

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

Karin Luize Mazur

**ENCAPSULAÇÃO DO DIETILDITIOCARBAMATO DE SÓDIO
EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS VIA DUPLA
EMULSÃO**

Florianópolis
2017

Karin Luize Mazur

**ENCAPSULAÇÃO DO DIETILDITIOCARBAMATO DE SÓDIO
EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS VIA DUPLA
EMULSÃO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Cláudia Sayer

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Alexandra Valério

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Manzur, Karin Luize

Encapsulação do Dietilditiocarbamato de Sódio em Nanopartículas Lipídicas Sólidas Via Dupla Emulsão / Karin Luize Manzur ; orientador, Pedro Henrique Hermes de Araújo ; coorientadora, Claudia Sayer ; coorientadora, Alexandra Valério. Florianópolis, SC, 2017.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Nanopartículas lipídicas sólidas. 3. Dietilditiocarbamato de sódio. 4. Nanoencapsulação. 5. Fármacos hidrofílicos. I. De Araújo, Pedro Henrique Hermes. II. Pedro Henrique Hermes, Helton José. III. Soares, Cintia. IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

Karin Luize Mazur

**ENCAPSULAÇÃO DO DIETILDITIOCARBAMATO DE SÓDIO
EM NANOPARTICULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS VIA DUPLA
EMULSÃO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química, e aprovada em sua forma final pelo Programa de pós-graduação em Engenharia Química.

Local, 13 de julho de 2017.

Prof^a. Cíntia Soares, Dr^a.
Coordenador do Curso

Prof. Pedro Henrique Hermes de Araújo, Dr.
Orientador

Alexsandra Valério, Dr.^a
Coorientadora

Prof.^a Cláudia Sayer, Dr.^a
Orientadora

Banca Examinadora:

Prof^a. Débora de Oliveira , Dr^a.

Dr. Paulo Emílio Feuser

Dr. Guilherme Zin

Dedico este trabalho aos meus amados
pais, sem eles eu não seria nada.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente a Deus por sempre ter me iluminado em minhas escolhas e principalmente por ter me dado forças para estar aqui hoje.

Agradeço aos meus pais, meus amados pais. Obrigada por todo apoio, amor incondicional, principalmente por ter me ajudado a realizar os meus sonhos e ter me ensinado a ser a pessoa íntegra que sou hoje.

Aos meus orientadores, Prof. Pedro e Prof^a. Cláudia pela confiança depositada, pelos ensinamentos e pela flexibilidade que sempre foi oferecida. Agradeço também de uma forma muito especial a Dr^a. Alexssandra, não existem palavras suficientes para demonstrar a minha gratidão por você ter me ajudado tanto e principalmente pela contribuição acadêmica que sou hoje.

Queria agradecer (e muito), as minhas colegas de trabalho Luana, Shanda e Dani por terem me ajudado muito durante o mestrado, não existem palavras.

Aos meus colegas do LCP pela ajuda que sempre foi oferecida desde o início, pelo carinho e compartilhamento de ideias. Obrigada por terem tornado o ambiente de trabalho algo agradável e feliz.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, Universidade Federal de Santa Catarina (LCME-UFSC) pelas imagens de TEM.

A Central de Análises do Departamento de Engenharia Química pelas análises de DSC e FTIR.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Obrigada também meus queridos familiares, que mesmo longe, sempre me incentivaram. Tudo começa em nossas famílias e devemos celebrar juntos, afinal, aquilo que era um sonho, hoje é mais um objetivo conquistado.

Agradeço a todos que de alguma forma estiveram comigo me ajudando ou não e foi principalmente com estes que aprendi muito sobre mim mesma, a vida e sobre pessoas, o que possibilitou ainda mais meu amadurecimento.

Obrigada!

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão, perder com
classe e vencer com ousadia, porque o
mundo pertence a quem se atreve, e a vida é
muito para ser insignificante.”*
(Charles Chaplin)

RESUMO

Trabalhos na literatura veem demonstrando a eficiência do DETC (Dietilditiocarbamato de Sódio) em diversas aplicações, seja pela sua atividade antiparasitária, antitumoral e até mesmo no tratamento de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Por se tratar de um fármaco hidrofílico, sua encapsulação é o maior desafio deste trabalho. As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são amplamente estudadas, principalmente pelas suas características como liberação sustentada de recursos, solubilização de ativos lipofílicos, aumento da estabilidade físico-química de moléculas lábeis, minimização dos efeitos colaterais entre outros. As NLS chamam a atenção para o encapsulamento e a liberação de drogas hidrofílicas, porque elas possuem uma baixa citotoxicidade e possibilidade de obtenção em sistemas isentos de solventes. Neste contexto, este trabalho propõe a encapsulação do fármaco hidrofílico DETC em nanopartículas lipídicas sólidas com a avaliação da eficiência de encapsulamento utilizando cera de abelha e Crodamol como lipídeo sólido e líquido respectivamente. Diversos trabalhos na literatura já demonstram que, a combinação de lipídeos líquidos e sólidos na encapsulação de compostos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos, são capazes de formar uma rede com uma menor cristalinidade, o que acaba acarretando uma maior interação entre o composto encapsulado e matriz lipídicas e conseqüentemente ocorrendo um aumento na eficiência de encapsulação. As nanopartículas foram obtidas utilizando a metodologia de emulsão dupla, que é muito utilizada na literatura para encapsulação de compostos hidrofílicos, onde as mesmas apresentaram morfologia esférica e diâmetro de tamanho médio entre 189 e 290 nm e um índice de polidispersão entre 0,2 e 0,3. Utilizando a mesma técnica, foi possível encapsular um corante também hidrofílico (Sulforadamina 101), comprovando assim a eficiência da metodologia. As NLS obtidas pela combinação dos dois lipídeos (cera de abelha e crodamol) apresentaram uma alta eficiência de encapsulação (79%) e uma grande estabilidade, comparada as formulação, utilizando apenas um lipídeo, após 30 dias de armazenamento a 4° C. A caracterização por FTIR mostrou de forma qualitativa a incorporação do fármaco nas NLS de cera de abelha e crodamol.

Palavras-chave: Nanopartículas lipídicas sólidas; Dietilditiocarbamato de sódio; Nanoencapsulação; Fármacos hidrofílicos; Cera de abelha.

ABSTRACT

Solid lipid nanoparticles (SLN) are widely studied, mainly due to characteristics as sustained release of resources, solubilize lipophilic actives, increase a physical and chemical stability labile molecules, minimize side effects among others. The SLN call attention to encapsulation and the release of hydrophilic drugs because they have low cytotoxicity and a possibility of obtaining in solvent free system. In this context, this work proposes an encapsulation of the hydrophilic drug sodium diethyldithiocarbamate (DETC) in solid lipid nanoparticles with the evaluation of encapsulation efficiency by using beeswax and Crodamol as lipid phase. The nanoparticles were obtained by double emulsion method, and nanoparticles with spherical morphology and average size diameter between 189 to 390 nm were obtained. SLN nanoparticles obtained using two lipids showed higher encapsulation efficiency (79%) and higher stability after 30 days of storage period at 4 °C.

Key words: Solid lipid nanoparticles; Diethyldithiocarbamate; Nanoencapsulation; Hydrophilic drugs; Beeswax.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema de formação de nanopartículas lipídicas sólidas utilizando o processo de emulsificação-ultrasonicação.....	21
Figura 2- Estrutura dos compostos: a) Dietilditiocarbamato de sódio, b)Ditiocarbamato, c) Dissulfiram.....	39
Figura 3- Fluxograma do processo de preparação das nanopartículas lipídicas sólidas.....	45
Figura 4- Curva padrão para quantificação do DETC em água DDI.	49
Figura 5- Características do pico de absorção do DETC em (a) pH ácido (abaixo de 6) e (b) pH básico (acima de 7.4).....	52
Figura 6 – Análise termogravimétrica para o DETC na variação de temperatura de 25 à 150 °C:.....	56
Figura 7- Distribuição do tamanho das nopartículas lipídicas sólidas: (a), imagens de TEM para as NLS obtidas pela mistura de cera de abelha e crodamol (50/50) e 3% de DETC (NLS 7) com relação a fase orgânica (b) e microscopia de fluorescência da sulforadamina 101 hidrofílica em nanopartículas lipídicas sólidas com aumento de 100X (c).....	64
Figura 8 - Espectros de FTIR de Crodamol GTCC (a), DETC (b), cera de abelha pura (c), e NLS sem fármaco (d) e nanopartículas obtidas nas condições do experimento 7 (e).....	65
Figura 9- Termograma de calorimetria diferencial de varredura para nanopartículas lipídicas sólidas sem a presença de DETC (a) e para nanopartículas sólidas carregadas com DETC obtidas nas condições do experimento 7 (Tabela 1) (b),.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Formulações básicas das nanopartículas lipídicas sólidas de cera de abelha e crodamol preparadas com duas combinações diferentes de surfactantes.....	46
Tabela 2- Curva de calibração para o DETC em água DDI.....	51
Tabela 3- Resultados do ensaio de estabilidade em diferentes pH para o DETC em solução aquosa.....	52
Tabela 4 - Estabilidade do DETC em solução aquosa com relação ao aumento de temperatura em pH 7.0.....	55
Tabela 5- Resultados para os testes preliminares utilizando ácido esteárico como matriz lipídica na preparação das nanopartículas lipídicas sólidas.....	58
Tabela 6- Resultados para os testes preliminares utilizando cera de carnaúba como matriz lipídica na preparação das nanopartículas lipídicas sólidas.....	58
Tabela 7 - Formulação das nanopartículas lipídicas sólidas e Diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas lipídicas sólidas obtidas via dupla emulsão.....	61
Tabela 8- Resultados calorimétricos de varrimento diferencial da temperatura de picos de fusão (T_m) e entalpias (ΔH_m) para nanopartículas lipídicas sólidas sem a presença de DETC e para nanopartículas sólidas carregadas e não carregadas com DETC.....	66
Tabela 9 - Eficiência de encapsulação do DETC nas nanopartículas lipídicas sólidas.....	68
Tabela 10 - Estabilidade das nanopartículas lipídicas sólidas ao armazenamento (4 °C) em relação a variação do tamanho médio das partículas (D_p) e índice de polidispersão (PdI) em 30 dias de armazenamento.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A/O/A** - água/óleo/água
C₁₅H₃₁COOC₃₀H₆₁ - Formula empírica da cera de abelha
CME- Concentração mínima efetiva
CMT- Concentração mínima toxica
DETC- Dietilditiocarbamato de Sódio Tri-hidratado
DDI- Água deionizada
DP- Diâmetro medio
DSC- Calorimetria Diferencial de Varrimento
EE- Eficiência de encapsulação
FTIR- Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
HLB- Balanço Hidrofílico-Lipofílico
NLC- Veículos lipídicos nanoestruturados
NLS- Nanopartículas lipídicas sólidas
NP- Nanopartículas poliméricas
O/A/O- óleo/ água/óleo
IPD- Índice de Polidispersão
SLC- Sistemas de liberação controlada
TEM- Microscópio de transmissão eletrônica
TGI - trato gastrintestinal
T_m–Temperatura de fusão
UV-Vis- Espectroscopia no ultra-violeta
ΔH_m - Entalpia de Fusão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 OBJETIVOS.....	27
1.1.1 Objetivo Geral.....	27
1.1.2 Objetivos Específicos.....	27
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1 Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS).....	29
2.2 Fase lipídica: Cera de Abelha e Crodamol (Triglicerídeo de ácido caprico/caprilico).....	34
2.3 Encapsulação de fármacos hidrofílicos em NLS.....	36
2.4 Dietilditiocarbamato de Sódio (DETC).....	38
2.5 Considerações finais a respeito do estado da arte.....	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.0 Material.....	43
3.1 Preparação das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS).....	43
3.2 Caracterização e Ensaio de estabilidade para o Dietilditiocarbamato de Sódio Trihidratado (DETC).....	46
3.2.1 Solução padrão de DETC.....	46
3.2.2 Linearidade.....	46
3.2.3 Estudo do DETC em relação a sua estabilidade térmica e a diferentes pHs.....	47
3.3 Caracterização das Nanopartículas lipídicas sólidas.....	47
3.3.1 Diâmetro Médio (Dp) e Índice de Polidispersão (PDI).....	47
3.3.2 Eficiência de encapsulação.....	47
3.3.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier-FTIR.....	48
3.3.4 Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC).....	48
3.3.5 Ensaio de Fluorescência.....	48
3.3.6 Análise termogravimétrica.....	49
3.4 Morfologia.....	49
3.4.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1 Caracterização e Avaliação da estabilidade do DETC	51
4.1.1 Linearidade.....	51
4.1.2 Resultados para os ensaios de estabilidade realizados com o DETC.....	52
4.2 Obtenção e caracterização das Nanopartículas lipídicas sólida.....	59

4.3 Estudo Térmico e Cristalinidade das nanopartículas lipídicas sólidas.....	66
4.4 Eficiência de Encapsulação.....	67
4.5 Estudos de estabilidade das nanopartículas lipídicas sólidas.....	69
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
REFERÊNCIAS.....	75

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas coloidais de veiculação de fármacos, tais como micro e nanocápsulas, micro e nanopartículas, lipossomas e mi-croemulsões, têm sido empregados com sucesso na área farmacêutica pelo fato de poderem proporcionar um microambiente restrito com propriedades físico-química diferentes daquelas apresentadas pelo meio externo, sendo capazes de compartimentalizar eficientemente diversos grupos de substâncias de uso terapêutico (ALMEIDA; SOUTO, 2007).

Vários estudos vêm relatando o carregamento de drogas hidrofílicas em nanopartículas lipídicas sólidas, as mesmas têm sido utilizadas como veículos de fármacos para prevenir a degradação enzimática, promover a permeabilidade através das membranas celulares e também melhorar a biodisponibilidade de fármacos hidrofílicos (GONÇALVES et al., 2015; LUO et al., 2015; SOUTO et al., 2011, MEHNERT; MÄDER, 2012). Técnicas de encapsulação com elevada eficiência tem sido um desafio, principalmente, devido à instabilidade do fármaco e devido à rápida partição do mesmo na fase aquosa externa ao usar emulsões simples(PERES et al., 2016; COHEN-SELA et al., 2009; IQBAL et al., 2015; SEVERINO et al., 2014).

O desenvolvimento de sistemas carreadores de produtos farmacêuticos ainda é um grande desafio. Durante muitos anos foram incorporados fármacos em polímeros inertes ou não erodíveis; e um grande inconveniente do uso destes dispositivos era a não biodegradabilidade dos mesmos, requerendo remoção cirúrgica após o esgotamento do fármaco. Neste contexto, desde a década de 1990, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são uma promissora alternativa para o carregamento de fármacos, uma vez que podem ser adaptadas a diversas vias de administração e veicular vários compostos, como, proteínas, fármacos, agentes de imagiologia e material genético (JENNING; THUNEMANN; GOHLA, 2000; PINTO, 2013).

Lipídeos e surfactantes biocompatíveis são comumente usados na preparação de dispersões tornando esse tipo de sistema atrativo por apresentar baixa toxicidade durante sua degradação além de possibilitar a incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas (KÜLKAMP-GUERREIRO; POHLMANN; GUTERRES, 2005; PERES, 2012a; SOUTO et al., 2011a).

A incorporação de fármacos com solubilidade limitada depende também das características físico-química da matriz sólida bem como do surfactantes incorporado (PERES, 2012). Com isso, tanto a escolha dos lipídeos e surfactantes como o tipo e a concentração afetam o tamanho

de partícula, estabilidade do fármaco e perfil de liberação do mesmo (KHERADMANDNIA et al., 2010).

Na literatura é possível encontrar diversos métodos de preparação de nanopartículas lipídicas sólidas, cada qual com suas vantagens e desvantagens. Infelizmente, na sua grande maioria, se utilizam de solventes orgânicos, o que acaba acarretando num aumento da toxicidade das nanopartículas ou até mesmo por conta dos resíduos de solvente que ficam ao final do processo de encapsulação (PERES, 2012b; PRATA, 2011).

Normalmente, o encapsulamento de fármacos hidrofílicos é obtido pela técnica de dupla emulsão ou miniemulsão inversa, que também se utilizam com frequência de solventes orgânicos, desta forma, preparar estas nanopartículas utilizando água como solvente é um dos desafios deste trabalho. (PERES et al., 2012)

Cera de abelha, lipídeo utilizado como matriz neste trabalho, consiste em uma combinação de ésteres de ácidos graxos e álcoois de cadeia longa ($C_{15}H_{31}COOC_{30}H_{61}$), estrutura cristalina, granular, cuja cristalização depende da temperatura. Apresenta ponte de fusão entre 63-65 °C, índice de acidez entre 7,2-7,4 e densidade próxima da água (AMIN et al., 2017; FRATINI et al., 2016). A cera de abelha tem vasta aplicação nas áreas alimentícia e farmacêuticas e recentemente, o interesse dos pesquisadores dirigiu-se sobre as propriedades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Candida albicans* e *Aspergillus Níger* (AMIN et al., 2017; FRATINI et al., 2016). O Crodamol, segundo lipídeo utilizado também na formulação das nanopartículas deste trabalho, é uma combinação dos triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico, que são triglicérides de cadeia média (TCM) constituída principalmente por ésteres de ácidos caprílicos (C8) e cápricos (C10) derivados do óleo de coco. São considerados toxicologicamente e dermatologicamente inócuos e classificados como *Generally Recognized As Safe* pelo *Food and Drug Administration* (HU et al., 2006) (YE et al., 2016).

Dietilditiocarbamato de sódio (DETC) é um fármaco hidrofílico com uma forte atividade antioxidante (PAUL B; CHAPMAN; M. C. PROBINE, 1959). Muitas publicações relatam sua aplicação de forma oral ou através de membranas bacterianas (CELES et al., 2016) no tratamento de doenças como a leishmaniose (CELES et al., 2016; KHOURI et al., 2010), AIDS (HERSH et al., 1991; SUNDERMAN, 1991) e câncer (RAHDEN-STARON et al., 2012). No entanto, por se tratar de um composto hidrofílico, sua encapsulação ainda é pouco reportada na literatura.

Diante do exposto, neste trabalho foi explorada a estabilidade e encapsulação do DETC via dupla emulsão, com a finalidade de promover ainda mais a biodisponibilidade do fármaco através da encapsulação em nanopartículas lipídicas sólidas utilizando cera de abelha e crodamol como fase lipídica, além de preencher a lacuna da literatura em relação a encapsulação de fármacos hidrofílicos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho consiste na avaliação da estabilidade do DETC com relação a elevação de temperatura e também com relação a diferentes pH, para posteriormente encapsular e avaliar o do processo de encapsulação e caracterização do Dietilditiocarbamato de Sódio Trihidratado (DETC) em nanopartículas lipídicas solidas utilizando cera de abelha e crodamol como fase lipídica.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Sintetizar nanopartículas lipídicas sólidas via dupla emulsão em sistema livre de solvente;
- b) Encapsulação do fármaco Dietilditiocarbamato de Sódio Trihidratado em nanopartículas lipídicas sólidas de cera de abelha e crodamol;
- c) Ensaio de estabilidade do Dietilditiocarbamato de Sódio em diferentes pH e em diferentes temperaturas
- d) Caracterização das nanopartículas carregadas com Dietilditiocarbamato de Sódio Trihidratado em relação ao diâmetro de partículas, índice de polidispersão, eficiência de encapsulação, estabilidade sob armazenagem, propriedades térmicas e cristalinidade;
- e) Análise de fluorescência das nanopartículas carregadas com um corante também hidrofílico.

Para facilitar a apresentação e compreensão, este trabalho foi estruturado em 5 capítulos, de forma a apresentar em um único capítulo os fundamentos teóricos necessários para o desenvolvimento deste trabalho. Os procedimentos adotados, os resultados, discussões e conclusões foram divididos por assunto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste Capítulo será apresentada uma revisão da literatura acerca dos assuntos pertinentes a este trabalho. Primeiramente, os conceitos de nanopartículas lipídicas serão abordados, relatando algumas técnicas de preparo das nanopartículas lipídicas sólidas. Posteriormente uma revisão em relação ao fármaco e aos lipídeos utilizados neste trabalho.

2.1 Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)

A nanotecnologia é um ramo promissor e que vem sendo amplamente estudado onde é definida como a criação, utilização e manipulação de materiais, dispositivos ou sistemas em escala nanométrica. A nanoencapsulação é um importante campo da nanotecnologia, que envolve o aprisionamento de agentes bioativos dentro de materiais de suporte, com uma dimensão em nanoescala (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012).

Diante disto, desenvolver sistemas carreadores de fármacos é um grande desafio para ciência. Com os avanços na nanotecnologia das últimas décadas, pode-se desenvolver e estruturar novas técnicas visando à liberação controlada de compostos ativos. A produção de nanopartículas (sejam poliméricas, lipossomas ou lipídicas) tem sido alvo de grande atenção das empresas médicas e farmacêuticas, principalmente no que tange o sentido da utilização de fármacos com uma baixa biodisponibilidade, baixa estabilidade ou também, aplicação de fármacos que apresentam irritação local como efeito colateral. Assim, estas desvantagens podem ser superadas pela formulação adequada e redução de tamanho de partícula utilizando as ferramentas da nanotecnologia moderna, uma vez que esta proporciona uma entrega dirigida e ainda liberação controlada, melhorando a segurança e eficácia do fármaco uma vez que possibilita a proteção do composto ativo (KUMAR et al., 2017; PERES, 2012)

Tornou-se cada vez mais evidente que o desenvolvimento de novas formulações ou sistemas de liberação de fármacos não é suficiente para assegurar o progresso da terapia medicamentosa (MEHNERT; MÄDER, 2012). Os principais motivos da falha terapêutica incluem concentração de fármaco insuficiente devido à má absorção, metabolismo rápido e eliminação (por exemplo, peptídeos, proteínas), toxicidade aguda e crônica presente em alguns veículos de liberação, falta de estabilidade físico-química do fármaco e a elevada flutuação dos níveis plasmáticos devido à biodisponibilidade imprevisível após a

administração peroral, incluindo a influência dos alimentos nos níveis plasmáticos (HUANG; BRAZEL, 2001). Uma estratégia promissora para superar esses problemas envolve o desenvolvimento de sistemas portadores de fármacos adequados.

As NLS vêm ganhando cada vez mais espaço e estão sendo investigadas como sistemas carreadores de compostos lipofílicos em produtos farmacêuticos, cosméticos (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014; GARG; SINGH, 2011; GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2013) e, recentemente, vêm despertando interesse também na indústria alimentícia, isto por que mantêm a atividade biológica de compostos ativos e minimizam o impacto sobre as propriedades organolépticas dos alimentos (GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2013).

Muitos sistemas de nanopartículas baseados em matrizes biocompatíveis (polímeros, lipídios e óleos) veem sendo utilizados, o que pode ser eficiente para aumentar a biodisponibilidade dos compostos, aumentando a permeabilidade da droga ou a diminuindo os efeitos colaterais. Entre elas, as nanopartículas à base de lipídeos possuem a vantagem de ser o menos tóxico para aplicações *in vivo* e a possibilidade de uma liberação controlada do fármaco (entre outros compostos bioativos).

A liberação controlada partir de NLS já vem sendo estudada (GANESAN; NARAYANASAMY, 2017). O uso de lipídios sólidos em vez de óleos líquidos tornou-se mais vantajosa porque a mobilidade da droga em um lipídeo sólido deve ser consideravelmente menor em comparação com um óleo líquido. (MEHNERT; MÄDER, 2012; MÜHLEN; SCHWARZ; MEHNERT, 1998).

Neste contexto, desde a década de 1990, as NLS são uma promissora alternativa, uma vez que podem ser adaptados a diversas vias de administração e podem veicular vários compostos, como, proteínas, fármacos, agentes de imagiologia e material genético (PINTO, 2013). Lipídeos fisiológicos e surfactantes biocompatíveis são comumente usados na preparação de dispersões tornando esse tipo de sistema atrativo por apresentar baixa toxicidade durante a degradação das NLS (PERES et al., 2016). Trata-se de sistemas bem adequados para encapsulação de compostos hidrofóbicos e em comparação aos sistemas tradicionais, tais como os já utilizados comercialmente em cremes, tinturas e emulsões, as NLS combinam vantagens como liberação controlada, estabilização por surfactantes biocompatíveis (iônicos ou não-iônicos), vasta variedade de lipídeos (ácidos, mono-, di- ou triglicerídeos, misturas de glicerídeos ou ceras) (KÜLKAMP-

GUERREIRO; POHLMANN; GUTERRES, 2005; SOUTO et al., 2011a). Sintetizadas a partir de fontes naturais, incluindo lipídeos, polissacarídeos e proteínas, as NLS possuem o objetivo de melhorar a solubilidade, estabilidade e principalmente a biodisponibilidade de fármacos (GONÇALVES et al., 2015; LUO et al., 2015; SOUTO et al., 2011).

Publicações vêm demonstrando a inúmeras vantagens presentes nas NLS perante outros portadores coloidais como: A possibilidade de uma liberação controlada e direcionada do fármaco, maior estabilidade para o composto, possibilidade de encapsulação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, a possibilidade da não utilização de solventes (MÄDER; MEHNERT; MÄDER, 2001).

Os primeiros estudos relatados na literatura sobre NLS reportam o desenvolvimento de partículas na busca por partículas intermediárias às nanopartículas poliméricas e nanoemulsões, que possuíssem uma liberação quase que instantânea do princípio ativo para o meio, mas que ainda fossem inferiores as nanopartículas poliméricas, que possuem uma liberação muito lenta tanto *in vitro* quanto *in vivo* (MENESES, 2016; SCHWARZ et al., 1994).

Existem duas gerações de nanopartículas lipídicas, a primeira geração são as nanopartículas de lipídeos sólidos (*solid lipid nanoparticle, NLS*) e a segunda geração os vetores lipídicos nanoestruturados (*nanostructured lipid carriers, NLC*). As NLS são constituídas apenas por lipídeos sólidos à temperatura ambiente, enquanto que os NLC apresentam uma mistura de lipídeos líquidos e sólidos (SILVA, 2015).

A primeira geração desenvolvida de NLS foi produzida pela dispersão do composto ativo em um lipídio sólido fundido seguido por um resfriamento para haver a incorporação das moléculas ativas entre as cadeias lipídicas (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014; MENESES, 2016). A segunda geração de partículas lipídicas, conhecida como veículos lipídicos nanoestruturados (NLC), consiste em uma mistura de um lipídio sólido mais um lipídio líquido, capazes de formar uma matriz sólida a temperatura ambiente, formando uma rede com menor cristalinidade e uma taxa maior de encapsulação, quando comparado ao uso de um único lipídeo sólido (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014; MENESES, 2016). Estudos mostram que a mistura lipídios líquidos e sólidos contornam com sucesso algumas limitações presentes em NLS quando se trata no carregamento de drogas, aumentando a eficiência de encapsulação (JENNING; THUNEMANN; GOHLA, 2000).

As NLS apresentam algumas vantagens com relação as nanopartículas poliméricas e o fato de a matriz lipídica ser produzida a partir de lipídios fisiológicos acaba por reduzir a toxicidade aguda e crônica bem como aumentar a biodisponibilidade das substâncias encapsuladas; apresentam elevada estabilidade ao longo do tempo; permitem obter uma liberação modificada das moléculas veiculadas; a matriz sólida confere proteção das moléculas contra degradações; devido à utilização de excipientes fisiológicos e biocompatíveis; elevada eficácia de encapsulação; facilidade de produção em larga escala; não é necessário recorrer ao uso de solventes orgânicos durante os processos de produção; baixo custo de produção; capacidade de direcionar as substâncias encapsuladas para locais alvo e excelente estabilidade físico-química, proporcionando maior proteção contra a degradação de fármacos lábeis (MEHNERT; MÄDER, 2012; SILVA, 2011; SOUTO et al., 2011). Na área farmacêutica, as NLS podem ser administradas por todas as vias oral, parenteral, cutânea, dérmica e ocular (SOUTO et al., 2011; WEBER; ZIMMER; PARDEIKE, 2014).

As NLS possuem uma estrutura bastante similar a das nanoemulsões, no entanto, o núcleo é formado por lipídios sólidos a temperatura ambiente e não por óleos líquidos, como nas nanoemulsões. Sendo assim, a solidez característica dos lipídeos que formam as NLS conferem uma menor mobilidade aos ativos neles incorporados, podendo assim sustentar, ou até mesmo controlar a velocidade de liberação destas substâncias (MÄDER; MEHNERT; MÄDER, 2001; SEVERINO et al., 2014).

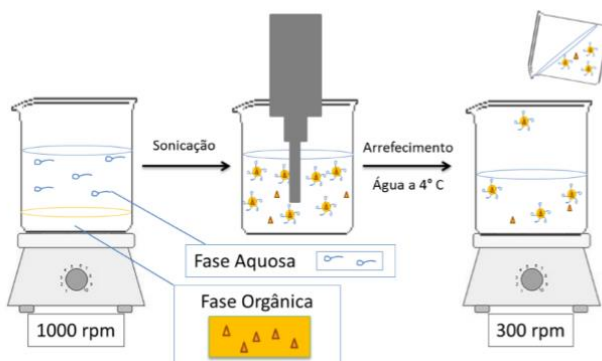
O uso comercial das NLS e NLC é na maioria das vezes de forma tópica, estes sistemas têm grande potencial de aplicação para as vias oral e parentérica. A biodisponibilidade oral dos fármacos pode ser melhorada graças à presença dos lipídeos, que melhoram a sua absorção no TGI. Por outro lado, as moléculas encapsuladas podem ser protegidas contra a degradação ao longo do TGI e a sua liberação pode ser controlada, o que reduz os efeitos secundários de alguns fármacos (PINTO, 2013; SILVA, 2015)

A morfologia das nanopartículas lipídicas é influenciada pela composição da formulação, no que diz respeito ao tipo de lipídeo(s), natureza química da substância ativa, tipo de agente(s) tensoativo(s), método de produção, capacidade de carga, rendimento de produção, eficiência de encapsulação e tamanho da partícula (SILVA, 2015), e independentemente do método de obtenção adotado, cada técnica exige o estudo de uma formulação de preparo, pois irá interferir diretamente

nas características das partículas finais (PERES et al., 2012; TAVEIRA, 2009).

Para a produção de NLS, pode ser utilizada a técnica de emulsificação-ultrasonicação para preparação das NLS, podem ser utilizadas duas técnicas, a partir do uso de solvente ou em sistema livre de solventes. Na técnica emulsificação- evaporação, uma emulsão inicial é formada pela mistura da fase lipídica, solvente orgânico, emulsionante e componente bioativo. A pré-emulsão é em seguida sonicada a temperatura acima do ponto de fusão do lipídio. Em seguida, as partículas sólidas lipídicas são formadas quando a nanoemulsão formada é submetida à água arrefecida contendo surfactante e agitação para evaporação do solvente (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012; MENESES, 2016). Na técnica emulsificação/ultrasonicação (Figura 1) não se faz necessário o uso de solvente orgânico, e a fase orgânica é composta pelo lipídio ou mistura de lipídios e o composto bioativo que são aquecidos a temperatura superior ao ponto de fusão do lipídio, enquanto a fase aquosa é composta por água e surfactante. As fases orgânica e aquosa são emulsionadas sob alta agitação, a emulsão obtida é sonicada em ultrassom, formando então uma nanoemulsão que será dispersa em água arrefecida para solidificação das nanopartículas (DAS et al., 2011; MENESES, 2016).

Figura 1: Esquema de formação de nanopartículas lipídicas sólidas utilizando o processo de emulsificação-ultrasonicação.



Fonte: (MENESES, 2016).

2.2 Fase lipídica: Cera de Abelha e Crodamol (Triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico).

A cera de abelha, lipídeo utilizado como matriz neste trabalho, é o resultado do processo metabólico liberado (excretado) através dos segmentos abdominais das abelhas operárias mais jovens (com idade entre 12 e 18 dias, ou seja, no final do período em que as abelhas atuam como enfermeiras). Em contato com o ar solidifica em escalas em que as abelhas modelam com as mandíbulas para construir os favos, adicionando pólen e própolis. Consiste em uma combinação de ésteres de ácidos graxos e álcoois de cadeia longa ($C_{15}H_{31}COOC_{30}H_{61}$). Possui estrutura cristalina, granular, cuja forma de cristalização é dependente da temperatura. É um isolante elétrico, funde entre 63-65 °C, amolece a partir dos 35°C, possui um índice de acidez entre 7,2-7,4 e densidade próxima da água (AMIN et al., 2017; FRATINI et al., 2016). A cera de abelha, pode ser de dois tipos, amarela e branca. A cera de abelha amarela tem um aroma semelhante ao mel e é frágil quando na fase sólida. Inversamente, a cera de abelha branca não possui aroma e apresenta-se mais flexível quando comparada com a cera de abelha amarela (ATTAMA; MÜLLER-GOYMANN, 2008).

Graças às suas propriedades protetoras hidrofóbicas, a cera de abelha está atualmente presente em diversas indústrias como cosméticos, alimentícia, farmacêuticas entre outras. Exatamente como o mel que ela contém, possui várias propriedades terapêuticas de grande interesse, sendo eficaz na cicatrização, inflamação e queimaduras. Recentemente, o interesse dos pesquisadores dirigiu-se até mesmo sobre as propriedades antimicrobianas da cera de abelha, alguns mostraram uma eficácia antimicrobiana contra o *Staphylococcus aureus* em geral, *Salmonella enterica*, *Candida albicans* e *Aspergillus Níger*, porém, ainda há poucos estudos na literatura focada apenas na ação do lipídeo (AMIN et al., 2017; FRATINI et al., 2016).

Um dos trabalhos relatados na literatura utilizando cera de abelha como lipídeo na produção de nanopartículas foi reportado por Namdariyan e colaboradores (2013), onde as nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) foram aprisionadas em microesferas de cera de abelha utilizando Tween-80 ou Tween-20 como surfactantes. O objetivo principal do trabalho foi obter nanopartículas estáveis a fim de aumentar o tempo de persistência e liberação controlada do composto em diferentes condições. As partículas foram devidamente caracterizadas e de acordo com os resultados apresentados pelos autores, a cera de abelha

protegeu as nanopartículas de óxido de zinco em ambiente indesejável e condição de armazenamento.

Kheradmandnia e colaboradores (2010) encapsularam o fármaco Cetoprofeno em NLS de cera de abelha e carnaúba combinadas, os autores relataram estudos utilizando Cetoprofeno, um composto com uma forte atividade anti-inflamatória e não esteroide comumente utilizado para tratamento de artrite reumatoide aguda, com meia-vida curta, fraca solubilidade em água, baixa biodisponibilidade e efeitos secundários no trato gastrointestinal. Os autores reportaram a encapsulação do Cetoprofeno em uma combinação de cera de carnaúba e cera de abelha, utilizando Tween-80 e lecitina do ovo como surfactantes, seguindo a técnica via microemulsão. Os resultados foram promissores e uma alta eficiência de encapsulação (97%) indicou uma boa compatibilidade entre o Cetoprofeno e o núcleo ceroso das NLS.

O Crodamol, segundo lipídeo utilizado também na formulação das nanopartículas deste trabalho, é uma combinação dos triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico (TACC), que são triglicérides de cadeia média (TCM) constituída principalmente por ésteres de ácidos caprílicos (C8) e cápricos (C10) derivados do óleo de coco. Os TCM são derivados de ácidos graxos completamente saturados e por isso a baixa viscosidade. Esses óleos fluidos adquirem excepcional estabilidade oxidativa e oferecem ótimo espalhamento como resultado de sua característica saturada. Devido ao tamanho da cadeia, os TACC apresentam excelente solubilidade em álcool e daí sua importância na aplicabilidade em produtos farmacêuticos. Esses compostos são considerados toxicologicamente e dermatologicamente inócuos e são classificados como Gras (*Generally Recognized As Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*). Os TACC são excelentes solventes de princípios ativos devido à sua composição estrutural. É recomendado como substituto do óleo mineral, usado como veículo ou diluente, por ser também inerte. A rota metabólica dos TCM no organismo é diferente daquela dos ácidos de cadeia longa. OS TCM são absorvidos diretamente no sistema digestivo, metabolizados no fígado e então transportados como ácidos graxos livres ligados à albumina. Os ácidos de cadeia longa, por outro lado são metabolizados no intestino e transportados como triglicérides reesterificados através do sistema linfático (MAPRIC, 2016).

Os portadores de lipídeos nanoestruturados (NLC), constituídos por um lipídeo sólido como matriz combinado com um lipídeo líquido são uma nova geração de nanopartículas lipídicas sólidas (MÄDER et al, 2001). Neste contexto, os triglicerídeos caprílico/caprico (GTCC) é

escolhido como lipídeo líquido na grande maioria dos trabalhos, pelas vantagens mencionadas acima e também por melhorar a retenção dos fármacos na estrutura da NLS, por diminuir a cristalinidade da matriz lipídica sólida (HU et al., 2006).

Ye et al, (2016) reportaram o uso do crodamol (GTCC) na encapsulação da fragrância de hortelã-pimenta através da polimerização interfacial do diisocianato de isoforona (IPDI) e hexametileno diamina (HMDA) numa nanoemulsão, na qual a fragrância foi combinada com / sem triglicérido caprílico / cáprico (GTCC). Os resultados mostraram que a adição de GTCC pode reduzir significativamente os tamanhos de nanocápsulas e melhorar a distribuição de tamanho das nanocápsulas. Sob condições otimizadas, as nanocápsulas combinadas com GTCC resultantes mantiveram uma boa estabilidade física, enquanto que a dispersão de nanocápsulas sem foi fisicamente separada num curto espaço de tempo. Além disso, a eficiência de encapsulação das nanocápsulas preparadas com GTCC atingiram cerca de 81% com um carregamento elevado de 16%

Hu et al,(2006), utilizaram o método de difusão com solvente para encapsulação do propionato de clobetasol em NLC. A monostearina (MS) e os triglicéridos caprílico/cáprico (GTCC) foram escolhidos como lipídeos sólidos e lipídeos líquidos respectivamente. A metodologia utilizada de difusão com solvente em sistema aquoso obteve êxito para preparar o NLC de monoestearina. Comparado com SLN, o NLC mostrou capacidade melhorada de carga de fármaco e uma boa capacidade para reduzir a expulsão de fármaco durante o armazenamento. As taxas de libertação de fármaco da NLC aumentaram com o aumento do teor do GTCC na formulação. Estes resultados indicaram que o NLC obtido poderia potencialmente ser explorado como um transportador com capacidade de carga de fármaco melhorada e propriedades controladas de libertação de fármaco controlando a temperatura de produção do método de difusão com solvente e o teor de lipídeos líquidos em nanopartículas bem como uma maior estabilidade durante o armazenamento.

2.3 Encapsulação de fármacos hidrofílicos em NLS

Vários estudos vêm relatando o carregamento de drogas hidrofílicas em nanopartículas lipídicas sólidas, as mesmas têm sido utilizadas como veículos de fármacos para prevenir a degradação enzimática, promover a permeabilidade através das membranas celulares e também melhorar a biodisponibilidade de fármacos hidrofílicos. As

técnicas comumente utilizadas para encapsulação de compostos hidrofílicos não são vantajosas, a encapsulação com elevada eficiência de encapsulação tem sido um desafio, principalmente, devido à instabilidade do fármaco por causa da rápida partição do mesmo na fase aquosa externa ao usar emulsões simples (BECKER PERES et al., 2016a; COHEN-SELA et al., 2009; IQBAL et al., 2015; SEVERINO et al., 2014). Normalmente, o encapsulamento de fármacos hidrofílicos é obtido pela técnica de dupla emulsão ou miniemulsão inversa, que utilizam com frequência solventes orgânicos o que pode gerar problemas com relação à toxicidade devido a presença de resíduos de solventes. Entretanto, alguns trabalhos já foram publicados em relação à avaliação da técnica sem a utilização de solventes orgânicos (PERES et al., 2012).

As emulsões duplas são sistemas complexos, também chamados de "emulsões de emulsões", nas quais as gotículas da fase dispersa contêm um ou mais tipos de gotículas dispersas pequenas. As emulsões duplas têm o potencial para encapsulação tanto de fármacos hidrofóbicos como hidrofílicos, cosméticos, alimentos e outros produtos de alto valor. As técnicas baseadas em emulsões duplas são comumente usadas para o encapsulamento de moléculas hidrófilas, que sofrem de baixa eficiência de encapsulamento (IQBAL et al., 2015).

Seguindo a técnica livre de solventes, a dupla emulsão é formada onde a primeira emulsão é preparada a partir da emulsificação da fase interna aquosa contendo o fármaco hidrofílico e lipídio fundido, ambos acima da temperatura de fusão do lipídio, em presença de um surfactante de baixo balanço hidrofílico-lipofílico (HLB), onde, com auxílio de uma sonda de ultrassom são sonicados formando a primeira emulsão água em óleo. Em seguida, uma solução aquosa de surfactante de alto HLB, é adicionada à primeira emulsão e sonicada para formação da segunda emulsão (água em óleo em água). Para promover a rápida solidificação do lipídio, a dupla emulsão é adicionada em água destilada resfriada a 2°C sob agitação (PERES et al., 2012).

Severino et al, (2014), utilizaram a técnica de dupla emulsão água em óleo em água (A/O/A), para a nanoencapsulação da insulina. A metodologia foi escolhida para evitar que a alta temperatura, levasse a desnaturação da enzima ou alteração das propriedades da insulina. Os autores reportaram testes utilizando Softisan® 100 como lipídeo e Span® 80 e Lipoid® S75 como surfactantes. Ao final do trabalho, os autores relataram que o tamanho das partículas foi importante na avaliação da estabilidade de sistemas coloidais, sendo que estes variam entre 294,6

nm e 627 nm, com eficiência de encapsulação de 38,39% a 81,20%, respectivamente.

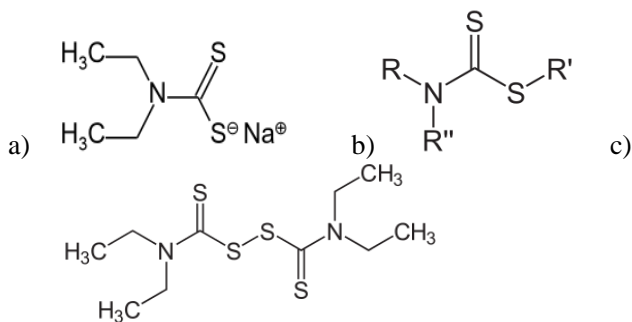
Peres, (2016) e colaboradores avaliaram a preparação de nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com um composto hidrófilo pela técnica de dupla emulsão sem a utilização de solvente orgânico. O objetivo principal foi investigar a influência de importantes variáveis do processo e formulação, como composição lipídica, tipo de surfactante, parâmetros de sonicação e condições de solidificação lipídica sobre as características físico-químicas da dispersão de SLN. Desta forma, o tamanho de partícula e a polidispersividade resultantes foram principalmente influenciados pela quantidade de lipídeos e pelo tensoativo utilizado. O tamanho de partícula mais pequeno (277 nm) foi obtido quando a lecitina foi utilizada em conjunto com Tween 80 como surfactantes. Esta combinação também resultou em nanopartículas com maior estabilidade, mostrando diminuição significativa de tamanho de partícula nem agregação de partículas e sedimentação. A técnica proposta, que foi previamente utilizada para preparar micropartículas lipídicas sólidas, demonstrou ser um método eficaz para carregar compostos hidrófilos e hidrofóbicos, com uma eficiência de encapsulação superior a 60% e 95% para compostos hidrofílicos e hidrofóbicos, respectivamente.

2.4 Dietilditiocarbamato de Sódio (DETC)

Os ditiocarbamatos são compostos contendo nitrogênio e enxofre, são comumente usados em farmacologia, medicina e agricultura. São quelantes metálicos à base de enxofre que contêm um grupo funcional ditiocarboxílico conjugado com um grupo amino secundário alifático. Os ditiocarbamatos são conhecidos por exercer efeitos pró-oxidantes e antioxidantes tanto em sistemas celulares como biológicos. Suas aplicações biológicas incluem uso generalizado como inseticidas agrícolas, herbicidas e fungicidas (MATIAS et al., 2012).

O Dietilditiocarbamato de Sódio (DETC) é o principal metabólito do dissulfiram, onde este é um medicamento usado no tratamento do etilismo (RAHDEN-STARON et al., 2012).

Figura 2: Estrutura dos compostos: a) Dietilditiocarbamato de sódio, b) Ditiocarbamato, c) Dissulfiram .



Fonte: Autor

O Dissulfiram foi usado em todo o mundo principalmente para terapia de aversão ao álcool desde a década de 1950, embora a razão da sua eficácia não havia sido compreendida até muitos anos depois (SKROTT; CVEK, 2012). Dr. E. Lew Lewison descobriu outra aplicação clinicamente importante do dissulfiram em 1977, ele observou remissão completa de um câncer de mama metastático em um paciente com alcoolismo grave que fazia uso deste medicamento. A atividade anticancerígena do dissulfiram foi confirmada em estudos adicionais quando foi utilizado para suprimir a progressão de cânceros induzidos quimicamente no intestino e bexiga em ratos. Além disso, em um ensaio clínico de fase II controlado por placebo, o principal metabolito de dissulfiram, o DETC, foi usado com sucesso como um adjuvante na terapia para câncer de mama não metastático e de alto risco (RAHDEN-STARON et al., 2012; SKROTT; CVEK, 2012).

Um dos primeiros trabalhos utilizando DETC foi publicado por Callan Henderson em 1929, onde o fármaco foi empregado pela primeira vez em calorimetria de comparação para a determinação quantitativa do cobre (II). O DETC quando complexado com cobre (II) dá origem a um quelado de cor marrom amarelado. Jacintho e colaboradores (1967), utilizaram o DETC na determinação de cobre em plantas e solos, concluindo que a utilização do mesmo é eficiente para análise deste tipo de metal.

Sunderman (1991) descreve em sua publicação uma breve história com relação ao DETC. O desenvolvimento do dietilditiocarbamato de sódio como agente terapêutico havia começado a

cerca de 35 anos, quando os interesses da pesquisa estavam, em grande parte, preocupados com os riscos de exposição ao níquel e em particularmente ao níquel-carbonilo. Durante a Segunda Guerra Mundial, tornou-se relevante o estudo com relação à exposição ao níquel-carbonilo, um gás extremamente tóxico que apresentava um grave perigo para a saúde. Desde então, a eficácia terapêutica do DETC tem sido relatada para muitos distúrbios, incluindo: envenenamento com níquel, cádmio, tálio, cobre e mercúrio, carcinogênese experimental de níquel, proteção contra danos à medula óssea, tratamento de candidíase em animais experimentais, doença de Wilson, lúpus eritematoso sistêmico e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Sunderman acrescenta que havia sido observado durante testes em alguns pacientes doentes com a síndrome da imune insuficiência adquirida (AIDS) administrados com DETC onde a progressão da infecção por HIV-1 havia sido inibida quando o fármaco era administrado por via intravenosa ou oral, consequentemente havendo uma melhora no estado clínico e imune do paciente.

Dietilditiocarbamato de sódio é um composto organossulforado ($\text{NaS}_2\text{CN}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$), hidrofílico com forte atividade antioxidante e capacidade quelante. É um composto amplamente utilizado como inibidor enzimático, fungicida e por ser tratar de um ligante inorgânico comum, é muito utilizado em algumas técnicas para a detecção e estimativa de metais utilizando métodos espectrofotométricos (PAUL B; CHAPMAN; M. C. PROBINE, 1959), sendo obtido através da reação entre dissulfeto de carbono com dietilamina na presença de hidróxido de sódio através da reação:



Khoury et al., (2010), avaliaram a aplicação do fármaco DETC para lesões causadas por leishmaniose. Os autores demonstraram que o DETC, um inibidor de superóxido dismutase, aumenta a morte de parasitas por macrófagos *in vitro* e diminui o tamanho da lesão e a carga parasitária *in vivo*. O tratamento da leishmaniose ainda depende de drogas com efeitos adversos potencialmente graves, Celes et al., (2016) reportaram o uso do DETC em formulação tópica de membranas de celulose bacteriana (BC) o fármaco, considerado inibidor de superóxido dismutase 1. Os macrófagos infectados com *Leishmania* expostos ao BC-DETC resultaram na matança das parasitas, sem efeitos tóxicos pronunciados para as células hospedeiras. A aplicação tópica de BC-

DETC diminuiu significativamente o tamanho da lesão, a carga parasitária e a resposta inflamatória no local da infecção. As membranas BC-DETC promovem a morte de parasitas em macrófagos humanos infectados com *L. braziliensis*.

2.5 Considerações finais a respeito do estado da arte

Dependendo da sua solubilidade em água, cada fármaco possui um perfil diferente e único de liberação e de ação no alvo. Os compostos pouco (ou muito) solúveis em água, assim como os que apresentam sérios efeitos colaterais, requerem uma tecnologia para a sua liberação em um alvo-específico. Em função destas correlações, a absorção desses no organismo pode ser melhorada pelo aumento da velocidade de dissolução do fármaco através do aumento da sua área superficial. Logo, encontrar metodologia eficiente para contornar este problema é de extrema importância.

É possível encontrar diversos trabalhos na literatura mostrando a encapsulação de compostos hidrofílicos, porém, alcançar uma elevada eficiência de encapsulação se tornou um grande desafio.

Existem diversos relatos na literatura utilizando o fármaco DETC em diversas aplicações, sejam elas no tratamento da intoxicação por níquel carbonilo, câncer, mas ainda não existe na literatura trabalhos encapsulando este fármaco para melhorar sua biodisponibilidade e sua estabilidade.

Portanto, desenvolver sistemas nanocarreadores pode ser considerada uma interessante abordagem para explorar as propriedades clínicas.

Baseado nestas considerações, as seguintes seções da presente dissertação apresentam os resultados obtidos referente ao estudo da encapsulação do fármaco hidrofílico DETC em nanopartículas lipídica sólidas, avaliando sua eficiência de encapsulação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.0 Material

No desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados ácido esteárico (Vetec, puro), cera de carnaúba em flocos (GM ceras, puro) e uma combinação de crodamol GTCC (Alpha Química, puro) e cera de abelha branca em flocos (GM CERAS, pura) para preparação das nanopartículas lipídicas sólidas. Como surfactantes utilizou-se lecitina de soja (Alfa Aesar) e polioxietileno-20-sorbitano monooleato (Tween 80, Vetec,). Como marcador fluorescente hidrofílico Sulforadamina 101 (SR-101, Sigma–Aldrich). O fármaco dietilditiocarbamato de sódio tri-hidratado (VETEC). Água DDI (deionizada). Soluções de HCL 0,5 M e NaOH 0,01 M para os ajustes de pH para análise de estabilidade do DETC. Todos os reagentes foram utilizados como recebidos sem prévia purificação.

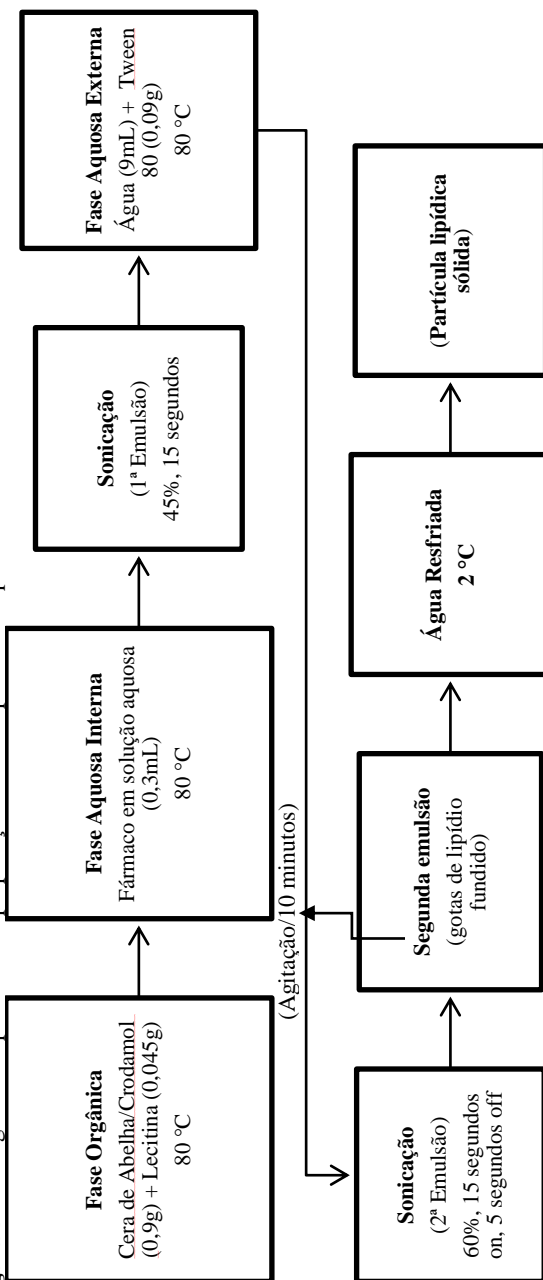
3.1 Preparação das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)

As nanopartículas lipídicas sólidas (Tabela 1) foram preparadas por fusão/dupla emulsão, técnica proposta por REITHMEIER; HERRMANN; GÖPFERICH, 2001 para preparação de micropartículas lipídicas e encapsulação de compostos hidrofílicos. As quantidades de cada reagente foram adaptadas da publicação de Peres et al., (2016), onde o mesmo trabalho trata da encapsulação de compostos hidrofílicos em lipídeos utilizando-se da técnica de dupla emulsão.

Inicialmente, a primeira emulsão (água em óleo), foi preparada a partir da emulsificação, em sonda de ultrassom (Fischer Scientific, Ultrasonic Dismembrator Model 500, 400 W com ponta de 1/8”) por 15 segundos a amplitude de 45% (20 W), de 0,9 g de fase lipídica (crodamol e cera de abelha) fundidos a 80 °C na presença do surfactante lecitina (0,045 g) e 0,3 mL de solução aquosa do fármaco (por se tratar de um fármaco que sofre uma rápida degradação diante de altas temperaturas, a solução aquosa do mesmo é deixada apenas poucos segundos em banho a 80°C para evitar que a fase lipídica se solidifique rapidamente quando a fase aquosa do fármaco é adicionada para a preparação da primeira emulsão). Em seguida, foi adicionado a primeira emulsão 9 mL da solução aquosa com o segundo surfactante Tween 80 (0,09 g/L mantido fixo em todos os experimentos). As soluções foram então mantidas sob agitação (300 rpm) por 10 minutos e sonicada novamente por 60 segundos (15 segundos on e 5 off) amplitude de 60%

(30 W), para formação da segunda emulsão (água/óleo/água). A fim de promover a rápida solidificação do lipídio, a dupla emulsão foi adicionada em 90 mL de água a 2 °C sob agitação magnética (300 rpm). A preparação das nanopartículas pode ser mais bem compreendida no fluxograma apresentado na Figura 5.

Figura 3- Fluxograma do processo de preparação das nanopartículas lipídicas sólidas.



Fonte: Autor.

Tabela 1- Formulações básicas das nanopartículas lipídicas sólidas de cera de abelha e crodamol preparadas com duas combinações diferentes de surfactantes.

Amostra	Cera de Abelha (g)	Crodamol GTCC (g)	Lecitina (g)	Tween 80(g)	DETC (%)^a
NLS 1	0,9	-	0,009	0,09	6
NLS 2	0,675	0,225	0,009	0,09	6
NLS 3	0,45	0,45	0,009	0,09	6
NLS 4	0,9	-	0,045	0,09	-
NLS 5	0,45	0,45	0,045	0,09	-
NLS 6	0,45	0,45	0,045	0,09	6
NLS 7	0,45	0,45	0,045	0,09	3
NLS 8	0,45	0,45	0,045	0,09	2

3.2 Caracterização e Ensaio de estabilidade para o Dietilditiocarbamato de Sódio Trihidratado (DETC).

3.2.1 Solução padrão de DETC

A solução estoque padrão foi obtida pesando exatamente 0,01 g de DETC trihidratado, que foi transferido para um béquer de 500 mL adicionados 200 mL de água DDI. A concentração final de DETC foi de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Diluições apropriadas da solução estoque padrão foram efetuadas com água DDI para execução do estudo de estabilidade e para a curva de calibração.

3.2.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de um procedimento apresentar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, na amostra em um determinado intervalo de valores. Para o estudo da linearidade foram obtidas 3 curvas idênticas, construídas em dias diferentes. Para cada curva, uma solução padrão de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de DETC em água DDI foi preparada, onde a mesma foi diluída em 7 soluções de concentrações diferente, variando de 0,5 até $18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cada concentração foi medida sete vezes, considerando-se a média desses pontos. A análise foi realizada utilizando espectrofotometria UV com leituras realizadas em 281 nm. A linearidade foi determinada por

meio de regressão linear e a qualidade do ajuste do modelo foi verificada por análise de variância (ANOVA).

3.2.3 Estudo do DETC em relação a sua estabilidade térmica e a diferentes pHs.

Para avaliação da estabilidade do DETC em diferentes temperaturas e pH, uma solução aquosa de DETC (5 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada em todos os experimentos. Soluções de HCl 0,5 M e NaOH 0,01 M foram utilizadas para ajuste do pH que variou na faixa de 1,5 a 12. Para os ensaios de estabilidade a temperatura, avaliado na faixa entre 25 °C a 90 °C, foi utilizada solução de 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de DETC. A estabilidade do DETC foi avaliada por Uv-Vis (U-1900, Hitachi) na faixa de absorbância de 200 a 400 nm.

3.3 Caracterização das Nanopartículas lipídicas sólidas

3.3.1 Diâmetro Médio (Dp) e Índice de Polidispersão (PDI)

O diâmetro médio (em intensidade) e índice de polidispersão das nanopartículas, que fornece informações acerca da largura da distribuição dos tamanhos de partícula, foram determinados através da técnica de Espectroscopia de Correlação de Fótons ou Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering – DLS) utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (ângulo do feixe incidente de 173° e comprimento de onda do laser de 633nm), da Malvern Instruments, alocado no Laboratório de Controle de Processos (LCP) da UFSC. As leituras foram feitas a 20°C a partir de uma alíquota das miniemulsões sem prévia diluição.

3.3.2 Eficiência de encapsulação

A carga de fármaco na formulação das nanopartículas de lipídicas sólidas foi determinada por centrifugação utilizando um filtro de Limite de Peso Molecular Nominal (Amicon® Ultra, Millipore) de 100 kDa. A análise foi realizada adicionando 500 μL de dispersão de NLS ao Amicon® Ultra e centrifugando-o a 13400 rpm durante 30 min. As NLS carregadas com fármaco foram retidas pelo filtro e a água e o fármaco livre foram permeados. Uma alíquota da amostra permeada foi adequadamente diluída em água e depois o DETC livre foi quantificado por espectroscopia UV-Vis a 281 nm utilizando um espectrofotômetro Hitachi (U-1900) alocado no Laboratório de Controle de Processos

(LCP) da UFSC . A concentração de fármaco livre foi calculada utilizando uma curva de calibração seguindo a Equação 1 e a eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada utilizando a Equação 2.

$$Abs = (0,0535 \times C_{detc}) + 0,0331 \quad (1)$$

Onde, *Abs* é a absorbância e *C_{detc}* é a concentração de fármaco ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Seguindo um coeficiente de correlação de $R^2 = 0,99$.

$$EE\% = (C_{inicial} - C_{livre}) / C_{inicial} \times 100 \quad (2)$$

Onde *C_{livre}* é a quantidade (μg) de fármaco não encapsulado disperso em água determinada pela Equação 1 e *C_{inicial}* é a quantidade total (μg) de fármaco adicionado à emulsão inicial.

3.3.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier - FTIR

Os espectros de absorção de amostras de NLS liofilizadas foram determinados utilizando um espectrofotômetro Shimadzu (IRPrestige-21) pelo método convencional de pastilha de KBr. As amostras foram trituradas e comprimidas com KBr anidro para formar grânulos. A gama de varrimento era de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ e a resolução era de 4 cm^{-1} . As análises foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química da UFSC.

3.3.4 Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

As amostras de NLS liofilizadas foram analisadas utilizando uma DSC 4000 Perkin Elmer, sob atmosfera inerte (N_2 , $20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), desde -10 a $85\text{ }^\circ\text{C}$, a uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. A história térmica foi removida antes das análises a uma taxa de aquecimento de $20\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e taxa de arrefecimento de $20\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. As temperaturas de fusão foram assim obtidas a partir da segunda corrida de aquecimento para investigar a influência do fármaco e Crodamol GTCC no comportamento térmico do NLS. As análises foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química da UFSC.

3.3.5 Ensaio de Fluorescência

Um corante hidrofílico e fluorescente foi encapsulado e investigado por microscopia de fluorescência usando um microscópio

Olympus BX41 com filtro vermelho (U-MGW2) e uma câmera CCD. As amostras foram lavadas utilizando dispositivos de filtro centrífugo Amicon Ultra-0,5 (Millipore, 100 kDa), pingando sobre o vidro e observado com lente objetiva 100x utilizando o filtro vermelho para corante SR-101 (Abs entre 580 e 600 nm) . Às análises foram realizadas no LAMEB (Laboratório Multiusuário em Análises Biológicas), do Departamento de Biologia da UFSC.

3.3.6 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica é definida como um processo contínuo que envolve a medida de variação de massa de uma amostra em função da temperatura (varredura de temperatura), ou do tempo a uma temperatura constante (modo isotérmico). Neste tipo de análise uma balança ultrasensível é utilizada para seguir as mudanças de peso de uma amostra em função da temperatura. Tais mudanças de peso podem estar relacionadas com uma série de transformações da amostra como fenômenos de decomposição, desidratação, oxidação etc (CARVALHO, 2009). As curvas termogravimétricas para o DETC (50 µg) foram obtidas através de um analisador termogravimétrico Shimadzu TGA-50 com um programa de temperatura de 25-150 °C, taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e vazão de 50 mL min⁻¹ , sob atmosfera de nitrogênio. As análises foram realizadas no LCP (Laboratório de Controle de Processos) no Departamento de Engenharia Química da UFSC.

3.4 Morfologia

3.4.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A caracterização morfológica das partículas foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão utilizando um JEM-1011 TEM (100 kV). Amostras de NLS foram diluídas em água destilada até 0,1% de sólidos; em sequência, colocou-se uma gota de cada amostra numa grelha revestida com carbono e secou-se sob condições de ambiente durante a noite. As análises foram realizadas no laboratório LCME (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica) da UFSC.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos fatores são capazes de influenciar a quantidade de fármaco associada aos sistemas nanoestruturados, dentre os quais se destacam as características físico-químicas do fármaco, o pH do meio, as características da superfície da partícula ou a natureza do lipídeo, a quantidade de fármaco adicionada à formulação, a ordem de adição do fármaco e o tipo de tensoativo adsorvido à superfície lipídica (PERES, 2012a; SCHAFFAZICK et al., 2003).

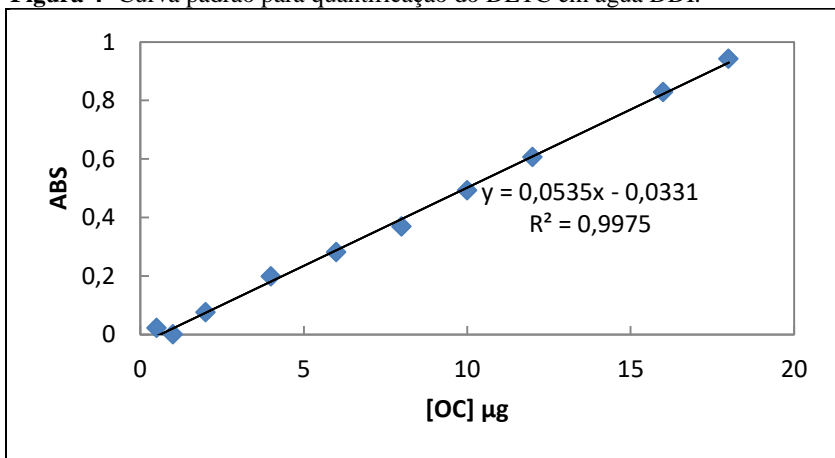
4.1 Caracterização e Avaliação da estabilidade do DETC

4.1.1 Linearidade

O teste de linearidade para quantificação do DETC (Figura 5) considerou a média de três curvas autênticas (Tabela 2) com 10 níveis de concentrações. A curva padrão resultante apresentou coeficiente de determinação (R^2) de 0,99, indicando elevado índice de proporcionalidade entre concentração e absorbância na faixa de 0,5 a 18 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 2- Curva de calibração para o DETC em água DDI.

AMOSTRA	[C] (μg)	ABS (281 nm)	pH
S1	0,5	0,022 \pm 0,001	7
S2	1	0,039 \pm 0,002	7
S3	2	0,076 \pm 0,004	7
S4	4	0,198 \pm 0,002	7
S5	6	0,281 \pm 0,002	7
S6	8	0,369 \pm 0,015	7
S7	10	0,492 \pm 0,003	7
S8	12	0,606 \pm 0,029	7
S9	16	0,828 \pm 0,003	7
S10	18	0,942 \pm 0,016	7

Figura 4- Curva padrão para quantificação do DETC em água DDI.

4.1.2 Resultados para os ensaios de estabilidade realizados com o DETC.

Após a preparação da curva de calibração do DETC, o próximo passo foi realizar os ensaios de estabilidade do fármaco com relação ao pH e temperatura afim de identificar possíveis modificações na molécula decorrente do processo de encapsulação ou da sensibilidade da mesma diante de mudanças do meio reacional como temperatura e pH.

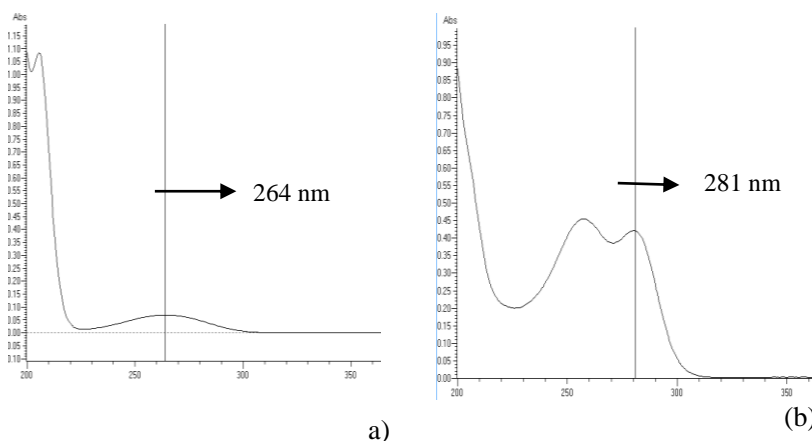
Tabela 3- Resultados do ensaio de estabilidade em diferentes pH para o DETC em solução aquosa.

Tempo (h)	Absorbância (nm)				
	pH 1.5	pH 5.5	pH 7.0	pH 10.5	pH 12.0
0	0.069±0,001	0.478±0,003	0.421±0,005	0.399±0,001	0.332±0,001
24	0.072±0,002	0.299±0,001	0.420±0,005	0.397±0,001	0.327±0,003
48	0.069±0,006	0.194±0,007	0.402±0,001	0.394±0,001	0.309±0,005
72	0.059±0,002	0.123±0,001	0.408±0,005	0.386±0,003	0.324±0,003
96	0.056±0,004	0.100±0,001	0.400±0,002	0.380±0,005	0.326±0,005

A partir da Tabela 1, observou-se a alteração da absorbância com a variação do pH, principalmente em valores de pH abaixo de 7.0 no

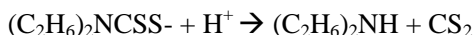
qual foi observado a deslocamento do pico de absorvância máxima de 281 nm para 264 nm (Figura 6) indicando uma possível modificação (proposta de equação para a modificação será mostrada abaixo) da molécula do DETC. Os resultados observados neste estudo estão de acordo com estudos relatados na literatura onde foi reportado que o DETC apresenta maior estabilidade em pH acima de 7,0, relatando rápido ataque do próton H^+ no nitrogênio do ditiocarbamato, seguida pela dissociação do zwitterion (íon dipolar) em dietilamina e dissulfeto de carbono (DALE; FISHBEIN, 1970; PAUL B; CHAPMAN; M. C. PROBINE, 1959).

Figura 5- Características do pico de absorção do DETC em (a) pH ácido (abaixo de 6) e (b) pH básico (acima de 7.4)



Fonte: Autor.

Ainda em estudos reportados na literatura é possível observar a reação proposta para decomposição do DETC em meio ácido (DALE; FISHBEIN, 1970; PAUL B; CHAPMAN; M. C. PROBINE, 1959).



A partir da equação química acima é possível observar o rápido ataque do próton H^+ no nitrogênio do ditiocarbamato, seguida pela dissociação do zwitterion (íon dipolar) em dietilamina e dissulfeto de carbono. O estudo publicado por Chapman e colaboradores (1959) demonstrou a estabilidade do DETC em termos do tempo necessário para sua meia decomposição ($t_{1/2}$), indicando que a estabilidade aumenta

com o aumento unitário de pH, sugerindo que a decomposição é uma função simples da concentração de H^+ .

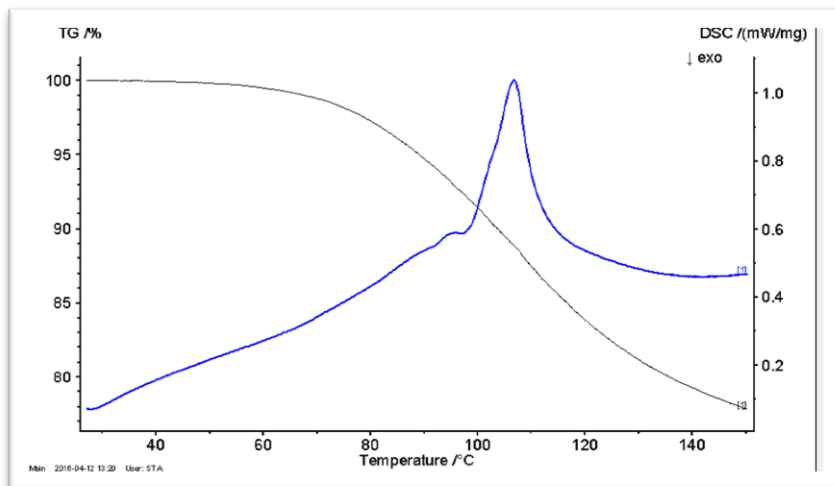
Assim, para as próximas etapas deste trabalho, o pH foi mantido em 7,0, a fim de assegurar a estabilidade da molécula em relação ao pH e avaliar a influência da temperatura. A partir da definição do melhor pH, foi avaliada a influência da temperatura na estabilidade do DETC em solução aquosa conforme resultados apresentados na Tabela 2.

Tabela 4 - Estabilidade do DETC em solução aquosa com relação ao aumento de temperatura em pH 7.0.

Time (min)	Absorbância (nm)							
	25 °C	40 °C	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C		
20	0,405±0,05	0,406±0,01	0,376±0,02	0,252±0,01	0,204±0,02	0,071±0,09		
30	0,405±0,02	0,406±0,05	0,335±0,01	0,239±0,02	0,165±0,04	0,038±0,06		
40	0,402±0,03	0,387±0,08	0,365±0,05	0,219±0,02	0,148±0,05	0,037±0,07		

Como pode ser observado na tabela acima, o DETC apresentou uma grande instabilidade com o aumento da temperatura através da redução dos valores de absorvância para valores maiores de 60°C. O mesmo pode ser observado quando análise termogravimétrica do mesmo foi realizada:

Figura 6 – Análise termogravimétrica para o DETC na variação de temperatura de 25 à 150 °C:



Fonte: Autor

Observa-se pela medida termogravimétrica do fármaco que o mesmo em seu estado puro é termicamente instável em temperaturas acima de 60°C, sendo possível observar perda de massa a partir deste ponto, comprovando também o resultado para o estado de estabilidade do mesmo em solução aquosa.

Neste contexto, a encapsulação do DETC em NLS se mostra como uma alternativa promissora para a proteção do mesmo. As NLS tendem a proteger compostos sensíveis de possíveis degradações do meio como: temperaturas elevadas (acima de 40 °C), oxidação, variação de pH e sensibilidade a luz ultravioleta (KÜLKAMP; GUTERRES; POHLMANN, 2009; PIMENTEL et al., 2007), levando em consideração que a temperatura é um dos fatores mais importante envolvido na degradação de fármacos, devido ao aumento da degradação química das moléculas (SANTOS; MIRCO, 2015).

Após a caracterização do DETC e os ensaios de estabilidade, o próximo passo foi a encapsulação do fármaco.

Em um primeiro momento neste trabalho, outros dois de lipídeos foram avaliados na encapsulação do DETC (ácido esteárico e a cera de carnaúba). Os resultados estão apresentados nas tabelas 5.1 e 5.2:

Tabela 5- Resultados para os testes preliminares utilizando ácido esteárico como matriz lipídica na preparação das nanopartículas lipídicas sólidas.

Amostra	Ácido		Tween80 (g)	DETC (%) ^a	EE (%) ^b (264 nm)	dP (nm)	PDI
	Estearico (g)	Lectina (g)					
AC 1	0,9	0,009	0,09	-	-	283	0,244
AC 2	0,9	0,009	0,09	6	0,071	313	0,250
AC 3	0,9	0,009	0,09	3	0,090	328	0,255

a- Porcentagem de DETC com relação a fase orgânica total.

b- Eficiência de encapsulação.

Tabela 6- Resultados para os testes preliminares utilizando cera de carnaúba como matriz lipídica na preparação das nanopartículas lipídicas sólidas.

Amostra	Cera de Carnaúba		Tween80 (g)	DETC (%) ^a	EE (%) ^b (281 nm)	dP nm)	PDI
	(g)	Lectina (g)					
CC 1	0,9	0,009	0,09	-	-	242	0,182
CC 2	0,9	0,009	0,09	6	21	272	0,242
CC 3	0,9	0,009	0,09	3	34	276	0,261

a- Porcentagem de DETC com relação a fase orgânica total.

b- Eficiência de encapsulação.

Nos testes preliminares apresentados acima, foi possível observar a baixa estabilidade do DETC quando em matriz lipídica formada por ácido esteárico. Essa baixa estabilidade está relacionada com a faixa de pH do ácido esteárico (3,0 e 4,0), ocasionado assim a degradação do DETC ainda no início do processo de encapsulação não sendo possível medir eficiência de encapsulação das nanopartículas lipídicas sólidas, sendo observada mudança no pico duplo característico do DETC em 281 nm, apresentando um único pico em 264 nm como na figura 6.

Em um segundo momento, foi possível encapsular o DETC utilizando cera de carnaúba como fase lipídica, porém, por se tratar de uma cera com um alto ponto de fusão (85 °C), o processo foi realizado em alta temperatura (100 °C), e os resultados obtidos não foram satisfatórios. Como observado na Figura 6 e Tabela 4, o DETC apresentou-se bastante sensível com o aumento da temperatura, principalmente acima de 65 °C, sendo ainda sim possível medir eficiência de encapsulação, porém com resultados muito baixos.

Assim, cabe aqui mencionar, que a partir dos resultados apresentados, a escolha da matriz lipídica passa a ter caráter fundamental uma vez que a matriz lipídica pode ter caráter ácido ou básico, como o ácido esteárico ou ainda temperaturas de fusão elevadas como a cera de carnaúba, implicando diretamente na variação da estabilidade do DETC durante processo de síntese das NLS.

4.2 Obtenção e caracterização das Nanopartículas lipídicas sólida.

Após avaliação das melhores condições de pH (7.0) e verificação da influência da temperatura na estabilidade do DETC, o segundo passo deste trabalho foi a encapsulação do DETC em NLS. A escolha e a concentração do surfactante desempenha um importante papel na estabilização das gotas e das partículas sólidas obtidas bem como influencia no tamanho e na estabilidade das mesmas (KHERADMANDNIA et al., 2010; PERES, 2013). Alguns autores relataram que a combinação de surfactantes hidrofílicos e lipofílicos na técnica de emulsão dupla pode melhorar a eficiência de encapsulação de drogas hidrofílicas como a combinação de um surfactante com baixo HBL, lecitina de soja, usado para estabilizar a primeira emulsão (água/óleo) e um surfactante com alto HBL, Tween 80, para estabilizar a segunda emulsão (água/óleo) (KHOEE; YAGHOUBIAN, 2009; PAL, 2007). Sistemas nanoestruturados lipídicos preparados com uma combinação de surfactantes tendem a resultar em miniemulsões com menor tamanho médio de partícula e a apresentar maior estabilidade

durante o período de estocagem do que aqueles preparados com um único surfactante (KHERADMANDNIA et al., 2010; MÄDER; MEHNERT; MÄDER, 2001; PERES, 2013; SCHWARZ et al., 1994).

A principal função do agente estabilizante é reduzir a tensão interfacial entre o meio disperso e contínuo, sendo que o aumento da concentração de surfactante tende a refletir no tamanho de partícula (KHERADMANDNIA et al., 2010; MEHNERT; MÄDER, 2012; PERES, 2013). A partir dos resultados de diâmetro médio das partículas e índice de polidispersão obtidos neste trabalho, observou-se uma variação do diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas em função da variação da relação surfactante/fase lipídica e presença do Crodamol GTCC como observado na Tabela 3.

Tabela 7 - Formulação das nanopartículas lipídicas sólidas e Diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas lipídicas sólidas obtidas via dupla emulsão.

Exp	Cera de Abelha (g)	Crodamol GTCC (g)	DETC (wt%) ^a	Lecitina/Tween 80 (g) ^b	Dp (nm)	PdI
NLS 1	0,90	-	6	0,009/0,09	236 ± 2,21	0,321 ± 0,011
NLS 2	0,67	0,23	6	0,009/0,09	290 ± 2,14	0,277 ± 0,014
NLS 3	0,45	0,45	6	0,009/0,09	206 ± 2,26	0,273 ± 0,028
NLS 4	0,90	-	-	0,045/0,09	244 ± 1,32	0,413 ± 0,014
NLS 5	0,45	0,45	-	0,045/0,09	256 ± 1,24	0,297 ± 0,012
NLS 6	0,45	0,45	6	0,045/0,09	204 ± 1,42	0,246 ± 0,014
NLS 7	0,45	0,45	3	0,045/0,09	189 ± 2,56	0,196 ± 0,070
NLS 8	0,45	0,45	2	0,045/0,09	213 ± 1,28	0,213 ± 0,042

^a % de DETC em relação à fase orgânica total.

^b concentração de surfactante Lecitina/Tween 80 (m/m) em relação à fase orgânica total.

Assim, a partir dos resultados, para a concentração de surfactante, observou-se que quando a relação surfactante de lecitina de soja / Tween 80 mudou de 0,009 / 0,09 para 0,045 / 0,09, não houve uma grande mudança com relação ao tamanho de partícula (NLS 3 e NLS 6 por exemplo), porém houve mudança na distribuição de partículas que passaram de um comportamento bimodal para monomodal. Essas mudanças podem estar associada à máxima concentração de surfactante no sistema, visto que existe uma concentração de surfactante ótima suficiente para recobrir e estabilizar toda a área interfacial entre água/lipídio, acima da qual o surfactante encontra-se em excesso e passa a se acumular na forma de micelas ou outras estruturas como lipossomas, não exercendo mais qualquer efeito estabilizante ou protetor (KHERADMANDNIA et al., 2010; MÜHLEN; SCHWARZ; MEHNERT, 1998; PERES, 2013).

Análogo a este resultado, Khoee (2009) e colaboradores encapsularam a penicilina-G em nanopartículas de adipato de polibutilo (PBA). As mesmas foram preparadas por um método de precipitação modificada como um polímero biocompatível e biodegradável. A degradação deste polímero ocorre através da clivagem da ligação éster hidrolítica, levando a uma diminuição no seu peso molecular. O aprisionamento da penicilina-G foi fortemente dependente da hidrofiliidade do polímero. O trabalho desenvolveu o método de emulsão múltipla (dupla/emulsão) para preparar nanocápsulas de penicilina-G na PBA. As emulsões duplas foram preparadas em um processo de emulsão em dois passos usando dois surfactantes: um hidrofóbico (Span) projetado para estabilizar a interface de emulsão interna sem energia e uma hidrofílica (Tween) para a interface externa dos glóbulos de óleo para w/o/w. Relataram que ao aumentar as concentrações de Span 20 e Span 60 de 1,4 a 7% em peso a 8% em peso de Tween o tamanho de partícula reduz de 638 nm a 416 nm e de 356 nm a 240 nm, respectivamente. Pode-se observar que o tamanho das partículas depende do equilíbrio entre o tipo e a concentração do surfactante interno. Considerou-se que a maior concentração de Span 60 a uma concentração constante de Tween 60 resulta em um grupo hidrofóbico superior e conseqüentemente a formação de nanopartículas menores (KHOEE; YAGHOBIAN, 2009).

A organização tridimensional que a matriz lipídica adquire durante a solidificação depende da velocidade de resfriamento e da composição da fase orgânica (lipídica), sendo que transformações polimórficas podem ser observadas durante o armazenamento, o que

pode resultar na liberação do fármaco (PERES, 2012b; SOUTO et al., 2011b). O processo de preparação de NLS inicia-se com a fusão do lipídio, seguida do resfriamento. Ao iniciar o processo de solidificação, a viscosidade do lipídio fundido aumenta progressivamente, dando origem a cristais lipídicos com diferentes graus de organização tridimensional, ou seja, diferentes formas polimórficas, processo conhecido por recristalização do lipídeo (SOUTO et al., 2011b).

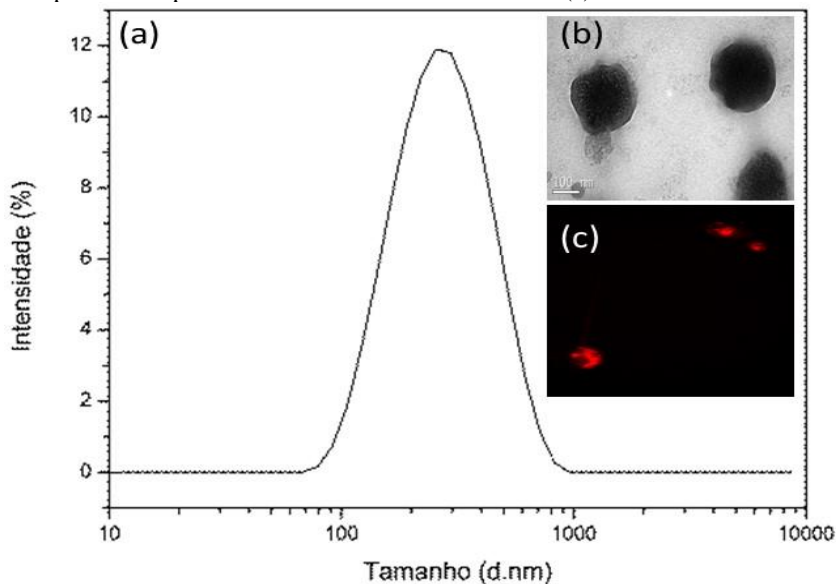
Assim, a adição de crodamol possibilita a redução da viscosidade da fase orgânica, resultando, conseqüentemente, em um processo de emulsificação mais eficiente, partículas menores e mais estáveis devido a uma redução da resistência às forças de cisalhamento aplicadas durante o processo de sonicação (PERES, 2012b), bem como na redução da cristalinidade da matriz lipídica aumentando assim a eficiência de encapsulação.

Resultados semelhantes aos reportados neste trabalho foram relatados por Chantaburanan (2017) e colaboradores, onde o fármaco ibuprofeno foi encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas de Palmitato de cetilo combinado com Sofitsan 378 (triglicerídeo complexo). A adição de Softisan não somente levou à diminuição dos tamanhos de partículas, mas à redução da entalpia de fusão das nanopartículas indicando uma diminuição da cristalinidade da matriz lipídica binária (CHANTABURANAN et al., 2017).

A morfologia das NLS obtidas foi analisada por TEM (Figura 7b). Os resultados mostraram nanopartículas relativamente esféricas com um tamanho de partícula semelhantes aos reportados anteriormente obtidos por dispersão dinâmica da luz (Figura 7a). Todas as análises foram realizadas utilizando a formulação NLS 7.

A incorporação de marcadores fluorescentes às nanopartículas lipídicas foi utilizada para verificar se a adaptação proposta para produção de nanopartículas lipídicas na ausência de solventes orgânicos via fusão/dupla emulsificação é apropriada para encapsulação de compostos hidrofílicos (BECKER PERES et al., 2016). Ainda que seja uma análise qualitativa, a determinação da encapsulação via microscopia de fluorescência é um método simples e rápido. O composto Sulforadamina 101 (SR-101) é um corante vermelho, hidrofílico e fluorescente. Por este motivo, foi utilizado no lugar do fármaco para possibilitar a análise por microscopia de fluorescência e acompanhar o aprisionamento na matriz lipídica.

Figura 7- Distribuição do tamanho das nanopartículas lipídicas sólidas: (a), imagens de TEM para as NLS obtidas pela mistura de cera de abelha e crodamol (50/50) e 3% de DETC (NLS 7) com relação a fase orgânica (b) e microscopia de fluorescência da sulforadamina 101 hidrofílica em nanopartículas lipídicas sólidas com aumento de 100X (c).



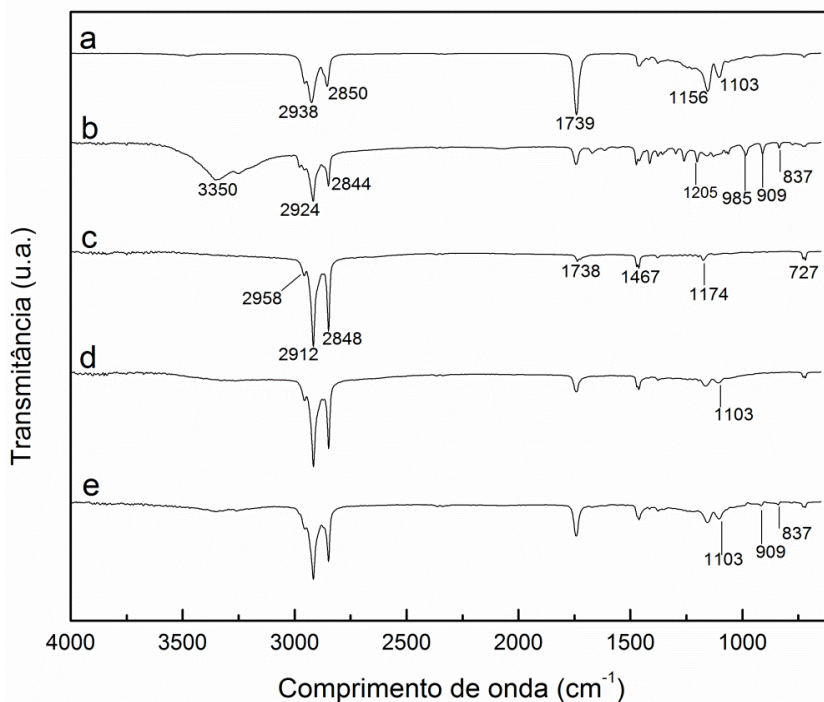
Fonte: Autor

Como pode ser observado pela Figura 8c acima, o mesmo acende-se no filtro vermelho. Mostrando assim que houve a encapsulação do corante confirmando também que a técnica é eficiente para encapsular o fármaco também hidrofílico.

As imagens obtidas por microscopia de fluorescência sugerem que nanopartículas lipídicas sólidas preparadas através da técnica de fusão/dupla emulsificação apresentam potencial aplicação para a encapsulação de compostos hidrofílicos

Na figura 9 estão representados os espectros de FTIR para Crodamol, dietilditiocarbamato de Sódio trihidratado (DETC), cera de abelha, NLS sem DETC e NLS carregadas com DETC. No espectro 1a, são observados os picos característicos para o Crodamol GTCC, em 1739 cm^{-1} referentes ao estiramento C=O, 1156 cm^{-1} e 1103 cm^{-1} referente ao estiramento C-O-C e na região de 2938 e 2850 cm^{-1} em relação as bandas dos grupos CH_3 presentes na molécula (YE et al., 2016).

Figura 8 - Espectros de FTIR de Crodamol GTCC (a), DETC (b), cera de abelha pura (c), e NLS sem fármaco (d) e nanopartículas obtidas nas condições do experimento 7 (e).



Fonte: Autor

As bandas de intensidade média ou forte na região entre 900 a 1000 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos de ligações simples entre carbono e enxofre (C-S) e as bandas na região de 1000 cm^{-1} sugerem a presença de ligações duplas entre estes dois elementos (C=S), típicas em estruturas em que o ligante coordena ao centro metálico de forma monodentada. As bandas correspondentes aos estiramentos carbononitrogênio podem aparecer em duas regiões distintas, sendo que, bandas largas de média ou baixa intensidade em 1252 a 1356 cm^{-1} são atribuídas às ligações simples entre estes elementos (C-N) (CARVALHO, 2009). Na Figura 1b é apresentado o espectro de FTIR do DETC caracterizado pelos picos em 837, 909, 985 cm^{-1} referente às ligações C-S, em 1205 cm^{-1} relacionadas a ligação C-N e a banda localizada em 3350 cm^{-1} referente as hidroxilas da água. No espectro da cera de abelha (Figura 9c), é possível visualizar picos em 2922 e 2848

cm^{-1} e picos localizados em 1467 cm^{-1} relativo às vibrações hidrocarbônicas indicando a presença de ácidos graxos (LUO et al., 2012). Também é possível visualizar picos localizados em 1174 cm^{-1} e 728 cm^{-1} , atribuídas às ligações C-O referente ao grupo éster. Para o espectro das NLS sem adição de fármaco (Figura 9d e 9c), foram observados os mesmos picos de intensidade observados para o espectro da cera de abelha pura, com exceção de um pico na região de 1103 cm^{-1} , atribuído à presença do Crodamol na formulação. Em relação ao espectro da NLS com adição de fármaco (Figura 2e) foi observado a presença dos picos na região de 909 e 837 cm^{-1} , referente ao espectro do DETC relacionados à ligação C-S, indicando a incorporação do fármaco na NLS de cera de abelha e Crodamol.

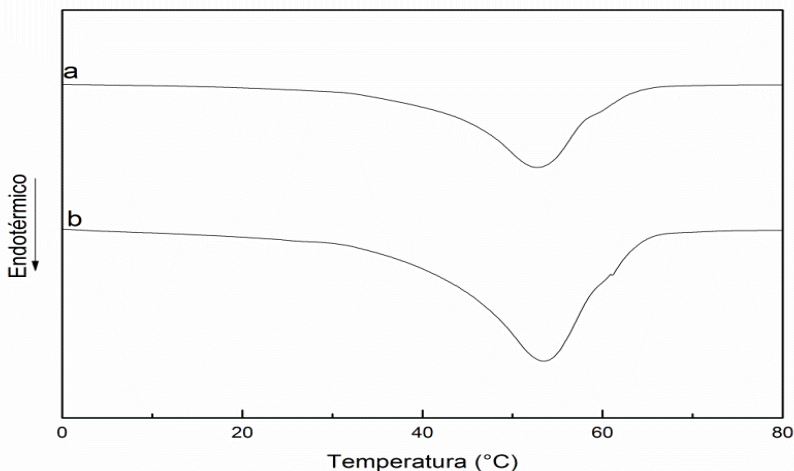
4.3 Estudo Térmico e Cristalinidade das nanopartículas lipídicas sólidas

Os resultados da análise da estabilidade térmica para avaliação da temperatura de fusão e entalpia das amostras contendo ou não fármaco são apresentadas na Figura 10 e Tabela 7. Ambos os picos de fusão observados apresentaram comportamento de fusão homogêneo para ambas amostras analisadas, NLS branco e SNL 7, indicando que não houve alteração térmica para a amostra carregada com fármaco quando comparada com a amostra branco (sem presença de DETC). Resultados similares aos observados neste estudo foram reportados por Meyagusku (2014), para a encapsulação de ciprofloxacino, um fármaco muito utilizado para tratar infecções oculares, encapsulado em nanopartículas lipídicas de monoestearato de glicerila (MEG) e de triestearina (TRI), sendo os valores de entalpia das formulações na ausência e na presença de CIPRO bastante próximos.

Tabela 8- Resultados calorimétricos de varrimento diferencial da temperatura de picos de fusão (T_m) e entalpias (ΔH_m) para nanopartículas lipídicas sólidas sem a presença de DETC e para nanopartículas sólidas carregadas e não carregadas com DETC.

Amostra	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_m ($\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$)
NLS sem DETC	52,7	66,45
NLS 7	53,5	69,04

Figura 9- Termograma de calorimetria diferencial de varredura para nanopartículas lipídicas sólidas sem a presença de DETC (a) e para nanopartículas sólidas carregadas com DETC obtidas nas condições do experimento 7 (Tabela 1) (b).



Fonte: Autor

4.4 Eficiência de Encapsulação

A combinação de lipídeos sólidos e lipídeos líquidos são um novo tipo de nanopartículas lipídicas, que aumentam a capacidade de carga do fármaco, aumento da eficiência de encapsulação, estabilidade e propriedades de liberação (HU et al., 2006; PERES et al., 2012). Segundo Khoe e Yaghoobian (2009) e Pal (2007), a combinação de surfactantes hidrofílicos e lipofílicos na obtenção de nanopartículas por dupla emulsificação é importante na estabilização das nanopartículas e aumento da eficiência de encapsulação de compostos hidrofílicos.

Foi avaliada a eficiência de encapsulação do DETC em nanopartículas de Cera de Abelha e Crodamol GTCC obtidas pela técnica de dupla emulsão em um sistema livre de solventes. A influência da proporção de DETC também foi avaliada, bem como a quantidade de surfactante utilizada. A Tabela 8 apresenta os valores da eficiência de encapsulação (EE%) para todas as formulações estudadas neste trabalho.

Tabela 9 - Eficiência de encapsulação do DETC nas nanopartículas lipídicas sólidas

	% DETC (w%) ^a	Concentração		EE% ^c
		Lecitina/Tween 80 (w/w) ^b	Crodamol (g)	
NLS 1	6	0,009/0,09	0	15±3,70
NLS 2	6	0,009/0,09	0,23	21±0,71
NLS 3	6	0,009/0,09	0,45	35±0,59
NLS 6	6	0,045/0,09	0,45	51±0,65
NLS 7	3	0,045/0,09	0,45	68±1,03
NLS 8	2	0,045/0,09	0,45	79±2,50

^a % DETC em relação à fase orgânica total.

^b concentração dos surfactantes em relação à fase orgânica total.

^c Eficiência de encapsulação.

Como pode ser observado a partir dos resultados, a adição de crodamol e o aumento da concentração lecitina na formulação aumentou a eficiência de encapsulação, resultado relacionado a capacidade do Crodamol de aumentar as imperfeições na rede cristalina lipídica, na qual o fármaco é carregado (HU et al., 2006).

A eficiência de encapsulação também foi avaliada em relação à variação da concentração de DETC, sendo possível verificar que a E.E.% aumenta com a redução da concentração de DETC nas formulações, provavelmente devido à saturação da fase lipídica com o fármaco (DOKTOROVÁ et al., 2016; HU et al., 2006). Análogo aos resultados observados neste trabalho, Meneses (2016) reportou o encapsulamento de óleo de cravo em nanopartículas lipídicas de ácido esteárico, onde a eficiência de encapsulação se mostrou maior com a adição de crodamol, bem como quando a concentração de óleo de cravo adicionada foi menor.

Khoe (2009) obteve resultados similares aos encontrados neste trabalho, mostrando que as eficiências de encapsulação da penicilina-G aumentaram com o aumento nos conteúdos de Span e Tween. Esses resultados mostram que, ao fornecer uma condição hidrofílica, criada pela introdução do Span 60 como surfactante interno, pode melhorar a residência da penicilina-G na fase interna. Isto é provável através da influência de grupos polares da molécula de surfactante (grupos hidroxilo) na interface água-óleo em grupos funcionais de penicilina-G. Na verdade, os mesmos parâmetros, que podem diminuir o tamanho médio, também podem aumentar a eficiência de encapsulamento (KHOEE; YAGHOBIAN, 2009). O mesmo foi possível observar para

o DETC, o aumento da concentração de lecitina e a adição de crodamol ajudaram na retenção do fármaco na fase interna, sendo possível obter uma boa eficiência de encapsulação.

4.5 Estudos de estabilidade das nanopartículas lipídicas sólidas

Os estudos de estabilidade foram realizados após 15 e 30 dias de armazenamento sob refrigeração e os resultados são apresentados na Tabela 9. Vale ressaltar que as formulações com Crodamol (SLN 5, 6, 7 e 8) aumentaram a eficiência de encapsulamento e diminuíram a liberação do fármaco. O efeito observado pode ser explicado devido ao fato de o Crodamol ser capaz de promover um melhor aprisionamento da droga durante o armazenamento, uma vez que ajuda na formação da rede e no carregamento do DETC nas imperfeições da matriz lipídica das nanopartículas, reduzindo as chances de expulsão da droga da fase lipídica. Conforme relatado anteriormente (SOUTO et al., 2004), se quando um lipídeo com elevado grau de cristalinidade, como é o caso da cera de abelha, possui a sua cristalinidade transformada devido a modificações de elevada energia no processo de encapsulação e durante o armazenamento tem a tendência para se tornar um cristal perfeito e pôr com consequência iniciar precocemente o processo de liberação do fármaco. É relatado na literatura que as nanopartículas de lipídeos sólidos com uma mistura de surfactantes geralmente têm menor tamanho de partícula, distribuição de tamanho estreito e maior estabilidade em comparação com aqueles preparados com apenas um surfactante (BECKER PERES et al., 2016).

Tabela 10 - Estabilidade das nanopartículas lipídicas sólidas ao armazenamento (4 °C) em relação a variação do tamanho médio das partículas (Dp) e índice de polidispersão (Pdl) em 30 dias de armazenamento.

	Dia 1			Dia 15			Dia 30		
	Dp (nm)	Pdl		Dp (nm)	Pdl		Dp (nm)	Pdl	
NLS 4	204±0,42	0,410±0,014		311±0,40	0,367±0,015		349±0,6	0,268±0,015	
NLS 5	236±0,42	0,197±0,012		236±0,41	0,195±0,012		236±0,45	0,196±0,013	
NLS 6	201±1,27	0,246±0,084		201±1,13	0,244±0,087		201±1,5	0,244±0,090	
NLS 7	189±1,41	0,196±0,07		187±1,56	0,225±0,010		186 ±1,7	0,237±0,020	
NLS 8	206±0,28	0,213±0,042		206±0,4	0,239±0,056		209±0,3	0,239±0,060	

É importante notar que as formulações (Tabela 6) com Crodamol CTCG (NLS 5, 6, 7 e 8), bem como a formulação com maior concentração de surfactante (NLS 5, 6, 7 e 8), permitiu manter a estabilidade das nanopartículas durante 30 dias de armazenamento a 4 ° C quando comparada à NLS 4 (sem Crodamol), onde a menor estabilidade foi observada aumentando o tamanho de partícula de 204 nm a 349 nm após 30 dias e separação de fases. Assim, neste trabalho, a combinação de Lecitina / Tween 80 como agentes tensoativos e a mistura de cera de abelha / Crodamol CTCG como lipídeos foi possível manter a estabilidade do NLS carregado com DETC durante 30 dias de armazenamento a 4 ° C.

A adição de Crodamol CTCG, na gama estudada neste trabalho, permitiu a redução da viscosidade na fase orgânica, resultando em um processo de emulsão mais eficiente com partículas sólidas lipídicas pequenas, menores que 200 nm e estáveis devido à redução na cristalinidade da matriz lipídica aumentando a eficiência de encapsulação (CHANTABURANAN et al., 2017), bem como aumentou a retenção do fármaco na matriz lipídica e também protegeu o mesmo de possíveis degradações do meio pelo aumento de temperatura durante a preparação das nanopartículas lipídicas sólidas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram sintetizadas e caracterizadas nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com o dietilditiocarbamato de sódio trihidratado por fusão/dupla emulsificação. O processo foi realizado na ausência de solventes orgânicos, utilizando cera de abelha e Crodamol GTCC como matriz lipídica.

Os resultados obtidos até o momento mostram que é possível obter nanopartículas lipídicas sólidas da combinação de cera de abelha e crodamol com potencial aplicabilidade para encapsulação de fármacos hidrofílicos utilizando a técnica de fusão/dupla emulsificação na ausência de solventes orgânicos. O estudo permitiu verificar que é possível obter dispersões estáveis de nanopartículas com diâmetro médio entre 189 e 290 nm através do ajuste das formulações e condições experimentais. O par Lecitina de soja e Tween 80 se mostraram eficientes na estabilização das dispersões, resultando em partículas menores e distribuições de tamanho mais estreita, principalmente quando a concentração de Lecitina aumento de 0,009 g na formulação para 0,045g. O uso de lecitina como surfactante lipofílico contribuiu para obtenção de partículas com dispersões mais estáveis, com pouca variação do tamanho de partícula observada ao longo de 30 dias.

A utilização de uma mistura de cera de abelha e resultou em partículas menores devido à diminuição da viscosidade da fase orgânica e mostrou que é a substituição de parte do lipídeo sólido por um lipídio líquido é viável, mostrando também que a mistura de lipídeos sólidos e líquidos ajudam na retenção do fármaco, sendo possível obter bons resultados com relação a eficiência de encapsulação.

Os melhores resultados em termos de estabilidade para o fármaco foram encontrados para pH 7,0 e temperatura abaixo de 60 °C. Ainda, elevadas eficiências de encapsulação (79%) foram obtidas para as menores concentrações de DETC (2%) devido à saturação da fase lipídica com o fármaco. Com o ensaio de fluorescência utilizando corante hidrofílico (Sulforadamina 101) foi possível confirmar, a encapsulação do DETC nas nanopartículas.

Neste contexto, os resultados se mostraram promissores para a produção de nanocarreadores utilizando a cera de abelha como matriz lipídica na encapsulação de fármacos hidrofílicos, que hoje ainda é um grande desafio para a ciência.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. J.; SOUTO, E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 478–490, 2007.

AMIN, M. et al. Thermal properties of beeswax/graphene phase change material as energy storage for building applications. **Applied Thermal Engineering**, v. 112, p. 273–280, 2017.

ATTAMA, A. A.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid lipid nanoparticle crystallinity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, n. 1–3, p. 189–195, 2008.

BECKER PERES, L. et al. Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 140, p. 317–323, 2016.

CARVALHO, F. A. Síntese e caracterização de complexos n,n'-diethyltilditiocarbamato de bi(iii), sn(iv), ga(iii), in(iii) e zn(ii); e de seus produtos de decomposição térmica, **Dissertação de Mestrado**, Belo Horizonte, 2009.

CELES, F. S. et al. DETC-based bacterial cellulose bio-curatives for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 6, n. iii, p. 38330, 2016.

CHANTABURANAN, T. et al. Effect of binary solid lipid matrix of wax and triglyceride on lipid crystallinity, drug-lipid interaction and drug release of ibuprofen-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for dermal delivery. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 504, p. 247–256, 2017.

COHEN-SELA, E. et al. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 133, n. 2, p. 90–95, 2009.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Encapsulation of eugenol rich clove extract in solid lipid carriers.

Journal of Food Engineering, v. 127, p. 34–42, 2014.

DALE, S. W.; FISHBEIN, L. Stability of sodium diethyldithiocarbamate in aqueous solution by proton magnetic resonance spectroscopy. **J. Agric. Food Chem.**, v. 18, n. 4, p. 713–9, 1970.

DAS, S. et al. Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: Effects of process variables. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, n. 1, p. 483–489, 2011.

DOKTOROVOVÁ, S. et al. Preclinical safety of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Current evidence from in vitro and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 108, p. 235–252, 2016.

FATHI, M.; MOZAFARI, M. R.; MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 23, n. 1, p. 13–27, 2012.

FRATINI, F. et al. Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 9, p. 839–843, 2016.

GANESAN, P.; NARAYANASAMY, D. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 6, n. July, p. 37–56, 2017.

GARG, A.; SINGH, S. Enhancement in antifungal activity of eugenol in immunosuppressed rats through lipid nanocarriers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 87, n. 2, p. 280–288, 2011.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Ultrasonics Sonochemistry Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 338–344, 2013.

GONÇALVES, V. S. S. et al. Supercritical fluid precipitation of ketoprofen in novel structured lipid carriers for enhanced mucosal delivery - A comparison with solid lipid particles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 495, n. 1, p. 302–311, 2015.

HERSH, E. M. . J et al. Ditiocarb sodium (diethyldithiocarbamate) therapy in patients with symptomatic HIV infection and AIDS: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study. **Journal of the American Medical Association**, v. 265, n. 12, p. 1538–1544, 1991.

HU, F. Q. et al. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, n. 1, p. 83–89, 2006.

HUANG, X.; BRAZEL, C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 2–3, p. 121–136, 2001.

IQBAL, M. et al. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 173–190, 2015.

JACINTHO, A. O. A, Determinação do cobre pelo método calorimétrico do dietilditiocarbamato de sódio. v. XXIV, p. 353, 1967.

JENNING, V.; THUNEMANN, A. F.; GOHLA, S. H. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. **Int. J. Pharm.**, v. 199, n. 2, p. 167–177, 2000.

KHERADMANDNIA, S. et al. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 6, p. 753–759, 2010.

KHOEE, S.; YAGHOUBIAN, M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 2392–2399, 2009.

KHOURI, R. et al. DETC induces Leishmania parasite killing in human invitro and murine in vivo models: A promising therapeutic alternative in leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. 8–9, 2010.

KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. p. 4–7, 2005.

KÜLKAMP, I. C.; GUTERRES, K. P. E S. S.; POHLMANN, A. R. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. v. 32, n. 8, p. 2078–2084, 2009.

KUMAR, R. et al. Solid lipid nanoparticles for the controlled delivery of poorly water soluble non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Ultrasonics - Sonochemistry**, 2017.

LUO, W. et al. Discovery of Beeswax as binding agent on a 6th-century BC Chinese Turquoise-inlaid Bronze sword. **Journal of Archaeological Science**, v. 39, n. 5, p. 1227–1237, 2012.

LUO, Y. et al. Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: Chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 221–229, 2015.

MÄDER, K.; MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 47, n. 2–3, p. 165–196, 2001.

MAPRIC. Crodamol GTCC- Triglicerídios de ac. capríco caprílico. v. 55, n. 11, 2016.

MATIAS, A. C. et al. Diethyldithiocarbamate induces apoptosis in neuroblastoma cells by raising the intracellular copper level, triggering cytochrome c release and caspase activation. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 1, p. 349–357, 2012.

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

MENESES, A. C. DE. Encapsulação de óleo de cravo em nanopartículas lipídicas e poliméricas em sistema livre de solvente, **Dissertação de Mestrado**, Florianópolis, 2016.

MEYAGUSKU; V.M. Desenvolvimento E Caracterização De Nanopartículas Lipídicas Sólidas Contendo Ciprofloxacino. 2014.

MÜHLEN, A.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery--drug release and release mechanism. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 45, n. 2, p. 149–155, 1998.

NAMDARIYAN, R.; FARAHBAKSH, A.; GOLESTANI, H. A. Encapsulation ZnO Nanoparticles by using Beeswax. p. 67–69, 2013.

PAUL B, G.; CHAPMAN, G. B.; M. C. PROBINE. The stability of sodium diethyldithiocarbamate in biochemical experiments. p. 538–540, 1959.

PERES, L. B. Síntese de nanopartículas de plla e nanopartículas blenda polímero natural (plla)/polímero sintético para encapsulação de fármacos, **Dissertação de Mestrado**, Florianópolis, UFSC, 2012.

PERES, L. B. et al. Nova estratégia de preparação de nanopartículas lipídicas sólidas para encapsulação de compostos hidrofílicos. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014**, v. 1, n. 2, p. 14075–17082, 2012.

PERES, L. B. Encapsulação dos fármacos antituberculose em nanopartículas para liberação sustentada, Florianópolis, UFSC, 2013.

PIMENTEL, L. F. et al. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 503–514, 2007.

PINTO, S. S. A. Nanopartículas lipídicas na promoção da absorção oral de fármacos. 2013.

PRATA, W. M. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas carreadoras de proteínas como potenciais adjuvantes para uso em vacinas**, 2011.

RAHDEN-STARON, I. et al. The effects of sodium

diethyldithiocarbamate in fibroblasts V79 cells in relation to cytotoxicity , antioxidative enzymes , glutathione , and apoptosis. p. 1841–1850, 2012.

REITHMEIER, H.; HERRMANN, J.; GÖPFERICH, A. Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 2–3, p. 339–350, 2001.

SANTOS, M.; MIRCO, J. Estudo de estabilidade de medicamentos. n. 1, 2015.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SCHWARZ, C. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. **Journal of Controlled Release**, v. 30, n. 1, p. 83–96, 1994.

SEVERINO, P. et al. Solid lipid nanoparticles for hydrophilic biotech drugs: Optimization and cell viability studies (Caco-2 & HEPG-2 cell lines). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 81, p. 28–34, 2014.

SILVA, A. H. Estratégias Para Avaliação Da Toxicidade De Sistemas Nanoestruturados. p. 77–95, 2011.

SILVA, B. D. G. DA. Nanopartículas lipídicas para a administração de produtos biofarmacêuticos. 2015.

SKROTT, Z.; CVEK, B. Diethyldithiocarbamate complex with copper : the mechanism of action in cancer cells. p. 1184–1192, 2012.

SOUTO, E. B. et al. Nanopartículas de lipídios sólidos: Métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1762–1769, 2011.

SUNDERMAN, F. W. Therapeutic properties of sodium diethyldithiocarbamate: Its role as an inhibitor in the progression of AIDS. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 21, n. 1, p. 70–81, 1991.

TAVEIRA, S. F. **Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para o tratamento tópico do câncer de pele.**Ribeirão Preto, 2009.

WEBER, S.; ZIMMER, A.; PARDEIKE, J. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: A review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 1, p. 7–22, 2014.

YE, K. et al. RSC Advances Use of caprylic / capric triglyceride in the encapsulation of dementholized peppermint. **RSC Advances**, v. 6, p. 84119–84126, 2016.