

Pedro Davide Leite Fernandes

Otimização do processo de fabrico de nanopartículas sólidas por homogeneização a pressão elevada

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor João Manuel Martins Leitão e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Pedro Davide Leite Fernandes

Otimização do processo de fabrico de nanopartículas sólidas por homogeneização a pressão elevada

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor João Manuel Martins Leitão e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Pedro Davide Leite Fernandes, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010165926, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de Setembro de 2015.

(Pedro Davide Leite Fernandes)

O Tutor da Monografia

(Professor Doutor João Manuel Martins Leitão)

O Orientando

(Pedro Davide Leite Fernandes)

“Só com sabedoria dos velhos e a força dos novos, é que isto avança.” – avô José Leite.

Agradecimentos

À minha família, pelo apoio dado, pela constante presença e por acreditarem em mim, nesta etapa.

Aos meus amigos, com os quais tive a oportunidade de partilhar momentos de grande companheirismo e amizade sincera durante estes cinco anos.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pela excelência do corpo docente e não docente.

Ao Professor Doutor João Leitão, pela compreensão, paciência, frontalidade, partilha de conhecimento e disponibilidade em ser Tutor desta monografia.

Índice

Introdução	1
Nanopartículas Lipídicas Sólidas	3
Homogeneização a Pressão Elevada	4
Processo a frio	4
Processo a quente	4
Variáveis do processo de fabrico	5
Modelos experimentais de otimização.....	8
Modelos de Varrimento.....	9
Modelos de Otimização	10
Casos práticos de Otimização.....	11
1. “Optimizing SLN and NLC by 2 ² full factorial design: Effect of homogenization technique.”(Severino, Santana, et al., 2012).	11
2. “Optimization of α -tocopherol loaded solid lipid nanoparticles by central composite design.”(Carvalho, De et al., 2013).	13
Conclusões	15
Bibliografia.....	16

Índice de figuras

Figura 1: Tipos de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (SLN) (Üner e Yener, 2007).....	3
Figura 2: Exemplo de um possível Homogeneizador a Pressão Elevada.	4
Figura 3: Esquema representativo das vertentes de Homogeneização a Alta Pressão (Mäder e Mehnert, 2001).....	5
Figura 4: Equação de Henry (Kaszuba <i>et al.</i> , 2010).	6
Figura 5: Fórmula de cálculo da Capacidade de Carga e fórmula cálculo da Eficiência de Encapsulação (Carvalho, De <i>et al.</i> , 2013).	7
Figura 6: Modelo Fatorial - tabela e matriz de estudo de duas variáveis e matriz de estudo para três variáveis (Lundstedt <i>et al.</i> , 1998).	9
Figura 7: Matriz para um modelo fatorial fracionado com três variáveis (Lundstedt <i>et al.</i> , 1998)	10
Figura 8: Modelo de CCD para três variáveis (Lundstedt <i>et al.</i> , 1998).	10
Figura 9: Modelo fatorial 2 ² inicial, estabelecendo os valores de cada nível(Severino, Santana, <i>et al.</i> , 2012).....	11
Figura 10: Gráficos de superfície de resposta. (a) Tamanho de partícula, (b) Potencial zeta; (c) Índice de polidispersão(Severino, Santana, <i>et al.</i> , 2012).	11
Figura 11: Parâmetros do modelo de compósito central e valores experimentais obtidos para o tamanho de partícula, taxa de incorporação de α -tocoferol e potencial zeta(Carvalho, De <i>et al.</i> , 2013).	13

Abreviaturas

AFM – Microscopia de Força Atômica, (do inglês: *Atomic Force Microscopy*).

CC – Capacidade de Carga.

CCD – Modelo Compósito Central, (do inglês: *Central Composite Design*).

DoE – Planejamento Experimental (do inglês: *Design of Experiments*).

DSC – Calorimetria de Varrimento Diferencial, (do inglês: *Differential Scanning Calorimetry*).

EE – Eficiência de encapsulação.

ELS – Dispersão Electroforética da Luz, (do inglês: *Electrophoretic Light Scattering*).

HPH – Homogeneização a Pressão Elevada, (do inglês: *High Pressure Homogenization*).

HSH – Homogeneização por Cisalhamento elevado, (do inglês: *High Shear Homogenization*).

OFAT/OVAT – Um Fator/Uma variável de Cada Vez, (do inglês: *One-Factor/Variable-At-A-Time*).

PI – Índice de Polidispersão, (do inglês: *Polydispersity Index*).

RSM – Metodologia de Superfície de Resposta, (do inglês: *Response Surface Methodology*).

SEM – Microscopia Eletrônica de Varrimento, (do inglês: *Scanning Electron Microscopy*).

SLN – Nanopartículas Lipídicas Sólidas, (do inglês: *Solid Lipidic Nanoparticles*).

TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão. (do inglês: *Transmission Electron Microscopy*).

XRD – Difração de Raios-X, (do inglês: *X-ray Diffraction*).

Resumo

As nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) são sistemas de transporte utilizados em diversas indústrias, incluindo a indústria farmacêutica no transporte de fármacos. A base lipídica das SLN são lípidos fisiologicamente compatíveis atraindo nos últimos anos a atenção da comunidade científica para possíveis novas formas de terapêutica.

O processo de fabricação de homogeneização a alta pressão (HPH) é bastante utilizado dado que não inclui solventes orgânicos, os custos associados relativamente baixos e a transposição para escala industrial é uma realidade.

Os estudos de otimização são cada vez mais utilizados, quer na fase de inicial de desenvolvimento de processos, quer na procura de robustez ou ainda na otimização de processos já estabelecidos.

Dadas as exigências existentes ao nível da melhoria de terapêuticas, a criação de novos meios de administração é inevitável e como tal a otimização dos mesmos está implícita. O estudo de otimização do processo de fabricação de SLN por HPH torna-se necessário dado o número de vias de administração existentes, a quantidade de fármacos a incorporar e a variedade de lípidos e soluções tensioativas passíveis de serem usadas.

Abstract

SLN are carrier systems used on many industries, including pharmaceutical industry as drug carriers. The SLN lipid base is composed of physiologically compatible lipids, attracting the attention for new therapeutical developments.

High pressure homogenization is widely used because organic solvents aren't present, scale up is possible and has relatively low cost.

Designs of experiments are being increasingly requested, either in the early process development stage, or when robustness is required or in already established process optimization.

The need for therapeutic improvement, makes designing of new ways of drug delivery unavoidable as well as their optimization. The optimization of the manufacturing process of SLN by HPH and its research became necessary due to the method of drug delivery, the drugs to include, the variety of lipids that can be used and the surfactant solutions used.

Introdução

A necessidade e exigência impostas à eficácia da terapêutica medicamentosa levou ao estudo e posterior aparecimento de novos sistemas de transportes de fármacos. Nos últimos anos tem-se tornado mais evidente que o desenvolvimento de novos fármacos não tem sido suficiente para assegurar o progresso das diferentes terapêuticas medicamentosas (Mäder e Mehnert, 2001). As razões existentes para a falha da terapêutica medicamentosa são várias entre as quais razões farmacocinéticas (baixa absorção, rápido metabolismo e eliminação) e físico-químicas (baixa solubilidade do fármaco no veículo de administração e floculação, por exemplo) (Mäder e Mehnert, 2001).

As nanopartículas, atendendo aos inúmeros processos de fabrico e morfologias, são atualmente “ferramentas” extensamente usadas e estudadas em vários campos de aplicação de forma a desenvolver novos produtos.

Nos últimos 20 anos as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) apareceram como um novo sistema de transporte de fármacos baseado em nanopartículas, e como uma potencial alternativa a outros sistemas tais como emulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas, nas de mais vias de administração (Hao *et al.*, 2011).

As SLN têm uma composição que é bem tolerada pelo organismo humano e têm uma grande facilidade de transposição de escala a nível industrial (Silva *et al.*, 2011). Dada a sua matriz sólida, esta pode proteger os fármacos incorporados da degradação pelos diversos fatores e permitir diferentes perfis de libertação. Podem também ser assim corrigidos efeitos secundários e reações adversas e aumentada a biodisponibilidade de determinados princípios ativos (Gaumet *et al.*, 2008).

Embora a elevada biocompatibilidade dos lípidos usados, seja a maior vantagem das SLN, é necessário uma elevada qualidade aquando da produção industrial, para que sejam aceites pelas Autoridades Regulamentares.

A estrutura cristalina do lípido sólido bem como a solubilidade do fármaco no lípido dificulta a incorporação do fármaco. A capacidade de incorporação de fármacos hidrofílicos torna-se reduzida devido aos efeitos de partição com a fase externa aquosa, em determinados casos. Durante o período de armazenamento a transição entre formas polimórficas do fármaco pode levar à sua expulsão do transportador (Anton, Benoit e Saulnier, 2008).

Otimização do processo de fabrico de nanopartículas sólidas por homogeneização a pressão elevada

Por tudo isto torna-se necessário ter em conta todas variáveis associadas ao processo de fabrico das SLN de forma a otimizá-lo e procurando obter diferentes procedimentos de produção de acordo com os fármacos a administrar.

O objetivo deste trabalho é compreender de que forma é que o processo de fabrico de nanopartículas lipídicas sólidas por homogeneização pressão elevada pode ser otimizado.

Nanopartículas Lipídicas Sólidas

As SLN eram geralmente definidas como “nano-matrizes” lipídicas, sólidas à temperatura ambiente e estabilizadas por tensoativos (Silva *et al.*, 2011). Dados os estudos realizados encontram-se descritas em três tipos: SLN I, SLN II e SLN III. O reduzido tamanho, a extensa área de superfície, a capacidade de incorporação, o baixo risco de toxicidade aguda e crónica, a boa estabilidade física e os reduzidos custos de produção, são algumas das vantagens das nanopartículas lipídicas sólidas (Severino, Andreani, *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2011).

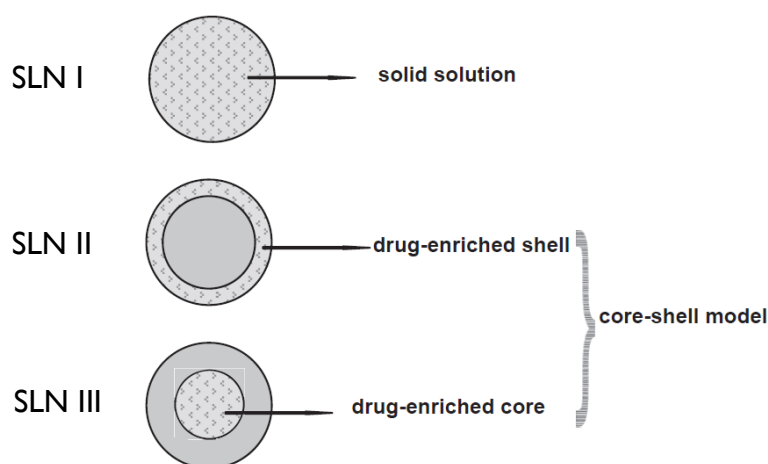


Figura 1: Tipos de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (SLN) (Üner e Yener, 2007).

As SLN I são consideradas a primeira geração de SLN e surgem de emulsões óleo/água em que um lípido sólido, contendo o fármaco, era disperso numa solução aquosa de tensoativo, sendo designados por transportadores coloidais (Üner e Yener, 2007).

As SLN I e as SLN II/III são obtidas pelo mesmo método havendo apenas diferenças ao nível da temperatura durante o procedimento. As SLN II possuem o núcleo lipídico sólido pois na fase de arrefecimento este cristaliza e o fármaco fica dissolvido na solução externa, aderindo posteriormente ao núcleo sólido. No caso das SLN III, o arrefecimento da nanoemulsão leva a uma supersaturação do fármaco, precipitando primeiro que a cristalização da base lipídica. A solubilidade do fármaco na base lipídica constitui também um fator preponderante no tipo de SLN a obter (Pardeike, Hommoss e Müller, 2009; Üner e Yener, 2007). Dada a sua estrutura, as SLN III permitem uma libertação mais prolongada do fármaco. No entanto, a libertação do fármaco pelas SLN II dá-se de forma rápida permitindo uma resposta imediata (Pardeike *et al.*, 2009; Üner e Yener, 2007). Com a explicação do método de produção tornar-se-á mais claro distinguir os diferentes tipos.

Homogeneização a Pressão Elevada

O processo de fabrico por Homogeneização a Pressão Elevada (HPH) pode decorrer a frio ou a quente que, como já referido anteriormente, origina SLN com características diferentes. Na fase final, a homogeneização dá-se através da passagem forçada da mistura obtida, por um tubo com dimensões nanométricas, sendo recolhida no final.

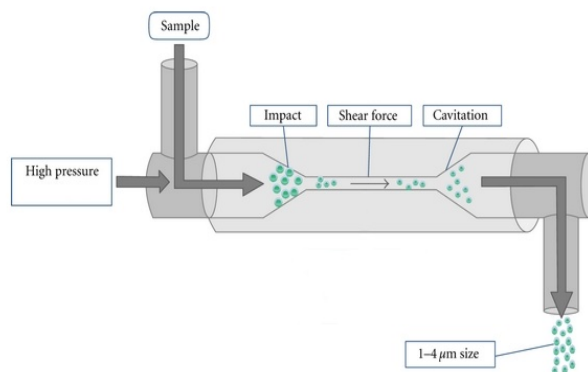


Figura 2: Exemplo de um possível Homogeneizador a Pressão Elevada.

O homogeneizador empurra a mistura com pressão elevada contra uma passagem estreita. A mistura acelera até uma velocidade elevada em curta distância. As elevadas forças de cisão e de cavitação fazem com que as partículas se dividam para tamanhos inferiores (Mäder e Mehnert, 2001).

Processo a frio

O princípio ativo é adicionado ao lípido sólido fundido. De seguida ocorre o arrefecimento da mistura originando micropartículas lipídicas. Estas micropartículas são dispersas em uma solução tensioativa. Após agitação forma-se uma pré-suspensão, que irá sofrer a ação do homogeneizador a pressão elevada, originando nanopartículas lipídicas sólidas de matriz sólida e homogénea (SLN I). Esta vertente é largamente utilizada quando os fármacos a incorporar são hidrofílicos (Mäder e Mehnert, 2001; Üner e Yener, 2007).

Processo a quente

O fármaco é adicionado ao lípido sólido fundido. Esta mistura é dispersa em uma solução tensioativa, formando-se de seguida por agitação uma pré-emulsão quente. A emulsão sofre ação do homogeneizador, originando por arrefecimento nanopartículas lipídicas sólidas. A vertente a quente é usada para incorporar fármacos lipídicos, estando o perfil de ação e a qualidade das nanopartículas lipídicas (SLN II/III) dependentes da temperatura da pressão e números de ciclos de homogeneização. No entanto, a HPH a

Otimização do processo de fabrico de nanopartículas sólidas por homogeneização a pressão elevada quente, requer especial atenção dado que pode induzir a degradação do fármaco bem como o efeito partição do fármaco para a fase aquosa (Mäder e Mehnert, 2001).

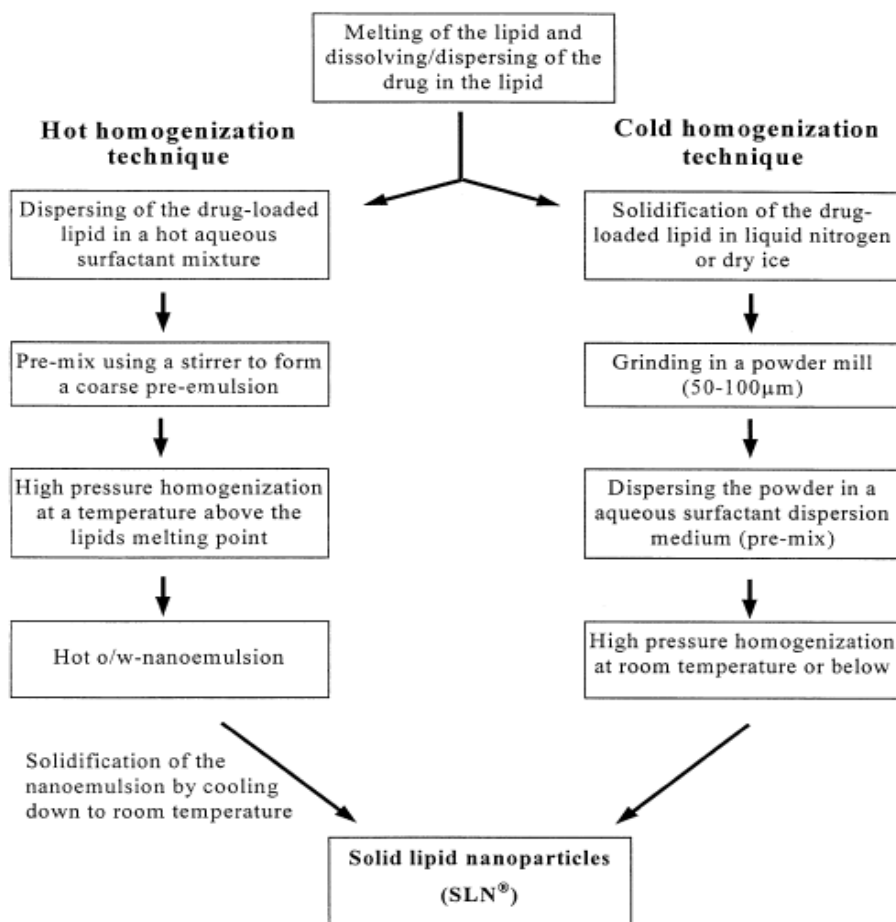


Figura 3: Esquema representativo das vertentes de Homogeneização a Alta Pressão (Mäder e Mehnert, 2001).

Variáveis do processo de fabrico

As variáveis a considerar, durante todo este processo de fabrico dependem das características físico-químicas dos fármacos, bem como dos lípidos usados como base. A via de administração o alvo a atingir no organismo interferem também, no “desenho” do processo de produção das nanopartículas lipídicas sólidas. Assim diversos estudos devem ser realizados de forma a conjugar os princípios ativos com os lípidos passíveis de ser utilizados neste processo de fabrico. O número de ciclos de homogeneização, a temperatura e pressão de homogeneização, a solução tensioativa e o tempo entre cada etapa do processo são, por exemplo, algumas das variáveis a ser incluídas em modelos de otimização, de forma saber a sua influência no fabrico e nas variáveis/parâmetros de resposta.

Os parâmetros de resposta a analisar para qualquer processo são, o tamanho de partícula, a morfologia das nanopartículas, o potencial zeta, o grau de cristalinidade, a eficiência de encapsulação e a capacidade de transporte do fármaco (Silva *et al.*, 2011).

O **tamanho de partícula** das SLN é medido através da dispersão dinâmica de luz (espectroscopia de correlação fotónica) e da dispersão estática de luz (difração de laser). A espectroscopia de correlação fotónica é um método amplamente usado e bem estabelecido para a determinação do tamanho de partícula, especialmente para partículas com dimensões nanométricas a micrométricas, apresentando em paralelo a distribuição do tamanho de partícula, sob a forma de índice de polidispersão (PI). Esta técnica consiste medição da flutuação da intensidade da luz dispersa causada pelo movimento Browniano das partículas. A velocidade do movimento Browniano é definida pelo coeficiente de difusão (Severino, Santana e Souto, 2012; Silva *et al.*, 2011).

Com o método da difração de laser, mede-se a intensidade da luz dispersa por um conjunto de partículas em função do ângulo de difração. O ângulo de difração é inversamente proporcional ao tamanho da partícula (Silva *et al.*, 2011).

A **morfologia das partículas** poderá ser verificada e avaliada por microscopia eletrónica de transmissão (TEM), de varrimento (SEM) e por microscopia de força atómica (AFM). Este último método, para além de permitir a avaliar a forma e a morfologia das nanopartículas, apresenta ainda a topologia das mesmas (Mäder e Mehnert, 2001; Silva *et al.*, 2011).

A medição do **potencial zeta** permite prever a estabilidade de uma dispersão

$$U_E = \frac{2\varepsilon z F(\kappa a)}{3\eta}$$

U_E – Mobilidade Electroforética;

z – Potencial Zeta;

ε – Constante Dielétrica;

η – Viscosidade;

$F(\kappa a)$ – Função de Henry.

coloidal durante o armazenamento. O potencial zeta é uma propriedade física relacionada com a carga superficial (elétrica) de uma partícula, em suspensão, em um determinado meio. Em geral, a agregação de partículas tem menor probabilidade de ocorrer em partículas carregadas (elevado potencial zeta) devido à repulsão elétrica. No entanto, esta regra não se pode aplicar estritamente a sistemas que contenham

Figura 4: Equação de Henry (Kaszuba *et al.*, 2010).

estabilizadores estéricos, dado que a adsorção destes leva a uma diminuição do potencial zeta. Através da

técnica de dispersão electroforética da luz (ELS) é possível medir a mobilidade

Otimização do processo de fabrico de nanopartículas sólidas por homogeneização a pressão elevada electroforética das partículas em dispersão (princípio da eletroforese). Assim o potencial zeta está relacionado com a mobilidade electroforética segundo a equação de Henry (Severino, Santana, *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2011).

O **grau de cristalinidade** do lípido base requer especial atenção, tal como a modificação a que está sujeito, dado que o aquecimento/arrefecimento e a fusão/recristalização da maioria dos lípidos podem levar à ocorrência de transições entre os seus vários estados polimórficos. Este parâmetro está fortemente relacionado com as taxas de incorporação e libertação do princípio ativo. As técnicas de calorimetria de varrimento diferencial (DSC) e de difração de raios-X (XRD) tornam-se essenciais para a avaliação do grau de cristalinidade. A DSC é largamente usada para o estudo de eventos térmicos de amostras, partindo do princípio que diferentes modificações lipídicas, originam diferentes pontos de fusão e entalpias de fusão. No entanto, não revela a origem do fenómeno. Para identificar a causa que levou a determinadas formas polimórficas são necessárias técnicas complementares como a difração de raios-X. (Silva *et al.*, 2011).

Um ponto importante para avaliar se um sistema de transporte, como as nanopartículas lipídicas sólidas, é adequado para um determinado fármaco é a **capacidade de carga (CC)** (ou capacidade de incorporação) bem como a **eficiência da encapsulação (EE)**. A capacidade de carga é geralmente expressa em percentagem em relação à fase lipídica.

$$\% CC = \frac{m_{\text{fármaco total}} - m_{\text{fármaco livre}}}{m_{\text{lípido}}} \times 100 \quad \% EE = \frac{m_{\text{fármaco total}} - m_{\text{fármaco livre}}}{m_{\text{fármaco total}}} \times 100$$

Figura 5: Fórmula de cálculo da Capacidade de Carga e fórmula cálculo da Eficiência de Encapsulação (Carvalho, De *et al.*, 2013).

A eficiência da encapsulação é calculada através da seguinte fórmula (Figura 5) sendo determinada de forma indireta. Através de ultrafiltração da dispersão das SLN, obtém-se a fase aquosa externa (solução tensioativa), com o fármaco livre não incorporado. Calculando a quantidade de fármaco livre é possível saber a eficácia de encapsulação (Gonzalez-Mira *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2011).

A capacidade de carga e eficiência de encapsulação dependem principalmente da solubilidade do fármaco no lípido, da estrutura química e física da matriz lipídica sólida e do estado polimórfico (Gonzalez-Mira *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2011).

Modelos experimentais de otimização

Os modelos experimentais de otimização (modelos matemáticos) são ferramentas usadas para avaliar de uma forma sistemática, rápida e eficiente diferentes tipos de problemas que surgem quer na investigação quer na produção de um determinado produto. (Lundstedt *et al.*, 1998) A “otimização tradicional”, otimização que varia um fator/uma variável de cada vez (OFAT), tem associadas muitas desvantagens. Em primeiro lugar, raramente se obtém as condições ótimas devido ao facto dos resultados serem dependentes de um ponto de partida. Em segundo, este método não é capaz de separar as interferências da experiência de uma possível melhoria, a não ser que sejam realizadas um determinado número de experiências nas mesmas condições (Weissman, 2014). A abordagem sistemática inerente, ao planeamento experimental (DoE) de otimização, elimina determinados erros cometidos pela pessoa que realiza a análise, e frequentemente até apresenta condições que não tinham sido consideradas anteriormente (Weissman, 2014). No entanto a principal vantagem dos DoE é a facilidade de encontrar possíveis interações entre variáveis que podem por exemplo afetar a produção e qualidade do produto (Weissman, 2014). O facto de serem vários os fatores analisados em simultâneo, torna estes modelos mais eficientes (Lundstedt *et al.*, 1998; Weissman, 2014).

De forma a ser escolhido um modelo de DoE de otimização adequado para o problema em questão, deve-se primeiramente definir o objetivo principal (Lundstedt *et al.*, 1998). Assim o problema deverá ser analisado com a ajuda de algumas questões como: *o que é conhecido? O que não é conhecido? O que é necessário investigar?* (Lundstedt *et al.*, 1998). Depois de planeado o processo ou experiência, os fatores/variáveis a incluir no DoE serão definidos. Torna-se imperativo criar prioridades entre as variáveis consideradas, a fim de não desperdiçar tempo, materiais e evitar um maior número de experiências. Considerar todos os fatores intervenientes no processo de fabrico não é vantajoso dado que nem todos interferem significativamente nos resultados obtidos. Os fatores podem ser divididos em fatores que poderão causar mais impacto, fatores suspeitos, fatores possíveis e fatores improváveis. As variáveis de resposta definidas traduzem os resultados do processo. Estas estão relacionadas com os objetivos e podem ser incluídas num único DoE. A exatidão e a reprodutibilidade da técnica experimental são de extrema importância de forma a alcançar resultados significativos (Weissman, 2014).

Atualmente, os resultados obtidos são introduzidos em programas informáticos que os reorganizam de acordo com o tipo de modelo selecionado apresentando no final uma equação que traduz a influência de cada fator.

Os modelos matemáticos frequentemente utilizados para otimizar processos de fabrico dividem-se em dois grupos: os modelos de varrimento e os modelos de otimização.

Modelos de Varrimento

Os modelos de varrimento (*screening*), reportam informação qualitativa sobre variáveis e interações relevantes, excluindo os fatores que não têm grande impacto nas variáveis resposta.

O **modelo fatorial** averigua se todas as variáveis e efeitos de interação considerados em um determinado procedimento influenciam as respostas obtidas. Se as combinações de k fatores forem verificadas a dois níveis (± 1) o modelo fatorial deverá consistir em 2^k experiências a realizar. O nível zero (centro) deve estar sempre incluído de forma a minimizar a perda de linearidade e determinar intervalos de confiança (Lundstedt et al., 1998).

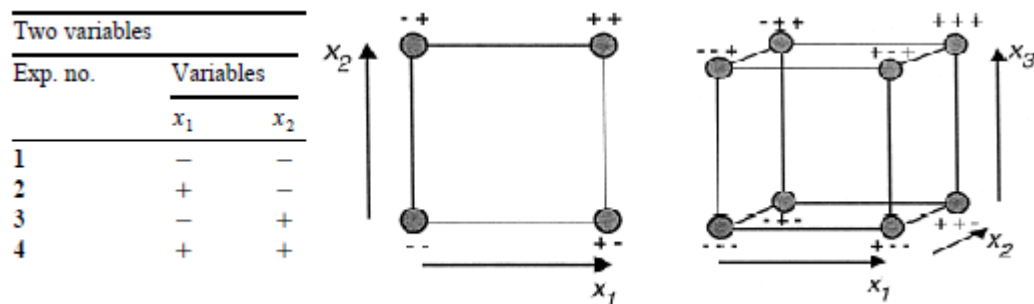


Figura 6: Modelo Fatorial - tabela e matriz de estudo de duas variáveis e matriz de estudo para três variáveis (Lundstedt et al., 1998).

O **modelo fatorial fracionado** é definido através de uma matriz, como o modelo anterior, acrescentando uma coluna com o produto dos níveis estabelecidos para as variáveis. No entanto para evitar a realização de um elevado número de experiências, é assumido que a influência de interações de terceira ordem não significativa. Assim são definidas frações do modelo matemático com 2^{k-p} variáveis em que k representa o número de variáveis e p o tamanho da fração. No modelo fatorial fracionado as experiências tentam abranger o mais possível o domínio experimental (Lundstedt et al., 1998).

<i>I</i>	a	b	c ab
1	-1	-1	1
1	1	-1	-1
1	-1	1	-1
1	1	1	1

Figura 7: Matriz para um modelo fatorial fracionado com três variáveis (Lundstedt et al., 1998).

Modelos de otimização

No campo da otimização existem duas estratégias: a otimização simples (já referida anteriormente) e o método de superfície de resposta (Lundstedt et al., 1998).

O **modelo compósito central** (CCD) está incluído no método de superfície de resposta. Para definir as condições ótimas é necessário que a função polinomial contenha termos quadráticos. Assim há uma melhor compreensão do modelo em estudo. Este modelo é constituído por um modelo fatorial ou fatorial fracionário, experiências centrais e experiências com distância $\pm \alpha$ da origem com $x_i = \alpha$. (Araujo e Brereton, 1996; Hao et al., 2011; Lundstedt et al., 1998; Severino, Santana, et al., 2012; Weissman, 2014).

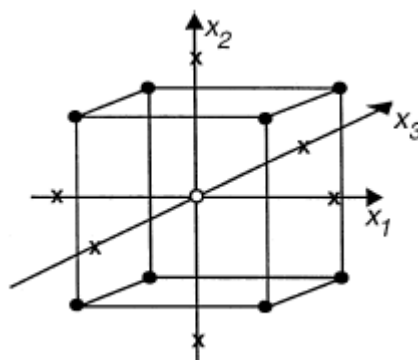


Figura 8: Modelo de CCD para três variáveis (Lundstedt et al., 1998).

O **modelo Box Behnken** segue também, o modelo de superfície de resposta, dado que estima parâmetros sob a forma de equação quadrática, constrói modelos sequenciais e deteta o desajuste do modelo. (Ferreira et al., 2007). Quando comparado com CCD consegue ser ligeiramente mais eficaz (Ferreira et al., 2007).

Nos estudos apresentados abaixo, alguns destes modelos serão expostos de forma a compreender a sua dinâmica.

Casos práticos de Otimização

1. “Optimizing SLN and NLC by 2^2 full factorial design: Effect of homogenization technique.”(Severino, Santana, et al., 2012).

Os objetivos deste estudo são avaliar o efeito da pressão utilizada no processo de fabrico de SLN por HPH, e o efeito da intensidade de mistura através de um HSH, de forma a obter um maior rendimento possível na produção de SLN. As variáveis dependentes/resposta estabelecidas foram o tamanho de partícula, o índice de polidispersão e o potencial zeta, permitindo obter uma resposta acerca do efeito de cada um dos fatores em estudo. Recorrendo a um modelo fatorial 2^2 (2^k , k = número de fatores em estudo), fixaram-se os valores dos três níveis, tendo por base estudos de prévios de pré-formulação. Cada fator possui um nível mais elevado (+1) e um nível mais baixo (-1), sendo que o nível central (0) é usado para estimar o erro experimental (Leardi, 2009).

Variables	Levels		
	-1	0	+1
HSH intensity (rpm)	10,000	15,000	20,000
HPH pressure (bar)	500	700	900

Figura 9: Modelo fatorial 2^2 inicial, estabelecendo os valores de cada nível (Severino, Santana, et al., 2012).

Neste estudo, os dados foram analisados pelo programa informático *STATISTICA 7.0*, gerando equações polinomiais que estabelecem as relações entre os fatores em estudo e as variáveis dependentes. Os resultados são apresentados em gráficos de superfície de resposta como mostra a figura 7.

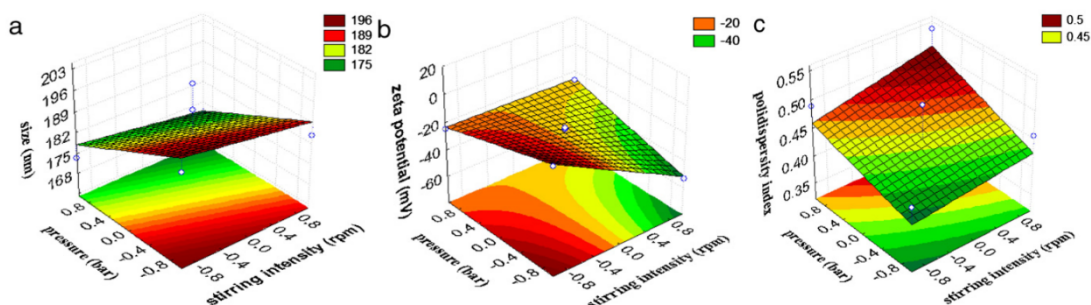


Figura 10: Gráficos de superfície de resposta. (a) Tamanho de partícula, (b) Potencial zeta; (c) Índice de polidispersão (Severino, Santana, et al., 2012).

De acordo com os resultados apresentados o índice de polidispersão não se mostrou estaticamente relevante. Assim apenas foram apresentadas as seguintes equações:

$$\text{Tamanho de Partícula (nm)} = - 8,9750P$$

$$\text{Potencial Zeta (mV)} = 183,8-3,2750H+0,1750H.P$$

Otimização do processo de fabrico de nanopartículas sólidas por homogeneização a pressão elevada

Onde, **P** é a pressão exercida pela HPH e **H** a intensidade de homogeneização no método de HSH.

Na produção de SLN, o aumento da pressão e do número de ciclos de homogeneização utilizada por HPH, assim como o aumento da intensidade por HSH fazem com que o tamanho de partícula diminua e a agregação das nanopartículas ocorra.

Os valores das variáveis independentes são de 20 000 rpm de intensidade de mistura para o processo de HSH e 500 bar de pressão para o processo de HPH, de forma a obter SLN nas condições previstas.

2. “Optimization of α -tocopherol loaded solid lipid nanoparticles by central composite design.”(Carvalho, De et al., 2013).

Este estudo tem como objetivo estabelecer as condições ideais de produção de SLN de α -tocoferol pelo de processo de HPH. Para tal, foi usado o modelo de otimização CCD para avaliar a influência da concentração de α -tocoferol (X1), da concentração de tensoativo lipofílico (lecitina de soja, X2) e da concentração de tensoativo hidrofílico (poloxamer 188, X3) no tamanho de partícula, no potencial zeta e na taxa de incorporação de α -tocoferol. Os fatores selecionados (Xi) foram estudados em cinco níveis diferentes de concentração: -1 (X1, X2 e X3=0,5%), 0 (ponto central) (X1=0,75%, X2 e X3=1,0%), 1 (X1=1,0%, X2 e X3=1,5%), - $\sqrt{3}$ (X1=0,33%, X2 e X3=0.16%) e $\sqrt{3}$ (X1=1.17%, X2 e X3=1,84%). O valor $\sqrt{3}$ ($\sqrt{3}=1,682$) foi obtido através da equação $\pm\sqrt{3}$ dado que estavam em estudo 3 (três) variáveis independentes.

Run no.	Block	Assigned independent variables			Real independent variables			Responses		
		X1	X2	X3	α -Tocopherol concentration (%)	Soya lecithin concentration (%)	Poloxamer 188 concentration (%)	Particle size (nm)	α -Tocopherol recovery rate (%)	Zeta potential
1	Day 1	-1	-1	-1	0.5	0.5	0.5	459	74.2	-37.4
2	Day 1	-1	-1	1	0.5	0.5	1.5	190	70.7	-36.3
3	Day 1	-1	1	-1	0.5	1.5	0.5	324	73.4	-53.3
4	Day 1	-1	1	1	0.5	1.5	1.5	213	74.2	-47.6
5	Day 1	1	-1	-1	1.0	0.5	0.5	326	75.8	-38.7
6	Day 1	1	-1	1	1.0	0.5	1.5	171	82.1	-31.4
7	Day 1	1	1	-1	1.0	1.5	0.5	292	76	-51.9
8	Day 1	1	1	1	1.0	1.5	1.5	224	76.4	-46.1
9	Day 1	0	0	0	0.75	1.0	1.0	205	72.1	-45
10	Day 1	0	0	0	0.75	1.0	1.0	215	74.5	-46.5
11	Day 2	-1.682	0	0	0.33	1.0	1.0	230	69.2	-47
12	Day 2	1.682	0	0	1.17	1.0	1.0	217	76.7	-45.6
13	Day 2	0	-1.682	0	0.75	0.16	1.0	211	73.2	-30.2
14	Day 2	0	1.682	0	0.75	1.84	1.0	268	58.5	-54.3
15	Day 2	0	0	-1.682	0.75	1.0	0.16	615	71.3	-52.6
16	Day 2	0	0	1.682	0.75	1.0	1.84	196	71.1	-40.6
17	Day 2	0	0	0	0.75	1.0	1.0	217	74.2	-46.15
18	Day 2	0	0	0	0.75	1.0	1.0	204	74	-47.8

Figura 11: Parâmetros do modelo de compósito central e valores experimentais obtidos para o tamanho de partícula, taxa de incorporação de α -tocoferol e potencial zeta (Carvalho, De et al., 2013).

De acordo com o modelo de compósito central gerado pelo programa informático utilizado (STATISTICA) (Figura 8), as dezoito experiências foram realizadas em dois dias de forma a minimizar os efeitos de variabilidade dos resultados observados devido a erros sistemáticos. Para além dos oito pontos fatoriais (níveis -1 e 1) e dos 6 pontos axiais (níveis $\pm\sqrt{3}$) existem também quatro repetições do ponto central para estimar o erro associado.

A equação 1 (equação polinomial de segundo grau) foi usada pra expressar o tamanho de partícula (Y_1), a taxa de incorporação de α -tocoferol (Y_2) e o potencial zeta (Y_3) em função das variáveis independentes:

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3 + \varepsilon$$

Equação 1

Otimização do processo de fabrico de nanopartículas sólidas por homogeneização a pressão elevada

onde, B_0 é uma constante, B_i representa os termos lineares, B_{ii} representa os termos quadráticos para cada uma das variáveis, B_{ij} representa a interação entre os termos (com $i=1, 2$ e 3 e $j=1, 2$ e 3) e E representa o erro aleatório.

Para desenvolver um modelo para cada uma das variáveis de resposta (Y_1 , Y_2 e Y_3), os coeficientes relacionados com as variáveis independentes foram calculados com t-valores significativos ($p \leq 0,05$). Quanto mais baixo for o p-valor mais significativo é o efeito das variáveis independentes nas variáveis de resposta.

Assim, as equações 2, 3 e 4 descrevem a relação entre as variáveis independentes e o tamanho de partícula, a taxa de incorporação de α -tocoferol e o potencial zeta, respetivamente.

$$Y_1 = 210.46 - 14.27X_1 + 0.21X_2 - 95.75X_3 + 65.5X_3^2 + 16.37X_1X_2 + 19.62X_1X_3 + 30.62X_2X_3 \quad \text{Equação 2}$$

$$Y_2 = 73.63 + 2.23X_1 - 2.01X_2 - 1.75X_2^2 \quad \text{Equação 3}$$

$$Y_3 = 46.37 + 7.00X_2 - 1.83X_2^2 - 2.93X_3 \quad \text{Equação 4}$$

A conclusão apresentada por este estudo demonstra que para obter o tamanho médio de partícula de 214,5 nm, uma taxa de incorporação de α -tocoferol de 75,4 % e um potencial zeta de 41.9 mV as condições ótimas são 1.1% de α -tocoferol, 0,75% de lecitina de soja e 1,3% de *poloxamer 188*.

Conclusões

As SLN são sistemas de transporte de fármacos muito promissores na medida em que são tidos em conta como uma forma de melhorar a as características farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo e eliminação) de determinados fármacos bem como a sua estabilidade durante o armazenamento. Além disso, podem ser concebidas para transportar um fármaco para um local em específico do organismo (terapêutica direcionada). A maior vantagem das SLN é o facto da matriz lipídica ser constituída por lípidos fisiologicamente compatíveis diminuindo o risco toxicidade crónica. Na produção de SLN por HPH não são utilizados solventes orgânicos e sendo possível a transposição de escala é o que torna este método de fabrico atrativo. As vertentes de produção (a quente e a frio) estudadas permitem obter SLN com diferentes perfis de libertação do fármaco.

Para caracterizar as SLN, são normalmente estabelecidas variáveis de resposta, como o potencial zeta, tamanho e morfologia de partícula que traduzem o efeito dos vários fatores considerados para análise.

Os modelos experimentais de otimização quando aplicados neste campo, permitem selecionar em uma primeira fase os fatores de influência mais relevante. Estes fatores são incluídos em um modelo experimental de otimização ajustado ao nível de significância pretendido. Os resultados das variáveis de resposta obtidos são analisados estatisticamente recorrendo ao modelo de otimização permitindo obter uma equação que relaciona os fatores em questão com as mesmas.

Em suma, os valores dos parâmetros que caracterizam as SLN têm que ser definidos mediante os objetivos a atingir ao nível da terapêutica como por exemplo fármaco a incorporar, via de administração e local de ação. Assim a escolha da composição da SLN dita os fatores que podem interferir na qualidade do produto, bem como as condições de fabrico por HPH. De forma geral é necessário realizar estudos de otimização para este processo de fabrico para que as nanopartículas obtidas satisfaçam os requisitos pretendidos, no caso de não existir procedimentos bem estabelecidos.

Bibliografia

ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. - Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. **Journal of Controlled Release**. . ISSN 01683659. 128:3 (2008) 185–199. doi: 10.1016/j.jconrel.2008.02.007.

ARAUJO, P. W.; BRERETON, R. G. - Experimental design II. Optimization. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**. . ISSN 01659936. 15:2 (1996) 63–70. doi: 10.1016/0165-9936(96)80762-X.

CARVALHO, S. M. DE *et al.* - Optimization of α -tocopherol loaded solid lipid nanoparticles by central composite design. **Industrial Crops and Products**. . ISSN 09266690. 49:2013) 278–285. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.04.054.

FERREIRA, S. L. C. *et al.* - Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**. . ISSN 00032670. 597:2 (2007) 179–186. doi: 10.1016/j.aca.2007.07.011.

GAUMET, M. *et al.* - Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. . ISSN 09396411. 69:1 (2008) 1–9. doi: 10.1016/j.ejpb.2007.08.001.

GONZALEZ-MIRA, E. *et al.* - Optimizing flurbiprofen-loaded NLC by central composite factorial design for ocular delivery. **Nanotechnology**. . ISSN 0957-4484. 22:4 (2011) 045101. doi: 10.1088/0957-4484/22/4/045101.

HAO, J. *et al.* - Development and optimization of solid lipid nanoparticle formulation for ophthalmic delivery of chloramphenicol using a Box-Behnken design. **International journal of nanomedicine**. . ISSN 11782013. 6:2011) 683–692. doi: 10.2147/IJN.S17386.

KASZUBA, M. *et al.* - High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. **Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences**. . ISSN 1364-503X. 368:1927 (2010) 4439–4451. doi: 10.1098/rsta.2010.0175.

LEARDI, R. - Experimental design in chemistry: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**. . ISSN 00032670. 652:1-2 (2009) 161–172. doi: 10.1016/j.aca.2009.06.015.

LUNDSTEDT, T. *et al.* - Experimental design and optimization. **Chemometrics And Intelligent Laboratory Systems**. 42:1998) 3–40.

MÄDER, K.; MEHNERT, W. - Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced drug delivery reviews**. . ISSN 0169-409X. 47:2-3 (2001) 165–96. doi: 10.1016/S0169-409X(01)00105-3.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. - Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**. . ISSN 03785173. 366:1-2 (2009) 170–184. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.10.003.

SEVERINO, P.; ANDREANI, T.; *et al.* - Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery. **Journal of Drug Delivery**. . ISSN 2090-3014. 2012:2012) 1–10. doi: 10.1155/2012/750891.

SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A; SOUTO, E. B. - Optimizing SLN and NLC by 2 2 full factorial design: Effect of homogenization technique. **Materials Science and Engineering C**. . ISSN 09284931. 32:6 (2012) 1375–1379. doi: 10.1016/j.msec.2012.04.017.

SILVA, A. C. *et al.* - Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. . ISSN 09277765. 86:1 (2011) 158–165. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.03.035.

ÜNER, M.; YENER, G. - Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspective. **International Journal of Nanomedicine**. . ISSN 11769114. 2:3 (2007) 289–300.

WEISSMAN, S. - Design of Experiments (DoE) and Process Optimization . A Review of Recent Publications . 2014).

Imagem de Capa:

Raed Abu-Reziq - **Casali Institute of Applied Chemistry**. [Data de Acesso: 5-09-2015].

Disponível na Internet: <http://chemistry.huji.ac.il/casali/images/raed3.jpg>

Jim Yang Lee Group [Data de Acesso: 5-09-2015]. Disponível na Internet:

<http://cheed.nus.edu.sg/stf/cheleejy/Gallery/Hollow%20Core-shell%20SnO2%20Nanoparticle.jpg>