



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Isabelle Pinheiro Gomes da Silva

Desenvolvimento de nanoemulsões de 7-nitroindazol pela técnica de
homogeneização de alta pressão como uma nova abordagem terapêutica para o
tratamento da sepse

Florianópolis

2024

Isabelle Pinheiro Gomes da Silva

Desenvolvimento de nanoemulsões de 7-nitroindazol pela técnica de homogeneização de alta pressão como uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da sepse

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de farmácia do Centro de ciências da saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em farmácia

Orientador(a): Profa. Elenara Lemos Senna
Coorientadora: Dra. Amanda Ellen de Athayde

Florianópolis

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Silva, Isabelle Pinheiro Gomes da
Desenvolvimento de nanoemulsões de 7-nitroindazol pela
técnica de homogeneização de alta pressão como uma nova
abordagem terapêutica para o tratamento da sepse /
Isabelle Pinheiro Gomes da Silva ; orientadora, Elenara
Lemos Senna, coorientadora, Amanda Ellen de Athayde,
2024.
40 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Homogeneização por alta pressão. 3. 7
nitroindazol. 4. Nanoemulsões. I. Senna, Elenara Lemos .
II. Athayde, Amanda Ellen de . III. Universidade Federal
de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

Isabelle Pinheiro Gomes da Silva

Desenvolvimento de nanoemulsões de 7-nitroindazol pela técnica de homogeneização de alta pressão como uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da sepse

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de bacharela e aprovado em sua forma final pelo Curso de farmácia

Florianópolis, 27 de junho de 2024.

Insira neste espaço
a assinatura

Coordenação do Curso

Banca examinadora

Insira neste espaço
a assinatura

Prof.(a) Elenara Lemos Senna, Dr.(a)
Orientador(a)

Insira neste espaço
a assinatura

Prof. Luis Felipe Costa Silva Dr.

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Insira neste espaço
a assinatura

Fabiana Noronha Dornelles, Dr.(a)

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2024

AGRADECIMENTOS

Para meu pai, que é a minha base, que me ajudou juntar os meus pedaços quando despedacei e me fortaleceu com seu amor para que a cada despedaço, seja mais fácil me juntar. Ao pai que sempre me apoia, me incentiva, me ensina todos os dias e que eu amo incondicionalmente.

Ao meu irmão pelo apoio e carinho comigo, aos meus amigos Hellyn, Amigdar, Renan, Carolina e Igor, pela paciência, incentivo e apoio, sem todos vocês eu não chegaria até aqui.

Aos meus professores e orientadores, que me mostraram o caminho e apoiaram a caminhada.

E para minha avó, que infelizmente não pode ver esse sonho se realizar, mas, sei que me acompanha de onde estiver e sempre estará em meus pensamentos.

RESUMO

A sepse é definida como uma resposta desregulada do hospedeiro frente a um processo infeccioso associado à disfunção orgânica, constituindo a principal causa de morte nas Unidades de Terapia Intensiva e uma das principais causas de mortalidade hospitalar tardia. Estudos mencionam que o óxido nítrico (NO) desempenha um papel importante no desenvolvimento da sepse, contribuindo para a disfunção orgânica em pacientes sépticos. Neste contexto, a potencial aplicação do 7-nitroindazol (7-NI), tem sido avaliada pelo nosso grupo de pesquisa visando o tratamento da sepse. Entretanto, este composto tem um tempo de meia vida baixo, além de ser pouco solúvel em água, o que inviabiliza a obtenção de soluções parenterais. Assim, o emprego de nanoemulsões tem sido proposto como estratégia para veicular o 7-NI. Neste trabalho, a técnica de homogeneização de alta pressão foi empregada para a obtenção de nanoemulsões contendo o 7-NI. O efeito de parâmetros de homogeneização (variáveis independentes) como pressão aplicada (300 e 500 bar) e número de ciclos do homogeneizador (5, 10 e 15) sobre as características de tamanho, PDI, potencial zeta e eficiência de encapsulação foi avaliado por meio de uma análise estatística fatorial 2x3. Os valores de tamanho médio e índice de polidispersão variaram entre 205 e 481 nm e 0,348 e 0,494, respectivamente, enquanto o potencial zeta variou entre -12 e -15 mV, nas formulações testadas. Os valores de teor e de eficiência de encapsulação variaram de cerca de 410 a 520 µg/mL e de 64 a 68%, respectivamente. A análise da variância (ANOVA) mostrou que, dentre os fatores estudados, somente o tamanho médio das gotículas foi afetado pela alteração da pressão e números de ciclos do processo de homogeneização ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$, $p < 0,05$), sendo que não foi observado a interação entre estes dois fatores. Os resultados mostraram que com a utilização da pressão de 300 bar, uma redução significativa no tamanho médio ocorreu quando o número de ciclos da homogeneização aumentou de 5 para 10 e para 15. Igualmente, com o aumento da pressão de 300 para 500 bar, uma redução no tamanho médio foi observada, mantendo-se constante o número de ciclos da homogeneização em 5 ou 15. Em suma, os resultados mostraram a viabilidade de obtenção de nanoemulsões de 7-NI pela técnica de homogeneização de alta pressão.

Palavras-chaves: sepse, 7-nitroindazol, nanoemulsões, homogeneização por alta pressão.

ABSTRACT

Sepsis is defined as a dysregulated host response to an infectious process associated with organ dysfunction, constituting the leading cause of death in Intensive Care Units and one of the leading causes of late hospital mortality. Studies mention that nitric oxide (NO) plays an important role in the development of sepsis, contributing to organ dysfunction in septic patients. In this context, our research group has evaluated the potential application of 7-nitroindazole (7-NI) for treating sepsis. However, this compound has a short half-life and poor aqueous solubility, which limits its use in clinics. Thus, nanoemulsions have been proposed as a strategy to deliver 7-NI. This study employed the high-pressure homogenization technique to obtain nanoemulsions containing 7-NI. The effect of homogenization parameters (independent variables) such as applied pressure (300 and 500 bar) and number of homogenizer cycles (5, 10, and 15) on the characteristics of size, PDI, zeta potential, and encapsulation efficiency was evaluated using a 2x3 factorial statistical analysis. The average size and polydispersity index values varied between 205 and 481 nm and 0.348 and 0.494, respectively, while the zeta potential varied between -12 and -15 mV, in the formulations tested. The content and encapsulation efficiency values ranged from around 410 to 520 $\mu\text{g/mL}$ and from 64 to 68%, respectively. The analysis of variance (ANOVA) showed that, among the factors studied, only the average droplet size was affected by the change in pressure and number of cycles of the homogenization process ($F_{\text{calculated}} > F_{\text{critical}}$, $p < 0.05$), and not the interaction between these two factors was observed. The results showed that with the use of 300 bar pressure, a significant reduction in the average size occurred when the number of homogenization cycles increased from 5 to 10 and 15. Likewise, with the increase in pressure from 300 to 500 bar, a reduction in average size was observed, keeping the number of homogenization cycles constant at 5 or 15. In short, the results showed the feasibility of obtaining 7-NI nanoemulsions using the high-pressure homogenization technique.

Keywords: sepsis, 7-nitroindazole, nanoemulsions, high pressure homogenization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do 7-nitroindazol.	14
Figura 2. Estrutura de nanoemulsões óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O).	16
Figura 3. Obtenção de nanoemulsões por emulsificação espontânea.	17
Figura 4. Processo de homogeneização por alta pressão.	19
Figura 5. Efeito das variáveis independentes pressão (bar) e número de ciclos sobre as características das nanoemulsões de 7-NI.	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Composição das formulações de nanoemulsões contendo 7-NI	26
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis dependentes e combinações utilizadas na análise estatística fatorial 2x3.	27
Tabela 2. Características de tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanoemulsões de 7-NI obtidas nos ensaios preliminares de preparação por homogeneização por alta pressão.	30
Tabela 3. Valores de tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta das formulações testadas na análise fatorial (n = 3).	31
Tabela 4. Análise da variância realizada na avaliação do efeito dos parâmetros de homogeneização por alta pressão sobre as características das nanoemulsões de 7-nitroindazol.	32
Tabela 5. Valores de teor de 7-NI e eficiência de encapsulação das formulações testadas na análise fatorial (n = 3).	34
Tabela 6. Valores médios obtidos para as características físico-químicas e de encapsulação do 7-NI nas nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea e homogeneização de alta pressão.	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS-1	Isoforma neuronal óxido nítrico
NOS-2	Isoforma induzida óxido nítrico
NOS-3	Isoforma endotelial óxido nítrico
7-NI	7-nitroindazol
NE	Nanoemulsões
CLP	Modelo de ligadura e perfuração do ceco
C _{max}	Concentração máxima
K _e	Constante de velocidade de eliminação
t _{1/2}	Tempo de meia vida plasmática (t _{1/2})
HAP	Homogeneizador de alta pressão
NE-7NI	Nanoemulsões contendo 7-NI
PDI	Índice de polidispersão
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3. OBJETIVOS	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.2.1 Preparação de nanoemulsões pela técnica de homogeneização de alta pressão	24
4.2.2 Determinação do diâmetro médio da gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta	26
4.2.3 Avaliação do teor e eficiência de encapsulação	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

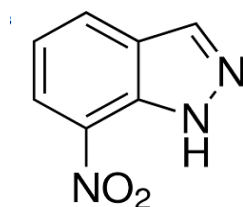
A sepse é a principal causa de morte nas Unidades de Terapia Intensiva e uma das principais causas de mortalidade hospitalar tardia. É atualmente definida como uma resposta desregulada do hospedeiro frente a um processo infeccioso associado à disfunção orgânica. Durante a sepse ocorre a ativação precoce tanto de respostas pró- como anti-inflamatórias, e também alterações importantes em vias não imunológicas, tais como cardiovascular, neuronal, autonômica, hormonal, bioenergética, metabólica e de coagulação, sendo que todas elas compartilham significância prognóstica (SINGER *et al.*, 2016). A evolução da sepse leva ao choque séptico. Tal condição, além de aumentar a taxa de mortalidade, é caracterizada pela hipotensão refratária à reposição volêmica, com necessidade de administração de medicamentos vasoconstritores. Entretanto, boa parte dos pacientes com choque séptico apresenta um quadro de hipotensão que não é revertido pela fluidoterapia ou pelos agentes vasoconstritores, o que explica a sua elevada letalidade (SINGER *et al.*, 2016).

Muitos estudos mencionam que o óxido nítrico (NO) desempenha um papel no desenvolvimento da sepse. Isso é apoiado pelo aumento dos níveis de nitrito e nitrato no sangue, que são produtos resultantes do metabolismo do NO, em pacientes com sepse e choque séptico. O NO é uma molécula gasosa envolvida na regulação de várias respostas fisiológicas e fisiopatológicas do organismo, como a pressão sanguínea, função plaquetária, defesa do organismo e neurotransmissão. É sintetizado a partir da L-arginina em uma reação catalisada por uma família de enzimas, as óxido nítrico sintases (NOS) (KORHONEN *et al.*, 2005). A enzima óxido nítrico sintase possui três isoformas, que apesar de serem semelhantes estruturalmente, são reguladas de forma distinta: as isoformas neuronal (NOS-1 ou nNOS) e endotelial (NOS-3 ou eNOS), também chamadas de constitutivas; e a isoforma induzível (NOS-2 ou iNOS). Tendo em vista sua localização, o NO proveniente da isoforma neuronal está envolvido em importantes processos fisiológicos. No SNC tem papel na plasticidade sináptica e neurotransmissão; no músculo esquelético atua na dilatação de vasos sanguíneos, permitindo o aumento da irrigação muscular para contração adequada; no retículo sarcoplasmático cardíaco

participa da regulação autócrina da contratilidade cardíaca (GOVERS & OESS, 2004). Assim, o desbalanço na produção do NO pela NOS-1 contribui para o desenvolvimento de processos patológicos. Na sepse, estudos mostraram que disfunção vascular está associada à maior expressão e associação física da óxido nítrico sintase e da guanilato ciclase e maior produção de guanosina monofosfato cíclico. Estes estudos igualmente mostraram que a inibição seletiva da NOS-1 restaura a resposta aos vasoconstritores (NARDI *et al.*, 2014).

O 7-nitroindazol (7-NI) (Figura 1) é uma substância conhecida por sua capacidade de inibir seletivamente a enzima óxido nítrico sintase neuronal (NOS-1). Age como inibidor seletivo *in vivo* da NOS-1 ao ligar-se reversivelmente ao grupo heme desta enzima, impedindo a ligação do cofator BH₄ (Bush & Pollack, 2000) e competindo com a L-arginina (Klatt *et al.*, 1994). Apesar de sua farmacocinética ter se mostrado dose-dependente em injeções intraperitoneais, o composto tem um tempo de meia vida baixo, variando de 25 a 87 minutos. Mesmo após a administração de doses elevadas, o tempo de meia vida não foi superior a duas horas (BUSH; POLLACK, 2000).

Figura 1. Estrutura química do 7-nitroindazol.



Fonte: Drug Bank (2020).

O 7-NI é um composto que exibe baixa solubilidade aquosa, e por este motivo, foi planejado o desenvolvimento de nanoemulsões visando a sua administração intravenosa. Neste caso, nanoemulsões foram desenvolvidas empregando a técnica de emulsificação espontânea (BARP *et al.*, 2016). Tais sistemas mostraram ser capazes de veicular o 7-NI pela via intravenosa e aumentar a sua meia-vida plasmática (FRANÇA *et al.*, 2024). Entretanto, devido à demanda do emprego de solventes orgânicos, o método de emulsificação espontânea apresenta desvantagens na produção em grande escala, visto que seriam necessárias etapas adicionais no processo de fabricação para realizar a remoção do solvente. Assim, neste trabalho visamos a obtenção das nanoemulsões pela técnica de homogeneização de alta pressão, por ser um método mais apropriado para aplicações industriais, devido à

facilidade de operação e escalonamento, reprodutibilidade e elevada capacidade de processamento (YUKUYAMA *et al.*, 2019).

Os carreadores tais como as nanoemulsões, micelas e lipossomas têm sido considerados sistemas de liberação alternativos às formas farmacêuticas convencionais, por aumentar a biodisponibilidade dos fármacos, melhorar a eficácia terapêutica e reduzir os efeitos adversos (CUNHA *et al.*, 2020). Entretanto, suas características peculiares como tamanho, estrutura e capacidade de veicular fármacos, juntamente as variações das técnicas de preparação, têm gerado desafios para a indústria e aos órgãos reguladores. Há uma falta de protocolos específicos para o seu desenvolvimento pré-clínico, que pode levar ao fracasso em muitos ensaios clínicos, limitando a aplicação proposta.

Além disso, a transferência em grande escala do processo de fabricação constitui outra limitação à produção industrial e utilização clínica (CUNHA *et al.*, 2020). No desenvolvimento das formulações, delineamentos estatísticos são empregados de modo a compreender o efeito de variáveis de processo sobre as características finais do produto. Neste trabalho, buscou-se compreender quais fatores são influentes para a obtenção de formulações com as características desejáveis similares àquelas obtidas pela técnica de emulsificação espontânea.

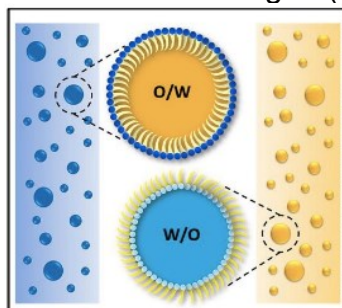
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NANOEMULSÕES

Nanoemulsões (NE) são dispersões coloidais cineticamente estáveis constituídas de duas fases líquidas imiscíveis e com tamanho de gota de algumas dezenas a algumas centenas de nanômetros, nos quais um líquido é disperso no outro utilizando uma mistura de surfactantes apropriada para sua estabilização (GUPTA *et al.*, 2016; LOVELYN & ATTAMA, 2011; SINGH *et al.*, 2017). Dependendo da composição, nanoemulsões podem ser dispersões óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), ou ainda múltiplas (A/O/A), podendo dessa forma veicular fármacos hidrofílicos e lipofílicos (Figura 2). Considerando que a maioria dos compostos ativos em desenvolvimento ou disponíveis no mercado apresentam baixa solubilidade em água,

as NEs do tipo O/A têm sido alvo da maioria dos estudos envolvendo a liberação de fármacos (PENGON *et al.*, 2018; SHAKER *et al.*, 2019).

Figura 2. Estrutura de nanoemulsões óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O).



Adaptado de Singh *et al.* (2017).

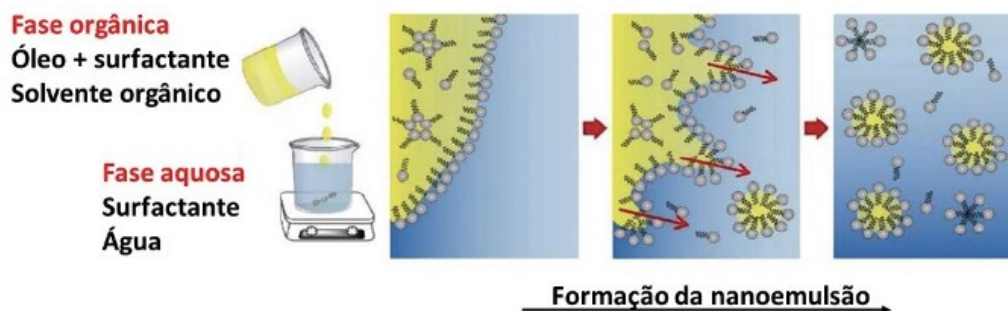
As nanoemulsões podem ser preparadas por métodos que utilizam baixa energia, como a emulsificação espontânea, ou que utilizam alta energia, os quais requerem equipamentos que conduzam à ruptura da fase oleosa em finas gotículas e mistura de ambas as fases oleosa e aquosa. Uma das principais características dos métodos de baixa energia é a utilização de energia armazenada no sistema para produzir as gotículas. Neste caso, são levados em conta as propriedades dos surfactantes, óleo e fase aquosa que formam espontaneamente a NE com base em procedimentos simples de mistura ou alterações das condições do sistema (SINGH *et al.*, 2017).

Nanoemulsões contendo 7-NI têm sido preparadas utilizando a técnica de emulsificação espontânea. Esta técnica é baseada na dispersão de uma fase orgânica em uma fase aquosa, com posterior evaporação dos solventes e redução do volume sob pressão reduzida (Figura 3). A fase orgânica é composta geralmente por óleo e um solvente miscível em água como acetona ou etanol, contendo ou não um surfactante lipofílico. Na fase aquosa são adicionados os componentes hidrofílicos da formulação, se assim houver, tais como surfactantes, conservantes, agente isotonzantes e outros. Após a homogeneização isolada dessas fases, a fase orgânica é injetada na fase aquosa sob agitação magnética constante (Li *et al.* 2020).

A rápida difusão do solvente orgânico na fase aquosa leva a uma turbulência interfacial (efeito Maragoni) que resulta na redução da tensão interfacial e na formação de gotas de tamanho reduzido, formando instantaneamente a nanoemulsão. A agitação magnética é mantida por determinado tempo, permitindo que o sistema atinja o equilíbrio. Só depois o solvente orgânico é removido e a formulação concentrada

até o volume desejado por evaporação sob pressão reduzida (AZMI *et al.*, 2019; RAI *et al.*, 2018).

Figura 3. Obtenção de nanoemulsões por emulsificação espontânea.



Adaptado de Li *et al.* (2020).

As nanoemulsões contendo 7-NI têm sido avaliadas em modelos experimentais de sepse. Estudos em cultura de células de músculo liso A7r5 mostraram que, diferente do 7-NI livre (não associado), as nanoemulsões foram capazes de reduzir a produção de óxido nítrico de maneira prolongada. Além disso, os efeitos do pré-tratamento com a nanoemulsão de 7-NI em ratos sépticos foram avaliados pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e em camundongos com sepse por pneumonia. A nanoemulsão de 7-NI preveniu em 40% a mortalidade nos dois modelos, enquanto que o 7-NI livre preveniu na mesma proporção apenas no modelo de sepse por CLP (BARP *et al.*, 2018).

Estudos farmacocinéticos recentes mostraram que nanoemulsões aumentam os valores de concentração máxima (C_{max}), constante de velocidade de eliminação (K_e) e meia vida plasmática ($t_{1/2}$) do 7-NI em ratos. Além disso, estudos de toxicidade aguda *in vivo* mostraram que as nanoemulsões são seguras, não produzindo qualquer efeito adverso, quando administradas por via intravenosa na dose de 3 mg/kg nos animais (FRANÇA *et al.*, 2024).

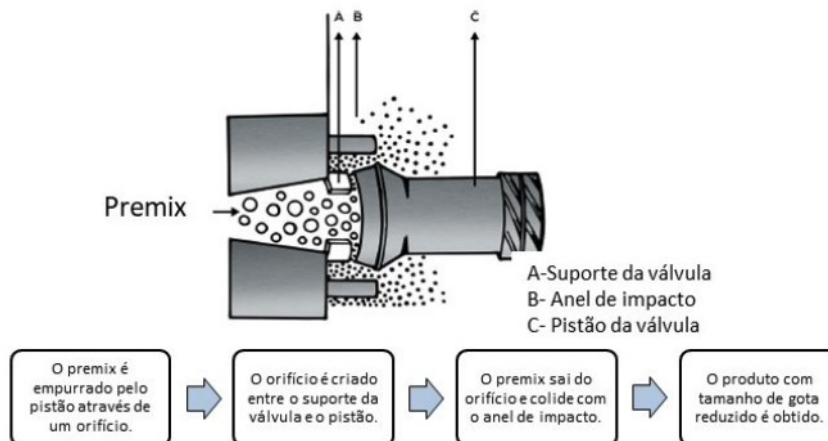
Apesar da simplicidade e facilidade de execução, o método de emulsificação espontânea requer o emprego de solventes orgânicos, o que constitui uma desvantagem quando uma produção em grande escala é necessária, visto que etapas de remoção do solvente devem ser introduzidas no processo de fabricação. Dessa

forma, a técnica de homogeneização de alta pressão se insere como uma opção mais apropriada para aplicações industriais, devido à facilidade de operação, escalonamento, reprodutibilidade e elevada capacidade de processamento (YUKUYAMA *et al.*, 2019). O homogeneizador de alta pressão (HAP) é um equipamento especificamente empregado na indústria farmacêutica para a redução do tamanho, mistura e estabilização de dispersões como macro e microemulsões e suspensões.

2.2 HOMOGENEIZAÇÃO POR ALTA PRESSÃO

Na homogeneização por alta pressão, uma pressão é aplicada para forçar a passagem do líquido por uma abertura estreita. As gotículas da emulsão inicial (*premix*) são submetidas aos fenômenos de cisalhamento, cavitação e turbulência, que levam à sua ruptura e, portanto, à redução do tamanho das gotículas para valores nanométricos (YADAV; KALE, 2020). Assim, a pressão aplicada afeta diretamente o tamanho final das gotículas, sendo uma etapa crítica do processo. Para se completar um ciclo, é necessário a circulação completa do *premix* pelo sistema. Visto que o líquido está sendo submetido a um novo cisalhamento, cavitação e turbulência a cada ciclo, o tamanho da gota é reduzido a cada passagem completa. Assim, o número de ciclos tem relação direta com o tamanho da gota resultante, mesmo à pressão constante. (Figura 4).

Figura 4. Processo de homogeneização por alta pressão.



Adaptado de Yadav & Kale (2020).

Considerando o exposto acima, este trabalho teve como objetivo obter nanoemulsões contendo 7-NI pela técnica de homogeneização de alta pressão. As nanoemulsões produzidas por esta técnica devem apresentar características físico-químicas similares às aquelas obtidas pela emulsificação espontânea que são: tamanho de cerca de 250 nm, potencial zeta negativo e uma eficiência de encapsulação maior que 70%. Para isto, um estudo de formulação foi realizado para avaliar o efeito dos parâmetros como velocidade de homogeneização do *premix*, pressão aplicada e número de ciclos, sobre as características finais das nanoemulsões. Por meio de um delineamento estatístico pretendeu-se compreender como os parâmetros de processo afetam a obtenção das nanoemulsões de 7-NI pela técnica de homogeneização por alta pressão.

2.3 APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE HOMOGENEIZAÇÃO DE ALTA PRESSÃO NO PREPARO DE NANOEMULSÕES (“ESTADO DA ARTE”)

A utilização de nanoemulsões em alimentos e fármacos vem ganhando cada vez mais destaque, como mostrado por Kumar et al (2019) em seu artigo de revisão sobre técnicas para formulação de nanoemulsões para administração de medicamentos, considerando que seu uso apresenta diversas vantagens, porém, ainda apresenta desafios e tem potencial para o emprego de novas tecnologias e formulações (KUMAR et al., 2019).

A aplicação da técnica de homogeneização de alta pressão das nanoemulsões em medicamentos, seja por via oral, tópica ou intravenosa, além de outras vias, pode promover avanços cada vez mais eficientes em relação aos fatores que contribuem para uma baixa da biodisponibilidade que ocorrem com as formulações mais tradicionais, como o metabolismo de primeira passagem, em medicamentos que são muito lipofílicos, dificultando a absorção pelo organismo (KUMAR et al., 2019).

Para a produção de nanoemulsões, podem ser empregadas diversas técnicas e essas podem ser divididas sumariamente em duas categorias: as técnicas que se utilizam de alta ou baixa energia. Os métodos de alta energia, como por exemplo o método de homogeneização por alta pressão, usualmente se mostram mais vantajosos, uma vez que, é possível ter maior controle sobre seus parâmetros e

resultados, como o tamanho das partículas, o potencial zeta e o índice de polidispersão (KUMAR et al., 2019). De acordo com Gawin-Mikołajewicz (2024), que em seu trabalho sobre o efeito das condições de homogeneização de alta pressão nas propriedades físico-químicas e estabilidade de nanoemulsões oculares de fluconazol relata que, para se obter partículas de tamanho nanométrico para a fase interna oleosa, pode-se utilizar de métodos de alta energia como homogeneização em alta pressão (HPH) e microfluidização, e entre as duas, a HPH é geralmente preferida para a produção industrial devido à sua alta eficiência, escalabilidade, repetibilidade do processo e capacidade de personalizar o tamanho das gotículas e ampliar a produção.

Ainda de acordo com Gawin-Mikołajewicz, (2024), um índice baixo de polidispersão pode ser obtido aumentando o número de ciclos no processo de homogeneização, porém, a eficiência do processo pode ser afetada, considerando que conforme a pré-emulsão é submetida ao processo por mais tempo, sua energia interna aumenta em forma de calor, podendo prejudicar os componentes da sua emulsão devido ao aumento da temperatura, sendo isso, uma complicação significativa do método.

Estes autores demonstraram que a pressão aplicada, o número de ciclos e a temperatura de saída da homogeneização influenciaram significativamente o tamanho médio da partícula e os valores de índice de polidispersão das nanoemulsões em investigação. Após a otimização dos parâmetros de homogeneização, foi determinado que três ciclos a uma pressão de 1000 bar representavam condições favoráveis do processo para a obtenção de amostras satisfatórias em seu estudo (GAWIN-MIKOŁAJEWICZ, 2024).

Já Sharma *et al.* (2014), para otimizar seu processo ao produzir nanoemulsões e avaliar o efeito da homogeneização de alta pressão nas mesmas, aplicou o mínimo possível de ciclos com pressões de 1000 a 2500 bar, para a obtenção do menor tamanho possível de partícula em suas nanoemulsões e um baixo índice de polidispersão. A autora concluiu que conforme a pressão aumentou, o tamanho das gotículas reduziu significativamente na faixa entre 1000 e 2000 bar, já entre 2000 e 2500 bar, não houve mudança significativa, sugerindo que o aumento de pressão tem influência direta no tamanho da partícula, porém há um limite. Ao manter a pressão estável em 2000 bar, foi analisado o efeito do número de ciclos no tamanho da partícula, aumentando os ciclos de 1 para 4, causando também uma diminuição significativa. Assim como a pressão, o número de ciclos também apresentou uma

limitação levando em conta que a partir de quatro ciclos, o tamanho das gotículas não apresentou mudanças.

Chong e colaboradores (2018) utilizaram mais de número de ciclos de homogeneização, aumentando a pressão de homogeneização de 300 a 900 bar resultando em diminuições significativas no tamanho das gotículas ao propor uma otimização dos parâmetros para a preparação de nanoemulsões baseadas em óleo de palma vermelho rico em tocotrienol em seu trabalho. A influência do número de ciclos de homogeneização no tamanho das gotículas mostrou que o tamanho das gotículas atingiu um patamar após um certo número de ciclos de homogeneização. Isso indica que a energia fornecida pelo processo de alta pressão pode reduzir o tamanho das gotículas, mas após um certo número de ciclos sob a mesma pressão, a energia alcança um patamar em que não é possível reduzir ainda mais os tamanhos das gotículas.

Também neste estudo, o autor fixou a pressão de homogeneização de 600 bar para aprofundamento no estudo, já que a pressão de 300 bar resultou em um tamanho de gotícula maior do que utilizando 600 e 900 bar. Também foi observado que em pressões de 600 e 900 bar, que a partir de 4 ciclos não há uma mudança significativa ($P > 0,05$) no tamanho das gotículas. Chong *et al.* (2018), observou que no ápice do experimento, o surfactante foi totalmente utilizado para encapsular o óleo para a formação da nanoemulsão, assim a pressão de homogeneização mais alta (900 bar) não teve um efeito significativo na redução do tamanho das gotículas, demonstrando assim, outra limitação da técnica.

Wilson e colaboradores. (2022) afirmam que as nanoemulsões são cineticamente estáveis, porém, termodinamicamente instáveis, levando a uma separação de fases inevitável, sendo assim é importante considerar o tempo de estabilidade de uma nanoemulsão como um importante fator para o desenvolvimento de um fármaco. O uso de fosfolipídeos, substâncias abundantes no corpo humano, podem diminuir a toxicidade do composto, essas substâncias já são aplicadas em larga escala em diversos produtos alimentícios e farmacêuticos.

De tal forma, exemplos como a lecitina de soja, além de ser retirada de uma matéria prima vegetal, apresenta boa estabilidade. Essa estabilidade pode ser de maneira em que as gotas são eletricamente repelidas por sua forma estrutural básica e comum

dos fosfolipídeos, com um fosfato carregado positivamente e uma dois (conjuntos) de ácidos (altamente lipofílicos). Os fosfolipídeos também podem promover uma barreira estérica, aumentando a energia necessária para a degradação, garantindo maior estabilidade para a emulsão (WILSON et al., 2022).

Além da diminuição do diâmetro médio das gotículas das emulsões, a homogeneização em alta pressão também pode auxiliar o desmanche de possíveis floculações. Ao utilizar pressões mais baixas, a ruptura das gotas pode não ser tão efetiva devido à baixa energia que foi aplicado e por consequência, geram gotas maiores que o esperado para uma nanoemulsão, além de afetar sua estabilidade.

De acordo com Juttulapa (2017), que em seu trabalho sobre o efeito da homogeneização de alta pressão sobre a estabilidade de emulsões contendo zeína e pectina, relata que as proteínas e emulsificantes de baixo peso molecular contribuem para a produção e estabilização de emulsões promovendo a redução da tensão superficial das partículas. Assim como Flourey (2000), que estudou sobre o efeito da homogeneização de alta pressão no tamanho das gotas, distribuições e propriedades reológicas de modelo de emulsões de óleo em água, relatou que as proteínas e a homogeneização de alta pressão favoreceu as interações moleculares durante o processo de emulsificação, formando assim, uma película protetora ao redor das gotas aumentando a estabilidade para a partícula.

O emprego de nanoemulsões de 7-nitroindazol procura superar as limitações da molécula para aplicação parenteral em pacientes que se encontram em choque séptico, considerando que a molécula possui baixo tempo de meia vida e insolúvel em água, em uma nanoemulsão seria possível veicular a formulação com segurança e eficiência.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanoemulsões contendo 7-nitroindazol pela técnica de homogeneização de alta pressão.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Preparar nanoemulsões de 7-NI pela técnica de homogeneização de alta pressão;
- b) Caracterizar as nanoemulsões quanto às propriedades de tamanho, potencial zeta, teor de 7-NI;
- c) Avaliar os efeitos das variáveis do processo de obtenção da nanoemulsão, como velocidade de agitação para obtenção do premix; número de ciclos e pressão no homogeneizador de alta pressão sobre as características finais das nanoemulsões usando um delineamento estatístico fatorial.
- d) Compreender os fatores críticos do processo que afetam a obtenção de nanoemulsões pela técnica de homogeneização de alta pressão.
- e) Comparar os resultados obtidos com estudos relatados na literatura.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 MATERIAIS

O óleo de rícino, polissorbato 80 (Tween® 80), 7-nitroindazol e glicerol foram adquiridos da Sigma-Aldrich/Merck (EUA). Lecitina de soja (Lipoid S100, mínimo de 94% de fosfatidilcolina) e N-(carbonil-metoxipolietilenoglycol-2000) -1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE-PEG2000; Lipoid PE 18:0/18:0 – PEG 2000) foram adquiridos da Lipid Ingredients (Brasil). Acetonitrila grau HPLC foi adquirido da Navelab (Brasil). A água ultrapura foi obtida. Água ultrapura foi obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, EUA). Todos os outros os solventes empregados foram de grau analítico.

1.2 METODOLOGIA

4.2.1 Preparação de nanoemulsões pela técnica de homogeneização de alta pressão

As nanoemulsões contendo 7-NI (NE-7NI) foram preparadas conforme composição previamente estabelecida por BARP et al. (2018) pela técnica de emulsificação espontânea, com modificações (Quadro 1). Brevemente, uma fase oleosa constituída de óleo de rícino, lecitina de soja (Lipoid S100), Tween 80 e glicerol foi aquecida até temperatura de 60 a 70 °C. Uma solução de 7-NI foi preparada em uma mistura de DMSO e etanol com auxílio de sonda de ultrassom e imediatamente adicionada à fase oleosa previamente aquecida. A fase aquosa foi igualmente aquecida em banho de água até cerca de 60 a 70° C e adicionada à fase oleosa. A mistura então foi submetida à homogeneização em homogeneizador do tipo rotor/estator. A pré-emulsão (premix) foi submetida à homogeneização usando homogeneizador de alta pressão Homolab A10 (Alitec, Brasil). Finalmente, o pH das formulações ajustado para 7,4 com NaOH 0,1 M ou HCl 0,1 M e filtradas através de papel filtro quantitativo 8 µm.

Quadro 1. Composição das formulações de nanoemulsões contendo 7-NI

	Emulsificação espontânea*		Homogeneização de alta pressão	
	Quantidade (mg)	Concentração (% m/V)	Quantidade (g)	Concentração (% m/V)
Óleo de Rícino	500 mg	2,5	5	2,5
Lecitina de soja	7 mg	0,035	0,15	0,075
7-nitroindazol	14 mg	0,070	0,140	0,07
Tween 80	100 mg	0,5	2,0	1,0
Glicerol	450 mg	2,25	5,0	2,50
DMSO	-	-	1,5	0,75
Álcool Etilico	-	-	1,0	0,5
Água qsp	20 mL	100 mL	200	200

*De acordo com BARP et al., 2018.

Uma análise fatorial foi realizada com o intuito de avaliar o efeito de variáveis da técnica de homogeneização por alta pressão sobre as características físico-químicas e de encapsulação do 7-NI das nanoemulsões. O planejamento fatorial utilizado foi um delineamento com dois fatores (variáveis independentes), com dois e três níveis, resultado em 6 formulações, preparadas em triplicatas. Os parâmetros da homogeneização por alta pressão avaliados foram: pressão aplicada (300 ou 500 bar) e número de ciclos (5, 10 ou 15 ciclos). Considerando o volume de 200 mL da formulação e a vazão de 10L/h do homogeneizador, um ciclo (uma passagem completa da formulação pelo homogeneizador) correspondeu a 1,2 minutos. As variáveis dependentes avaliadas foram tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI), potencial zeta, teor e eficiência de encapsulação do 7-NI. A análise estatística foi realizada usando o software Statistica 13 (TIBCO, Estados Unidos). Os fatores e níveis utilizados e suas combinações possíveis encontram-se sumarizados na tabela 1.

Tabela 1. Variáveis dependentes e combinações utilizadas na análise estatística fatorial 2x3.

	P1 (300 bar)	P2 (500 bar)
C1 (5 ciclos)	P1 C1	P2 C1
C2 (10 ciclos)	P1 C2	P2 C2
C3 (15 ciclos)	P1 C3	P2 C3

4.2.2 Determinação do diâmetro médio da gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta

O diâmetro médio de gotícula e o índice de polidispersão foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz em Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). As medidas foram realizadas a 25 °C após diluição apropriada das amostras (1:100 v/v) em água ultrapura (Milli-Q®, Millipore, EUA). A análise do tamanho e distribuição granulométrica foi realizada em ângulo fixo de detecção de 173°. O potencial zeta das nanoemulsões foi determinado por anemometria laser-Doppler em equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). As amostras foram diluídas 1:100 (v/v) em água ultrapura (Milli-Q®, Millipore, EUA) e acondicionadas em células eletroforéticas, onde o potencial de ± 150 mV é estabelecido. Os valores de potencial zeta foram calculados a partir da média dos valores de mobilidade eletroforética obtidos, usando a equação de Smoluchowski.

4.2.3 Avaliação do teor e eficiência de encapsulação

O teor de 7-NI nas nanoemulsões foi determinado conforme metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em modo de fase reversa previamente desenvolvida e validada por Barp (2016). As análises foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu constituído de bomba LC-10AD e detector UVVIS modelo SDP-10AVP (Kyoto, Japão), usando as seguintes condições: coluna de fase reversa Luna C18 5 μ m (150 x 4,60 mm – Phenomenex, USA) mantida a 30 °C, acoplada a uma pré-coluna (4,0 mm x 3,0 mm – Phenomenex, USA); fluxo de 1 mL.min⁻¹; fase móvel de tampão acetato de amônia (25 mM, pH ajustado com NaOH 0,1M para 8,0) e acetonitrila (50:50 v/v) e detecção no UV no comprimento de onda de 360 nm.

Para as análises de teor, uma alíquota de 50 μL de cada uma das formulações contendo 7-NI foi transferida para balões volumétricos de 5,0 mL e o volume final completado com acetonitrila. As amostras foram mantidas em banho ultrassônico durante 20 min. Em seguida as amostras foram filtradas em membrana de PVDF (0,22 μm , Milipore) e injetadas no cromatógrafo. As análises foram realizadas em triplicata e as áreas médias dos picos referentes ao 7-NI foram comparadas à área da solução padrão de concentração conhecida (10 $\mu\text{g/mL}$) analisada nas mesmas condições. O teor de 7-NI nas nanoemulsões foi expresso como $\mu\text{g/mL}$. Para a avaliação da eficiência de encapsulação, as nanoemulsões foram submetidas à ultrafiltração/centrifugação usando unidades Microcon® com membrana Ultracel YM-100 (100.000 NMWL, Millipore, EUA). Volumes de 400 μL de cada uma das formulações foram adicionados nas unidades de filtração e centrifugadas a 3000 x g por 10 minutos. O ultrafiltrado foi analisado por CLAE, nas condições previamente descritas. A eficiência de encapsulação (%) foi estimada como sendo a diferença entre a concentração total de fármaco e a sua concentração no sobrenadante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos anteriores descrevem a obtenção de nanoemulsões contendo 7-NI pela técnica de emulsificação espontânea com características físico-químicas adequadas e elevada taxa de encapsulação (BARP et al., 2018; FRANÇA et al., 2024). No entanto, esta técnica utiliza solventes orgânicos para a sua preparação, além de requerer uma elevada relação solvente/óleo para obtenção de gotículas de tamanho reduzido. Isto torna necessário a inclusão de uma etapa de remoção do solvente do solvente que é simples de realizar em escala laboratorial, mas pode impor dificuldades no escalonamento da produção (SANCHEZ-LOPES et al., 2019). Assim, a técnica de homogeneização por alta pressão foi empregada neste trabalho visando obter nanoemulsões de 7-NI com características similares às aquelas obtidas pela emulsificação espontânea, tendo como ponto de partida a formulação já desenvolvida nos estudos anteriores (ver Quadro 1).

Para a preparação das nanoemulsões por homogeneização por alta pressão, as fases oleosa e aquosa da formulação foram aquecidas e misturadas em condições controladas de temperatura e agitação de modo a obter uma dispersão homogênea. A mistura das duas fases foi realizada em homogeneizador de turbina e, em seguida, a emulsão primária foi submetida ao cisalhamento em homogeneizador de alta pressão com o intuito de reduzir o tamanho das gotículas. Considerando este processo de obtenção, vários fatores podem afetar as características finais das nanoemulsões. Inicialmente, em ensaios preliminares, os parâmetros de velocidade de agitação da emulsão primária, pressão aplicada e número de ciclos foram alterados. Além disso, a adição de um pequeno volume de DMSO e álcool etílico nas formulações foi necessário para a completa solubilização do 7-NI na fase oleosa. Igualmente, concentrações dos surfactantes (lecitina de soja) e Tween 80 foram aumentados nas formulações, na busca de uma melhor estabilização. Os resultados de tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta das nanoemulsões obtidas nos estudos iniciais encontram-se compilados na tabela 2. Como mostrado nesta tabela, o aumento do número de ciclos, ou seja, o número de passagens da formulação pelo homogeneizador, pareceu impactar nas propriedades de tamanho e índice de polidispersão das nanoemulsões, provocando uma redução destes parâmetros. Por outro lado, um efeito oposto ao esperado foi verificado quando

o aumento da velocidade de agitação da emulsão primária e pressão do homogeneizador foram aumentados.

Tabela 2. Características de tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanoemulsões de 7-NI obtidas nos ensaios preliminares de preparação por homogeneização por alta pressão.

	Parâmetros avaliados			Características físico-químicas		
	Velocidade de agitação (rpm)	Pressão (bar)	Número de ciclos	Tamanho médio (nm)	PDI	Potencial zeta (nm)
F1	22.000	500	10	454,5	0,452	-11,1
F2	22.000	700	10	836,3	>1,0	-13,2
F3	22.000	500	5	824,1	0,719	-13,6
F4	22.000	500	10	446,8	0,462	-13,4
F5	22.000	500	15	184,4	0,386	-14,8
F6	14.000	500	5	643,0	0,624	-18,9
F7	22000	500	5	492,2	0,491	-15,9
F8	30000	500	5	1056	0,836	-18,1

Em função dos resultados preliminares obtidos e visando reduzir o número de experimentos, uma análise estatística fatorial foi realizada mantendo-se constante a velocidade de agitação da emulsão primária em 17.000 rpm, sendo os fatores pressão do homogeneizador (300 e 500 bar) e número de ciclos (5, 10 e 15) selecionados com variáveis independentes. As variáveis dependentes avaliadas foram tamanho médio da gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação e teor de 7-NI nas formulações. Os valores de tamanho médio e índice de polidispersão variaram entre 205 e 481 nm e 0,348 e 0,494, respectivamente, enquanto o potencial zeta variou entre -12 e -15 mV, nas formulações testadas (Tabela 3). Tais diferenças refletem a influência de parâmetros de homogeneização por alta pressão sobre as características finais das partículas.

Tabela 3. Valores de tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta das formulações testadas na análise fatorial (n = 3).

Formulação	Tamanho ± d.p (nm)	PDI ± d.p	Potencial Zeta ± d.p (mV)
P1 C1	481,8 ± 60,1	0,494 ± 0,055	-15,1 ± 2,5
P1 C2	252,4 ± 40,5	0,419 ± 0,105	-13,3 ± 0,8
P1 C3	340,0 ± 142,5	0,440 ± 0,073	-13,5 ± 0,8
P2 C1	209,0 ± 42,2	0,386 ± 0,030	-12,5 ± 3,0
P2 C2	295,7 ± 26,7	0,385 ± 0,026	-12,6 ± 1,1
P2 C3	205,3 ± 26,3	0,348 ± 0,067	-12,0 ± 1,1

P1 e P2 correspondem à 300 e 500 bar, respectivamente.

C1, C2 e C3 correspondem à 5, 10, e 15 ciclos, respectivamente.

A ANOVA (tabela 4) mostrou que, dentre os fatores estudados, somente o tamanho médio das gotículas foi afetado pela alteração da pressão e números de ciclos do processo de homogeneização ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$, $p < 0,05$), sendo que não foi observado a interação entre estes dois fatores. Para verificar em quais níveis ocorreu diferença estatística, a diferença mínima significativa (d.m.s) entre as médias foi calculada usando o teste de t de comparação das médias, conforme a seguinte equação:

$$d.m.s = t_{gl,\alpha} \sqrt{\frac{2 \cdot QMR}{n}}$$

Onde: $t_{gl,\alpha}$ é o valor de t tabelado em função do número de graus de liberdade do resíduo e nível de significância de 5%, QMR é o quadrado médio dos resíduos e n é o número de repetições.

O valor calculado de d.m.s. foi de 123,7 nm. Assim, foi possível mostrar que com a utilização da pressão de 300 bar, uma redução significativa no tamanho médio ocorreu quando o número de ciclos da homogeneização aumentou de 5 para 10 e para 15. Igualmente, com o aumento da pressão de 300 para 500 bar, uma redução no tamanho médio foi observada, mantendo-se constante o número de ciclos da homogeneização em 5 ou 15. O efeito das variáveis independentes sobre tamanho da partícula, PDI e potencial zeta também podem ser visualizados na Figura 5.

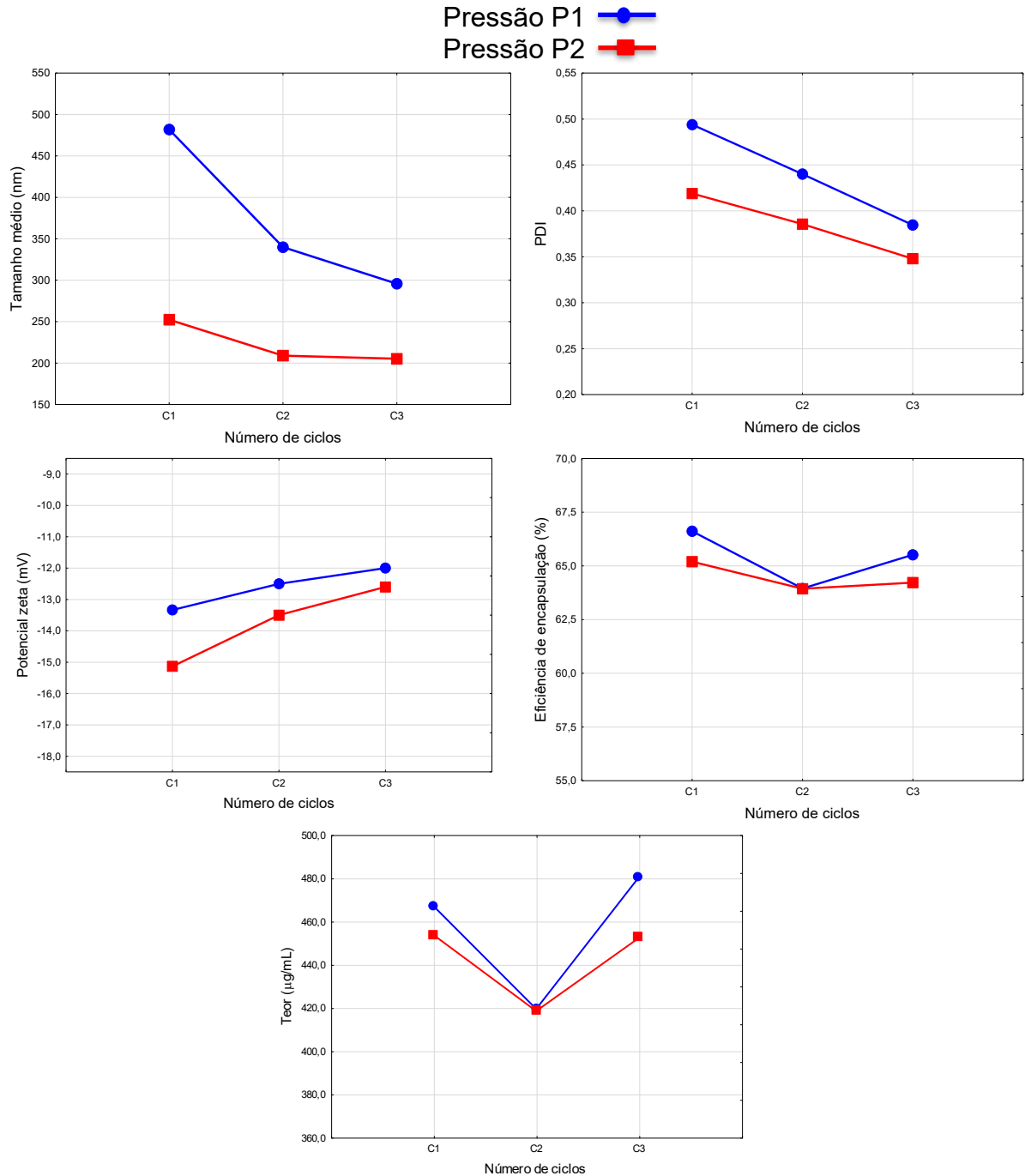
TABELA 4. Análise da variância realizada na avaliação do efeito dos parâmetros de homogeneização por alta pressão sobre as características das nanoemulsões de 7-nitroindazol.

	Soma dos quadrados	GL	Média dos quadrados	F calculado	Valor de p
<i>Tamanho (nm)</i>					
Pressão	101625	1	101625	21,2211*	0,000604*
Número de ciclos	45497	2	22749	4,7503**	0,030226**
Interação	15344	2	7672	1,6020	0,241732
Erro	57467	12	4789		
<i>PDI</i>					
Pressão	0,013778	1	0,013778	3,2620	0,096029
Número de ciclos	0,024398	2	0,012199	2,8882	0,094630
Interação	0,001104	2	0,000552	0,1307	0,878689
Erro	0,050685	12	0,004224		
<i>Potencial Zeta</i>					
Pressão	5,780	1	5,780	1,8141	0,202901
Número de ciclos	11,498	2	5,749	1,8044	0,206483
Interação	1,120	2	0,560	0,1758	0,840938
Erro	38,233	12	3,186		
<i>Eficiência de Encapsulação</i>					
Pressão	3,71	1	3,71	0,55	0,473194
Número de ciclos	11,59	2	5,80	0,86	0,448516
Interação	1,81	2	0,90	0,13	0,876056
Erro	81,08	12	6,76		
<i>Teor de 7-NI</i>					
Pressão	902	1	902	0,650	0,435740
Número de ciclos	8001	2	4000	2,885	0,094842
Interação	555	2	277	0,200	0,821336
Erro	16640	12	1387		

*Fcalculado > F crítico = 4,75 (gl_{1,12}), p < 0,05

**Fcalculado > F crítico = 3,89 (gl_{2,12}), p < 0,05

Figura 5. Efeito das variáveis independentes pressão (bar) e número de ciclos sobre as características das nanoemulsões de 7-NI.



A determinação da concentração de 7-NI nas formulações foi realizada empregando-se uma metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em modo de fase reversa previamente desenvolvida e validada por Barp (2016) e descrita em 4.2.3. Nas condições testadas o 7-NI apresentou um tempo de retenção de 3 min. As áreas médias dos picos referentes ao 7-NI foram comparadas à área da solução padrão de

concentração conhecida (10 µg/mL), analisada nas mesmas condições. Os valores de teor de 7-NI e de eficiência de encapsulação encontrados para as formulações testadas encontram-se mostrados na Tabela 5. Como pode ser observado, os valores de teor e de eficiência de encapsulação variaram de cerca de 410 a 520 µg/mL e de 64 a 68%, respectivamente. No entanto, a análise de variância (tabela 4) mostrou que os parâmetros de pressão e número de ciclos da homogeneização não afetaram significativamente os parâmetros de encapsulação do 7-NI nas nanoemulsões. Ainda estes valores mostraram ser semelhantes aqueles encontrados por França et al. (2024). O efeito das variáveis independentes sobre o teor de 7-NI e eficiência de encapsulação também podem ser visualizados na figura 5.

Tabela 5. Valores de teor de 7-NI e eficiência de encapsulação das formulações testadas na análise fatorial (n = 3).

Formulação	Teor de 7-NI (µg/mL)	Eficiência de encapsulação (%)
P1 C1	467,0 ± 32,2	66,6 ± 2,2
P1 C2	453,6 ± 17,0	65,2 ± 1,3
P1 C3	419,3 ± 14,1	63,9 ± 1,7
P2 C1	418,4 ± 67,4	63,9 ± 5,2
P2 C2	480,3 ± 40,0	65,5 ± 1,4
P2 C3	452,2 ± 25,3	64,2 ± 0,5

P1 e P2 correspondem à 300 e 500 bar, respectivamente.

C1, C2 e C3 correspondem à 5, 10, e 15 ciclos, respectivamente.

Em suma, os resultados obtidos neste estudo evidenciaram que os parâmetros da homogeneização por alta pressão afetam, sobretudo, o tamanho médio as gotículas. Resultados semelhantes foram descritos por Gawin-Mikolajewicz (2023) no desenvolvimento de nanoemulsões contendo fluconazol destinadas à administração ocular, usando ácido oleico como óleo e Tween 20, Tween 80 ou Kolliphor EL como surfactantes. Conforme descrito pelos autores, para um mesmo número de ciclos, o aumento da pressão aplicada provocou uma redução significativa no tamanho das gotículas. Embora este efeito tenha sido observado com o aumento do número de

ciclos para uma mesma pressão, a redução do tamanho só foi observada para valores baixos de pressão da homogeneização.

Em outro estudo, o efeito da concentração de variáveis independentes (concentração de surfactante, concentração de co-solvente e pressão de homogeneização) sobre o tamanho da gotícula e índice de polidispersão de nanoemulsões de óleo de dendê foi avaliado, usando um desenho composto central. No geral, os autores mostraram que a pressão e a interação entre as concentrações de surfactante e glicerol foram os fatores que afetaram significativamente as variáveis dependentes estudadas (CHONG et al., 2018).

Tabela 6. Valores médios obtidos para as características físico-químicas e de encapsulação do 7-NI nas nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea e homogeneização de alta pressão.

	Emulsificação espontânea*	Homogeneização por alta pressão**
Tamanho médio (nm)	208,0	205,3
PDI	0,255	0,348
Potencial zeta (mV)	-42,7	-12,0
Teor ($\mu\text{g/ml}$)	431,3	452,24
Eficiência de encapsulação (%)	68,1	64,2

*França et al. (2024).

**Pressão: 500 bar, número de ciclos: 3.

Finalmente, as características de tamanho médio e de encapsulação do 7-NI mostraram-se semelhantes quando as formulações otimizadas obtidas por emulsificação espontânea e homogeneização espontânea foram comparadas (Tabela 6). No entanto, a homogeneização por alta pressão tende à obtenção de sistemas mais polidispersos, como evidenciado pelos maiores valores de PDI. Ainda, as nanoemulsões obtidas por homogeneização de alta pressão exibiram menores valores de potencial zeta em módulo, o que pode ser explicado pela necessidade de aumento da concentração do surfactantes na formulação. Estudos têm mostrado que o Tween 80, um surfactante etoxilado não iônico, quando presente na interface das nanoemulsões leva ao mascaramento das cargas negativas provenientes da lecitina de soja, reduzindo o potencial zeta, mas proporciona a estabilização das formulações por efeito estérico (Zhao et al., 2023). No conjunto, a realização deste trabalho

mostrou que a obtenção de nanoemulsões de 7-NI por homogeneização de alta pressão é viável. No entanto, estudos podem ainda ser realizados para avaliar como os fatores estudados afetam, por exemplo, a estabilidade das formulações e o perfil de liberação do 7-NI a partir das nanoemulsões.

6. CONCLUSÕES

O objetivo deste trabalho foi desenvolver nanoemulsões contendo 7-nitroindazol pela técnica de homogeneização de alta pressão, com resultados satisfatórios como atingir o tamanho nanométrico, um índice baixo de polidispersão, mantendo o teor de 7-NI e uma aceitável eficiência de encapsulação. Os resultados mostraram que a obtenção de nanoemulsões de 7-NI pela homogeneização por alta pressão é viável. A análise estatística evidenciou que os parâmetros da homogeneização (pressão e número de ciclos) afetaram significativamente o tamanho das gotículas, mas não exercem efeito sobre o índice de polidispersão, potencial zeta, teor de 7-NI e eficiência de encapsulação. Por meio do levantamento bibliográfico sobre a preparação de nanoemulsões pela técnica de homogeneização por alta pressão, foi possível equiparar os resultados deste trabalho com os resultados descritos em diversas literaturas, mostrando que o processo de homogeneização foi eficiente dentro das limitações apresentadas.

REFERÊNCIAS

- 7-NITROINDAZOLE. **DrugBank**. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB02207>. Acesso em: 12 jun. 2020.
- AZMI, N. A. N. et al. **Nanoemulsions: Factory for food, pharmaceutical and cosmetics**. *Processes*, [S.l.], v. 7, n. 9, p. 1–34, Sept. 2019.
- BARP, C. G. **Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsão de 7-nitroindazol para inibição da produção do óxido nítrico**. 2016. 100 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.
- BARP, C. G. et al. **7-nitroindazol-loaded nanoemulsions: Preparation, characterization and its improved inhibitory effect on nitric oxide synthase-1**. *Nitric Oxide*, v. 76, p. 129–135, Jun. 2018.
- BUSH, M. A.; POLLACK, G. M. **Pharmacokinetics and protein binding of the selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole**. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, v. 21, n. 6, p. 221–228, Sept 2000.
- CHONG, W.-T. et al. **Optimization of process parameters in preparation of tocotrienol-rich red palm oil-based nanoemulsion stabilized by Tween80-Span 80 using response surface methodology**. *PLoS ONE*, v. 13, n. 8, Aug. 2018.
- FLOURY, J.; DESRUMAUX, A.; LARDIÈRES, J. **Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions**. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 1, n. 2, p. 127–134, Jun. 2000.
- França, A.P et al. **Pharmacokinetics, biodistribution, and in vivo toxicity of 7-nitroindazole loaded in pegylated and non-pegylated nanoemulsions in rats**. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 194, 106695, 2024.
- GAWIN-MIKOŁAJEWICZ, A. et al. **The effect of high-pressure homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of designed fluconazole-loaded ocular nanoemulsions**. *Pharmaceutics*, v. 16, n. 1, 2023. doi: 10.3390/pharmaceutics16010011.
- GOVERS, R.; OESS, S. **To NO or not to NO: “where?” is the question**. *Histology and Histopathology*, v. 19, n. 2, p. 585–605, abr. 2004
- GUPTA, A. et al. **Nanoemulsions: Formation, properties and applications**. *Soft Matter*, [S.l.], v. 12, n. 11, p. 2826–2841, Mar. 2016.
- ILAS. **Instituto Latino-Americano para Estudos da Sepse. Sepse: um problema de saúde pública**. Brasília: Conselho Federal de Medicina, 2015.

JUTTULAPA, M. et al. **Effect of high-pressure homogenization on stability of emulsions containing zein and pectin.** Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 12, n. 1, p. 21–27, Jan. 2017.

KLATT, P. et al. **The pteridine binding site of brain nitric oxide synthase. Tetrahydrobiopterin binding kinetics, specificity, and allosteric interaction with the substrate domain.** The Journal of Biological Chemistry, v. 269, n. 19, p. 13861–13866, May 1994.

KORHONEN, R. et al. **Nitric oxide production and signaling in inflammation. Current Drug Targets.** Inflammation and Allergy, v. 4, n. 4, p. 471–479, Aug. 2005.

KUMAR, M. et al. **Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: A review.** Preventive nutrition and food science, v. 24, n. 3, p. 225–234, 2019.

LI, Z. et al. **Advances of spontaneous emulsification and its important applications in enhanced oil recovery process.** Advances in Colloid and Interface Science, v. 277, p. 102119, Mar. 2020.

LOVELYN, C; ATTAMA, A. A. **Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery.** Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, [S.I.], v. 2, n. 5, p. 626-639, Dec. 2011.

NARDI, G. M. et al. **Neuronal Nitric Oxide Synthase and Its Interaction With Soluble Guanylate Cyclase Is a Key Factor for the Vascular Dysfunction of Experimental Sepsis*:** Critical Care Medicine, v. 42, n. 6, p. e391–e400, Jun. 2014.

PENGON, S. et al. **The effect of surfactant on the physical properties of coconut oil nanoemulsions.** Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, [S.I.], v. 13, n. 5, p. 409–414, Sept. 2018.

RAI et al. **Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications.** Journal of Controlled Release, [S.I.], v. 270, p. 203-218, Jan. 2018

SANCHEZ-LOPEZ, E. et al. **Current Applications of Nanoemulsions in Cancer Therapeutics.** Nanomaterials (Basel), v. 9, n.6, 821, May 2019. doi: 10.3390/nano9060821.

SHARMA, S. et al. **Effect of high-pressure homogenization on formulation of TPGS loaded nanoemulsion of rutin – pharmacodynamic and antioxidant studies.** Drug Delivery, v. 22, n. 4, p. 541–551, Mar. 2014.

SHAKER, D. S. et al. **Nanoemulsion: A review on mechanisms for the transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs.** Scientia Pharmaceutica, [S.I.], v. 87, n. 3, p. 1– 34, July. 2019.

SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, v. 315, n. 8, p. 801, 23 Feb. 2016.

SINGH, Y. et al. **Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery**. *Journal of Controlled Release*, [S.I.], v. 252, p. 28–49, Apr. 2017

WILSON, R. J. et al. **Nanoemulsions for drug delivery**. *Particuology*, v. 64, p. 85–97, 2022.

YADAV, K. S.; KALE, K. **High Pressure Homogenizer in Pharmaceuticals: Understanding Its Critical Processing Parameters and Applications**. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, [S.I.], v. 15, n. 4, p. 690–701, Dec. 2020.

YUKUYAMA, M. N. et al. **Olive oil nanoemulsion preparation using high-pressure homogenization and d-phase emulsification – A design space approach**. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, [S.I.], v. 49, p. 622–631, Feb. 2019.

ZHAO , S. et al. **Characterization of Nanoemulsions Stabilized with Different Emulsifiers and Their Encapsulation Efficiency for Oregano Essential Oil: Tween 80, Soybean Protein Isolate, Tea Saponin, and Soy Lecithin**. *Foods*, [S.I.], v. 12, n. 15, 3183, Aug. 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12173183>