



CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS REDISPERSÍVEIS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM-PIMENTA

GABRIELA A. GIL*, LETÍCIA KAKUDA, WANDERLEY P. DE OLIVEIRA

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP

*e-mail: gabi.gil@usp.br e gabi.gabriela.gil.10@gmail.com

RESUMO - O óleo essencial extraído da *Lippia sidoides* Cham., popularmente conhecido por alecrim-pimenta, possui importante ação inseticida, antifúngica, antibacteriana e anti-inflamatória. No entanto, os óleos essenciais podem ser facilmente volatilizados e oxidados, bem como podem levar a intoxicações e sensibilizações dos pacientes. Dessa forma, o uso de técnicas de nanoencapsulação e secagem podem contribuir para melhoria da sua estabilidade, segurança e eficácia. Neste trabalho foram produzidos carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) contendo óleo essencial de *L. sidoides* com duas possibilidades de surfactantes (Poloxamer 407[®] ou uma mistura de Poloxamer 407[®] e CTAB[®]), avaliando a estabilidade das formulações por 28 dias. As formulações estáveis foram secas por liofilização com duas diferentes composições de crioprotetores (manitol:trealose:Aerosil[®] 200 ou goma arábica:maltodextrina:Aerosil[®] 200). As propriedades das formulações líquidas com e sem adjuvantes foram comparadas com os NLCs secos após redispersão à mesma concentração original. Todas as formulações apresentaram variações significativas nas propriedades dos NLC após a liofilização. As formulações contendo açúcares e polióis na composição, e menor concentração de Aerosil[®] 200 sofreram menor variação no tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta após redispersão, evidenciando viabilidade da tecnologia desenvolvida.

INTRODUÇÃO

A *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) é uma planta nativa do nordeste brasileiro, especialmente nos locais de clima semiárido. Esta espécie está inserida na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS - RENISUS (Brasil, 2009). O óleo essencial (OE) – também chamados de óleo volátil – extraído a partir de suas folhas possui várias atividades biológicas comprovadas, tais como ação inseticida, antifúngica, antibacteriana, antileishmania, larvicida, acaricida e anti-inflamatória (Baldim et al., 2019), geralmente associadas à presença dos monoterpenos timol e o seu isômero carvacrol. Estes compostos são capazes de promover o aumento da permeabilidade da membrana de fungos e bactérias, o que resulta na liberação do conteúdo intracelular para o

meio e no desequilíbrio hidroeletrolítico. Além disso, esses compostos atuam na supressão da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e na inibição da produção das citocinas e mediadores inflamatórios (Almeida, 2015), minimizando sinais de dor e inflamação.

Entretanto, como a maioria dos OEs, seus ativos podem ser facilmente volatilizados ou oxidados, dificultando a sua aplicação na forma nativa. Ademais, devido concentração significativa de ativos, os OE podem, se administrados incorretamente, promover a sensibilização da pele e a intoxicação do paciente – devido a considerável absorção sistêmica – aumentando o risco de efeitos adversos graves, dores de cabeça e irritação no trato gastrointestinal (Bilia et al., 2014).

O emprego de processos de nanoencapsulação podem contribuir para a solução de várias

dessas limitações, proporcionando novas propriedades aos OEs, além de aumentarem a segurança, eficácia e a qualidade do produto (Cortés-Rojas e Oliveira, 2012). Existem uma grande variedade de processos de encapsulação, e no setor farmacêutico se destacam os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs). Recentemente, diversos autores têm proposto a encapsulação dos OEs e outros ativos vegetais em sistemas lipídicos (Baldim et al., 2019; Bankole et al., 2020, Secolin et al., 2017), a fim de favorecer a liberação sustentada, contribuir para o aumento da estabilidade e bioatividade, bem como para reduzir os riscos de toxicidade e de irritação da pele, permitindo sua aplicação em formulações tópicas estáveis e eficazes (Costa e Santos, 2017).

NLCs são carreadores cuja matriz é constituída por uma mistura de lipídeos sólidos e líquidos (óleos), contribuindo para que a matriz permaneça sólida em temperatura ambiente e corporal. Para a estabilização das NLCs em dispersões aquosas, é empregado um surfactante – ou uma mistura de surfactantes. A morfologia e a capacidade de carregamento dos NLCs estão diretamente relacionadas à escolha adequada dos lipídios sólidos e líquidos, bem como dos surfactantes empregados na sua produção (Souto et al., 2020).

No entanto, para que um produto possa ser comercializado é imprescindível que ele seja estável ao longo de todo o processo de produção, transporte, comercialização e uso pelo consumidor. Para tanto, deve-se realizar a avaliação da estabilidade averiguando a presença dos fenômenos de instabilidade, tais como: cremação, sedimentação, inversão de fases, coalescência e quebra da emulsão, principalmente para produtos comercializados na forma líquida. Tais fenômenos podem ocorrer devido a um conjunto de fatores, tais como: ação de microrganismos, alterações na temperatura e incompatibilidade de componentes da formulação (Baldim, 2017; Baldim et al., 2019; Weigel et al., 2018).

A secagem dos NLCs por liofilização permite a obtenção de produtos secos de alta qualidade e relativamente estáveis frente à oxidação, em partes devido às baixas temperaturas envolvidas e à ausência de água na forma líquida durante o processo (Calvo et al., 2011).

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi encapsular o OE de *L. sidoides* Cham. em NLCs e liofilizar essas formulações, avaliando a influência da adição de crioprotetores e sobre as características das nanopartículas, visando a obtenção de um sistema redispersível para posterior aplicação em formulações antifúngicas de uso tópico.

METODOLOGIA

Encapsulação do OE de *L. sidoides* em Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (NLC)

Para o desenvolvimento dos NLCs, se utilizou o Precirol[®] ATO 5 (Gattefossé; França), ácido oleico (Synth; Brasil) e os surfactantes Poloxamer 407[®] (BASF, EUA) e o Brometo de Cetiltrimetilamônio - CTAB[®] (Sigma-Aldrich; Alemanha). Como ativos foram utilizados o OE de *L. sidoides* Cham. (PRONAT; Ceará, Brasil) e como controle o timol (Sigma-Aldrich; Alemanha). O método de preparo foi de inversão de fases desenvolvido em trabalhos anteriores do Grupo LAPROFAR (Baldim et al., 2019; Rosa e Oliveira, 2018). A fase lipídica – contendo Precirol[®] e ácido oleico – foram aquecidas em banho-maria até a fusão do lipídio sólido. A fase aquosa – contendo água e os surfactantes (Poloxamer[®] e/ou CTAB[®], de acordo com a formulação preparada) – foi aquecida à mesma temperatura. O timol foi aquecido junto a fase lipídica, enquanto o OE de *L. sidoides* Cham. foi adicionado à fase lipídica somente após a fusão. Com ambas as fases aquecidas à mesma temperatura, verteu-se a fase aquosa na fase lipídica. Em seguida, o sistema foi submetido à homogeneização no UltraTurrax (IKA modelo T18 basic, Wilmington, EUA) a 22.000 rpm por 3 minutos e no processador ultrassônico (SONICS Vibracell modelo CV334, Newtown, EUA) com sonda de 13 mm e amplitude de 45% por 30 minutos (6 ciclos de 5 minutos *on* e 2 minutos *off*) com a formulação mantida em banho-maria de gelo (Baldim et al., 2019; Rosa e Oliveira, 2018).

A princípio, dividiu-se as formulações em dois grandes grupos a partir da presença de cada tensoativo: “F1” – designando aquelas contendo apenas Poloxamer 407[®] – e “F2” – representado aquelas que apresentam uma combinação entre o Poloxamer 407[®] e o CTAB[®]. A

partir desses grupos, as formulações foram subdivididas de acordo com a presença (ou não) de Timol e OE, sendo denominadas: “B” na ausência de ativos (branco); “T” quando apresentam o Timol; e “LS” para as formulações que contêm o OE de *L. sidoides*. O pH das formulações de NLC do grupo F2 foi neutralizado para que respeitasse o pH da pele – normalmente na faixa de 4,1 a 5,8 – com a adição de aminometil propanol (AMP-ULTRA[®] PC 2000 - Angus chemical, EUA), e auxílio do peagômetro.

Depois de preparadas, as formulações foram submetidas a testes preliminares de estabilidade das formulações considerando as características organolépticas, o pH, o tamanho de partícula, o índice de polidispersão e o potencial de zeta. Para tanto, as formulações de NLC foram armazenadas em recipientes de vidro fechados e mantidas em temperatura ambiente por um período de 28 dias, sendo analisadas após 24 horas (0), 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias do preparo em temperatura ambiente (~25 °C).

Avaliação das características organolépticas: Foram monitoradas possíveis alterações nos parâmetros: cor (classificando as formulações em “branca”, “levemente amarelada” e “amarelada”); odor (identificando como “característico” ou “alterado”) e separação de fases.

Determinação do pH: O pH das formulações foi obtido, em triplicata, com o peagômetro (Metrohm modelo 827; Suíça) devidamente calibrado (Cola et al., 2016).

Determinação do tamanho de partícula e índice de polidispersão (PdI): O tamanho de partícula e o índice de polidispersão foram obtidos por meio do espalhamento de luz dinâmica (Dynamic Light Scattering - DLS), capaz de medir a velocidade das partículas submetidas ao movimento browniano (Baldim et al., 2019; Bhattacharjee, 2016). Dessa forma, pequenas amostras das formulações foram diluídas em concentrações 1/500 (v/v) com água deionizada e devidamente agitadas por um agitador magnético por 30 minutos, permanecendo sob agitação até o momento da análise. Para a obtenção dos dados (triplicata), 1000 µL da solução diluída foram transferidos para a cubeta e, então, analisados no Zetasizer (Malvern modelo Nano - ZS90; Inglaterra) no modo *Size* a 25 °C.

Determinação do potencial zeta: O potencial zeta foi determinado por microeletroforese (Baldim et al., 2019; Bhattacharjee, 2016).

Dessa forma, pequenas amostras das formulações foram diluídas em concentrações 1/500 com água deionizada e devidamente agitadas por um agitador magnético por 30 minutos, permanecendo sob agitação até o momento da análise. Para a obtenção dos dados (triplicata), 750 µL da solução diluída foram transferidos para a célula capilar descartável e, então, analisados no Zetasizer (Malvern modelo Nano - ZS90; Inglaterra) no modo *Zeta Potencial* a 25°C.

Liofilização dos NLCs

A secagem dos NLCs foi realizada por liofilização com o emprego de agentes crioprotetores para estabilização de acordo com protocolos experimentais desenvolvidos anteriormente pelo grupo de pesquisa LAPROFAR (Cortes-Rojas et al., 2018; Baldim et al., 2020; Bankole et al., 2020). Foram utilizadas duas combinações de agentes crioprotetores: a primeira combinação (C1) foi formada por manitol (Natural Pharma[®]; Brasil) (5,0%), trealose diidratada (TCI, Japão) (14,0%) e dióxido de silício coloidal – Aerosil 200[®] (EVONIK; Alemanha) (1,0%); a segunda combinação (C2) consistiu em Aerosil 200[®] (3,8%), goma arábica (Nexira; Brasil) (11,5%) e maltodextrina MOR REX[®] 1910 (Ingredion; Brasil) (23,1%). Em ambos os casos, cada agente crioprotetor foi pesado e transferido a um béquer de grande volume. Adicionou-se água aos poucos, mantendo o sistema sob agitação constante, até serem obtidas soluções de crioprotetores concentradas.

Amostras das formulações de NLC foram pesadas e acrescidas da solução de crioprotetores na proporção 4:1 (m/m – base seca), sendo armazenadas em tubos de falcon de 50 mL. Em seguida, foram congeladas a -20 °C por 12 horas e, posteriormente, a -80 °C por mais 4 horas. Após o congelamento, foram liofilizadas por 48 horas em um liofilizador (modelo SNL108B; Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, EUA) contendo uma unidade liofilizadora Micromodulvo 1,5 L (305×330×432 mm), um condensador em aço inoxidável, um compressor de 1/4 hp e potência de 0,30 kw, uma bomba de ultra-vácuo LyoPump VLP195FD, recipientes para liofilização e válvulas independentes.

As amostras dos NLCs liofilizados foram caracterizadas pela determinação da umidade e atividade de água.

Umidade: O conteúdo de umidade das NLCs liofilizadas foi analisado pelo método de titulação por Karl Fischer (Metrohm; Herisau, Suíça).

Atividade de água (a_w): As análises de atividade de água foram determinadas no medidor de atividade de água Aqua Lab 4TEV Decagon Devices (Pullman, EUA).

As formulações liofilizadas de NLC foram redispersas em água ultrapura em concentração equivalente à da amostra líquida original e agitadas por um período de 30 minutos (Baldim et al., 2017). Em seguida, foram avaliadas quanto ao tamanho de partícula, ao índice de polidispersão e ao potencial de zeta, seguindo a mesma metodologia adotada para caracterização das formulações líquidas. Os dados obtidos foram comparados com os parâmetros estabelecidos na análise das amostras das formulações de NLC líquidas acrescidas de crioprotetores que produzidas do processo de liofilização.

Análise e Tratamento dos Dados

O tratamento estatístico dos resultados experimentais foi realizado com o auxílio de softwares Prism GraphPad 8.4.3 (San Diego, EUA) e Origin 9.7.0.185 (Massachusetts, EUA), empregando análises adequadas para cada tipo de experimento. Para avaliação da normalidade das populações, foi empregado o teste de Shapiro-Wilk. Para distribuição normal utilizou-se ANOVA one-way com pós-teste de Tukey, enquanto para distribuição não normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com o pós-teste Dunns. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento, Caracterização e Avaliação da Estabilidade dos NLCs

Avaliação das características organolépticas: A ocorrência de separação de fases, bem como alterações na cor e no odor da formulação pode significar a existência de fenômenos de instabilidade – tais como cremeação, sedimentação, inversão de fases, coalescência e quebra da emulsão – ou de contaminações por microrganismos (McClements, 2007; Baldim et al., 2019). Nesses critérios, todas as formulações apresentaram indicativos de estabilidade, não sendo observadas alterações significativas

no período de 28 dias. As formulações com ausência de ativos (F1-B ou F2-B) ou contendo Timol (F1-T e F2-T) apresentaram coloração branca, enquanto as formulações contendo o OE de *L. sidoides* Cham (F1-LS e F2-LS) possuíam uma tonalidade amarelada característica do OE utilizado em sua preparação.

Determinação do pH: O pH das formulações de NLC F2 foi neutralizado com AMP, permitindo a correção do pH ácido – entre 2,71 a 2,80 – para valores compatíveis com o pH da pele. Dessa forma, as formulações finais desenvolvidas apresentaram pH entre 4,12 e 5,05, característica essencial para produtos de uso tópico que não desestabilizem a barreira de proteção cutânea e, conseqüentemente, não provoquem ardência, coceiras, vermelhidão ou descamação epidérmica (Proksch, 2018). A ocorrência de variações significativas no pH de uma formulação pode indicar a instabilidade da fase aquosa e a perda da estabilidade dos seus componentes – por exemplo, devido à hidrólise dos seus grupos funcionais (Cola et al., 2016). Os resultados obtidos indicaram uma diminuição estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) do pH entre os tempos de 0 e 28 dias para a formulação F1-B, F1-LS, F2-B e F2-LS, sem, contudo, tornar as formulações inadequadas para aplicação tópica. As formulações contendo Timol (F1-T e F2-T) não sofreram variações significativas no decorrer dos 28 dias de estudo.

Tamanho de partícula e índice de polidispersão (PdI): O acompanhamento desses parâmetros permite avaliar possíveis ocorrências de fenômenos de instabilidade. Todas as formulações apresentaram tamanhos de partículas dentro da faixa nanométrica e, com exceção da F2-T, nenhuma demonstrou variações estatísticas significativas em um período de 28 dias (Figura 1.a). Todas as formulações apresentaram pouca ou nenhuma variação estatística significativa do índice de polidispersão (Figura 1.b). Ademais, a maioria das formulações apresentam PdI inferior a 0,3 – indicando uma população com baixa polidispersão e com partículas mais homogêneas – enquanto as demais, possuem PdI inferior a 0,5 – indicando populações com média polidispersão (Chirayil et al., 2017).

Potencial zeta: O acompanhamento do potencial zeta permite avaliação da estabilidade das formulações por meio da carga superficial

das nanopartículas. Para tanto, deve-se considerar o valor em módulo, no qual potenciais superiores 30 mV (em módulo), possuem elevada estabilidade – portanto, quanto maior o valor, maior a estabilidade elétrica (Shrestha et al., 2014). Na Figura 1.c é possível se observar que todas as formulações possuem valores de potencial zeta superiores a 25 mV, indicando elevado potencial dos surfactantes em estabilizar os NLCs. Enquanto o Poloxamer[®] é um polímero não-iônico e não-tóxico capaz promover o efeito estérico entre as nanopartículas, evitando a agregação, o CTAB[®] é um surfactante catiônico que promove o aumento de cargas positivas na superfície das nanopartículas, levando a repulsão eletrostática e, conseqüentemente, favorecendo a estabilização das NLCs (Souto et al., 2020). Devido a isso, as formulações F2 podem ser consideradas mais estáveis, visto que somente as formulações do grupo F1 apresentaram variação estatística significativa ($p \leq 0,05$) no decorrer dos 28 dias de acompanhamento, uma vez que nesse período ocorreu um aumento do potencial zeta.

O elevado potencial zeta se deve ao acúmulo de cargas na superfície das nanopartículas, contribuindo para que os seus tamanhos sejam reduzidos e homogêneos, bem como aumentando a estabilidade da formulação e evitando a ocorrência de fenômenos de agregação ou coalescência (Duracher et al., 1998; Tan et al., 2010; Nguyen et al., 2012). As formulações F1 apresentam carga negativa, enquanto as F2 apresentam carga positiva. Isso é uma consequência direta das cargas dos surfactantes utilizados no preparo das NLCs (Rosa e Oliveira, 2018), de forma que a carga positiva das F2 ocorre devido a presença do CTAB.

Liofilização dos NLCs e Caracterização das Formulações Líquidas com Crioprotetores, Produtos Secos e Redispersos

A liofilização é um processo industrial capaz de remover a água de formulações previamente congeladas através da sublimação e desorção à vácuo (Varshosaz et al., 2012). Contudo, esse procedimento expõe os NLCs a um congelamento em baixas temperaturas e a dois processos de secagem, conseqüentemente, facilitando a ocorrência de alterações na estrutura cristalina e nas propriedades dos liofilizados (Varshosaz et al., 2012; Franzé et al., 2018).

Dessa maneira, visando minimizar esses prejuízos podem ser adicionados agentes crioprotetores à formulação líquida, promovendo o aumento da estabilidade e da capacidade de redispersão do produto seco, bem como reduzindo a perda de ativos e os riscos da formação de agregados de nanopartículas (Mehnert & Mader, 2001; Varshosaz et al., 2012).

Para esse trabalho foram utilizados açúcares e polióis – tais como a trealose (dissacarídeo não-redutor) e o manitol, respectivamente – capazes de atuar como agentes crioprotetores e protetores de secagem. Algumas hipóteses sugerem que os açúcares são capazes de substituir a interação da água com os lipídeos (Crowe et al., 1996; Franzé et al., 2018) e de promover a vitrificação – ou seja, formam uma fase amorfa com alta viscosidade e baixa mobilidade dos lipídeos (Koster et al., 1994) – das nanopartículas (Hua et al., 2010). Além disso, foram utilizados polímeros – tais como a goma arábica e a maltodextrina – e sílica – Aerosil 200[®], capaz de se ligar à água residual da formulação, contribuindo para a obtenção de pós mais secos (Hua et al., 2010).

Contudo, mesmo com a adição dos adjuvantes de secagem, foram obtidos, para ambas as combinações de adjuvantes, pós com resíduo oleoso e com tendência a aglomeração, possivelmente indicando uma necessidade do aumento da concentração de crioprotetores a ser adicionado. No entanto, todas as amostras apresentaram facilidade em serem redispersas em água quando submetidas à agitação magnética. Umidade: A umidade das NLCs secas ficou entre 1,13% e 2,17% para as formulações com C1 e entre 1,95% e 3,46% para as formulações com C2. Considerando que com o tempo as nanopartículas liofilizadas absorvem água (Abdelwahed et al., 2006), quanto menor a umidade, maior a estabilidade dos NLCs.

Atividade de água (a_w): A atividade de água das formulações acrescidas de C1 ficou entre 0,187 e 0,260, enquanto aquelas em que foi adicionado C2 tiveram uma atividade de água entre 0,078 e 0,233. Portanto, os NLCs apresentam baixo risco de crescimento microbiano; contudo, a maioria dos NLCs – especialmente as C2 – estão suscetíveis à peroxidação lipídica, uma vez que possuem $a_w < 0,2$ (Labuza e Altunakar, 2020).

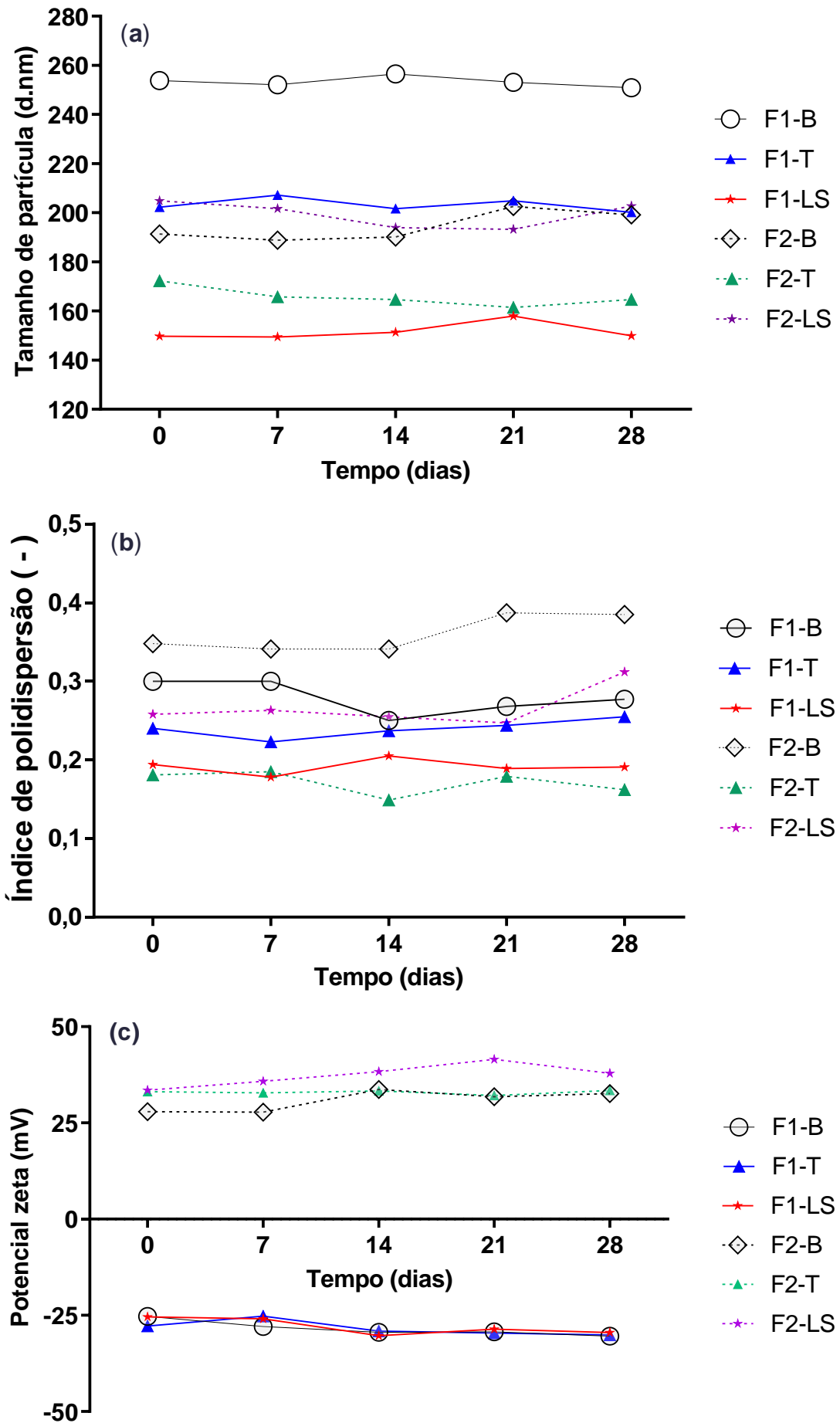


Figura 1: Tamanho de partícula (a), índice de polidispersão (b), e potencial zeta (c) das formulações líquidas avaliados por um período de 28 dias.

As formulações líquidas acrescidas de crioprotetores e as redispersões dos produtos liofilizados foram avaliadas comparativamente quanto ao tamanho de partícula, ao índice de polidispersão e ao potencial zeta, Figuras 2, 3 e 4, respectivamente.

Tamanho de partícula e índice de polidispersão (PdI): Os tamanhos de partículas das formulações C1 e C2 não sofreram alterações significativas quando comparada às formulações líquidas, exceto para a formulação F2-B(C2) – Figura 2 (d). Porém, ao se comparar o tamanho nas formulações C1 e C2 com os liofilizados redispersos R1 e R2, respectivamente, foram detectadas variações significativas ($p \leq 0,05$). De maneira geral, o tamanho dos NLCs é similar entre as formulações líquidas e as formulações líquidas com adjuvantes; enquanto, os NLCs secos apresentaram um aumento significativo de tamanho, especialmente em C2. Isso pode ser devido a presença do Aerosil 200[®] que, em elevadas concentrações, favorece a formação do gel de aerosil e, conseqüentemente, a agregação das nanopartículas (Rowe et al., 2005). O aumento do cisalhamento durante o processo de redispersão possivelmente poderia contribuir para a redução do tamanho das partículas, porém foge do objetivo proposto de produzir nanossistemas lipídicos de fácil redispersão, sem uso de equipamentos sofisticados.

De forma similar ao tamanho de partícula, o índice de polidispersão sofreu variações significativas ($p \leq 0,05$) entre C2 e R2 – exceto para a formulação F1-LS –, bem como entre C1 e R1 – com exceção de F1-B e F1-LS. Além disso, a formulação F2-LS apresentou variação significativa ($p \leq 0,05$) entre a formulação líquida e C1. Portanto, o PdI sofreu influência do processo de secagem, indicando a baixa homogeneidade entre os tamanhos das NLCs redispersas – novamente, sendo mais evidente nas formulações C2.

Pode-se atribuir o aumento do tamanho e do índice de polidispersão dos NLCs redispersos à presença dos crioprotetores (ex. Aerosil 200[®]) - que contribuem para a formação de uma camada de revestimento sobre a superfície dos NLCs - e ao processo de liofilização, que favorecem a floculação, formando partículas maiores (Varshosaz et al., 2012).

Potencial zeta: Todas as formulações apresentaram variações significativas ($p \leq 0,05$) no potencial zeta quando se comparadas com as formulações líquidas (L), líquidas com crioprotetores (LC) e redispersas.

Embora também tenham sofrido variações estatisticamente significativas, os potenciais zeta das formulações do grupo F1 foram menos afetados pelo processo de secagem que os do grupo F2. Possivelmente, isso se deve a influência da carga positiva derivada do CTAB presente nessas formulações.

Varshosaz et al. (2012) demonstrou que o aerosil é capaz de promover uma diminuição mais significativa do potencial zeta do que a sacarose – um dissacarídeo redutor. Isso ocorre porque o aerosil possui um valor (em módulo) de potencial zeta maior do que a sacarose (neutro). Ainda segundo o autor, os NLCs acrescidos de sacarose apresentam sua própria carga superficial, enquanto aquelas em que foram adicionados aerosil, tem suas cargas superficiais aprisionadas por esse polímero (Hawley et al., 1997; Tobio et al., 1998). Seguindo esse raciocínio, é possível comparar a ação da sacarose com a da trealose – uma vez que ambos são dissacarídeos não redutores. Além disso, a menor concentração de Aerosil 200[®] e a presença de um dissacarídeo não redutor na composição do crioprotetor podem ser a razão das formulações do grupo F2 acrescidas de C1 terem seu potencial zeta menos afetado do que essas mesmas formulações quando adicionados de C2.

CONCLUSÃO

As formulações foram consideradas estáveis após 28 dias de estudo. Contudo, após a liofilização, as propriedades NLCs sofreram alterações. Houve aumento estatisticamente significativo no tamanho de partícula, no índice de polidispersão e no potencial zeta das amostras redispersas, especialmente para as formulações C2. Possivelmente a maior concentração de Aerosil 200[®], bem como a ausência de açúcares e polióis como agentes crioprotetores nas formulações C2, favoreceu a formação de uma camada de revestimento sobre a superfície das nanopartículas, aprisionando as cargas superficiais dos NLCs, particularmente nas formulações contendo surfactantes iônicos (F2).

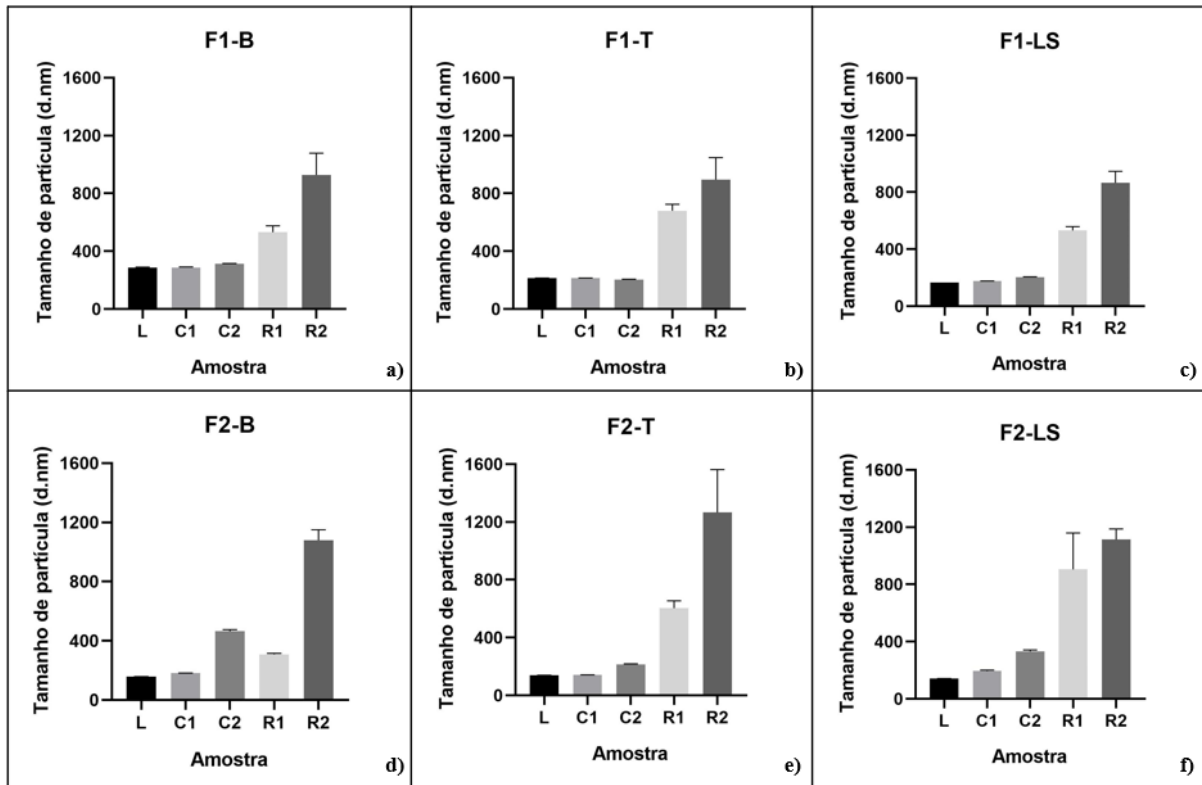


Figura 2: Tamanho de partícula das formulações F1-B (a), F1-T (b), F1-LS (c), F2-B (d), F2-T (e) e F2-LS (f) - líquidas, líquidas com C1, líquidas com C2, secas com C1 e secas com C2.

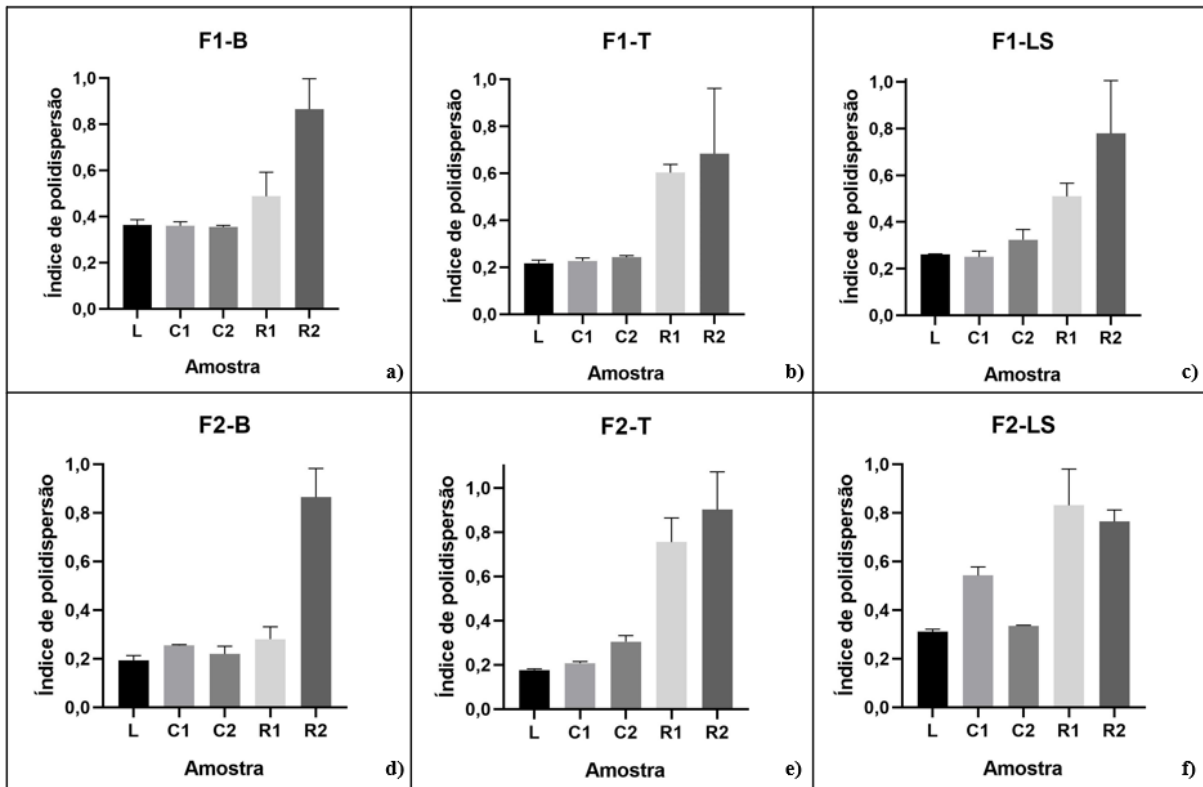


Figura 3: Índice de polidispersão das formulações F1-B (a), F1-T (b), F1-LS (c), F2-B (d), F2-T (e) e F2-LS (f) - líquidas, líquidas com C1, líquidas com C2, secas com C1 e secas com C2.

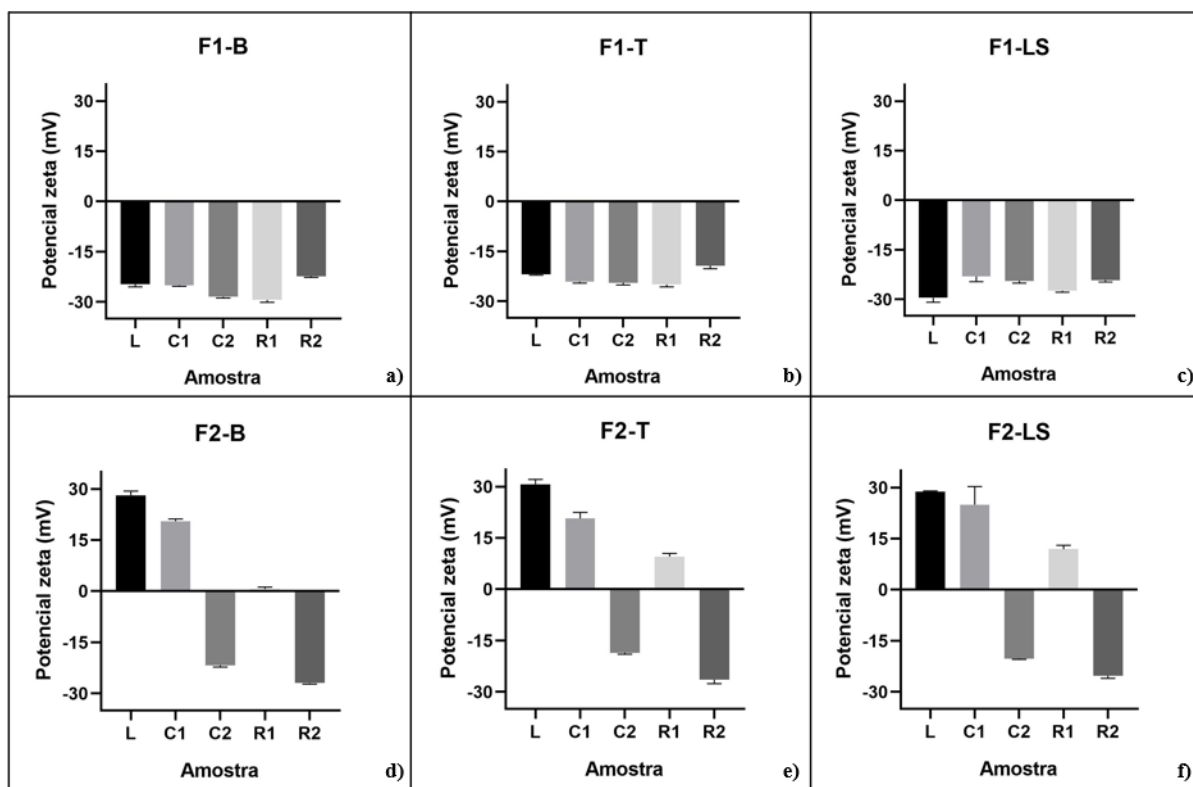


Figura 4: Potencial zeta das formulações F1-B (a), F1-T (b), F1-LS (c), F2-B (d), F2-T (e) e F2-LS (f) - líquidas, líquidas com C1, líquidas com C2, secas com C1 e secas com C2.

ABREVIACÕES

F1-B: NLC sem ativo e contendo apenas Poloxamer 407[®] como surfactante.

F1-T: NLC com Timol e contendo apenas Poloxamer 407[®] como surfactante.

F1-LS: NLC com OE de *L. sidoides* Cham. contendo apenas o surfactante Poloxamer 407[®].

F2-B: NLC sem ativo e contendo combinação de surfactante (Poloxamer 407[®] e CTAB[®]).

F2-T: NLC com Timol e contendo combinação de surfactantes (Poloxamer 407[®] e CTAB[®]).

F2-LS: NLC com OE de *L. sidoides* Cham. e contendo combinação de surfactante (Poloxamer 407[®] e CTAB[®]).

L: NLCs líquidos sem crioprotetor.

C1: NLCs acrescidas da primeira combinação de crioprotetores, formado por manitol, trealose e Aerosil 200[®].

C2: NLCs acrescidos da segunda combinação de crioprotetores, formado por Aerosil 200[®], goma arábica e maltodextrina.

R1: NLCs acrescidos de C1, liofilizados e re-dispersas.

R2: NLCs acrescidos de C2, liofilizados e re-dispersas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo n° 121520/2021-8) pela bolsa de estudos ao primeiro autor e à FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processos: 2021/11000-8, 2018/26069-0 e 2014/15905-1) pelo suporte financeiro e à CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Código 001).

REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, W., DEGOBERT, G., & FESSI, H. (2006), Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, v. 63, n. 2, p. 87-94.

ALMEIDA, R. R. (2015), Mecanismos de ação dos monoterpênicos aromáticos: timol e carvacrol. São João del-Rei: Universidade Federal de São João del Rei.

- BALDIM, I. (2017), Desenvolvimento tecnológico e secagem de sistemas lipídicos incorporando óleo essencial de *Lippia sidoides* (dissertação de doutorado, Universidade de São Paulo).
- BALDIM, I., TONANI, L., KRESS, M.R.V.Z., & OLIVEIRA, W.P. (2019), *Lippia sidoides* essential oil encapsulated in lipid nanosystem as an anti-Candida agent. *Industrial Crops and Products*, v. 127, p. 73-81.
- BHATTACHARJEE, S. (2016), DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. *Journal of controlled release*, v. 235, p. 337-351.
- BILIA, A. R., GUCCIONE, C., ISACCHI, B., RIGHESCHI, C., FIRENZUOLI, F., & BERGONZI, M. C. (2014), Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, v. 2014.
- BRASIL (2009), RENISUS – Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS Espécies vegetais 1, Ministério da Saúde.
- CALVO, P., CASTAÑO, Á. L., HERNÁNDEZ, M. T., & GONZÁLEZ-GÓMEZ, D. (2011), Effects of microcapsule constitution on the quality of microencapsulated walnut oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 113, n. 10, p. 1273-1280.
- CHIRAYIL, C. J., ABRAHAM, J., MISHRA, R. K., GEORGE, S. C., & THOMAS, S. (2017). Instrumental techniques for the characterization of nanoparticles. In *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization* (p. 1-36). Elsevier.
- COLA, D. F., PASQUOTO, T., GUILGER, M., LIMA, R. D., GONÇALVES DA SILVA, C. M., & FRACETO, L. F. (2016), Lipid Nanostructured Carriers Systems for Ivermectin and Methoprene Aiming Parasite Control. *Química Nova*, p. 1034-1043.
- CORTÉS-ROJAS, D. F., & OLIVEIRA, W. P. (2012). Physicochemical properties of phytopharmaceutical preparations as affected by drying methods and carriers. *Drying Technology*, v. 30, n. 9, p. 921-934.
- CORTES-ROJAS, D.F., SOUZA, C.R.F., CHEN, M.J., HOCHHAUS, G., & OLIVEIRA, W.P. (2018), Effects of lipid formulations on clove extract spray dried powders: comparison of physicochemical properties, storage stability and in vitro intestinal permeation. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 23, n. 10, p. 1047-1056.
- COSTA, R., & SANTOS, L. (2017). Delivery systems for cosmetics—From manufacturing to the skin of natural antioxidants. *Powder Technology*, v. 322, p. 402-416.
- CROWE, J.H., HOEKSTRA, F.A., NGUYEN, K.H., & CROWE, L.M. (1996), Is vitrification involved in depression of the phase transition temperature in dry phospholipids?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1280, n. 2, p. 187-196.
- DURACHER, D., SAUZEDDE, F., ELAISSARI, A., PICHOT, C., & NABZAR, L. (1998), Cationic amino-containing N-isopropyl-acrylamide-styrene copolymer particles: 2-surface and colloidal characteristics. *Colloid and Polymer Science*, v. 276, n. 10, p. 920-929.
- FRANZÉ, S., SELMIN, F., SAMARITANI, E., MINGHETTI, P., & CILURZO, F. (2018), Lyophilization of liposomal formulations: still necessary, still challenging. *Pharmaceutics*, v. 10, n. 3, p. 139.
- HAWLEY, A. E., ILLUM, L., & DAVIS, S. S. (1997), Preparation of biodegradable, surface engineered PLGA nanospheres with enhanced lymphatic drainage and lymph node uptake. *Pharmaceutical research*, v. 14, n. 5, p. 657-661.
- HUA, T. C., LIU, B. L., & ZHANG, H. (2010), Protective Agents and Additives for Freeze-Drying of Pharmaceutical Products. *Freeze-Drying of Pharmaceutical and Food Products*, p. 170-186.
- KOSTER, K. L., WEBB, M. S., BRYANT, G., & LYNCH, D. V. (1994), Interactions between soluble sugars and POPC (1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin) during dehydration: vitrification of sugars alters the phase behavior of the phospholipid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1193, n. 1, p. 143-150.

- LABUZA, T. P., & ALTUNAKAR, B. (2020), Water activity prediction and moisture sorption isotherms. *Water activity in foods: fundamentals and applications*, p. 161-205.
- MCCLEMENTS, D. J. (2007), Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 47, n. 7, p. 611-649.
- MEHNERT, W., & MÄDER, K. (2012), Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced drug delivery reviews*, v. 64, p. 83-101.
- NGUYEN, H. M., HWANG, I. C., PARK, J. W., & PARK, H. J. (2012), Enhanced payload and photo-protection for pesticides using nanostructured lipid carriers with corn oil as liquid lipid. *Journal of microencapsulation*, v. 29, n. 6, p. 596-604.
- NOOR, N. M., ANUAR, N. A., ABD-RASID, Z. I., MOHTAR, N., & HASHAM, R. (2021), Design of experiment of redispersible spray dried powder of fatty acid-nanostructured lipid carriers using a 23 full factorial design. In *AIP Conference Proceedings*, v. 2347, n. 1, p. 020145. AIP Publishing LLC.
- PROKSCH, E. (2018), pH in nature, humans and skin. *The Journal of dermatology*, v. 45, n. 9, p.1044-1052.
- ROSA, D., & OLIVEIRA, W. (2018). Spray drying of lipid nanosystems (SLN and NLC) loaded with *Syzygium aromaticum* essential oil. In *IDS 2018. 21st International Drying Symposium Proceedings* (p. 895-902). Editorial Universitat Politècnica de València.
- ROWE, R. C., SHESKEY, P., & QUINN, M. (2009), *Handbook of pharmaceutical excipients*. Libros Digitales-Pharm. Press.
- SECOLIN, V.A.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P (2017), Spray drying of lipid-based systems loaded with *Camellia sinensis* polyphenols. *Journal of Liposome Research*, v. 27, n. 1, p.11-20.
- SHRESTHA, H., BALA, R., & ARORA, S. (2014), Lipid-based drug delivery systems. *Journal of pharmaceutics*, v. 2014.
- SOUTO, E. B., BALDIM, I., OLIVEIRA, W. P., RAO, R., YADAV, N., GAMA, F. M., & MAHANT, S. (2020), SLN and NLC for topical, dermal, and transdermal drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, v. 17, n. 3, p. 357-377.
- TAN, S. W., BILLA, N., ROBERTS, C. R., & BURLEY, J. C. (2010), Surfactant effects on the physical characteristics of Amphotericin B-containing nanostructured lipid carriers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 372, n. 1-3, p. 73-79.
- TOBIO, M. J. A. M., GREF, R., SANCHEZ, A., LANGER, R., & ALONSO, M. J. (1998). Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. *Pharmaceutical research*, v. 15, n. 2, p. 270-275.
- VARSHOSAZ, J., ESKANDARI, S., & TABBAKHIAN, M. (2012), Freeze-drying of nanostructure lipid carriers by different carbohydrate polymers used as cryoprotectants. *Carbohydrate polymers*, v. 88, n. 4, p. 1157-1163.
- WEIGEL, F., WEISS, J., DECKER, E. A., & MCCLEMENTS, D. J. (2018), Lutein-enriched emulsion-based delivery systems: Influence of emulsifiers and antioxidants on physical and chemical stability. *Food Chemistry*, v. 242, p. 395-403.