



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS V
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ALÉXIA GONÇALVES DIAS

**LIOFILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI (ÁCIDO LÁTICO) CONTENDO
CANDIDATO A FÁRMACO ANTILEISHMANIA**

**JOÃO PESSOA
2022**

ALÉXIA GONÇALVES DIAS

**LIOFILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI (ÁCIDO LÁTICO) CONTENDO
CANDIDATO A FÁRMACO ANTILEISHMANIA**

Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências
Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba,
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira

Coorientadora: M.^A Camila de Oliveira Melo

JOÃO PESSOA
2022

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

D5411 Dias, Alexia Gonçalves.
Liofilização de nanopartículas de Poli (ácido láctico) contendo candidato a fármaco Antileishmania [manuscrito] / Alexia Gonçalves Dias. - 2022.
32 p. : il. colorido.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2022.
"Orientação : Prof. Dr. Elquio Eleanen Oliveira , Departamento de Biologia - CCBS."

1. Liofilização. 2. sistemas de liberação. 3. -amino-tiofênicos. I. Título

21. ed. CDD 615.1

ALÉXIA GONÇALVES DIAS

**LIOFILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI (ÁCIDO LÁTICO) CONTENDO
CANDIDATO A FÁRMACO ANTILEISHMANIA**

Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências
Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba,
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Ciências Biológicas

Aprovada em: 29/07/2022.

BANCA EXAMINADORA

Elcio Eleamen Oliveira

Prof. Dr. Elcio Eleamen Oliveira (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

 UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
Marcos A. J. Costa
Marcos Antonio J. Costa

Prof. Dr. Marcos Antônio Jerônimo Costa
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Rodrigo Santos Aquino de Araújo

Prof. Dr. Rodrigo Santos Aquino de Araújo
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida e por me guiar e me manter firme em todos os meus caminhos, pois, sem ele nada seria possível.

Aos meus pais **Alessandra Silva Gonçalves Dias** e **Alexandre Dias da Silva** por me acolherem me apoiando e sempre me dando forças para continuar, vocês são tudo em minha vida, especialmente a minha mãe que me inseriu desde cedo no meio acadêmico.

Aos meus avós **Maria da Penha**, **Martins Gonçalves** e **Maria Teresa**, por me apoiarem e por depositar tanta confiança em mim, vocês são os amores da minha vida.

A **Paulo Matheus de Oliveira Medeiros**, meu companheiro de todas as horas por ser tão prestativo e me ajudar em tudo que eu preciso, por aguentar os meus surtos e ressuscitar meu notebook sempre que preciso, amo você.

Ao meu orientador **Prof.o Dr.o Elquio Eleamen Oliveira** por seus ensinamentos nas suas aulas encantadoras e principalmente por ter me aceitado no laboratório mesmo nos tempos difíceis que foi a pandemia.

A minha coorientadora **M.^A Camila de Oliveira Melo**, por me apresentar as nanopartículas de uma forma acessível com uma analogia de um “carrinho”, eu nunca vou esquecer disso, muito obrigada por todos os ensinamentos, por toda calma e conselhos, você é incrível.

Aos meus professores da UEPB que me acompanharam durante a graduação por todo o conhecimento compartilhado, especialmente o professor Marcos que me acompanhou bons períodos como orientador de monitoria e a professora Tacyana que nessa etapa final proporcionou aulas a campo maravilhosas e por todo o seu auxílio na disciplina de metodologia aplicada.

As minhas amigas que a UEPB me presenteou Natália, Izabele, Gabriela, Jéssica, Roberta e Laura por toda a cumplicidade pelos momentos de descontração que vocês me proporcionaram, por me ouvirem, me aconselharem e por me consolarem sempre que precisei.

A todos os meus familiares e amigos que me ajudaram de alguma forma e torceram por mim.

RESUMO

O 2-[(5-bromo-1H-indol-3-ilmetileno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-4H-ciclohexa[b]tiofeno-3-carbonitrila (SB83), um derivado do 2 amino-tiofeno, é um candidato a fármaco leishmanicida, de baixa citotoxicidade. As nanopartículas poliméricas vêm chamando bastante a atenção graças às suas propriedades como o controle de liberação do ativo encapsulado, proteção contra degradação do fármaco, além de melhorar a entrega do fármaco no sítio de ação, reduzindo efeitos adversos. A fim de superar a instabilidade gerada durante longos períodos de prateleiras de nanopartículas em suspensão, a liofilização é uma alternativa promissora, o processo consiste no congelamento prévio da substância seguido da remoção da água através de sublimação. Assim o objetivo desse estudo tem como finalidade melhorar a estabilidade de nanopartículas de poli (ácido lático) (PLA) contendo SB-83 utilizando a técnica de liofilização. As nanopartículas foram preparadas pela técnica de nanoprecipitação, em seguida foram liofilizadas em duas condições, sem crioprotetor e com 5% de trealose. Logo após obtenção do liofilizado, este foi caracterizado quanto ao seu diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta e cinética de liberação *in vitro*. Os resultados da análise de tamanho hidrodinâmico revelaram que as partículas liofilizadas sem crioprotetor apresentaram um aumento de diâmetro quando comparadas as nanopartículas em suspensão. A cinética de liberação *in vitro* das nanopartículas após a liofilização com o uso da trealose mostrou que o processo de liberação do SB-83 das nanopartículas foi acelerado, quando comparado com as nanopartículas em suspensão houve um aumento de sua liberação de 72% para 90% ao fim das 96 horas. Assim, estudos posteriores serão realizados para melhor caracterizar as nanopartículas obtidas após a liofilização.

Palavras- chaves: liofilização, sistemas de liberação, 2-amino-tiofênicos

ABSTRACT

The 2-[(5-bromo-1H-indol-3-ylmethylene)-amino]-4,5,6,7-tetrahydro-4H-cyclohexa[b]thiophene-3-carbonitrile (SB83), a 2-amino-thiophene derivative, is a leishmanicidal drug candidate with low cytotoxicity. Polymeric nanoparticles have been attracting a lot of attention thanks to their properties such as controlling the release of the encapsulated active ingredient, protecting against drug degradation, and improving the delivery of the drug to the site of action, reducing adverse effects. In order to overcome the instability generated during long shelf life of nanoparticles in suspension, lyophilization is a promising alternative, the process consists in the previous freezing of the substance followed by the removal of water through sublimation. Thus, the aim of this study is to improve the stability of poly(lactic acid) (PLA) nanoparticles containing SB-83 using the freeze-drying technique. The nanoparticles were prepared by nanoprecipitation technique, then they were freeze-dried in two conditions, without cryoprotectant and with 5% trehalose. Soon after the freeze-dried material was obtained, it was characterized in terms of its hydrodynamic diameter, polydispersity index, zeta potential and in vitro release kinetics. The results of the hydrodynamic size analysis revealed that the freeze-dried particles without cryoprotectant showed an increase in diameter when compared to the nanoparticles in suspension. The in vitro release kinetics of the nanoparticles after freeze-drying using trehalose showed that the release process of SB-83 from the nanoparticles was accelerated, when compared to the nanoparticles in suspension there was an increase in their release from 72% to 90% at the end of 96 hours. Thus, further studies will be carried out to better characterize the nanoparticles obtained after lyophilization.

Keywords: lyophilization, delivery systems, 2-amino-thiophenics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Curva de liberação in vitro das NP SB-83 em antes da liofilização (suspensão), liofilizadas sem e liofilizadas com crioprotetor	21
--	----

LISTA DE TABELAS

.

Tabela 1- Excipientes utilizados com maior frequência na liofilização..... 13

Tabela 2- Dados do tamanho de partículas, índice de polidispersão, potencial zeta e tempo de ressuspensão das nanopartículas20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	10
2.1 Derivados Tiofênicos.....	10
2.2 Métodos de secagem de nanosistemas	10
2.3 Liofilização	11
2.4 Crioprotetores e Lioprotetores	12
2.5 Técnicas de caracterização físico-química aplicados a nanosistemas	13
2.6 Cinética de liberação de fármacos em sistemas poliméricos	15
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4. METODOLOGIA	18
4.1 1 Obtenção de Nanopartículas contendo SB-83	18
4.2 Liofilização das nanopartículas de PLA com SB-83.....	18
4.3 Caracterização físico-química das nanopartículas	18
4.3.1 Reconstituição do liofilizado	18
4.3.2 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta	19
4.3.3 Ensaio da cinética de liberação <i>in vitro</i> das NP SB-83.....	19
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	20
5.1 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta e reconstituição das nanopartículas	20
5.2 Cinética de liberação <i>in vitro</i>.....	21
6. CONCLUSÃO	23
7. REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

Em âmbito mundial, a leishmaniose apresenta mais casos no Brasil do que no resto do mundo e pode estar relacionada com a situação econômica da população atingida que tem menos acesso aos serviços de saúde. A leishmaniose pode se apresentar em duas formas: a leishmaniose mucocutânea e a leishmaniose visceral, que possui maior letalidade (BARBOSA et al., 2021; FARIAS et al., 2021; GONTIJO et al., 2004). Os fármacos utilizados frequentemente para o tratamento da leishmaniose são de baixa eficácia, possuem efeitos adversos preocupantes, além de resistência parasitária. Dentre estes fármacos estão os antimoniais pentavalentes, são eles: o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio, fármacos de segunda linha também são utilizados, como a anfotericina B, pentamidina, paromomicina, miltefosina e possuem ainda mais toxicidade em relação aos de primeira linha (NAFARI et al., 2020; RODRIGUES et al., 2015).

Os Tiofenos são um grupo de compostos heterocíclicos que tem atraído a atenção de indústrias farmacêuticas, por possuírem diversas atividades farmacológicas, incluindo leishmanicida. O 2-[(5-bromo-1H-indol-3-ilmetileno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-4H-ciclohexa[b]tiofeno-3-carbonitrila (SB-83) dentre dez grupos derivados do 2-amino-tiofeno, mostrou atividade promissora sobre as formas de amastigota e promastigotas do parasita *Leishmania amazonenses*, além de possuir baixa citotoxicidade e maior eficiência (RODRIGUES et al., 2015; RODRIGUES et al., 2018). Entretanto o SB-83 possui um desafio em relação a sua baixa solubilidade em água, o que limita estudos in vitro e in vivo, no entanto a encapsulação do SB-83 em nanopartículas poliméricas pode superar essa limitação (SILVA, 2016).

Os sistemas de liberação de fármaco surgiram com o objetivo de fornecer melhorias em relação à entrega do ativo, além de melhorar sua propriedade terapêutica, garantindo que seja entregue de maneira segura e eficaz ao sítio de ação. As nanopartículas poliméricas possuem vantagem na administração controlada de fármacos, promovem melhora na absorção do fármaco e apresentam diminuição de efeitos adversos (TYLER et al., 2016). Entretanto, as nanopartículas possuem um desafio em relação a sua estabilidade por serem produzidas em suspensão aquosa, durante o armazenamento podem ser expostas a agregação e fusão das partículas, além de problemas como instabilidade química, contaminação por microrganismos,

hidrólise de polímeros e o vazamento do ativo, o que é um fator limitante para a indústria farmacêutica que visa um grande período de prateleira (MARALDI et al., 2020).

A liofilização se trata de uma técnica empregada para reduzir a instabilidade física e química a longo prazo e é bastante utilizada para secagem de nanopartículas poliméricas. Essa técnica consiste em três etapas: o congelamento, a secagem primária e a secagem secundária; no qual a princípio após o congelamento da amostra, a água congelada é removida através da sublimação (secagem primária), e posteriormente por dessorção é retirada a água descongelada no vácuo (secagem secundária). (FONTE et al., 2016; FONTE et al., 2015; ALI; LAMPRECHT, 2017; UMERSKA et al., 2018).

Todavia, por mais que liofilização seja uma alternativa para a instabilidade física e química das nanopartículas durante o armazenamento, essa técnica causa estresses nas nanopartículas durante os processos de congelamento e remoção de água o que pode levar a instabilidade. Com isso, por vezes, se torna necessário a adição de crioprotetores para atenuar impactos nas características físicas e químicas das nanopartículas, diminuindo a agregação das partículas e evitando a tensão (ALI; LAMPRECHT, 2017). Os crioprotetores formam uma matriz vítrea que protege as nanopartículas e isso contribui para sua imobilização evitando assim a tensão mecânica entre os cristais de gelo. Açúcares e polímeros como a trealose, manitol, sorbitol, manose, álcool polivinílico, glicose, dextrana, glicerol, frutose, sacarose e ciclodextrina são os crioprotetores mais empregados na manutenção das propriedades das nanopartículas durante a etapa de liofilização. (FONTE et al., 2016; FONTE et al., 2015; ALI; LAMPRECHT, 2017; UMERSKA et al., 2018).

Diante disso, esse estudo tem como proposta aumentar a estabilidade de nanopartículas de poli (ácido láctico) (PLA) contendo SB83 por meio da liofilização.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Derivados Tiofênicos

Os derivados dos tiofenos são um grupo de compostos heterocíclicos aromático com a presença de um enxofre em sua estrutura, os tiofenos são produzidos a partir de plantas e fungos como metabólitos secundários, dentre estes organismos estão as *Tagetes patula* e *Tagetes erecta* que são espécies da família Asteraceae (TAKAHASHI et al., 2011). Já foi descrito na literatura que os tiofenos possuem propriedades diversas como antifúngicas, antibacterianas, antiinflamatórias, anticonceptiva, antiarrítmica, antinociceptivo, antiviral, antituberculares e antitumorais, contudo alguns derivados do tiofeno mostram atividades antiprotozoárias contra as espécies *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani*, *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania infantum* (RODRIGUES et al., 2015; TAKAHASHI et al., 2011).

Dentre os grupos tiofênicos dez derivados 2-amino-tiofeno que foram avaliadas suas atividades antiparasitária, o SB-83 se mostrou com uma maior seletividade e quando comparado ao tratamento atual contra a leishmaniose apresentou ser cerca de 840 menos nocivo em relação aos macrófagos murinos e cerca de 14,84 mais benigno em eritrócitos humanos (RODRIGUES et al., 2018). Além disso o SB-83 diminui a carga parasitária graças a sua atividade imunomoduladora e a amplificação do fator de necrose tumoral-alfa, citocinas IL-12 que resulta na ativação de interferons gama, diante disso esse derivado 2-amino-tiofeno apresenta atividade leishmanicida sendo assim um possível candidato a fármaco (RODRIGUES et al., 2015; RODRIGUES et al., 2018).

2.2 Métodos de secagem de nanosistemas

Nanosistemas quando armazenados por longos períodos em suspensão aquosa acarretam problemas relacionados com a estabilidade física, no qual pode gerar agregação das partículas e instabilidade química e biológica. (FONTE et al., 2015; MALAMATARI et al., 2020). Por isso, se torna necessário o uso de métodos de secagem como liofilização, secagem por pulverização (*spray dryer*), *spray coating* e a tecnologia do fluido supercrítico (HAGGAG et al., 2015).

A secagem por pulverização é um método que ocorre em uma única etapa tem um menor tempo e é mais econômico, neste método a solução é convertida em forma de partícula por atomização do conteúdo em gotículas finas seguido pela evaporação do solvente através de um gás quente de secagem, a secagem por pulverização é indicada para moléculas menos

vulneráveis ao calor (YUE-XING et al., 2018; MALAMATARI et al., 2020). No entanto as etapas de secagem por pulverização podem causar estresses e gerar danos à estabilidade das partículas comprometendo suas propriedades, por causa da alta temperatura, tensão, ligação entre o ar e água que leva à fusão das partículas. A interação entre as partículas pode ocasionar agregação, por isso se torna necessário o uso de excipientes protetores para superar os estresses gerados durante a secagem (YUE-XING et al., 2018). O método *spray coating* apesar de ser menos empregado em comparação com a liofilização e a secagem por pulverização é corriqueiramente utilizado para a fabricação de filmes de espessuras menores e apresenta vantagens econômicas tendo em vista que para a execução do método é necessário apenas o uso de uma pistola de spray ou aerógrafo e um gás para realizar o transporte da solução, por essa versatilidade esse método pode ser aplicado em longa escala em indústrias e em substratos distintos (LIMA et al., 2020; MA et al., 2021).

A tecnologia dos fluídos supercríticos começou a ser inserida no início de 1990 e demonstrou uma melhoria significativa em relação ao controle da viscosidade e a densidade de formulações, uma substância alcança a sua fase supercrítica quando a sua temperatura e a sua pressão estão superiores ao seu ponto crítico e a fase líquida e gasosa são inexistentes, sendo o dióxido de carbono como um dos fluídos supercríticos mais utilizados, além disso nessa técnica a quantidade de solvente residual na formulação é diminuída (TRAN et al., 2021).

2.3 Liofilização

A liofilização é um processo industrial que se tornou importante no meio farmacêutico e se encontra em constante crescimento, corriqueiramente esse método é utilizado para superar a instabilidade química, biológica e física, sendo utilizada tanto em produtos farmacêuticos (incluindo nanopartículas) como em produtos biológicos (MOHAMMADY et al., 2020; NIREESHA et al., 2013). A liofilização possui aplicação em diversas áreas, dentre estas está o ramo farmacêutico e biotecnológico com o intuito de aumentar a vida útil de produtos e na indústria alimentícia conservando alimentos (NIREESHA et al., 2013). Os liofilizados além de possuírem a vantagem de serem mais estáveis, são favorecidos também em relação ao transporte e armazenamento, pois o manuseio é mais acessível. (MOHAMMADY et al., 2020; TANG et al., 2004).

A sublimação é o fenômeno base da liofilização, no qual a água congelada (estado sólido) se converte para o estado gasoso sem passar pelo estado líquido, ou seja, durante a

sublimação ocorrem combinações de pressões e temperaturas acima do ponto triplo da água que permite que haja essa conversão direta de sólido para gás (NIREESHA et al., 2013). O processo da liofilização é constituído por três etapas: Congelamento ou solidificação, secagem primária e secagem secundária, após o congelamento ocorre a sublimação (secagem primária) da água congelada, que acontece com a diminuição da pressão na câmara e a elevação da temperatura na prateleira, essa etapa é a mais longa das três, já na secagem secundária o vapor de água restante não sublimada é removida por dessorção. (MOHAMMADY et al., 2020; NIREESHA et al., 2013; TANG et al., 2004).

Produtos da liofilização possuem características de maior estabilidade a longo prazo, baixa taxa de umidade residual, além da rápida constituição e os produtos apresentarem mais assepsia pois após a retirada da umidade é diminuída exposição a bactérias, no entanto estresses gerados durante o congelamento e a secagem podem ocasionar instabilidade física por isso a fim de superar esses problemas, crioprotetores ou lioprotetores podem ser adicionados (IBRAHIM et al., 2022).

2.4 Crioprotetores e Lioprotetores

O uso de açúcares para preservar a estabilidade física durante os processos de congelamento e secagem durante a liofilização já é conhecido, no entanto os mecanismos de ação ainda não são totalmente elucidados, acredita-se que envolvam a comunhão entre dois processos: a reposição de água por meio da reposição das pontes de hidrogênio na superfície do coloide através dos açúcares, preservando a estrutura da molécula durante a secagem e vitrificação, no qual o coloide é imobilizado na matriz do açúcar vítrea rígida e amorfa onde endurece o material e impede o deslocamento, a fusão, difusão e agregação das partículas e outros processos desestabilizantes (HINRICHS et al., 2005; TRENKENSCHUH et al., 2021; WILDING et al., 2019).

Os lioprotetores são excipientes adicionados durante a liofilização para proteger as moléculas na etapa de secagem de temperaturas elevadas (WILDING et al., 2019). No entanto na primeira etapa da liofilização as moléculas passam por um congelamento e para protegê-las são utilizados crioprotetores que podem ser excipientes amorfos, que formam uma matriz vítrea que favorece a preservação das moléculas de tensões mecânicas entre os cristais congelados (SUSA et al., 2021).

Por isso é importante a escolha de um crioprotetor/lioprotetor que seja adequado e forneça estabilidade ao liofilizado, além de manter os padrões que são específicos durante a liofilização como a manutenção da temperatura durante a secagem primária, além das condições necessárias no armazenamento (TRENKENSCHUH et al., 2021). A tabela 1 resume os principais crioprotetores/lioprotetores utilizados corriqueiramente na liofilização, tanto um crioprotetor pode agir como um lioprotetor, assim como o inverso.

Tabela 1: Excipientes utilizados com maior frequência na liofilização

Estabilizadores	Função	Exemplos
Crioprotetor	Proteção durante o congelamento	Açúcares (por exemplo, sacarose, trealose) Aminoácidos (por exemplo, arginina)
Lioprotetor	Proteção durante a secagem ou durante o armazenamento	Açúcares (por exemplo, sacarose, trealose) Polímeros (Por exemplo, Polivinilpirrolidona e Hidroxetilamido) Aminoácidos (por exemplo, prolina, arginina)

FONTE: ADAPTADO DE FONTE et al., 2016; TRENKENSCHUH et al., 2021

2.5 Técnicas de caracterização físico-química aplicados a nanosistemas

As técnicas de caracterização de nanosistemas e suas propriedades físicas e químicas como estrutura, morfologia, tamanho médio, propriedades ópticas, e composição são de extrema importância (THAHER et al., 2021).

O aperfeiçoamento de técnicas de caracterização com alta resolução como a microscopia eletrônica de varredura (MEV) tornou esta ferramenta bastante importante para o estudo de nanoestruturas, pois permite a maior compreensão da morfologia e composição delas. A MEV consiste em uma sonda que emite feixes de elétrons constantemente que varre a superfície da amostra, por meio desta interação entre a amostra e os feixes de elétrons gera emissões distintas que são recebidas por detectores, as características morfológicas e de composição são obtidas de forma separada escolhendo os tipos dos elétrons que são emitidos que são os elétrons secundários (SEs) que possuem energias menores que 50 eV e os elétrons com energias maiores

que 50 eV que são os elétrons retroespalhados (BSEs), as imagens formadas pelos SEs apresentam fidelidade ao relevo da amostra e são geradas através da excitação de elétrons presentes no átomo da amostra em sua camada mais externa por meio do feixe de elétrons, já as imagens geradas pelos BSEs apresentam resultados diferentes, pois também se leva em consideração os elementos químicos e seus números atômicos da amostra (LIU et al., 2019; SUGA et al., 2014).

Dentre as técnicas para obter informações em relação à composição química de nanosistemas, a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com a técnica de reflectância total atenuada (ATR), possui a vantagem de conseguir superar a região de interface líquido-sólido que apresenta uma dinâmica e explorar a superfície de adsorção de nanopartículas em vários meios, por meio disso se torna possível a identificação do modo de adsorção, além de alterações na morfologia e estruturas de ligantes (MUDUNKOTUWA et al., 2014; FERRER.,2014).

A determinação do tamanho dos nanosistemas em suspensão são determinados a partir do espalhamento de luz dinâmico (DLS) que se tornou uma técnica padrão para esse processo. Por meio do DLS é medido o coeficiente de difusão translacional dos nanosistemas em dispersão, obtendo as alterações da luz dinâmica e por meio da equação de Stokes-Einstein os dados são transformados no tamanho das partículas. Além do tamanho das partículas, também podem ser obtidos o índice de polidispersão e o potencial zeta (JIANG et al., 2019; RAMIREZ et al., 2021).

A técnica de difração por raios-X (DRX) é frequentemente utilizada para se observar estruturas cristalinas (textura), mas também fornece informações sobre o tamanho médio, cristalinidade e deformação do cristal. Na DRX os picos de raios-X formam interferência com feixes de raios-X monocromáticos que se encontram espalhados em uma amostra, os picos de raios-X podem ser intensificados pela forma que os átomos da amostra estão dispostos na rede (BASAK et al., 2022; BUNACIU et al., 2015; WANG et al., 2022).

A análise térmica consiste em um conjunto de técnicas, no qual se busca informações relacionadas à propriedades físicas e químicas de uma determinada amostra quando submetidas em função do tempo e da temperatura e se torna essencial encontrar por meio de curvas termogravimétricas as temperaturas máximas ou mínimas que causem instabilidade dos

sistemas. (DENARI et al., 2012; BANNACH et al., 2011; PRAKASH et al., 2021). Algumas das principais técnicas de análise térmica serão descritas a seguir:

- Análise termogravimétrica (TGA) consiste na análise da variação do peso da amostra em relação à temperatura ou ao tempo, a amostra pode ter seu peso alterado por dessorção, vaporização, desidratação, desgaseificação, vaporização, decomposição, sublimação, entre outros eventos térmicos (PIELICHOWSKA et al., 2019).
- Análise térmica diferencial (DTA), nessa técnica são analisadas as temperaturas da amostra e são comparadas a um referencial inerte termicamente onde ambos são expostos às mesmas variações de temperatura, já calorimetria exploratória diferencial (DSC), que consiste basicamente no mesmo método analítico DTA, são medidas as diferenças de energia absorvida ou liberada pela amostra, enquanto nas DTA são medidas as variações de temperatura (GOH et al., 2022; WAGNER., 2017).
- Análise de gás evoluída (EGA) se trata de técnicas que envolvem a medição da quantidade de gases evoluídos de uma amostra em relação à temperatura, geralmente a EGA é utilizada em conjunto com a TGA, tendo em vista que a TGA mede a perda de massa (WAGNER., 2017).
- Análise termomecânicas (TMA) determina mudanças nas dimensões de uma amostra em função da temperatura e submetida a uma força mecânica crescente e constante, a partir disto as alterações nas dimensões da amostra são medidas (WAGNER., 2017).
- Análise mecânica dinâmica (DMA) é um método que consiste na aplicação de uma tensão mecânica oscilatória (senoide) na amostra e mede a deformidade após a tensão em função da temperatura (WAGNER., 2017).

2.6 Cinética de liberação de fármacos em sistemas poliméricos

O desenvolvimento de sistemas de liberação de drogas sempre foi um alvo importante para pesquisa, com o avanço tecnológico materiais mais complexos foram somados para

desenvolver sistemas de liberação de drogas, incluindo sistemas poliméricos que apresentam vantagens como redução da toxicidade, controle da liberação do ativo e entrega direcionada. A liberação de um fármaco consiste no transporte do soluto do fármaco da posição inicial do polímero para a sua região externa e posteriormente para o meio de liberação, é influenciado por características físicas, químicas, estruturais, além das características do meio de liberação e suas interações (FERREIRA et al., 2019; FU et al., 2010).

O estudo da cinética de liberação de um fármaco é derivado da solubilidade e do coeficiente de difusão do fármaco no polímero e é de grande importância para o desenvolvimento de novos fármacos por fornecer informações sobre perfil de liberação e permitir a modulação desse processo (BIZERRA et al., 2016). O método de diálise, é um dos métodos utilizados para o estudo da cinética de liberação de nanopartículas, que consiste na introdução do sistema em uma bolsa de diálise e ao decorrer do tempo o fármaco se difunde para fora desta bolsa, sendo analisadas posteriormente (ABOUELMAGD et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Liofilizar e caracterizar nanopartículas poliméricas contendo candidato a fármaco leishmanicida

3.2 Objetivos específicos

- Obter nanopartículas poliméricas de PLA
- Liofilizar as nanopartículas de PLA contendo SB-83 com e sem uso de trealose;
- Caracterizar as nanopartículas em relação às suas características de tamanho e morfologia;
- Avaliar o perfil de liberação do fármaco antes e após a liofilização;

4. METODOLOGIA

4.1 1 Obtenção de Nanopartículas contendo SB-83

O SB-83 foi sintetizado pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas e fornecido pelo professor Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior. As nanopartículas de PLA com SB-83 foram obtidas por meio do método de nanoprecipitação de acordo com Melo, 2018. A fase aquosa foi preparada a partir de 400 mg de Pluronic-F68 e 40 ml de água destilada. A fase orgânica continha 50 mg de PLA, 8 ml de acetona 2 mg de SB-83, 50 mg de Lipoid S-100 e 2 ml de metanol, essa solução orgânica foi adicionada na solução aquosa e agitada a 1200 rpm por 20 minutos em um agitador magnético, as nanopartículas foram roto-evaporadas para a eliminação do solvente orgânico. Depois da evaporação do solvente a suspensão das nanopartículas de PLA com SB-83 foram congeladas (*overnight*).

4.2 Liofilização das nanopartículas de PLA com SB-83

A liofilização das nanopartículas foi realizada em liofilizador (Alpha 1,2 LDplus, CHRIST) com volume de amostra não ultrapassando a altura de 1,5 cm (parâmetro pré-fixado). Foi utilizado o crioprotetor trealose na concentração de 5% para o volume de nanopartículas utilizados por tubo (2mL de amostra/100 mg de trealose). As condições otimizadas para a liofilização foram:

- Pré-congelamento *overnight* em congelador ($-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$);
- Congelamento durante 2 horas no condensador ($-60 \pm 5^{\circ}\text{C}$);
- Liofilização primária durante 24 horas;

Após a liofilização as nanopartículas foram armazenadas em frasco de vidros fechados e mantidas sobre refrigeração até posterior uso.

4.3 Caracterização físico-química das nanopartículas

4.3.1 Reconstituição do liofilizado

As amostras liofilizadas foram reconstituídas através da adição de água destilada. No mesmo frasco em que foram liofilizadas foram reconstituídas com o mesmo volume antes da liofilização (2 mL para todos os frascos). Caso as amostras não conseguissem reconstituir espontaneamente, foi utilizada agitação mecânica através de vórtex e analisado o tempo que o liofilizado demorou para reconstituir-se na água.

4.3.2 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

O tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta foram determinados pelo método de espalhamento de luz dinâmica (DLS, *Dynamic Light Scattering*) no Zetasizer (Nano ZS, Malvern). O experimento foi realizado em triplicata sob um ângulo de dispersão de 173°, a 25°C e 10 corridas por minuto. Foi realizada uma diluição de 1/20 da amostra ressuspensa em água deionizada (20 uL da amostra para 180 uL de água). O potencial zeta das amostras foi analisado por meio da mobilidade eletroforética em um campo elétrico. A diluição utilizada foi a mesma para utilizada na determinação do tamanho médio. A solução foi inserida em células eletroforéticas dobradas descartáveis (DTS1070- Malvern) com potencial de ± 150 mV. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média e desvio padrão (\pm).

4.3.3 Ensaio da cinética de liberação *in vitro* das NP SB-83

A cinética de liberação *in vitro* foi realizada nas nanopartículas de PLA contendo SB-83 (NP SB-83) em suspensão, e liofilizadas com e sem trealose. O estudo foi realizado em saco de diálise (± 5 cm de altura), no qual anteriormente foi hidratada com água destilada e submersa em uma solução tampão de fosfato de sódio com o pH 7,4. Após este processo, 2 mL da solução de nanopartículas ressuspensas foram inseridas no saco e imersas em uma proveta contendo 10 mL da solução tampão pH 7,4. A fim de simular a temperatura do organismo, o sistema foi mantido em um agitador magnético com temperatura de 37°C e sob agitação de 300 rpm. Em intervalos de tempo previamente determinados (5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas) foram coletados 1 mL da solução, sendo em seguida repostos o volume retirado. As análises foram realizadas em triplicata, sendo uma contendo as nanopartículas brancas e três contendo o fármaco, as coletas foram lidas posteriormente através do espectrofotômetro UV-vis em comprimento de onda 392 nm. Os valores foram encontrados a partir da reta da curva padrão do SB-83 em metanol, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,999.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta e reconstituição das nanopartículas

As amostras não colapsaram durante o processo de liofilização (NP-SB83 sem crioprotetor e NP-SB83 com crioprotetor) se apresentando como um pó amarelo. O liofilizado foi resuspenso em água com agitação manual em 30 segundos. Este resultado está de acordo com outros trabalhos da literatura, que descrevem a trealose como um excelente crioprotetor para nanopartículas, incluindo uma facilidade na resuspensão das nanopartículas em meio aquoso (ARYA et al., 2022; LIMA., 2019).

Tabela 2: Dados do tamanho de partículas, índice de polidispersão, potencial zeta e tempo de ressuspensão das nanopartículas

<i>NP-SB83</i>	<i>Tamanho das partículas (nm)</i>	<i>Índice de polidispersão</i>	<i>Potencial Zeta (mV)</i>	<i>Ressuspensão (tempo - agitação)</i>
Suspensão	196,6 (±0,09)	0,335 (±0,02)	-20,1 (±0,29)	-
Liofilizada sem crioprotetor	273,2 (±0,11)	0,425 (±0,03)	-19,6 (±0,12)	30s – manual
Liofilizada com 5% de trealose	207,6 (±0,08)	0,355 (±0,03)	-18,1(±0,19)	30s- manual

Os valores do potencial zeta de suspensões coloidais são de grande importância, pois podem estar relacionados com sua estabilidade. Valores maiores de $|30\text{mV}|$ indicam uma obtenção de nanopartículas estáveis, tendo em vista que quanto maior o potencial zeta em módulo, maior é a repulsão das nanopartículas e menor será a agregação e tamanho das partículas (SAMIMI et al., 2019).

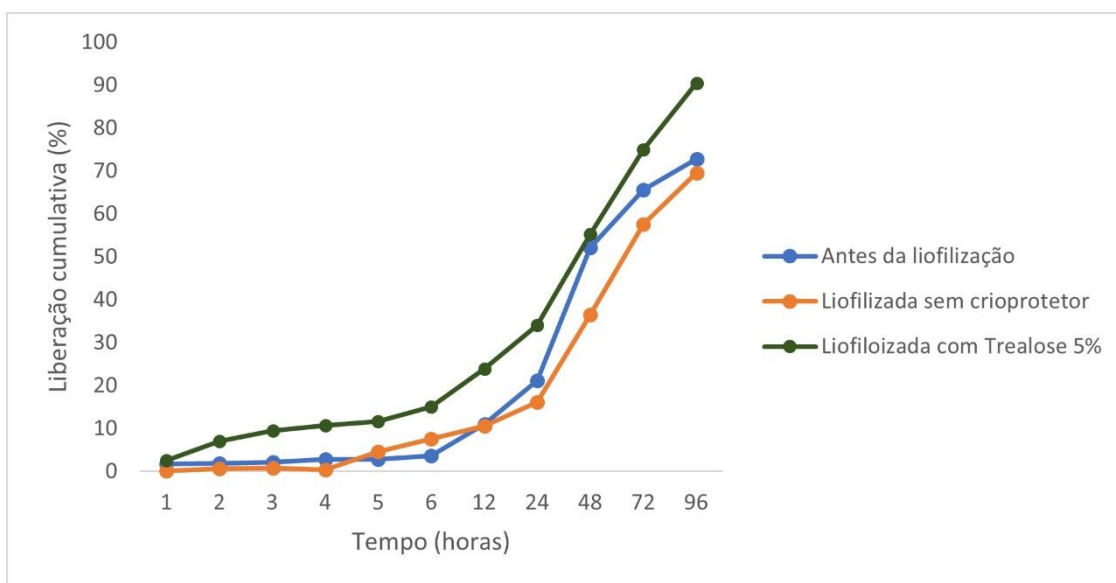
Na tabela 2 pode ser observado os resultados para potencial zeta, tamanho das partículas e o índice de polidispersão. Ao compararmos os resultados, observamos que o processo de liofilização não alterou de maneira expressiva os valores de potencial zeta, sendo que estes oscilaram entre 18,1 e 20,1. A formulação liofilizada com trealose 5% apresentou uma pequena variação com relação ao tamanho médio das partículas e o índice de polidispersão. Porém a formulação liofilizada sem crioprotetor oscilou seu tamanho de 196,6 nm para 273,2 nm e o seu valor de índice de polidispersão de 0,335 para 0,425. Esses resultados demonstram a

importância do crioprotetor em manter as propriedades de tamanho e polidispersão das NP-SB83 (PRATA,2011).

5.2 Cinética de liberação *in vitro*

O estudo da cinética de liberação do SB-83 em nanopartículas de PLA foi realizada ao decorrer de 96 horas (4 dias) em tampão fosfato de sódio em temperatura 37°C e pH 7,4, com o intuito de simular a temperatura corpórea e sob a agitação de 300 rpm. A figura 1 mostra a curva de liberação do ativo ao decorrer do tempo predeterminado.

Figura 1: Curva de liberação *in vitro* das NP SB-83 em antes da liofilização (suspensão), liofilizadas sem e liofilizadas com crioprotetor



Podemos observar que durante as primeiras horas houve uma liberação mais lenta das NP SB-83 em suspensão, somente a partir de 6 horas se iniciou uma liberação mais expressiva, sendo liberado cerca de 72% do fármaco após as 96 horas de análise.

Estudos anteriores mostraram, através da cinética de liberação, que as nanopartículas de PLA com um peso molecular maior demoram mais tempo para degradar e com consequência apresentam uma liberação mais lenta (MELO, 2018).

A liofilização é comumente utilizada para preservar a estabilidade física e química de nanopartículas e impedir que haja liberação do fármaco durante o processo de armazenamento em meio aquoso (TRENKESCHUH et al., 2021). Ao compararmos a cinética de liberação das NP SB-83 em suspensão em contraste com a cinética de liberação após a liofilização sem uso de crioprotetor, nota-se que ao decorrer das primeiras 4 horas praticamente não ocorreu liberação do fármaco, após este período e no decorrer do tempo predeterminado se manteve uma liberação de forma lenta, chegando a 68% de SB-83 liberado após 96 h.

O próprio processo da liofilização pode gerar estresses às nanopartículas, por isso se torna fundamental o uso de crioprotetores para mitigar os impactos ocasionados durante a liofilização em diversos sistemas nanopartículados, já é conhecido que o uso da trealose como crioprotetor melhora a estabilidade de nanopartículas e esses mecanismos estabilizantes já são descritos por meio da teoria da vitrificação e isolamento das nanopartículas, além de que dissacarídeos são melhores estabilizadores de estruturas coloidais após o processo de liofilização (TRENKESCHUH et al., 2021).

Após adicionar trealose 5% durante a liofilização das NP SB-83, o estudo da cinética de liberação *in vitro* apresentou uma liberação desde as primeiras horas do estudo e se manteve de maneira sustentada ao decorrer das 96 horas com cerca de 90% do ativo liberado ao fim do experimento.

6. CONCLUSÃO

O processo de liofilização é uma maneira eficaz de superar a desvantagem causada pela suspensão de nanopartículas em meio aquoso, removendo o teor de água das formulações e garantindo uma melhor estabilidade. As nanopartículas contendo o derivado SB-83 foram obtidas com sucesso após a liofilização com e sem crioprotetor. Os resultados apresentados neste trabalho revelaram que o processo de liofilização sem o uso de crioprotetor influenciou no diâmetro médio e índice de polidispersão das NP-SB83, enquanto a inclusão do crioprotetor trealose preservou o diâmetro médio e o índice de polidispersão da nanopartícula após o processo de secagem. O estudo da cinética de liberação *in vitro* das NP SB-83 revelou que o uso de trealose acelerou o processo de liberação do SB-83 das nanopartículas, aumentando sua liberação de 72% para 90% ao fim das 96 horas. Assim, estudos posteriores serão realizados para melhor caracterizar as nanopartículas obtidas após a liofilização.

7. REFERÊNCIAS

- ABOUELMAGD, Sara A.; SUN, B. ; CHANG, A. C. ; KU, Y. J. ; YEO, Y. Release Kinetics Study of Poorly Water-Soluble Drugs from Nanoparticles: Are We Doing It Right? **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, p. 997–1003, 2015.
- ALI, M. E.; LAMPRECHT, A. Spray freeze drying as an alternative technique for lyophilization of polymeric and lipid-based nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 516, no 1–2, p. 170–177, 2017.
- ARYA, S. PATIDAR, R.; RAY, D.; ASWAL, V. K.; RANJAN, N.; BAHADUR, P.; TIWARI, S. Structural transitions in TPGS micelles induced by trehalose as a model cryoprotectant. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s.l.], v. 642, no December 2021, p. 128714, 2022.
- BANNACH, G.; PERPÉTUO, G. L.; CAVALHEIRO, É. T. G.; CAVALHEIRO, C. C. S.; ROCHA, R. R. Efeitos da história térmica nas propriedades do polímero pet: Um experimento para ensino de análise térmica. **Química Nova**, [s.l.], v. 34, no 10, p. 1825–1829, 2011.
- BASAK, M.; RAHMAN, M. L.; AHMED, M. F.; BISWAS, B.; SHARMIN, N. The use of X-ray diffraction peak profile analysis to determine the structural parameters of cobalt ferrite nanoparticles using Debye-Scherrer, Williamson-Hall, Halder-Wagner and Size-strain plot: Different precipitating agent approach. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 895, p. 162694, 2022.
- BARBOSA, T. C.; JÚNIOR, L. B.; OLIVEIRA, J. R.; SANTOS, R. E.; BARBOSA, F.; BIGARAN, L. T.; MURATA, A. A.; MENDES, L. M.; MURATA, M. S.; KOZUSNY-ADREANI, D. I. Mortalidade Decorrente De Leishmaniose No Período De 2014 a 2018. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, vol. 25, no. S 1, p. 101222, 2021.
- BIZERRA, A; SILVA, V. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente-RESMA**, n. 2, p. 1–12, 2016.
- BUNACIU, A. A; UDRISTIQU, E.G; ABOUL-ENEIN, H.Y. X-ray diffraction: instrumentation and applications. **Crit Rev Anal Chem**. 2015;45(4):289-99.
- DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, É. T. G. Princípios e Aplicações de Análise Térmica. Material de Apoio, Universidade de São Paulo, 2012.

- FARIAS, V. E.; ARAUJO, J. E. B. Perfil Epidemiológico Da Leishmaniose Visceral Humana Na Paraíba No Período De 2008 a 2017. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, vol. 25, no. S 1, p. 101218, 2021.
- FERRER, N. Forensic Science, Applications of Infrared Spectroscopy. Reference Module in Chemistry, **Molecular Sciences and Chemical Engineering**, 2014.
- FERREIRA, M. V.; PRADELA F., L. A.; DOS SANTOS, A. L.; TAKEUCHI, R. M.; DE ASSUNÇÃO, R. M. N. Avaliação do Perfil de Liberação do Fármaco Ibuprofeno em Membranas simétricas e assimétricas de Acetato de Celulose: Efeito da Morfologia. **Quimica Nova**, v. 42, n. 8, p. 823–830, 2019.
- FONTE, P.; ARAÚJO, F.; SEABRA, V.; REIS, S.; VAN DE WEERT, M.; SARMENTO, B. Co-encapsulation of lyoprotectants improves the stability of protein-loaded PLGA nanoparticles upon lyophilization. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 496, no 2, p. 850–862, 2015.
- FONTE, P.; REIS, S.; SARMENTO, B. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [s.l.], v. 225, p. 75–86, 2016.
- FU, Yao; KAO, Weiyuan John. Drug Release Kinetics and Transport Mechanisms of Nondegradable and Degradable Polymeric Delivery Systems. **HHS Author Manuscripts**, v. 7, n. 4, p. 429–444, 2010.
- GOH, C. F.; HADGRAFT, J.; LANE, M. E. Thermal analysis of mammalian stratum corneum using differential scanning calorimetry for advancing skin research and drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 614, no January, p. 121447, 2022.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, vol. 7, no. 3, p. 338–349, 2004.
- HAGGAG, Y. A.; FAHEEM, A. M. Evaluation of nano spray drying as a method for drying and formulation of therapeutic peptides and proteins. **Frontiers in Pharmacology**, [s.l.], v. 6, no JUL, p. 1–5, 2015.
- HINRICHS, W. L. J.; SANDERS, N.N.; DE, S.C.; DEMEESTER, J.; FRIJLINK, H.W. Inulin is a promising cryo- and lyoprotectant for PEGylated lipoplexes. **Journal of Controlled Release**, [s.l.], v. 103, no 2, p. 465–479, 2005.
- IBRAHIM, A. H.; IBRAHIM, H.M.; IBRAHIM, A.E.; MOHSEN, I.A.; TATSUAKI, T.; TETSUYA, O. Lyophilized tablets of felodipine-loaded polymeric nanocapsules to enhance aqueous solubility: Formulation and optimization. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s.l.], p. 103172, 2022.

- JIANG, Y.; ZHANG, C; YUAN, J.; WU, Y.; LI, F.; LI, D.; HUANG, Q. Effects of pectin polydispersity on zein/pectin composite nanoparticles (ZAPs) as high internal-phase Pickering emulsion stabilizers. **Carbohydrate Polymers**, v. 219, n. February, p. 77–86, 2019.
- LIMA, M. N. Caracterização de nanopartículas de PCL liofilizadas contendo Dietilcarbamazina. Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Programa de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, 2019.
- LIMA, A. M.; SANTOS, T.E.A; MEDEIRO, R.A.; CRUZ, L.R.O; PINHEIRO, W.A. Análise comparativa de deposições de filmes de óxido de grafeno por spray ultrassônico e convencional. **Matéria (Rio de Janeiro)**, [s.l.], v. 25, no 3, 2020.
- LIU, J.; PERES, S.L; KARAMCHED, P.; WILKINSON, A.J; GROVENOR, C. R. M. Forescattered electron imaging of nanoparticles in scanning electron microscopy. **Materials Characterization**, [s.l.], v. 155, no July, 2019.
- MA, D.; WANG, Z.; LIU, T.; HU, Y.; WANG, Y. Spray coating of polysulfone/poly(ethylene glycol) block polymer on macroporous substrates followed by selective swelling for composite ultrafiltration membranes. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 29, p. 85–91, 2021.
- MALAMATARI, M.; CHARISI, A.; MALAMATARIS, S.; KACHRIMANIS, K.; NIKOLAKAKIS, I. Spray drying for the preparation of nanoparticle-based drug formulations as dry powders for inhalation. **Processes**, [s.l.], v. 8, no 7, 2020.
- MARALDI, M., FERRARI, R., AURIEMMA, R., SPONCHIONI, M., & MOSCATELLI, D. (2020). C. of polymer nanoparticles through dialysis: E. and comparison with lyophilization for Peg. and zwitterionic systems. J. of pharmaceutical sciences. Concentration of Polymer Nanoparticles Through Dialysis: Efficacy and Comparison With Lyophilization for PEGylated and Zwitterionic Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 109, no 8, p. 2607–2614, 2020.
- MELO, C; O.; Nanopartículas de PLA contendo derivado espiro-acridínico com atividade anticancerígena. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica, da Universidade Estadual da Paraíba, 2018.
- MOHAMMADY, M.; MOHAMMADI, Y.; YOUSEFI, G. Freeze-Drying of Pharmaceutical and Nutraceutical Nanoparticles: The Effects of Formulation and Technique Parameters on Nanoparticles Characteristics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 109, no 11, p. 3235–3247, 2020.

- MUDUNKOTUWA, I. A.; MINSHID, A. A.; GRASSIAN, V. H.; ATR-FTIR spectroscopy as a tool to probe surface adsorption on nanoparticles at the liquid–solid interface in environmentally and biologically relevant media. **Analyst**, n. 5, 2014.
- NAFARI, A.; CHERAGHIPOUR, K.; SEPAHVAND, M.; SHAHROKHI, G.; GABAL, E.; MAHMOUDVAND, H. Nanoparticles: New agents toward treatment of leishmaniasis. **Parasite Epidemiology and Control**, vol. 10, p. e00156, 2020.
- NIREESHA, G.; DIVYA, L.; SOWMYA, C.; VENKATESHAN, N.; BABU, M.; LAVAKUMAR, V. Lyophilization/Freeze Drying -An Review. **Ijntps**, v.3, n. 4, p. 87-98, 2013.
- PRATA, W. M.; Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas carreadoras de proteínas como potenciais adjuvantes para uso em vacinas. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.
- PIELICHOWSKA, K.; NOWICKA, K. Analysis of nanomaterials and nanocomposites by thermoanalytical methods. **Thermochimica Acta**, [s. I.], v. 675, nº 5, p. 140-163, 2019.
- PRAKASH, M.; GHOSH, A. K. An investigation on optimization of instantaneous synthesis of TiO₂ nanoparticles and it's thermal stability analysis in PP-TiO₂ nanocomposite. **Solid State Sciences**, v. 120, n. June, p. 106707, 2021.
- RAMIREZ, L. M. F.; RIHOUEY, C.; CHAUBET, F.; CERF, D.L.; PICTON, L. Characterization of dextran particle size: How frit-inlet asymmetrical flow field-flow fractionation (FI-AF4) coupled online with dynamic light scattering (DLS) leads to enhanced size distribution. **Journal of Chromatography A**, v. 1653, p. 462404, 2021.
- RODRIGUES, K. A. da F.; DIAS, C. N. de S.; NÉRIS, P. L. do N.; ROCHA, J. da C.; SCOTTI, M. T.; SCOTTI, L.; MASCARENHAS, S. R.; VERAS, R. C.; MEDEIROS, I. A. de; KEESEN, T. de S. L.; OLIVEIRA, T. B. de; LIMA, M. do C. A. de; BALLIANO, T. L.; AQUINO, T. M. de; MOURA, R. O. de; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; OLIVEIRA, M. R. de. 2-Aminothiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 106, p. 1–14, 2015.
- RODRIGUES, K. A. da F.; SILVA, D. K. F.; SERAFIM, V. de L.; ANDRADE, P. N.; ALVES, A. F.; TAFURI, W. L.; BATISTA, T. M.; MANGUEIRA, V. M.; SOBRAL, M. V.; MOURA, R. O. de; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; OLIVEIRA, M. R. de. SB-83, a 2-Amino-thiophene derivative orally bioavailable candidate for the leishmaniasis treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1670–1678, 2018.

SAMIMI, S.; MAGHSOUDNIA, N; EFTEKHARI, R.B.; DORKOOSH, F. Chapter 3 - Lipid-Based Nanoparticles for Drug Delivery Systems. **Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery**, [s.l.], no 10, p. 47–76, 2019.

SILVA, J. E. G. Preparação e Caracterização de Nanopartículas Contendo Candidato a Fármaco Anti-Leishmania 2-[1H-5 BROMO-INDOL-2-IL)METILENOAMINO]-5,6,7,8-TETRAIDRO-4H-CICLOHEPTA[B] TIOFENO-3-CARBONITRILA. Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Programa de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, 2016.

SUGA, M.; ASAHINA, S.; SAKUDA, Y.; KAZUMORI, H.; NISHIYAMA, H.; NOKUO, T.; ALFREDSSON, V.; KJELLMAN, T.; STEVENS, S. M.; CHO, H. S.; CHO, M.; HAN, L.; CHE, S.; ANDERSON, M. W.; SCHUTH, F.; DENG, H.; YAGHI, O. M.; LIU, Z.; TERASAKI, O. Recent progress in scanning electron microscopy for the characterization of fine structural details of nano materials. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 42, n. 1–2, p. 1–21, 2014.

SUSA, F.; BUCCA, G.; LIMONGI, T.; CAUDA, V.; PISANO, R. Enhancing the preservation of liposomes: The role of cryoprotectants, lipid formulations and freezing approaches. **Cryobiology**, [s.l.], v. 98, no November 2020, p. 46–56, 2021.

TANG, X.; PIKAL, M. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. **Pharm Res**, 2004.

TAKAHASHI, H. T.; NOVELLO, C. R.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B.P. D.; DE MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V. Thiophene derivatives with antileishmanial activity isolated from aerial parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) **Cass. Molecules**, [S. l.], v. 16, n. 5, p.253469–3478, 2011.

THAHER, Y. A.; SATOOF, A.; KAMAL, A.; ALMANI, D.; SHABAN, D.; KASSAB, G.; SURCHI, H.; ABU-QTAISH, H.; FATOUH, J.; AJALEH, S. A. Chapter 7 - Instrumental analytical techniques for physicochemical characterization of bio-nanomaterials. *Handbook on Nanobiomaterials for Therapeutics and Diagnostic Applications*, p. 133–150, 2021.

TRAN, P.; PARK, J. S. Application of supercritical fluid technology for solid dispersion to enhance solubility and bioavailability of poorly water-soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 610, no November, p. 121247, 2021.

TRENKENSCHUH, E.; FRIESS, W. Freeze-drying of nanoparticles: How to overcome colloidal instability by formulation and process optimization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 165, no 8, p. 345–360, 2021.

TYLER, B.; GULLOTTI, D.; MANGRAVITI, A.; UTSUKI, T.; BREM, H.. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 107, p. 163–175, 2016.

UMERSKA, A.; PALUCH, K. J.; SANTOS-MARTINEZ, M. J.; CORRIGAN, O. I.; MEDINA, C.; TAJBER, L. Freeze drying of polyelectrolyte complex nanoparticles: Effect of nanoparticle composition and cryoprotectant selection. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 552, no 1–2, p. 27–38, 2018.

WAGNER, M. Thermal Analysis in Practice: Fundamental Aspects. **Schwerzenbach: Hanser Publications**, 2017.

WANG, Xiaoping; DONG, W.; ZHANG, P.; TANG, H.; ZHANG, L.; YANG, T.; LIU, P.; WANG, H.; XIANG, X.D. High-throughput powder diffraction using white x-ray beam and a simulated energy-dispersive array detector. **Engineering**, 2022.

WILDING, K. M.; ZHAO, E. L.; EARL, C. C.; BUNDY, B.C. Thermostable lyoprotectant-enhanced cell-free protein synthesis for on-demand endotoxin-free therapeutic production. **New Biotechnology**, [s.l.], v. 53, no April, p. 73–80, 2019.

YUE-XING, C.; FEI-FEI, Y.; HAN, W.; TAO-TAO, F.; CHUN-YU, L.; LI-HUI, Q.; YONG-HONG, L. The effect of L-leucine on the stabilization and inhalability of spray-dried solid lipid nanoparticles for pulmonary drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s.l.], v. 46, no 151, p. 474–481, 2018.