



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

João Pedro Dornelles Gambin

**Desenvolvimento de uma nanoemulsão contendo Fluconazol e timol preparada  
via técnica de emulsificação espontânea visando aplicação tópica contra  
cepas de *Candida spp.***

Florianópolis

2023

João Pedro Dornelles Gambin

**Desenvolvimento de uma nanoemulsão contendo Fluconazol e timol preparada via técnica de emulsificação espontânea visando aplicação tópica contra cepas de *Candida spp.***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Físico-química.

Orientador: Prof. Alexandre Luis Parize, Dr.  
Coorientador: Prof. Thiago Caon, Dr.

Florianópolis

2023

Dornelles Gambin, João Pedro

Desenvolvimento de uma nanoemulsão contendo Fluconazol e timol preparada via técnica de emulsificação espontânea visando aplicação tópica contra cepas de *Candida* spp. / João Pedro Dornelles Gambin ; orientador, Alexandre Luis Parize, coorientador, Thiago Caon, 2023.

126 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Química. 2. nanoemulsões. 3. Fluconazol. 4. timol. 5. planejamento fatorial. I. Parize, Alexandre Luis. II. Caon, Thiago. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

João Pedro Dornelles Gambin

**Desenvolvimento de uma nanoemulsão contendo Fluconazol e timol preparada via técnica de emulsificação espontânea visando aplicação tópica contra cepas de *Candida spp.***

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 05 de dezembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Giovana Carolina Bazzo, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof. Diego Galvan, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Profa. Tatiane de Andrade Maranhão, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Química atribuído pelo Programa de Pós-Graduação.

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Prof. Alexandre Luis Parize, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2023.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Luis Parize e meu co-orientador Prof. Dr. Thiago Caon e meus colegas de laboratório do grupo Polimat e GScorr pelo apoio, paciência e ajuda durante a pesquisa e execução do projeto.

Aos laboratórios parceiros LABECC (CFM), Laboratório de Controle de Qualidade (CCS) e LCME da UFSC, que disponibilizaram materiais e equipamentos fundamentais para a realização do projeto.

Ao departamento de Química da universidade, o Programa de Pós-graduação do curso e a Central de Análises pela estrutura e diversos equipamentos que foram necessários para a realização do projeto.

Agradecimentos a aluna do Prof. Dr. Thiago Caon, Júlia Conte por disponibilizar (e testar) as cepas utilizadas nos testes de inibição. Ao Prof. Gustavo A. Micke e suas alunas Riani Salvio e Camila Magrin pela disponibilidade e auxílio durante o desenvolvimento e validação do método de análise (HPLC). A Prof. Giovana Bazzo do Laboratório de Controle de Qualidade por realizar os testes de inibição por microdiluição e também disponibilizar o *shaker* utilizado nos testes de solubilidade.

Agradecimento especial à minha família pelo apoio desde sempre.

E finalmente, agradecer à CAPES pelo auxílio financeiro disponibilizado durante o período de realização do projeto.

## RESUMO

As candidíases superficiais são os tipos mais comuns de infecção fúngica (IF) e costumam afetar os cabelos, as unhas e as mucosas. Quando não tratadas podem colonizar tecidos mais internos e chegar na corrente sanguínea (candidemia). A candidemia nosocomial está atrelada a taxas de mortalidade de cerca de 70% em território nacional. A crescente incidência de IFs nas últimas décadas, como as candidíases, e o aumento de casos de resistência aos principais agentes antifúngicos têm motivado uma série de estudos que buscam desenvolver estratégias de tratamento alternativas mais eficazes. Neste trabalho foi desenvolvida uma nanoemulsão (NE) de um óleo vegetal não-volátil estabilizada com lecitina Lipoid® S75 e Pluronic® P123 preparada via técnica de emulsificação espontânea com auxílio de ferramentas de DoE para encapsular Fluconazol (FCZ) e timol visando aplicação tópica para o tratamento de candidíases superficiais. A NE produzida (NEFT) foi caracterizada em termos do diâmetro médio das partículas ( $169,2 \pm 1,7$  nm), PDI ( $0,150 \pm 0,017$ ) e potencial zeta ( $-46,3 \pm 2,6$  mV) por espalhamento de luz. Adicionalmente, foram realizados ensaios de liberação em dois meios que simulassem as condições de pH da pele saudável (pH 5,4) e da pele infectada (pH 7,4) para avaliar o perfil de liberação dos ativos nessas condições. Além disso, foram determinados os valores de concentração inibitória mínima (MIC) do FCZ e do timol contra três cepas de *Candida spp.* (*C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata*) por microdiluição. O FCZ não apresentou atividade contra nenhuma das cepas testadas nas concentrações avaliadas. Também não houve uma interação do fármaco com a fase carreadora da NE conforme esperado, resultando em valores de solubilidade muito baixos comparados com a literatura e uma EE% de apenas 10% na NEFT. Os valores de MIC obtidos para o timol livre foram de 500 ppm para as cepas de *C. albicans* e *C. krusei*, e 1000 ppm para *C. glabrata*. Os valores de MIC obtidos neste estudo estão muito acima de valores encontrados na literatura para as mesmas espécies de *Candida* avaliadas pela mesma técnica, porém com alguns dos parâmetros, como a temperatura e o tempo de incubação, ligeiramente diferentes. Não houve alteração da atividade antifúngica observada para o timol após a sua incorporação na NEFT. A NEFT apresentou características promissoras para um sistema de aplicação tópica, apesar da incorporação do ativo principal (FCZ) não ter ocorrido conforme desejado. Estes resultados servem de base para estudos posteriores envolvendo o desenvolvimento de uma NE com a finalidade proposta.

**Palavras-chave:** Nanoemulsão; Emulsificação espontânea; Planejamento fatorial; Fluconazol; Timol; Candidíases.

## ABSTRACT

Superficial candidiasis are the most common types of fungal infections (FI) and often affect hair, nails and mucous membranes. If untreated, these infections can reach internal tissues and reach the bloodstream (candidemia). Nosocomial candidemia is linked to mortality rates of about 70% in Brazil. The growing incidence of FI like candidiasis in recent decades and the increasing rate of reports of resistant strains have motivated a series of studies that seek to develop more effective treatment strategies. In this study, a nanoemulsion (NE) of a non-volatile oil stabilized with lecithin (Lipoid® S75) and a Pluronic® copolymer (P123) was prepared via spontaneous emulsification technique with the aid of DoE tools for the encapsulation of Fluconazole (FCZ) and thymol intended for topical applications such as the treatment of superficial candidiasis. The NE developed (NEFT) was characterized in terms of size ( $169,2 \pm 1,7$  nm), PDI ( $0,150 \pm 0,017$ ) and zeta potential ( $-46,3 \pm 2,6$  mV) by DLS. Additionally, the release profile of FCZ and thymol from NEFT was evaluated in two different pH values that simulate the pH values found in healthy (pH 5,4) and infected (pH 7,4) skin. Furthermore, the minimum inhibitory concentration (MIC) for FCZ and thymol were assessed by broth microdilution technique against three strains of *Candida spp.* (*C. albicans*, *C. krusei* and *C. glabrata*). FCZ did not show antifungal activity at the evaluated concentrations. FCZ also showed a very weak interaction with the selected oil phase, resulting in very low solubility values compared to the literature and an EE% of only 10% in NEFT. The MIC values for free thymol were 500 ppm for *C. albicans* and *C. krusei*, and 1000 ppm for *C. glabrata*. These MIC values are far greater than the values found in literature for the same *Candida* species obtained via broth microdilution technique but in slightly different conditions (i.e. incubation time and temperature). There was also no change in the antifungal activity of thymol once it was encapsulated in the NE. The NE developed show promising characteristics for topical applications even though the encapsulation of the main drug (FCZ) did not occurred as expected. These results may serve as basis for future research and development of such NEs with the intended application.

**Keywords:** Nanoemulsion; Spontaneous emulsification; Factorial design; Fluconazole; Thymol; Candidiasis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes tipos de nanoemulsões que podem ser produzidas. ....	25
Figura 2. Esquema dos diferentes fenômenos de desestabilização em uma NEs que levam a segregação das fases para uma emulsão do tipo O/A.....	26
Figura 3. Estrutura do Fluconazol.....	34
Figura 4. Estrutura do ergosterol. ....	36
Figura 5. Estrutura do timol (A) e do carvacrol (B).....	37
Figura 6. Estrutura dos principais ácidos graxos que compõe os triglicerídeos dos óleos estudados, o ácido ricinoleico (A) e o ácido linoleico. ....	41
Figura 7. Estrutura dos principais fosfolípídeos encontrados na lecitina de soja, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilinositol (PI).....	42
Figura 8. Estrutura do P123.....	44
Figura 9. Domínio experimental para um planejamento fatorial $2^k$ , onde $k = 3$ . .....	47
Figura 10. Esquema do domínio experimental em um <i>design</i> Doehlert. ....	50
Figura 11. Esquema de gotejamento e o processo de preparo das nanoemulsões. ....	57
Figura 12. Espectros no UV-Vis do Fluconazol (A) e do timol (B). ....	68
Figura 13. Cromatogramas de um branco dos meios de liberação, pH 5,4 (A) e 7,4 (B).....	69
Figura 14. Cromatogramas do FCZ e do timol nos meios de liberação. A e B – FCZ isolado em pH 5,4 e pH 7,4, respectivamente. C e D – timol isolado em pH 5,4 e pH 7,4, respectivamente. E e F – FCZ e timol em pH 5,4 e 7,4 respectivamente. .	70
Figura 15. Cromatogramas sobrepostos dos brancos dos meios de liberação e de injeções de água. ....	71
Figura 16. Curva de calibração para o FCZ. (n=3) .....	72
Figura 17. Curva de calibração para o timol. ....	72
Figura 18. Imagem dos óleos saturados com FCZ que foram utilizados para os testes de solubilidade. ....	75
Figura 19. Gráfico de Pareto gerado com os dados da Tabela 14 em função da variável dependente $D$ com os valores dos efeitos normalizados ( $p = ,05$ ). ....	79
Figura 20. Superfície de resposta gerada com os dados da Tabela 11. A SR foi gerada em termos da resposta combinada $D$ . ....	83

Figura 21. Estabilidade das NEs finais (NEOR, NEF, NEFT e NET) em função dos tamanhos médios de partículas.....	87
Figura 22. Estabilidade das NEs finais (NEOR, NEF, NEFT e NET) em função do PDI. ....	88
Figura 23. Estabilidade das NEs finais (NEOR, NEF, NEFT e NET) em função do potencial zeta. ....	88
Figura 24. Estabilidade das NEs otimizadas (NEOR <sub>SR</sub> , NEF <sub>SR</sub> e NEFT <sub>SR</sub> ) tamanhos médios de partículas.....	90
Figura 25. Estabilidade das NEs otimizadas (NEOR <sub>SR</sub> , NEF <sub>SR</sub> e NEFT <sub>SR</sub> ) em função do PDI.....	90
Figura 26. Estabilidade das NEs otimizadas (NEOR <sub>SR</sub> , NEF <sub>SR</sub> e NEFT <sub>SR</sub> ) em função do potencial zeta.....	91
Figura 27. Micrografias da NEOR (A e B) e NEFT (C e D). ....	92
Figura 28. Micrografias da NEOR <sub>SR</sub> (A e B) e NEFT <sub>SR</sub> (C e D). ....	93
Figura 29. Termogramas dos reagentes utilizados para a produção das NEs. ....	94
Figura 30. Termogramas do OR puro e das misturas de OR/FCZ e OR/Timol. ....	95
Figura 31. Perfil de liberação (% de ativo liberado vs. tempo) para o FCZ livre, na NEF e na NEFT, e para o timol na NEFT durante um período de 48h em pH 7,4 (±0,1). (n=3).....	97
Figura 32. Perfil de liberação (% de ativo liberado vs. tempo) para o FCZ livre, na NEF e na NEFT, e para o timol na NEFT durante um período de 48h em pH 5,4 (±0,1). (n=3).....	97
Figura 33. Perfil de liberação (% de timol liberado vs. tempo) para uma solução 1000 ppm de timol livre e a NEFT durante um período de 48h em pH 7,4 (±0,1). ....	98
Figura 34. Perfil de liberação (% de timol liberado vs. tempo) para uma solução 1000 ppm de timol livre e a NEFT durante um período de 48h em pH 5,4 (±0,1) ....	98
Figura 35. Micropoços do teste realizado com a <i>C. albicans</i> . A maior concentração testada (1000 ppm) está à esquerda. ....	102
Figura 36. Gráfico da resposta <i>size</i> (tamanho médio de partículas) em função da desejabilidade ( <i>disize</i> ) utilizado no planejamento de triagem. ....	113
Figura 37. Gráfico da resposta PDI em função da desejabilidade ( <i>diPDI</i> ) utilizado no planejamento de triagem. ....	114

Figura 38. Gráfico da resposta <i>zeta</i> (potencial <i>zeta</i> ) em função da desejabilidade ( <i>dizeta</i> ) utilizado no planejamento de triagem.....	114
Figura 39. Gráfico da resposta <i>size</i> (tamanho médio de partículas) em função da desejabilidade ( <i>disize</i> ) utilizado na MSR.....	115
Figura 40. Gráfico da resposta PDI em função da desejabilidade ( <i>diPDI</i> ) utilizado na MSR. ....	116
Figura 41. Gráfico da resposta <i>zeta</i> (potencial <i>zeta</i> ) em função da desejabilidade ( <i>dizeta</i> ) utilizado na MSR.....	116
Figura 42. Gráfico de Pareto para a variável dependente correspondente ao tamanho médio de partículas (variável <i>size</i> ) com os coeficientes dos efeitos principais e de interação normalizados para $p = ,05$ .....	118
Figura 43. Gráfico de Pareto para a variável dependente correspondente ao PDI com os coeficientes dos efeitos principais e de interação normalizados para $p = ,05$ .....	119
Figura 44. Gráfico de Pareto para a variável dependente correspondente ao potencial <i>zeta</i> ( $\zeta$ ) com os coeficientes dos efeitos principais e de interação normalizados para $p = ,05$ .....	120
Figura 45. <i>Plot</i> cúbico do domínio experimental. Os valores atrelados a cada vértice representam o efeito médio predito pelo modelo para cada experimento. Entre parêntesis estão os intervalos de confiança para cada efeito. Os efeitos foram calculados em termos da variável <i>D</i> .....	121
Figura 46. Placa com os halos de inibição para a <i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019). ....	123
Figura 47. Placa com os halos de inibição para a <i>C. albicans</i> (ATCC 10231). ....	124
Figura 48. Placa com os halos de inibição para a <i>C. glabrata</i> (CG MT 29). ....	125
Figura 49. Placa com os halos de inibição para a <i>C. krusei</i> (ATCC 6258). ....	126
Figura 50. Perfil da função desejabilidade ( <i>di</i> ). As linhas curvas correspondem ao perfil que a curva de resposta ( <i>yi</i> ) vs. desejabilidade ( <i>di</i> ) deve assumir quando o valor do fator <i>r</i> é modificado. A curva apresentada na figura representa uma desejabilidade onde é maximizada a mínima resposta. (JIMIDAR; BOURGUIGNON; MASSART, 1996).....	127

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do Fluconazol. ....	35
Tabela 2. Propriedades físico-químicas do timol. ....	38
Tabela 3. Estrutura de cada bloco para os polímeros do tipo Pluronic®. ....	43
Tabela 4. Matriz de planejamento utilizada para um planejamento fatorial completo 2 <sup>3</sup> . A matriz formada pelos sinais (+) e (-), mostra as diferentes combinações que devem ser feitas entre os níveis de cada fator ( $x_1$ , $x_2$ e $x_3$ ) para obtenção de uma resposta $y_i$ . ....	45
Tabela 5. Matriz de planejamento para um processo de otimização de 2 variáveis (A e B) com <i>design</i> Doehlert. A tabela mostra apenas os códigos dos níveis. A variável A é testada em 5 níveis, enquanto a variável B é testada em 3 níveis. ....	49
Tabela 6. Variáveis independentes selecionadas para a primeira etapa do planejamento (fatorial completo), os códigos dos níveis e seus respectivos valores. ....	59
Tabela 7. Variáveis independentes selecionadas para a MSR, os códigos dos níveis e seus respectivos valores. ....	60
Tabela 8. Parâmetros calculados para avaliar a precisão do método proposto para quantificação do FCZ. ....	73
Tabela 9. Parâmetros calculados para avaliar a precisão do método proposto para quantificação do timol. ....	73
Tabela 10. Parâmetros calculados para avaliar a exatidão do método proposto para quantificação do FCZ. ....	74
Tabela 11. Parâmetros calculados para avaliar a exatidão do método proposto para quantificação do timol. ....	74
Tabela 12. LOD e LOQ do FCZ e do timol para o método proposto. ....	75
Tabela 13. Resultados para a solubilidade do FCZ nos óleos obtidos com a metodologia validada de HPLC com detecção no UV em 210 nm. ....	76
Tabela 14. Matriz de planejamento do planejamento fatorial completo (2 <sup>3</sup> ). As respostas individuais obtidas ( $y_i$ ) e a desejabilidade final calculada ( $D$ ) também são apresentadas (variáveis dependentes). ....	77
Tabela 15. Matriz de planejamento completa com <i>design</i> Doehlert com os valores que foram utilizados para a geração da SR. ....	82

Tabela 16. Valores críticos calculados para cada variável a partir da equação da SR. ....	84
Tabela 17. Dados de tamanho médio de partículas, PDI e potencial zeta obtidos para as NEs finais (NEOR, NEF, NEFT e NET). As medidas são apresentadas como a média de 5 medidas para os valores de tamanho e PDI e 3 medidas para o potencial zeta ( $\zeta$ ). ....	85
Tabela 18. Dados de tamanho médio de partículas, PDI e potencial zeta obtidos para as NEs otimizadas (NEOR <sub>SR</sub> , NEF <sub>SR</sub> e NEFT <sub>SR</sub> ). As medidas são apresentadas como a média de 3 medidas. ....	86
Tabela 19. Eficiência de encapsulação de FCZ e timol nas formulações finais NEFT (n=2) e NEFT <sub>SR</sub> (n=2). ....	96
Tabela 20. Parâmetros dos modelos de liberação testados para a liberação do Fluconazol em pH 7,4. ....	99
Tabela 21. Parâmetros dos modelos de liberação testados para a liberação do Fluconazol em pH 5,4. ....	99
Tabela 22. Parâmetros dos modelos de liberação testados para a liberação do timol em pH 7,4. ....	99
Tabela 23. Parâmetros dos modelos de liberação testados para a liberação do timol em pH 5,4. ....	99
Tabela 24. Valores das MICs para as soluções dos ativos livres e encapsulados nas NEs (NEF, NET e NEFT). As concentrações são reportadas em unidades de partes por milhão (ppm).(n=2) ....	101
Tabela 25. Valores em % (m/m) e concentração em partes por milhão (ppm) dos níveis superiores (+) dos reagentes utilizados para a produção das NEs durante o planejamento fatorial completo. ....	112
Tabela 26. Valores em % (m/m) e concentração em partes por milhão (ppm) dos níveis inferiores (-) dos reagentes utilizados para a produção das NEs durante o planejamento fatorial completo. ....	112
Tabela 27. Valores utilizados para a produção da NEFT <sub>SR</sub> . Destaque ao excesso de FCZ na formulação que foi rejeitada como formulação final. ....	112
Tabela 28. Valores utilizados para a produção da NEFT definida como formulação final. ....	112
Tabela 29. Resultados do teste de atividade antifúngica por halo de inibição para <i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019). ....	123

Tabela 30. Resultados do teste de atividade antifúngica por halo de inibição para <i>C. albicans</i> (ATCC 10231). .....	124
Tabela 31. Resultados do teste de atividade antifúngica por halo de inibição para <i>C. glabrata</i> (CG MT 29).....	125
Tabela 32. Resultados do teste de atividade antifúngica por halo de inibição para <i>C. krusei</i> (ATCC 6258).....	126

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COF	Candidíase orofaríngea
CVV	Candidíase vulvovaginal
<i>D</i>	Desejabilidade
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico (do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i> )
DoE	<i>Design</i> de experimentos (do inglês <i>Design of Experiments</i> )
FA	Fase Aquosa
FCZ	Fluconazol
FO	Fase Oleosa ou Fase Orgânica
GI	Gastro-intestinal
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
IF	Infecções Fúngicas
Log <sub>k<sub>o/a</sub></sub>	Logaritmo do coeficiente de partição octanol-água
MIC	Concentração inibitória mínima (do inglês <i>Minimum inhibitory concentration</i> )
MO	Micro-organismo
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
NACS	Espécies de <i>Candida não-albicans</i> (do inglês <i>Non-albicans Candida Species</i> )
NE	Nanoemulsão
NEF	Nanoemulsão com Fluconazol
NEFT	Nanoemulsão com Fluconazol e Timol
NET	Nanoemulsão com Timol
NEOR	Nanoemulsão com óleo de rícino sem ativo
NEOX	Nanoemulsão com óleo não-definido
NLC	Carreadores lipídicos nanoestruturados (do inglês <i>Nanostructured Lipid Carriers</i> )
NP	Nanopartícula
O/A	Emulsão do tipo óleo-em-água
OG	Óleo de Girassol
OR	Óleo de Rícino
OSU	Óleo de Semente-de-uva

PDA	Detector de arranjo de diodos (do inglês <i>photodiode array</i> )
PEO	Poli(óxido de etileno) (do inglês <i>polyethylene oxide</i> )
PPO	Poli(óxido de propileno) (do inglês <i>polypropilene oxide</i> )
PTFE	Poli(tetrafluoretileno) (do inglês <i>polytetrafluoroethylene</i> )
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Rt	Tempo de retenção
SLN	Nanopartículas sólidas lipídicas (do inglês <i>Solid Lipid Nanoparticles</i> )
SR	Superfície de Resposta
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão (do inglês <i>Transmission Electron Microscopy</i> )
A/O	Emulsão do tipo água-em-óleo
A/O/A	Emulsão múltipla do tipo água-em-óleo-em-água

## LISTA DE SÍMBOLOS

$d_i$  – Desejabilidade individual

$D$  – Desejabilidade

$\varepsilon$  – Constante dielétrica do meio

$f(Ka)$  – Função de Henry

$\eta$  – Viscosidade do meio

$U_E$  – Mobilidade eletroforética

$\zeta$  – Potencial zeta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>22</b>
2.1	MOTIVAÇÃO DO ESTUDO .....	22
2.1.1	O problema das infecções fúngicas .....	22
2.1.2	<i>Candida spp.</i> como principais patógenos .....	22
2.1.3	Abordagens para desenvolvimento de novos agentes antifúngicos ...	23
2.2	NANOEMULSÕES COMO SISTEMA CARREADOR .....	24
2.2.1	Técnicas de preparo de nanoemulsões .....	28
2.2.1.1	<i>Técnicas de alta energia</i> .....	28
2.2.1.2	<i>Técnicas de baixa energia</i> .....	30
2.2.2	Nanoemulsões como sistema tópico de <i>drug delivery</i> .....	32
2.3	INSUMOS .....	34
2.3.1	Fluconazol .....	34
2.3.2	Timol .....	37
2.3.3	Óleo como fase carreadora .....	39
2.3.4	Lecitina .....	41
2.3.5	Pluronic® P123.....	43
2.4	DESIGN DE EXPERIMENTOS .....	44
2.4.1	Planejamento fatorial completo $2^3 + 3$ .....	44
2.4.2	Metodologia de superfície de resposta com <i>design</i> Doehlert.....	48
2.4.3	Função desejabilidade.....	51
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	53
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	53
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>55</b>
4.1	MATERIAIS.....	55
4.2	MÉTODOS .....	55
4.2.1	Teste de solubilidade.....	55
4.2.2	Preparo das nanoemulsões .....	56
4.2.3	Planejamento experimental.....	58
4.2.3.1	Planejamento fatorial $2^3 + 3$ .....	58
4.2.3.1.1	Desejabilidade para o Planejamento Fatorial.....	59

4.2.3.2	<i>Geração da superfície de resposta com design Doehlert</i> .....	59
4.2.3.2.1	Desejabilidade para a Metodologia de Superfície de Resposta .....	60
<b>4.2.4</b>	<b>Espalhamento de luz</b> .....	<b>60</b>
4.2.4.1	<i>Tamanho médio de partículas (z-average) e PDI</i> .....	60
4.2.4.2	<i>Potencial zeta</i> .....	61
<b>4.2.5</b>	<b>Calorimetria diferencial exploratória</b> .....	<b>61</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Estabilidade</b> .....	<b>62</b>
<b>4.2.7</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Transmissão</b> .....	<b>62</b>
<b>4.2.8</b>	<b>Validação da metodologia de HPLC</b> .....	<b>62</b>
4.2.8.1	<i>Parâmetros cromatográficos</i> .....	62
4.2.8.2	<i>Seletividade</i> .....	63
4.2.8.3	<i>Linearidade</i> .....	63
4.2.8.4	<i>Precisão e Exatidão</i> .....	63
4.2.8.5	<i>LOD/LOQ</i> .....	64
<b>4.2.9</b>	<b>Eficiência de encapsulação</b> .....	<b>65</b>
<b>4.2.10</b>	<b>Ensaio de liberação</b> .....	<b>65</b>
<b>4.2.11</b>	<b>Testes de inibição em cepas de <i>C. albicans</i></b> .....	<b>67</b>
4.2.11.1	<i>Reativação das cepas e preparo do inóculo</i> .....	67
4.2.11.2	<i>Ensaio de microdiluição</i> .....	67
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>68</b>
5.1	PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE HPLC.....	68
5.1.1	<b>Seletividade</b> .....	<b>68</b>
5.1.2	<b>Linearidade</b> .....	<b>71</b>
5.1.3	<b>Precisão/Exatidão</b> .....	<b>73</b>
5.1.4	<b>LOD/LOQ</b> .....	<b>74</b>
5.2	PREPARO DAS NANOEMULSÕES .....	75
5.2.1	<b>Fase carreadora</b> .....	<b>75</b>
5.2.2	<b>Planejamento Fatorial Completo 2<sup>3</sup> + 3</b> .....	<b>76</b>
5.2.3	<b>Metodologia de superfície de resposta com <i>design Doehlert</i></b> .....	<b>81</b>
5.3	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES.....	85
5.3.1	<b>Espalhamento de luz dinâmico e estabilidade</b> .....	<b>85</b>
5.3.2	<b>Microscopia eletrônica de transmissão</b> .....	<b>91</b>
5.3.3	<b>Calorimetria diferencial exploratória</b> .....	<b>93</b>
5.3.4	<b>Eficiência de encapsulação</b> .....	<b>95</b>

5.4	ENSAIO DE LIBERAÇÃO EM PH SIMULADO .....	96
5.5	TESTE DE INIBIÇÃO CONTRA CEPAS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> .....	101
6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>103</b>
7	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>105</b>
	<b>APÊNDICE A – PROPORÇÕES DE CADA COMPONENTE PARA OS NÍVEIS SUPERIORES (+) E INFERIORES (-) DO PLANEJAMENTO FATORIAL E A FORMULAÇÃO FINAL.....</b>	<b>112</b>
	<b>APÊNDICE B – PERFIL DAS FUNÇÕES DE DESEJABILIDADE INDIVIDUAIS .....</b>	<b>113</b>
	<b>APÊNDICE C – GRÁFICOS DE PARETO PARA AS VARIÁVEIS DEPENDENTES INDIVIDUAIS.....</b>	<b>118</b>
	<b>APÊNDICE D – DOMÍNIO EXPERIMENTAL DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO.....</b>	<b>121</b>
	<b>APÊNDICE E – TESTES DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA POR HALO DE INIBIÇÃO.....</b>	<b>123</b>
	<b>ANEXO A – DESCRIÇÃO .....</b>	<b>127</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente incidência de infecções fúngicas hospitalares com altas taxas de mortalidade têm motivado uma série de estudos que envolvem o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos e estratégias de tratamento alternativas aos tratamentos convencionais. As candidíases superficiais são os tipos mais comuns de infecção e os principais locais afetados são as unhas e cabelos (onicomicoses) e as mucosas (vaginal, orofaríngea, trato GI). Além disso, microrganismos como os fungos do gênero *Candida* podem formar biofilmes em praticamente qualquer superfície (biótica e abiótica), fator esse que reduz significativamente a eficácia dos principais agentes antifúngicos em uso.

O Fluconazol (FCZ) é um dos principais fármacos utilizados para o tratamento de candidíases superficiais. A sua administração é geralmente realizada por via oral e seu efeito é sistêmico. Apesar da via oral ser preferível, a administração tópica nesse contexto traz uma série de vantagens, uma vez que se evita o metabolismo de primeira passagem e, conseqüentemente, alguns efeitos adversos. Além disso, podem ser utilizadas doses menores, a aplicação é feita diretamente no local da infecção e tanto a aplicação como a descontinuação do tratamento pode ser realizada pelo próprio paciente.

Uma vez que o processo de desenvolvimento de novos agentes antifúngicos (AAF) é demasiadamente caro e demorado, estratégias alternativas para o tratamento das candidíases tornam-se pertinentes. Algumas alternativas que têm se mostrado promissoras nessa frente envolvem resgatar a eficácia de agentes antifúngicos já aprovados, como o FCZ, via sua incorporação em sistemas de *drug delivery* ou DDS (do inglês *Drug Delivery Systems*) e realizar o tratamento combinatório com outras moléculas com atividade antifúngica conhecida. Dentre essas moléculas, os terpenos fenólicos como o timol se destacam, pois não só agem como potentes AAFs, mas também podem facilitar a permeação cutânea de outros ativos. Além disso, estudos apontam um efeito sinérgico do timol e do FCZ contra cepas de *Candida spp.*

Os DDS podem ser desenvolvidos para uma série de finalidades como aumentar a solubilidade e biodisponibilidade de ativos, proporcionar proteção contra degradação, atenuar propriedades organolépticas indesejadas, entre outras. Para isso, uma série de sistemas podem ser produzidos na forma de dispersões em matrizes poliméricas (por exemplo, fibras, géis, filmes, entre outros) ou formulações

lipídicas (por exemplo, nanoemulsões, microemulsões, *SLNs*, *NLCs*, entre outros). O presente estudo traz destaque às NEs, pois o tamanho nanométrico das gotículas aumenta drasticamente a razão área superficial/volume de fase dispersa. Isso proporciona um aumento expressivo na biodisponibilidade do ativo e uma melhora na permeação através de tecidos como a pele. Adicionalmente, as NEs podem ser utilizadas como sistema inicial a serem incorporados em matrizes poliméricas para produzir formulações finais como pomadas, géis, membranas adesivas, entre outras. Além disso, ainda podem ser recobertas com material polimérico, que permite sua funcionalização e direcionamento da aplicação para tecidos específicos (por exemplo, mucoadesão) ou possibilita a secagem do material por *spray drying* para gerar um material seco (pó) contendo o ativo.

Em virtude do que foi introduzido, o objetivo deste trabalho foi de produzir uma NE de um óleo vegetal não-volátil estabilizado com lecitina Lipoid® S75 e um copolímero do tipo Pluronic®, o P123, via técnica de emulsificação espontânea visando encapsular o Fluconazol em combinação com o timol e testar a eficácia da formulação em cepas resistentes de *Candida spp.* pelo método de microdiluição.

Para isso, a formulação desenvolvida baseou-se em um estudo realizado pelo grupo (Polimat) e trabalhos semelhantes encontrados na literatura. A partir desse sistema e os dados da literatura, as quantidades dos reagentes foram otimizadas através de um planejamento fatorial completo, seguida de uma etapa de otimização via a geração de uma superfície de resposta (SR). A estabilidade e, conseqüentemente, a viabilidade do sistema formado, foi aferida em termos de três parâmetros: i) o tamanho médio de partículas, ii) índice de polidispersidade e iii) o potencial zeta. As medidas foram realizadas com a técnica de espalhamento de luz dinâmico ou DLS (do inglês *Dynamic Light Scattering*). Os valores obtidos para esses três parâmetros foram combinados em uma única resposta através do conceito de função desejabilidade de Derringer, que foi utilizada como a variável dependente no planejamento dos experimentos. Adicionalmente, uma metodologia de quantificação por HPLC foi desenvolvida e validada para a quantificação simultânea dos ativos durante os ensaios de liberação e a determinação da eficiência de encapsulação (EE%) do sistema final. Finalmente, foram realizados os testes de atividade antifúngica por microdiluição para a formulação final e obtidos valores de concentração inibitória mínima ou MIC (do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*) para os FCZ e o timol.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MOTIVAÇÃO DO ESTUDO

#### 2.1.1 O problema das infecções fúngicas

Atualmente, estima-se que cerca de 1,2 bilhão de pessoas estejam acometidas por algum tipo de infecção fúngica (IF) e essas infecções estejam ligadas a cerca de 1,5 milhão de mortes anuais mundialmente (FIRACATIVE, 2020; FUENTEFRÍA et al., 2018). Apesar de já haver uma certa variedade de agentes antifúngicos (AAF) disponíveis, o consenso atual é que existe uma demanda crescente por novos AAFs e novas estratégias para o tratamento das IFs (FUENTEFRÍA et al., 2018; ZIDA et al., 2017). Essa demanda se deve à crescente incidência de IFs hospitalares com altas taxas de mortalidade, no caso de IFs invasivas, e ao aumento de casos causados por cepas resistentes aos principais AAFs em uso (CASTANHEIRA et al., 2020; COLOMBO et al., 2013; DOI et al., 2016; FAY et al., 2019; FIRACATIVE, 2020; NUCCI et al., 2010).

#### 2.1.2 *Candida spp.* como principais patógenos

Em um contexto nacional, um estudo longitudinal realizado no Rio Grande do Sul mostrou que houve um aumento na ocorrência de IFs hospitalares no período avaliado (2003-2015) e a maioria dos casos estudados (geral) são de infecções causadas por *Candida spp.* (FAY et al., 2019). Cerca de 15% das cepas de *Candida* que foram isoladas neste estudo foram determinadas como resistentes ao Fluconazol pelo método de difusão em disco (FAY et al., 2019). O Fluconazol é um dos principais AAF em uso atualmente e fármacos da sua classe costumam ser utilizados como referência em testes de resistência, mais detalhes sobre o fármaco serão introduzidos no item **2.3.1**.

Apesar do principal causador dessas IFs invasivas com altas taxas de mortalidade ser a *C. albicans*, outras espécies de *Candida* como *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* já representam grande parte dos casos de resistência (FIRACATIVE, 2020). Essas espécies são chamadas de NACS (do inglês

*non-albicans Candida species*) e são menos suscetíveis ou já são intrinsicamente resistentes aos principais AAFs (FIRACATIVE, 2020).

As IFs causadas por espécies de *Candida* são chamadas de candidíases e podem ser locais ou disseminadas e separadas entre superficiais ou invasivas (AJETUNMOBI et al., 2023). Infecções superficiais causadas por *Candida spp.* são as formas menos graves e mais comuns de candidíases e os principais locais afetados são as unhas e cabelos (onicomicoses) e as mucosas, como a mucosa vaginal (CVV) e a mucosa oral/esofágica (COF) ou o trato GI (FAY et al., 2019). No entanto, o fungo é capaz de colonizar praticamente qualquer tecido do corpo e a etiologia das infecções é complexa e bastante específica para diferentes tecidos ou mucosas (JACOBSEN et al., 2020).

As infecções superficiais são comumente tratadas através do uso de AAFs na forma de pomadas, cremes de uso tópico ou de forma sistêmica (RÉ et al., 2021). Quando não tratadas adequadamente, podem levar à formação de biofilmes, que é uma forma mais agressiva da colonização do tecido infectado, e à colonização de tecidos mais profundos, manifestando-se na forma de uma infecção invasiva. Uma vez que o fungo chega à corrente sanguínea, a infecção é considerada sistêmica e é chamada de candidemia (DOI et al., 2016; EMAMI et al., 2019; FIRACATIVE, 2020). O estudo de Doi *et al.* (2016) avaliou casos de IFs em ambiente hospitalar no Brasil e reportou uma taxa de mortalidade de cerca de 70% à candidemia (DOI et al., 2016).

### **2.1.3 Abordagens para desenvolvimento de novos agentes antifúngicos**

O desenvolvimento de novos AAFs é um processo demasiadamente longo e caro, visto que novos AAFs devem atender a uma série de critérios bastante exigentes até serem aprovados e chegarem às prateleiras (AJETUNMOBI et al., 2023; FUENTEFRIA et al., 2018). Idealmente, novos AAFs devem apresentar um perfil farmacocinético e farmacodinâmico melhorados, baixa ou nenhuma toxicidade, alta seletividade frente ao mecanismo da atividade antifúngica e pouca ou nenhuma interação medicamentosa (CAMPOY; ADRIANO, 2017; FUENTEFRIA et al., 2018). Para isso, diversas estratégias podem ser implementadas como a realização de um *screening* sistemático em bases de dados de compostos naturais, moléculas pequenas e MOs em busca de potenciais novos AAFs ou moléculas modelo a partir das quais novos AAFs podem ser sintetizados (FUENTEFRIA et al., 2018).

Além disso, estudos da ação (farmacodinâmica) de AAFs já utilizados via testes *in vitro* e *in vivo* também auxiliam na compreensão dos mecanismos de infecção e em possíveis avanços nas estratégias de tratamento (FUENTEFRIA et al., 2018).

Outras estratégias que tem recebido bastante atenção de estudos acadêmicos recentemente e têm se mostrado bastante promissoras envolvem a combinação de AAFs já aprovados com outros AAFs (terapia combinatória) ou com AAFs naturais com propriedades antifúngicas já reconhecidas na literatura, e sua incorporação em sistemas de *drug delivey* ou DDS (do inglês *Drug Delivery Systems*), na forma de nanomateriais, também chamadas de nanomedicinas (AJETUNMOBI et al., 2023; FUENTEFRIA et al., 2018; ZIDA et al., 2017). Apesar de já existirem AAFs no *pipeline* aguardando aprovação, o consenso é de que novas estratégias se fazem necessárias.

A incorporação de AAFs em DDS costuma trazer uma série de vantagens, como por exemplo, o melhoramento do perfil farmacocinético ou maior biodisponibilidade do ativo incorporado, permeação facilitada, liberação prolongada ou facilitada e atenuação da toxicidade e de características organolépticas indesejadas (RÉ et al., 2021).

Vale destacar aqui, que alguns dos resultados mais promissores nesta frente têm saído de estudos realizados por pequenas empresas de pesquisa com nanotecnologia aplicada à farmácia e trabalhos acadêmicos (AJETUNMOBI et al., 2023).

## 2.2 NANOEMULSÕES COMO SISTEMA CARREADOR

Nanoemulsões (NEs) são dispersões de líquidos imiscíveis, onde um deles é disperso no outro na forma de finas gotículas de dimensões nanométricas ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ), portanto, são dispersões coloidais. Assim como as emulsões convencionais, essas dispersões podem ser do tipo óleo-em-água (O/A), onde uma fase oleosa é dispersa numa fase aquosa, ou do tipo água-em-óleo (A/O), onde o inverso é válido. É possível também formar emulsões múltiplas, por exemplo O/A/O ou A/O/A (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018a). O esquema abaixo (Figura 1) exemplifica os diferentes tipos de emulsões que podem ser formados, conforme citado.

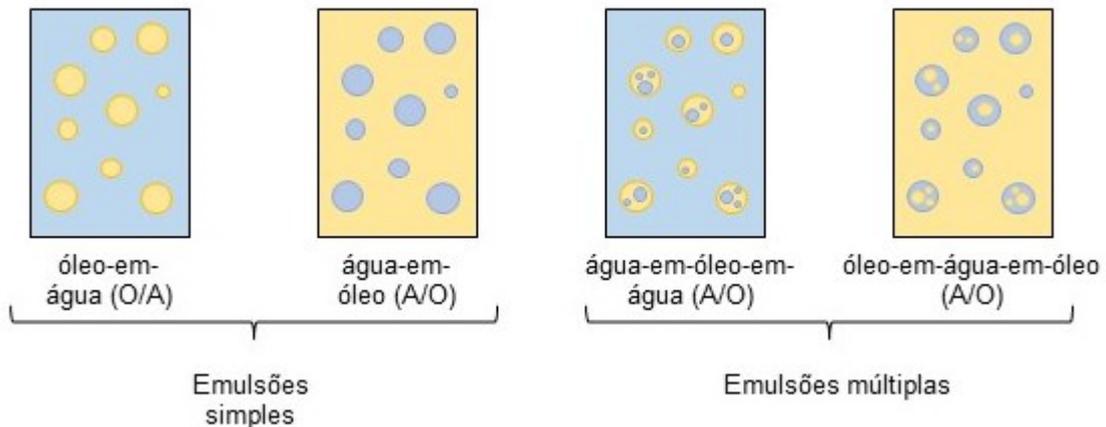


Figura 1. Diferentes tipos de nanoemulsões que podem ser produzidas. Elaborado pelo autor. Adaptado de (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018a).

As emulsões do tipo O/A são mais comuns, principalmente tratando-se do encapsulamento de ativos lipofílicos e, considerando o escopo deste trabalho, daqui em diante toda a discussão será em termos das emulsões deste tipo (O/A).

A única diferença entre as emulsões convencionais e as NEs é o tamanho das gotículas (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018a). A literatura indica que os tamanhos médios de partículas em uma NE podem variar de 10 – 200 nm (KUMAR et al., 2019; MCCLEMENTS, 2012; MCCLEMENTS; JAFARI, 2018a) com alguns autores também reportando valores até 500 nm (SINGH et al., 2017). O espalhamento da luz proporcionado pelas gotículas nanométricas confere às NEs uma aparência leitosa ou levemente translúcida (SINGH et al., 2017).

Existe uma certa ambiguidade no que se refere ao termo “tamanho” nesse contexto, onde alguns autores usam o termo para se referir ao raio das partículas e outros ao diâmetro. Neste trabalho, quando o termo “tamanho” for utilizado, este estará se referindo ao diâmetro das partículas.

O tamanho das gotículas é o que confere às NEs suas aclamadas vantagens de aumento da solubilidade ou biodisponibilidade de ativos, permeação facilitada através de tecidos como a pele e maior estabilidade quando comparadas às emulsões convencionais (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018a).

Assim como uma emulsão convencional, as NEs **não** são sistemas termodinamicamente estáveis e, portanto, estão sempre sujeitas aos mesmos fenômenos de desestabilização por coalescência das gotículas e segregação de fases

(MCCLEMENTS, 2012; MCCLEMENTS; JAFARI, 2018a). Um esquema ilustrando os diferentes processos que levam a desestabilização e consequente segregação das fases em uma NE é apresentado abaixo (Figura 2).

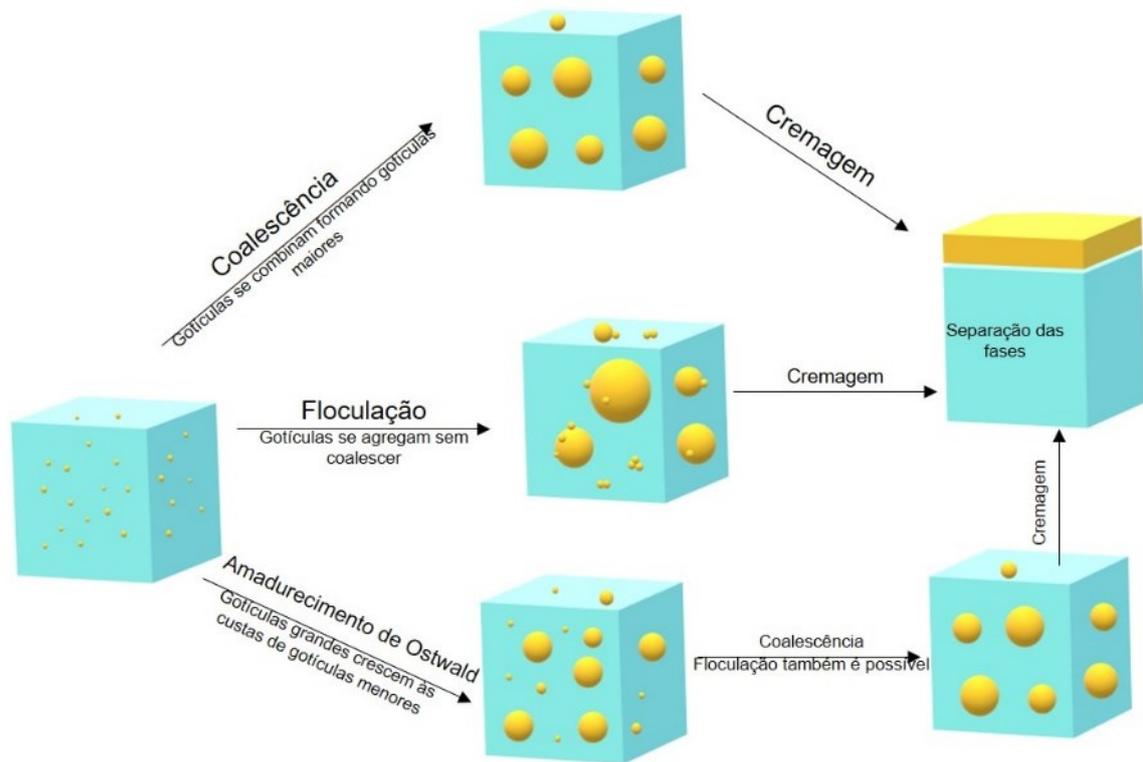


Figura 2. Esquema dos diferentes fenômenos de desestabilização em uma NEs que levam a segregação das fases para uma emulsão do tipo O/A.

Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de (ANKUR GUPTA, H. BURAK ERAL, T. ALAN HATTON, 2016).

A instabilidade termodinâmica das NEs se deve às interações desfavoráveis presentes na interface óleo-água (efeito hidrofóbico), que devem ser colocadas em xeque para que a dispersão mantenha sua característica alta razão área superficial/volume (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018a).

O tamanho nanométrico das gotículas é suficiente para desprezar os efeitos gravitacionais, que levam à segregação das fases (cremagem/sedimentação), portanto, para que a dispersão de líquidos imiscíveis atinja algum tipo de estabilidade relevante, é necessária a adição de surfactantes ao sistema (KLANG; VALENTA, 2011; MCCLEMENTS; JAFARI, 2018a).

Os surfactantes são tipicamente moléculas anfifílicas (possuem grupos hidrofílicos e grupos hidrofóbicos), que atuam na interface óleo-água e podem ser utilizados sozinhos ou em conjunto para diminuir a tensão interfacial e diminuir as interações entre as gotículas, conferindo alta estabilidade às NEs (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018b; SINGH et al., 2017). Surfactantes comumente utilizados na produção de NEs são polissacarídeos, fosfolipídios, proteínas e outros surfactantes poliméricos (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018b).

É comum fazer a seleção dos surfactantes baseando-se no seu valor do balanço hidrofílico-lipofílico ou HLB (do inglês *Hydrophilic-lipophilic balance*). Valores de HLB baixos (2 – 6) indicam que o surfactante deve ter preferência pela fase oleosa e é considerado mais adequado para estabilizar emulsões do tipo A/O. Já surfactantes com valores de HLB altos (8 – 18) devem particionar melhor na fase aquosa e são considerados mais adequados para estabilizar emulsões do tipo O/A (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018b).

Para fins de esclarecimento, existem dispersões coloidais semelhantes às NEs, como as microemulsões (MEs) e algumas diferenças importantes entre esses sistemas são destacadas a seguir. Uma ME também consiste em uma dispersão de gotículas nanométricas estabilizadas com surfactante(s), porém é um sistema termodinamicamente estável e, portanto, deve ser formado espontaneamente, uma vez que os reagentes (água/óleo/surfactante) são misturados nas proporções adequadas (KLANG; VALENTA, 2011; MCCLEMENTS, 2012). É comum a realização de estudos de misturas pseudoternárias para que sejam definidas as regiões de formação de ME (CONEAC et al., 2015; SHAH et al., 2009).

O sistema deve se manter estável indefinidamente, considerando que não há alteração nas condições iniciais (MCCLEMENTS, 2012). Por causa da natureza termodinâmica da estabilidade da MEs, alguns autores não consideram esses sistemas como emulsões verdadeiras (KLANG; VALENTA, 2011).

Para que um sistema como uma ME seja termodinamicamente estável, são necessárias maiores quantidades de surfactante(s), quando comparado às NEs, e os tamanhos de gotículas em uma ME costumam ser menores ( $< 100$  nm), apesar do prefixo indicar o contrário (MCCLEMENTS, 2012). Os tamanhos menores fazem com que as MEs sejam sistemas atraentes para aumentar a solubilidade de ativos, porém a necessidade de quantidades maiores de surfactantes faz com as NEs sejam

sistemas mais interessantes em termos de aplicações farmacêuticas (KLANG; VALENTA, 2011).

A produção de NEs também pode servir como etapa inicial para a formação de uma série de outros sistemas nanoestruturados com o papel de entrega de fármacos, os DDS (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018a). Alguns desses DDS têm se mostrado promissores para entrega de fármacos lipofílicos como nanopartículas sólidas lipídicas ou SLNs (do inglês *Solid Lipid Nanoparticles*) e, mais recentemente, os chamados sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados ou NLCs (do inglês *Nanostructured Lipid Carriers*) (FERNANDES et al., 2020; KRAISIT et al., 2021; MCCLEMENTS; JAFARI, 2018a).

Algumas aplicações interessantes envolvem a incorporação de NEs em filmes poliméricos comestíveis para auxiliar na preservação de alimentos, por exemplo (LI et al., 2020; ROBLEDO et al., 2018). NEs também podem ser recobertas com material polimérico para proporcionar uma liberação direcionada, atrasada ou controlada do ativo encapsulado. Adicionalmente, o recobrimento com polímero viabiliza a secagem do material pela técnica de *spray-drying*, que por sua vez abre a possibilidade de outras aplicações interessantes, uma vez que é obtido um material seco na forma de um pó contendo o ativo (RAI et al., 2018; SAATKAMP, 2019; SINGH et al., 2017).

### **2.2.1 Técnicas de preparo de nanoemulsões**

As diversas técnicas utilizadas para a produção de NEs podem ser separadas em técnicas de alta energia, que envolvem um *input* de energia ao sistema para que ocorra a formação das nanogotículas e as técnicas de baixa energia, que utilizam da energia química do próprio sistema, ou uma combinação das duas (SINGH et al., 2017). As principais características, vantagens e desvantagens de cada técnica são detalhadas a seguir.

#### **2.2.1.1 Técnicas de alta energia**

As técnicas de alta energia utilizam de forças disruptivas intensas para reduzir o tamanho das gotículas a partir de uma emulsão convencional (SINGH et al., 2017). Essas forças disruptivas são geradas com equipamentos mecânicos especializados

como homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores e sondas de ultrassom. Esses equipamentos são capazes de gerar altas taxas de cisalhamento, turbulência, cavitações, entre outros fenômenos físicos, que são responsáveis por romper as gotículas da emulsão de partida em gotículas menores, que por sua vez são rapidamente estabilizadas pelo(s) surfactante(s) presente(s) no meio (efeito Gibbs-Marangoni) (SAFAYA; ROTLIWALA, 2020; SINGH et al., 2017).

A homogeneização à alta pressão envolve forçar uma emulsão através de uma abertura ajustável ( $< 10 \mu\text{m}$ ) em um pistão sob pressões de 500 – 5 000 *psi*. (SINGH et al., 2017) Ao final do processo, o equipamento permite apenas a passagem de material com o tamanho adequado, onde gotículas de até 1  $\mu\text{m}$  podem ser formadas. (SINGH et al., 2017)

A técnica de microfluidização é semelhante, porém envolve forçar a emulsão através de microcanais sob alta pressão (até 20 000 *psi*) seguido de uma colisão de dois jatos do material canalizado em um compartimento específico onde ocorre a formação das nanogotículas (GURPREET; SINGH, 2018; SAFAYA; ROTLIWALA, 2020; SINGH et al., 2017).

Ambas técnicas são de grande interesse para a indústria de alimentos. A técnica de microfluidização é preferida, pois é capaz de produzir NEs mais estáveis com menores quantidades de surfactante e é comum utilizar a técnica de homogeneização para pré-condicionar a amostra para o microfluidizador (SINGH et al., 2017). Ambos processos podem ser repetidos múltiplas vezes até que seja atingido o tamanho e dispersão desejados para as partículas (SINGH et al., 2017).

A técnica de ultrassom possui algumas vantagens operacionais, é capaz de formar NEs estáveis com um custo energético menor que as técnicas anteriores e é uma técnica bastante utilizada em pesquisas laboratoriais (SAFAYA; ROTLIWALA, 2020; SINGH et al., 2017). Aqui, o processo de formação das gotículas nanométricas é um pouco parecido às técnicas anteriores, onde uma sonda piezoelétrica é utilizada para gerar energia acústica suficiente (cerca de 20 kHz) para formar cavitações no líquido dispersante (GURPREET; SINGH, 2018; SINGH et al., 2017). Essas cavitações formam bolhas instáveis que rapidamente implodem e geram um fluxo intenso de líquido em volta da fase dispersa. A pressão gerada pelo líquido turbulento é capaz de romper as gotículas da fase dispersa em gotículas nanométricas, que por sua vez são rapidamente recobertas e estabilizadas pelas moléculas de surfactante(s)

presente(s) no meio (SINGH et al., 2017). É possível formar NEs com gotículas de até 10 – 30 nm com essa técnica (GURPREET; SINGH, 2018).

Apesar de caras, as técnicas de alta energia são amplamente utilizadas na indústria de alimentos e cosméticos, pois são escalonáveis, permitem o emprego de qualquer tipo de óleo e geralmente menores quantidades de surfactantes são necessárias para estabilizar as NEs formadas (SAFAYA; ROTLIWALA, 2020).

Algumas desvantagens dessas técnicas são o alto custo dos equipamentos, seu consumo energético elevado e, no caso dos equipamentos que utilizam altas pressões, há geração de calor durante o processo, que acaba limitando o uso de ativos termolábeis nas formulações e exige um resfriamento adequado (SAFAYA; ROTLIWALA, 2020; SINGH et al., 2017).

#### 2.2.1.2 *Técnicas de baixa energia*

As técnicas de baixa energia utilizam da energia química do próprio sistema para que ocorra a formação da NE. Podem ser separadas entre as técnicas de inversão de fase, chamadas de PIC (do inglês *phase-inversion composition*) e PIT (do inglês *phase-inversion temperature*), e as técnicas de emulsificação espontânea ou uma combinação de ambas (SINGH et al., 2017; SOLANS; SOLÉ, 2012).

As técnicas de inversão de fase envolvem proporcionar uma mudança na solubilidade do surfactante ou da curvatura do filme na interface através de alterações na composição (PIC) ou na temperatura (PIT) do sistema. Portanto, consiste em uma conversão de um tipo de emulsão, por exemplo, uma emulsão do tipo A/O, para o tipo inverso, isto é, uma emulsão do tipo O/A, passando por uma fase bicontínua ou líquido-cristalina intermediária (SINGH et al., 2017).

A técnica de PIT consiste basicamente em preparar um sistema (água/óleo/surfactante) geralmente na forma de uma microemulsão, na PIT ou próximo à PIT, que corresponde à temperatura em que a curvatura do surfactante deve ser nula (fase bicontínua ou líquido-cristalina lamelar). Em seguida é realizado um rápido resfriamento (NE final do tipo O/A) ou aquecimento (NE final do tipo A/O) do sistema. A rápida mudança de temperatura do sistema é responsável pela formação de NEs razoavelmente estáveis (SINGH et al., 2017).

A utilização da técnica de PIT é limitada ao uso de surfactantes não-iônicos, tais como polímeros derivados de poli(óxido de etileno), que são sensíveis às

mudanças de temperatura (hidratação/desidratação das cadeias de PEO) (SOLANS; SOLÉ, 2012). As NEs formadas pela técnica de PIT são menos estáveis em temperaturas próximas à PIT e nessas condições é necessária a adição de co-surfactantes para garantir a estabilidade do sistema (SAFAYA; ROTLIWALA, 2020).

Algumas desvantagens dessa técnica são óbvias, como a sua inadequação frente ao uso de ativos termolábeis nas formulações, sua limitação ao uso exclusivo dos surfactantes termossensíveis. Além disso, é necessário conhecimento do comportamento de solubilidade dos reagentes para que a transição entre as emulsões ocorra de maneira adequada (SINGH et al., 2017; SOLANS; SOLÉ, 2012).

A técnica de PIC é relativamente mais simples e consiste basicamente na diluição de uma fase na outra, realizado por gotejamento à temperatura ambiente. O objetivo é o mesmo da técnica anterior, isto é, alterar a curvatura do surfactante para induzir a formação da NE do tipo inverso ao sistema inicial, dessa vez, a partir do aumento do volume de uma das fases (SAFAYA; ROTLIWALA, 2020).

Aqui novamente, prepara-se um sistema (óleo/água/surfactante) em uma composição específica, isto é, em uma região específica em um diagrama de fases próxima de um equilíbrio entre uma fase bicontinua e uma microemulsão do tipo A/O, por exemplo. Em seguida, o sistema é diluído com uma das fases, nesse caso a água, até que ocorra a formação da NE inversa (O/A) (SAFAYA; ROTLIWALA, 2020; SOLANS; SOLÉ, 2012). Propriedades como a região de transição de fase do sistema, a tensão interfacial, a viscosidade e o tipo e concentração do(s) surfactante(s) utilizado(s) são importantes e tem um impacto direto na formação e estabilidade da NE final (SAFAYA; ROTLIWALA, 2020). A técnica de PIC não é suscetível somente ao uso de surfactantes com segmentos de PEO como a PIT e permite a incorporação de ativos termolábeis, porém deve produzir NEs com tamanhos maiores e mais dispersas que a PIT (SOLANS; SOLÉ, 2012).

A técnica de emulsificação espontânea envolve a diluição de uma fase orgânica (FO) composta por um solvente parcialmente miscível (acetona, etanol, acetato de etila, entre outros) contendo o óleo (fase dispersa) e um surfactante com maior afinidade pela fase oleosa, chamado de surfactante lipofílico, em uma fase aquosa (FA) contendo um surfactante hidrofílico. Esse processo costuma ser realizado por gotejamento sob agitação branda e deve ocorrer à temperatura e pressão ambiente (SAFAYA; ROTLIWALA, 2020; SINGH et al., 2017). Aqui, a formação da NE ocorre através da migração do solvente miscível para a FA durante

a sua diluição. Isso gera uma turbulência intensa na interface óleo-água, que é capaz de romper as gotículas de óleo deixadas para trás e formar nanogotículas, que por sua vez são rapidamente estabilizadas pelos surfactantes presentes no meio (SAFAYA; ROTLIWALA, 2020; SINGH et al., 2017).

Não há mudança na curvatura do surfactante durante o processo de diluição da técnica de emulsificação espontânea (SOLANS; SOLÉ, 2012). Também é necessária a remoção do solvente miscível da formulação final, que é realizado por rotaevaporação (GURPREET; SINGH, 2018).

O processo de formação da NE é espontâneo, porém o sistema formado não é termodinamicamente estável (NE). Para compensar o ganho energético relacionado ao aumento expressivo da área interfacial durante a formação da NE, deve ocorrer um aumento de entropia durante a difusão da fase dispersa no meio (SINGH et al., 2017). Acredita-se que isso é causado pela turbulência gerada em torno das gotículas durante a migração do solvente miscível para a água (SINGH et al., 2017).

Apesar de não ser necessário *input* de energia ao sistema para que o processo espontâneo ocorra, é comum a utilização de agitação magnética branda durante o preparo, exatamente para facilitar a difusão das gotículas recém formadas e favorecer o rápido recobrimento/estabilização pelas moléculas de surfactante. (SINGH et al., 2017) Essa técnica é capaz de produzir NEs estáveis com diversos tamanhos (< 20 – 500 nm) e baixa polidispersidade (GURPREET; SINGH, 2018).

Existem outras técnicas classificadas como técnicas de emulsificação espontânea, como a técnica de diluição de microemulsão, que basicamente consiste em diluir uma microemulsão (p.ex., do tipo O/A) com água por gotejamento na presença de um co-solvente, como um álcool de cadeia média, por exemplo (SAFAYA; ROTLIWALA, 2020). O efeito de migração do solvente é semelhante à técnica de emulsificação espontânea explicada acima e não ocorre mudança na curvatura do surfactante (SOLANS; SOLÉ, 2012). Aqui, a formação da NE (O/A) ocorre por causa da diluição do surfactante, cuja concentração na interface passa a ser pequena demais para garantir a estabilidade termodinâmica da ME inicial (SAFAYA; ROTLIWALA, 2020).

### **2.2.2 Nanoemulsões como sistema tópico de *drug delivery***

O uso de NEs como DDS é vasto e sua aplicação para fins farmacêuticos pode ser realizada por diversas rotas de administração (oral, tópica, parenteral e intravenosa, ocular, intranasal e pulmonar) (SINGH et al., 2017).

Em geral, existe uma preferência pela administração oral de medicamentos. No entanto, para que um medicamento administrado por essa rota atinja a corrente sanguínea e chegue no local de ação na concentração adequada são necessárias doses sistêmicas e ainda há a possibilidade de interações com alimentos e sua degradação no ambiente gástrico (RAI et al., 2018).

A administração tópica de medicamentos apresenta diversas vantagens sobre as vias de administração sistêmica, onde menores doses são necessárias já que é possível aplicação diretamente no local da infecção, a absorção do medicamento é facilitada pela alta área superficial proporcionada pela pele e a aplicação e descontinuação do tratamento é simples e pode ser realizada pelo próprio paciente. Além disso, o metabolismo pré-sistêmico ou de primeira passagem é evitado, assim evitam-se efeitos adversos sistêmicos (RAI et al., 2018; SIVASANKARAPILLAI et al., 2021).

No seu trabalho de revisão, Rai *et al.* (2018) indicam que um fármaco modelo para aplicação tópica (via dérmica) deve apresentar baixo coeficiente de partição, massa molecular acima de  $500 \text{ g mol}^{-1}$ , baixa biodisponibilidade sistêmica e baixa permeação cutânea. O inverso é válido para a via transdérmica, onde o objetivo é fazer com que o fármaco permeie as camadas mais internas da pele e dessa forma, chegue rapidamente à corrente sanguínea (RAI et al., 2018).

A taxa de absorção, o alcance e o mecanismo responsável pelo transporte do fármaco através da pele dependerão das características do tecido em que será feita aplicação e, em termos dos parâmetros da formulação, do tamanho, potencial zeta e da sua composição (RAI et al., 2018). Partículas com tamanhos maiores que 150 nm e carga negativa tendem a favorecer ação tópica (via dérmica), já partículas menores que 100 nm e carga positiva favorecem a permeação até as camadas mais internas (via transdérmica) (RAI et al., 2018).

Nesse contexto, o papel do(s) surfactante(s) é de modificar as células das camadas mais externas e desestabilizar a camada lipofílica da pele para facilitar a permeação do fármaco (RAI et al., 2018; SIVASANKARAPILLAI et al., 2021).

É comum também a utilização de promotores de permeação como moléculas pequenas, tais como etanol, propileno glicol, ureia e DMSO, porém os efeitos

adversos de alguns desses promotores limita seu uso em algumas aplicações (CHANTASART et al., 2009; SIVASANKARAPILLAI et al., 2021).

Alternativamente, moléculas naturais como terpenos têm se destacado para essa função, pois são capazes de se alojar com facilidade entre as moléculas lipofílicas nas camadas da pele e alterar o perfil de fluidez de material na região, além de apresentarem um perfil de toxicidade reduzido (possuem *status* GRAS) e baixa irritabilidade cutânea para doses de 1 – 5% (CHANTASART et al., 2009).

## 2.3 INSUMOS

### 2.3.1 Fluconazol

O Fluconazol (2-(2,4-difluorofenil)-1,3-bis(1,2,4-triazol-1-il)propan-2-ol) (Figura 3) é considerado um fármaco de classe I (SCB), de acordo com as diretrizes encontradas na Farmacopeia Brasileira 6ª ed. Também é possível encontrar na literatura, autores o classificando como classe III (SCB) (FERNANDES et al., 2020), talvez devido a diferença dos dados de solubilidade disponíveis para o fármaco (ver Tabela 1).

Quimicamente, o FCZ é classificado como um triazol, em referência ao número de átomos de nitrogênio do anel azólico. Algumas propriedades físico-químicas do fármaco e sua estrutura são apresentadas abaixo.

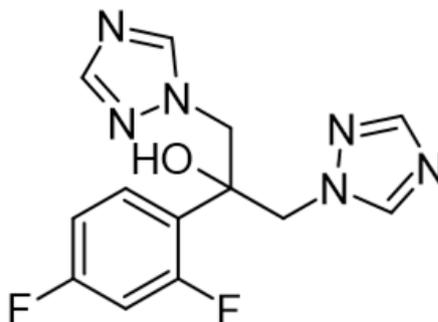


Figura 3. Estrutura do Fluconazol.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do Fluconazol.

Propriedade	Valor / unidade	Referências
$Logk_{o/a}$	0,4 0,5 0,58	(FERNANDES et al., 2020) (CHAVES RUELA CORRÊA; REICHMAN HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO; DUARTE VIANNA-SOARES, 2012) (RÉ et al., 2021)
$p.f.$	138 – 141°C	Dado obtido neste estudo (AKAY; KAYAN, 2021; BLOKHINA et al., 2020)
$pk_a$	11,1; 2,9; 2,5 <sup>a</sup>	(CHAVES RUELA CORRÊA; REICHMAN HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO; DUARTE VIANNA-SOARES, 2012)
Solubilidade em água	5,1 mg mL <sup>-1b</sup> 1,39 mg mL <sup>-1c</sup> 5,5 mg mL <sup>-1b</sup>	Dado obtido neste estudo (RÉ et al., 2021) (CONEAC et al., 2015)

<sup>a</sup> –OH; –NH (anel azólico).

<sup>b</sup> Dado experimental obtido à temperatura ambiente pelo autor do trabalho citado.

<sup>c</sup> Valor encontrado na literatura e temperatura não especificada.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Seu modo de ação envolve a inibição da atividade de uma enzima específica (14- $\alpha$ -desmetilase) envolvida na biossíntese de ergosterol (Figura 4). O ergosterol é o componente majoritário da membrana celular do fungo e é fundamental para assegurar a sua estrutura e também auxiliar em outras funções como, por exemplo, regular a fluidez de material através da membrana. Devido a sua importância para a sobrevivência do MO, esse esteroide e sua biossíntese são alvos de interesse para uma série de AAFs e interferir na sua biossíntese é o foco dos antimicóticos azólicos (CAMPOY; ADRIO, 2017; EMAMI et al., 2019).

A inibição desta enzima (14- $\alpha$ -desmetilase) leva à formação e acúmulo de esteróis metilados, que são tóxicos ao fungo, e altera o funcionamento de proteínas de transporte presentes na membrana. Isso ultimamente impede a reprodução do MO e, conseqüentemente, a colonização do tecido infectado. Assim, a atividade da maioria dos AAFs azólicos, como o FCZ, é fungistática, ou seja, apenas impede o crescimento e propagação do fungo, não o extermina (CAMPOY; ADRIO, 2017; EMAMI et al., 2019; JOHNSON, 2021).

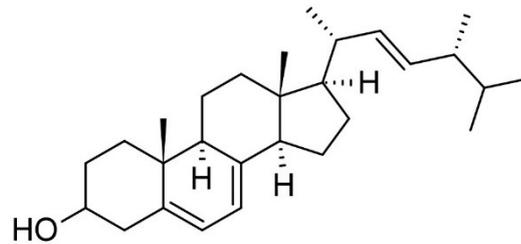


Figura 4. Estrutura do ergosterol.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

O Fluconazol compõe a linha de frente no tratamento de IF desde que foi introduzido no mercado na década de 90, pela Pfizer. É comumente utilizado tanto para tratamento como para profilaxia em ambiente hospitalar, por apresentar atividade contra uma variedade de MOs. É eficaz contra candidíases superficiais (i.e., onicomicoses, CVV e CO) e algumas IF invasivas (por exemplo, meningite criptocócica e candidemia) e ainda é o fármaco de escolha para o tratamento de candidíases em geral (JOHNSON, 2021; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012). Seu uso costuma ser feito por via oral e apresenta uma biodisponibilidade excelente (95%) (JOHNSON, 2021).

A escolha do FCZ como principal AAF para o tratamento de diversas IFs se deve ao seu amplo espectro de atividade, bom perfil farmacocinético/farmacodinâmico e um perfil de toxicidade melhorado quando comparado aos azóis de primeira geração (por exemplo, clotrimazol, miconazol, cetoconazol) (CAMPOY; ADRIO, 2017; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012). Alguns efeitos colaterais comumente reportados para o uso oral do FCZ são: diarreia, desconforto estomacal, irritação na pele e toxicidade hepática (KRAISIT et al., 2021).

A literatura sugere que o uso indiscriminado do FCZ para tratamento e profilaxia em ambiente hospitalar contribui significativamente para o crescente número de casos de resistência ao fármaco (EMAMI et al., 2019; FIRACATIVE, 2020; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012). O aumento de infecções causadas por cepas resistentes ao FCZ também é atribuído a sua natureza fungistática (CAMPOY; ADRIO, 2017; EMAMI et al., 2019).

O desenvolvimento de resistência aos AAFs por parte do fungo é regido pelo processo de seleção natural em favor de mutações genéticas que aumentam a chance de sobrevivência do MO. O desenvolvimento de resistência por mutações genéticas ocorre via 3 mecanismos principais: i) diminuição da concentração efetiva do AAF

dentro da célula ii) alterações no alvo do AAF e iii) alterações em etapas na via metabólica afetada pelo AAF (CAMPOY; ADRIO, 2017). Esses mecanismos desenvolvidos por *Candida spp.* e os genes específicos envolvidos são amplamente abordados na literatura em trabalhos de revisão sobre o tema. Para maiores detalhes, faz-se referência aos trabalhos já citados (CAMPOY; ADRIO, 2017; FUENTEFRIA et al., 2018; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012).

Um dos principais fatores que contribui para a resistência de MO como *Candida spp.* é a formação de biofilmes. Um biofilme é uma comunidade altamente organizada de células modificadas (hifas e pseudo-hifas) protegidas por uma rede polimérica de material produzido e excretado pelo fungo, como polissacarídeos, proteínas e carboidratos, que facilitam a adesão da colônia à superfície infectada (biótica ou abiótica) e protegem a matriz da infecção através de uma série de mecanismos de adaptação (AJETUNMOBI et al., 2023). No caso das espécies de *Candida*, a formação de biofilmes reduz significativamente a eficácia (ou até inutiliza) dos principais AAFs como os azóis, polienos e equinocandinas (AJETUNMOBI et al., 2023; RÉ et al., 2021).

### 2.3.2 Timol

O timol (2-isopropil-5-metilfenol) (Figura 5A) é um monoterpene fenólico e um dos principais terpenóides encontrado nos óleos essenciais de plantas dos gêneros *Thymus*, *Origanum* e *Satureja* e em menores quantidades em outras plantas também pertencentes a família das *Lamiaceae*. Pode ser encontrado como componente majoritário no óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) junto ao seu isômero, o carvacrol (Figura 5B), geralmente encontrado em menor quantidade (KARPIŃSKI, 2020; MARCHESE et al., 2016).

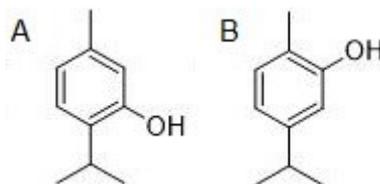


Figura 5. Estrutura do timol (A) e do carvacrol (B).  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim como os outros monoterpenos estruturalmente parecidos (*p*-cimeno, limoneno, mentol, entre outros) o timol apresenta atividade antimicrobiana já reconhecida na literatura e possui *status GRAS* (do inglês *Generally Recognized As Safe*) concedido pelo FDA (MARCHESE et al., 2016). Seu uso como aditivo na indústria alimentícia é comum, desde flavorizante (MARCHESE et al., 2016) a agente preservante (GUARDA et al., 2011; LI et al., 2017, 2020; ROBLEDO et al., 2018). Também é possível encontrar trabalhos que mostram a sua capacidade como potencial AAF no combate as infecções causadas por *Candida spp.* (KHAN et al., 2015; SHARIFZADEH et al., 2018).

Segundo o trabalho de revisão de Karpinski (2020), dados da literatura sugerem que o efeito antifúngico de terpenos como o timol se dá de forma multidirecional, induzindo processos oxidativos em polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios que compõem a parede e a membrana celular, danificando organelas e inibindo a síntese de material genético e estrutural essencial para a sobrevivência do MO. Dessa maneira, pode-se dizer que sua ação é fungicida, uma vez que a dose for adequada (KARPIŃSKI, 2020). No trabalho, o autor faz referência à mistura de terpenos na forma de óleo essencial e enfatiza a importância do efeito conjunto da mistura de metabólitos secundários. Porém, sabe-se que a atividade de um óleo essencial pode ser atribuída às moléculas em maior quantidade com os componentes em menor quantidade geralmente desempenhando um papel auxiliar (PAVONI et al., 2020).

Apesar das excelentes propriedades biocidas e as várias possibilidades de aplicação, as propriedades físico-químicas do timol dificultam sua aplicação em meio fisiológico. O timol possui baixa biodisponibilidade (16%) e é bastante volátil e reativo (NAGOOR MEERAN et al., 2017). Algumas das suas propriedades físico-químicas podem ser verificadas na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas do timol.

Propriedade	Valor / unidade	Referências
$\text{Log}k_{o/a}$	3,4	(RASSU et al., 2014)
<i>p.f.</i>	49 – 51°C	(NAGOOR MEERAN et al., 2017)
$\text{p}k_a$	10,6	(RASSU et al., 2014)
Solubilidade em água (25°C)	1197 g L <sup>-1a</sup>	Dado obtido neste estudo

<sup>a</sup>dado obtido à temperatura ambiente (~25°C).

Fonte: Elaborado pelo autor.

A utilização de sistemas como as NEs para contornar os problemas de estabilidade e biodisponibilidade do timol já é amplamente estudada (LI et al., 2017, 2020; MA; DAVIDSON; ZHONG, 2016; SAATKAMP et al., 2023).

Terpenos como o timol também são capazes de facilitar a permeação tanto de ativos lipofílicos como de ativos hidrofílicos através da pele (CHANTASART et al., 2009). O mecanismo pelo qual terpenos fenólicos como o timol promovem a permeação de ativos através da pele difere para sistemas específicos, o método do estudo e o ativo em questão (CHANTASART et al., 2009).

O estudo de Chantasart *et al.* (2009) indica que o mecanismo para o timol é semelhante ao seu mecanismo de ação antifúngica, onde o terpeno lipofílico é capaz de se alojar entre os corneócitos que compõem a camada hidrofóbica mais externa da pele, chamada de *stratum corneum* (SC), e “fluidizar” o material lipídico intercelular perante sua interação, facilitando a difusão do ativo lipofílico estudado através da pele (transporte transdérmico) (CHANTASART et al., 2009). O autor também compara o efeito do timol como promotor de permeação aos álcoois de cadeia curta comumente utilizados para essa finalidade, isso traz destaque ao terpeno por ser uma alternativa natural e igualmente eficaz.

Adicionalmente, destacam-se dois estudos já citados, que trazem resultados interessantes frente ao uso do timol contra *Candida spp.* O estudo de Khan *et al.* (2015), que avaliou a atividade antifúngica do timol e seu isômero contra cepas de *C. albicans* em busca de elucidar os mecanismos envolvidos no *stress* oxidativo causado pelos terpenos nos componentes lipídicos que compõem a membrana celular do fungo. Neste estudo os terpenos mostraram atividade antifúngica mesmo em baixas concentrações (KHAN et al., 2015).

O estudo de Sharifzadeh *et al.* (2018) avaliou o efeito fungicida do timol em cepas resistentes (*C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*) e reportou efeito sinérgico do terpeno com o FCZ (SHARIFZADEH et al., 2018).

### 2.3.3 Óleo como fase carreadora

A fase oleosa de uma NE pode ser composta por uma mistura de diversos componentes hidrofóbicos como triglicerídeos, terpenóides, flavonóides, vitaminas, corantes, entre outros (MCCLEMENTS, 2012). Propriedades como a viscosidade, tensão superficial, polaridade e características térmicas da fase oleosa influenciam na

capacidade de formação e na estabilidade das NEs. A natureza da fase dispersa também tem um impacto na liberação e biodisponibilidade proporcionada ao ativo (MCCLEMENTS, 2012).

Em uma NE, os fenômenos de desestabilização de origem gravitacional são contornados pelo tamanho nanométrico das gotículas e o uso de surfactantes retarda a coalescência das gotículas por repulsão eletrostática ou impedimento estérico.

Dessa forma, o principal fenômeno de desestabilização em NEs é o amadurecimento de Ostwald (MCCLEMENTS, 2012; PAVONI et al., 2020). O efeito do amadurecimento de Ostwald é mais aparente em sistema polidispersos, uma vez que se trata do aumento de volume de gotículas maiores às custas das gotículas menores, que difundem com maior facilidade no meio. Um jeito de retardar o amadurecimento de Ostwald é através da seleção de uma fase dispersa de peso molecular alto, como triglicerídeos de cadeia média ou longa e óleos vegetais não-voláteis como os óleos testados, que devem difundir com maior dificuldade através da fase dispersante (MCCLEMENTS, 2012; PAVONI et al., 2020).

Vale destacar alguns dos trabalhos referenciados, que utilizaram os óleos avaliados para encapsulação de FCZ e timol. O trabalho de Tripathy (2019) testou uma NE de óleo de girassol (OG) e reportou um aumento na solubilidade do FCZ incorporado na formulação destacando o potencial de aplicação para o tratamento de IFs na cavidade oral (TRIPATHY, 2019). Saatkamp *et al.* (2023) também desenvolveu uma NE visando aplicação para o tratamento de IFs (*C. albicans*) na cavidade oral. Nesse estudo, a NE desenvolvida foi produzida com óleo de semente-de-uva (OSU) e o ativo encapsulado foi o timol (SAATKAMP et al., 2023).

Fernandes *et al.* (2020) utilizou óleo de rícino (OR) na sua forma etoxilada para a produção de um sistema semi-sólido (NLC) também com a intenção de tratar IFs via aplicação tópica (FERNANDES et al., 2020).

Os três óleos testados no presente trabalho foram selecionados baseando-se nos estudos da literatura supracitados. O OG e o OSU são misturas ricas em triglicerídeos de ácido linoleico (~65%) e oleico (20%) (ver Figura 6A) (TRIPATHY, 2019). O OG é obtido principalmente das sementes de girassol (*Helianthus annuus*) e é amplamente utilizado na indústria de alimentos em formulações parenterais, cosméticos e formulações farmacêuticas de uso tópico (TRIPATHY, 2019).

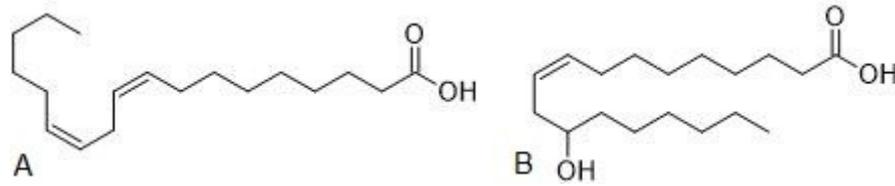


Figura 6. Estrutura dos principais ácidos graxos que compõe os triglicerídeos dos óleos estudados, o ácido ricinoleico (A) e o ácido linoleico.  
Elaborado pelo autor.

O OSU é extraído das sementes da uva (*Vitis vinifera*) e é um subproduto da indústria vinícola, possui uma composição semelhante ao OG, isto é, também é rico em triglicerídeos de ácido linoleico (65 – 75%) e oleico (20 – 40%) (MARTIN et al., 2020). O OSU também é reconhecido por possuir quantidades relevantes de moléculas bioativas de interesse farmacêutico como tocoferóis/tocotrienóis e alguns polifenóis, que conferem propriedade antioxidante ao óleo e o torna um ingrediente atraente para a produção de formulações farmacêuticas e cosméticas (MARTIN et al., 2020).

O OR é obtido a partir da semente da mamona (*Ricinus communis*) e é rico em triglicerídeos do ácido ricinoleico (75 – 90%) (ver Figura 6B). É o único óleo vegetal com conteúdo tão alto do triglicerídeo principal (até 90%) (YEBOAH et al., 2021). Além disso, o conteúdo de ácidos graxos saturados e poli-insaturados do OR (até ~10%) contribui para que ele tenha uma maior estabilidade quando comparado aos outros óleos (até ~60 – 70%) (MARTIN et al., 2020; YEBOAH et al., 2021).

Segundo a literatura, os três óleos citados apresentam uma série de propriedades terapêuticas reconhecidas, onde o OG contém ácidos graxos de valor nutricional e o OSU e o OR contêm uma série de moléculas bioativas de interesse farmacológico que conferem propriedades como antiinflamatório (OSU e OR), antimicrobiano (OSU) e purgativo (OR), por exemplo (MARTIN et al., 2020; YEBOAH et al., 2021).

#### 2.3.4 Lecitina

Fosfolípidios são moléculas anfífilicas encontradas na membrana celular de plantas, animais e bactérias. São compostos por uma unidade base de glicerol, onde duas das hidroxilas encontram-se esterificadas com algum ácido graxo contendo ou não insaturações (parte hidrofóbica) (CHUNG et al., 2018). A outra hidroxila é

esterificada com o grupo fosfato ligado à uma molécula de colina (PC), etanolamina (PE), serina (PS), glicerol (PG), Inositol (PI), entre outras (parte hidrofílica) (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018b). Alguns exemplos dessas estruturas são mostrados na Figura 7 abaixo.

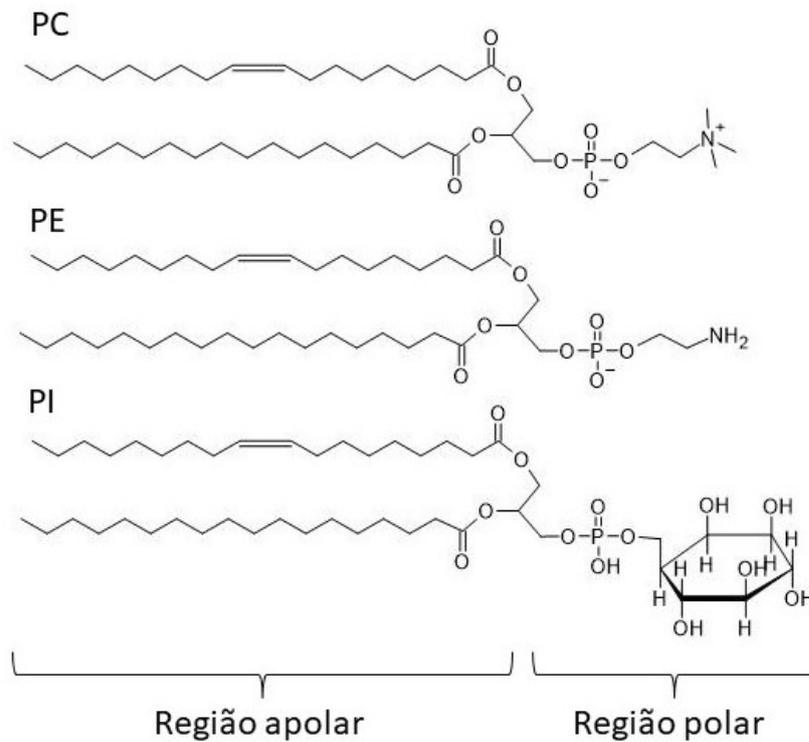


Figura 7. Estrutura dos principais fosfolipídeos encontrados na lecitina de soja, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilinositol (PI).  
Elaborado pelo autor. Adaptado de Schaffer *et al.* (2007) (SCHAFFER, 2007)

Esses fosfolipídios, comumente utilizados em aplicações alimentícias ou farmacêuticas, são chamados de lecitinas e são obtidas primariamente a partir de plantas como a soja, canola e semente de girassol, mas também podem ser de origem animal obtidas a partir da gema de ovo ou do leite (CHEN *et al.*, 2016; DAMMAK *et al.*, 2020).

As lecitinas comerciais são misturas naturais de fosfolipídios (65-75%), outros triglicerídeos (até 34%) e outros compostos em menores quantidades como açúcares, esteróis, pigmentos e esteróis glicosilados, por exemplo (DAMMAK *et al.*, 2020). A lecitina obtida a partir da soja costuma conter uma mistura de fosfolipídios de PC (em maiores quantidades), PE e PI (ver Figura 7) (CHUNG *et al.*, 2018; KLANG; VALENTA, 2011).

As lecitinas são amplamente utilizadas em formulações na indústria de alimentos, cosméticos e na indústria farmacêutica por serem seguras e biocompatíveis (possuem *status* GRAS), além de facilitar a absorção de ativos através da pele (CHEN et al., 2016; KLANG; VALENTA, 2011; SCHAFFER, 2007).

No entanto, sozinhas as lecitinas não costumam formar sistemas muito estáveis e é comum sua combinação com outros emulsificantes para que seja atingida uma maior estabilidade (KLANG; VALENTA, 2011; MA; DAVIDSON; ZHONG, 2016). A combinação de lecitinas e polímeros não-iônicos como os do tipo Pluronic® tem se mostrado eficaz para a produção de NEs estáveis (BOUCHEMAL et al., 2004; ZHAO; ZHANG, 2017). Sua combinação com o P123 em específico já é estudada para a formação de DDS (CHEN et al., 2016; SAATKAMP et al., 2023; ZHAO; ZHANG, 2017).

A lecitina Lipoid S75 utilizada no presente trabalho é obtida da soja, é composta por pelo menos 70% de PC e o seu valor de HLB encontrado na literatura é em torno de 7 – 8,5 (CHUNG et al., 2018; SAATKAMP, 2019).

### 2.3.5 Pluronic® P123

Os polímeros do tipo Pluronic® são compostos por segmentos ou blocos não-iônicos de solubilidade diferente (molécula anfifílica) e na ciência de polímeros são chamados de copolímeros em bloco do tipo (ABA) (PITTO-BARRY; BARRY, 2014).

Os Pluronic® também são chamados de poloxâmeros e são compostos por um bloco central mais hidrofóbico de poli(óxido de propileno) ou PPO (do inglês *polypropylene oxide*) flanqueado por blocos mais hidrofílicos de poli(óxido de etileno) ou PEO (do inglês *polyethylene oxide*) (ver .

Tabela 3) (JUNIOR, 2020; PITTO-BARRY; BARRY, 2014).

Tabela 3. Estrutura de cada bloco para os polímeros do tipo Pluronic®.

Segmento	Nome abrev.	Estrutura
Hidrofóbico (central)	PPO	
Hidrofílico (extremidades)	PEO	

Elaborado pelo autor.

A fórmula geral para um poloxâmmero é  $(\text{PEO})_x(\text{PPO})_y(\text{PEO})_z$ , onde para o P123  $x = y \cong 20$  e  $z \cong 70$  (Figura 8) (PITTO-BARRY; BARRY, 2014).

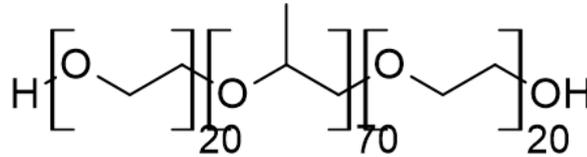


Figura 8. Estrutura do P123.  
Elaborado pelo autor.

A CMC do P123 é 300 ppm à 25 °C e o valor de HLB encontrado na literatura para o polímero é 8 (JUNIOR, 2020; PITTO-BARRY; BARRY, 2014; ZHAO; ZHANG, 2017).

O PEO é considerado seguro para uso como excipiente em formulações parenterais (possui *status* GRAS) pela agência de vigilância norte-americana, o FDA, pois apresenta baixa toxicidade e, dessa forma, diversos autores estendem o perfil de segurança do PEO para o P123 (ZHAO; ZHANG, 2017).

Os surfactantes não-iônicos tendem a ser mais efetivos para a estabilização de NEs do tipo O/A e são preferíveis para a produção de formulações tópicas (FERNANDES et al., 2020; SAFAYA; ROTLIWALA, 2020).

## 2.4 DESIGN DE EXPERIMENTOS

### 2.4.1 Planejamento fatorial completo $2^3 + 3$

De maneira geral, um planejamento fatorial (completo ou fracionário) é uma ferramenta estatística utilizada para auxiliar na compreensão dos efeitos principais e de interação dos fatores (variáveis independentes) suspeitos de exercerem alguma influência (efeito) na obtenção das respostas (variáveis dependentes) observadas para um dado sistema (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Resumidamente, tem-se um processo onde é sabido que a obtenção de uma resposta  $y$  pode depender de alguns fatores  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ . É possível representar a relação entre fatores e resposta através de uma função  $y = f(x_1, x_2, x_3)$ . Essa relação entre as variáveis pode ser conhecida ou não. Geralmente, esta relação é

desconhecida e utiliza-se uma aproximação polinomial na forma da Equação 1 para representá-la. A Equação 1 mostra a aproximação feita em um sistema com 3 variáveis independentes ( $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ ) e uma variável dependente  $y$ .

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 + e \quad (1)$$

Este polinômio serve como um modelo empírico que relaciona os fatores estudados e a resposta observada e serve para auxiliar na compreensão dos efeitos principais ( $b_1$ ,  $b_2$  e  $b_3$ ) e de interação ( $b_{12}$ ,  $b_{13}$ ,  $b_{23}$  e  $b_{123}$ ) que as variáveis de estudo podem apresentar (LUNDSTEDT et al., 1998; SILVA; SARAMAGO, 2005; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Um design fatorial completo em 2 níveis gera um total de  $2^k$  experimentos, onde  $k$  corresponde ao número de variáveis independentes ou fatores. Cada fator é estudado em 2 níveis ou limites, um superior (+) e outro inferior (-). Os valores atribuídos para cada nível são determinados pelo experimentalista através de experimentos exploratórios e dados disponíveis na literatura (SILVA; SARAMAGO, 2005). Com estes dados e os resultados dos experimentos é possível gerar uma tabela chamada de matriz de planejamento (Tabela 4).

Tabela 4. Matriz de planejamento utilizada para um planejamento fatorial completo  $2^3$ . A matriz formada pelos sinais (+) e (-), mostra as diferentes combinações que devem ser feitas entre os níveis de cada fator ( $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ ) para obtenção de uma resposta  $y_i$ .

# do experimento	Variáveis independentes			Variável dependente ou Resposta
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	
1	-	-	-	$y_1$
2	+	-	-	$y_2$
3	-	+	-	$y_3$
4	+	+	-	$y_4$
5	-	-	+	$y_5$
6	+	-	+	$y_6$
7	-	+	+	$y_7$
8	+	+	+	$y_8$

Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de Lundstedt *et al.* (1998) (LUNDSTEDT et al., 1998).

A Tabela 4 é organizada de forma que cada linha representa um experimento e cada experimento consiste em uma combinação única entre os diferentes níveis das variáveis independentes ( $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ ). A coluna mais à direita contém os resultados de cada experimento em termos da resposta observada ( $y_i$ ). Quando organizados desta

forma, estes dados correspondem às matrizes a partir das quais o cálculo dos efeitos (coeficientes da Equação 1) é realizado (LUNDSTEDT et al., 1998; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

O termo  $b_0$  na Equação 1 é um termo independente e corresponde à resposta média do modelo, calculada como uma média aritmética (LUNDSTEDT et al., 1998). O efeito principal que cada fator exerce na resposta é definido como a média da resposta produzida por dado fator em cada nível em que este é combinado com os outros fatores (SILVA; SARAMAGO, 2005). Portanto, os coeficientes  $b_1$ ,  $b_2$  e  $b_3$  podem ser calculados da mesma maneira que  $b_0$ , atribuindo os sinais de cada coluna (variável independente) na resposta para cada experimento (ver Tabela 4) (LUNDSTEDT et al., 1998).

Todos esses cálculos matriciais dos coeficientes dos efeitos principais e de interação, que são utilizados em diferentes tipos de planejamento, são detalhadamente descritos nos trabalhos de Lundstedt *et al.* 1998 e Teófilo e Ferreira, 2006 (LUNDSTEDT et al., 1998; TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Atualmente, todos estes cálculos e a organização do planejamento são realizados em softwares especializados. Apenas as colunas dos sinais dos efeitos principais são mostradas na Tabela 4. O cálculo dos efeitos de interação é feito da mesma forma, para isso, novas colunas devem ser criadas na matriz para cada interação e o sinal de cada célula é o resultado da multiplicação dos sinais dos fatores que estão interagindo (LUNDSTEDT et al., 1998).

O domínio experimental em um planejamento fatorial completo com 3 fatores ( $k = 3$ ) pode ser visualizado em um espaço cartesiano (3D) e, neste caso, deve gerar uma figura cúbica (Figura 9). Dessa forma, o planejamento pode ser interpretado geometricamente, onde cada eixo deve corresponder à uma das variáveis e cada vértice do cubo corresponde a um dos 8 experimentos (LUNDSTEDT et al., 1998).

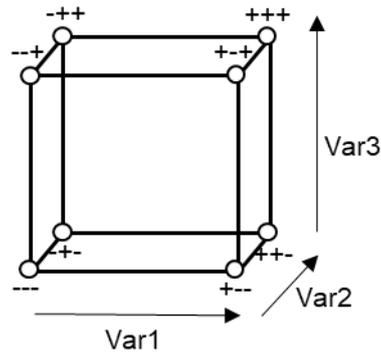


Figura 9. Domínio experimental para um planejamento fatorial  $2^k$ , onde  $k = 3$ .  
 Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de Lundstedt *et al.* (1998) (LUNDSTEDT *et al.*, 1998).

Essa forma permite inspecionar visualmente o domínio experimental e as condições que produziram a melhor resposta, semelhante ao resultado de uma etapa de otimização com geração de uma superfície de resposta (SR).

Segundo Saramago e Silva, tratando-se de um planejamento fatorial de 2 níveis, os fatores podem ser de natureza quantitativa (por exemplo, valores de concentrações específicas de reagentes, diferentes temperaturas para uma reação, entre outros) ou qualitativa (por exemplo, realizar uma reação na presença/ausência de luz, com/sem catalisador, entre outros) (SILVA; SARAMAGO, 2005).

Importante ressaltar que outros fatores conhecidos que podem ou não influenciar, mas que não foram incluídos no planejamento devem ser mantidos constantes ao longo dos experimentos. Isso deve ser feito para garantir que os efeitos que estão sendo observados sejam atribuídos aos fatores que estão sendo estudados com um grau de confiança (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Também deve-se levar em consideração os parâmetros da metodologia experimental que será utilizada para selecionar o planejamento adequado (completo ou fracionário) (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Uma prática comum é a execução de experimentos no ponto central. Repetições do experimento no ponto central permitem avaliar se há falta de ajuste do modelo e ajudam a estimar o erro experimental com uma maior economia de experimentos (LUNDSTEDT *et al.*, 1998). O ponto central do planejamento nada mais é do que um ponto que apresenta valores equidistantes aos níveis superior (+) e inferior (-) de cada fator, ou seja, é central ao domínio experimental (0,0). Uma comparação entre o valor de  $b_0$  e o valor de resposta obtido para um experimento

realizado no ponto central também pode ser utilizada como indicativo da adequação do modelo ao domínio experimental escolhido (LUNDSTEDT et al., 1998). Ao final, a adequação do modelo deve ser validada estatisticamente através de um teste de variância (ANOVA) (LUNDSTEDT et al., 1998). Quando há execução de experimentos no ponto central, o número total de experimentos num planejamento fatorial completo em 2 níveis pode ser descrito pela expressão  $2^k + C_0$ , onde  $C_0$  é o número de réplicas do ponto central e  $k$  é o número de fatores testados (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Um planejamento fatorial nas linhas do que foi descrito até o momento costuma servir como uma etapa de triagem, onde é avaliada a significância dos efeitos (principais e de interação) das variáveis para um intervalo de confiança determinado (por exemplo, 90%, 95%, 99%) através da geração de um gráfico de Pareto. Assim, apenas as variáveis responsáveis pelos efeitos significativos são levadas para uma etapa seguinte de otimização, que envolve ajustes mais finos e requer um número maior de experimentos.

Na etapa de otimização, utiliza-se um modelo de ordem superior (geralmente 2ª ordem), que é capaz de aproximar o comportamento das variáveis nas condições de estudo na forma de uma superfície curva chamada de superfície de resposta (SR) e, portanto, essa etapa costuma ser chamada de metodologia de superfície de resposta (MSR). Este modelo permite calcular as condições ótimas atreladas a obtenção da melhor resposta teórica dentro do domínio experimental. A melhor resposta corresponde a um ponto crítico (máx/mín) da SR e as condições ótimas são os valores de cada fator (coordenadas) atrelados a esse ponto (SILVA; SARAMAGO, 2005).

#### **2.4.2 Metodologia de superfície de resposta com *design* Doehlert**

A melhor resolução do modelo utilizado nessa etapa (MSR) é alcançada às custas de um número maior de experimentos, considerando o mesmo número de fatores que um planejamento completo, por exemplo. Por isso, é desejável levar a esta etapa apenas os fatores mais importantes (SILVA; SARAMAGO, 2005).

Assim como existem diferentes abordagens para o planejamento de triagem (completo ou fracionário), existem diferentes *designs* para a geração de uma SR (fatorial completo de 3 níveis, Box-Behnken, composto central, Doehlert, entre outros). A escolha da MSR deve ser feita de acordo com o sistema que se deseja estudar e

as informações que se deseja extrair dele, uma vez que cada *design* possui suas peculiaridades. (TEÓFILO; FERREIRA, 2006) A geração da SR deste trabalho utiliza uma abordagem chamada de *design* Doehlert ou matriz Doehlert e, portanto, será a única abordagem discutida.

Uma metodologia de otimização com *design* Doehlert deve gerar uma SR que pode ser descrita de forma geral pela Equação 2, onde  $y$  é a resposta,  $b_0$  é uma constante,  $k$  é o número de fatores e  $e$  é o erro aleatório (FERREIRA et al., 2004). Aqui, os coeficientes do polinômio que descreve a superfície são obtidos pelo método de quadrados mínimos (SILVA; SARAMAGO, 2005).

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_j b_{ij} x_i x_j + e \quad (2)$$

O *design* Doehlert de 2 fatores propõe um domínio experimental contido em um círculo. Este *design* proporciona uma certa liberdade de ajustes do domínio experimental (ver Figura 10) apesar de não ser rotacionável como o *design* em estrela ou composto central, por exemplo (FERREIRA et al., 2004). A matriz de um *design* Doehlert para 2 variáveis consiste em um ponto central cercado de 6 pontos equidistantes que formam uma figura hexagonal (ver Figura 10), semelhante ao ponto de convergência em um *design* Simplex (LUNDSTEDT et al., 1998; TEÓFILO; FERREIRA, 2006). A matriz de planejamento para um planejamento com *design* Doehlert para duas variáveis é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5. Matriz de planejamento para um processo de otimização de 2 variáveis (A e B) com *design* Doehlert. A tabela mostra apenas os códigos dos níveis. A variável A é testada em 5 níveis, enquanto a variável B é testada em 3 níveis.

# experimento	Variáveis ou fatores	
	A	B
1	0	0
2	+1	0
3	+0,5	+0,866
4	-1	0
5	-0,5	-0,866
6	0,5	-0,866
7	-0,5	+0,866

Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de Ferreira *et al.* (2004) (FERREIRA et al., 2004).

Nota-se aqui, que os valores dos níveis não são números inteiros como no caso anterior, isso é devido à escolha da distância entre os pontos, ou em outras palavras da geometria da figura formada, uma vez que são atribuídos valores em um eixo cartesiano a partir de um ponto central de coordenadas (0,0). A Figura 10 também ilustra a possibilidade de extensão do domínio experimental proporcionado pelo *design* sem que haja perda dos pontos já estabelecidos, uma das vantagens do *design* Doehlert, conforme mencionado anteriormente. (LUNDSTEDT et al., 1998)

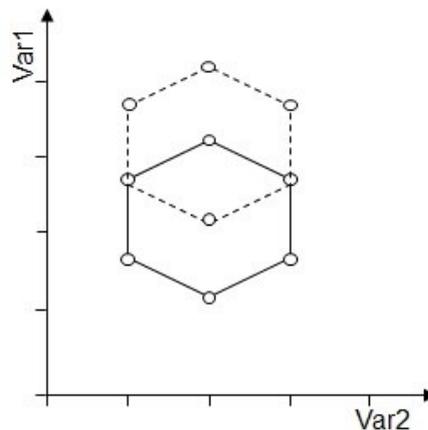


Figura 10. Esquema do domínio experimental em um *design* Doehlert.

Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de Lundstedt *et al.* (1998).

(LUNDSTEDT et al., 1998)

Idealmente, a SR gerada deve apresentar um ponto de máximo ou mínimo dentro do domínio experimental. Este ponto crítico está atrelado às condições experimentais ideais para a geração da melhor resposta, segundo o modelo. A Equação 2 deve corresponder a uma superfície de máximo quando os coeficientes quadráticos forem  $< 0$ , caso fosse uma superfície de mínimo, o contrário seria válido. No caso de um ponto de celda, ter-se-ia uma mistura de sinais + e -. Neste último caso, recomenda-se que o domínio experimental seja revisado (FERREIRA et al., 2004).

A análise da superfície pode ser feita de forma visual ou através dos coeficientes da equação, a partir dos quais é calculado o ponto crítico (máximo/mínimo). Aqui novamente, a aproximação fornecida pelo modelo deve ser validada através de um teste de variância (ANOVA) (LUNDSTEDT et al., 1998; SILVA; SARAMAGO, 2005).

### 2.4.3 Função desejabilidade

Resumidamente, o papel da Desejabilidade ( $D$ ) é de combinar respostas obtidas em escalas diferentes, ou seja, parâmetros diferentes, em uma escala adimensional que varia de 0 – 1, onde um valor de  $D = 1$  corresponde à máxima desejabilidade e  $D = 0$  corresponde à mínima desejabilidade, para dado parâmetro. (JIMIDAR; BOURGUIGNON; MASSART, 1996) Seu uso geralmente envolve a combinação de parâmetros divergentes em metodologias analíticas. (SILVA et al., 2019)

O cálculo de  $D$  é feito a partir das expressões abaixo (Equações 3 e 4), onde primeiro calcula-se um valor de desejabilidade para cada variável dependente ( $d_i$ ), em seguida, a desejabilidade total ( $D$ ) é calculada como a média geométrica das desejabilidades individuais ( $d_i$ ) utilizando a segunda expressão (Equação 4) (JIMIDAR; BOURGUIGNON; MASSART, 1996). As condições expressas na Equação 3 abaixo permitem maximizar a mínima resposta.

$$d_i = \begin{cases} 0, & y_i \leq y_{\min} \\ 1, & y_i \geq y_{\max} \\ \left(\frac{y_{\max} - y_i}{y_{\max} - y_{\min}}\right)^r, & y_{\max} \geq y_i \geq y_{\min} \end{cases} \quad (3)$$

$$D = \sqrt[m]{\prod_{i=1}^m d_i} \quad (4)$$

Na Equação 3, os parâmetros  $y_i$ ,  $y_{\max}$   $y_{\min}$  correspondem às respostas de cada experimento, a resposta máxima e a resposta mínima dentre todos os experimentos, respectivamente.<sup>1</sup> O fator  $r$  corresponde ao peso atribuído para a desejabilidade individual calculada para cada parâmetro ( $d_i$ ) e, matematicamente, alteram o perfil da curva  $d_i$  vs.  $y_i$ . Já na Equação 4,  $m$  representa o número de variáveis dependentes que foram utilizadas para o cálculo da  $D$ .

Conforme é mostrado no trabalho de Jimidar *et al.*, é possível atribuir valores de  $r$  que alteram o formato da função  $d_i$ . O efeito do valor de  $r$  na função  $d_i$  pode ser visualizado na Figura 50 no ANEXO. O valor de  $r$  pode ser escolhido de maneira que

---

<sup>1</sup> Há trabalhos na literatura que defendem que a função desejabilidade deve ser calculada apenas a partir dos valores preditos ( $\hat{y}_i$ ) pelo modelo para cada parâmetro e só então a SR pode ser gerada. Não foi o caso neste trabalho.

se obtenha determinado valor de  $d_i$  a partir de limites impostos nas respostas individuais ( $y_i$ ). Para maiores detalhes, faz-se referência ao trabalho citado. (1996) (JIMIDAR; BOURGUIGNON; MASSART, 1996)

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar ferramentas de DoE para produzir uma nanoemulsão de um óleo vegetal não-volátil estabilizado com lecitina Lipoid® S75 e Pluronic® P123 preparada via técnica de emulsificação espontânea para encapsular Fluconazol e timol e testar a atividade antifúngica do sistema contra cepas de *Candida spp.*

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar a fase carreadora da NE a partir de um teste de solubilidade do FCZ em óleo de girassol (OG), óleo de semente-de-uva (OSU) e óleo de rícino (OR);
- Avaliar o impacto das diferentes concentrações dos surfactantes e diferentes massas do óleo selecionado nos parâmetros de estabilidade das NEs produzidas através de um planejamento fatorial completo e definir as condições para uma etapa de otimização;
- Realizar uma etapa de otimização (MSR) para definir uma formulação otimizada contendo o fármaco (NEF) e posteriormente incorporar o timol para formar o sistema final (NEFT);
- Caracterizar as NEs com ativo (NEF e NEFT) e sem ativo (NEOX) em termos do diâmetro médio de partículas (*z-average*), PDI e potencial zeta e avaliar o efeito da incorporação dos ativos;
- Realizar um acompanhamento da estabilidade em termos dos tamanhos, PDI e potencial zeta por um período de 60 dias;
- Desenvolver e validar uma metodologia de HPLC para a quantificação simultânea dos ativos (FCZ e timol) durante os ensaios de liberação e para determinar a EE% da formulação final (NEFT).
- Realizar ensaios de liberação da formulação final em pH 5,4 e pH 7,4 e testar diferentes modelos para elucidar o mecanismo de liberação dos ativos a partir das formulações;

- Testar a atividade antifúngica da formulação final contra cepas de *Candida spp.* e obter um valor de MIC para os ativos nas formulações.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

Para a produção das NEs foi utilizado Fluconazol (FCZ) em seu estado puro (99%) adquirido na farmácia Magistrale (Florianópolis). Os óleos vegetais: óleo de rícino (OR), óleo de girassol (OG) e o óleo de semente-de-uva (OSU) utilizados foram adquiridos na farmácia Similibus (Florianópolis), sem caracterização adicional. O copolímero do tipo Pluronic® P123 e o Timol ( $\geq 98,5\%$ ) foram adquiridos da Sigma Aldrich (Estados Unidos) e o emulsificante lecitina de soja S75 com composição de fosfolípidios de pelo menos 70% fosfatidilcolina (PC) foi adquirido da Lipoid GmbH (Alemanha). MeOH grau HPLC foi adquirido da Supelco (Sigma Aldrich). As soluções de P123 foram preparadas nas concentrações determinadas em água ultrapura (resistividade inferior à 18 M $\Omega$ cm à 25 °C) para os planejamentos (ambas etapas) e em água filtrada em um sistema de osmose reversa para as formulações finais. As soluções de lecitina foram preparadas nas concentrações determinadas em acetona de grau analítico da marca Dinâmica. Todos os demais reagentes não especificados foram utilizados sem purificação adicional e são de grau analítico ou grau HPLC, quando necessário.

Conforme indicado na parte da Revisão Bibliográfica (item 2), com exceção do FCZ, todos os reagentes utilizados na produção das NEs possuem *status GRAS* (*Generally Recognized As Safe*) concedido pela agência de vigilância norte-americana, a FDA (*Food and Drug Administration*). Este *status* é concedido a substâncias que são comumente utilizadas como aditivos alimentares ou aditivos em formulações enterais e farmacêuticas (MARCHESE et al., 2016) e geralmente é visto como um ponto positivo a ser destacado, uma vez que são consideradas seguras para consumo e dispensam testes adicionais de compatibilidade, agilizando o processo de desenvolvimento de novas formulações.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Teste de solubilidade

Foi realizado um teste de solubilidade para o FCZ em 3 óleos vegetais comumente utilizados em formulações semelhantes à desenvolvida neste estudo. Os óleos testados foram o óleo de girassol (OG), o óleo de semente-de-uva (OSU) e o óleo de rícino (OR). Também foram realizados testes de solubilidade do FCZ e do timol em água. Todos os testes avaliaram a solubilidade do fármaco e do timol à temperatura ambiente (~25°C).

A metodologia utilizada foi o método *shake-flask* descrito por (SHAH et al., 2009; VLAIA et al., 2021) com algumas modificações e a quantificação foi realizada com a metodologia de HPLC descrita no item 4.2.8. Primeiramente, um volume de aproximadamente 15 mL de cada óleo foi saturado com um excesso de FCZ (> 100 mg). Os erlenmeyers contendo os óleos saturados foram mantidos sob agitação em um *shaker* da marca Novatécnica disponibilizado pelo Laboratório de Controle de Qualidade do departamento de Farmácia do CCS/UFSC à 25°C por 48h. Após o contato, os óleos contendo o fármaco foram centrifugados a 3000 rpm por 15min e os sobrenadantes foram coletados e filtrados com um filtro de seringa com membrana porosa (0,45 µm) de Nylon. Em seguida, o FCZ foi extraído da fase oleosa com MeOH para os OG e OSU e com uma mistura MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) para o OR. Para isso, as misturas foram agitadas em um agitador vórtex QL-901 (Biomixer) durante 1-2 min pelo menos 3 vezes e, em seguida, centrifugados em uma microcentrífuga a 14 000 rpm por 20 min. Os sobrenadantes foram coletados e filtrados em filtro de membrana porosa (0,45 µm) de PTFE e quantificados de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.8.

Os testes de solubilidade em água foram da mesma forma e os sobrenadantes foram filtrados em filtros de membrana porosa de acetato de celulose. A quantificação também foi realizada por HPLC com a metodologia descrita no item 4.2.8.

#### **4.2.2 Preparo das nanoemulsões**

As NEs foram preparadas pela técnica de emulsificação espontânea segundo método desenvolvido por Saatkamp (SAATKAMP, 2019) com algumas modificações baseadas nos trabalhos de referência de Bouchemal *et al.* (2004) e Li *et al.* (2017). (BOUCHEMAL et al., 2004; LI et al., 2017)

A adição da fase orgânica na fase aquosa foi realizada por gotejamento. Para isso, foram utilizadas seringas descartáveis de 40 mL com bico centralizado, sem

embolo (gotejamento à pressão ambiente) e agulhas descartáveis de diâmetro interno de 0,8 mm ou 21G. O sistema é simples e é ilustrado no esquema abaixo (Figura 11).

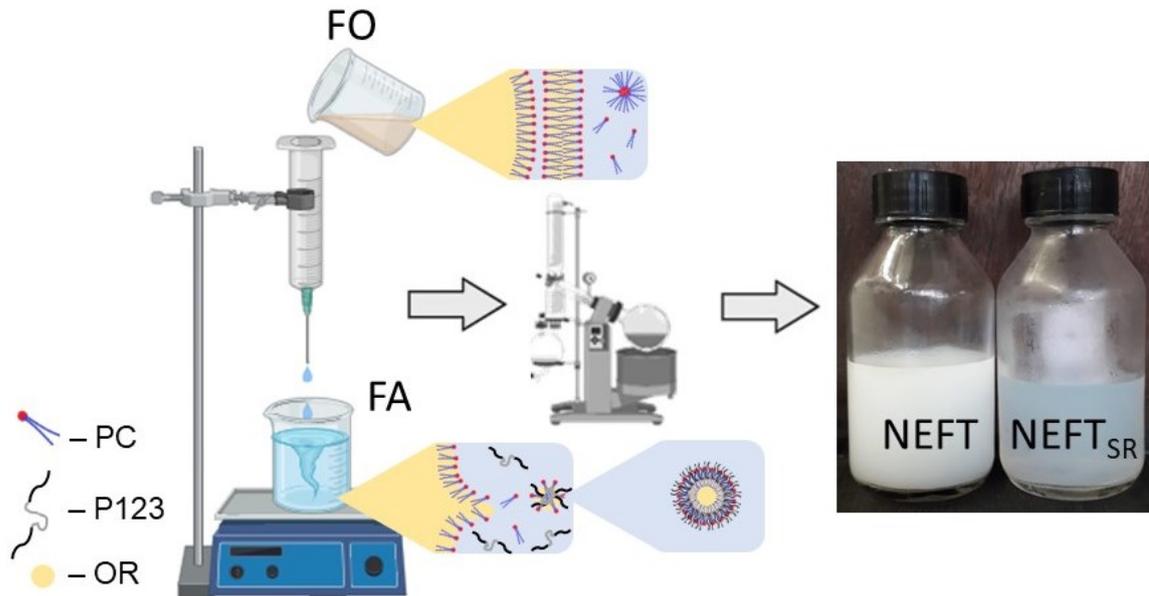


Figura 11. Esquema de gotejamento e o processo de preparo das nanoemulsões.  
 Fonte: Elaborado pelo autor. Criado com Biorender.com. Adaptado de Chang *et al.* (2013) e Rai *et al.* (2018) (CHANG; MCLANDBOROUGH; MCCLEMENTS, 2013; RAI *et al.*, 2018).

Inicialmente, foram preparadas as soluções dos surfactantes nas concentrações determinadas (ver Tabela 6 no item 4.2.3.1). Uma solução de Lecitina em acetona, denominada de fase orgânica ou fase oleosa (FO), pois é utilizada para solubilizar o óleo ou a fase dispersa e o surfactante lipofílico. Outra solução de P123 em água ultrapura, denominada a fase aquosa (FA), onde a FO é gotejada. Em seguida, pesa-se a massa de óleo em um béquer, contendo ou não uma massa de fármaco e/ou timol (não necessariamente solubilizada no óleo). Essa massa de óleo é solubilizada em 20 mL da FO até sua completa dissolução. Finalmente, a FO é adicionada na seringa, conforme orientado no esquema da figura acima, dando início ao gotejamento.

A FO é gotejada em 40 mL da FA, sob agitação magnética constante, que é mantida durante o gotejamento e dura aproximadamente 5 minutos, numa taxa média de ~4 mL/min sob temperatura e pressão ambiente. A agitação magnética deve ser mantida por mais 15 minutos após o término do gotejamento (SAATKAMP, 2019).

Passados esses 15 minutos de agitação, a mistura resultante é levada ao rotaevaporador à uma temperatura de 45 °C por mais 5-10 min, para remover o máximo de acetona da NE final. A NE resultante é avolumada para 40 mL com água filtrada em filtro de osmose reversa em uma proveta e transferida para um frasco com tampa, que é armazenado a 4 °C. As análises de espalhamento de luz são realizadas no dia seguinte ao preparo.

### 4.2.3 Planejamento experimental

A escolha dos reagentes e da técnica de preparo das NEs foi feita a partir do sistema desenvolvido por Saatkamp (2019) (SAATKAMP, 2019) com algumas modificações, e a partir de dados da literatura para sistemas semelhantes (BOUCHEMAL et al., 2004; LI et al., 2017). As modificações foram realizadas com a finalidade de viabilizar a NE produzida para aplicação em pele e encapsular o FCZ e o timol.

Um planejamento fatorial completo do tipo  $2^3$  foi realizado para definir as condições de uma formulação base (NEOX) que pudesse ser levada à uma etapa de otimização com uma MSR, onde seria incorporado o FCZ e posteriormente o timol.

Como respostas, foram selecionados parâmetros de fácil medida que refletissem a estabilidade do sistema formado. Os parâmetros escolhidos foram o tamanho média das partículas (*z-average*), o índice de polidispersidade ou PDI (do inglês *Polidispersity Index*) e o potencial zeta (FERNANDES et al., 2020; GURPREET; SINGH, 2018; MCCLEMENTS; JAFARI, 2018a; SINGH et al., 2017). As três respostas selecionadas foram combinadas através do conceito de função desejabilidade (*D*) de Derringer, que foi utilizada como a única variável dependente durante o planejamento (JIMIDAR; BOURGUIGNON; MASSART, 1996).

Os códigos e valores das variáveis independentes selecionadas em cada etapa do planejamento serão descritas nos seus respectivos itens a seguir.

#### 4.2.3.1 Planejamento fatorial $2^3 + 3$

Nesta etapa, foram selecionadas como as variáveis independentes a concentração de lecitina (A), a concentração de P123 (B) e a massa de OR. Os

códigos e os valores dos limites superior (+) e inferior (-) de cada fator são apresentados na Tabela 6 (SAATKAMP, 2019). A matriz de planejamento completa desta etapa é apresentada e discutida na seção dos resultados (5).

Tabela 6. Variáveis independentes selecionadas para a primeira etapa do planejamento (fatorial completo), os códigos dos níveis e seus respectivos valores.

Variáveis independentes	Códigos e seus respectivos valores		
	-1	0	+1
(A) [Lecitina] / g L <sup>-1</sup>	0,1	0,35	0,6
(B) [P123] / g L <sup>-1</sup>	1,0	2,0	3,0
(C) massa de OR / mg	200	400	600

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.2.3.1.1 Desejabilidade para o Planejamento Fatorial

O perfil da função da desejabilidade individual ( $d_i$ ) foi modificado alterando-se os valores do fator  $r$  na Equação 3 para cada uma das variáveis dependentes ( $size$ , PDI e zeta). O peso de cada variável foi determinado de modo que uma  $d_i \geq 0,5$  fosse atribuída para as respostas com valores menores ou iguais aos limites impostos, dessa maneira, maximizou-se a mínima resposta para todas as variáveis.

O perfil dos gráficos de  $d_i$  vs. resposta e os valores correspondentes do fator  $r$  para cada variável da etapa de triagem podem ser verificados item B do APÊNDICE. Para fins de esclarecimento, foram utilizados os valores das respostas obtidas experimentalmente ( $y_i$ ) para o cálculo de  $D$  nessa etapa.

#### 4.2.3.2 Geração da superfície de resposta com design Doehlert

Nesta segunda etapa foi feita a incorporação do FCZ no sistema para a produção das NEs contendo o FCZ, denominadas NEFs. Foram utilizadas como variáveis independentes para a geração da SR, a massa de FCZ (A) e a massa de OR (B). Os códigos de cada variável e seus respectivos valores para esta etapa do planejamento são apresentados na Tabela 7. A matriz de planejamento completa utilizada nesta etapa é apresentada e discutida na seção dos resultados (3).

Tabela 7. Variáveis independentes selecionadas para a MSR, os códigos dos níveis e seus respectivos valores.

Variáveis	Códigos e seus respectivos valores						
	-1	-0,866	-0,5	0	+0,5	+0,866	+1
(A) massa de FCZ / mg	0	-	50	100	150	-	200
(B) massa de OR / mg	-	100	-	200	-	300	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.2.3.2.1 Desejabilidade para a Metodologia de Superfície de Resposta

Os valores do fator  $r$  nesta etapa foram calculados partindo do mesmo princípio da etapa anterior, isto é, atribui-se valores de  $r$  de modo a se obter uma  $d_i \geq 0,5$  para tamanhos  $< 200$  nm, valores de PDI  $< 0,3$  e potencial zeta  $< -30$  mV. O perfil dos gráficos de  $d_i$  vs. resposta e os valores correspondentes do fator  $r$  para cada variável dessa etapa (MSR) podem ser verificados no item B do APÊNDICE. Para fins de esclarecimento, foram utilizados os valores das respostas obtidas experimentalmente ( $y_i$ ) para o cálculo de  $D$  nessa etapa também.

#### 4.2.4 Espalhamento de luz

As análises de tamanho médio de partículas, índice de polidispersidade (PDI do inglês *polydispersity index*) e potencial zeta foram realizadas via espalhamento de luz dinâmico ou DLS (do inglês *Dynamic Light Scattering*) em um Zetasizer Nano ZS da Malvern (Reino Unido). As medidas de DLS são realizadas com um laser de 633 nm e um detector fixo localizado a  $173^\circ$  (*backscattering*) do feixe incidente. Todas as análises de DLS foram realizadas à temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ).

##### 4.2.4.1 Tamanho médio de partículas (z-average) e PDI

O valor do tamanho médio das partículas é calculado como o *z-average* (média ponderada pela intensidade do espalhamento), obtido pelo método dos cumulantes e são reportados como a média de 3 – 5 medidas, onde cada medida consiste de 10 leituras de correlação da variação de intensidade detectada para a amostra ao longo de um período de 10 segundos. Todos os resultados são calculados pelo software do fabricante (Malvern).

Para o preparo das amostras, as NEs produzidas foram diluídas 30x em água filtrada em filtro de osmose reversa e transferidas para a cubeta (DTS1070) sem serem filtradas. Optou-se por não filtrar as amostras previamente às análises para avaliar a qualidade (PDI) da dispersão formada pela técnica utilizada (emulsificação espontânea).

#### 4.2.4.2 Potencial zeta

O potencial zeta ( $\zeta$ ) é obtido a partir de medidas da mobilidade eletroforética ( $U_E$ ) da amostra, que é convertida no potencial zeta com a equação de Henry (Equação 5) utilizando a aproximação de Smoluchowski para  $f(Ka)$ , onde  $f(Ka) = 1,5$ .  $\epsilon$  é a constante dielétrica e  $\eta$  é a viscosidade do meio.

$$U_E = \frac{2\epsilon\zeta f(Ka)}{3\eta} \quad (5)$$

Os dados de potencial zeta são reportados como a média de 3 medidas, onde cada medida consiste de 20 leituras de mobilidade obtidas pela técnica de LDV (do inglês *Laser Doppler Velocimetry*) com um detector fixo localizado a 17° do feixe incidente. As medidas são realizadas sob um potencial elétrico (~150 V) aplicado durante um período de 3 segundos. As análises de potencial zeta são realizadas em seguida das medidas de tamanho nas mesmas cubetas (DTS 1070) e, portanto, o preparo das amostras é o mesmo do item anterior (item 4.2.4.1). Não houve ajuste de pH nem da concentração salina das amostras previamente às medidas. Para fins de conferência, foram realizadas medidas de pH para cada formulação durante o planejamento fatorial (ver Tabela 14). Adicionalmente, o pH das formulações finais (NEOR, NEF, NEFT, NET) também é informado junto às medidas de potencial zeta reportadas no item 5.3.

#### 4.2.5 Calorimetria diferencial exploratória

Foram realizadas análises de calorimetria diferencial exploratória para fins de caracterização térmica dos reagentes em um calorímetro Q20 da TA Instruments (Estados Unidos). As rampas de temperatura foram feitas de 0 – 200 °C numa taxa de

aquecimento de 10 °C/min para todos os reagentes utilizados nas formulações, com exceção da água.

#### 4.2.6 Estabilidade

A estabilidade das NEs finais foi acompanhada através de medidas do tamanho médio de partículas (*z-average*), PDI e potencial zeta ao longo de um período de 60 dias. As amostras foram armazenadas à 4°C e ambientadas (~25°C) previamente às análises de DLS.

#### 4.2.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As análises de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foram realizadas em um equipamento JEM-1011 operando sob uma tensão de 80 ou 100 kV, disponibilizado pelo Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) localizado na UFSC.

Para o preparo das amostras, foram depositados 10 µL de amostra em *grids* de cobre (200 *mesh*) revestidos com material polimérico (FORMVAR®) e o excesso de amostra foi removido com papel filtro. Os *grids* foram secos à temperatura ambiente por cerca de 24h previamente às análises. As amostras foram preparadas a partir das mesmas diluições realizadas para as análises de DLS (ver item 4.2.4.1) e não foram filtradas previamente às análises de TEM. As amostras (NEOR<sub>SR</sub> e NEFT<sub>SR</sub>) foram preparadas sem diluição.

#### 4.2.8 Validação da metodologia de HPLC

##### 4.2.8.1 Parâmetros cromatográficos

As quantificações por HPLC foram realizadas em um cromatógrafo da marca Agilent Technologies (Estados Unidos) modelo 1200 com detecção em 210 nm (PDA). Como fase estacionária foi utilizada uma Coluna da marca Agilent modelo Zorbax Eclipse Plus C18 de dimensões 4.6x100 mm com partículas de 3.5 µm de diâmetro. A coluna foi ambientada em um forno à uma temperatura de 30°C. Como fase móvel

foi utilizada uma mistura de H<sub>2</sub>O:MeOH (40:60) e a eluição ocorreu em modo isocrático num fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup> durante 9,5 min.

De acordo com Ribani *et al.* (2004), a validação realizada consiste em uma forma simplificada de validação que avalia apenas parâmetros como: seletividade, linearidade, precisão/exatidão, limite de detecção/quantificação num âmbito que serve apenas para este estudo e é chamada pelo autor de *validação no laboratório* (RIBANI *et al.*, 2004). A validação da metodologia foi realizada de acordo com a normas propostas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017) e os parâmetros de validação são apresentados abaixo:

#### 4.2.8.2 *Seletividade*

A seletividade avalia a capacidade do método proposto de identificar/quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de outras espécies como outros ativos, excipientes, impurezas e produtos de degradação e garante que o pico seja exclusivamente do ativo de interesse (RIBANI *et al.*, 2004).

Nesse caso, a seletividade do método proposto foi avaliada comparando-se os cromatogramas dos meios de liberação sem adição de nenhum ativo e cromatogramas dos mesmos meios contendo quantidades conhecidas dos ativos. Nesse caso, a avaliação da seletividade é feita visualmente (RIBANI *et al.*, 2004).

#### 4.2.8.3 *Linearidade*

A linearidade avalia a capacidade do método de fornecer uma relação diretamente proporcional entre o sinal obtido e a concentração do analito de interesse dentro da faixa estudada. Para isso, deve ser preparada uma curva de calibração contendo pelo menos cinco concentrações diferentes (ARAUJO *et al.*, 2021; RIBANI *et al.*, 2004). As concentrações utilizadas nas curvas de calibração foram de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 ppm, para ambos analitos (FCZ e timol) e foram preparadas juntas (mesma amostra) em água e quantificados simultaneamente.

#### 4.2.8.4 *Precisão e Exatidão*

A precisão avalia a dispersão dos dados entre ensaios independentes para uma mesma amostra, sob as mesmas condições. A exatidão avalia o grau de concordância entre resultados individuais obtidos pelo método proposto e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI et al., 2004).

A precisão foi avaliada em termos da repetibilidade. Para isso, foram analisadas amostras com três concentrações diferentes (baixa, média e alta) compreendendo o intervalo de concentração estudado, também preparadas em água. As amostras foram preparadas independentemente e em triplicata, totalizando nove leituras. A partir das medidas foi calculado o desvio padrão relativo (DPR) para cada concentração. O cálculo do DPR foi realizado com a Equação 6 mostrada abaixo, onde  $s$  é o desvio padrão amostral e  $\bar{x}$  é a média de três medidas.

$$DPR = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \quad (6)$$

Todos os ensaios foram realizados nas mesmas condições, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento e em dias diferentes.

Similarmente, a exatidão foi avaliada comparando-se o erro relativo (ER%) obtido em nove leituras de amostras nas mesmas três concentrações (baixa, média e alta) que compreendem o intervalo de concentração estudado, também preparadas em água. Para isso, o ER% é calculado pela Equação 7, onde o valor de concentração obtido para as amostras ( $C_{experimental}$ ) foi comparado com as concentrações teóricas para as amostras ( $C_{teórica}$ ).

$$ER\% = \frac{(C_{observada} - C_{experimental})}{C_{experimental}} \times 100\% \quad (7)$$

#### 4.2.8.5 LOD/LOQ

O limite de detecção (LOD) corresponde à menor concentração de analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada utilizando o método proposto (RIBANI et al., 2004). O limite de detecção corresponde à menor concentração de analito que pode ser quantificada utilizando o método proposto.

Os limites de detecção e quantificação podem determinados estatisticamente a partir dos parâmetros das curvas de calibração para os dois analitos de acordo com as equações abaixo (Equações 8 e 9).

LOD:

$$LOD = 3,3 \times \frac{DP \text{ do coef.linear}}{coef.angular} \quad (8)$$

LOQ:

$$LOQ = 10 \times \frac{DP \text{ do coef.linear}}{coef.angular} \quad (9)$$

#### 4.2.9 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi realizada de forma indireta e a quantificação foi feita pela técnica de HPLC com a metodologia descrito no item 4.2.8 (LI et al., 2017; SAATKAMP et al., 2023).

Primeiramente, uma amostra da NE (~4 mL) foi centrifugada à 7000 rpm por 20min em um tubo de centrífuga com um filtro com corte de massa molar de 3,0 kDa da marca Sartorius (Alemanha). Em seguida, o sobrenadante foi coletado, diluído 21x e filtrado em um filtro de seringa de acetato de celulose (0,45 µm) antes de ser injetado no cromatógrafo. A quantidade de ativo detectada é entendida como a quantidade de fármaco livre ou não-encapsulado na formulação. A equação para a determinação da EE% é mostrada abaixo (Equação 10).

$$EE\% = \frac{(massa \text{ de ativo}_{total \text{ na formulação}}) - (massa \text{ de ativo}_{sobrenadante})}{(massa \text{ de ativo}_{total \text{ na formulação}})} \times 100 \quad (10)$$

#### 4.2.10 Ensaios de liberação

Os testes de liberação *in vitro* foram realizados em tampão fosfato nos pHs 5,4 (±0,1) e 7,4 (±0,1) com a finalidade de avaliar a taxa de liberação do fármaco num meio que simulasse as condições de pH da pele saudável (levemente ácido, pH 5,4 ± 0,1) e da pele infectada (aprox. neutro ou levemente alcalino, pH 7,4 ± 0,1) (RIPPKKE; BERARDESCA; WEBER, 2018). Foi adicionado 0,1% (m/v) de Tween 80 ao meio com

a finalidade de manter a condição *sink* do meio de dissolução (JUNIOR, 2020). A liberação foi realizada em um banho Dubnoff em uma temperatura de 37 °C ( $\pm 1$  °C).

Para isso, 5 mL das soluções de FCZ e timol (1000 ppm) e 5 mL de cada NE (NEF e NEFT) foram transferidos para membranas de diálise com corte de massa molar de 3,5 kDa. As membranas foram colocadas em béqueres contendo 200 mL do meio de liberação. Alíquotas de 1 mL foram coletadas nos tempos determinados de 10, 20, 30, 45, 60, 120, 240, 480 e 720, 1440, 2880 minutos e o volume coletado foi repostado para manter o volume constante do meio e a condição *sink*.

As alíquotas coletadas foram transferidas diretamente aos frascos (*vials*) de HPLC e quantificadas conforme a metodologia descrita no item 4.2.8. O meio de liberação foi filtrado com um filtro de membrana porosa de acetato de celulose (0,45  $\mu$ m) da marca Sartorius, previamente à liberação.

Foram testados quatro modelos de liberação com os dados obtidos, o modelo de liberação de ordem zero, de primeira ordem, de Higuchi e Kosmeyer-Peppas. A liberação descrita pelo modelo de ordem zero pode ser representada pela Equação 11.

$$Q_t = Q_0 + k_0 t \quad (11)$$

onde  $Q_t$  é a quantidade de ativo liberado no tempo  $t$ ,  $Q_0$  é a quantidade inicial de ativo liberado na solução (geralmente 0),  $k_0$  é a constante de liberação de ordem zero e  $t$  é o tempo (CONEAC et al., 2015; DASH et al., 2010).

O modelo de primeira ordem pode ser representado pela Equação 12.

$$\ln(1 - C/C_0) = -k_1 t \quad (12)$$

onde  $C_0$  é a concentração inicial de ativo,  $C$  é a concentração no tempo  $t$ ,  $k_1$  é a constante de liberação de primeira ordem e  $t$  é o tempo (CONEAC et al., 2015; DASH et al., 2010).

O modelo de Higuchi simplificado pode ser representado pela Equação 13.

$$Q = k_H t^{1/2} \quad (13)$$

onde  $Q$  é a porcentagem cumulativa de ativo liberado no tempo  $t$ ,  $k_H$  é a constante de liberação ou dissolução de Higuchi e  $t$  é o tempo (CONEAC et al., 2015; DASH et al., 2010).

E finalmente, o modelo de Kosmeyer-Peppas pode ser representado pela Equação 14.

$$M_t/M_\infty = k_{KP}t^n \quad (14)$$

onde  $M_t/M_\infty$  é a fração de ativo liberado no tempo  $t$ ,  $k_{KP}$  é a constante de liberação do modelo,  $n$  é o coeficiente de liberação que corresponde ao mecanismo de liberação proposto pelo modelo e  $t$  é o tempo (CONEAC et al., 2015; DASH et al., 2010).

#### **4.2.11 Testes de inibição em cepas de *C. albicans***

A atividade antifúngica das formulações finais (NEF, NEFT e NET) foi avaliada pelo método de microdiluição contra três cepas de *Candida spp.*.

##### **4.2.11.1 Reativação das cepas e preparo do inóculo**

Foram empregadas cepas dos fungos *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida glabrata* (CGMT29). As culturas foram ativadas em Caldo Sabouraud-dextrose e incubadas durante 48 h a 35 °C. A concentração do inóculo foi então ajustada com salina estéril (solução 0,9% NaCl), tendo como base o tubo 0,5 da escala de McFarland, equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Em seguida, a suspensão foi diluída com salina estéril até uma concentração aproximada de  $1,5 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>, a qual foi empregada nos ensaios posteriores.

##### **4.2.11.2 Ensaio de microdiluição**

Para determinação da concentração inibitória mínima ou MIC (do inglês *Minimum inhibitory concentration*) foram preparadas diluições seriadas das amostras, nos próprios poços da placa de microdiluição, nas concentrações equivalentes a 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,6 e 7,8 ppm de timol e/ou fluconazol, em duplicata,

empregando salina estéril como diluente. Para a realização do ensaio adicionou-se, a cada poço da microplaca, 100  $\mu\text{L}$  de cada diluição, 80  $\mu\text{L}$  de Caldo Sabouraud-dextrose e 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de cada MO. Controles de esterilidade do meio de cultivo e do diluente foram conduzidos em cada ensaio, assim como controles de crescimento dos fungos e de ausência de contaminação nas amostras. As microplacas foram incubadas por 48 h a 35 °C e o crescimento evidenciado através de turvação e pela adição de 20  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio a 0,5% (m/v) com incubação adicional de 2 h, à mesma temperatura. Poços com crescimento celular adquirem a coloração rosa, enquanto que os poços sem crescimento permanecem incolores. A MIC foi determinada como a menor concentração da diluição da amostra que inibiu o crescimento do MO.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE HPLC

Primeiramente foi realizada uma varredura dos espectros de UV-Vis dos compostos. O FCZ e o timol apresentaram  $\lambda_{m\acute{a}x}$  em 261 nm e 274 nm, respectivamente, no entanto, a quantificação simultânea se mostrou melhor em 210 nm e, portanto, foi realizada em 210 nm.

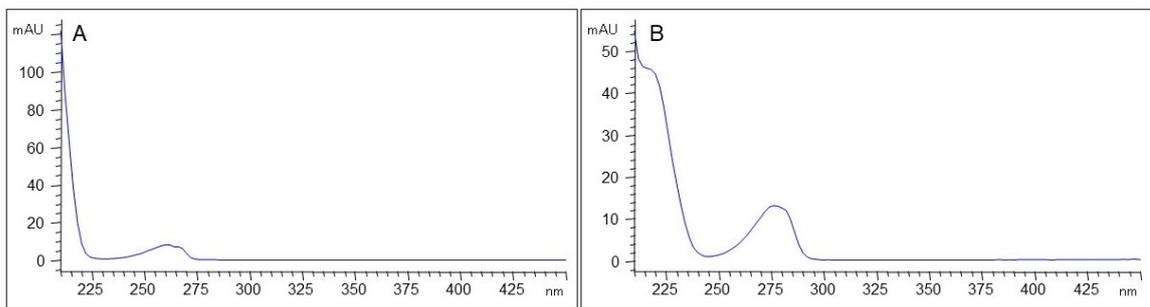


Figura 12. Espectros no UV-Vis do Fluconazol (A) e do timol (B).

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 5.1.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada comparando-se os cromatogramas dos meios de liberação sem nenhum analito (Figura 13) e de cromatogramas com uma concentração conhecida de ambos analitos (Figura 14) juntos e isolados. Nenhum dos sinais presentes nos cromatogramas dos meios de liberação interferiu na identificação e quantificação dos sinais dos analitos.

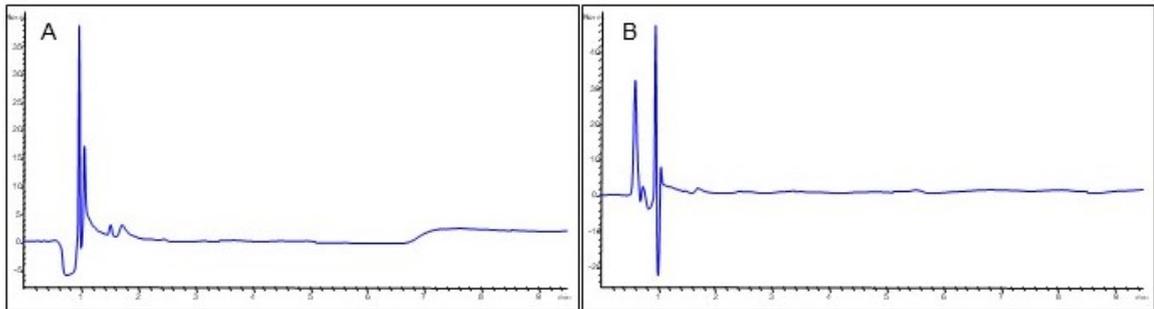


Figura 13. Cromatogramas de um branco dos meios de liberação, pH 5,4 (A) e 7,4 (B).

Fonte: Elaborado pelo autor.



A quantidade de amostra injetada é muito pequena (10  $\mu$ L), a concentração de tween 80 nos meios de liberação também é baixa (0,1%; m/m) e tendo em vista a similaridade dos cromatogramas da Figura 15 e a finalidade da validação (laboratorial), isto é, exclusivamente de uso para este projeto, decidiu-se que não se faria necessário preparar uma curva para cada meio de liberação. Portanto, as curvas para cada analito (FCZ e timol) foram preparadas concomitantemente (mesmas amostras) em água e os parâmetros de Precisão e Exatidão foram avaliados a partir das concentrações baixa, média e alta dos analitos, também em água. Não houve dificuldade de identificação de picos nos cromatogramas para nenhum dos analitos (ver Figura 14).

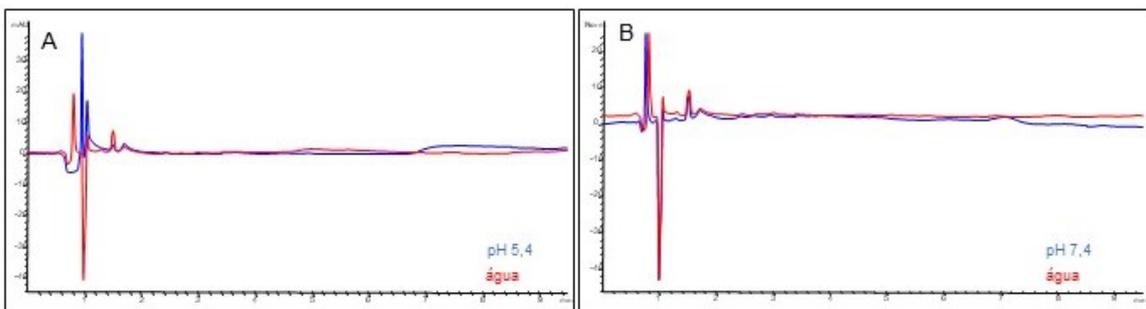


Figura 15. Cromatogramas sobrepostos dos brancos dos meios de liberação e de injeções de água.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.1.2 Linearidade

A aferição da linearidade foi realizada visualmente e através dos valores dos coeficientes de correlação ( $r$  de Pearson) obtidos a partir das curvas de calibração para o FCZ e para o timol (ver Figura 16 e Figura 17) (RIBANI et al., 2004).

Ambas curvas foram preparadas na mesma faixa de concentração (5, 10, 20, 30, 40 e 50 ppm) e os analitos foram quantificados simultaneamente.

Idealmente, um coeficiente de correlação de pelo menos 0,999 garante a correlação linear entre os dados de concentração e sinal obtido. (RIBANI et al., 2004) Valores de pelo menos 0,99 (ANVISA) ou 0,90 (INMETRO) também são aceitos (RIBANI et al., 2004).

Ambos analitos apresentam coeficiente de correlação superiores à 0,999 e, portanto, foram considerados adequados para garantir a linearidade do método (ver Figura 16 e Figura 17).

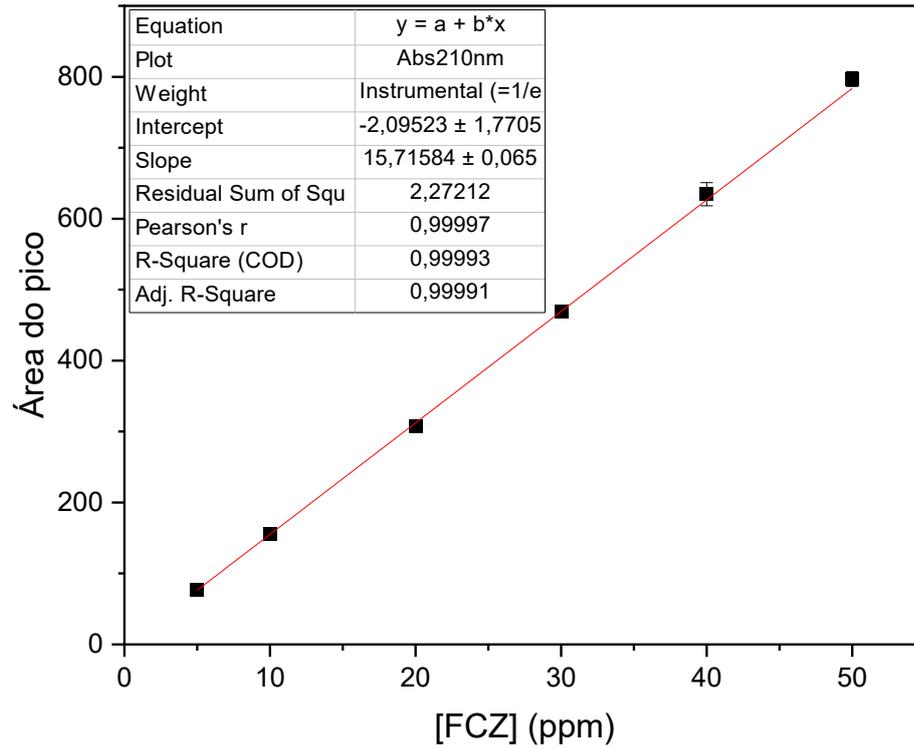


Figura 16. Curva de calibração para o FCZ. (n=3)  
Os parâmetros da curva foram calculados no software OriginPro (2021).  
Fonte: Elaborado pelo autor.

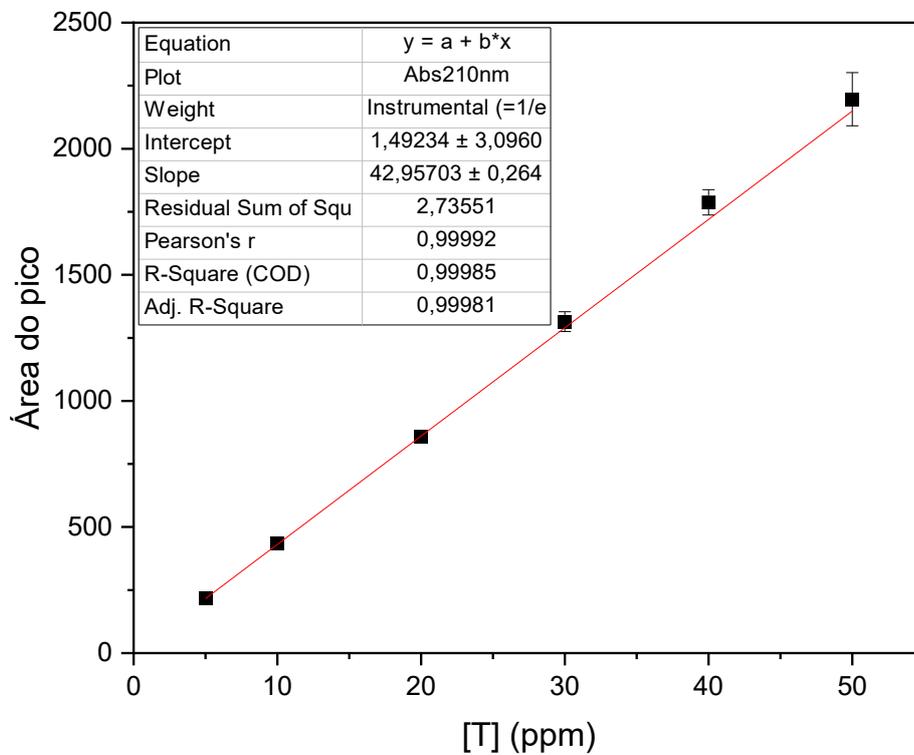


Figura 17. Curva de calibração para o timol.  
Os parâmetros da curva foram calculados no software OriginPro (2021).  
Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.1.3 Precisão/Exatidão

A precisão foi avaliada em termos dos DPR que foram calculados conforme indicado no item 4.2.8.4. Abaixo são mostradas as médias ( $\bar{x}$ ), os desvios ( $s$ ) e o DPR para o FCZ (Tabela 8) e para o timol (Tabela 9) em termos da área do pico e do tempo de retenção ( $R_t$ ) observado nos cromatogramas.

Tabela 8. Parâmetros calculados para avaliar a precisão do método proposto para quantificação do FCZ.

[FCZ] / ppm	$\bar{x}$ (área do pico)	DP (área do pico)	$\bar{x}$ ( $R_t$ )	DP ( $R_t$ )	DPR% (área do pico)	DPR% ( $R_t$ )
10	155,1	2,24	1,324	0,0104	1,4	0,8
30	468,9	0,86	1,326	0,0096	0,2	0,7
50	796,8	10,38	1,327	0,0087	1,3	0,7

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 9. Parâmetros calculados para avaliar a precisão do método proposto para quantificação do timol.

[Timol] / ppm	$\bar{x}$ (área do pico)	DP (área do pico)	$\bar{x}$ ( $R_t$ )	DP ( $R_t$ )	DPR% (área do pico)	DPR% ( $R_t$ )
10	435,6	6,132	12,72	0,1110	2,9	1,8
30	1314,4	6,151	39,13	0,0964	3,0	1,6
50	2196,6	6,171	105,56	0,0945	4,8	1,5

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em termos das áreas de pico, os DPRs calculados para o FCZ apresentaram valores inferiores a 1,5%. Para o timol, os DPRs calculados apresentaram valores maiores entre 2,9% – 4,9%. As normas vigentes da ANVISA (RDC nº166, 2017) indicam que os critérios de aceitação devem ser estabelecidos de acordo com alguns aspectos como o objetivo do método e sua variabilidade intrínseca, a concentração de trabalho e concentração do analito na amostra, sem especificar valores. A resolução antiga (RDC nº899, 2003) indica que os valores de DPR não devem exceder 5%. Considerando isso, a precisão do método proposto foi aceita em termos do DPR e as quantificações realizadas para os testes de solubilidade e EE% de ambos ativos empregaram diluições que resultassem em concentrações na faixa dos 20 – 30 ppm (meio da curva), onde o DPR é o mais baixo (para o FCZ) e intermediário para o timol.

Da mesma forma, foi avaliada a exatidão do método proposto, onde foram realizadas 9 leituras nas mesmas três concentrações e os parâmetros foram calculados conforme indicado no item 4.2.8.4. Abaixo são mostradas as

concentrações teóricas ( $C_{teórica}$ ) e observadas experimentalmente ( $C_{experimental}$ ), os desvios ( $s$ ) e o erro relativo (ER%) para o FCZ (Tabela 10) e para o timol (Tabela 11).

Tabela 10. Parâmetros calculados para avaliar a exatidão do método proposto para quantificação do FCZ.

$C_{teórica}$ / ppm	$C_{experimental}$	DP	ER%
10,00	10,002	0,142	0,002
30,00	29,97	0,055	0,1
50,00	50,84	0,660	1,7

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 11. Parâmetros calculados para avaliar a exatidão do método proposto para quantificação do timol.

$C_{teórica}$ / ppm	$C_{experimental}$	DP	ER%
10,00	10,10	0,296	1,0
30,00	30,56	0,911	1,9
50,00	51,10	2,457	2,2

Fonte: Elaborado pelo autor.

Um comportamento diferente foi observado considerando a precisão/exatidão, onde os desvios aumentam conforme é aumentada a concentração da amostra. Esse comportamento é diferente, pois segundo Ribani *et al.* (2004) e a própria ANVISA, é comum observar maiores desvios em concentrações menores, como no caso da análise de analitos em quantidades traço, por exemplo. O contrário geralmente também é válido, onde os desvios normalmente são menores para as concentrações maiores (ANVISA, 2017; RIBANI *et al.*, 2004).

No caso, o oposto foi observado, isto é, os desvios aumentaram para as concentrações maiores e o ER% foi menor nas menores concentrações avaliadas. Talvez devessem ser incluídos pontos mais diluídos, mais próximos ao valor do LOQ. De qualquer forma, os critérios de aceitação para os parâmetros de exatidão foram considerados os mesmos da precisão e como todos os parâmetros calculados resultaram em valores menores que 5%, foram aceitos para a validação da exatidão nas condições do método proposto.

#### 5.1.4 LOD/LOQ

Os LOD/LOQ foram calculados a partir dos parâmetros da curva analítica com as Equações 6 e 7 e os resultados são apresentados abaixo na Tabela 12.

Tabela 12. LOD e LOQ do FCZ e do timol para o método proposto.

Ativo	LOD / ppm	LOQ / ppm
FCZ	0,4	1,1
timol	0,2	0,7

Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5.2 PREPARO DAS NANOEMULSÕES

### 5.2.1 Fase carreadora

A fase carreadora foi selecionada baseando-se nos resultados de solubilidade obtidos experimentalmente para o FCZ nos 3 diferentes óleos testados (OR, OSU e OG). Uma análise visual dos óleos saturados com FCZ deixa evidente a capacidade superior de solubilização do OR (ver Figura 18). O excesso de FCZ adicionado aqui foi baseado em dados da literatura e, por isso, cerca de 50% a mais de fármaco foi adicionado para o OR, mesmo assim percebe-se a menor quantidade de fármaco sedimentado no fundo do Erlenmeyer (OR).



Figura 18. Imagem dos óleos saturados com FCZ que foram utilizados para os testes de solubilidade.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Apesar dos valores baixos de solubilidade observados, os resultados obtidos com a metodologia de HPLC descrita no item 4.2.8 justificaram ao final a escolha do OR como fase carreadora para o FCZ dentre os três óleos testados (ver Tabela 13).

Tabela 13. Resultados para a solubilidade do FCZ nos óleos obtidos com a metodologia validada de HPLC com detecção no UV em 210 nm.

Óleos	[FCZ] / ppm, (n=3)
OG	69 ± 7
OR	453 ± 12
OSU	62 ± 4

Fonte: Elaborado pelo autor.

A semelhança na composição dos triglicerídeos majoritários do OG e do OSU é refletida nos dados de solubilidade da Tabela 13, ambos ricos em triglicerídeos de ácido linoleico (Figura 6A). Já era esperado que houvesse uma melhor interação do FCZ com o OR do que com os outros dois óleos, por causa da presença de uma hidroxila na estrutura do ácido ricinoleico (Figura 6B) e sua composição. O OR também havia sido incluso na lista de óleos por ser um óleo mais viscoso, fator que deve favorecer a formação de gotículas menores durante o preparo da NE com a técnica de emulsificação espontânea (BOUCHEMAL et al., 2004).

Apesar da solubilidade do FCZ ser considerada baixa em água, o valor baixo do seu coeficiente de partição deve ter favorecido a sua dissolução na fase dispersante durante o preparo das NEs e, conseqüentemente, dificultado a interação com a fase carreadora da forma que foi inicialmente idealizada. Mesmo a solubilidade do FCZ no OR sendo até sete vezes maior que no OG e OSU, o valor observado é demasiadamente baixo para que ocorresse a incorporação do FCZ na fase carreadora nas quantidades intencionadas, o que levou a uma EE% muito abaixo do esperado (ver item 5.3.4). De qualquer forma, o OR foi selecionado como a fase carreadora para a produção das NE produzidas com o óleo são apresentadas nos itens seguintes.

### 5.2.2 Planejamento Fatorial Completo $2^3 + 3$

Nesta primeira etapa do planejamento, as três variáveis independentes selecionadas foram as concentrações dos dois surfactantes e a massa de OR. Os valores dos níveis de cada variável foram estabelecidos a partir de experimentos exploratórios e dados reportados nos trabalhos de referência citados (BOUCHEMAL

et al., 2004; SAATKAMP, 2019). As proporções de cada componente utilizadas nessa etapa podem ser verificadas nas Tabela 25 Tabela 26 no item A do APÊNDICE.

Foram realizados 11 experimentos ( $2^3 + 3$ ). A matriz de planejamento completa é apresentada abaixo na Tabela 14. Adicionalmente, foram realizadas aferições dos valores de pH das NEs produzidas nessa etapa. Esses valores também são mostrados na tabela abaixo e não foram considerados para o cálculo da  $D$ .

Tabela 14. Matriz de planejamento do planejamento fatorial completo ( $2^3$ ). As respostas individuais obtidas ( $y_i$ ) e a desejabilidade final calculada ( $D$ ) também são apresentadas (variáveis dependentes).

#	Variáveis independentes			Variáveis dependentes				
	(A) [Lecitina] / g L <sup>-1</sup>	(B) [P123] / g L <sup>-1</sup>	(C) massa de OR / mg	size / nm	PDI	$\zeta$ /mV	$D$	pH
1	0,100 (-)	1,0 (-)	200 (-)	201,7	0,171	-31,2	0,6140	5,77
2	0,600 (+)	1,0 (-)	200 (-)	174,4	0,114	-33,2	0,8771	4,75
3	0,100 (-)	3,0 (+)	200 (-)	185,9	0,159	-24,7	0,0000	5,39
4	0,600 (+)	3,0 (+)	200 (-)	171,9	0,139	-29,7	0,7571	4,85
5	0,100 (-)	1,0 (-)	600 (+)	258,5	0,437	-32,9	0,2457	4,65
6	0,600 (+)	1,0 (-)	600 (+)	399,0	0,481	-37,6	0,0396	4,40
7	0,100 (-)	3,0 (+)	600 (+)	596,9	0,616	-29,4	0,0000	4,70
8	0,600 (+)	3,0 (+)	600 (+)	267,2	0,377	-36,0	0,2833	5,05
9	0,350 (0)	2,0 (0)	400 (0)	242,4	0,320	-29,9	0,3272	4,94
10	0,350 (0)	2,0 (0)	400 (0)	238,1	0,350	-27,5	0,2739	5,06
11	0,350 (0)	2,0 (0)	400 (0)	243,6	0,368	-37,2	0,3742	4,42

Fonte: Elaborado pelo autor.

As NEs produzidas apresentaram diâmetros que variaram de 171,9 – 596,9 nm ( $\bar{d} = 270,9$  nm) com valores de PDI variando de 0,114 – 0,616 ( $\overline{PDI} = 0,321$ ). Os valores de potencial zeta se mantiveram em torno do limite imposto de -30 mV ( $\bar{\zeta} = -31,8$  mV) e variaram de -24,7 – -37,6 mV. O potencial zeta negativo é resultante da presença dos grupos fosfato da lecitina e a relação do valor de potencial zeta e as quantidades de surfactantes e óleo utilizadas não ficou clara (KLANG; VALENTA, 2011). Isso poderia ser atribuído ao fato da função  $D$  ter sido modelada a partir das

respostas obtidas experimentalmente ( $y_i$ ).<sup>2</sup> A equação obtida com os coeficientes dos efeitos principais (e de interação) em função da resposta  $D$  é apresentada abaixo.

$$D = 0,345 (\pm 0,015) + 0,137 (\pm 0,018)A - 0,092 (\pm 0,017)B - 0,210 (\pm 0,017)C + 0,123 (\pm 0,017)AB - 0,118 (\pm 0,017)AC + 0,092 (\pm 0,017)BC \quad (15)$$

Nessa etapa do planejamento é comum expressar os dados na forma de um gráfico de Pareto, a partir do qual é possível avaliar o impacto dos fatores estudados na resposta observada.

O gráfico de Pareto da Figura 19 foi obtido a partir dos dados da Tabela 14 e foi normalizado. A linha vermelha indica o ponto a partir do qual um efeito passa a ser considerado significativo para o intervalo de confiança determinado, nesse caso 95% ou  $p = ,05$ , portanto, o gráfico mostra que todos os efeitos avaliados (principais e de interação) se mostraram significativos ( $p = ,05$ ). O valor de  $p$  apenas indica a probabilidade de que seja aceita a hipótese nula ( $H_0$ ). Neste caso,  $H_0$  representa a hipótese de que nenhum dos fatores estudados tem influência significativa na modificação da resposta.

---

<sup>2</sup> Uma comparação do modelo (MSR) obtido com a  $D$  calculada a partir dos valores preditos ( $\hat{y}_i$ ) realizada após a execução deste trabalho mostrou que os resultados finais gerados foram praticamente iguais, nesse caso.

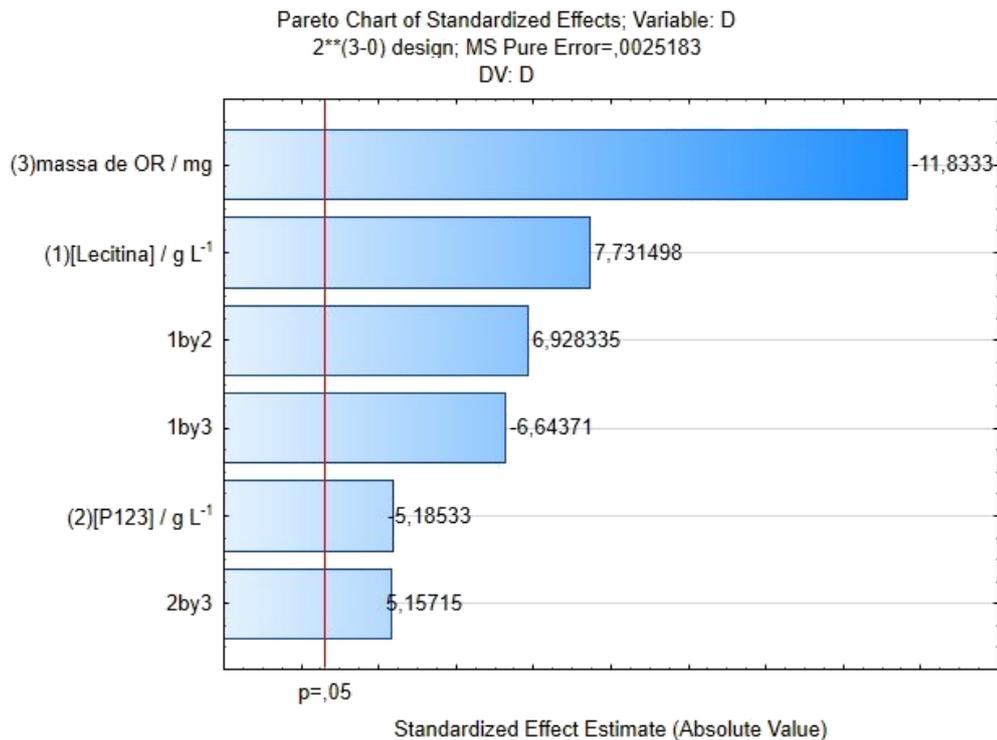


Figura 19. Gráfico de Pareto gerado com os dados da Tabela 14 em função da variável dependente  $D$  com os valores dos efeitos normalizados ( $p = ,05$ ).

Elaborado pelo autor no software Statistica (v13.5) da Tibco.

Esse resultado reflete a seleção de fatores que estão diretamente ligados à formação da NE, isto é, as quantidades de surfactantes disponíveis para estabilizar a dispersão e a quantidade de fase dispersa (OR). Contudo, é possível extrair informações interessantes do gráfico, que se referem ao comportamento dos fatores estudados frente ao impacto da sua modificação na resposta.

Efeitos de maior magnitude tem maior peso na modificação da resposta e o sinal do efeito é indicativo de qual sentido (nível - ou +) que essa modificação terá o maior impacto (efeitos principais). Assim, é possível observar na Tabela 14 o comportamento do efeito de cada fator (e suas interações) nos parâmetros individuais (tamanho de partículas, PDI e potencial zeta) de estabilidade das NEs.

É evidente que NEs produzidas com maiores quantidades dos surfactantes e menores massas de fase dispersa (OR) formam gotículas menores e menos polidispersas (p.ex., a NE#4). Contudo, nota-se que uma combinação entre a maior concentração de lecitina e a menor concentração de P123 (NE#2) produziu a NE com a maior  $D$ .

O efeito individual das concentrações de cada surfactante pode ser observado no gráfico da Figura 19. Já o efeito da interação dos surfactantes sugere o comportamento oposto, onde maiores concentrações de ambos surfactantes deve aumentar a  $D$  da NE. No entanto, a NE#2 emprega menores quantidades do surfactante sintético e de fato foi a NE que apresentou a melhor  $D$ , por isso a NE#2 deve representar as melhores condições nessa etapa.

Para fins comparativos, os efeitos observados em termos das variáveis individuais (gráficos de Pareto para as variáveis: *size*, PDI e zeta) podem ser verificados no item C do APÊNDICE. No caso de múltiplas variáveis, é indicado avaliar as variáveis individualmente dessa forma, porém a comparação dos gráficos de Pareto obtidos em termos dos parâmetros individuais e da  $D$  levou às mesmas conclusões finais, nesse caso.

Vale destacar que dentre as 11 NEs produzidas, aquelas produzidas com 200 mg de OR (NE#1 – 4) apresentaram valores de PDI adequados e formaram gotículas com tamanhos menores que 200 nm, com a NE#1 extrapolando marginalmente esse valor. Essa observação concorda com o efeito observado para a massa de OR no gráfico da Figura 19.

As NE#3 e NE#4 não apresentaram valores de potencial zeta adequados para o modelo, porém a NE#4 se destaca em termos dos outros dois parâmetros, pois emprega a combinação das concentrações máximas de ambos surfactantes e a mínima quantidade de OR, conforme discutido anteriormente.

Ao final, apenas a NE#2 gerou valores de tamanho, PDI e potencial zeta que se adequassem a todos os limites impostos. Apesar de não apresentar os menores valores para dois dos três parâmetros, a NE#2 apresentou a maior  $D$ .

A partir desses resultados, parece que todos os detalhes discutidos acima foram contabilizados nos valores calculados para a  $D$  e a escolha de combinar as três respostas em um único parâmetro se mostrou conveniente para a construção do modelo.

Assim, foi determinado que um sistema formado nas condições da NE#2, isto é, 0,6 g L<sup>-1</sup> de lecitina na FO, 1,0 g L<sup>-1</sup> de P123 na FA e 200 mg de OR, é capaz de produzir uma NE que respeita a todas as condições de estabilidade desejadas.

Adicionalmente, decidiu-se realizar uma etapa de otimização (MSR) do sistema produzido. Para isso, decidiu-se fixar as concentrações dos surfactantes nos valores citados acima e foram avaliados como fatores na MSR apenas a quantidade

de OR (fator mais significativo) e a quantidade de FCZ a ser incorporada na NE. A ideia nessa etapa seria de diminuir ainda mais os valores de tamanho e PDI da NE enquanto fosse incorporado desde nenhum até um excesso de FCZ no sistema e, posteriormente, ainda seria adicionado o timol à formulação otimizada.

Conforme será discutido a seguir, a NE otimizada resultante da MSR foi caracterizada, porém acabou não sendo utilizada como formulação final para os testes de liberação e atividade antifúngica e, conseqüentemente, a etapa de otimização acabou sendo inutilizada. Ao final, uma NE final contendo ambos ativos (NEFT) foi produzida nas condições da NE#2, que daqui pra frente será referida apenas como NEOR.

De qualquer forma, os dados da MSR e algumas análises de DLS e micrografias de TEM das amostras resultantes dessa etapa ( $NE_{SR}$ ) são apresentados e brevemente discutidos para fins de comparação nos itens seguintes.

Adicionalmente, foi realizado um teste preliminar para avaliar a atividade antifúngica das  $NE_{SR}$  contra cepas de *Candida spp.* por halo de inibição. Os resultados desse teste não serão discutidos, mas podem ser verificados no item E do APÊNDICE.

### 5.2.3 Metodologia de superfície de resposta com *design* Doehlert

Conforme comentado anteriormente, a partir dos resultados da etapa de triagem realizou-se uma etapa de otimização (MSR) da NEOR. Aqui decidiu-se por avaliar como fatores apenas a massa de OR (fator mais significativo), onde seriam testadas massas menores de óleo, e a massa de FCZ a ser incorporada na NE, onde seriam testadas diferentes quantidades, desde nenhum (0 mg) até um excesso (200 mg) do fármaco.

Decidiu-se por manter as concentrações dos surfactantes nas condições da NEOR, pois seria inviável explorar formulações com maiores quantidades de lecitina, uma vez que a mistura de fosfolipídios já está próxima ao seu ponto de saturação nessa concentração ( $0,6 \text{ g L}^{-1}$ ), e avaliar menores massas de P123 só agregaria mais complexidade ao planejamento. Os resultados obtidos nessa etapa são apresentados e brevemente discutidos abaixo.

Para a geração da SR foi escolhido um *design* Doehlert, pois essa abordagem permite manter um número mínimo de experimentos enquanto fornece uma eficiência

( $p/f$ ) maior ou igual a uma MSR do tipo Box-Behnken por exemplo.(FERREIRA et al., 2004)

O *design* Doehlert para 2 fatores permite atribuir pesos diferentes as variáveis, onde uma delas é explorada em mais níveis que a outra.(FERREIRA et al., 2004) Neste caso, a massa de FCZ (A) foi explorada em 5 níveis, enquanto a massa de OR (B) foi explorada em 3 níveis. Os valores dos níveis escolhidos para cada variável foram determinados baseados nos resultados da etapa anterior e a intenção foi de incorporar desde nenhum até um excesso de fármaco (200mg).

A matriz de planejamento completa utilizada para a geração da SR é apresentada na Tabela 15 abaixo.

Tabela 15. Matriz de planejamento completa com design Doehlert com os valores que foram utilizados para a geração da SR.

#	Variáveis independentes		Variáveis dependentes			
	(A) massa de FCZ /mg	(B) massa de OR / mg	size / nm	PDI	$\zeta$ / mV	D
1	100 (0)	200 (0)	179,8	0,146	-33,0	0,7857
2	200 (+1)	200 (0)	171,4	0,103	-26,2	0
3	150 (+0,5)	300 (+0,866)	207,8	0,231	-29,7	0
4	0 (-1)	200 (0)	173,7	0,102	-31,6	0,8462
5	50 (-0,5)	100 (-0,866)	152,1	0,150	-31,7	0,7662
6	150 (+0,5)	100 (-0,866)	141,4	0,102	-33,2	0,9948
7	50 (-0,5)	300 (+0,866)	201,7	0,210	-33,3	0,4301
8	100 (0)	200 (0)	165,2	0,154	-32,0	0,7479
9	100 (0)	200 (0)	163,2	0,147	-32,1	0,7783

Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir dos dados da Tabela 15, obteve-se a equação abaixo (Equação 16) que descreve a SR da Figura 20 em termos da resposta combinada  $D$ .

$$R = 0,678 (\pm 0,020) - 0,078 (\pm 0,008)A^2 - 0,121 (\pm 0,010)A - 0,104 (\pm 0,024)B^2 - 0,373 (\pm 0,018)B - 0,125 (\pm 0,018)AB \quad (16)$$

A adição de um parâmetro que não foi avaliado na etapa de triagem na MSR é questionável, mas esperava-se que houvesse uma melhor interação entre o fármaco e o sistema produzido. Testes preliminares mostraram que a incorporação do FCZ num sistema semelhante (mesma composição) não traria impacto significativo nos

parâmetros de estabilidade da NE e, portanto, incluí-lo na etapa de triagem resultaria em 8 experimentos adicionais sem necessidade. Por isso, decidiu-se por incluí-lo apenas na etapa de otimização com o(s) parâmetro(s) mais significativo(s) da etapa de triagem. Infelizmente, essa decisão não foi justificada pelos dados obtidos na MSR e nem pelos dados de solubilidade e EE% obtidos posteriormente. Esses dados serão discutidos nos itens seguintes.

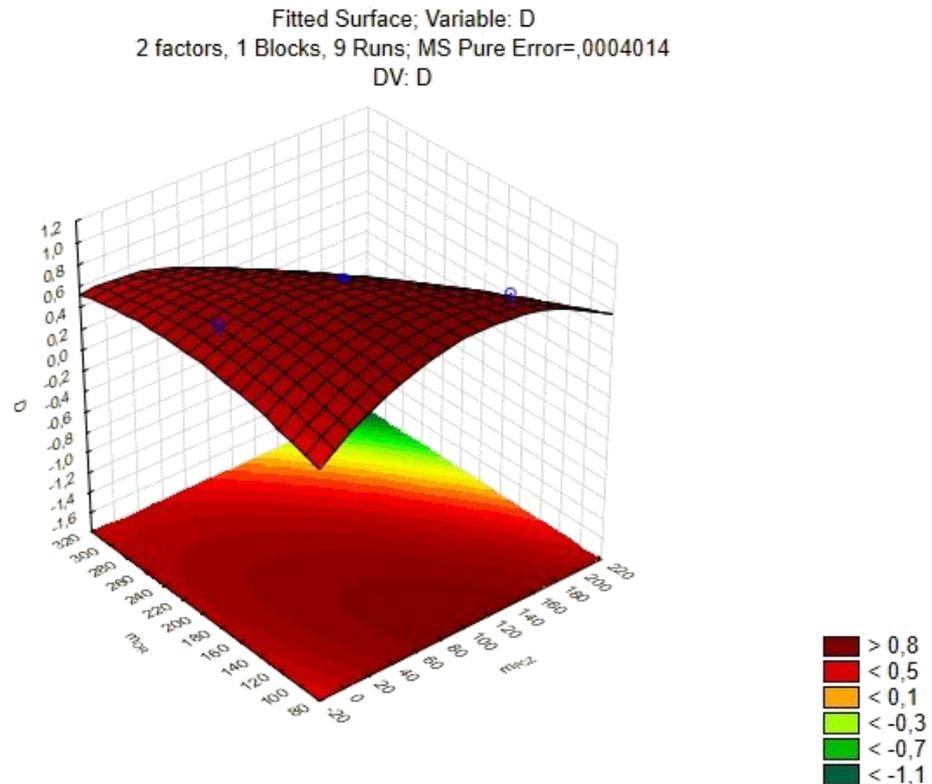


Figura 20. Superfície de resposta gerada com os dados da Tabela 11. A SR foi gerada em termos da resposta combinada *D*.

Fonte: Elaborado pelo autor no software Statistica (v13.5) da Tibco.

A análise de variância (ANOVA) mostrou que a aproximação proporcionada pela equação da SR seguindo os parâmetros impostos pela *D* é razoável ( $R^2 = 0,93$ ), porem houve falta de ajuste do modelo, com um valor de  $p = ,057$ , e o ponto de máximo da SR não está contido no domínio experimental.

Os valores críticos obtidos para cada variável a partir da SR são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Valores críticos calculados para cada variável a partir da equação da SR.

Fator	Valor predito na solução: 0,9871		
	Mínimo observado	Valor crítico	Máximo observado
Massa de FCZ	0	129,5053	200
Massa de OR	100	41,8950	300

Fonte: Elaborada pelo autor. Os dados desta tabela foram gerados no software Statistica (v13.5).

A partir destes valores, foram preparadas duas NEs nessas condições, isto é, 0,6 g L<sup>-1</sup> de lecitina na FO, 1,0 g L<sup>-1</sup> de P123 na FA, 42 mg de OR e 130 mg de FCZ, uma formulação contendo apenas o FCZ, que foi chamada de NEF<sub>SR</sub> e a outra formulação contendo também 40 mg de timol, que foi chamada de NEFT<sub>SR</sub>. O subscrito “SR” indica que essa formulação foi produzida nas condições otimizadas pela superfície de resposta.

A NEFT<sub>SR</sub> foi caracterizada em termos do tamanho médio de partículas, PDI, potencial zeta e EE% para ambos ativos. Estes resultados são apresentados no item seguinte (5.3).

Infelizmente, os resultados que serão apresentados a seguir evidenciaram que as NEs produzidas na MSR estavam com um excesso de FCZ para a quantidade de OR utilizada, onde praticamente todo o fármaco estava livre em solução. Apesar de ter sido possível chegar numa SR adequada e obter uma formulação com características de estabilidade satisfatórias, não foi possível incorporar o FCZ na formulação da maneira que foi inicialmente idealizada. Os dados da EE% de FCZ para a formulação otimizada com a MSR (NEFT<sub>SR</sub>) e os dados de solubilidade obtidos com metodologia de HPLC descrita no item 4.2.8 acabaram não justificando as quantidades de fármaco utilizadas nessa etapa.

Após esses resultados e considerando que ainda seriam realizados os testes de inibição, decidiu-se produzir como sistema final uma NE nas condições da melhor NE da etapa anterior (NEOR), isto é, uma NE com 0,6 g L<sup>-1</sup> de lecitina na FO, 1,0 g L<sup>-1</sup> de P123 na FA, 200 mg de OR, com a intenção de aumentar a quantidade de fase carreadora para permitir a incorporação de uma massa maior de fármaco. As quantidades de ativo foram revisadas para 40 mg de FCZ e timol, totalizando 1000 ppm de cada ativo na formulação final.

Portanto, ao final foram caracterizadas: uma formulação nas condições da NEOR contendo somente FCZ, que foi chamada de NEF, uma formulação nas

mesmas condições contendo ambos FCZ e timol, que foi chamada de NEFT, e alguns testes foram realizados para fins comparativos com uma formulação final contendo apenas timol, que foi chamada de NET. As três formulações (NEF, NEFT e NET) foram comparadas com a NEOR para avaliar a influência da incorporação dos ativos na estabilidade da NE através de um teste t.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

Para fins de caracterização das NEs finais (NEF e NEFT), foram realizadas análises de DLS, DSC, TEM, EE%, liberação e os testes de inibição contra diferentes cepas de *Candida spp.*

#### 5.3.1 Espalhamento de luz dinâmico e estabilidade

Os dados dos tamanhos médios de partículas (*z-average*), PDI e potencial zeta são apresentados abaixo (Tabela 17) para NE final sem nenhum ativo (NEOR) e as formulações com FCZ (NEF), com FCZ e timol (NEFT) e somente com timol (NET). Os valores de pH para essas NEs também podem ser verificados na Tabela 17.

Tabela 17. Dados de tamanho médio de partículas, PDI e potencial zeta obtidos para as NEs finais (NEOR, NEF, NEFT e NET). As medidas são apresentadas como a média de 5 medidas para os valores de tamanho e PDI e 3 medidas para o potencial zeta ( $\zeta$ ).

NE	diâmetro / nm	$\pm$ DP (n=5)	PDI	$\pm$ DP(n=5)	$\zeta$ / mV	$\pm$ DP (n=3)	pH
NEOR	171,2	3,5	0,156	0,038	-49,1	1,5	6,0
NEF	173,3	2,1	0,123	0,012	-37,6	2,8	6,2
NEFT	169,2	1,7	0,150	0,017	-46,3	2,6	6,8
NET	170,2	1,8	0,154	0,018	-28,3	1,0	6,3

Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram realizados testes de comparação (*t-student* considerando as variâncias) entre a NEOR (sem ativos) e a NEF, NEFT e NET em termos dos valores médios de cada parâmetro de estabilidade para avaliar se houve mudança significativa ( $p = ,05$ ) nos valores de tamanho, PDI e potencial zeta após a incorporação dos ativos. Aqui, a  $H_0$  representa a falta de relação entre a incorporação de um ativo (ou ambos) no sistema e mudanças estatisticamente significativas nos valores observados para os tamanhos médios de partículas, PDI e potencial zeta.

Uma comparação do valor de  $t_{calc}$  e  $t_{crit}$  mostrou que houve diferença significativa ( $p = ,05$ ) apenas para os valores de potencial zeta entre a NEOR e a NET e a NEOR e a NEF. A partir desses dados, percebe-se um comportamento curioso para o potencial zeta, onde a incorporação individual do FCZ e do timol na NEOR parece diminuir (em módulo) significativamente o potencial zeta, no entanto, a incorporação de ambos (NEFT) não produz o efeito combinado, isto é, não há uma diminuição (em módulo) expressiva o suficiente para ser considerada estatisticamente significativa. A razão deste comportamento não ficou clara a partir dos experimentos realizados.

Adicionalmente, é possível observar um aumento (em módulo) expressivo dos valores de potencial zeta para todas as formulações, principalmente da NEOR, quando comparadas com a NE equivalente (NE#2 da etapa de triagem). Provavelmente isso se deve a diferença entre a água utilizada durante a etapa de triagem (água ultrapura) e a água utilizada no momento do preparo das NEs finais (água filtrada em sistema de osmose reversa). É sabido que fatores como a salinidade e pH do meio afetam o perfil da dupla camada elétrica das nanopartículas em solução e, geralmente, isso é passível de invalidar uma comparação entre sistemas, porém, como se tratam de sistema semelhantes produzidos com a mesma técnica e mesmas concentrações de surfactantes, onde a única diferença é a presença dos ativos, a comparação foi considerada válida e decidiu-se por não realizar os ajustes de pH e salinidade exatamente para avaliar o potencial zeta das NEs a partir das condições de preparo.

Apesar de não terem sido utilizadas como formulações finais, foram obtidos também dados de estabilidade para as formulações otimizadas (NEF<sub>SR</sub> e NEFT<sub>SR</sub>) e uma NE sem ativo (branco) nas mesmas condições (NEOR<sub>SR</sub>). Esses dados podem ser verificados abaixo na Tabela 18.

Tabela 18. Dados de tamanho médio de partículas, PDI e potencial zeta obtidos para as NEs otimizadas (NEOR<sub>SR</sub>, NEF<sub>SR</sub> e NEFT<sub>SR</sub>). As medidas são apresentadas como a média de 3 medidas.

NE	diâmetro / nm	±DP (n=3)	PDI	±DP(n=3)	ζ / mV	±DP (n=3)
NEOR <sub>SR</sub>	128,7	2,0	0,176	0,015	-28,7	0,6
NEF <sub>SR</sub>	119,7	1,6	0,166	0,013	-30,6	0,8
NEFT <sub>SR</sub>	116,2	1,2	0,244	0,003	-36,6	1,1

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os testes de comparação de médias (*t-student* considerando as variâncias) mostraram que a incorporação tanto do FCZ como de ambos FCZ e timol na NEOR<sub>SR</sub> reduziu significativamente ( $p = ,05$ ) os valores observados para os tamanhos médios de partículas e para o potencial zeta. Já para os valores de PDI, apenas a incorporação de ambos aumentou significativamente ( $p = ,05$ ) a dispersão dos tamanhos.

As análises de DLS também foram utilizadas para realizar um acompanhamento da estabilidade das formulações (NEOR, NEF, NEFT e NET) ao longo de um período de 60 dias. A Figura 21 mostra a estabilidade das NEs finais (NEOR, NEF, NEFT e NET) em função do tamanho médio das partículas, a Figura 22 mostra a estabilidade em função do PDI e a Figura 23 mostra a estabilidade em função do potencial zeta.

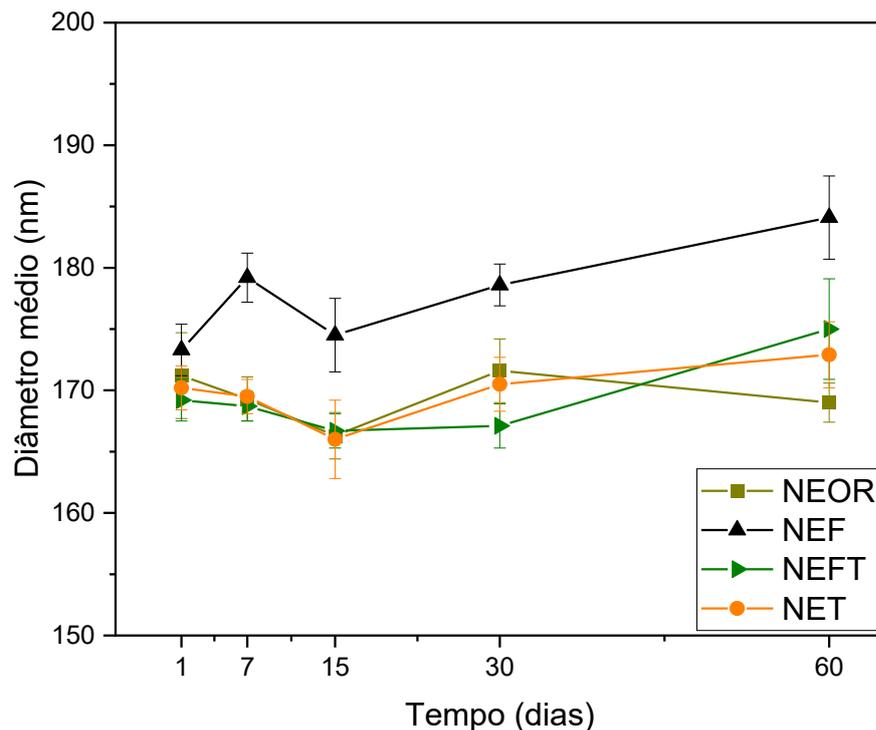


Figura 21. Estabilidade das NEs finais (NEOR, NEF, NEFT e NET) em função dos tamanhos médios de partículas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

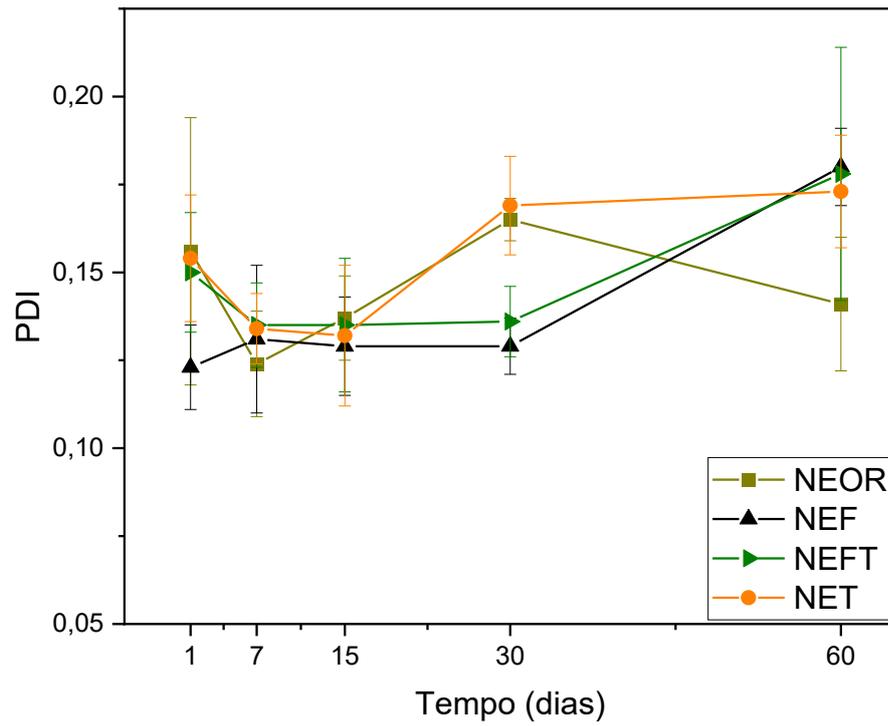


Figura 22. Estabilidade das NEs finais (NEOR, NEF, NEFT e NET) em função do PDI.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

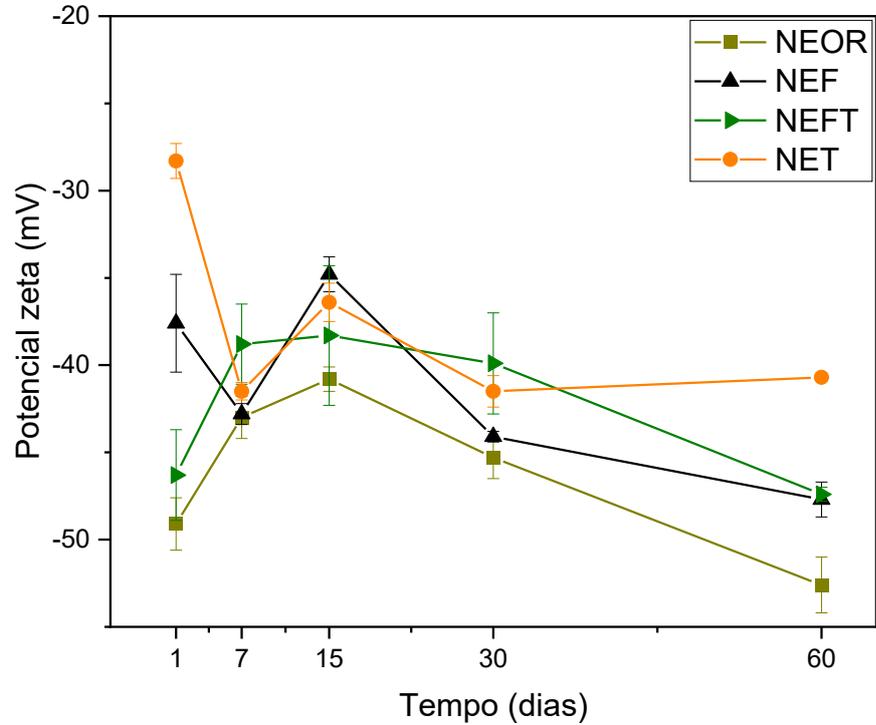


Figura 23. Estabilidade das NEs finais (NEOR, NEF, NEFT e NET) em função do potencial zeta.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma análise da variância (ANOVA 2 fatores) foi realizada para aferir se houveram mudanças estatisticamente significativas ( $p = ,05$ ) nos valores de tamanho tanto durante a incorporação dos ativos como ao longo do período avaliado. Em seguida, o teste comparativo (Tukey) foi realizado para aferir a partir de quais dias e para quais formulações houve uma mudança estatisticamente significativa.

Para os tamanhos, a variação mais significativa ( $p = ,05$ ) ocorreu somente após 60 dias, porém o teste mostrou que houveram variação estatisticamente significativas nos intervalos de 7 – 60, 15 – 60 e 15 – 30 dias. Isso deve-se a diminuição de tamanho que ocorre para a maioria das formulações a partir desses dias, como pode ser visto no gráfico (Figura 21). Considerando a incorporação, apenas a NEF apresentou variação estatisticamente significativa ( $p = ,05$ ).

Segundo a ANOVA, os valores de PDI não se alteraram significativamente com a incorporação dos ativos. Houve variação estatisticamente significativa dos valores de PDI apenas ao longo dos dias. Aqui novamente, o teste de Tukey mostrou que os valores de PDI observados variaram significativamente ( $p = ,05$ ) apenas após 60 dias, porém semelhante ao caso anterior, as variações significativas ocorreram nos intervalos dos dias 7 – 60 e 15 – 60. Esse comportamento pode ser facilmente visualizado no gráfico da Figura 22.

Os valores de potencial zeta variaram significativamente apenas a partir da incorporação do timol na NEOR (NET). A variação observada entre as formulações é mais aparente no primeiro dia (ver Tabela 17). Vale destacar que por mais que possa parecer que houve variação nos valores de potencial zeta ao longo dos dias, a ANOVA resultou num valor de  $p = ,07$  e um  $F_{\text{stat}} (2,88) < F_{\text{crit}} (3,26)$  e, portanto, não foi considerada estatisticamente significativa ( $p = ,05$ ), por mais marginal que tenha sido o resultado.

Similarmente, foi realizado um acompanhamento da estabilidade das NEs produzidas a partir da etapa de otimização (MSR) durante um período de apenas 30 dias. A Figura 24 mostra a estabilidade das NEs otimizadas ( $NEOR_{\text{SR}}$ ,  $NEF_{\text{SR}}$  e  $NEFT_{\text{SR}}$ ) em função do tamanho médio de partículas. A Figura 25 mostra a estabilidade em função do PDI e a Figura 26 mostra a estabilidade em função do potencial zeta.

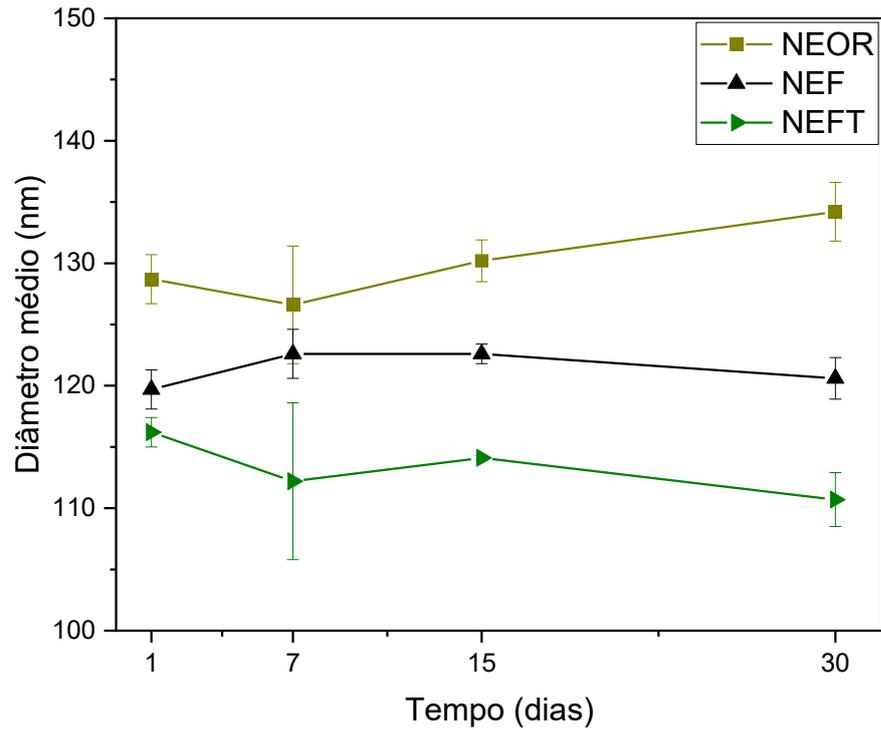


Figura 24. Estabilidade das NEs otimizadas ( $NEOR_{SR}$ ,  $NEF_{SR}$  e  $NEFT_{SR}$ ) tamanhos médios de partículas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

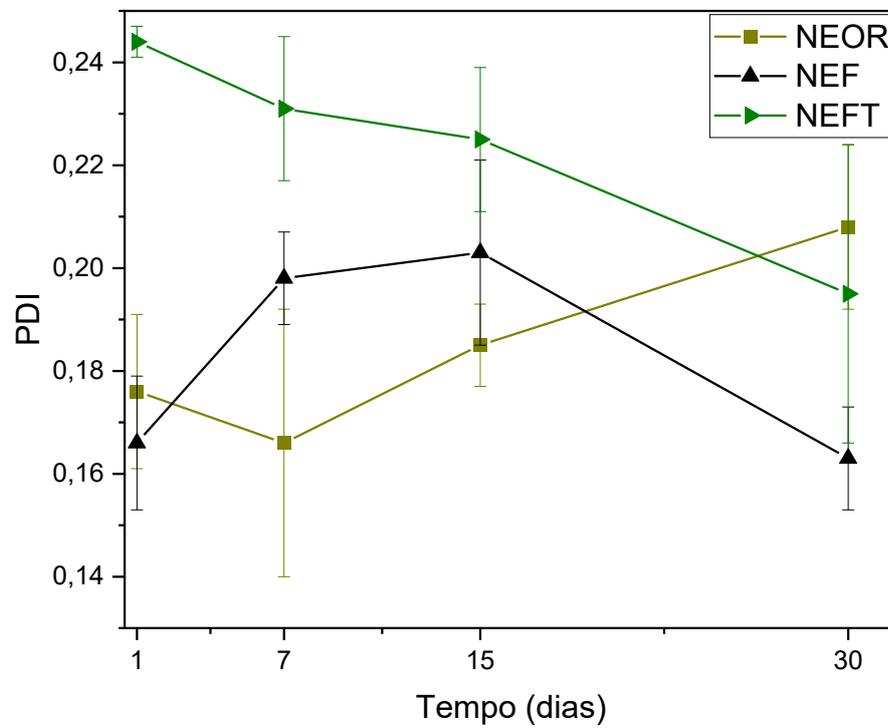


Figura 25. Estabilidade das NEs otimizadas ( $NEOR_{SR}$ ,  $NEF_{SR}$  e  $NEFT_{SR}$ ) em função do PDI.

Fonte: Elaborado pelo autor.

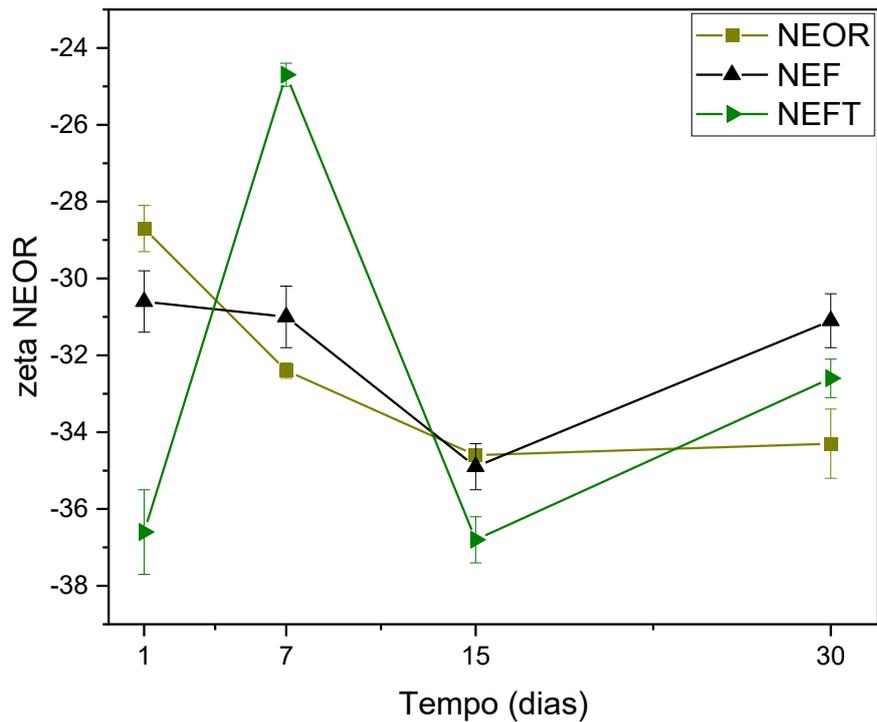


Figura 26. Estabilidade das NEs otimizadas ( $NEOR_{SR}$ ,  $NEF_{SR}$  e  $NEFT_{SR}$ ) em função do potencial zeta.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

As medidas de DLS (Tabela 18) sugerem que a incorporação de ativos na NEOR diminuiu levemente o tamanho médio observado para as partículas da NE. Houve também um aumento nos valores de PDI e potencial zeta (em módulo) observados.

### 5.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Algumas micrografias foram obtidas para as formulações finais com e sem ativo (NEOR e NEFT) e são apresentadas a seguir.

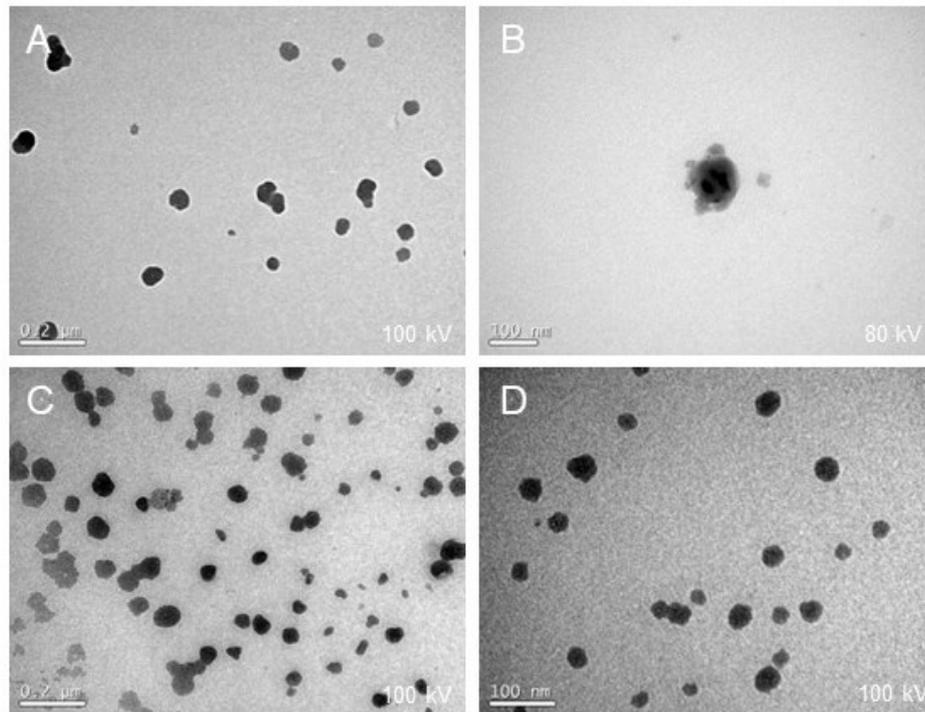


Figura 27. Micrografias da NEOR (A e B) e NEFT (C e D).  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os tamanhos das partículas observados nas micrografias da Figura 27 são muito menores que os tamanhos observados por DLS (~170 nm). Isso é comum para sistemas como NEs nesse tipo de análise, pois no DLS as medidas são realizadas em solução e o valor de tamanho obtido refere-se ao diâmetro hidrodinâmico das partículas. O preparo da amostra para as análises de TEM envolve a sua secagem e é esperado que um sistema como uma NE sofra uma redução de tamanho, uma vez que não contem a esfera de hidratação considerada no diâmetro hidrodinâmico e a fase carreadora é líquida. A redução de tamanho nesse caso pareceu expressiva, o que gera um questionamento da utilização da técnica para a análise do sistema proposto. Uma alternativa mais adequada porem que não pôde ser realizada seria utilizar a técnica de criomicroscopia de transmissão eletrônica.

Da mesma forma, para fins comparativos foram obtidas micrografias para as formulações otimizadas com e sem os ativos (NEOR<sub>SR</sub> e NEFT<sub>SR</sub>).

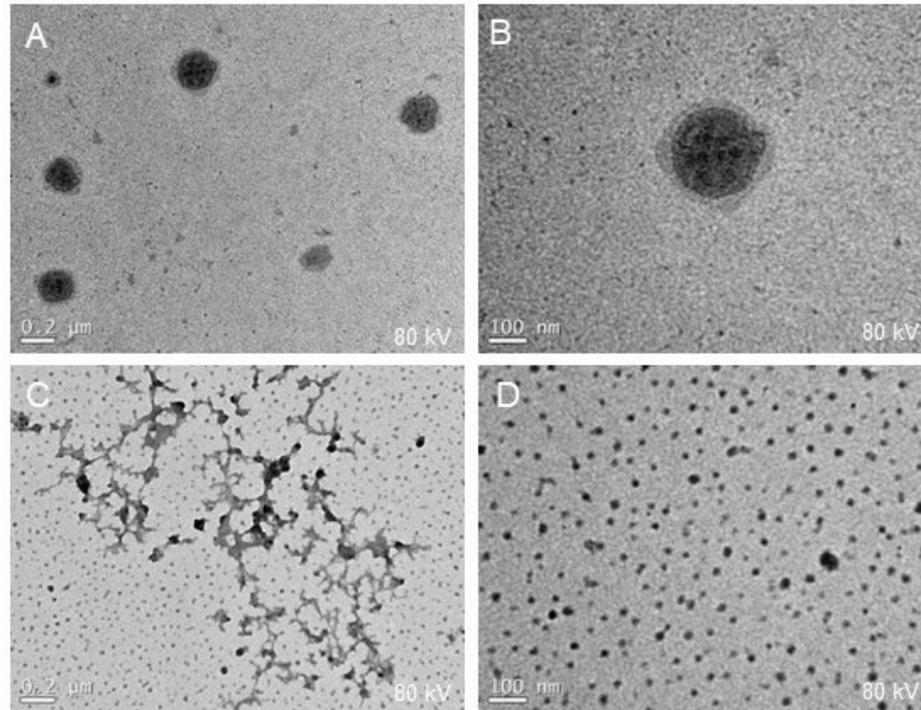


Figura 28. Micrografias da NEOR<sub>SR</sub> (A e B) e NEFT<sub>SR</sub> (C e D).  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Aqui (Figura 28) os tamanhos das partículas concordam relativamente melhor com valores de tamanhos observados por DLS para a NEOR<sub>SR</sub>. O mesmo não pode ser dito das NEFT<sub>SR</sub> (C e D), que não apresentaram formatos que se assemelham às partículas da NE, mas pontos que podem ser atribuídos à cristais de FCZ livre (não-incorporado).

### 5.3.3 Calorimetria diferencial exploratória

As análises de calorimetria diferencial exploratória (DSC) foram realizadas para a caracterização térmica dos reagentes utilizados na formulação e como uma aferição da capacidade de solubilização do fármaco no óleo (SAATKAMP et al., 2023). Abaixo são apresentados os termogramas sobrepostos dos reagentes utilizados na formulação final (Figura 29).

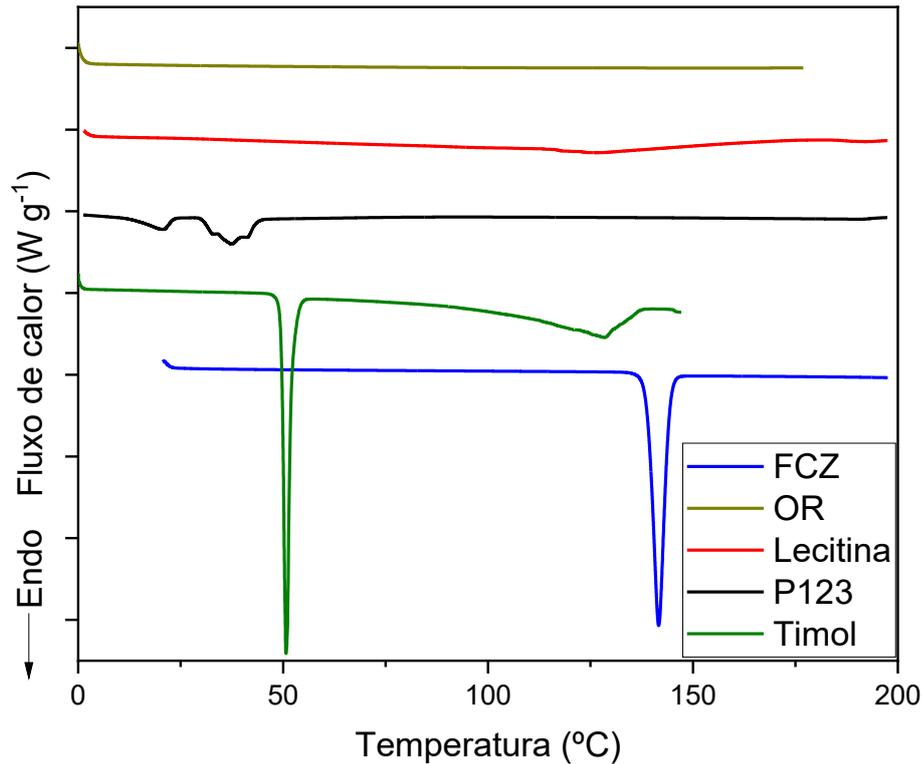


Figura 29. Termogramas dos reagentes utilizados para a produção das NEs.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

O FCZ apresenta um evento endotérmico bem definido em 138°C – 141°C, que corresponde à fusão do fármaco na sua forma cristalina e está de acordo com o valor encontrado na literatura (AKAY; KAYAN, 2021; BLOKHINA et al., 2020). A integração levou a um  $\Delta H_{fus} = 125 \text{ J g}^{-1}$ , valor relativamente próximo ao valor encontrado na literatura (112 – 114  $\text{J g}^{-1}$ ) (BLOKHINA et al., 2020).

O timol também apresentou um evento endotérmico bem definido em 49°C – 51°C com um  $\Delta H_{fus} = 124,5 \text{ J g}^{-1}$ , que por sua vez corresponde à fusão da forma cristalina do terpeno, seguido de uma provável liberação de água e/ou sua degradação a partir dos 100 – 150 °C (SAATKAMP et al., 2023).

O P123 apresenta dois eventos endotérmicos em 21°C e 38°C com entalpias de aproximadamente 12  $\text{J g}^{-1}$  e 34  $\text{J g}^{-1}$ , respectivamente, que devem indicar uma reorganização das cadeias do polímero nessas temperaturas (JUNIOR, 2020).

A curva para a lecitina no termograma da Figura 29 mostra um grande evento endotérmico que se inicia em torno 20 – 40°C e que se estende até a temperatura final do aquecimento (200°C). A literatura indica que esse evento corresponde à transição gel-líquido cristalina característica dos fosfolipídios que compõe a lecitina, como a PC (KLANG; VALENTA, 2011; SAATKAMP et al., 2023).

O OR não apresentou nenhum evento térmico distinto na faixa de temperatura avaliada. Eventos térmicos como a fusão do óleo, por exemplo, são observados em temperatura negativas (-5 – -2°C), que não foi o caso (PATEL et al., 2016).

Apesar de não ter sido observado nenhum evento térmico para o OR, misturas de OR com ambos ativos também foram aquecidas (Figura 30). Nesse caso, a ausência dos picos característicos das fusões dos ativos sugere a ausência de material na forma cristalina na amostra. Isso pode ser considerado um indicativo de solubilização do ativo na fase carreadora, onde o ativo solubilizado não está mais na forma de cristais que fundem em temperaturas definidas, mas homoganeamente disperso pelo material líquido.

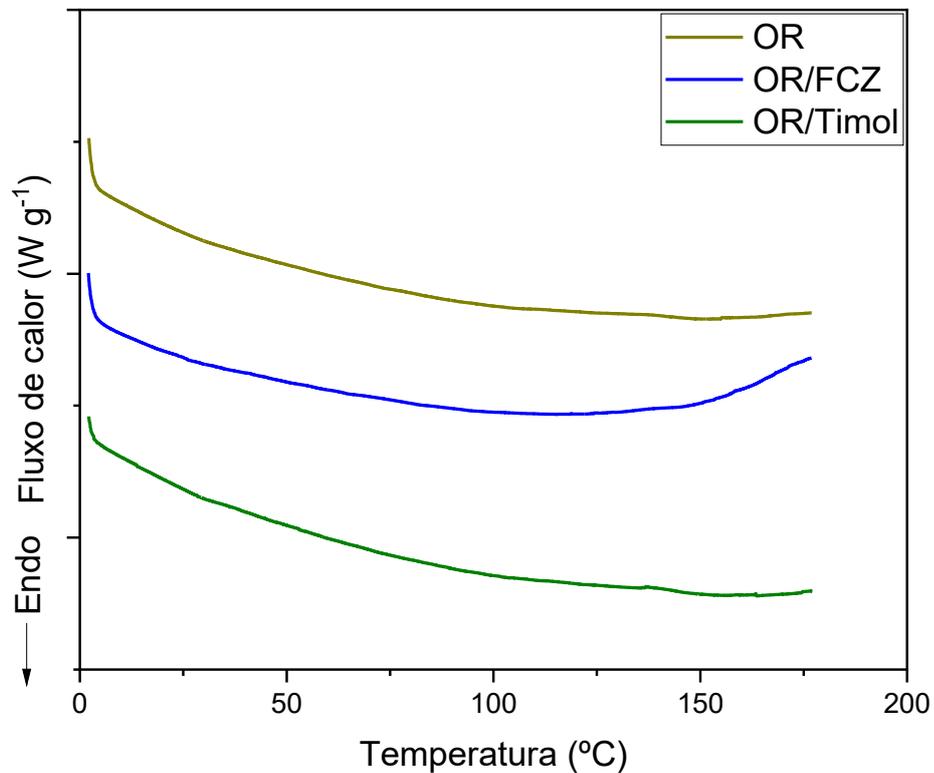


Figura 30. Termogramas do OR puro e das misturas de OR/FCZ e OR/Timol.  
Fonte: Elaborado pelo autor

#### 5.3.4 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE%) das formulações finais NEFT/NEFT<sub>SR</sub> foi determinada de maneira indireta utilizando a Equação 10 (ver item 4.2.9). Os dados são apresentados abaixo na Tabela 19.

Tabela 19. Eficiência de encapsulação de FCZ e timol nas formulações finais NEFT (n=2) e NEFT<sub>SR</sub> (n=2).

Formulação	EE% (FCZ)	EE% (Timol)
NEFT <sub>SR</sub>	2% ±1%	84% ±2%
NEFT	10% ±2%	97% ±<1%

Fonte: Elaborado pelo autor.

Praticamente nenhum fármaco foi incorporado na NEFT<sub>SR</sub>. A partir desse resultado, foi tomada a decisão de produzir a NEFT nas condições da NEOR. O aumento na carga de FCZ foi mínimo e pareceu proporcional ao aumento da massa de fase carreadora. Esperava-se uma melhor compatibilidade entre o fármaco e a NE. Apesar do aumento de massa da fase carreadora, o sistema produzido se manteve dentro dos limites impostos para os parâmetros de estabilidade

Com a maior quantidade de OR da NEOR (200 mg), praticamente todo timol foi incorporado na NE. No caso do timol, esses resultados estão de acordo com o que já foi reportado em um estudo prévio para um sistema semelhante de lecitina e P123 com OSU (SAATKAMP et al., 2023).

#### 5.4 ENSAIO DE LIBERAÇÃO EM pH SIMULADO

Foram realizados ensaios de liberação em dois meios diferentes que simulassem as condições de pH encontradas na pele. O primeiro ensaio de liberação foi realizado em pH 5,4 com a finalidade de simular as condições de pH da superfície da pele saudável (pH~5) (RIPPKE; BERARDESCA; WEBER, 2018).

Os perfis de liberação do FCZ a partir de uma solução do fármaco livre, da NEF e da NEFT em pH 7,4 (Figura 31) e em pH 5,4 (Figura 32) são apresentados abaixo. A liberação foi acompanhada durante um período de 48 h. Praticamente todo o FCZ foi liberado até as primeiras 8 h. Os gráficos também mostram o perfil de liberação do timol a partir NEFT. A liberação do timol é mais demorada e praticamente todo o timol foi liberado até as primeiras 12 h.

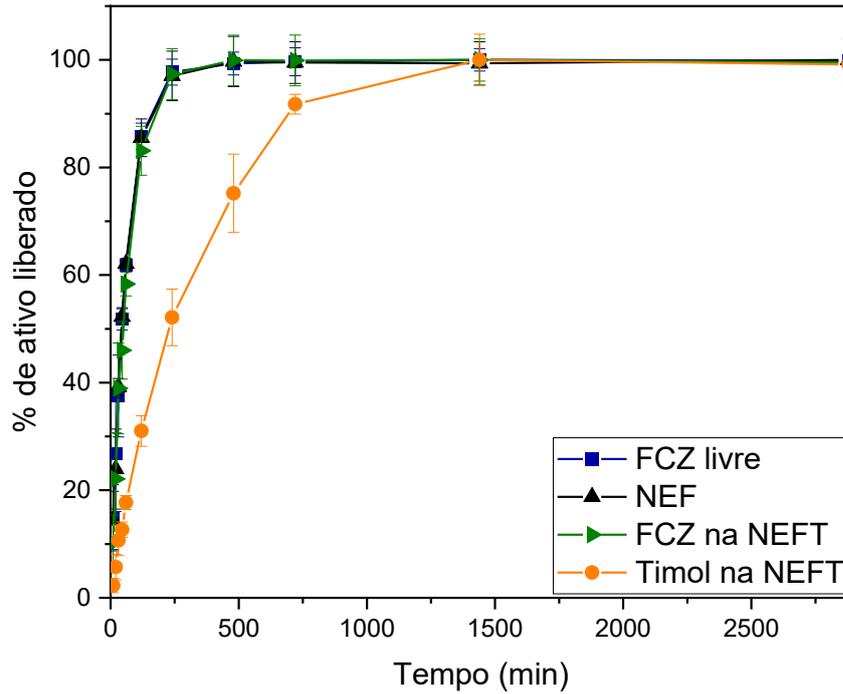


Figura 31. Perfil de liberação (% de ativo liberado vs. tempo) para o FCZ livre, na NEF e na NEFT, e para o timol na NEFT durante um período de 48h em pH 7,4 ( $\pm 0,1$ ). (n=3)  
 Fonte: Elaborado pelo autor.

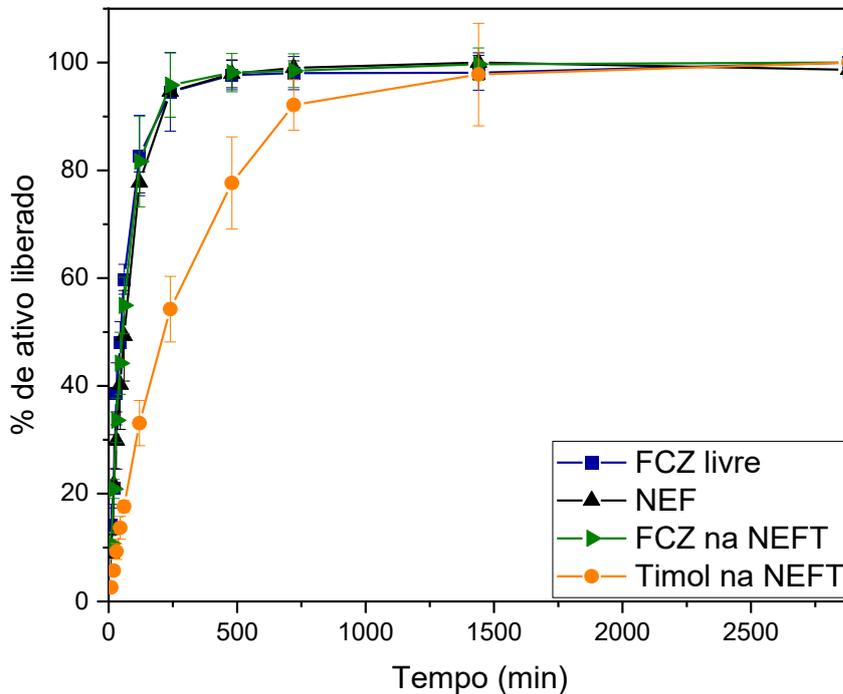


Figura 32. Perfil de liberação (% de ativo liberado vs. tempo) para o FCZ livre, na NEF e na NEFT, e para o timol na NEFT durante um período de 48h em pH 5,4 ( $\pm 0,1$ ). (n=3)  
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Um ensaio com o timol livre também foi realizado para fins comparativos frente ao seu perfil de liberação a partir da NEFT em pH 7,4 (Figura 33) e pH 5,4 (Figura 34).

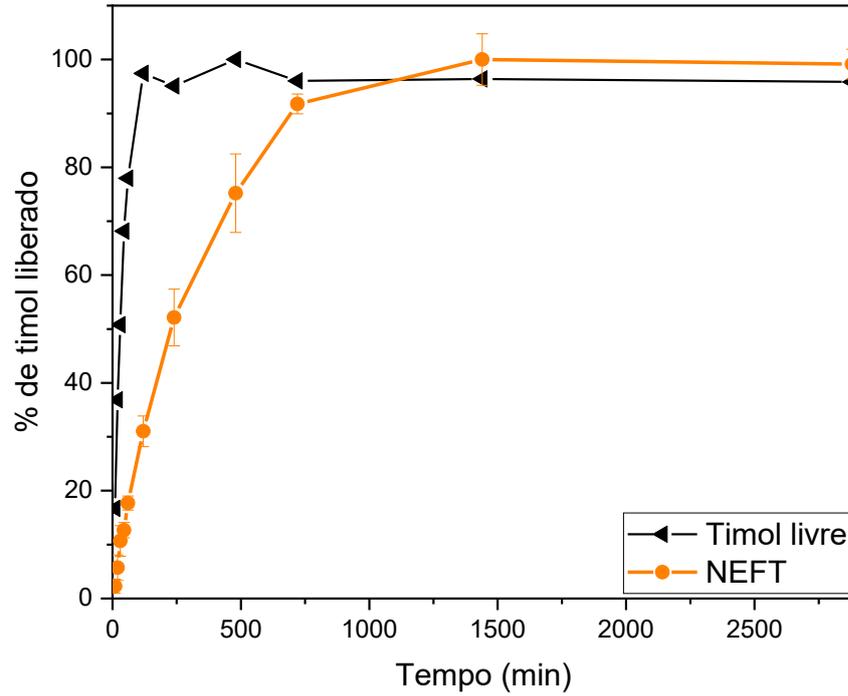


Figura 33. Perfil de liberação (% de timol liberado vs. tempo) para uma solução 1000 ppm de timol livre e a NEFT durante um período de 48h em pH 7,4 ( $\pm 0,1$ ).

Fonte: Elaborado pelo autor.

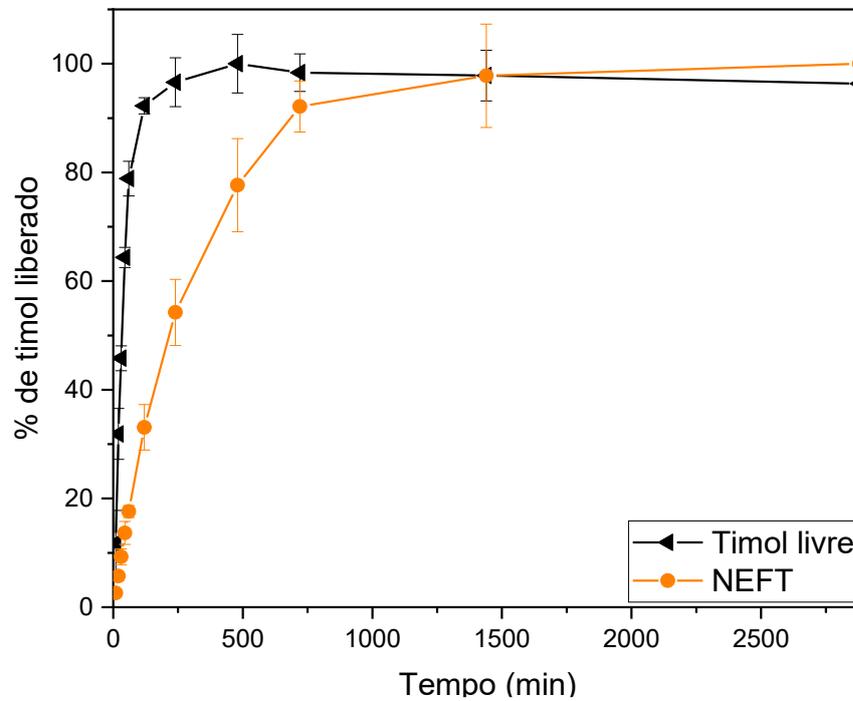


Figura 34. Perfil de liberação (% de timol liberado vs. tempo) para uma solução 1000 ppm de timol livre e a NEFT durante um período de 48h em pH 5,4 ( $\pm 0,1$ ).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para ajudar a elucidar o mecanismo de liberação do FCZ a partir das formulações nos meios estudados, foram testados os modelos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Kosmeyer-Peppas.

Os dados dos coeficientes de determinação ( $r^2$ ), das constantes cinéticas de liberação ( $k_i$ ) e do coeficiente de liberação  $n$  para os respectivos modelos de liberação são apresentados abaixo na Tabela 20 para o FCZ em pH 7,4, na Tabela 21 para o FCZ em pH 5,4 e, em seguida, nas Tabela 22 e Tabela 23 para o timol nos pH 7,4 e 5,4, respectivamente.

Tabela 20. Parâmetros dos modelos de liberação testados para a liberação do Fluconazol em pH 7,4.

Forma	Ordem zero		Primeira ordem		Kosmeyer-Peppas			Higuchi	
	$r^2$	$k_0 / \mu\text{g mL}^{-1} \text{h}^{-1}$	$r^2$	$k_1 / \text{h}^{-1}$	$r^2$	$k_{KP} / \text{h}^{-n}$	$n$	$r^2$	$k_H / \text{h}^{-1/2}$
NEF	0,3203	0,287	0,9360	0,539	0,9876	63,0	0,803	0,7781	27,3
NEFT	0,3255	0,305	0,9191	0,493	0,9690	58,2	0,833	0,7995	28,6

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 21. Parâmetros dos modelos de liberação testados para a liberação do Fluconazol em pH 5,4.

Forma	Ordem zero		Primeira ordem		Kosmeyer-Peppas			Higuchi	
	$r^2$	$k_0 / \mu\text{g mL}^{-1} \text{h}^{-1}$	$r^2$	$k_1 / \text{h}^{-1}$	$r^2$	$k_{KP} / \text{h}^{-n}$	$n$	$r^2$	$k_H / \text{h}^{-1/2}$
NEF	0,3598	0,317	0,9292	0,399	0,9880	50,3	0,811	0,7221	20,6
NEFT	0,3497	0,296	0,8412	0,245	0,9911	55,9	0,848	0,5821	12,8

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 22. Parâmetros dos modelos de liberação testados para a liberação do timol em pH 7,4.

Forma	Ordem zero		Primeira ordem		Kosmeyer-Peppas			Higuchi	
	$r^2$	$k_0 / \text{ppm h}^{-1}$	$r^2$	$k_1 / \text{h}^{-1}$	$r^2$	$k_{KP} / \text{h}^{-n}$	$n$	$r^2$	$k_H / \text{h}^{-1/2}$
NEFT	0,6194	0,476	0,9907	0,199	0,9956	17,0	0,815	0,9526	24,5

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 23. Parâmetros dos modelos de liberação testados para a liberação do timol em pH 5,4.

Forma	Ordem zero		Primeira ordem		Kosmeyer-Peppas			Higuchi	
	$r^2$	$k_0 / \text{ppm h}^{-1}$	$r^2$	$k_1 / \text{h}^{-1}$	$r^2$	$k_{KP} / \text{h}^{-n}$	$n$	$r^2$	$k_H / \text{h}^{-1/2}$
NEFT	0,6115	0,420	0,9788	0,166	0,9956	17,4	0,831	0,8409	17,4

Fonte: Elaborado pelo autor.

Segundo Dash *et al.* (2010), o modelo de ordem zero serve para descrever modelos de liberação mais lenta a partir de formas farmacêuticas que não se desintegram (DASH *et al.*, 2010). A liberação rápida do FCZ a partir da NEFT é igual à liberação do fármaco livre (ver Figura 31). De fato, a EE% de 10% significa que até 90% do que foi adicionado de fármaco está livre em solução.

O autor também indica que o modelo de primeira ordem e o de Higuchi são aplicáveis para descrever a dissolução de ativos hidrossolúveis para o meio de

liberação a partir de uma matriz porosa ou para uma série de formas farmacêuticas transdermais e comprimidos, respectivamente (DASH et al., 2010). O modelo de primeira ordem parece descrever bem a liberação do FCZ ( $r^2 \cong 0,93$ ).

O modelo de Kosmeyer-Peppas pode descrever a liberação de ativos a partir de sistemas poliméricos (DASH et al., 2010). Nesse modelo, apenas os primeiros 60% de ativo liberado são considerados no cálculo dos parâmetros. Como pode ser observado no gráfico da Figura 31, a liberação dos primeiros 60% de ativo disponível já ocorre na primeira hora. A liberação do FCZ é rápida e graficamente, o comportamento da liberação é diretamente proporcional até o final da liberação. A linearização logarítmica da equação utilizada para a realização do cálculo desse modelo apenas realça esse comportamento. Essa liberação inicial rápida e constante é chamada de efeito *burst* e é resultado da difusão normal do ativo livre devido ao gradiente de concentração (Lei de Fick).

A partir da Figura 31 e os dados da EE% do FCZ na NEFT é possível concluir que a liberação rápida do FCZ deve-se à difusão do fármaco da NE para o meio de liberação através da membrana polimérica (membrana de diálise) e deve ser regido pela diferença de potencial químico entre o meio e a NE, uma vez que a maior parte do fármaco está livre em solução ou interagindo fracamente com as NPs da NE.

O coeficiente  $n$  deve sugerir um mecanismo para a dissolução do ativo no meio a partir da formulação, onde um valor de  $n \leq 0,43$  indica mecanismo de difusão normal regido pela diferença de potencial químico em gradientes de concentração (Lei de Fick), um valor de  $n = 0,85$  corresponde a um transporte Caso II, que pode descrever uma matriz polimérica relaxando ou erodindo enquanto libera o ativo, e um valor de  $0,43 < n < 0,85$  corresponde transporte difusivo anômalo, uma mistura dos dois mecanismos (SANCHES et al., 2020).

A liberação tanto do FCZ como do timol em ambos pHs foi melhor descrita pelo modelo de Kosmeyer-Peppas e deve ser regida por um mecanismo de difusão normal e caso II para ambos ativos a partir da NE. Os dados também se adequaram ao modelo de primeira ordem e, no caso do timol até o de Higuchi. O timol parece ter difundido facilmente a partir da NEFT, apenas mais lentamente que o FCZ e não parece ter havido diferença no perfil da liberação nos diferentes pHs.

## 5.5 TESTE DE INIBIÇÃO CONTRA CEPAS DE *CANDIDA ALBICANS*

Os testes de inibição contra as diferentes cepas de *Candida spp.* foram realizados por microdiluição para a NEF, a NEFT e uma formulação contendo só timol (NET). Os resultados foram comparados com a atividade para soluções dos ativos livres nas mesmas concentrações das NEs (1000 ppm). Previamente a esses resultados, haviam sido realizados testes de inibição preliminares pelo método de difusão em disco para as formulações otimizadas pela MSR (NEF<sub>SR</sub> e NEFT<sub>SR</sub>). Esses resultados podem ser verificados no item E do APÊNDICE.

Os resultados dos testes de atividade antifúngica para as NEs finais (NEF, NET e NEFT) são apresentados em termos da MIC na Tabela 24. Os valores de concentração são dados em partes por milhão (ppm). Abaixo também é mostrada uma imagem de uma das placas (micropoços) reveladas (Figura 35) do teste realizado com a *C. albicans*.

Tabela 24. Valores das MICs para as soluções dos ativos livres e encapsulados nas NEs (NEF, NET e NEFT). As concentrações são reportadas em unidades de partes por milhão (ppm). (n=2)

Cepa / forma	Timol / ppm	FCZ / ppm	NEF / ppm	NET / ppm	NEFT / ppm
<i>C. albicans</i>	500	> 1000	> 1000	500	500
<i>C. krusei</i>	500	> 1000	> 1000	500	500
<i>C. Glabrata</i>	1000	> 1000	> 1000	1000	500

Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir dos valores de MIC percebe-se que o FCZ não apresentou atividade contra nenhuma das cepas testadas, com valores de MIC maiores que 1000 ppm ([FCZ]<sub>NE</sub>). Já para o timol, apesar das concentrações serem consideradas bastante altas, foi capaz de inibir o crescimento nas três cepas de *Candida* testadas em concentrações a partir de 500 ppm.

Sharifzadeh *et al.* (2018) reportaram valores de MIC (microdiluição) para as mesmas espécies de *Candida* testadas na Tabela 24. Os valores médios de MIC reportados no estudo para o FCZ contra cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* foram 0,47, 18 e 179 ppm, respectivamente. Para o timol esses valores médios foram em torno de 50 ppm para *C. albicans* e *C. glabrata* e 70 ppm para *C. krusei* (SHARIFZADEH *et al.*, 2018). Em comparação com os valores encontrados na literatura, os valores de MIC da Tabela 24 são bastante altos, mesmo considerando que alguns dos parâmetros da metodologia utilizada diferem do estudo citado, como

o tempo (48h vs. 24h) e a temperatura (35°C vs. 30°C) de inoculação das cepas, além das diluições utilizadas.

Apesar de ser possível observar um comportamento melhor para a atividade antifúngica da NEFT contra as três cepas, a diferença entre as diluições que mostraram atividade para o timol livre ou incorporado na NET não deixa claro se há atividade conjunta ou se o efeito é só do timol.

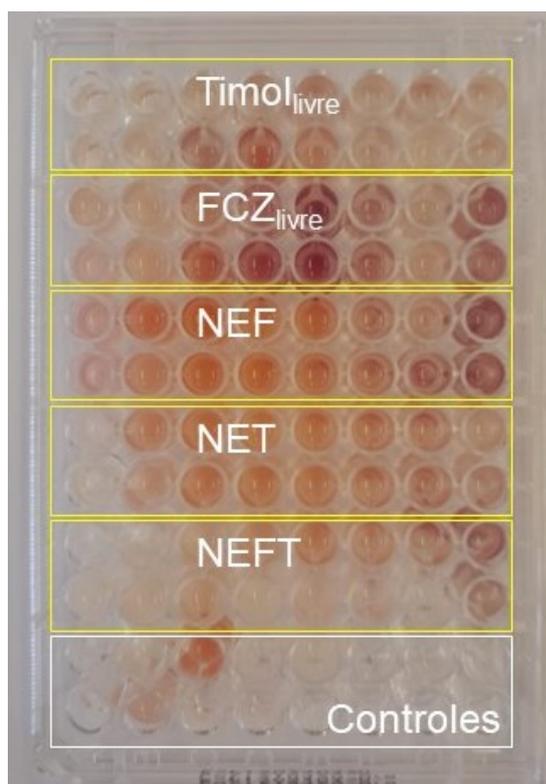


Figura 35. Micropoços do teste realizado com a *C. albicans*. A maior concentração testada (1000 ppm) está à esquerda.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Adicionalmente, foram realizados alguns testes preliminares por halo de inibição e esses resultados podem ser verificados no item E do APÊNDICE. Esses testes por halo de inibição foram realizados com as NEs da MSR que continham 3x mais FCZ (ver Tabela 27 no item A do APÊNDICE). Nesse caso, três das cepas testadas são as mesmas dos testes por microdiluição e duas delas (*C. albicans* e *C. krusei*) não se mostraram suscetíveis à solução de timol (1000 ppm). Aqui, não foi avaliado o timol incorporado individualmente na NE (NET).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Primeiramente, esperava-se que houvesse uma melhor compatibilidade entre a fase carreadora (OR) e o FCZ, possivelmente na forma de interações favoráveis entre as hidroxilas presentes nas cadeias alquílicas do ácido ricinoleico, principal componente dos triglicerídeos do OR, e o fármaco na forma de ligações de hidrogênio.

No caso do timol o valor alto do coeficiente de partição e seu tamanho pequeno podem ter favorecido esse tipo de interação com a fase carreadora. Já no caso do FCZ, o baixo coeficiente de partição e o impedimento estérico da hidroxila podem ter dificultado interações desse tipo (EMAMI et al., 2019).

Uma possível forma de facilitar a interação do fármaco com a fase oleosa seria utilizar a forma etoxilada do OR que proporcionaria um aumento expressivo na capacidade de solubilização do óleo (até 100x (CONEAC et al., 2015)). Outra alternativa envolveria a utilização do timol na forma do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*), dados a capacidade de solubilização do FCZ em óleos essenciais semelhantes como o óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), por exemplo (KARPIŃSKI, 2020; VLAIA et al., 2021). Em ambos casos, se faria necessário a realização de um novo planejamento, desde a etapa inicial.

Outra possibilidade envolve explorar outros DDS parecidos, como por exemplo, lipossomas, que são vesículas que podem ser formadas por fosfolipídios como a lecitina, onde idealmente a encapsulação do FCZ ocorreria dentro do compartimento aquoso e o timol seria capaz de se organizar na camada lipofílica.

Apesar disso, a NEFT apresentou parâmetros de estabilidade razoáveis para um sistema misto de lecitina e P123, com um tamanho médio em torno de 170 nm, um valor de PDI perto de 0,1, indicando a formação de um sistema monodisperso, e potencial zeta negativo maior que 30 mV em módulo e que se manteve estável por pelo menos 60.

Os testes de inibição contra as cepas de *Candida spp.* mostraram que o sistema desenvolvido (NEFT) apresenta atividade antifúngica, porém os valores de MIC obtidos foram consideravelmente maiores (até 10x) que os encontrados na literatura para ambos ativos e para as mesmas espécies de *Candida* (utilizando a mesma técnica, porém com condições de inoculação levemente diferentes). Fica claro que correções ainda devem ser feitas frente a quantidade de fármaco na formulação. Já o timol apresentou atividade contra as cepas testadas tanto livre como

encapsulado. Os resultados não mostraram que o sistema (NE) causou efeito na atividade antifúngica dos ativos.

Em vista da baixa capacidade de encapsulação do FCZ, algumas possíveis aplicações sugeridas para um sistema como a NEFT envolvem a sua incorporação em matrizes poliméricas como géis, filmes, membranas ou fibras para produzir materiais poliméricos com potencial atividade antifúngica pelo efeito combinado do FCZ e do timol contra *Candida spp.*.

Os dados obtidos para a NEOR servem de base para o desenvolvimento de sistemas parecidos com um óleo viscoso e com propriedades peculiares como o OR e a técnica de preparo utilizada (emulsificação espontânea) se mostrou capaz de produzir um sistema misto de lecitina e P123 monodisperso e estável para o óleo.

Além disso, a NEFT<sub>SR</sub> apresentou parâmetros de estabilidade interessantes considerando a possível aplicação tópica do sistema, além de ter encapsulado uma quantidade razoável de timol. Os resultados deste trabalho servem de base para estudos futuros considerando o desenvolvimento de uma NE com a finalidade proposta.

## 7 REFERÊNCIAS

AJETUNMOBI, O. H. et al. Antifungal therapy of Candida biofilms: Past, present and future. **Biofilm**, v. 5, 1 dez. 2023.

AKAY, S.; KAYAN, B. Aqueous solubility and chromatographic studies of antifungal drug-fluconazole at high temperature conditions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 328, p. 115438, 2021.

ANKUR GUPTA, H. BURAK ERAL, T. ALAN HATTON, P. S. D. Nanoemulsions: Formation, Properties and Applications. **Soft Matter**, n. 12, p. 2826–2841, 2016.

ANVISA. **Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017**. [s.l: s.n.].

ARAUJO, V. H. S. et al. Validation of an innovative analytical method for simultaneous quantification of curcumin and fluconazole using high-performance liquid chromatography from nanostructured lipid carriers. **Journal of Separation Science**, v. 44, n. 23, p. 4264–4273, 1 dez. 2021.

BLOKHINA, S. et al. Experimental investigation of fluconazole: Equilibrium solubility and sublimation. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 151, 1 dez. 2020.

BOUCHEMAL, K. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n. 1–2, p. 241–251, 2004.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86–96, 2017.

CASTANHEIRA, M. et al. Analysis of global antifungal surveillance results reveals predominance of Erg11 Y132F alteration among azole-resistant Candida parapsilosis and Candida tropicalis and country-specific isolate dissemination. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 1, p. 105799, 2020.

CHANG, Y.; MCLANDBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of carvacrol nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 37, p. 8906–8913, 2013.

CHANTASART, D. et al. Effects of oxygen-containing terpenes as skin permeation enhancers on the lipoidal pathways of human epidermal membrane. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 10, p. 3617–3632, 2009.

CHAVES RUELA CORRÊA, J.; REICHMAN HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO, C.; DUARTE VIANNA-SOARES, C. **Performance characteristics of high-performance liquid chromatography, first order derivative UV spectrophotometry and bioassay for Fluconazole determination in capsules** *Quim. Nova*. [s.l: s.n.].

CHEN, L. C. et al. Development and Characterization of Lecithin-based Self-assembling Mixed Polymeric Micellar (saMPMs) Drug Delivery Systems for Curcumin. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 1–12, 2016.

CHUNG, C. et al. Impact of Electrostatic Interactions on Lecithin-Stabilized Model O/W Emulsions. **Food Biophysics**, v. 13, n. 3, p. 292–303, 1 set. 2018.

COLOMBO, A. L. et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283–312, 2013.

CONEAC, G. et al. Development and Evaluation of New Microemulsion-Based Hydrogel Formulations for Topical Delivery of Fluconazole. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 4, p. 889–904, 2015.

DAMMAK, I. et al. Nanoemulsions: Using emulsifiers from natural sources replacing synthetic ones—A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 5, p. 2721–2746, 1 set. 2020.

DASH, S. et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 67, n. 3, p. 217–223, 2010.

DOI, A. M. et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2016.

EMAMI, S. et al. **Current advances of triazole alcohols derived from fluconazole: Design, in vitro and in silico studies**. *European Journal of Medicinal Chemistry* Elsevier Masson SAS, , 15 maio 2019.

FAY, V. DA S. et al. A 12-year study of fungal infections in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 36, n. 2, p. 55–60, 2019.

FERNANDES, A. V. et al. Design, preparation and in vitro characterizations of fluconazole loaded nanostructured lipid carriers. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, 2020.

FERREIRA, S. L. C. et al. Doehlert matrix: A chemometric tool for analytical chemistry - Review. **Talanta**, v. 63, n. 4, p. 1061–1067, 8 jul. 2004.

FIRACATIVE, C. Invasive fungal disease in humans: Are we aware of the real impact? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, n. 9, p. 1–9, 2020.

FUENTEFRIA, A. M. et al. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 2–13, 2018.

GUARDA, A. et al. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 144–150, 2011.

GURPREET, K.; SINGH, S. K. Review of nanoemulsion formulation and characterization techniques. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 5, p. 781–789, 2018.

JACOBSEN, I. D. et al. Commensal to Pathogen Transition of *Candida albicans*. **Reference Module in Life Sciences**, 2020.

JIMIDAR, M.; BOURGUIGNON, B.; MASSART, D. L. Application of Derringer's desirability function for the selection of optimum separation conditions in capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 740, p. 109–117, 25 jan. 1996.

JOHNSON, M. D. **Antifungals in Clinical Use and the Pipeline**. **Infectious Disease Clinics of North America** W.B. Saunders, , 1 jun. 2021.

JUNIOR, A. E. **Desenvolvimento de fibras eletrofiadas de acetato de celulose recobertas com quitosana contendo curcumina aplicadas em tratamentos cutâneos**. Doutorado em Química, área de concentração Físico-Química—[s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2020.

KARPIŃSKI, T. M. Essential oils of lamiaceae family plants as antifungals. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, 2020.

KHAN, A. et al. Effect of two monoterpene phenols on antioxidant defense system in *Candida albicans*. **Microbial Pathogenesis**, v. 80, p. 50–56, 2015.

KLANG, V.; VALENTA, C. Lecithin-based nanoemulsions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 21, n. 1, p. 55–76, 2011.

KRAISIT, P. et al. Fluconazole-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) as a potential carrier for buccal drug delivery of oral candidiasis treatment using the Box-Behnken design. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 63, n. February, p. 102437, 2021.

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, J. et al. Thymol nanoemulsions formed via spontaneous emulsification: Physical and antimicrobial properties. **Food Chemistry**, v. 232, p. 191–197, 2017.

LI, X. et al. Gelatin films incorporated with thymol nanoemulsions: Physical properties and antimicrobial activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 161–168, 2020.

LUNDSTEDT, T. et al. Experimental design and optimization. **Chemometric and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, p. 3–40, 1998.

MA, Q.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Nanoemulsions of thymol and eugenol co-emulsified by lauric arginate and lecithin. **Food Chemistry**, v. 206, p. 167–173, 2016.

MARCHESE, A. et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, v. 210, p. 402–414, 2016.

MARTIN, M. E. et al. Grape (*vitis vinifera* L.) seed oil: A functional food from the winemaking industry. **Foods**, v. 9, n. 10, 1 out. 2020.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719–1729, 2012.

MCCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. **General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018a.

MCCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. **Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review**. **Advances in Colloid and Interface Science** Elsevier B.V., , 1 jan. 2018b.

NAGOOR MEERAN, M. F. et al. Pharmacological properties and molecular mechanisms of thymol: Prospects for its therapeutic potential and pharmaceutical development. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. JUN, p. 1–34, 2017.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of opportunistic fungal infections in latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 5, p. 561–570, 2010.

PATEL, V. R. et al. **Castor oil: Properties, uses, and optimization of processing parameters in commercial production.** *Lipid Insights*Libertas Academica Ltd., , 2016.

PAVONI, L. et al. **An overview of micro-and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability.** *Nanomaterials*MDPI AG, , 1 jan. 2020.

PITTO-BARRY, A.; BARRY, N. P. E. Pluronic® block-copolymers in medicine: From chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances. **Polymer Chemistry**, v. 5, n. 10, p. 3291–3297, 2014.

RAI, V. K. et al. **Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications.** *Journal of Controlled Release*Elsevier B.V., , 28 jan. 2018.

RASSU, G. et al. Encapsulation and modified-release of thymol from oral microparticles as adjuvant or substitute to current medications. **Phytomedicine**, v. 21, n. 12, p. 1627–1632, 2014.

RÉ, A. C. S. et al. New perspectives on the topical management of recurrent candidiasis. **Drug Delivery and Translational Research**, n. 0123456789, 2021.

RIBANI, M. et al. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**Quim. Nova. [s.l: s.n.].

RIPPKE, F.; BERARDESCA, E.; WEBER, T. M. PH and Microbial Infections. **Current Problems in Dermatology (Switzerland)**, v. 54, p. 87–94, 2018.

ROBLEDO, N. et al. Thymol nanoemulsions incorporated in quinoa protein/chitosan edible films; antifungal effect in cherry tomatoes. **Food Chemistry**, v. 246, n. November 2017, p. 211–219, 2018.

SAATKAMP, R. H. **Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões revestidas por quitosana como carreadores de timol aplicadas a tratamentos de problemas da cavidade oral.** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2019.

SAATKAMP, R. H. et al. Development of thymol nanoemulsions with potential application in oral infections. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 87, 1 set. 2023.

SAFAYA, M.; ROTLIWALA, Y. C. Nanoemulsions: A review on low energy formulation methods, characterization, applications and optimization technique.

**Materials Today: Proceedings**, v. 27, p. 454–459, 2020.

SANCHES, M. P. et al. Chitosan-sodium alginate polyelectrolyte complex coating pluronic® F127 nanoparticles loaded with citronella essential oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 4, p. 803–812, 2020.

SCHAFFER, T. **Lecithin and Phospholipids - the optimal choice for natural cosmetics**. **Euro Cosmetics**, 2007.

SHAH, R. et al. Fluconazole Topical Microemulsion: Preparation and Evaluation. **Research J. Pharm. and Tech.**2, v. 2, n. 2, p. 353–357, 2009.

SHARIFZADEH, A. et al. Potential effect of 2-isopropyl-5-methylphenol (thymol) alone and in combination with fluconazole against clinical isolates of *Candida albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei*. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 28, n. 2, p. 294–299, 2018.

SILVA, D. DOS S. et al. Doehlert design in the optimization of ultrasound assisted dissolution of fish fillet samples with tetramethyl ammonium hydroxide for metals determination using FAAS. **Food Chemistry**, v. 273, p. 71–76, 1 fev. 2019.

SILVA, N. P.; SARAMAGO, S. F. P. UMA INTRODUÇÃO AO ESTUDO DE SUPERFÍCIES DE RESPOSTA. **Revista Horizonte Científico**, n. 4, 2005.

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

SIVASANKARAPILLAI, V. S. et al. Progress in natural polymer engineered biomaterials for transdermal drug delivery systems. **Materials Today Chemistry**, v. 19, p. 100382, 2021.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 246–254, 2012.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Química Nova Quimiometria. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, 8 dez. 2006.

TRIPATHY, S. K. Design , Development , and Evaluation of Sunflower Oil Based Nanoemulsion of Fluconazole. **International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 1, 30 ago. 2019.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

VLAIA, L. et al. Topical biocompatible fluconazole-loaded microemulsions based on essential oils and sucrose esters: Formulation design based on pseudo-ternary phase diagrams and physicochemical characterization. **Processes**, v. 9, n. 1, p. 1–21, 2021.

YEBOAH, A. et al. Castor oil (*Ricinus communis*): A review on the chemical composition and physicochemical properties. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 41, p. 399–413, 2021.

ZHAO, L. Y.; ZHANG, W. M. **Recent progress in drug delivery of pluronic P123: pharmaceutical perspectives. Journal of Drug Targeting** Taylor and Francis Ltd, , 3 jul. 2017.

ZIDA, A. et al. Substances naturelles actives sur *Candida albicans*, sources de nouveaux médicaments antifongiques : revue de la littérature. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 27, n. 1, p. 1–19, 2017.

**APÊNDICE A – Proporções de cada componente para os níveis superiores (+) e inferiores (-) do planejamento fatorial e a formulação final.**

Tabela 25. Valores em % (m/m) e concentração em partes por milhão (ppm) dos níveis superiores (+) dos reagentes utilizados para a produção das NEs durante o planejamento fatorial completo.

Componente	Nível superior (+)		
	Massa / g	% (m/m) após evaporação do solvente	□ / ppm
Óleo	0,6	1,47	15000
Surfactante lipofílico	0,012	0,03	300
Surfactante hidrofílico	0,12	0,29	3000
Acetona	15,82	-	-
Água	40	98,20	-
Total	56,552		

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 26. Valores em % (m/m) e concentração em partes por milhão (ppm) dos níveis inferiores (-) dos reagentes utilizados para a produção das NEs durante o planejamento fatorial completo.

Componente	Nível inferior (-)		
	Massa / g	% (m/m) após evaporação do solvente	□ / ppm
Óleo	0,2	0,50	5000
Surfactante lipofílico	0,002	0,005	50
Surfactante hidrofílico	0,04	0,10	1000
Acetona	15,82	-	-
Água	40	99,40	-
Total	56,062		

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 27. Valores utilizados para a produção da NEFT<sub>SR</sub>. Destaque ao excesso de FCZ na formulação que foi rejeitada como formulação final.

Componente	Massa / g	% (m/m) após evaporação. do solvente	□ / ppm
Óleo	0,042	0,10	1050
Surfactante lipofílico	0,012	0,03	300
Surfactante hidrofílico	0,04	0,10	1000
<b>FCZ</b>	<b>0,13</b>	<b>0,32</b>	<b>3250</b>
Timol	0,04	0,10	1000
Acetona	15,82	-	-
Água	40	99,34	-
Total	56,084		

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 28. Valores utilizados para a produção da NEFT definida como formulação final.

Componente	Massa / g	% (m/m) após evaporação. do solvente	□ / ppm
Óleo	0,2	0,50	5000
Surfactante lipofílico	0,012	0,03	300
Surfactante hidrofílico	0,04	0,10	1000
FCZ	0,04	0,10	1000
Timol	0,04	0,10	1000
Acetona	15,82	-	-
Água	40	99,18	-
Total	56,152		

Fonte: Elaborado pelo autor.

## APÊNDICE B – Perfil das funções de deseabilidade individuais

Os valores para o fator  $r$  da Equação 3 e os valores dos limites escolhidos para cada variável durante o planejamento de triagem são apresentados abaixo.

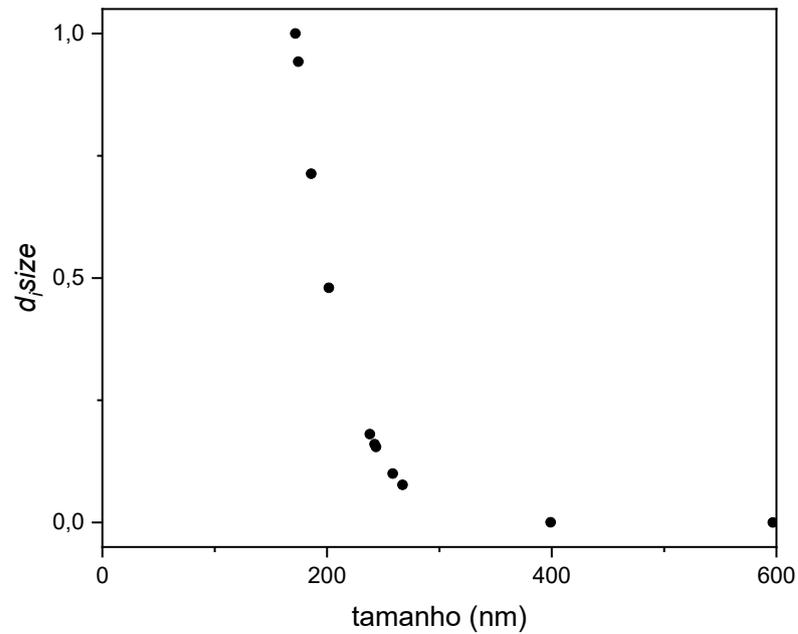


Figura 36. Gráfico da resposta *size* (tamanho médio de partículas) em função da deseabilidade ( $d_i size$ ) utilizado no planejamento de triagem.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O valor limite imposto para a variável *size* (tamanho médio de partículas) foi 200 nm (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018a), portanto, o valor do fator  $r$  da  $d_i$  para o tamanho médio de partículas foi 10,1.

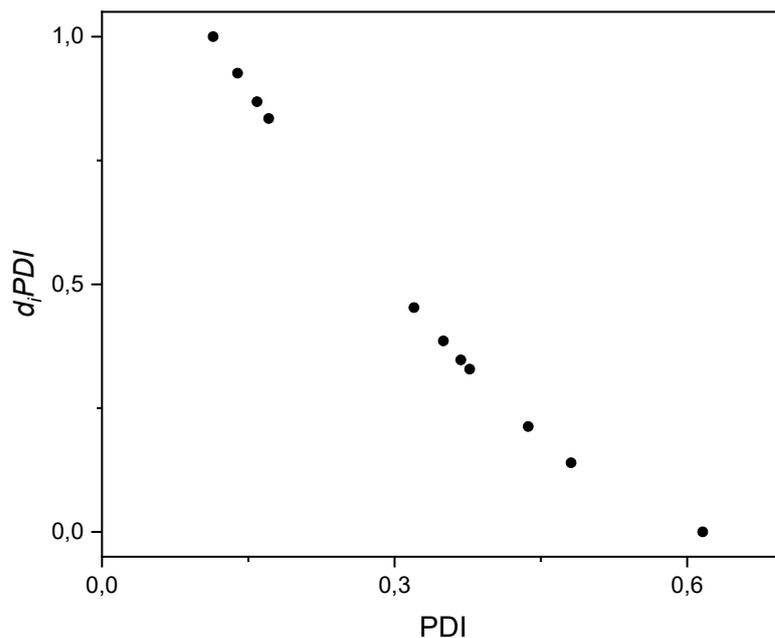


Figura 37. Gráfico da resposta PDI em função da desejabilidade ( $d_i PDI$ ) utilizado no planejamento de triagem.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O valor limite imposto para a variável PDI foi 0,3 (FERNANDES et al., 2020), portanto, o valor do fator  $r$  da  $d_i$  para o PDI foi 1,5.

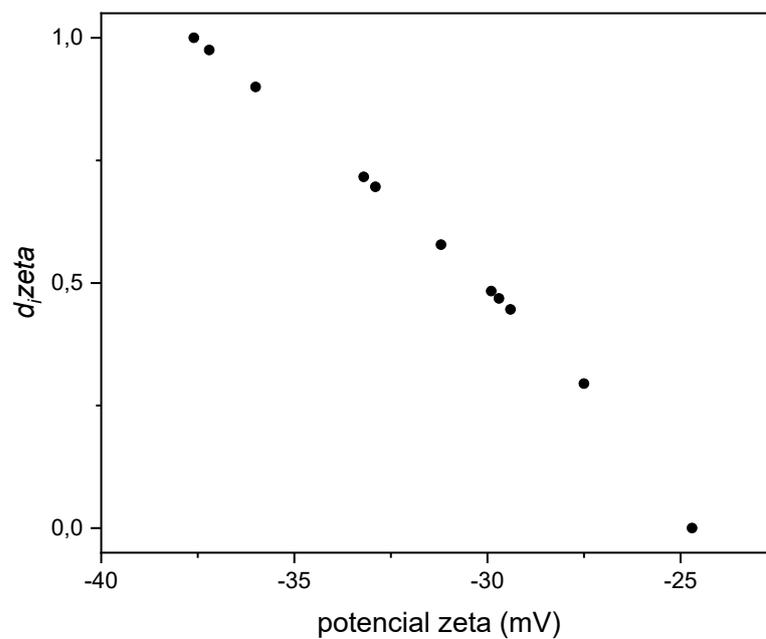


Figura 38. Gráfico da resposta zeta (potencial zeta) em função da desejabilidade ( $d_i zeta$ ) utilizado no planejamento de triagem.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O valor limite imposto para a variável zeta foi -30 mV (KLANG; VALENTA, 2011; SINGH et al., 2017) portanto, o valor do fator  $r$  da  $d_i$  para o potencial zeta foi 0,8.

Assim, todas as formulações que apresentarem tamanhos < 200 nm, valores de PDI < 0,3 ou potencial zeta < -30 mV devem gerar valores de  $D$  maiores que 0,5 e, portanto, são consideradas adequadas.

Os valores para o fator  $r$  da Equação 3 e os valores dos limites escolhidos para cada variável durante a MSR são apresentados abaixo.

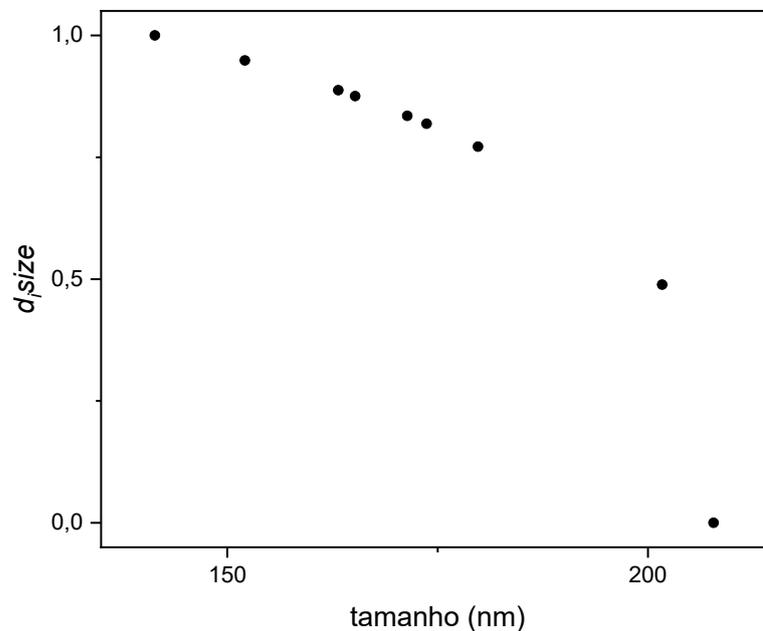


Figura 39. Gráfico da resposta  $size$  (tamanho médio de partículas) em função da desejabilidade ( $d_{size}$ ) utilizado na MSR.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Aqui, novamente, o valor limite imposto para a variável  $size$  (tamanho médio de partículas) se manteve o mesmo em 200 nm, portanto, o valor do fator  $r$  da  $d_i$  para o tamanho médio de partículas neste caso foi 0,3.

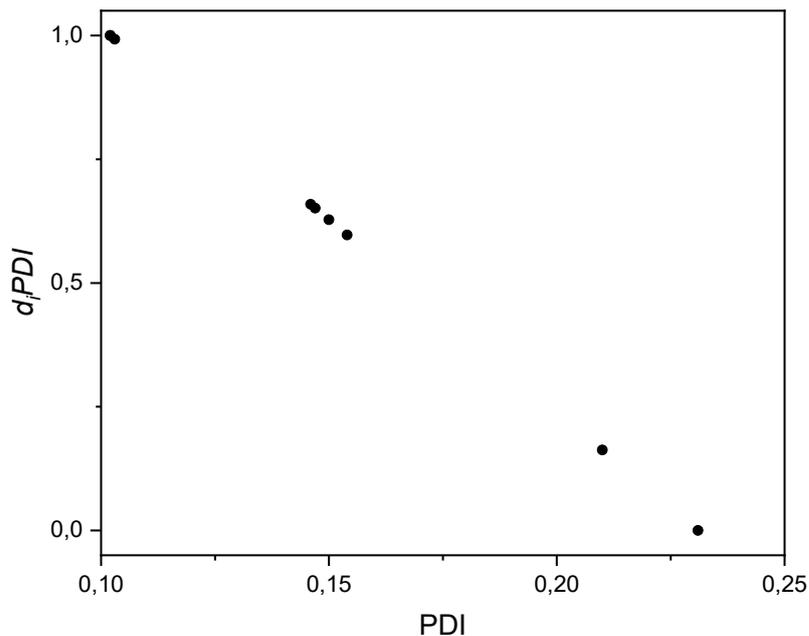


Figura 40. Gráfico da resposta PDI em função da deseabilidade ( $d_i PDI$ ) utilizado na MSR.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

O valor limite imposto para a variável PDI foi 0,3, portanto, o valor do fator  $r$  da  $d_i$  para o PDI foi 1. Aqui, não houve mudança no perfil linear da função  $d_i$ , uma vez que todas as formulações produzidas apresentaram valores de PDI menores que 0,3.

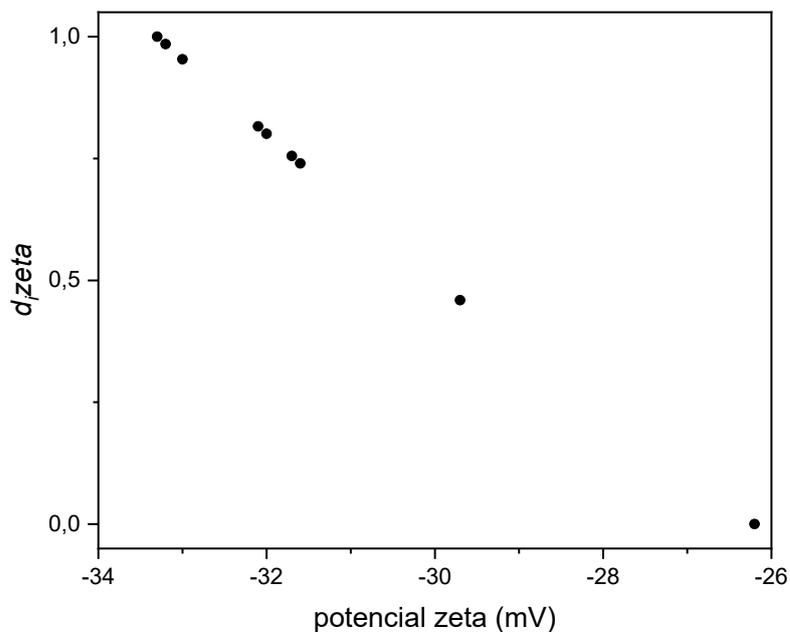


Figura 41. Gráfico da resposta zeta (potencial zeta) em função da deseabilidade ( $d_i zeta$ ) utilizado na MSR.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

O valor limite imposto para a variável *zeta* foi -30 mV, portanto, o valor do fator  $r$  da  $d_i$  para o potencial *zeta* foi 1,1.

## APÊNDICE C – Gráficos de Pareto para as variáveis dependentes individuais.

Foi gerado um gráfico de Pareto para cada variável no software Statistica (v13.5) da Tibco com os dados da Tabela 14.

### 1. Tamanho médio das partículas (variável *size*):

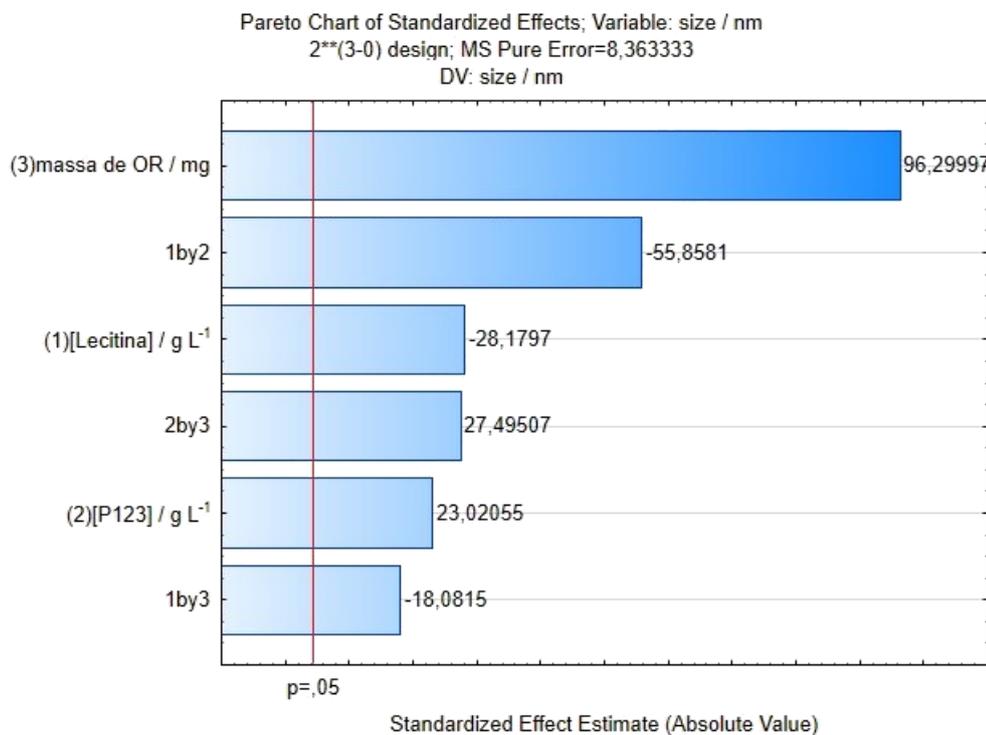


Figura 42. Gráfico de Pareto para a variável dependente correspondente ao tamanho médio de partículas (variável *size*) com os coeficientes dos efeitos principais e de interação normalizados para  $p = ,05$ .

Fonte: Elaborado pelo autor no software Statistica (v13.5) da Tibco com os dados da Tabela 14.

O gráfico de Pareto gerado para a variável dependente *size* (Figura 42), mostra que em termos dos tamanhos médios de partículas, todos os fatores estudados apresentaram efeitos (principais e de interação) bastante significativos ( $p = ,05$ ), semelhante ao resultado para a resposta combinada *D*.

Observando os dados da Tabela 14 fica claro o impacto do aumento da massa de OR no diâmetro das gotículas das NEs.

O peso maior atribuído ao tamanho de partículas na  $D$  ( $r = 10,1$ ), pode ter influenciado no efeito mais pronunciado das variáveis nos valores observados para os tamanhos. O tamanho médio das partículas em uma NE é de fato o parâmetro mais significativo quando se busca avaliar a estabilidade de NEs. (KLANG; VALENTA, 2011) O PDI e potencial zeta também tem um papel importante em garantir a estabilidade prolongada da dispersão, onde um sistema monodisperso resistirá melhor aos efeitos do amadurecimento de Ostwald e partículas com potencial zeta elevado ( $> |30|$  mV) se repelem com maior eficiência.

## 2. PDI:

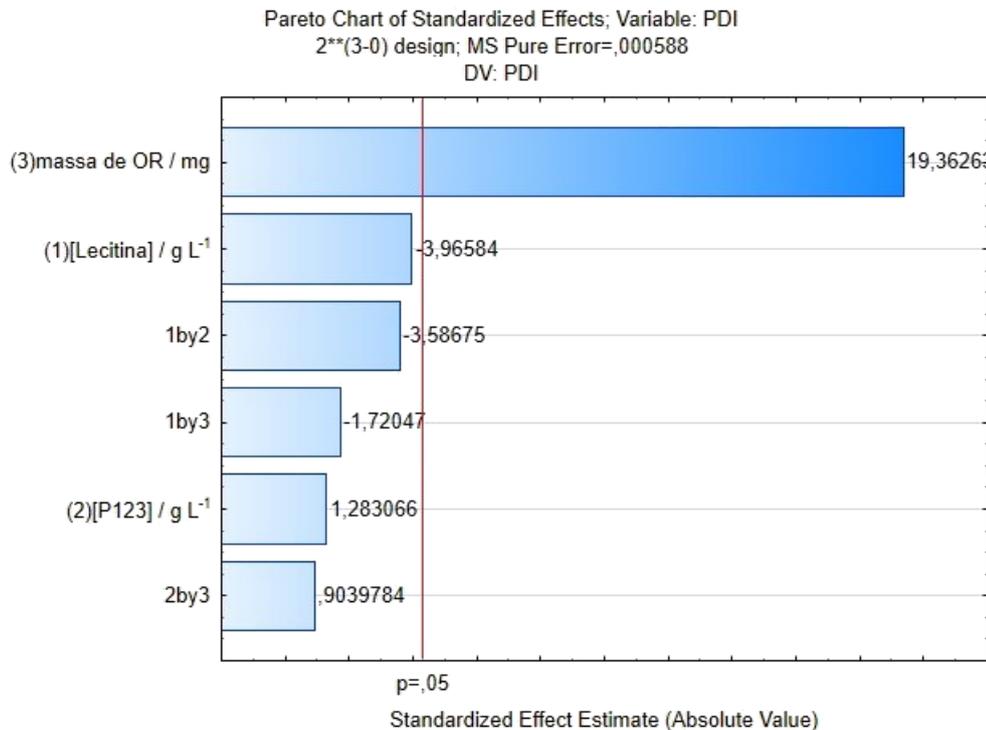


Figura 43. Gráfico de Pareto para a variável dependente correspondente ao PDI com os coeficientes dos efeitos principais e de interação normalizados para  $p = ,05$ .

Fonte: Elaborado pelo autor no software Statistica (v13.5) da Tibco com os dados da Tabela 14.

Aqui novamente o efeito da massa de OR se destaca. Nota-se também que os sinais dos efeitos são os mesmos do gráfico da Figura 42. Comparada à variação na massa de OR, as variações nas concentrações dos surfactantes dentro dos intervalos estudados não alteraram significativamente o PDI das NEs.

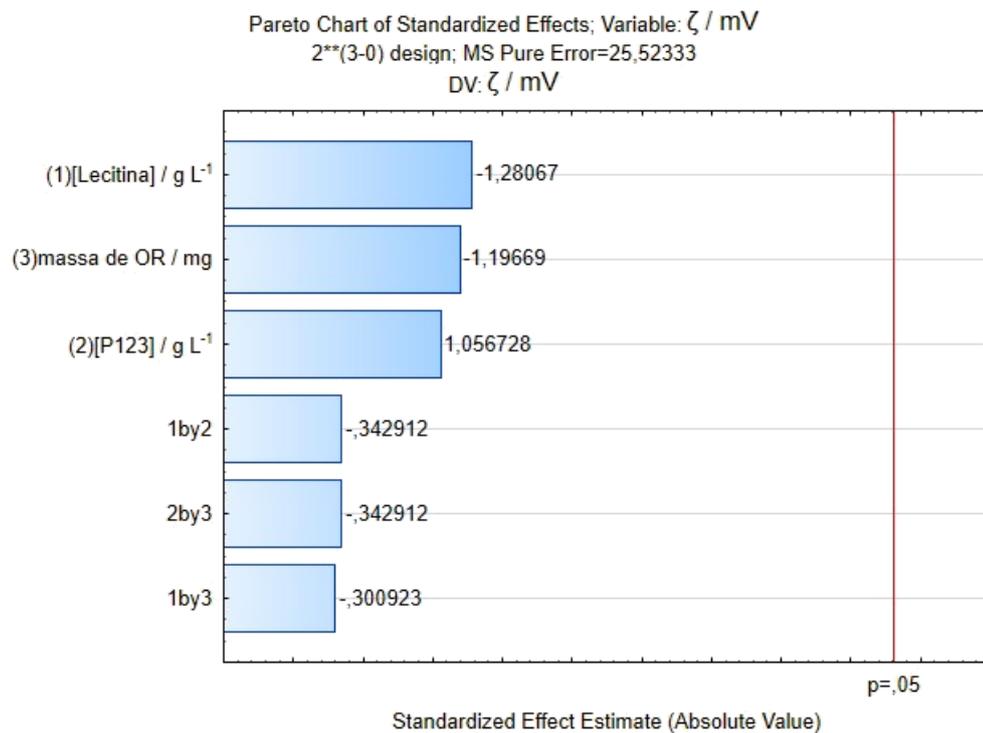


Figura 44. Gráfico de Pareto para a variável dependente correspondente ao potencial zeta ( $\zeta$ ) com os coeficientes dos efeitos principais e de interação normalizados para  $p = ,05$ .

Fonte: Elaborado pelo autor no software Statistica (v13.5) da Tibco com os dados da Tabela 14.

O gráfico da Figura 44 deixa evidente que a variação do potencial zeta das partículas na dispersão depende mais da natureza dos componentes da NE do que das suas quantidades, dentro dos intervalos de concentração e massa estudados. O gráfico justificaria um questionamento da inclusão do potencial zeta no cálculo da  $D$ . Porém, essa comparação foi feita e o resultado final foi o mesmo, onde a NE#2 se mostrou a melhor formulação. Portanto, ao final decidiu-se por manter o potencial zeta no cálculo da  $D$ .

## APÊNDICE D – Domínio experimental do planejamento fatorial completo.

O domínio experimental pode ser visualizado geometricamente (Figura 45), observa-se que o efeito calculado para cada experimento (vértices do cubo) apresenta algo grau de concordância com os valores de  $D$  para cada NE. Entre parêntesis são apresentados os valores de  $D$  para um intervalo de confiança de 95%.

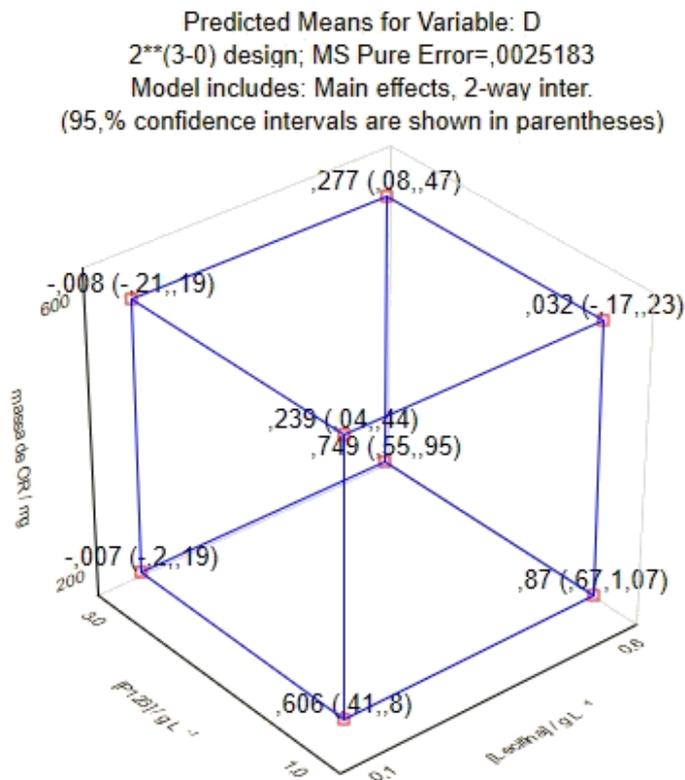


Figura 45. *Plot* cúbico do domínio experimental. Os valores atrelados a cada vértice representam o efeito médio previsto pelo modelo para cada experimento. Entre parêntesis estão os intervalos de confiança para cada efeito. Os efeitos foram calculados em termos da variável  $D$ .

Fonte: Elaborado pelo autor no software Statística (v13.5) da Tibco com os dados da Tabela 14.

A qualidade da aproximação gerada pelo modelo para descrever os dados pode ser atribuída ao ajuste do valor de  $r$  durante a combinação das respostas via a função  $D$ . A definição de valores definidos como limites para a seleção da NE

adequada se mostrou bastante útil nesse caso. A melhor formulação desta etapa do planejamento foi definida com base na  $D$  e o gráfico da Figura 45 suportou a escolha.

## APÊNDICE E – Testes de atividade antifúngica por halo de inibição.

Abaixo são apresentadas imagens dos testes preliminares de atividade antifúngica por halo de inibição. Esses testes foram realizados para as formulações otimizadas na MSR (NEF<sub>SR</sub> e NEFT<sub>SR</sub>) e são apresentados abaxio (ver Tabela 29-32).

### *C. parapsilosis* (ATCC 22019):

Tabela 29. Resultados do teste de atividade antifúngica por halo de inibição para *C. parapsilosis* (ATCC 22019).

Amostra	Halo de inibição / mm
Sol. Fluconazol	12,6
Sol. Timol	4,1
NEF <sub>SR</sub>	15,5
NEFT <sub>SR</sub>	23,2



Figura 46. Placa com os halos de inibição para a *C. parapsilosis* (ATCC 22019).

***C. albicans* (ATCC 10231):**

Tabela 30. Resultados do teste de atividade antifúngica por halo de inibição para *C. albicans* (ATCC 10231).

Amostra	Halo de inibição / mm
Sol. Fluconazol	19,2
Sol. Timol	0
NEF <sub>SR</sub>	24,1
NEFT <sub>SR</sub>	24,6

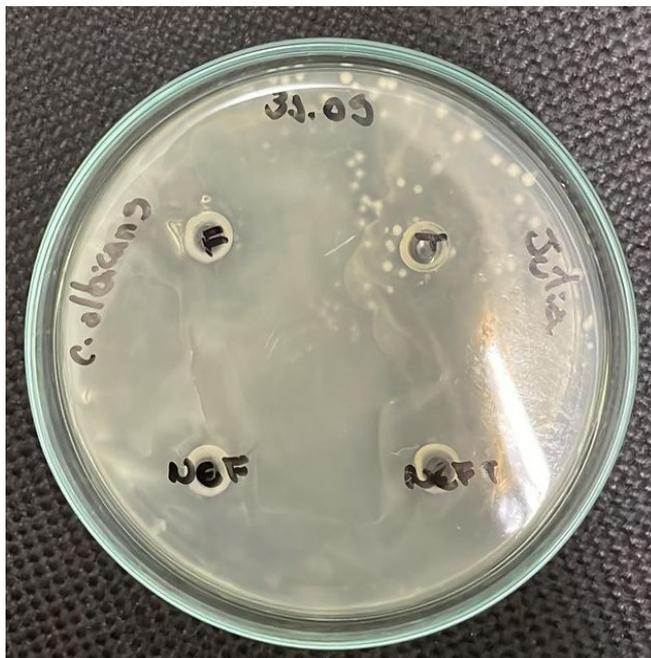


Figura 47. Placa com os halos de inibição para a *C. albicans* (ATCC 10231).

***C. glabrata* (CG MT 29):**

Tabela 31. Resultados do teste de atividade antifúngica por halo de inibição para *C. glabrata* (CG MT 29).

Amostra	Halo de inibição / mm
Sol. Fluconazol	19,1
Sol. Timol	10,2
NEF <sub>SR</sub>	15,3
NEFT <sub>SR</sub>	22,2



Figura 48. Placa com os halos de inibição para a *C. glabrata* (CG MT 29).

***C. krusei* (ATCC 6258):**Tabela 32. Resultados do teste de atividade antifúngica por halo de inibição para *C. krusei* (ATCC 6258)

Amostra	Halo de inibição / mm
Sol. Fluconazol	10,8
Sol. Timol	0
NEF <sub>SR</sub>	11,3
NEFT <sub>SR</sub>	11,1

Figura 49. Placa com os halos de inibição para a *C. krusei* (ATCC 6258).

## ANEXO A – DESCRIÇÃO

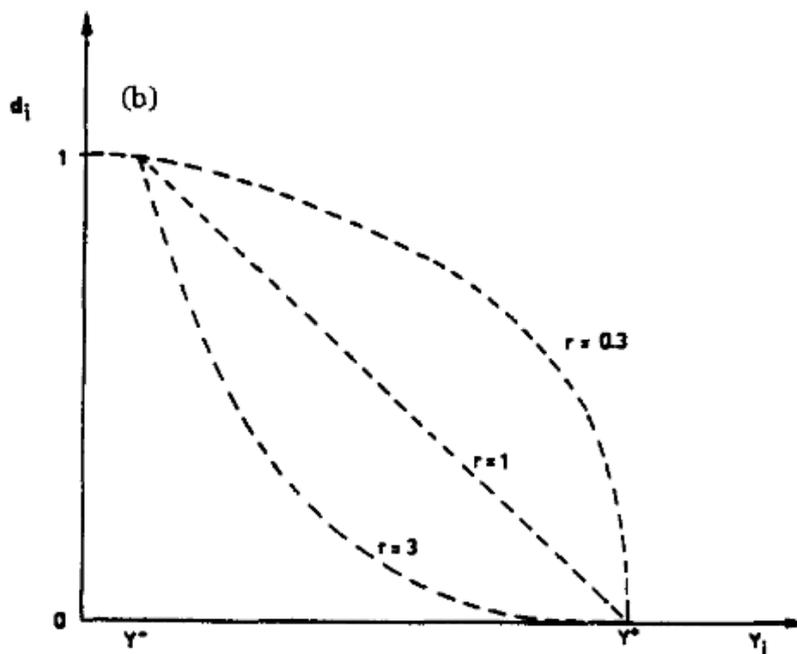


Figura 50. Perfil da função desejabilidade ( $d_i$ ). As linhas curvas correspondem ao perfil que a curva de resposta ( $y_i$ ) vs. desejabilidade ( $d_i$ ) deve assumir quando o valor do fator  $r$  é modificado. A curva apresentada na figura representa uma desejabilidade onde é maximizada a mínima resposta. (JIMIDAR; BOURGUIGNON; MASSART, 1996)