

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BRENDA ALVES LOPES

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS
DE LECITINA/QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO MODIFICADA DA
PROGESTERONA

PONTA GROSSA

2025

BRENDA ALVES LOPES

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS
DE LECITINA/QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO MODIFICADA DA
PROGESTERONA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste como requisito para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra Priscileila Colerato Ferrari
Coorientador: Profa. Dra Patrícia Mazureki Campos

PONTA GROSSA

2025

L864 Lopes, Brenda Alves
Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas híbridas de
lecitina/quitosana para liberação modificada da progesterona / Brenda Alves
Lopes. Ponta Grossa, 2025.
119 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração:
Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Priscileila Colerato Ferrari.
Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia Mazureki Campos.

1. Nanotecnologia. 2. Mucosa vaginal. 3. Designer fatorial. 4. Nanopartículas
híbridas. 5. Hormônio esteroide. I. Ferrari, Priscileila Colerato. II. Campos,
Patrícia Mazureki. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos,
Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 615

BRENDA ALVES LOPES

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
HÍBRIDAS DE LECITINA/QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO MODIFICADA
DA PROGESTERONA**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre(a) no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, nível Mestrado e Doutorado, Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e a Universidade do Centro-Oeste (UNICENTRO).

Ponta Grossa, 26 de março de 2025.



Documento assinado digitalmente
PRISCILEILA COLERATO FERRARI
Data: 26/03/2025 14:32:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Priscileila Colerato Ferrari – UEPG – Presidente



Documento assinado digitalmente
MARLUS CHORILLI
Data: 27/03/2025 19:37:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marlus Chorilli – UNESP – Membro titular externo



Documento assinado digitalmente
RUBIANA MARA MAINARDES
Data: 26/03/2025 16:41:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Rubiana Mara Mainardes – UNICENTRO – Membro titular externo

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Bloco M Sala 93 B – Campus Universitário – Fone (42) 2102-8937
Av. Carlos Cavalcanti, 4748 – CEP: 84030-900 – PONTA GROSSA – PR – BRASIL

“Ninguém que deu o melhor de si, se arrependeu.”

(George Halas)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus, pela oportunidade de aprendizado concedida, pelas pessoas que colocou em meu caminho, por ouvir minhas orações e me conceder a graça de superar cada obstáculo.

Agradeço por todo amor e incentivo àqueles que são meu porto seguro, minha família: a minhas irmãs (Bruna e Luma), meu irmão (Daniel) e em especial aos meus pais (Francisco e Robecilda), pelo carinho e esforços realizados para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu companheiro e amigo, André, por todo apoio e incentivo que sempre me dedicou. Agradeço pela paciência em compreender minha ausência e pela admiração mútua e amor que construímos juntos.

A todos meus amigos que mantive, fiz e permaneceram por todo o período de construção dessa pesquisa, por contribuírem de alguma forma. Em especial, à Mirielen e às minhas companheiras de laboratório, Thaís e Júlia, por compartilharem comigo as frustrações diárias da pesquisa e da Pós-Graduação. Obrigada pelas risadas que tornaram os dias mais leves.

À Profa. Dra. Priscileila Colerato Ferrari pela confiança depositada em mim ao aceitar me orientar nessa dissertação. Agradeço a oportunidade, pela admirável paciência, pela indispensável contribuição científica e por me lembrar constantemente que devo confiar em mim. Deixo aqui registrado meu carinho, admiração e respeito pela profissional e pessoa que é.

À Profa. Dra. Patrícia Mazureki, sou imensamente grata pela coorientação, pelos conhecimentos científicos e de vida compartilhados. Pela confiança e pelos constantes incentivos desde a graduação. Agradeço pelas inúmeras conversas no laboratório, pelo apoio em cada desafio e, sobretudo, pelo exemplo de força, resiliência e profissionalismo que você representa para mim. Sua dedicação e generosidade foram essenciais nessa caminhada, e levo comigo cada aprendizado que me transmitiu.

À Profa. Dra. Patrícia Doll Boscardin por me considerar parte do seu grupo de pesquisa. Fico feliz pelo seu apoio, amizade, trabalhos desenvolvidos e pelo

acolhimento em seu laboratório. Sou grata pela confiança, pelos aprendizados compartilhados e por todas as oportunidades que me proporcionou ao longo dessa jornada.

Ao Prof. Dr. Luís Antônio Pinheiro, por sua inestimável generosidade e paciência ao me auxiliar nas análises do planejamento fatorial, sempre com disposição e compreensão diante dos meus limites intelectuais.

À Thaís Letícia Moreira por suas contribuições e ensinamentos com o uso do UHPLC que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Marques, Me. Maycon Hudson Contador e ao grupo de pesquisa GSCECOM, minha gratidão por terem aberto as portas da UEPG e da pesquisa para mim em 2015, quando ainda era aluna do PIBIC Jr. Agradeço pelos sete anos de iniciação científica no seu laboratório. Foi uma jornada fundamental para minha formação, e sou muito grata por cada aprendizado. Peço desculpas por não ter seguido na Química Orgânica, acabei me encontrando em outro caminho, mas levo comigo tudo o que aprendi com vocês.

Minha gratidão aos membros da banca de qualificação Profa. Dra. Patrícia Döll Boscardin e Prof. Dr. Paulo Vitor Farago e membros da banca de defesa Profa. Dra. Rubiana Mara Mainardes e Prof. Dr. Marlus Chorilli pelo tempo destinado a leitura atenta, respeitosa e pelas contribuições que muito auxiliaram na construção desta dissertação.

Às técnicas de laboratório Ely, Josemira e Aparecida pelo auxílio diários no laboratório, por manterem os equipamentos e materiais acessível para continuidade dos experimentos. Agradeço pelos cafés compartilhados e por sempre me tratarem com muito carinho. Sou especialmente grata pelos pequenos gestos que fizeram toda a diferença, seja um chá para acalmar ou um bolinho guardado quando eu não tinha tempo para pausas. Levo comigo cada demonstração de afeto e apoio.

Aos técnicos do Complexo de Laboratório de Multiusuários que me auxiliaram nas análises deste trabalho. Em especial, à Michele e à Silvine, por enfrentarem comigo as frustrações dos resultados ruins, comemorar as conquistas e, incansavelmente, me auxiliarem nas análises de DLS.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UEPG/UNICENTRO e ao corpo docente pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) por me proporcionar um local de excelência em ensino e pesquisa com disponibilidade de meios para minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)- Código de financiamento 001, pelo auxílio com a bolsa de mestrado que possibilitaram o desenvolvimento dessa pesquisa.

A todos que colaboraram de alguma maneira, os meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

A progesterona (PG) é um hormônio esteroide essencial para o sistema reprodutor feminino. Embora a aplicação vaginal seja a via mais eficaz, sua eficácia é limitada pela instabilidade em pH ácido, baixa solubilidade em água e pelos mecanismos de autolimpeza da mucosa vaginal. Para superar esse problema, desenvolveu-se nanopartículas automontáveis à base de lecitina (LC) e quitosana (QS) como carreadores promissores para a encapsulação de PG objetivando a sua aplicação vaginal. As nanopartículas foram sintetizadas utilizando a técnica de injeção etanólica, seguindo um planejamento fatorial 3^2 para avaliar a influência da concentração de QS(A) e PG (B) nas características físico-química das nanopartículas. As formulações foram caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e mobilidade eletroforética, e a Eficiência de encapsulação (EE) e teor de PG obtidos por Cromatografia Líquida de Ultra-alta Eficiência (CLUE) previamente validado. A nanopartícula otimizada (NPPG) foi analisada por Microscopia eletrônica de varredura acoplado com emissão de campo (MEV-FEG), difração de raio X (DRX) e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), além de estudos de estabilidade em diferentes temperaturas durante 120 dias. O mecanismo de liberação *in vitro* foi analisado por modelos matemáticos em pH 4,0 e 7,5. A mucoadesão *in vitro* foi avaliada pela eficiência de ligação (EElig%) e pela alterações físico-químicas após o contato com diferentes concentrações de mucina. Os resultados mostraram que as nanopartículas foram obtidas com sucesso pelo método proposto. A nanopartícula otimizada (NPPG) que possuía 25 mg de QS e 10 mg de PG apresentou formato esférico, superfície lisa e regular com tamanho nanométrico, em conformidade com os resultados obtidos por DLS, que indicaram nanopartículas com 256,03 nm de diâmetro, monodispersas (IPD= 0,335), potencial zeta de + 19,93 mV, EE de 98,51% e teor de PG de 2,11% (20 mg/g). A análise de DRX sugeriu que o processo de encapsulação levou à amorfização da PG, enquanto o FTIR sugeriu o encapsulamento bem-sucedido do fármaco nas nanopartículas híbridas. O estudo de estabilidade indicou 4 °C como a melhor condição de armazenamento, pois conseguiu preservar melhor as características da NPPG ($p>0,05$). Ensaio *in vitro* demonstraram liberação controlada do fármaco, com liberação de 73,94% e 48,56% no pH 4,0 e pH 7,4, respectivamente após 12 horas. A cinética de liberação pode ser explicada pelos modelos de Korsmeyer-Peppas ($R_{aj}= 0,9961$ em pH 4,0; $R_{aj}= 0,9732$ em pH 7,4) e Weibull ($R_{aj}= 0,9849$ em pH 4,0; $R_{aj}= 0,9267$ em pH 7,4), que caracterizaram o transporte por difusão Fickiana e liberação parabólica com $n<0,45$ e $b<1$ em ambos pHs. Os estudos de mucoadesão *in vitro* evidenciaram que a NPPG possui boa capacidade mucoadesiva atribuída a quitosana, com aumento do diâmetro médio, inversão de cargas positivas para negativas após o contato com diferentes concentrações de mucina, com eficiência de ligação maior de $27,97 \pm 0,69$ % para a concentração de $0,25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de mucina. Dessa maneira, os resultados obtidos fornecem uma base experimental que viabiliza o uso de nanopartículas híbridas de lecitina e quitosana como uma alternativa viável, atrativa e inovadora para aplicação da progesterona pela via vaginal.

Palavras-chave: Nanotecnologia; mucosa vaginal; *designer* fatorial; nanopartículas híbridas; hormônio esteroide.

ABSTRACT

Progesterone (PG) is a steroid hormone that plays a crucial role in the female reproductive system. Although vaginal administration represents the most effective route, its therapeutic efficacy is limited by its instability in acidic pH, low aqueous solubility, and the self-cleaning mechanisms of the vaginal mucosa. To address these challenges, self-assembling nanoparticles based on lecithin (LC) and chitosan (CS) were developed as promising carriers for PG encapsulation, aiming at vaginal delivery. The nanoparticles were synthesized using the ethanol injection technique and optimized through a 3^2 factorial design to assess the influence of chitosan (factor A) and PG (factor B) concentrations on the physicochemical properties of the nanoparticles. The formulations were characterized by dynamic light scattering (DLS) and electrophoretic mobility, while encapsulation efficiency (EE) and PG content were determined by previously validated ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) methods. The optimized formulation (NPPG) was further characterized using field-emission scanning electron microscopy (FE-SEM), X-ray diffraction (XRD), and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), in addition to stability studies conducted at different temperatures over a period of 120 days. In vitro drug release was evaluated at pH 4.0 and 7.5 using mathematical modeling to elucidate the release kinetics. Mucoadhesive properties were assessed in vitro by measuring binding efficiency (BE%) and analyzing physicochemical changes upon contact with varying concentrations of mucin. The results demonstrated that nanoparticles were successfully obtained using the proposed methodology. The optimized formulation, containing 25 mg of CS and 10 mg of PG, exhibited spherical morphology, a smooth and regular surface, and nanometric size, consistent with DLS findings, which indicated an average diameter of 256.03 nm, monodispersity (PDI = 0.335), a positive zeta potential of +19.93 mV, high encapsulation efficiency (98.51%), and PG content of 2.11% (equivalent to 20 mg/g). XRD analysis suggested that the encapsulation process resulted in PG amorphization, whereas FTIR analysis confirmed successful drug entrapment within the hybrid nanoparticles. Stability studies identified 4 °C as the most suitable storage condition, effectively preserving the physicochemical properties of NPPG ($p > 0.05$). In vitro release studies demonstrated a controlled release profile, with 73.94% and 48.56% of PG released at pH 4.0 and 7.4, respectively, after 12 hours. Release kinetics were best described by the Korsmeyer–Peppas model ($R^2 = 0.9961$ at pH 4.0; $R^2 = 0.9732$ at pH 7.4) and the Weibull model ($R^2 = 0.9849$ at pH 4.0; $R^2 = 0.9267$ at pH 7.4), indicating Fickian diffusion and parabolic release mechanisms ($n < 0.45$; $b < 1$) under both conditions. In vitro mucoadhesion assays confirmed the mucoadhesive potential of NPPG, attributed to the presence of chitosan, as evidenced by an increase in mean particle size and a shift from positive to negative surface charge upon exposure to mucin. The highest binding efficiency ($27.97 \pm 0.69\%$) was observed at a mucin concentration of 0.25 mg/mL. Collectively, the findings provide a robust experimental basis supporting the use of hybrid lecithin–chitosan nanoparticles as a viable, attractive, and innovative strategy for vaginal delivery of progesterone.

Keywords: Nanotechnology; vaginal mucosa; factorial design; hybrid nanoparticles; steroid hormone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura química da progesterona	22
Figura 2	– Vantagens apresentadas pelos sistemas nanoestruturados na liberação controlada de fármacos	26
Figura 3	– Diferentes sistemas nanométricos de liberação controlada de fármacos.....	27
Figura 4	– Diferentes tipos de nanopartículas híbridas polímero-lipídicas.....	33
Figura 5	– Representação esquemática da interação quitosana-fosfolipídios e da automontagem de nanopartículas.....	37
Figura 6	– Reação de desacetilação da quitina para a obtenção da quitosana.....	38
Figura 7	– Estrutura molecular da fosfatidilcolina, componente da lecitina.....	40
Figura 8	– Fluxograma ilustrativo das etapas da pesquisa.....	47
Figura 9	– Esquema do método para a obtenção das nanopartículas híbridas contendo progesterona.....	49
Figura 10	– Esquema ilustrativo das nanopartículas híbridas de lecitina e quitosana obtidas por automontagem.....	60
Figura 11	– Gráficos de Pareto dos efeitos para as variáveis dependentes no planejamento fatorial completo 3^2	65
Figura 12	– Gráfico de Superfície de Resposta das variáveis do planejamento fatorial 3^2 das nanopartículas híbridas contendo progesterona.....	66
Figura 13	– Aspecto macroscópico das nanopartículas híbridas otimizadas contendo progesterona (NPPG) e sem progesterona (NP-C).....	76

Figura 14	– Esquema do método para obtenção das nanopartículas híbridas contendo progesterona após otimização (NPPG)	79
Figura 15	– Cromatograma de CLUE correspondente ao padrão de Progesterona (50 µg/mL).....	80
Figura 16	– Representação gráfica da curva analítica padrão para a determinação da progesterona obtida por CLUE na faixa de concentração de 25 a 200 µg/mL (n=4).....	81
Figura 17	– Representação gráfica dos resíduos obtidos para cada réplica das concentrações das curvas analíticas.....	82
Figura 18	– Cromatograma das nanopartículas brancas em comparação com o cromatograma da progesterona (PG) para análise de seletividade...	83
Figura 19	– Aspectos morfológicos da quitosana (QS); lecitina (LC) e progesterona pura (PG) por FEG-SEM, em aumento de 2000x.....	88
Figura 20	– Aspectos morfológicos das nanopartículas otimizadas (NPPG); nanopartícula controle negativo (NP-C) por FEG-SEM, em aumento de 2000x e 3500x	89
Figura 21	– Difrátograma da quitosana, lecitina, progesterona, nanopartícula híbrida otimizada (NPPG) e nanopartícula híbrida controle negativo (NP-C).....	91
Figura 22	– Espectros de FTIR das nanopartículas híbridas otimizadas (NPPG); nanopartículas híbridas controle negativo (NP-C), progesterona (PG), quitosana (QS) e lecitina (LC).....	93
Figura 23	– Aspectos macroscópicos das NPPG e NP-C armazenadas ao abrigo da luz, em temperatura ambiente (T.A.), 37 °C (estufa) E 4 °C	

	(geladeira) durante 120 dias para o estudo de estabilidade.....	95
Figura 24	– Estudo de estabilidade das NPPG e NP-C em diferentes temperaturas, com análise do diâmetro de partículas.....	96
Figura 25	– Estudo de estabilidade das NPPG e NP-C em diferentes temperaturas, com análise do índice de polidispersão.....	98
Figura 26	– Estudo de estabilidade das NPPG e NP-C em diferentes temperaturas, com análise do potencial zeta.....	99
Figura 27	– Perfil de liberação <i>in vitro</i> para nanopartículas híbridas contendo progesterona (NPPG) em pH 4,0 e 7,45.....	101

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1	– Estudos relativos à associação da progesterona e sistemas nanométricos.....	28-29
Tabela 2	– Lipídios, polímeros e estabilizadores comumente usados em sistemas híbridos.....	34
Tabela 3	– Variáveis utilizadas no planejamento fatorial 3^2	50
Tabela 4	– Planejamento fatorial 3^2 : número de experimentos e combinações dos níveis e fatores.....	51
Tabela 5	– Parâmetros cromatográficos utilizados para quantificação da progesterona (PG) por CLUE.....	52
Tabela 6	– Matriz completa do Planejamento Fatorial 3^2 e seus resultados de tamanho, índice de polidispersão (IPD), potencial zeta (Zeta) e EE obtidos para as nanopartículas.....	62
Tabela 7	– Resumo da análise de regressão para as respostas observadas.....	64
Tabela 8	– Estimativa dos efeitos e valores de p ($<0,05$) (ANOVA) para a variáveis dependentes.....	68
Tabela 9	– Otimização da resposta obtida através do Planejamento Fatorial para as nanopartículas.....	75
Tabela 10	– Formulação otimizada de nanopartículas híbridas lecitina-quitosana contendo progesterona (NPPG).....	75
Tabela 11	– Nanopartícula otimizada (NPPG) com valores experimentais e previstos pela análise do planejamento fatorial e erro absoluto e percentual.....	76

Tabela 12	–	Caracterização físico-química da nanopartícula controle (NP-C).....	77
Tabela 13	–	Caracterização físico-química da NPPG com e sem centrifugação ..	78
Tabela 14	–	Resultados da ANOVA para a linearidade do método	81
Tabela 15	–	Parâmetros da curva analítica da progesterona	84
Tabela 16	–	Dados da repetibilidade e precisão intermediária para amostras de progesterona	85
Tabela 17	–	Valores experimentais obtidos nos ensaios de exatidão	86
Tabela 18	–	Valores experimentais obtidos nos ensaios de robustez.....	86
Tabela 19	–	Dados ajustados para o perfil de liberação in vitro das nanopartículas híbridas de lecitina-quitosana contendo progesterona (NPPG).....	104
Tabela 20	–	Eficiência de ligação, diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta antes e após o contato com diferentes concentrações de mucina.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DRX	Difração de raios X
EE%	Eficiência de encapsulação
FEG-SEM	Field Emission Gun Scanning Eletron Microscopy
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
GL	Grau de liberdade
IPD	Índice de Polidispersão
LAC	Lactose
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura acoplado com emissão de campo
MQ	Média quadrática
NP-C	Nanopartícula controle negativo
NPPG	Nanopartícula híbrida de lecitina/quitosana otimizadas contendo progesterona
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PZ	Potencial zeta
RPM	Rotação por minuto
SQ	Soma quadrática
T.A.	Temperatura ambiente
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UV-VIS	Ultravioleta/Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau celsius
kV	Kilovolt
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mV	Milivolt
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
θ	Ângulo de espalhamento
λ	Comprimento de onda
v/v	Proporção volume/volume
p/v	Proporção peso/volume
p/p	Proporção peso/peso
R ²	Coefficiente de determinação
kHz	Quilohertz

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVOS.....	21
2.1	OBJETIVO GERAL.....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1	APLICAÇÕES DA PROGESTERONA	22
3.2	NANOTECNOLOGIA COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS.....	25
3.3	NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS LIPÍDICO-POLIMÉRICAS.....	31
3.4	NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS A BASE DE LECITINA E QUITOSANA.....	35
3.5	QUITOSANA.....	38
3.6	LECITINA.....	40
3.7	SISTEMAS MUCOADESIVOS.....	41
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1	MATERIAIS.....	44
4.2	EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	45
4.3	DESENHO EXPERIMENTAL.....	46
4.4	DESENVOLVIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS DE LECITINA/QUITOSANA CONTENDO PROGESTERONA.....	48
4.4.1	Liofilização.....	49
4.5	OTIMIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS USANDO PLANEJAMENTO FATORIAL 3 ²	49
4.6	DETERMINAÇÃO DA PROGESTERONA INCORPORADAS NAS NANOPARTÍCULAS.....	52
4.6.1	Desenvolvimento do Método Analítico por Cromatografia Líquida de Ultra-alta Eficiência (CLUE).....	52
4.6.2	Validação do Método Analítico Para a Quantificação da Progesterona.....	52

4.6.2.1	Linearidade.....	53
4.6.2.2	Seletividade.....	53
4.6.2.3	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	53
4.6.2.4	Precisão.....	54
4.6.2.5	Exatidão.....	54
4.6.2.6	Robustez.....	54
4.6.3	ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE%) E TEOR DE FÁRMACO ENCAPSULADO	55
4.7	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS CONTENDO PROGESTERONA.....	55
4.7.1	Caracterização Físico-química.....	55
4.7.2	Caracterização Morfológica.....	56
4.7.2.1	Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (<i>Field Emission Gun Scanning Eletron Microscopy - FEG-SEM</i>).....	56
4.7.3	Caracterização estrutural.....	56
4.7.3.1	Análise por difração de raio X (<i>X Ray Diffraction – DRX</i>).....	56
4.7.3.2	Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).....	57
4.8	ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS.....	57
4.9	ESTUDO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	57
4.9.1	Ensaio do perfil de liberação <i>in vitro</i>	57
4.9.2	Cinética e mecanismo de liberação.....	58
4.10	ESTUDO DAS PROPRIEDADES MUCOADESIVAS <i>IN VITRO</i>	58
4.10.1	Análise de absorbância.....	58
4.10.2	Análise da interação entre mucina e as nanopartículas a partir da análise do diâmetro de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta.....	59
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1	DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS PELO PLANEJAMENTO FATORIAL 3 ²	60
5.1.1	Tamanho de Partícula.....	69

5.1.2	Índice de Poldispersão (IPD).....	70
5.1.3	Potencial Zeta (PZ).....	71
5.1.4	Eficiência de Encapsulação (EE%).....	72
5.1.5	Teor de Fármaco.....	73
5.1.6	Nanopartícula Otimizada.....	74
5.2	DETERMINAÇÃO DE PROGESTERONA INCORPORADAS NAS NANOCÁPSULAS.....	79
5.2.1	Linearidade.....	80
5.2.2	Seletividade.....	82
5.2.3	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	83
5.2.4	Precisão.....	84
5.2.5	Exatidão.....	85
5.2.6	Robustez.....	86
5.3	ANÁLISE MORFOLÓGICA DE SUPERFÍCIE.....	87
5.4	ANÁLISE ESTRUTURAL.....	90
5.4.1	Análise por Difração de Raios X (X Ray Diffraction – DRX).....	90
5.4.2	Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR).....	92
5.5	ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS.....	94
5.6	ESTUDO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	101
5.6.1	Ensaio do perfil de liberação <i>in vitro</i>	101
5.6.2	Cinética e mecanismo de liberação.....	103
5.7	ESTUDO DE MUCOADESÃO <i>IN VITRO</i>	106
6	CONCLUSÃO.....	108
	REFERÊNCIAS.....	110

1 INTRODUÇÃO

A progesterona, um hormônio esteroide, desempenha um papel essencial na manutenção do sistema reprodutor feminino. Durante a gestação, participa de processos fundamentais como na maturação e liberação dos ovócitos, implantação do embrião, modulação da resposta imunológica materna, a redução da contratilidade uterina e o suporte à fase lútea (Graham, Clarke, 1997; Ruan, Mueck, 2014; Patil; Mahaeshwari, Wairkar, 2023). Devido a tais atributos, é amplamente reconhecida como o "hormônio da gravidez" (Di Renzo *et al.*, 2016; Bulletti *et al.*, 2022; Mahaeshwari; Wairkar, 2023; Taylor *et al.*, 2023).

Diferentes vias de administração e formas farmacêuticas de progesterona estão disponíveis no mercado, com destaque para as formas farmacêuticas de liberação vaginal, como cremes e supositórios. Essas formas farmacêuticas oferecem vantagens por serem de fácil administração, indolores, evitarem o metabolismo hepático de primeira passagem, rápida absorção devido à alta vascularização da mucosa vaginal que favorece a atividade biológica da progesterona (Almomen *et al.*, 2015; Hoang *et al.*, 2019; Salem *et al.*, 2019).

No entanto, fatores como o pH vaginal ácido, temperatura corporal ($\sim 37^\circ\text{C}$) e mecanismos fisiológicos de autolimpeza comprometem a eficácia dessas formulações, reduzindo o tempo de permanência e provocando perdas significativas do fármaco (Dos Santos *et al.*, 2020; Pandey *et al.*, 2021). Portanto, estratégias inovadoras, como a aplicação de sistemas nanométricos (1×10^{-9} m), mostraram-se promissoras para otimizar a entrega e a eficácia terapêutica da progesterona (Hoang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020; Pandey *et al.*, 2021; Fogolari *et al.*, 2023; Patil; Mahaeshwari; Wairkar, 2023).

Dentre esses sistemas, os nanosistemas híbridos compostos por lipídios e polímeros com propriedades mucoadesivas destacam-se por prolongarem a retenção na mucosa, protegerem o fármaco e facilitarem sua penetração (Alkoholief, 2019; Valência *et al.*, 2021; Abruzzo *et al.*, 2021; Elhabak; Ibrahim; Ibrahim, 2022).

A literatura demonstra que nanopartículas lipídicas revestidas com polímeros catiônicos, como a quitosana, aumentam a eficiência de encapsulação e a capacidade de carga dos fármacos, além de permitir maior aderência na mucosa vaginal devido às interações eletrostáticas entre a quitosana e a mucina

(Jøraholmen *et al.*, 2014; Hao *et al.*, 2017; Abruzzo *et al.*, 2021; Elhabak; Ibrahim; Ibrahim, 2022). Ademais, nanopartículas auto-organizadas de lecitina e quitosana demonstram ser transportadores promissores para fármacos (Sonvico *et al.*, 2006; Senyigit *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2011; İlk; Saglam; Ozgen, 2017; Alkholief, 2019; Valência *et al.*, 2021) podendo ser uma alternativa eficiente para a veiculação vaginal da progesterona (Jøraholmen *et al.*, 2014; Elhaback; Ibrahim; Ibrahim, 2022).

Embora existem estudos sobre nanopartículas híbridas de lecitina e quitosana contendo progesterona, todos se concentram na administração oral. Até o momento não foram encontradas investigações que explorem o uso desse sistema pela via vaginal. Dessa forma, esse trabalho propõe uma abordagem inovadora, ao aplicar essas nanopartículas na mucosa vaginal, com o intuito de contornar os desafios fisiológicos observados por essa via e melhorar a biodisponibilidade da progesterona por meio de um sistema estável, mucoadesivo e com liberação controlada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar nanopartículas híbridas compostas por lecitina e quitosana contendo progesterona, como forma inovadora e atrativa para a administração vaginal da progesterona.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

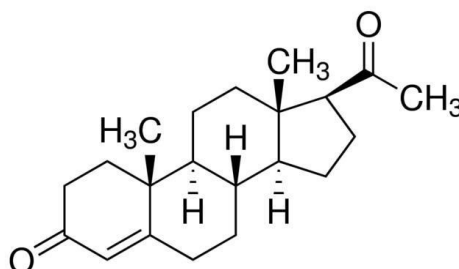
- Desenvolver as nanopartículas híbridas contendo progesterona pelo método de automontagem eletrostática de única fase;
- Realizar o planejamento fatorial das nanopartículas híbridas;
- Avaliar a eficiência de encapsulação da progesterona incorporadas nas nanopartículas híbridas pelo método de cromatografia de alta eficiência, previamente validado;
- Efetuar a caracterização das nanopartículas híbridas por meio das análises físico-químicas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e determinação eletroforética,
- Efetuar a caracterização das nanopartículas híbridas otimizadas por meio de análises morfológicas por Microscopia eletrônica de varredura acoplado com emissão de campo (MEV-FEG);
- Efetuar a caracterização das nanopartículas híbridas otimizadas por meio de análises estruturais de Difração de raios X (DRX) e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR);
- Avaliar a estabilidade físico-química das nanopartículas híbridas sob diferentes condições de armazenamento por 120 dias;
- Determinar o perfil de liberação da progesterona e a cinética de liberação a partir do sistema nanotecnológico desenvolvido;
- Realizar a análise das propriedades mucoadesivas das nanopartículas híbridas otimizadas contendo progesterona.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 APLICAÇÕES DA PROGESTERONA

A progesterona, cujo nome tem origem no latim (pró = favorável; gester = gestação; ona = sufixo que indica hormônio), também é conhecida como Pregn-4-ene-3,20-diona. Possui fórmula molecular $C_{21}H_{30}O_2$, e sua estrutura química está representada na Figura 1. Este composto é classificado como um esteroide devido às quatro cadeias cíclicas interligadas, além dos grupos funcionais cetona e metila. A forma pura comercial da progesterona se apresenta como pó cristalino branco ou ligeiramente amarelado, inodoro, estável ao ar e sensível à luz. Sua massa molar é de 314,46 g/mol, com uma faixa de fusão entre 126 e 131 °C e densidade de 1,166 g/cm³ a 23 °C. Possui um pKa de 18,92 (ácido mais forte) e – 4,8 (base mais forte), com um log P de 3,87, sendo praticamente insolúvel em água (8,8 µg/mL à 25 °C), mas é solúvel em solventes como etanol, acetona, dioxano e moderadamente solúvel em óleos vegetais (Farmacopeia, 2010; PubChem, 2024).

Figura 1 - Estrutura química da progesterona.



Fonte: Farmacopeia (2010).

Classificada como um hormônio esteroide, a progesterona é produzida a partir do colesterol por meio das células ovarianas e em quantidades menores por glândulas adrenais e células de Leydig. Na membrana mitocondrial interna o citocromo P450_{scc} cliva a cadeia lateral do colesterol, dando origem a pregnenolona. A pregnenolona recém-formada difunde-se para o retículo endoplasmático liso, onde sofrerá ação da enzima 3β-hidroxiesteroide-desidrogenase, dando origem a progesterona (Molina, 2007; Barros; Tufik; Andersen, 2015; Roby, 2019).

Este hormônio é fundamental para a manutenção da fisiologia reprodutiva feminina. A progesterona é mantida em altas concentrações durante a gravidez pois é essencial para sua manutenção (Anderson; Clarke, 2004 *apud* Barros; Tufik; Andersen, 2015; Bulletti *et al.*, 2022).

No útero e nos ovários, a progesterona é responsável pela liberação de ovócitos maduros e por facilitar a implantação do embrião, pois promove o crescimento uterino e suprime as contrações do miométrio (Graham; Clarke, 1997; Ruan; Mueck, 2014; Patil; Mahaeshwari; Wairkar, 2023). Dessa forma, através de diferentes mecanismos, como: modulação da resposta imune materna, supressão da resposta inflamatória, redução da contratilidade, melhora na circulação útero-placentária e suporte da fase lútea, faz com que a progesterona seja um hormônio essencial no processo de gravidez, por tais motivos, é caracterizado como o “hormônio da gravidez” (Di Renzo *et al.*, 2016; Bulletti *et al.*, 2022).

Dessa maneira, a aplicação terapêutica da progesterona é feita no tratamento de diferentes doenças ginecológicas como hiperplasia endometrial, hemorragias disfuncionais, deficiência da fase lútea e síndrome pré-menstrual. Durante a gravidez sua aplicação visa a prevenção e tratamento a ameaças de abortos, aborto recorrente, parto prematuro e infertilidade (Di Renzo *et al.*, 2016; Ruan; Mueck, 2014). Até o momento, a única intervenção terapêutica profilática que tem evidenciado eficácia na prevenção do parto prematuro é a administração de progesterona e seus derivados (Hoang *et al.*, 2019; Taylor *et al.*, 2023).

A administração da progesterona pode ser realizada por diferentes vias, incluindo oral, parenteral (intramuscular e subcutânea) e tópica, como em gel-creme ou cápsulas vaginais (Almomen *et al.*, 2015). Apesar da via oral ser a abordagem convencional, sua eficácia é comprometida devido ao alto metabolismo pré-sistêmico que causa a sua rápida degradação e baixa biodisponibilidade, bem como limitada solubilidade em água. Isso requer o uso de doses elevadas, potencialmente aumentando o risco de efeitos adversos do fármaco (Ruan; Mueck, 2014; Hoang *et al.*, 2019; Pandey *et al.*, 2021).

Por outro lado, as injeções intramusculares ou subcutâneas têm a capacidade de evitar o metabolismo de primeira passagem, no entanto, sua eficácia é afetada pela baixa adesão do paciente em virtude da necessidade de injeções frequentes, que podem ser dolorosas. A dor associada às injeções diminui a adesão

do paciente ao tratamento comprometendo sua eficácia terapêutica (Silverberg *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2020).

As formas farmacêuticas de liberação vaginal contendo progesterona, como cremes e supositórios, apresentam vantagens em relação a outras vias (Almomen *et al.*, 2015), pois são de fácil administração, indolores, não sofrem metabolismo de primeira passagem e possuem rápida absorção, devido à alta vascularização da mucosa vaginal. A via vaginal é preferida, uma vez que a progesterona exerce maior atividade no ovário e no útero em eventos fisiológicos, como ovulação, fertilização, manutenção do ciclo menstrual e prevenção do parto prematuro em mulheres com sinais de remodelação cervical prematura (colo uterino curto identificado por ultrassonografia (Hoang *et al.*, 2019; Salem *et al.*, 2019).

No entanto, é importante considerar que a região vaginal possui características intrínsecas que podem afetar a estabilidade das formas farmacêuticas utilizadas nesse local. O pH ácido, geralmente situado na faixa de 4,5 a 5,5, juntamente com a temperatura próxima a 37 °C, podem desencadear fenômenos de instabilidade nas formulações. Esses fenômenos incluem irritação e inflamação locais, propensão a infecções fúngicas e ocorrência de secreções, bem como mecanismos fisiológicos de autolimpeza que contribuem para o vazamento da formulação resultando na perda dos princípios ativos contidos na formulação e diminuição do tempo de residência vaginal. Esses aspectos combinados podem levar a um efeito terapêutico insatisfatório da formulação utilizada (Stadtmauer *et al.*, 2013; Almomen *et al.*, 2015; Dos Santos *et al.*, 2020; Pandey *et al.*, 2021).

Portanto, dada a relativa limitação das aplicações da progesterona em produtos farmacêuticos, estratégias inovadoras tornam-se necessárias para o desenvolvimento e exploração de sistemas de administração de fármacos eficazes. Visando não apenas melhorar as características físico-químicas da substância, mas também otimizar sua eficácia terapêutica. Entre as abordagens promissoras, destaca-se a aplicação da nanotecnologia, a qual oferece oportunidades significativas para a melhoria da entrega e eficácia terapêutica de compostos bioativos, como a progesterona (Hoang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020; Pandey *et al.*, 2021; Fogolari *et al.*, 2023; Patil; Mahaeshwari; Wairkar, 2023).

3.2 NANOTECNOLOGIA COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS

Compreende-se como nanotecnologia a ciência de materiais que integra princípios da física, química, biologia e engenharia de materiais, com o intuito de desenvolver, caracterizar e aplicar partículas de dimensões extremamente pequenas na escala nanométrica. O prefixo “nano” remete a uma escala de medida em que um nanômetro representa um bilionésimo do metro (1×10^{-9} m), esses nanocarreadores possuem tamanho entre 1 - 1000 nm (Schaffazick *et al.*, 2003; Murthy *et al.*, 2020; Shah *et al.*, 2022).

O princípio da nanotecnologia é pautado em contornar as limitações químicas e físico-químicas apresentadas em formulações em escala maiores, proporcionando soluções inovadoras e promissoras no âmbito do diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças. Tais vantagens justificam a ampliação da sua aplicação no campo biomédico (El-Say; El-Sawy, 2017; Sahu *et al.*, 2021; Murthy *et al.*, 2020; Afzal *et al.*, 2022; Tundisi *et al.*, 2023).

Uma das áreas mais promissoras da nanotecnologia biomédica é no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. Devido ao seu tamanho reduzido, essa tecnologia permitiu melhorar a eficácia de diversos fármacos, como na proteção de insumos farmacêuticos às reações fisiológicas, garantindo sua alta concentração e biodisponibilidade no tecido desejado, assim como toxicidade diminuída e a possibilidade de utilizar menor concentração de ativos quando comparado a formulações convencionais (Maleki; Karimpour; Dizaj, 2018; Murthy *et al.*, 2020; Afzal *et al.*, 2022; Tundisi *et al.*, 2023). As vantagens apresentadas pela nanotecnologia como sistema de entrega controlada de fármacos estão esquematizadas na Figura 2.

Figura 2 - Vantagens apresentadas pelos sistemas nanoestruturados na liberação controlada de fármacos.

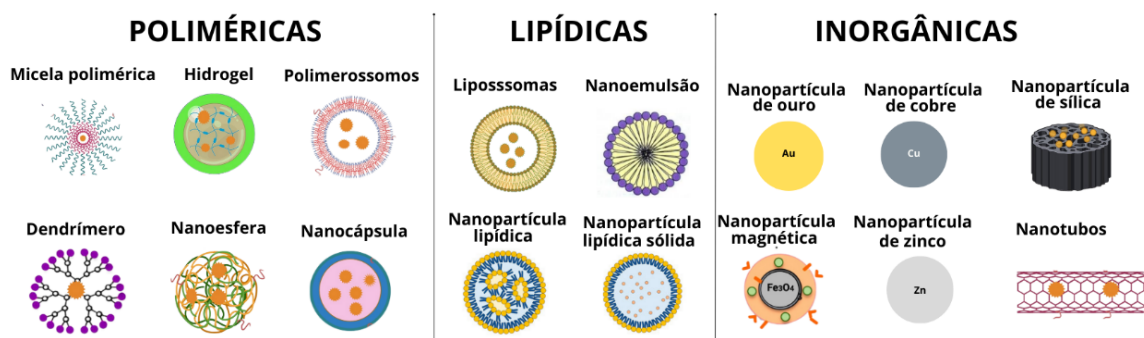


Fonte: A autora.

Diferentes tipos de nanopartículas têm sido explorados para melhorar a administração de fármacos, podendo ser produzidos a partir de polímeros, lipídios ou metais (Afzal *et al.*, 2022; Sultana *et al.*, 2022; Tundisi *et al.*, 2023; Kim *et al.*, 2023). Entre os inúmeros sistemas nanotecnológicos para liberação de fármacos, podem ser citados os lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas, nanopartículas magnéticas, nanocristais, dendrímeros, nanotubos de carbonos, ou ainda, podem ser combinados diferentes materiais dando origem as nanopartículas híbridas que são as formas mais avançadas de nanopartículas (El-Say; El-Sawy, 2017; Ma *et al.*, 2020; Murthy *et al.*, 2020; Sahu *et al.*, 2021; Gupta *et al.*, 2002).

A Figura 3 apresenta diferentes tipos de nanosistemas presentes na literatura utilizados para o desenvolvimento de sistemas tecnológicos na liberação controlada de fármacos.

Figura 3 - Diferentes sistemas nanométricos de liberação controlada de fármacos.



Fonte: Adaptado de Wahab *et al.* (2021).

Os hormônios, incluindo os esteroides como estradiol, testosterona e progesterona, geralmente apresentam baixa solubilidade em água, o que compromete sua absorção no organismo. Essa característica limita sua biodisponibilidade, exigindo doses mais elevadas para alcançar a eficácia terapêutica desejada. No entanto, o uso de doses elevadas pode aumentar o risco de efeitos colaterais, como toxicidade sistêmica, alterações metabólicas e impacto em tecidos não-alvo (Tomoda *et al.*, 2012; Fogolari *et al.*, 2023). Com propósito de aprimorar as suas características físico-química, otimizar a farmacocinética e potencializar a sua atividade biológica, abordagens baseadas em sistemas nanoestruturados se mostram vantajosas para veiculação de esteroides (Tomoda *et al.*, 2012; Chanphai; Tajmir-Riahi, 2017; Joachim *et al.*, 2020; Tajbakhsh *et al.*, 2020; Koga 2021; Fogolari *et al.*, 2023; Patil; Mahaeshwari; Wairkar, 2023).

Diversos sistemas nanoestruturados de entrega de fármacos demonstram aumentar significativamente a eficácia terapêutica da progesterona, aumentando sua solubilidade em água, estabilidade físico-química e biodisponibilidade (Hoang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020; Pandey *et al.*, 2021; Fogolari *et al.*, 2023; Patil; Mahaeshwari; Wairkar, 2023).

Alguns estudos para a obtenção de sistemas nanométricos contendo progesterona já foram publicados e estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Estudos relativos à associação da progesterona e sistemas nanométricos.

Sistema	Método de preparo	Características Físico-químicas	Resultados obtidos	Referências
Nanopartícula lipídica sólida	Homogeneização a quente com ultrassom	190±1 a 237±1 nm; IPD 0,2; PZ= -15 a -5 mV; EE% 95,4±0,6 e 97,2±1,4	Liberação controlada e sustentada <i>in vivo</i> .	FOGOLARI <i>et al.</i> (2023)
Nanopartícula polimérica	Nanoprecipitação, homogeneização de alta pressão e moagem úmida	200 – 500 nm; PZ -2,01±0,03 a – 45,0 ± 0,9	Moagem úmida produziu partículas menores. Concentração uterina foi aumentada através da administração vaginal em comparação com administração sistêmica.	HOANG <i>et al.</i> (2019)
Nanopartícula lipídica sólida/ Nanopartícula lipídico estruturado	Homogeneização a quente com ultrassom e alta pressão	68 ± 15 a 255 ± 45 nm; IPD ~0,3; PZ= -; EE% 82 ±4 a 99 ±1	As nanoestruturas produzidas por alta pressão foram mais eficazes na estabilidade físico-química e melhoraram a absorção <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	ESPOSITO <i>et al.</i> (2017)
Nanopartícula polimérica	Eletrospray	472,1±54,8 a 588,0±92,1nm; IPD= -; PZ= -; EE% 92±3 a 95±2	Melhora do perfil de liberação <i>in vitro</i> , aumento da solubilidade e dissolução.	ZHANG <i>et al.</i> (2020)
Hidrogel	Gelificação ionotrópica	198±4 a 236±6 nm; IPD 0,19±0,01 a 0,25±0,03; PZ +27±1 a +31±2 mV; EE% 80±1 a 95±3	Melhora no perfil de liberação <i>in vitro</i> , aumento da biodisponibilidade.	CÁRDIA <i>et al.</i> (2019)
Nanopartículas híbridas	Automontagem	662,1 ± 19,3 nm; IPD= -; PZ 28,19 ± 1,97 mV; EE% 80	Aumento da estabilidade e biodisponibilidade e perfil de liberação sustentada.	WANG <i>et al.</i> (2017)
Nanopartícula polimérica	Nanoprecipitação com evaporação do solvente	155,0 ± 15,6 a 217,5 ±2,1 nm; IPD= 0,1 a 0,3; PZ= -; EE% 98,7 a 99,5	Técnica de síntese foi eficiente para a obtenção de nanopartículas estáveis.	LEIMANN <i>et al.</i> (2015)

Nanopartícula lipídica	Homogeneização de alto cisalhamento seguida de sonicação	21,82 a 315,60 nm; IPD= -; PZ= -; EE% 96,42 ± 0,00	As nanopartículas não apresentaram citotoxicidade em células HaCaT e apresentaram liberação sustentada <i>in vitro</i> .	CORREIA <i>et al.</i> (2020)
Transetossomo	Sonicação por injeção	133,3 ± 3,42 a 349,5 ± 1,24 nm; PZ -23,5 ± 3,84 a +74,6 ± 4,97 EE% 87,93 ± 3,58 a 97,05 ± 2,61	Aumento da permeabilidade no tecido vaginal <i>in vivo</i> . No estudo clínico o gel contendo as nanopartículas apresentaram maior eficiência na taxa de gravidez e maior adesão em comparação a formulação comercial.	SALEM <i>et al.</i> (2018)
Nanopartícula lipídica	Homogeneização de alto cisalhamento seguida de sonicação	137,2 ± 4,1 e 228,2 ± 5,6 nm; PDI <0,35; PZ -22,1 ± 1,47 a -28,1 ± 3,4; EE% 93,7 ± 2,7 e 97,2 ± 1,5	Apresentou padrão de liberação controlada, boa estabilidade e eficiente permeação duodenal. Portanto, parece ser um sistema promissor para administração oral de PG.	ELMOWAFY <i>et al.</i> (2018)

Fonte: A autora

Nota: IPD: índice de polidispersão; PZ: potencial zeta; EE%: eficiência de encapsulação.

Hoang et al. (2019) sintetizaram nanosuspensões de progesterona revestidas com Polietilenoglicol (200 - 500 nm), e observou melhora na farmacocinética e farmacodinâmica da progesterona encapsulada e melhoria significativa na prevenção do nascimento prematuro em comparação com os géis vaginais Crinone® *in vivo*. O estudo em camundongas prenhes revelou uma absorção vaginal melhorada para nanossuspensão em 7 vezes maior que a formulação de gel no tecido cervical, e o nível de progesterona circulante foi 2,3 vezes maior na nanossuspensão após 6 horas.

As nanoestruturas mucoadesivas de administração vaginal emergem como promissores moduladores potenciais para a entrega de progesterona, em virtude de suas características favoráveis. Estas incluem a capacidade de conferir liberação prolongada e controlada do fármaco, a habilidade de aderir ao muco e/ou modular suas propriedades, permanecendo por mais tempo na vagina, bem como a capacidade de direcionar de forma precisa a distribuição da progesterona nas camadas mucosas e intracelulares. Essas propriedades combinadas facilitam a administração do fármaco e, conseqüentemente, podem aprimorar a eficácia terapêutica da progesterona contornando os problemas observados em formulações disponíveis no mercado (Hoang *et al.*, 2019; Dos Santos *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020; Pandey *et al.*, 2021; Fogolari *et al.*, 2023; Patil; Mahaeshwari; Wairkar, 2023).

Dispositivos vaginais baseados em transportadores lipídicos nanoestruturados foram desenvolvidos para alcançar um perfil de liberação prolongada de progesterona na vagina. Esses transportadores apresentaram tamanho nanométricos ($315,60 \pm 0,01$ nm) e foram biocompatíveis sem qualquer efeito citotóxico nas células HaCaT e mostraram liberação sustentada de progesterona até 24 horas (Correia *et al.*, 2020). Salem *et al.* (2019) também observou liberação controlada de progesterona para sistemas de transetossomos nanométricos ($133,3 \pm 3,42$ nm) após 24 horas, assim como maior eficiência na taxa de gravidez e maior adesão em comparação com a formulação comercial.

Dentre os sistemas nanoestruturados, nanopartículas lipídicas e nanopartículas poliméricas se destacam como sistemas nanocarreadores na entrega de fármacos, evidenciado pelo grande número de pesquisas, ensaios clínicos e medicamentos aprovados (Mandal *et al.*, 2013; Elhabak *et al.*, 2022). Ambas as

classes apresentam vantagens e limitações em termos de propriedades físico-químicas e biológicas (Sivadasan *et al.*, 2021; Parveen *et al.*, 2023).

Por várias décadas, os lipídios têm sido empregados como sistemas de liberação de fármacos, incluindo lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, líquidas e nanopartículas lipídicas estruturadas compostas por lipídios naturais ou sintéticos. Essas estruturas são facilmente obtidas, biocompatíveis, biodegradáveis, atóxicas, flexíveis e permitem uma ampla administração de fármacos lipofílicos e hidrofílicos. No entanto, apresentam limitações no que diz respeito à estabilidade físico-química em fluidos biológicos, o que restringe sua aplicabilidade devido a sua rápida depuração antes de atingirem os locais-alvo, bem como à baixa viabilidade de produção e reprodutibilidade em larga escala (Kumar *et al.*, 2020; Sivadasan *et al.*, 2021).

Por outro lado, as nanopartículas poliméricas apresentam vantagens significativas, como tamanho reduzido das partículas, capacidade de penetração nos tecidos, variedade ampliada de métodos de síntese e disponibilidade de diversos polímeros, facilidade de obtenção e reprodutibilidade, maior estabilidade em fluidos biológicos, versatilidade na carga de medicamentos e controle aprimorado da taxa de liberação de fármacos. No entanto, essas vantagens são acompanhadas por algumas limitações, tais como a necessidade de utilização de solventes orgânicos, encapsulamento deficiente e potencial toxicidade dos polímeros (Mandal *et al.*, 2013; Tushar *et al.*, 2018; Parveen *et al.*, 2023).

Uma geração promissora de sistemas de entrega de fármacos, denominada nanopartículas híbridas lipídico-poliméricas, vêm sendo exploradas com o objetivo de aproveitar as propriedades individuais de cada sistema, ao mesmo tempo em que contorna ou minimiza as limitações associadas às nanopartículas lipídicas e poliméricas. Esses sistemas oferecem uma ampla gama de benefícios em diversas aplicações biomédicas, ao mesclar as características de nanoestruturas à base de lipídios e polímeros, evitando suas desvantagens (Mandal *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2020; Sivadasan *et al.*, 2021; Elhabak; Ibrahim; Ibrahim, 2022; Parveen *et al.*, 2023).

3.3 NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS LIPÍDICO-POLIMÉRICAS

As nanopartículas híbridas emergiram em resposta à necessidade de superar os desafios intrínsecos observados nas nanopartículas lipídicas e

poliméricas, visando oferecer uma alternativa inovadora, mais atraente, segura e eficaz para o transporte de agentes terapêuticos (WU 2016; Sivadasan *et al.*, 2021; Valencia *et al.*, 2021). A palavra “híbrido” é usada porque as nanopartículas possuem propriedades de partículas poliméricas e lipídicas. O polímero regula a liberação do fármaco, aumenta a estabilidade do sistema e prolonga a sua permanência na corrente sanguínea. Enquanto a utilidade do lipídio pode intensificar a permeação do fármaco através da membrana, facilitar a absorção e preservar o princípio ativo (Mukherjee *et al.*, 2019; Shah *et al.*, 2022).

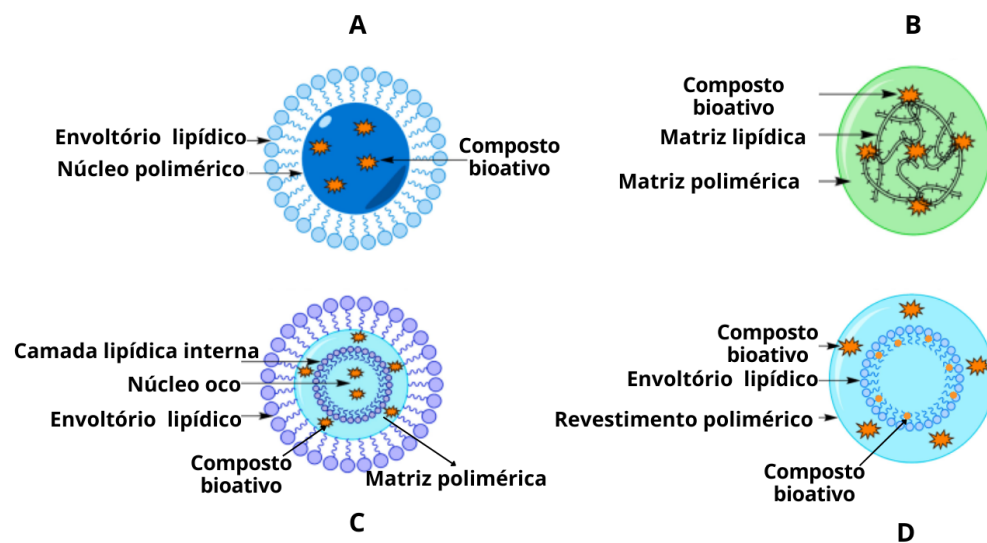
Nanopartículas híbridas lipídicas poliméricas têm a capacidade de melhorar a biocompatibilidade e a estabilidade física de fármacos, abrindo caminho para seu uso promissor na entrega robusta de compostos bioativos (Mandal *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2020; Sivadasan *et al.*, 2021). A presença simultânea de polímero e lipídio nessas nanoestruturas confere-lhes uma notável versatilidade para a veiculação de diversos tipos de fármacos, graças às distintas propriedades desses componentes, tais como hidrofobicidade e solubilidade em água (Wu 2016; Sivadasan *et al.*, 2021; Shah *et al.*, 2022).

Em comparação com outros sistemas nanoestruturados, as nanopartículas híbridas lipídico-polimérica exibem uma série de vantagens singulares. Estas incluem a ampla seleção de polímeros e lipídeos biocompatíveis, permitindo numerosas combinações entre eles, bem como a fabricação simplificada por meio de métodos de síntese em único passo. Adicionalmente, demonstram capacidade de coencapsular agentes terapêuticos com propriedades distintas, o que potencializa sua aplicabilidade clínica e terapêutica (WU, 2016; Mukherjee *et al.*, 2019).

As nanopartículas híbridas são classificadas com base na organização estrutural dos lipídeos e polímeros, como ilustrado na Figura 4. Podendo se apresentar como: A) Núcleo polimérico com envoltório lipídico; B) Lipídios dispersos em uma matriz polimérica; C) Lipídico-polimérica-lipídicas de núcleo oco; D) Núcleo lipídico/ Vesículas lipossomais confinados dentro de uma matriz polimérica (Mandal *et al.*, 2013; Tushar *et al.*, 2018; Mukherjee *et al.*, 2019; Sivadasan *et al.*, 2021; Shah *et al.*, 2022).

A Tabela 2 lista alguns lipídios e polímeros comumente utilizados em sistemas híbridos lipídico-poliméricas que são materiais geralmente considerados seguros e aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) (Tushar *et al.*, 2018).

Figura 4 - Diferentes tipos de nanopartículas híbridas polímero-lipídicas.



Fonte: Adaptado de SHAH *et al.* (2022).

Nota: A) Núcleo polimérico com envoltório lipídico; B) Lipídios dispersos em uma matriz polimérica; C) Lipídico-polimérica-lipídicas de núcleo oco; D) Núcleo lipídico/ Vesículas lipossomais confinados dentro de uma matriz polimérica.

Tabela 2 - Lipídios, polímeros e estabilizadores comumente usados em sistemas híbridos.

LIPÍDIOS			
Fosfolipídios	Lipídios catiônicos	Ácidos graxos	Glicerídeos
Fosfatidilcolina	[N-(N', N '-dimetilaminoetano)-carbamoil] colesterol (DC-Chol)	Ácido oleico	Monoestearato de glicerila (Invitor®900)
1,2-Dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE)	1,2-dioleoil-3-trimetilamônio propano (DOTAP)	Ácido palmítico	Palmitoestearato de glicerila (Precirol®ATO 5)
1,2-Dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (DOPC)	Cloreto de N[1-(2,3dioleiloxi) propil]-N,N,N trimetilamônio (DOTMA)	Ácido cáprico	Behenato de glicerila (Compritol®888 ATO)
1,2-Distearoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE)	Diocetadecilamidoglicilspermina (DOGS)	Ácido láurico	
POLÍMEROS			
Natural	Semi-sintético	Sintético	
Alginato de sódio	Poli (ácido metacrílico)	Polietilenoglicol (PEG)	
Ácido hialurônico	N -trimetilquitosana	Policaprolactona (PCL)	
Quitossana e seus derivados	HPOE (polímero hidrolisado de óleo de soja epoxidado)	Poli (ácido láctico) (PLA)	
Albumina	Amido enxertado entre-80	Poli (ácido láctico- co -glicólico) (PLGA)	
TENSOATIVOS (ESTABILIZADORES)			
Iônico	Não iônico	Anfótero	Copolímeros em blocos não iônicos
Sulfosuccinato de dioctilsódio	Polissorbato-20	Lecitina de ovo (Lipoid® E 80)	PEO-PPO-PEO (poloxâmero 182, 188, 407)
Brometo de cetiltrimetilamônio	Polissorbato-60	Lecitina de soja (Lipoid® S 75, S 100)	Poloxamina
Glicocolato de sódio	Polissorbato-80	Fosfatidilcolina	
Sal sódico de ácido taurocólico	Álcool polivinílico (PVA)		

Fonte: Adaptado de TUSHAR *et al.*, 2018.

O primeiro registro de nanopartículas híbridas lipídico-poliméricas data de 2004. Esse sistema despertou interesse entre os pesquisadores que buscavam resolver problemas relacionados à encapsulação de fármacos antineoplásicos e quimiossensibilizadores iônicos hidrossolúveis em uma matriz lipídica. Eles procuravam uma alternativa para garantir que esses princípios ativos fossem encapsulados adequadamente e apresentassem liberação controlada (Wong *et al.*, 2004). Desde então, nanopartículas híbridas têm sido alvo de interesse para a encapsulação de várias moléculas bioativas, como fármacos únicos e múltiplos, peptídeos, vacinas, oligonucleotídeos, proteínas, agentes de diagnóstico e imagem (Shah *et al.*, 2022).

A literatura destaca esses nanosistemas promissores na entrega modificada de fármacos anti-cancerígenos (Alkholief 2019; Elhabak; Ibrahim; Ibrahim, 2022; Ning *et al.*, 2023), nutracêuticos (Valencia *et al.*, 2021), antioxidantes (Tan *et al.*, 2011; Pukale *et al.*, 2022), fármacos destinados ao tratamento de osteoporose (Murthy *et al.*, 2020), inflamação cutânea (Senyigit *et al.*, 2010), antifúngicos (Ilk; Saglam; Ozgen, 2017), hormônios como a insulina (Liu *et al.*, 2016) e progesterona (Sonvico *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2017; Dehariya *et al.*, 2023).

3.4 NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS A BASE DE LECITINA E QUITOSANA

A combinação de lecitina e quitosana na formação de nanopartículas híbridas representa uma proposta inovadora e promissora no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. Ambas as matérias-primas possuem características únicas que, quando combinadas, potencializam as propriedades das nanopartículas, tornando-as altamente eficazes para diversas aplicações terapêuticas, como já observado por muitos autores, que relataram maior biodisponibilidade, propriedade mucoadesiva, estabilidade de armazenamento e maior eficiência de encapsulação de fármacos (Sonvico *et al.*, 2006; Senyigit *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2011; Ilk; Saglam; Ozgen, 2017; Alkholief, 2019; Valência *et al.*, 2021; Elhabak; Ibrahim; Ibrahim, 2022). Fármacos lipofílicos, como a progesterona, podem ser envolvidos pela porção hidrofóbica da lecitina, constituindo o núcleo interno, enquanto a quitosana hidrofílica compõe a camada externa e mantém a estabilidade da nanoestrutura (Ma *et al.*, 2020).

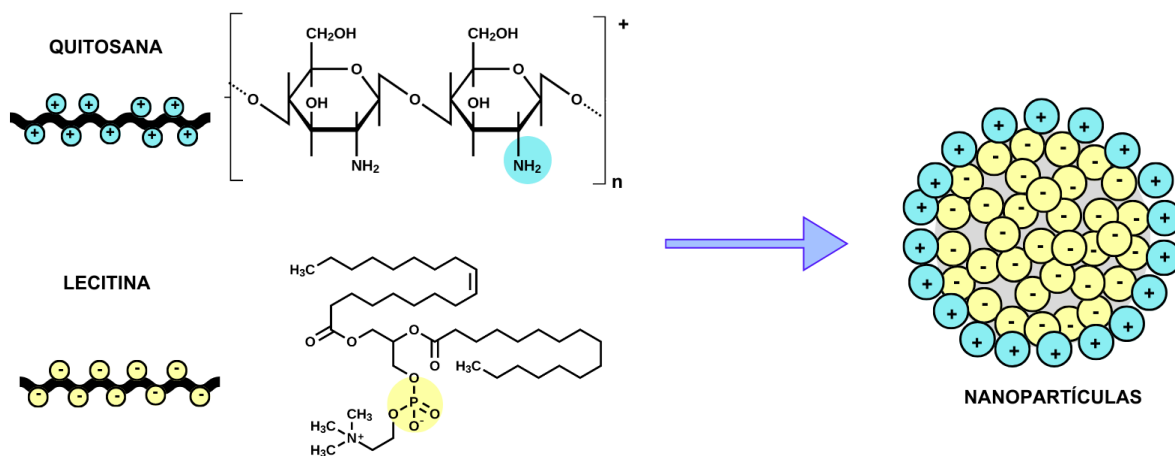
No estudo conduzido por Elhaback, Ibrahim, Ibrahim (2022), foi observado que nanopartículas híbridas constituídas por lecitina e quitosana que continham gemcitabina, promoveram uma fusão mais eficaz dos fosfolípidios das nanopartículas com a membrana celular. Essa interação resultou em uma melhor fixação e captação celular do fármaco, como evidenciado pela maior taxa de absorção observada *in vivo*. Além disso, os autores enfatizam que a propriedade mucoadesiva da quitosana desempenhou um papel significativo ao prolongar o tempo de permanência do fármaco na mucosa, sendo um sistema intravaginal promissor para o tratamento de câncer cervical.

A obtenção das nanopartículas híbridas revestidas com quitosana podem ser obtidas pela adição da solução de quitosana em formulações de nanopartículas previamente preparadas. Alternativamente, também é descrito que a solução de quitosana pode ser adicionada ainda durante a formação das nanopartículas para revesti-las por meio de interações eletrostáticas de cargas opostas que permitem se automontar em nanopartículas (Frank *et al.*, 2020). Esse último método, também é conhecido como nanoprecipitação com adição de solvente (Dalagnol, 2011; Sonvico *et al.*, 2020; Murthy *et al.*, 2020).

A técnica de automontagem tem recebido maior atenção devido ao fato de ser um processo simples que ocorre em uma única etapa, fácil de ser realizado e sem envolver quaisquer solventes orgânicos ou agentes de reticulação (Cho *et al.*, 2012 apud Ma *et al.*, 2020). Além de economizar energia, esse atrativo método é também mais vantajoso quando comparado às abordagens convencionais que utilizam grandes volumes de solventes orgânicos, agentes de reticulação ou equipamentos robustos.

Esse método protege os ingredientes bioativos encapsulados das tensões prejudiciais normalmente associadas aos processos convencionais de fabricação (Ichikawa *et al.*, 2005 apud Ma *et al.*, 2020; Dalagnol, 2011). A interação eletrostática entre polieletrólitos de cargas opostas, base desse trabalho, está esquematizada na Figura 5.

Figura 5 - Representação esquemática da interação quitosana-fosfolipídios e da automontagem de nanopartículas.



Fonte: A autora.

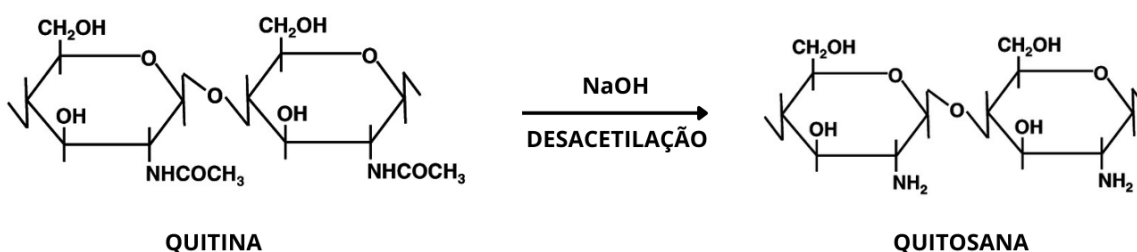
Vários polímeros naturais biocompatíveis e biodegradáveis apresentam capacidade de automontagem. Entre as opções, a quitosana e o fosfolipídio são os candidatos bem aceitos devido à biocompatibilidade e biodegradabilidade desses materiais (Ma *et al.*, 2020). Alguns autores afirmam que nanopartículas à base de lecitina (fosfolipídios carregados negativamente) e quitosana (polissacarídeo carregado positivamente), obtidas por interação eletrostática, por possuírem excelentes taxas de encapsulamento têm sido utilizadas com sucesso para encapsular substâncias insolúveis ou pouco solúveis em água, por isso, promissor para a veiculação da progesterona (Alkoholief, 2019; Frank *et al.*, 2020; Murthy *et al.*, 2020; Valência *et al.*, 2021).

Assim, via interação eletrostática, os grupamentos amina (NH_3^+) da cadeia da quitosana interagem com a porção polar carregada negativamente da lecitina (grupos fosfato). Essa interação permite melhorar as propriedades da cadeia polimérica, o que parece favorecer a incorporação de compostos bioativos dentro das nanopartículas, uma vez que deixa porção apolar da lecitina disponível para interagir com a porção hidrofóbica do ativo lipofílico, estabilizando-o dentro das nanopartículas (Alkoholief, 2019; Frank *et al.*, 2020; Jardim *et al.*, 2020; Murthy *et al.*, 2020; Valência *et al.*, 2021).

3.5 QUITOSANA

A quitosana é um biopolímero natural formado pelos polissacarídeos N-acetil- 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose unidos por ligações β -1,4 glicosídicas. É um derivado complexo, não tóxico, biodegradável, obtido pela desacetilação parcial de quitina (Figura 6), sendo esse, parte constituinte importante dos exoesqueletos de crustáceos e artrópodes, como caranguejos, camarões e lagostas, além de constituir as paredes celulares dos fungos (Zargar; Asghari; Dashti, 2015; Yadav *et al.*, 2023).

Figura 6 - Reação de desacetilação da quitina para a obtenção da quitosana.



Fonte: A autora.

A quitosana é um polímero catiônico cujo comportamento em solução é influenciado por diversos parâmetros, notadamente seu pKa, massa molecular e porcentagem de desacetilação. Com um valor de pKa em torno de 6,5 para os grupos amino presentes na estrutura da quitosana, esta tende a apresentar carga positiva em pH neutro a ácido o que promove melhoria da solubilidade do polímero (Zargar; Asghari; Dashti, 2015).

A solubilidade da quitosana é altamente dependente de sua massa molecular e da porcentagem de desacetilação. Em particular, uma maior massa molecular tende a diminuir a solubilidade devido à formação de extensas ligações de hidrogênio inter e intramoleculares entre as cadeias poliméricas. Por outro lado, uma maior porcentagem de desacetilação contribui para uma maior solubilidade em água, uma vez que resulta na protonação de um maior número de grupos amina na molécula, facilitando sua interação com o solvente (Zargar; Asghari; Dashti, 2015; Yadav *et al.*, 2023).

A quitosana apresenta uma ampla gama de aplicações no campo biomédico, abrangendo áreas como cicatrização de feridas, engenharia de tecidos, regeneração óssea, odontologia, bioimagem, biossensores, além de possibilitar a entrega direcionada e controlada de fármacos e genes. A diversidade de características da quitosana, tais como atividade antibacteriana, ação hemostática, capacidade de adsorção, biodegradabilidade, formação de filme, biocompatibilidade, resistência mecânica ajustável e mucoadesividade, contribui significativamente para o seu valor no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (Zargar; Asghari; Dashti, 2015; Hossain; Mallik; Rahman, 2020; Yadav *et al.*, 2023).

Nanocápsulas formadas ou recobertas por quitosana podem processar uma carga superficial catiônica beneficiando-se dos ricos grupos amino da quitosana. A superfície catiônica possibilita a interação eletrostática com superfícies carregadas negativamente como de lipídios, bactérias, membranas celulares e mucosas (Deng *et al.*, 2020; Valência *et al.*, 2021; Yadav *et al.*, 2023). Nesse contexto, a adesão da quitosana aos tecidos de revestimento da mucosa vaginal é uma característica extremamente favorável no que diz respeito a sua utilização nos sistemas de liberação controlada de fármacos na região da mucosa vaginal ou como ingrediente farmacêutico (Jøraholmen *et al.*, 2014; Dos Santos *et al.*, 2020; Elmi *et al.*, 2020; Elhabak; Ibrahim; Ibrahim, 2022).

Jøraholmen *et al.*, 2014 desenvolveram lipossomas de lecitina revestidos de quitosana contendo clotrimazol para o tratamento de candidíase vulvovaginal e constataram um perfil de liberação sustentada *in vitro* maior em lipossomas revestido com quitosana e maior propriedade mucoadesiva comparado aos lipossomas não revestidos. Da mesma forma, Andersen *et al.* (2017) compararam a atividade fungicida de duas formulações lipossomais diferentes: lipossoma revestido com quitosana carregado com metronidazol e lipossoma revestido com carbopol carregado com metronidazol. O resultado indicou que o lipossoma revestido com quitosana, além de melhorar a atividade fungicida, apresentou maior força mucoadesiva e liberação controlada em comparação com o lipossoma revestido com carbopol.

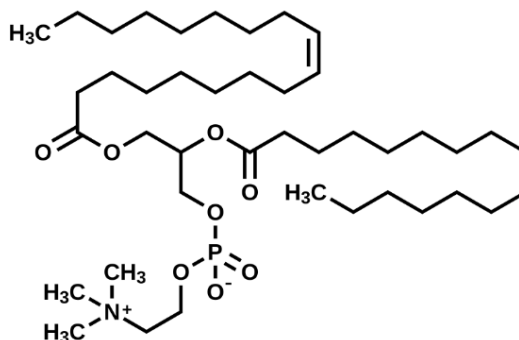
Assim, nanopartículas híbridas revestidas com quitosana podem ser uma alternativa promissora para a veiculação vaginal da progesterona. Ademais, nanopartículas de quitosana associada à lecitina sintetizadas por interação intramolecular auto-organizada entre a lecitina carregada negativamente e a

quitosana carregada positivamente foram demonstradas como transportadores promissores para diversos fármacos (Sonvico *et al.*, 2006; Senyigit *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2011; Ilk; Saglam; Ozgen, 2017; Alkholief 2019; Valência *et al.*, 2021).

3.6 LECITINA

A lecitina é considerada uma importante molécula anfifílica obtida de uma mistura de fosfolipídeos de origem vegetal, especialmente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, conforme Figura 7. É considerada segura e biocompatível, por isso, muito usada em formulações farmacêuticas, incluindo lipossomas, nanopartículas poliméricas, micelas, nanopartículas lipídicas e nanopartículas híbridas lipídico-polimérica (Senyigit *et al.*, 2010; Ilk; Saglam; Ozgen, 2017; Alkholief 2019; Valência *et al.*, 2021). Embora a palavra lecitina seja derivada do grego “lekithos”, que significa “gema de ovo”, a principal fonte comercial de lecitina vem da soja (PAIVA, 2015).

Figura 7 - Estrutura molecular da fosfatidilcolina, componente da lecitina.



Fonte: A autora.

A lecitina é utilizada comercialmente como emulsificante e lubrificante em diversas indústrias, incluindo a farmacêutica e a alimentícia. Ela é considerada um tensoativo não tóxico e bem tolerado pelo organismo, pois é um componente integral das membranas celulares e pode ser completamente metabolizada. A *Food and Drug Administration* (FDA) classifica a lecitina como um produto geralmente reconhecido como seguro (GRAS) para consumo humano, o que justifica ela ser

amplamente utilizada. Na União Europeia, a lecitina é reconhecida como aditivo alimentar e identificada pelo número E322 (Machado *et al.*, 2014).

Além disso, a lecitina desempenha um papel crucial como emulsionante na estabilização do processo de formação de nanopartículas, contribuindo para mitigar a pressão interfacial e prevenir a coalescência das partículas resultantes, devido a sua estrutura anfifílica (Paiva, 2015; Jardim *et al.*, 2020). Além disso, sua presença facilita significativamente o aumento da solubilidade do princípio ativo na matriz da nanopartícula, características estas que são fundamentais para a obtenção bem-sucedida de sistemas nanoparticulados com estabilidade adequada (Romio *et al.*, 2007 *apud* Paiva, 2015). Trabalhos anteriores demonstraram que, a adição da lecitina às nanopartículas de quitosana e sulfato de condroitina aumentou consideravelmente a eficiência de encapsulação da curcumina (Jardim *et al.*, 2020), progesterona (Sonvico *et al.*, 2006), clobetasol-17-propionato (Senyigit *et al.*, 2010) e gemcitabina (Elhabak; Ibrahim; Ibrahim, 2022).

Devido a interações eletrostáticas, a lecitina vem sendo bastante utilizada concomitantemente com polímeros catiônicos, como a quitosana, na formação de nanopartículas. A partir de uma solução alcoólica de lecitina adicionada a uma solução de quitosana gera-se um sistema nanoestruturado. A porção negativamente carregada na porção polar (grupo fosfato) da lecitina interage com a quitosana (grupo NH^{3+}) levando a formação preliminar de uma vesícula. A auto associação do fosfolípido com o polímero deixam as cadeias polares dos ácidos graxos disponíveis a interação com sistemas hidrofóbicos, tornando o sistema um potencial candidato a incorporação de fármacos hidrofóbicos (Taner *et al.*, 2014 *apud* Paiva, 2015; Alkholief, 2019; Jardim *et al.*, 2020; Murthy *et al.*, 2020; Valência *et al.*, 2021).

3.7 SISTEMAS MUCOADESIVOS

A mucosa é uma membrana epitelial que reveste as superfícies internas do corpo como olhos, trato gastrointestinal, respiratório, cervicovaginal. A mucosa desempenha um papel fundamental na proteção contra agentes patogênicos, regulação do transporte de nutrientes e absorção de fármacos. A superfície da mucosa é ricamente revestida por um hidrogel composto por ~95% p/p de água e 1–5% p/v de glicoproteínas como mucinas (que são consideradas o componente estrutural e funcional do muco), proteínas, eletrólitos, carboidratos, DNA, ácidos

nucléicos, lipídios, sais, detritos celulares, e diversas proteínas (enzimas, fatores de crescimento, anticorpos e imunoglobulinas) que atuam como sítios de ligação para os sistemas mucoadesivos (Puri *et al.*, 2022; Valamla *et al.*, 2022).

Os sistemas mucoadesivos são formulações farmacêuticas projetadas para aderir à mucosa, permitindo liberação controlada e direcionada do fármaco. Esses sistemas são frequentemente aplicados como géis, filmes, comprimidos, cremes ou soluções (Kumar; Islam; Nurunnabi, 2022; Mfoafo; Omid; Omidian, 2023). Os sistemas mucoadesivos são compostos por polímeros específicos que interagem e se ligam às glicoproteínas presentes na superfície da mucosa, formando uma união resistente. Essas interações mucoadesivas são mediadas por interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas entre as partículas e fibras de mucina presentes na mucosa. Essas interações promovem a aderência estável do sistema mucoadesivo à mucosa, impedindo sua remoção prematura (Shaikh *et al.*, 2011; Kuma; Islam; Nurunnabi, 2022; Puri *et al.*, 2022; Valamla *et al.*, 2022; Mfoafo; Omid; Omidian, 2023).

A mucoadesão ocorre por meio da adesão do polímero à superfície da mucosa que envolve duas etapas: (I) contato íntimo do polímero com uma membrana por meio do fenômeno de umedecimento ou inchaço; (II) penetração do polímero no tecido ou na superfície da membrana mucosa (interpenetração) por meio de várias interações físico-químicas que ocorrem para fortalecer a articulação adesiva, resultando em adesão prolongada (Mansuri *et al.*, 2016).

O processo de mucoadesão é explicado por diversas teorias que, em conjunto, auxiliam na sua compreensão (Shaikh *et al.*, 2011; Mansuri *et al.*, 2016). Sendo elas:

- *Teoria eletrônica:* está relacionada à interação eletrostática entre a carga positiva do sistema de liberação e a carga negativa da mucina, glicoproteína que recobre a mucosa;
- *Teoria de adsorção:* a interação ocorre por ligação de hidrogênio e Van der Waals;
- *Teoria da molhabilidade:* diz a respeito da capacidade do polímero de intumescer e se fixar na mucosa;
- *Teoria da difusão:* é dependente do tempo que a cadeia polimérica mucoadesiva consegue penetrar na cadeia glicoproteica da camada mucosa. Esta

propriedade está relacionada com as cadeias poliméricas e a quantidade de glicoproteínas na mucosa;

- *Teoria mecânica:* considera a adesão devido ao preenchimento de irregularidades em uma superfície rugosa por um líquido mucoadesivo. Além disso, tal irregularidade aumenta a área interfacial disponível para interações e pode ser considerada o fenômeno mais importante do processo;

- *Teoria da fratura:* as ligações adesivas entre os sistemas estão relacionadas com a força necessária para separar ambas as superfícies uma da outra. Esta “teoria da fratura” relaciona a força para o desprendimento do polímero do muco com a força da sua ligação adesiva.

Nanopartículas mucoadesivas têm mostrado grande potencial para administração de fármacos pela mucosa vaginal, devido à sua capacidade de aderir à superfície da mucosa e prolongar o tempo de residência do fármaco. Segundo Puri et al. (2022) e Obuobi et al. (2024) essas partículas possuem características específicas, como o tamanho reduzido e a capacidade de interagir com os componentes da camada mucosa, o que melhora a biodisponibilidade e eficácia terapêutica dos fármacos administrados. O tamanho adequado dessas nanopartículas, tipicamente na faixa de 200 a 500 nm, é crucial para promover tanto a adesão prolongada na camada mucosa, maximizando o efeito terapêutico.

Os nanosistemas híbridos, baseados em lipídios e polímeros catiônicos com propriedades mucoadesivas, têm sido amplamente explorados com o intuito de prolongar o tempo de permanência na mucosa, proteger o fármaco, aumentar a penetração e melhorar a biodisponibilidade de ativos com baixa farmacocinética (Sonvico et al., 2006; Hao et al., 2017; Alkholief 2019; Abruzzo et al., 2021; Valência et al., 2021).

Neste contexto, a veiculação da progesterona em nanopartículas híbridas mucoadesivas, como as de lecitina e quitosana, representa uma abordagem inovadora para sua aplicação na mucosa vaginal. Esses sistemas oferecem o potencial de promover uma liberação sustentada e localizada, prolongando o tempo de permanência do fármaco na mucosa e, conseqüentemente, aumentando sua eficácia terapêutica (Sonvico et al., 2006; Hao et al., 2017; Alkholief, 2019; Abruzzo et al., 2021; Valência et al., 2021). A eficácia dessa estratégia já foi evidenciada na veiculação de outros fármacos por via vaginal, como o clotrimazol (Jøraholmen et al., 2014) e a gemcitabina (Elhabak; Ibrahim; Ibrahim, 2022).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

- Ácido acético glacial (Biotec EIRELI-ME, São José dos Pinhais, Brasil);
- Ácido clorídrico (HCl) (Biotec, Produtos Químicos, São José dos Pinhais, Brasil);
- Água ultrapura (Milli-Q®, MILLIPORE, Bedford, MA, Estados Unidos);
- Álcool etílico PA 96% (C₂H₆O) (Êxodo científica, São Paulo, Brasil);
- Dimetilsulfóxido (C₂H₆OS) (Synth ®, São Paulo, Brasil);
- Hidróxido de sódio (NaOH) (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil);
- Lactose monohidratada P.A. (Biotec, Produtos Químicos, São José dos Pinhais, Brasil);
- Lecitina (L- α -fosfatidilcolina, n.44924, Sigma-aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil);
- Metanol (CH₃OH) grau HPLC (Hexis Científica, Phillispsburg, Estados Unidos);
- Miristato de isopropila P.A. (Synth ®, São Paulo, Brasil);
- Monooleato de sorbitano etoxilado (Tween® 80; Synth ®, São Paulo, Brasil);
- Progesterona-PG (Mm 314.46 g/mol; 99% (m/m) de pureza, Fagron S.A., Rotterdam, Holanda);
- Quitosana (baixa massa molecular; grau de desacetilação de ≤ 75 %, n. 448869, Sigma-aldrich Brasil Ltda, Cotia, Brasil);
- Filtro para seringa com membrana de nylon (0,2 μ m x 13 mm, Cromafil®).
- Cloreto de sódio (NaCl) (Êxodo científica, São Paulo, Brasil);
- Cloreto de potássio (KCl) (Synth ®, São Paulo, Brasil);
- Fosfato dissódico dihidratado (Na₂HPO₄) (Êxodo científica, São Paulo, Brasil);
- Fosfato de potássio dihidrogenado (KH₂PO₄) (Êxodo científica, São Paulo, Brasil).

4.2 EQUIPAMENTO E ACESSÓRIOS

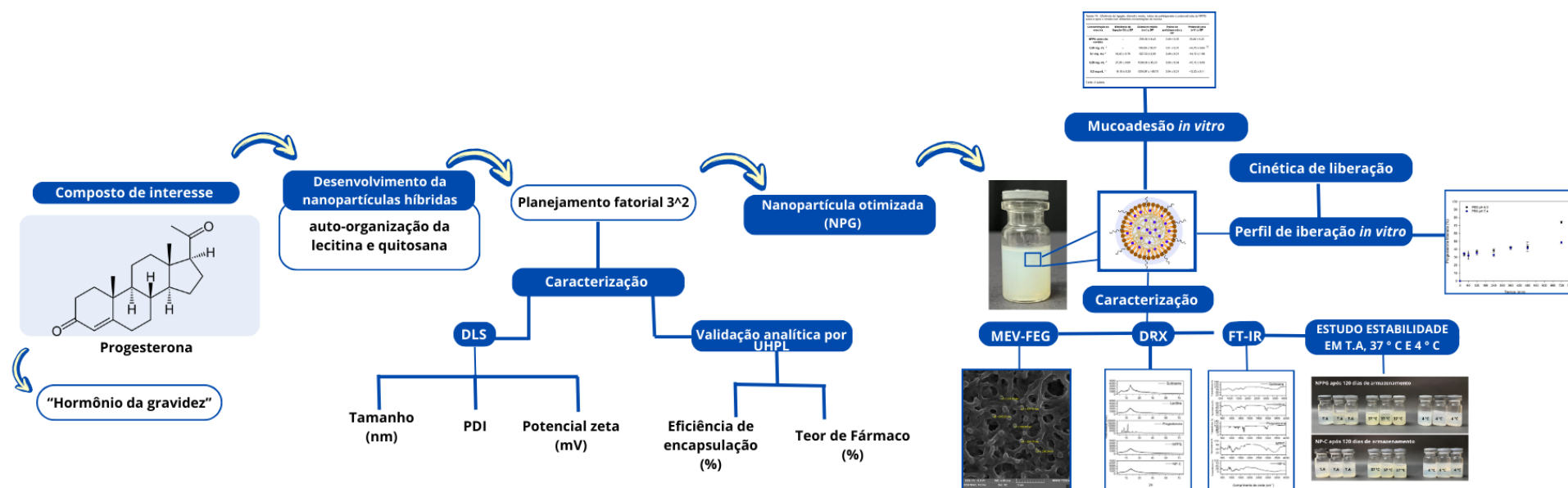
- Agitador magnético (FISATOM, modelo Q261-22, Diadema, Brasil).
- Balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil)
- Centrífuga (Hermle Z326K, Wehingen, Alemanha)
- Centrífuga (Bio Eng, BE-4004, Curitiba, Brasil)
- Difratorômetro de raio X (SHIMADZU, modelo XRD-6000, Quioto, Japão).
- Equipamento DSC/TG (STA 6000, Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos).
- Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21, Quioto, Japão).
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater, Quioto, Japão).
- Microscópico eletrônico de varredura por emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca).
- pHmetro digital (HANNA, HI 2221, São Paulo, Brasil).
- Sonicador ultrassônico (ECO-SONICS, modelo QR550, 555 watts, São Paulo, Brasil).
- Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, NANO ZS 90, Malvern Reino Unido).
- Ultra-freezer (REVCO, modelo ULT-2186-3-D37, Carolina do Norte, Estados Unidos);
- Liofilizador (LIOTOP, L2020, São Paulo, Brasil);
- Incubadora shaker de bancada (ETHIK TECHNOLOGY, modelo 530-D, São Paulo, Brasil);

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Este estudo consistiu no desenvolvimento de nanopartículas híbridas constituídas por lecitina e quitosana para liberação direcionada de progesterona na mucosa vaginal. As etapas realizadas na parte experimental estão representadas na Figura 8.

O presente trabalho teve início com a síntese das nanocápsulas híbridas de lecitina e quitosana por meio do planejamento fatorial 3^2 para ajuste da formulação com uma quantidade limitada de experimentos, conforme as variáveis respostas definidas. A eficiência de encapsulação (EE%) da progesterona foi avaliada por meio da cromatografia líquida de ultra eficiência previamente validado de acordo com as especificações da Resolução 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA. Na sequência, a formulação selecionada foi caracterizada por métodos físico-químicos, morfológicos e estruturais. A estabilidade da nanopartícula otimizada foi avaliada a partir das análises de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta, nos tempos 0, 30, 60 e 120 dias. Posteriormente, a liberação e a mucoadesão *in vitro* foram investigadas.

Figura 8 - Fluxograma ilustrativo das etapas da pesquisa.



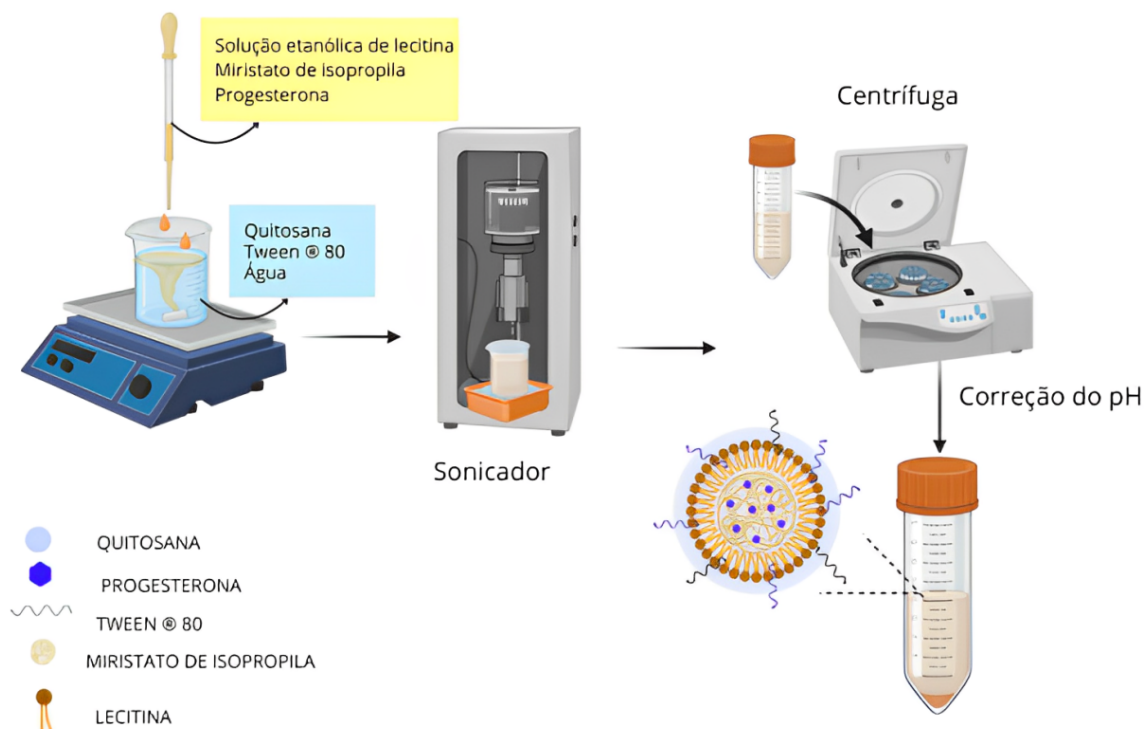
Fonte: A autora.

4.4 DESENVOLVIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS DE LECITINA/QUITOSANA CONTENDO PROGESTERONA

As nanopartículas híbridas de lecitina/quitosana automontadas contendo progesterona foram obtidas por meio do método de injeção etanólica de lecitina sob uma solução aquosa de quitosana, conforme relatado anteriormente, com algumas modificações (Sonvico *et al.*, 2006; Alkholief, 2019; Murthy *et al.*, 2020; Senyigit *et al.*, 2020).

Inicialmente, uma solução de quitosana a 1% (p/v) foi preparada em ácido acético a 1% (v/v) sob agitação magnética por 24 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, volumes de 2,5 mL, 1 mL e 0,5 mL dessa solução foram adicionados a uma fase aquosa contendo 0,5% (m/v) de Tween® 80 em água, até um volume final de 46 mL. Para a fase etanólica, quantidades adequadas de progesterona foram dissolvidas em 4 mL de uma solução etanólica (etanol absoluto com 10% (v/v) de DMSO) de lecitina a 25 mg/mL, contendo 2,5% (m/v) de miristato de isopropila. Após aquecer a fase aquosa a 65 °C, a solução etanólica foi adicionada gota a gota à fase aquosa com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, mantendo a mistura sob agitação vigorosa por 30 minutos a 65°C. Em seguida, a mistura foi submetida à sonicação em banho de gelo, com frequência de 20 kHz, potência de 550 watts e amplitude de 80%, em regime de 10 s ON/ 10 s OFF, durante 2 ciclos de 5 minutos. A suspensão obtida foi centrifugada a 1.300 rpm por 40 minutos, com o intuito de remover o excesso de polímero, lipídio e fármaco não encapsulado (Ilk, Saglam, Ozgen 2017). Esse precipitado formado, foi dissolvido em metanol para a quantificação da progesterona não encapsulada e o sobrenadante contendo as nanopartículas teve o pH final ajustado para 4,5-5,0 com soluções de HCl 5% (v/v) e NaOH 5% (p/v) para posterior análise de caracterização. Uma nanopartícula controle (NP-C) foi produzida nas mesmas condições sem a adição do fármaco. O esquema da obtenção das nanopartículas pode ser visualizado na Figura 9.

Figura 9 - Esquema do método para a obtenção das nanopartículas híbridas contendo progesterona.



Fonte: A autora.

4.4.1 Liofilização

Para realizar a caracterização por alguns métodos, fez-se necessário a liofilização das nanopartículas híbridas contendo progesterona (NPPG) e a NP-C. Para isso, 1 g de lactose monoidratada foi dispersa em 10 mL da nanossuspensão sob agitação magnética. Em seguida, a suspensão foi congelada em ultra-freezer (REVCO, modelo ULT-2186-3-D37, Carolina do Norte, Estados Unidos) a -80°C por 24 horas e liofilizada em liofilizador (LIOTOP, L2020, São Paulo, Brasil) por 48 horas, até total remoção da água.

4.5 OTIMIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS USANDO PLANEJAMENTO FATORIAL 3^2

Nesta pesquisa, após estudos experimentais de pré-formulação e avaliação da literatura disponível, optou-se pela otimização das formulações das nanopartículas de lecitina e quitosana através de uma análise fatorial completa do

tipo 3².

As variáveis de estudo estão discriminadas na Tabela 3. Como variáveis independentes, foram selecionados como fatores: a quantidade de quitosana e fármaco em três níveis: nível inferior (-), nível intermediário (0) e nível superior (+).

A interferência dos componentes da formulação foi estudada frente as quatro características essenciais em uma nanopartícula: diâmetro médio, índice de polidispersão (PDI) potencial zeta, eficiência de encapsulação (EE%) e teor de progesterona, por isso, esses parâmetros foram escolhidos como variáveis de resposta.

Tabela 3 - Variáveis utilizadas no planejamento fatorial 3².

Variáveis independentes	Níveis codificados para análise		
	Nível inferior (-1)	Nível médio (0)	Nível superior (+1)
(A) Quitosana (mg)	5	10	25
(B) Progesterona (mg)	5	10	20

Variáveis dependentes	Restrições aplicadas
(R1) Tamanho de partícula (nm)	Mínimo
(R2) Índice de Polidispersão (IPD)	Mínimo
(R3) Potencial Zeta (mV)	Máximo
(R4) Eficiência de encapsulação (%)	Máxima
(R5) Teor de fármaco (%)	Máximo

Fonte: A autora.

O delineamento 3² proporcionou a obtenção de 9 experimentos combinados em triplicata, totalizando 27 experimentos executados de forma aleatória, para garantir a reprodutividade do ensaio, como observado na Tabela 4.

Tabela 4 - Planejamento fatorial 3²: número de experimentos e combinações dos níveis e fatores.

Experimentos	Variáveis independentes	
	Quitosana	Progesterona
1	+1	-1
2	0	-1
3	-1	-1
4	+1	0
5	0	0
6	-1	0
7	+1	+1
8	0	+1
9	-1	+1

Fonte: A autora.

O planejamento fatorial foi utilizado para permitir a avaliação simultânea dos efeitos das variáveis com um número reduzido de ensaios. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com o auxílio do programa Minitab[®] Statistical Software versão 22.1.0 para nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Uma equação polinomial de segunda ordem não linear gerada pelo software que define a correlação entre as variáveis independentes e dependentes, pode ser expressa por:

$$R = b_0 + b_1A + b_2B + b_{12}AB + b_{11}A^2 + b_{22}B^2$$

Onde, R representa a resposta observada da variável dependente associada a cada nível de fator; b_0 é uma constante; b_1 e b_2 são os efeitos principais das variáveis independentes A (quitosana) e B (progesterona); b_{12} é o efeito da interação entre as variáveis independentes (AB); b_{11} e b_{22} são termos que representam os efeitos quadráticos das variáveis independentes.

O sinal positivo (+) de um fator na equação polinomial demonstra efeito sinérgico, enquanto o sinal negativo (-) demonstra efeito antagônico.

4.6 DETERMINAÇÃO DA PROGESTERONA INCORPORADAS NAS NANOPARTÍCULAS

4.6.1 Desenvolvimento do Método Analítico por Cromatografia Líquida de Ultra-alta Eficiência (CLUE)

A concentração da progesterona (PG) encapsulado nas nanocápsulas poliméricas (mg/mL) foi determinada a partir dos ensaios de quantificação desenvolvidos por CLUE, em equipamento Nexera X2 UHPLC system (Shimadzu, Quito, Japão), com bomba quaternária (LC-30AD), desgaseificador (DGU20A5RA), amostrador automático (SIL-30 AC), compartimento de coluna termostatizado (CTO-20AC) e um detector de arranjo de fotodiodos (SPD-M20A), conforme parâmetros estabelecidos na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros cromatográficos utilizados para quantificação da progesterona (PG) por CLUE.

Características	Descrição
Detecção	UV ($\lambda = 246 \text{ nm}$)
Fluxo	1 mL/min
Coluna	NST C ₁₈ (125 mm x 4 mm x 5 μm)
Temperatura	Temperatura ambiente
Fase móvel	Metanol e água ultrapura (85:15 v/v)
Volume de injeção	5 μL
Tempo de análise	5 min
Tempo de retenção	2,805 min

Fonte: A autora.

Previamente, o método analítico foi validado conforme descrito a seguir:

4.6.2 Validação do Método Analítico Para a Quantificação da Progesterona

A validação do método analítico foi desenvolvida conforme descrito na Resolução n° 166, de 24 de junho de 2017 (Brasil, 2017) e recomendação da *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH).

Os parâmetros avaliados foram linearidade, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão intermediária, exatidão e robustez. A aquisição e

processamento dos dados foram obtidos com o software LabSolutions® chromatography (Shimadzu UK Ltd, Milton Keynes, UK, versão 5.73).

4.6.2.1 Linearidade

Para linearidade foram elaboradas quatro curvas analíticas com 6 pontos em concentrações diferentes de PG em metanol (25; 50; 75; 100; 150; 200 µg/mL) como preconizado pela RDC 166/17. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram obtidos. A análise da regressão linear ocorreu pelos mínimos quadrados e o coeficiente angular foi testado por análise de (ANOVA), com $p < 0,05$.

4.6.2.2 Seletividade

A seletividade foi determinada pela análise do cromatograma das nanopartículas preparadas sem fármaco (NP-C) em comparação com o cromatograma da PG numa concentração de 50 µg/mL, com a intenção de confirmar que a formulação e o processo de preparo das nanopartículas não interferem na quantificação do fármaco.

4.6.2.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados por meio da relação entre o desvio padrão dos coeficientes lineares da equação da reta (σ) e a média dos coeficientes angulares de 4 curvas analíticas (IC), utilizando fatores multiplicadores de acordo com a RDC 166/17, conforme as Equações 1 e 2.

(Equação 1)

$$LD = \frac{3,3 \sigma}{IC}$$

(Equação 2)

$$LQ = \frac{10 \sigma}{IC}$$

4.6.2.4 Precisão

A precisão do método determina a proximidade dos resultados de uma mesma amostra expressa pela repetibilidade e precisão intermediária demonstrada pela dispersão dos resultados e desvio padrão relativo (Equação 3). A determinação da precisão foi obtida por meio da análise de 9 (nove) réplicas das concentrações de 25, 100 e 200 µg/mL individualmente preparadas em três dias diferentes no mesmo laboratório e mesmo analista. A análise estatística dos resultados foi realizada por ANOVA com $p < 0,05$.

(Equação 3)

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Onde CV= coeficiente de variação; DP= desvio padrão da série de medições; CMD= concentração média determinada.

4.6.2.5 Exatidão

Para a exatidão foi utilizado o método de recuperação com adição do padrão. Dessa maneira, foi adicionado uma quantidade conhecida de fármaco (50 µg/mL) às amostras de concentração de 25, 100, 150 µg/mL, para obter amostras nas concentrações de 37,5; 75 e 100 µg/mL. As soluções foram obtidas em triplicata e os resultados foram expressos como porcentagem de recuperação, a partir da Equação 4, onde CME é a concentração média experimental e CT a concentração teórica.

(Equação 4)

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{CME}{CT} \times 100$$

4.6.2.6 Robustez

Na avaliação da robustez, soluções de PG a 25, 100 e 200 µg/mL foram submetidas a diferentes condições de fluxo da fase móvel, temperatura da coluna

analítica e variação da composição da fase móvel. A fase móvel variou de 85:15 (v/v) para 83:17 (v/v) (metanol e água). O fluxo foi modificado de 1 mL/min para 0,9 mL/min. A temperatura da coluna analítica foi alterada de 25 °C para 29 °C. Os resultados dos parâmetros foram analisados por meio do CV e Recuperação do analito e comparados com os valores obtidos em condições padrões. A significância dos resultados foi verificada por ANOVA com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.

4.6.3 ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE%) E TEOR DE FÁRMACO ENCAPSULADO

A porcentagem de eficiência de encapsulamento (EE) foi determinada pelo método indireto. Durante o preparo das nanopartículas, o excesso de material sólido formado após a centrifugação foi dissolvido em metanol a fim de quantificar a progesterona não encapsulada (El Hady *et al.*, 2024). Uma vez validado o método, a cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLUE) a 246 nm foi utilizada para determinar a quantidade de fármaco não encapsulado e o teor de fármaco. A porcentagem de EE foi estimada pela Equação 5 e teor de fármaco pela Equação 6 (Alkholief, 2019; Mehandole *et al.*, 2024).

Equação (5)

$$EE\% = \frac{\text{Quantidade de fármaco adicionado} - \text{Quantidade não encapsulada do fármaco}}{\text{Quantidade de fármaco adicionado}} \times 100$$

Equação (6)

$$Teor = \frac{\text{Quantidade de fármaco adicionado} - \text{Quantidade não encapsulada do fármaco}}{\text{Massa de nanopartícula}} \times 100$$

4.7 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS CONTENDO PROGESTERONA

4.7.1 Caracterização Físico-química

As análises de tamanho médio e índice de polidispersão (IPD) foram

realizadas pela metodologia de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e a determinação do potencial zeta por meio da mobilidade eletroforética em equipamento Zetasizer® Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido) com ângulo de detecção de 90° em temperatura de 25 °C. Tais análises foram realizadas com nanopartículas diluídas em água na proporção de 1:10 (v/v). O pH foi medido diretamente nas formulações com o auxílio de um potenciômetro calibrado (Digimed®, Brasil), previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0.

4.7.2 Caracterização Morfológica

4.7.2.1 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (*Field Emission Gun Scanning Eletron Microscopy - FEG-SEM*)

A avaliação morfológica e de superfície foi realizada por microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão por campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). As amostras foram rotaevaporadas até atingir o volume de 10 mL, com o objetivo de concentrá-las para a análise. Em seguida, uma gota da amostra foi depositada em *stubs* e deixada secar por 24 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram submetidas à metalização com ouro, utilizando o metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU, Quioto, Japão). Para a obtenção das eletromicrografias, foi empregada uma voltagem de aceleração de 7 a 10 kV, utilizando-se um software específico (Electron Optical Design®).

4.7.3 Caracterização estrutural

4.7.3.1 Análise por difração de raio X (X Ray Diffraction – DRX)

Para a realização da análise, as amostras de nanosuspensão (NPPG e NP-C) foram gotejadas sobre uma lâmina até a formação de uma pasta. Essa pasta, assim como a PG pura, a quitosana e a lecitina foi examinada em um difratômetro de raios X Shimadzu XRD-6000, utilizando scan de 2°.min⁻¹ e 2^º de 4° à 80°, radiação K α de cobre (λ = 1.5418 Å), corrente de 40 mA e voltagem de 40kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade.

4.7.3.2 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

As NPPG e NP-C liofilizadas (conforme o item 4.4.1) foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2%, m/m), no equipamento IR Prestige-21 (SHIMADZU, Quito, Japão), na faixa de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, com resolução de 2 cm^{-1} e 64 scan/min. Os espectros obtidos foram avaliados frente aos espectros do fármaco puro, polímero e lecitina.

4.8 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas contendo PG (NPPG) e NP-C (sem PG) foram avaliadas em diferentes condições de armazenamento ao abrigo da luz em temperatura ambiente ($\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$), estufa ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$), geladeira ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 120 dias com leitura em 0, 30, 60 e 120 dias com avaliação das características físico-químicas como diâmetro de partícula, IPD e potencial zeta. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os resultados obtidos para cada condição de armazenamento foram analisados e comparados estatisticamente por ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni para um intervalo de confiança de 95%.

4.9 ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

4.9.1 Ensaio do perfil de liberação *in vitro*

O ensaio foi realizado seguindo adaptações de Shah e colaboradores (2013) e Abruzzo e colaboradores (2021). Para tanto, 2 mL da suspensão de NPPG, contendo a progesterona na concentração de $0,2\text{ mg.mL}^{-1}$, foram adicionados a um bécker contendo 8 mL de meio solução salina tamponada com fosfato (PBS) de pH 4,0 e 7,45 contendo 0,5 % (v/v) de Tween® 80. Posteriormente, foi homogeneizada e incubada em agitador orbital do tipo shaker a 100 rpm, à 37°C por 12 horas e ocluído para evitar a evaporação das amostras. Em intervalos pré-definidos (30 min, 1, 2, 4, 6, 8 e 12 horas), 1 mL da amostra foi retirado do meio e centrifugado por 14.000 rpm por 15 minutos. O mesmo volume retirado foi substituído com o meio de

análise com solução de PBS correspondente armazenado à 37°C para evitar flutuações térmicas e manter a condição *sink*. O sobrenadante foi filtrado por meio de filtros de nylon com tamanho de poro de 0,22 µm e quantificado em UHPLC, com método descrito anteriormente. A quantidade cumulativa (% cumulativo) da progesterona liberada das nanopartículas foi determinada em triplicata utilizando a Equação 7:

Equação (7)

$$\% \text{ Cumulativa} = \frac{\text{quantidade de fármaco liberado}}{\text{quantidade inicial do fármaco na nanopartícula}} \times 100$$

4.9.2 Cinética e mecanismo de liberação

Para a determinação do mecanismo de liberação da progesterona a partir das NPPG, os resultados *in vitro* foram ajustados aos modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell e Weibull. O ajuste dos dados experimentais ao modelo foi realizado por linearização e o R² ajustado foi usado como critério de seleção do modelo. Os resultados foram obtidos usando o software Sigma Plot ® 10.

4.10 ESTUDO DE DAS PROPRIEDADES MUCOADESIVAS *IN VITRO*

4.10.1 Análise de absorbância

As propriedades mucoadesivas por meio da análise da absorbância foram avaliadas por método descrito por Abruzzo et.al. (2021) com algumas modificações. A suspensão de NPPG foi misturada em shaker em 100 rpm na proporção 1:1 (v/v) com uma dispersão de mucina do Tipo II nas concentrações 0,1; 0,25 e 0,5 mg/mL e incubada à 37 °C por 2 horas. Posteriormente, 2 mL da mistura da NPPG e solução de mucina foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos. A mucina livre restante no sobrenadante foi determinada à 261 nm em espectrofotômetro UV-Vis e relacionada ao controle (mucina antes do contato com a NPPG). A análise foi realizada em

triplicata. A eficiência de ligação da mucina com a NPPG foi calculada usando a Equação 8.

Equação (8)

$$EE \text{ lig. (\%)} \left[\frac{ABS_{NP \text{ após do contato}} - ABS_{mucina}}{ABS_{NP \text{ após o contato}}} \right] \times 100$$

4.10.2 Análise da interação entre mucina e as nanopartículas a partir da análise do diâmetro de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

Foram preparadas soluções de mucina Tipo II nas concentrações 0,08; 0,1; 0,25 e 0,5 mg/mL em água ultrapura e na sequência adicionou-se 500 µL da suspensão de NPPG em 1500 µL da solução de mucina, as amostras foram homogeneizadas em *shaker*, por 2 horas, em 100 rpm e à 37 ° C. Os parâmetros de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta foram avaliados antes e após o contato das NPPG com diferentes concentrações de mucina, para avaliar a capacidade de interação da NPPG e a mucina. Todas as análises foram feitas em triplicata.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

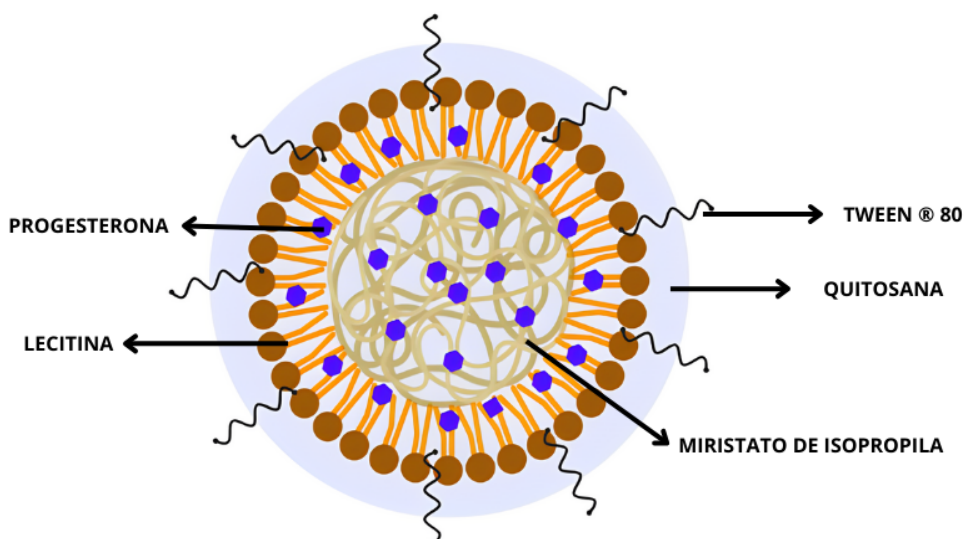
As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando a Análise de Variância (ANOVA) e com post-hoc de Tukey por meio dos programas Minitab[®] Statistical Software versão 22.1.0, Microsoft Excel 365[®] e OriginPro[®] 9.0 para nível de confiança de 95% (p< 0,05). O gráfico 3 D foi gerado pelo software Statistica[®].

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS PELO PLANEJAMENTO FATORIAL 3²

As nanopartículas híbridas automontadas de lecitina e quitosana carregadas com PG foram obtidas com sucesso pela técnica de automontagem por meio da interação entre grupos aminas da quitosana carregadas positivamente e grupos fosfatos da lecitina carregadas negativamente. A representação esquemática sugerida das nanopartículas híbridas está apresentada na Figura 10.

Figura 10 - Esquema ilustrativo das nanopartículas híbridas de lecitina e quitosana obtidas por automontagem.



Fonte: A autora.

Após o preparo apresentaram-se macroscopicamente como fluídos translúcidos característicos do efeito *Tyndall* em sistemas nanoestruturados (Toma 2016). Não foi observada a separação de fases ou a formação de precipitados nas formulações obtidas, exceto nas formulações dos experimentos 2, 5 e 8, onde foram claramente identificados aglomerados de lecitina. Isso pode ser devido ao aumento da concentração de lecitina em relação à quitosana, o que leva à neutralização do polímero e resulta em uma maior tendência de agregação da lecitina (Mehandole *et al.*, 2024).

A matriz completa do desenho experimental com os resultados obtidos para as variáveis dependentes através das execuções obtidas no planejamento fatorial está expressa em média $\pm$ desvio padrão na Tabela 6. A Tabela 7 representa um resumo da análise da regressão para as respostas observadas.

Tabela 6 - Matriz completa do Planejamento Fatorial 3² e seus resultados de tamanho, índice de polidispersão (IPD), potencial zeta (Zeta), EE e teor obtidos para as nanopartículas.

Experimento	Variável independente			Variável dependente				
	Quitosana (mg)	Lecitina (mg)	Progesterona (mg)	Tamanho (nm)	IPD	Zeta (mV)	EE (%)	Teor (%)
1	25	100	5	263,27 ± 3,40	0,306 ± 0,006	+27,5 ± 0,44	93,84 ± 0,02	1,02 ± 0,00
2	10	100	5	617,83 ± 4,28	0,857 ± 0,126	-12,67 ± 0,47	84,24 ± 8,00	0,95 ± 0,10
3	5	100	5	229,77 ± 2,51	0,271 ± 0,023	-29,00 ± 0,40	96,87 ± 0,03	1,10 ± 0,00
4	25	100	10	256,03 ± 3,82	0,335 ± 0,016	+19,93 ± 0,64	98,51 ± 1,03	2,12 ± 0,0
5	10	100	10	2385,33 ± 5,69	0,978 ± 0,038	+2,28 ± 0,08	86,18 ± 0,11	1,92 ± 0,0
6	5	100	10	430,33 ± 0,76	0,441 ± 0,011	-16,27 ± 0,67	61,49 ± 0,10	1,38 ± 0,0
7	25	100	20	366,43 ± 5,15	0,312 ± 0,012	+28,83 ± 0,31	61,83 ± 0,23	2,60 ± 0,0
8	10	100	20	851,60 ± 4,95	0,720 ± 0,004	-14,07 ± 0,60	62,42 ± 0,23	2,72 ± 0,0
9	5	100	20	248,57 ± 3,93	0,249 ± 0,002	-16,13 ± 0,32	58,1 ± 1,91	2,60 ± 0,1

Fonte: A autora.

Nota: N=3.

Diversos parâmetros afetam notavelmente as propriedades físico-químicas das nanopartículas, a otimização das condições experimentais representa uma etapa crítica do desenvolvimento do método de produção desses nanosistemas. O planejamento fatorial tem sido uma estratégia útil a fim de estimar por meio de cálculos estatísticos os parâmetros influentes envolvidos no preparo dessas formulações (Barros *et al.*, 2003; Alkholief, 2019; Mehandole *et al.*, 2024).

Sabe-se, por exemplo, que o diâmetro das partículas e o índice de polidispersão (IPD) das nanopartículas são influenciados pela concentração do fármaco e que nanopartículas híbridas, compostas por lecitina e quitosana em diferentes concentrações e proporções, são significativamente alteradas quando a proporção entre o polímero e o lipídio é modificada (Senyig *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2011; Alkholief 2019; Mehandole *et al.*, 2024).

Estudos relataram que a concentração de lecitina de 100 mg foi necessária para obter nanopartículas de menor tamanho e máximo de aprisionamento do fármaco (Ozcan *et al.*, 2013; Alkholief 2019; Dong *et al.*, 2020). Portanto, a concentração de lecitina de 100 mg foi mantida constante e a sua proporção com relação a quitosana (p/p) foi selecionada como uma variável independente para o experimento, sendo as proporções 4:1, 10:1 e 20:1 correspondendo à 25, 10 e 5 mg de quitosana respectivamente. A quantidade de fármaco foi selecionada como parâmetro da formulação para avaliar a capacidade máxima do sistema em carregar o fármaco selecionado com base nas concentrações observadas na literatura e ensaios prévios de formulação (Leimann *et al.*, 2015; Alkholief 2019; Correia *et al.*, 2020).

Os resultados apresentados na Tabela 7 indicam que os modelos quadráticos são eficazes para descrever e prever as influências nas respostas de IPD (R^2), Zeta (R^3) e Teor (R^5) com coeficientes de determinação (R^2) de 0,9582; 0,9331 e 0,9442 respectivamente, e erros padrão da estimativa baixos (0,0615 para IPD; 5,9496 para Zeta e 0,1843 para Teor). Esses valores sugerem que a maior parte da variabilidade observada nas respostas pode ser explicada pelos modelos propostos, destacando a sua adequação e robustez. Além disso, a proximidade entre os valores de R^2 ajustado e R^2 previsto para essas respostas refletem uma boa capacidade de generalização dos modelos, tornando-os ferramentas interessantes para entender e prever as influências sobre IPD, Zeta e Teor.

Tabela 7 - Resumo da análise de regressão para as respostas observadas.

Resposta	Modelo	R ²	R ² ajustado	R ² previsto	S
Tamanho (R1)	Quadrático	0,7017	0,6306	0,5312	403,475
IPD (R2)	Quadrático	0,9582	0,9483	0,9339	0,0615
Zeta (R3)	Quadrático	0,9331	0,9172	0,8923	5,9496
EE (R4)	Quadrático	0,7406	0,6788	0,5872	9,3365
Teor (R5)	Quadrático	0,9442	0,9309	0,9105	0,1843

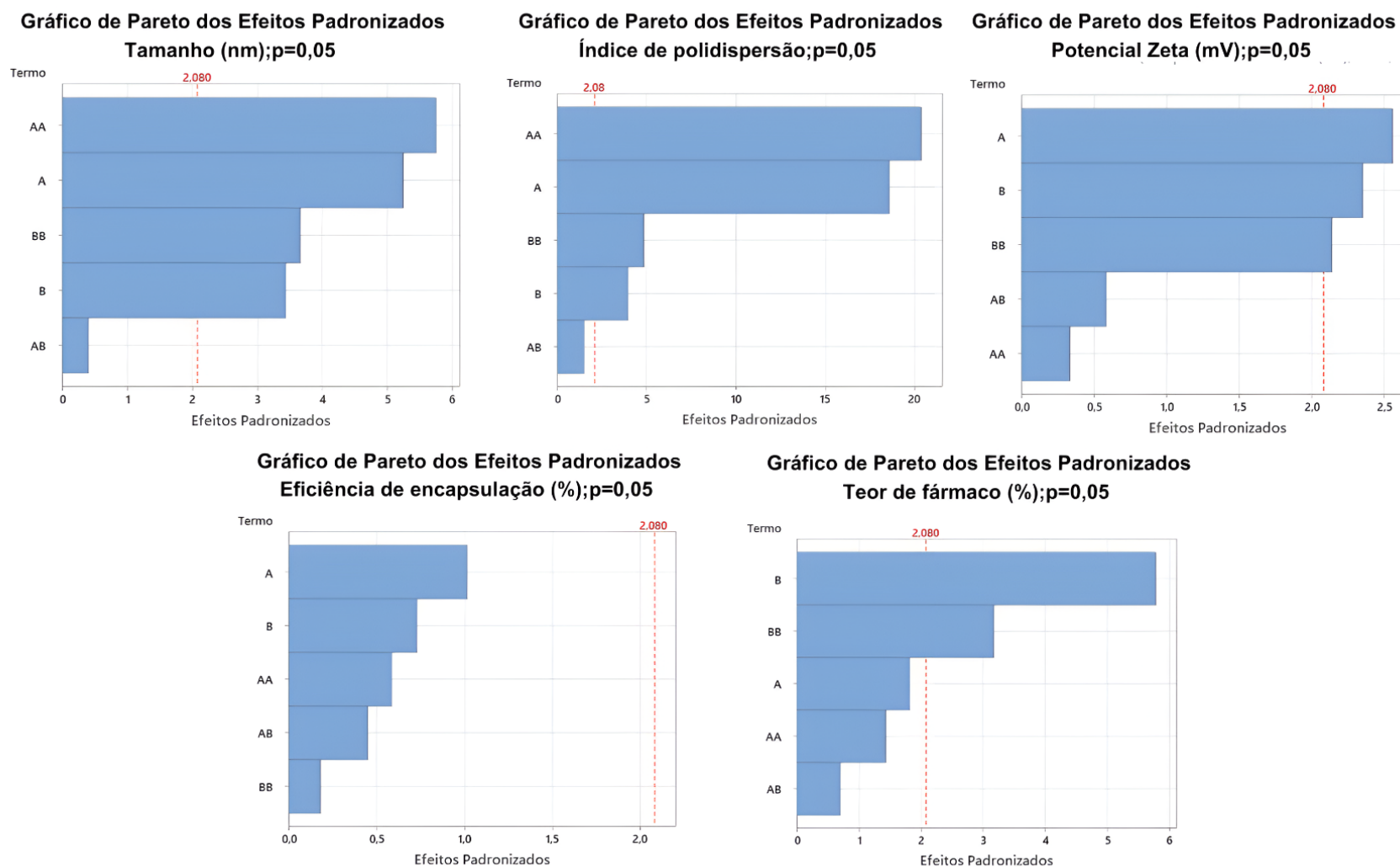
Fonte: A autora.

Nota: S = erro padrão da estimativa.

No entanto, para Tamanho (R1) e Eficiência de Encapsulação (EE, R4), os modelos apresentaram menor poder explicativo, com R² de 0,7017 e 0,7406, respectivamente, e maiores erros padrão da estimativa, sugerindo que outros fatores não incluídos nos modelos podem estar contribuindo para a variabilidade das respostas. Portanto, embora os modelos quadráticos sejam eficazes para IPD e Zeta, melhorias são necessárias para aprimorar a previsão de tamanho e eficiência de encapsulação.

Para avaliar e ilustrar a magnitude da influência das variáveis independentes, em três níveis, sobre as variáveis dependentes, foram construídos Gráficos de Pareto e Gráficos de Superfície de Resposta a partir dos resultados obtidos no planejamento fatorial aplicado, conforme ilustrado nas Figuras 11 e 12, respectivamente. O Gráfico de Pareto dos efeitos é um gráfico de barras de fácil interpretação. As barras que ultrapassam a linha de referência indicam a magnitude e a relevância dos efeitos sobre a variável dependente avaliada, conforme mostrado na Figura 11.

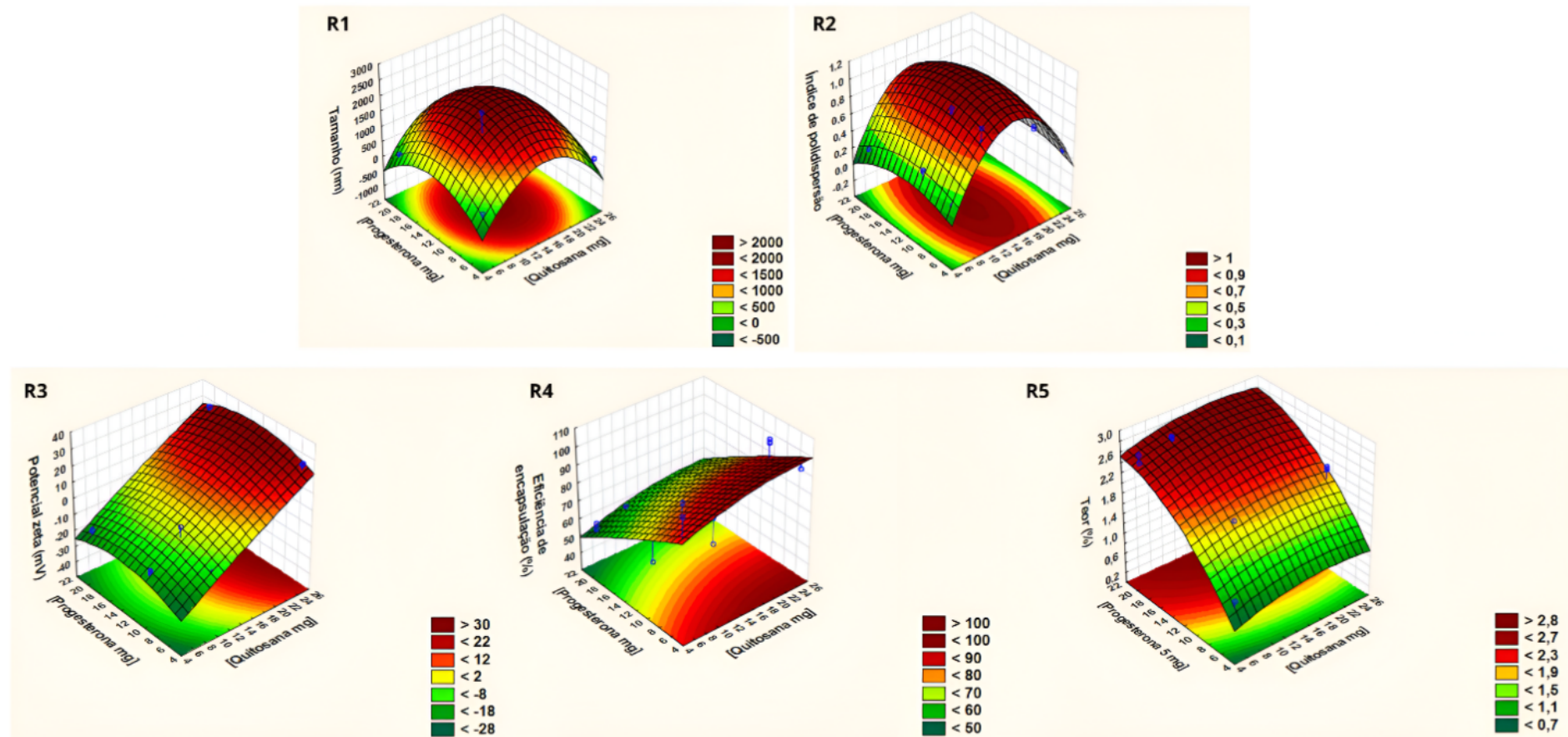
Figura 11 - Gráficos de Pareto dos efeitos para as variáveis dependentes no planejamento fatorial completo 3^2 .



Fonte: A autora.

Nota: (A)= quitosana; (B)= progesterona.

Figura 12 - Gráfico de Superfície de Resposta das variáveis do planejamento fatorial 3^2 das nanopartículas híbridas contendo progesterona.



Fonte: A autora.

Nota: R1= Tamanho (nm); R2= IPD; R3= Zeta (mV), R4= EE% e R5= Teor de fármaco.

Os resultados obtidos pelo planejamento fatorial 3^2 revelam uma complexa interação entre as variáveis independentes (quitosana e progesterona) e as variáveis dependentes (tamanho das partículas, IPD, potencial zeta, EE e teor). Os dados obtidos nos experimentos foram ajustados em equações polinomiais para as respostas observadas e a significância estatística dos efeitos causados pelas variações dos fatores estudados foi avaliada por ANOVA considerando $p < 0,05$. Estes resultados estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8 - Estimativa dos efeitos e valores de p (<0,05) (ANOVA) para a variáveis dependentes.

Variável independente	Tamanho de partícula (R1)		IPD (R2)		Potencial Zeta (R3)		EE (R4)		Teor (R5)	
	Coeficiente	p	Coeficiente	p	Coeficiente	p	Coeficiente	p	Coeficiente	p
Constante	-2768	0,000*	-0,7364	0,000*	-50,95	0,000*	85,1	0,000*	-0,446	0,144
Quitosana (A)	386,3	0,000*	0,2088	0,000*	2,78	0,019*	1,73	0,322	0,0613	0,084
Progesterona (B)	307,0	0,002*	0,0542	0,001*	3,09	0,029*	-1,50	0,475	0,2355	0,000*
AB	0,59	0,690	0,000334	0,151	-0,0126	0,567	-0,0152	0,658	-0,000466	0,494
A ²	-13,12	0,000*	-0,007093	0,000*	-0,0113	0,742	-0,0309	0,565	-0,00150	0,167
B ²	-12,28	0,001*	-0,002480	0,000*	-0,1057	0,045*	-0,0140	0,859	-0,00485	0,005*

Fonte: A autora.

Nota: *p<0,05.

5.1.1 Tamanho de Partícula

Ao analisar os dados do Gráfico de Pareto (Figura 11), em conjunto com o gráfico de Superfície de Resposta (Figura 12) e a Tabela 8, observa-se que o tamanho das partículas é significativamente influenciado pela concentração de quitosana ($p < 0,05$). Tanto as concentrações mais altas (25 mg) quanto as mais baixas (5 mg) de quitosana resultaram na formação de partículas significativamente menores, como observado nos resultados de experimentos 1, 3, 4, 6, 7 e 9 apresentados na Tabela 7 e na curvatura do gráfico de superfície resposta observado na Figura 12-R2.

Conforme ilustrado na Figura 12, o aumento da concentração de quitosana no sistema provoca uma redução na proporção entre lecitina e quitosana para 4:1, o que torna as cargas opostas dessas moléculas quase equivalentes. Isso intensifica a interação eletrostática entre elas, facilitando a formação de estruturas mais compactas e, conseqüentemente, menores (Alkoholief, 2019).

No entanto, quando a proporção de lecitina em relação à quitosana é aumentada para 20:1, ou seja, utilizando 5 mg de quitosana (experimentos 3, 6 e 9), as interações eletrostáticas entre os componentes diminuem. Esse efeito ocorre porque a quantidade de grupos fosfato carregados negativamente da lecitina aumenta, enquanto a quantidade de grupos amina da quitosana permanece constante nas amostras (Fereng *et al.*, 2021). Nessa condição, a elevada carga negativa da lecitina reduz a probabilidade de interação entre suas próprias moléculas, inibindo a formação de agregados.

Esse comportamento contrasta com o observado nas amostras contendo 10 mg de quitosana (experimentos 2, 5 e 8), onde a proporção de 10:1 resultou em diâmetros de partícula maiores. Esses resultados estão de acordo com os dados reportados na literatura para sistemas semelhantes, onde concluíram que proporções de lecitina e quitosana de 4:1 e 20:1 foram as melhores para obter nanopartículas estáveis (Sonvico *et al.*, 2006; Fereng *et al.*, 2021; Mehandole *et al.*, 2024).

Com base nos resultados, observa-se que a concentração de progesterona também exerce uma influência significativa sobre o tamanho das partículas obtidas ($p < 0,05$). O coeficiente positivo de 307,0 apresentado na Tabela 8 para a progesterona indica que existe uma relação diretamente proporcional entre a

concentração do fármaco e o tamanho das partículas obtidas. Em outras palavras, formulações com concentrações mais altas de progesterona resultaram em partículas de tamanho maior em comparação com as mesmas formulações contendo concentrações mais baixas do fármaco ($p < 0,05$), conforme mostrado no experimento 7, 8 e 9. Isso pode ser explicado pelo fato de que, ao aumentar a concentração de progesterona, há um aumento na massa total de material encapsulado, o que pode promover a formação de partículas maiores devido ao maior volume de núcleo a ser envolto pela matriz polimérica (Tan *et al.*, 2011; Alkholief, 2019; Deng *et al.*, 2020; Mehandole *et al.*, 2024) ou causado pela agregação do excesso de fármaco não aprisionado (Sonvico *et al.*, 2006; Bhatia, 2016; Fereng *et al.*, 2021; Mehandole *et al.*, 2024).

5.1.2 Índice de Polidispersão (IPD)

Tão relevante quanto a determinação do tamanho médio das partículas é a avaliação da sua dispersão, expressa pelo Índice de Polidispersidade (IPD). Um IPD inferior a 0,5 é indicativo de maior homogeneidade e estabilidade das nanopartículas (Bhatia, 2016; Mehandole *et al.*, 2024). Conforme observado na Tabela 6, os valores de IPD das nanopartículas variaram de $0,249 \pm 0,002$ (experimento 9) a $0,978 \pm 0,038$ (experimento 5).

As formulações com proporções de lecitina e quitosana de 4:1 e 20:1 apresentaram IPDs menores e comportamento monodisperso ($<0,5$) como pode ser analisado na Figura 12-R2, o que sugere uma influência positiva da concentração de quitosana e das interações eletrostáticas entre os grupos fosfato da lecitina e os grupos amina da quitosana na redução da polidispersidade (Sonvico *et al.*, 2006; Alkholief, 2019; Fereng *et al.*, 2021; Mehandole *et al.*, 2024).

Em determinadas proporções de lecitina e quitosana, a presença quase equivalente de grupos catiônicos e aniônicos pode preservar uma distribuição de tamanho mais estreita, como observado para os experimentos 1, 4 e 7 que continham 25 mg de quitosana. No entanto, quando predomina um tipo de carga, as nanopartículas apresentam distribuições de tamanho mais amplas, o que compromete a homogeneidade do sistema, como demonstrado no estudo de Murthy *et al.* (2020). Por outro lado, a proporção intermediária de 10:1 (lecitina:quitosana) com 10 mg de quitosana resultou em IPDs mais elevados ($0,857 \pm 0,126$; $0,978 \pm$

0,038; $0,720 \pm 0,004$), indicando uma menor homogeneidade e estabilidade dessas formulações. Esses resultados corroboram com as observações macroscópicas de formação de agregados na nanoformulação, assim como os dados de tamanho de partícula, que indicaram a presença de partículas maiores, evidenciando maior instabilidade nas formulações dos experimentos 2, 5 e 8. Além disso, verificou-se que, em proporções menores, o aumento da concentração de progesterona também contribuiu para o aumento do IPD, indicando uma menor uniformidade das partículas formadas.

5.1.3 Potencial Zeta (PZ)

O potencial zeta (PZ) é uma medida quantitativa de carga elétrica superficial e um importante indicador de estabilidade elétrica de partículas em suspensão. Quanto maior for o PZ (± 30 mV) maiores são as interações repulsivas entre as partículas e menor é a força de atração entre elas, o que leva à formação de partículas mais estáveis, porque evita a sua agregação (Schaffazick *et al.*, 2003; Bhatia, 2016; Deng *et al.*, 2020).

Com base nos resultados apresentados, é evidente que a proporção de lecitina e quitosana exerce uma influência significativa no PZ das nanopartículas. As nanopartículas formam-se principalmente por meio de interações eletrostáticas, especialmente em um pH ácido (4,5 - 5,0). Nesse ambiente, os grupos amina da quitosana (com pKa aproximadamente 6,2) tornam-se protonados, enquanto os grupos fosfato da lecitina (com pKa em torno de 1,5) adquirem uma carga negativa intensa. Portanto, a carga superficial das nanopartículas depende diretamente do pH do meio e da proporção entre quitosana e lecitina. Para padronizar as condições experimentais, o pH da formulação foi ajustado para um intervalo fixo de 4,5 a 5,0, conforme indicado em estudos anteriores (Sonvico *et al.*, 2006; Senyigit *et al.*, 2010; Murthy *et al.*, 2020).

A variação do PZ observada nas formulações é um reflexo direto das diferenças nas interações eletrostáticas entre seus componentes. Formulações com uma proporção de lecitina:quitosana de 4:1, que contêm uma concentração elevada de quitosana, exibiram um PZ positivo. Isso se deve à predominância dos grupos amina protonados da quitosana, que conferem uma carga positiva à superfície das nanopartículas. Em contraste, formulações com menor concentração de quitosana e

maior proporção de lecitina, como a proporção de 20:1 com 5 mg de quitosana, apresentaram um PZ mais negativo (Murthy *et al.*, 2020; Fereng *et al.*, 2021). Quando a proporção de lecitina atingiu 10:1 (experimento 2,5 e 8), o potencial zeta se aproximou da neutralidade ($-12,67 \pm 0,47$; $+2,28 \pm 0,08$; $-14,07 \pm 0,60$), o que favoreceu a agregação das nanopartículas devido à redução das forças repulsivas entre elas. Esse fenômeno levou ao aumento do tamanho das nanopartículas, sugerindo uma instabilidade nas formulações em que o potencial zeta se aproxima de zero que colaboram com a formação de aglomerados observados na análise macroscópica da formulação e com os resultados de tamanho e IPD. Esses resultados se mostram congruentes com estudos de Sonvico *et al.*, 2006 e Murthy *et al.*, 2020, em que também realizaram a análise da variância entre as proporções da lecitina e quitosana sobre o tamanho, IPD e Zeta e observaram que proporção equivalentes e proporções maiores sobre um e outro até determinado ponto pode resultar em nanopartículas com características mais satisfatórias.

Além disso, a presença de progesterona contribuiu para o aumento do potencial zeta das nanopartículas, tornando-as mais positivas, o que foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$). A carga positiva residual das amostras do experimento 1, 4 e 7 sugerem o aprisionamento da progesterona na matriz lipídica, que está recoberta pela matriz polimérica de quitosana, formada e estabilizada por interações iônicas, conferindo às nanopartículas propriedades mucoadesivas (Sonvico *et al.*, 2006; Murthy *et al.*, 2020; Fereng *et al.*, 2021).

5.1.4 Eficiência de Encapsulação (EE%)

Quanto à eficiência de encapsulação (EE%), os resultados obtidos demonstram que o nanosistema foi eficaz para encapsular a progesterona, apresentando altas taxas de encapsulação que variaram de $58,1 \pm 1,91\%$ a $98,51 \pm 1,03\%$. Observou-se, no entanto, que a EE% diminuiu com o aumento da concentração de progesterona (Tabela 8), sugerindo uma saturação do sistema. Isso indica que existe um limite na quantidade de fármaco que a matriz híbrida de lecitina e quitosana é capaz de encapsular eficientemente, com uma tendência maior de EE% em formulações com concentrações menores de fármaco ($p < 0,05$), embora o Gráfico de Pareto (Figura 11) indique que o efeito da concentração de fármaco não foi estatisticamente significativo. Dessa forma, as nanopartículas devem ser

preparadas com base numa razão princípio ativo/ lipídio/ polímero adequada à obtenção de uma eficiência de encapsulação elevada (Souto *et al.*, 2012).

Os sistemas híbridos formados por lecitina e quitosana demonstraram altas taxas de eficiência de encapsulamento (EE) em estudos anteriores, como 73% para o cloridrato de raloxifeno (Murthy *et al.*, 2020), 84,72% para o dasatinibe (Mehandole *et al.*, 2024), e 88,27% e 66,72% para o tacrolimus (Fereng *et al.*, 2021). Os resultados deste trabalho apresentaram uma EE de progesterona superior ao obtido por Sonvico *et al.* (2006), onde os autores relataram uma EE da progesterona variando de $62,4 \pm 5,3\%$ a $18,2 \pm 1,1\%$ para diferentes proporções de lecitina e quitosana. Apesar de termos utilizado a mesma metodologia para a obtenção das nanopartículas e mesmo fármaco, nossos resultados sugerem que a adição de Tween® 80 e miristato de isopropila favoreceu a dissolução do fármaco no núcleo lipídico das nanopartículas, resultando em uma maior EE, mesmo utilizando menos agentes encapsulantes que o referido trabalho. Uma vez que à inclusão de tensoativos e co-tensoativos no processo de obtenção de nanopartículas, como utilizados nesse trabalho, demonstrou eficácia na EE e em outros estudos (Senyigit *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2011).

Além disso, é importante destacar que, diferentemente de Sonvico *et al.* (2006), que propuseram o uso das nanopartículas para administração oral, o presente estudo visa a aplicação vaginal da progesterona, o que representa uma abordagem inovadora e potencialmente mais eficaz para a liberação direta do fármaco na mucosa vaginal, favorecendo a ação terapêutica local e reduzindo efeitos sistêmicos indesejados (Almomen *et al.*, 2015; Hoang *et al.*, 2019; Salem *et al.*, 2019).

5.1.5 Teor de Fármaco

Em contrapartida, o coeficiente positivo (0,0613) para quitosana no teor de fármaco, com p de 0,084, sugere uma tendência de aumento do teor de fármaco com o aumento da concentração de quitosana, mas sem significância estatística, assim como a sua interação com a progesterona e seu efeito quadrático ($p > 0,05$). Dessa forma, a quitosana pode estar contribuindo na encapsulação, mas o seu impacto direto no teor de fármaco não foi comprovado pelo modelo matemático empregado.

A variável progesterona (B) apresentou um coeficiente significativo para o teor de fármaco (0,2355, $p < 0,001$), indicando que a quantidade de progesterona influencia diretamente o teor de fármaco encapsulado. Este resultado era esperado, uma vez que a progesterona é o princípio ativo do sistema, e o aumento em sua concentração tende a resultar em maior quantidade encapsulada. Esse comportamento confirma a relação entre a disponibilidade do fármaco e sua eficiência de encapsulação.

Além disso, o efeito quadrático da progesterona também foi significativo ($p = 0,005$), mas com coeficiente negativo (-0,00485). Esse dado sugere que, em concentrações muito elevadas de progesterona, o teor de fármaco encapsulado pode começar a declinar. Tal comportamento pode ser explicado por uma possível saturação do sistema, em que o excesso de progesterona ultrapassa a capacidade de encapsulação das nanopartículas, ou por interações físico-químicas indesejáveis, como a agregação de partículas ou a alteração na estabilidade do sistema. Esses fatores resultam em uma encapsulação menos eficiente nas amostras com maiores concentrações de progesterona, o que corrobora com os menores valores de eficiência de encapsulamento (EE) observados nessas condições.

5.1.6 Nanopartícula Otimizada

A otimização de resposta é uma ferramenta estatística possível após a realização do planejamento fatorial que permite concluir qual o melhor nível de variação entre os fatores escolhidos (Quitosana e Progesterona) que otimiza a variável resposta conforme o objetivo desejado. A fim de garantir o resultado, deve ser considerado o valor de desejabilidade (d), um índice global que varia de 0 a 1 e é calculado a partir da combinação de cada uma das variáveis resposta do planejamento fatorial (Asif *et al.*, 2022).

A nanopartícula otimizada neste estudo, foi definida como aquela que resulte no menor diâmetro médio (preferencialmente < 500 nm), homogeneidade de tamanho de partículas ($PDI < 0,5$), maior carga superficial (potencial Zeta $> |30|$ mV) e alta EE e teor (Schaffazick *et al.*, 2003; Bhatia, 2016; Deng *et al.*, 2020; Puri *et al.*, 2022).

Nesse contexto, visando à maximização do PZ (potencial zeta positivo residual), da eficiência de encapsulamento (EE) e do teor, bem como à minimização

do diâmetro médio e do índice de polidispersidade (PDI), foi possível, com o auxílio do *Design of Experiments* (DoE), obter respostas otimizadas através da formulação apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 - Otimização da resposta obtida através do Planejamento Fatorial para as nanopartículas.

<i>d</i>	Quitosana (mg)	Progesterona (mg)	Tamanho de partícula (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	EE (%)	Teor (%)
0,862758	25	10	256,033	0,3353	+19,93	98,51	2,12

Fonte: A autora.

A formulação otimizada apresentou um índice de desejabilidade (*d*) elevado (0,862758), indicando que o modelo matemático proposto foi capaz de gerar uma combinação de parâmetros que atende bem aos critérios definidos pelo planejamento fatorial, resultando em uma formulação com características físico-químicas desejáveis. Além disso, os resultados demonstram a obtenção de nanopartículas com tamanho nanométrico, monodispersas ($PDI < 0,5$), potencial zeta positivo e altas taxas de encapsulamento do fármaco. Essas são características consideradas satisfatórias para sistemas nanoparticulados (Schaffazick *et al.*, 2003; Murthy *et al.*, 2020; Shah *et al.*, 2022). A Tabela 10 apresenta a composição da nanopartícula otimizada.

Tabela 10 - Formulação otimizada de nanopartículas híbridas lecitina-quitosana contendo progesterona (NPPG).

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO
FASE AQUOSA	
Tween® 80	230 mg (0,5% m/v)
Sol. Quitosana 1% (m/v)	25 mg (2,5 mL)
Água ultrapura	43,50 mL
FASE ETANÓLICA	
Miristato de isopropila	100 mg (2,5% m/v)
Lecitina	100 mg
Progesterona	10 mg
Etanol com 10% de DMSO	4 mL

Fonte: A autora.

A nanoformulação otimizada (NPPG) foi então preparada e caracterizada para as cinco variáveis respostas. Os valores experimentais e previstos pelo modelo

estatístico das respostas para as variáveis dependentes foram comparados e o erro absoluto e percentual foi calculado, podendo ser observado na Tabela 11. A formulação otimizada foi preparada em triplicata e expressa em média $\pm$ desvio padrão. A Figura 13 apresenta a análise macroscópica da nanopartícula otimizada (NPPG) e a NP-C.

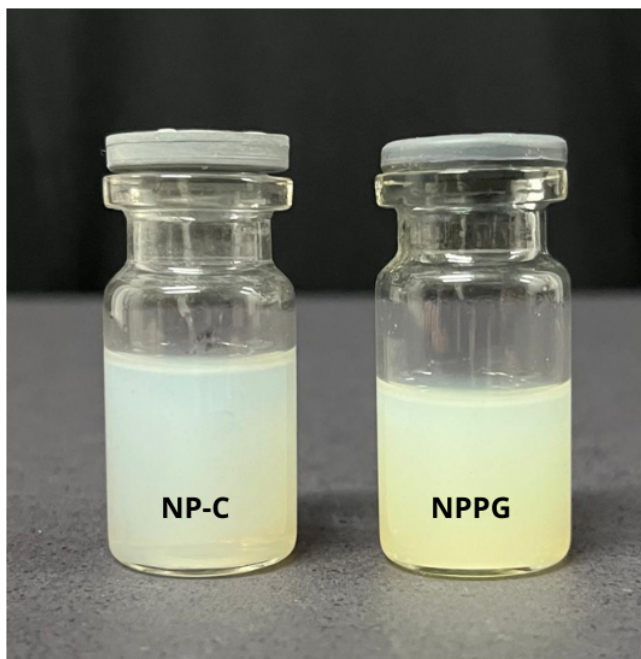
Tabela 11 - Nanopartícula otimizada (NPPG) com valores experimentais e previstos pela análise do planejamento fatorial e erro absoluto e percentual.

Variáveis dependentes	Valores experimentais	Valores previstos	Erro absoluto	Erro porcentual (%)
Tamanho de partícula (nm)	227,23 $\pm$ 9,92	256,033	-28,80	-11,25
PDI	0,36 $\pm$ 0,04	0,3353	0,0247	7,37
Potencial zeta (mV)	21,53 $\pm$ 0,99	19,93	1,6	8,02
EE (%)	97,35 $\pm$ 1,99	98,51	-1,16	-1,18
Teor (%)	2,09 $\pm$ 0,04	2,12	-0,03	-1,41

Fonte: A autora.

Nota: N=3.

Figura 13 - Aspecto macroscópico das nanopartículas híbridas otimizadas contendo progesterona (NPPG) e sem progesterona (NP-C).



Fonte: A autora.

Os resultados indicam que os valores experimentais para o tamanho de partícula, índice de polidispersidade (PDI), potencial zeta, eficiência de encapsulamento (EE) e teor estão muito próximos dos valores previstos pela análise do planejamento fatorial, demonstrando uma excelente concordância entre os dados experimentais e os modelos preditivos. Apesar da pequena discrepância observada entre os valores experimentais e previstos para as respostas dependentes, os resultados não apresentaram diferença estatística ($p>0,05$), sugerindo que o modelo de planejamento fatorial é eficaz para otimizar a formulação de nanopartículas.

Esses resultados reforçam o potencial do planejamento fatorial como uma ferramenta robusta para a otimização de sistemas nanoparticulados, pois permite produzir um máximo de informações por meio de um mínimo de experimentos e gastos, o que o torna uma abordagem racional e eficiente na previsão de propriedades críticas para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas (Barros, *et al.*, 2003), logo é de grande utilidade na área de produção de nanopartículas (Alkholief 2019; Mehandole *et al.*, 2024).

Para fins de comparação, a NPPG foi analisada em relação a uma nanopartícula controle (NP-C), que não continha fármaco em sua formulação, considerando-se um nível de significância de $p<0,05$. Os resultados da caracterização físico-química da NP-C estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Caracterização físico-química da nanopartícula controle (NP-C).

Amostra	Tamanho (nm) $\pm$ DP	IPD $\pm$ DP	Potencial Zeta (mV) $\pm$ DP
NP-C	302,27 $\pm$ 6,92 *	0,30 $\pm$ 0,01	+18,73 $\pm$ 0,35

Fonte: A autora.

Nota: N=3; * $p<0.05$

A ausência de diferença significativa no PDI e potencial zeta ($p>0,05$) entre a nanopartícula controle (NP-C) e a nanopartícula contendo progesterona (NPPG) indica que a encapsulação do fármaco não alterou as propriedades físico-químicas do sistema. Esses resultados mostram que a matriz de lecitina e quitosana manteve a estabilidade coloidal, sem prejudicar a uniformidade ou aumentar a variabilidade do tamanho das partículas. Além disso, a estabilidade do potencial zeta sugere que a carga superficial das nanopartículas não foi afetada pela presença da progesterona, o que é fundamental para evitar a agregação e manter a dispersão

adequada das partículas (Schaffazick *et al.*, 2003; Murthy *et al.*, 2020; Fereng *et al.*, 2021).

Foi observada uma leve redução no diâmetro médio das nanopartículas contendo progesterona em relação à formulação controle, possivelmente devido à formação de um núcleo oleoso mais compacto. Como a progesterona é lipofílica, sua presença pode ter favorecido uma organização mais eficiente no interior da fase lipídica, resultando em partículas menores, sem afetar a estabilidade da superfície (Abruzzo *et al.*, 2021). Assim, a presença da PG não comprometeu a integridade estrutural da nanopartícula, preservando seu potencial como sistema de liberação da PG.

Após a obtenção da nanopartícula otimizada de progesterona (NPPG), buscou-se aprimorar seu processo de produção. Para isso, avaliou-se a necessidade do uso da centrifugação, comparando os resultados de caracterização físico-química da NPPG obtida com e sem esse procedimento. Os dados resultantes dessa análise estão apresentados na Tabela 13.

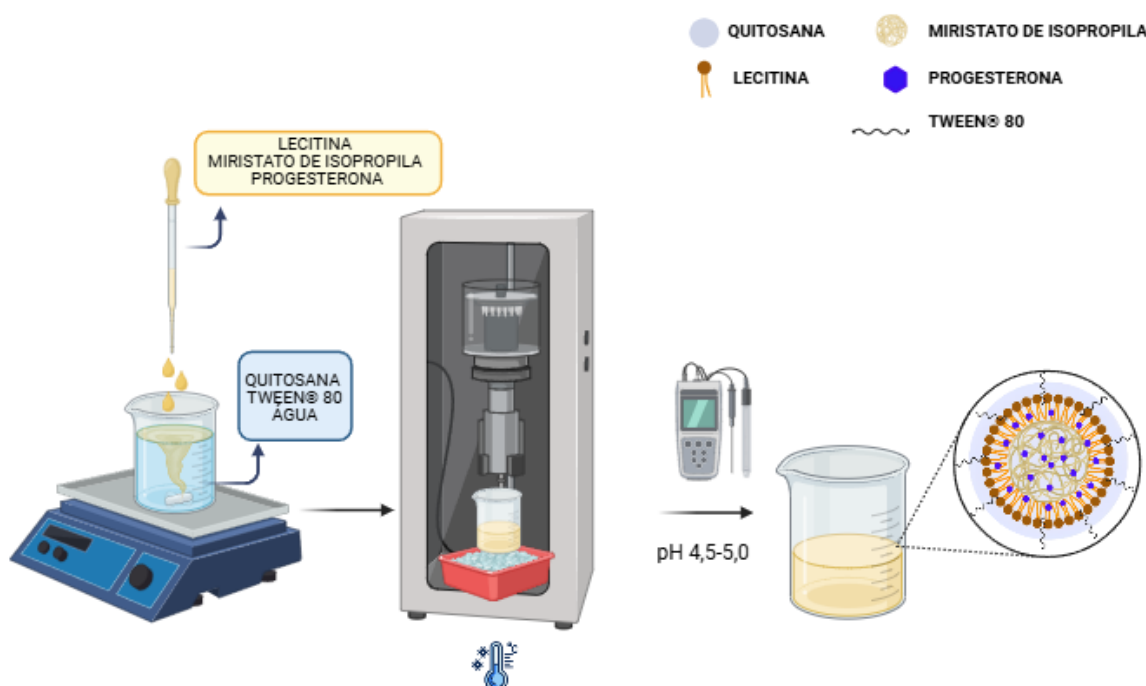
Tabela 13 - Caracterização físico-química da NPPG com e sem centrifugação.

Amostra	Tamanho (nm)± DP	IPD± DP	Potencial Zeta (mV)± DP
NPPG- com centrifugação	227,23 ± 9,92	0,36 ± 0,04	+21,53 ± 0,99
NPPG- sem centrifugação	230,01 ± 7,63	0,39 ± 0,093	+20,4 ± 0,20

Fonte: A autora.

Ao comparar os resultados, observou-se que os valores obtidos com e sem o uso da centrífuga eram semelhantes, indicando que essa etapa não impactou significativamente as características físico-químicas da NPPG e, portanto, não era essencial para o processo. Além disso, a remoção dessa etapa contribui para a simplificação do método, reduzindo o tempo de produção e os custos operacionais. Dessa forma, optou-se pela remoção dessa etapa no processo produtivo. A Figura 14 apresenta o esquema otimizado do método para a obtenção da NPPG.

Figura 14- Esquema do método para a obtenção das nanopartículas híbridas contendo progesterona após otimização (NPPG).



Fonte: A autora.

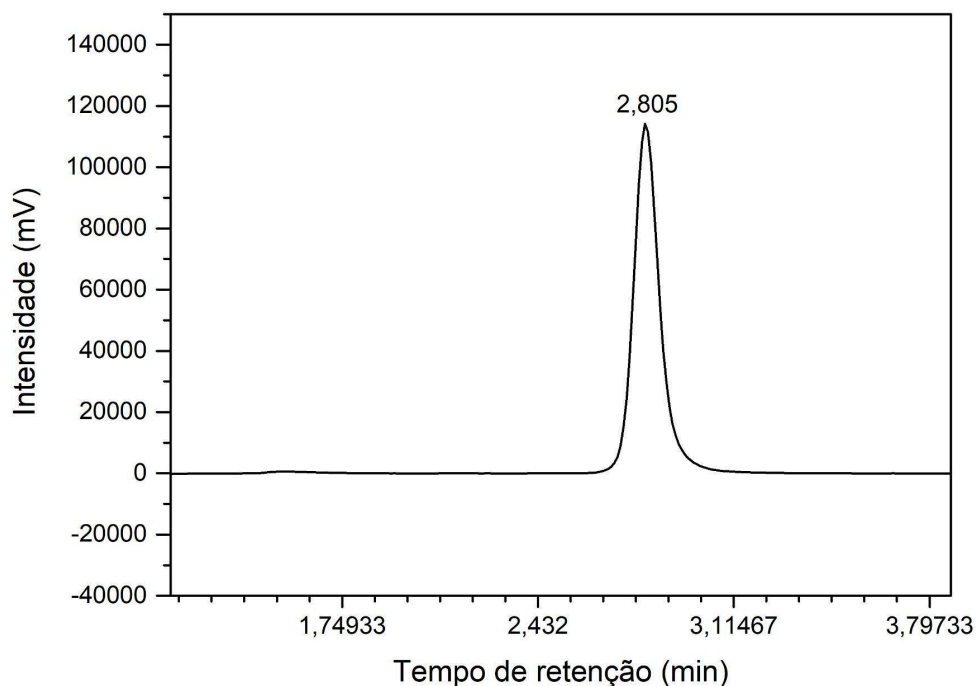
Com base nesses achados, a NPPG foi selecionada para prosseguir com as análises adicionais de caracterização e os estudos *in vitro* posteriormente.

5.2 DETERMINAÇÃO DE PROGESTERONA INCORPORADAS NAS NANOCÁPSULAS

Após pesquisas na literatura onde também realizaram a quantificação da progesterona em nanopartículas e a realização de corridas em gradiente exploratório, a fase móvel isocrática foi estabelecida utilizando metanol: água (85:15 v/v) com fluxo de 1 mL/min, temperatura ambiente e comprimento de onda de 246 nm, sendo essas condições definidas como padrão para as demais análises, conforme a Tabela 5 (Yuan *et al.*, 2007; Elgindy; Mehanna; Mohyeldin, 2016).

Dessa forma, uma melhor resolução cromatográfica foi obtida, detectando o pico do fármaco em 2,805 min em 5 minutos de corrida, o que é adequado para análises de rotina – Figura 15 e Tabela 5.

Figura 15 - Cromatograma de CLUE correspondente ao padrão de Progesterona (50 µg/mL).



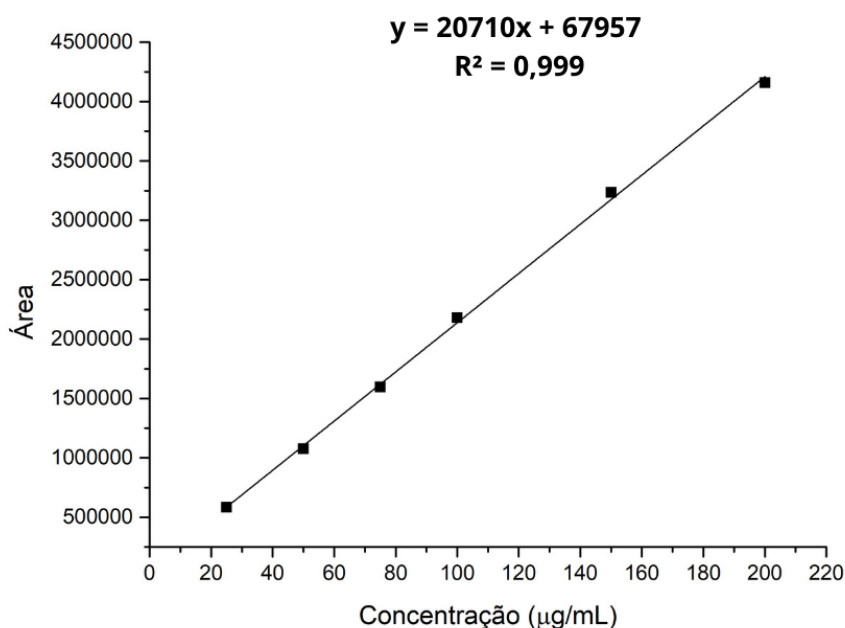
Fonte: A autora.

Nota: Fase móvel: metanol e água (85:15 v/v); Fluxo: 1 mL/min; Comprimento de onda de detecção: 246 nm; Temperatura da coluna: (25 ± 2 °C) e volume de injeção: 5 µL.

5.2.1 Linearidade

A linearidade de um método compreende a capacidade do mesmo em obter respostas proporcionais à concentração do analito de análise. A determinação da linearidade do método foi realizada através da análise da área sob a curva de seis soluções padrão de progesterona no intervalo de 25 a 200 µg/ mL. A partir dos resultados da curva analítica foi gerado um coeficiente de correlação de 0,9988, o que comprova a linearidade do método no intervalo de concentração utilizado. A equação linear obtida pelo método foi $y = 20710 x + 67957$ ($n = 4$) (Figura 16).

Figura 16- Representação gráfica da curva analítica padrão para a determinação da progesterona dongobtida por CLUE na faixa de concentração de 25 a 200 µg/mL (n = 4).



Fonte: A autora.

A análise de variância ANOVA para a linearidade do método está representada na Tabela 14. Além do valor do coeficiente de regressão, foi realizado o teste para falta de ajuste que avalia a variação dos valores residuais. O valor de F obtido para o modelo de regressão é superior que o valor de F tabelado (F_{tab}), para intervalo de confiança de 95%, estando em concordância com a significância da falta de ajuste, onde o F foi menor que o F tabelado (F_{tab}) portanto a regressão linear não apresentou falta de ajuste na linearidade do método.

Tabela 14 - Resultados de ANOVA para a linearidade do método.

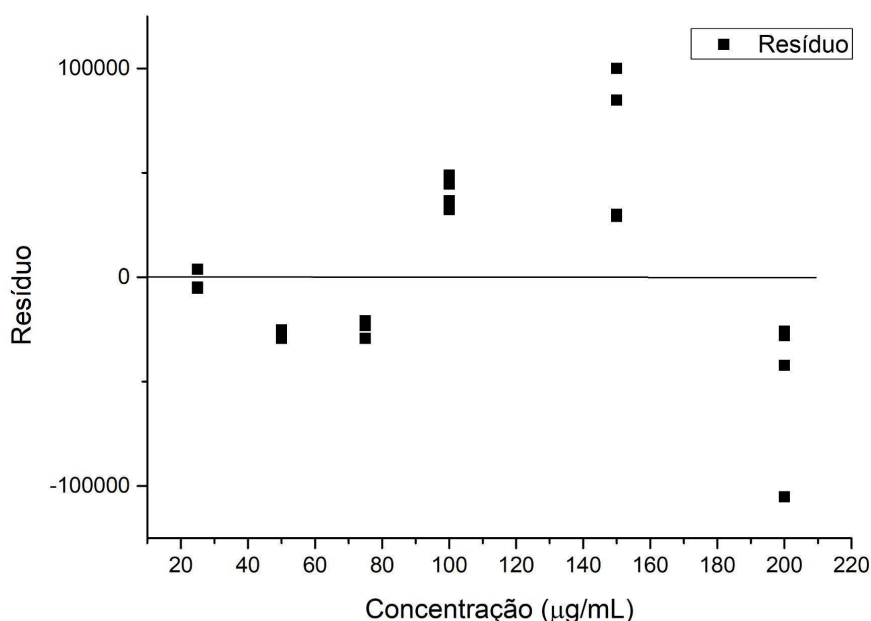
	SQ	GL	MQ	F	F_{Tab}
Modelo	$3,65 \cdot 10^{13}$	1	$3,65 \cdot 10^{13}$	17697,03	4,30
Resíduo	$4,53 \cdot 10^{10}$	22	$2,06 \cdot 10^9$	Linear	
Falta de ajuste	$8,55 \cdot 10^9$	4	$2,14 \cdot 10^9$	1,05	2,93
Erro puro	$3,68 \cdot 10^{10}$	18	$1,59 \cdot 10^{12}$	Não há falta de ajuste	

Fonte: A autora.

Nota: SQ= soma quadrática; GL= graus de liberdade; MQ= média quadrática; F = valor de F calculado do teste; F_{Tab} = valor de F tabelado.

Com o objetivo de demonstrar que y realmente varia em função de x foi necessário avaliar que a variação devida à regressão é suficientemente maior que a dos erros (resíduos). Desta forma, a Figura 17 demonstra o gráfico dos resíduos, onde foi possível observar pela análise visual que os resíduos são independentes e homogeneamente distribuídos em função da média, garantindo a confiabilidade da resposta gerada pelo método demonstrando distribuição homocedástica.

Figura 17 - Representação gráfica dos resíduos obtidos para cada réplica das concentrações das curvas analíticas.



Fonte: A autora.

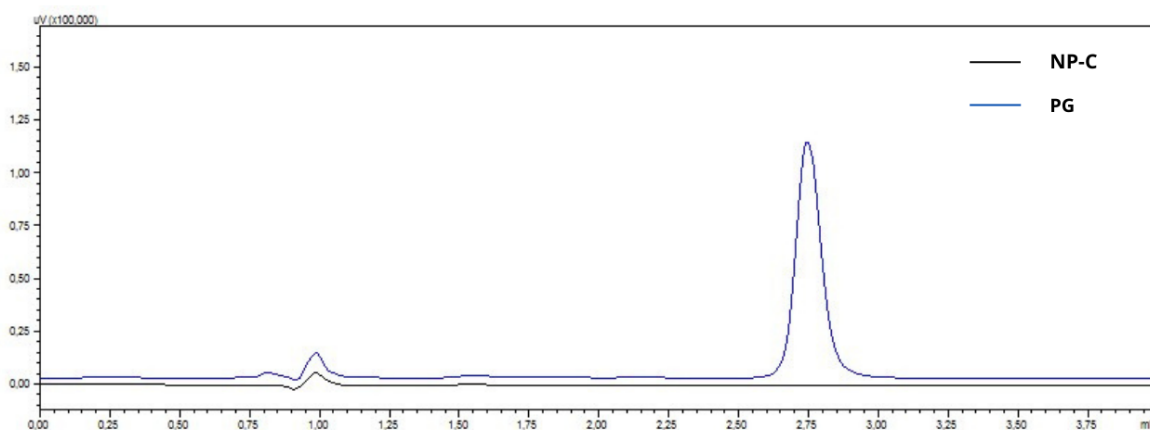
5.2.2 Seletividade

A seletividade deve assegurar a capacidade do método de identificar ou quantificar a substância em estudo, em meio a qualquer outro componente que não se tenha interesse, como impurezas, diluentes e componentes de matriz. Além de assegurar resultado positivo para o analito e negativo para as demais substâncias. Esse parâmetro certifica que a resposta gerada como resultado seja exclusiva da amostra de interesse, logo, nesse estudo a progesterona (Brasil, 2017).

O método desenvolvido para quantificação de progesterona mostrou-se seletivo e o detector de arranjo de diodos indicou que o pico cromatográfico da progesterona não apresentou interferentes, já que não houve sobreposição de

leitura da formulação controle (NP-C) no tempo de retenção da progesterona (Figura 18), indicando que nenhum componente da formulação apresentou absorção neste intervalo de comprimento de onda.

Figura 18 - Cromatograma das nanopartículas brancas em comparação com o cromatograma da progesterona (PG) para análise de seletividade.



Fonte. A autora.

5.2.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Com os dados provenientes da avaliação de linearidade foram calculados os limites de detecção e de quantificação, por meio das Equações 1 e 2, respectivamente. O LD refere-se a menor concentração do analito que o método é capaz de detectar, enquanto o LQ é a menor quantidade de substância que o método é capaz de quantificar com precisão e exatidão (Brasil, 2017). Os valores de LD e LQ foram calculados com base nos parâmetros de quatro curvas analíticas.

O LD e LQ encontrados foram, respectivamente 1,34 e 4,07 $\mu\text{g/mL}$ de progesterona. Esses valores asseguram a sensibilidade do método em quantificar quantidades pequenas do fármaco, garantindo a viabilidade de aplicação do método dentro da faixa de trabalho escolhida. A partir disso, é possível afirmar que o método cromatográfico é adequado para detectar e quantificar a progesterona na faixa de concentração de 25 - 200 $\mu\text{g/mL}$. A Tabela 15 resume os parâmetros da curva analítica.

Tabela 15 - Parâmetros da curva analítica da progesterona.

Linearidade	
Faixa de trabalho	25-200 µg/mL
Limite de detecção	1,34 µg/mL
Limite de quantificação	4,07 µg/mL
Dados da regressão	
N	4
Inclinação da reta (a)	20710
Desvio padrão da inclinação	96,86
Média da inclinação	20653,75
Intercepto do eixo y (b)	67957
Desvio padrão do intercepto	8395,75
Coeficiente de correlação (r)	0,9988

Fonte: A autora.

Nota: $y = ax + b$, onde x é a concentração do composto e y é a área sob a curva.

5.2.4 Precisão

A precisão de um método analítico descreve a proximidade entre os valores observados no experimento obtidos através de repetidas medições de uma mesma amostra e pode ser expressa como repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade mostra a concordância entre os resultados encontrados para um mesmo método, executado nas mesmas condições, em um breve intervalo de tempo. A precisão intermediária mostra o efeito das variações, dentro de um mesmo laboratório, considerando dias diferentes de execução do método e analistas diferentes (Brasil, 2017).

Os resultados para precisão e repetibilidade foram expressos como média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16 - Dados da repetibilidade e precisão intermediária para amostras de progesterona.

	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL, média ± DP)	CV (%)
Repetibilidade N=3	25	24,89 ± 0,27	1,10
	100	98,73 ± 0,45	0,46
	200	202,19 ± 1,60	0,79
Precisão intermediária			
Intradia N=3	25	25,68 ± 0,15	0,60
	100	100,09 ± 2,29	2,29
	200	199,41 ± 2,28	1,25
Interdia N=9	25	24,92 ± 0,15	0,60
	100	97,87 ± 2,17	2,21
	200	200,94 ± 2,34	1,17

Fonte: A autora.

De acordo com o Guia internacional de validação analítica (ICH) valores de CV não devem ultrapassar 5% (ICH 2005), desse modo, os resultados obtidos confirmam a precisão do método, uma vez que o maior valor observado para CV foi de 2,29% estando em conformidade com o que é preconizado para esse parâmetro de análise. Além disso, não apresentou diferença significativa entre a concentração teórica e experimental pelo teste de ANOVA com $p > 0,05$.

5.2.5 Exatidão

A exatidão foi confirmada através da análise da proximidade dos valores obtidos em amostras de progesterona em comparação aos valores de concentrações teóricas.

Foram analisadas três soluções padrão de progesterona nas concentrações de 37,5; 75 e 100 µg/mL, a porcentagem de recuperação variou de 94,16 a 98,29%, assim os percentuais de recuperação se encontraram próximo de 100%, o que considera o método como exato, segundo os preceitos do ICH (2005) e da ANVISA (2017). A Tabela 17 descreve os dados da análise de exatidão.

Tabela 17 - Valores experimentais obtidos nos ensaios de exatidão.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL, média ± DP)	Recuperação (%)	CV (%)
37,5	35,31 ± 0,05	94,16	0,15
75	72,96 ± 0,10	97,28	0,14
100	98,29 ± 3,40	98,29	3,46

Fonte: A autora.

5.2.6 Robustez

Com o intuito de analisar a robustez, pequenas alterações foram realizadas em alguns parâmetros analíticos, uma vez que, de acordo com o ICH, para que um método seja considerado robusto, os valores obtidos devem se manter inalterados diante de pequenas variações que eventualmente ocorram durante o processo de análise (ICH, 2005). Os parâmetros alterados foram fluxo, proporção da fase móvel e temperatura da coluna. Os resultados estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Valores experimentais obtidos nos ensaios de robustez.

Parâmetros		Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL, média ± DP)	CV (%)	Recuperação (%)
Concentração da fase móvel	83:17 (v/v) (metanol: água)	25	24,84 ± 0,21	0,86	99,35
		100	96,20 ± 1,68	1,74	96,20
		200	201,45 ± 1,53	0,76	100,73
Fluxo da fase móvel	0,9 mL/min	25	24,71 ± 0,06	0,24	98,83
		100	101,65 ± 0,78	0,77	101,65
		200	226,17 ± 1,17	0,52	113,09
Temperatura da coluna	29 °C	25	23,92 ± 0,37	1,56	95,69
		100	91,38 ± 0,66	0,72	91,38
		200	212,84 ± 7,25	3,41	106,42

Fonte. A autora.

Nota: N=3.

Com relação a esses valores, os valores de CV% foram inferiores a 5% e a taxa de recuperação acima de 91,38%, a análise estatística demonstrou $p > 0,05$, o

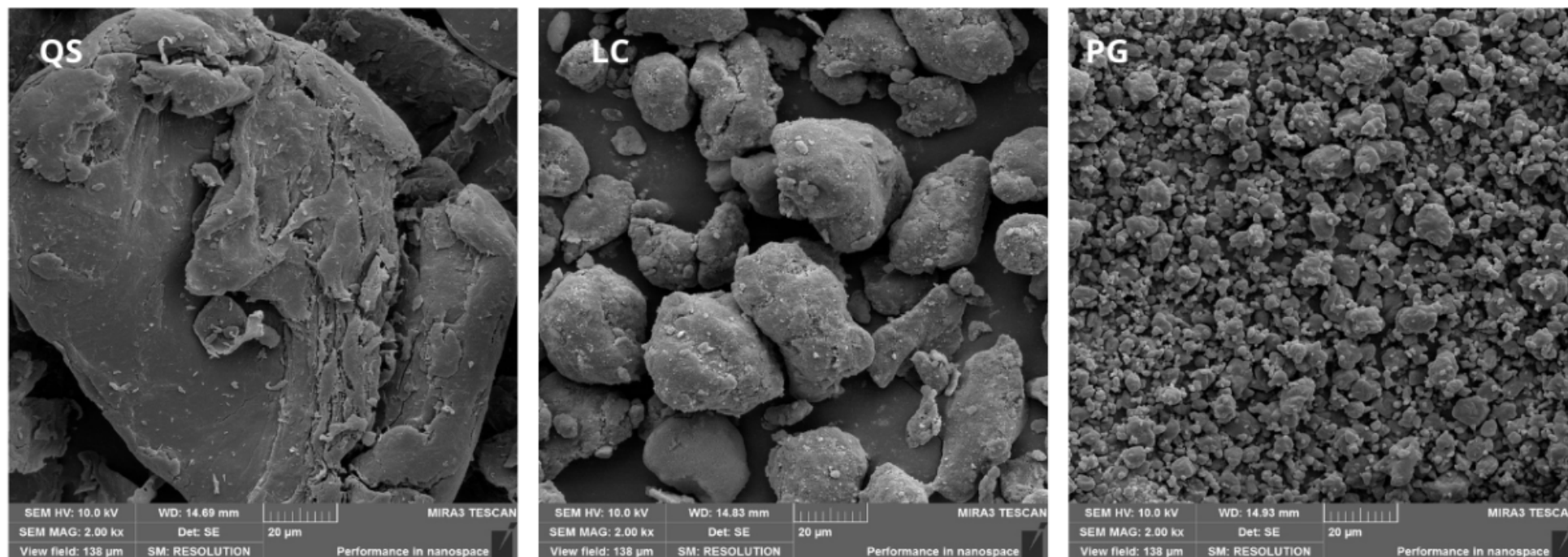
que caracteriza o método como robusto para todos os parâmetros analisados, pois se manteve inalterado mesmo com pequenas variações nos parâmetros analíticos, conforme resumido na Tabela 17.

Considerando os resultados obtidos, o método foi considerado seletivo, linear para a faixa de aplicação proposta, preciso, exato e robusto, sendo, portanto, devidamente validado. Com base no exposto, foi possível concluir que o método é capaz de quantificar a progesterona incorporada nas nanopartículas, fornecendo resultados confiáveis.

5.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA E DE SUPERFÍCIE

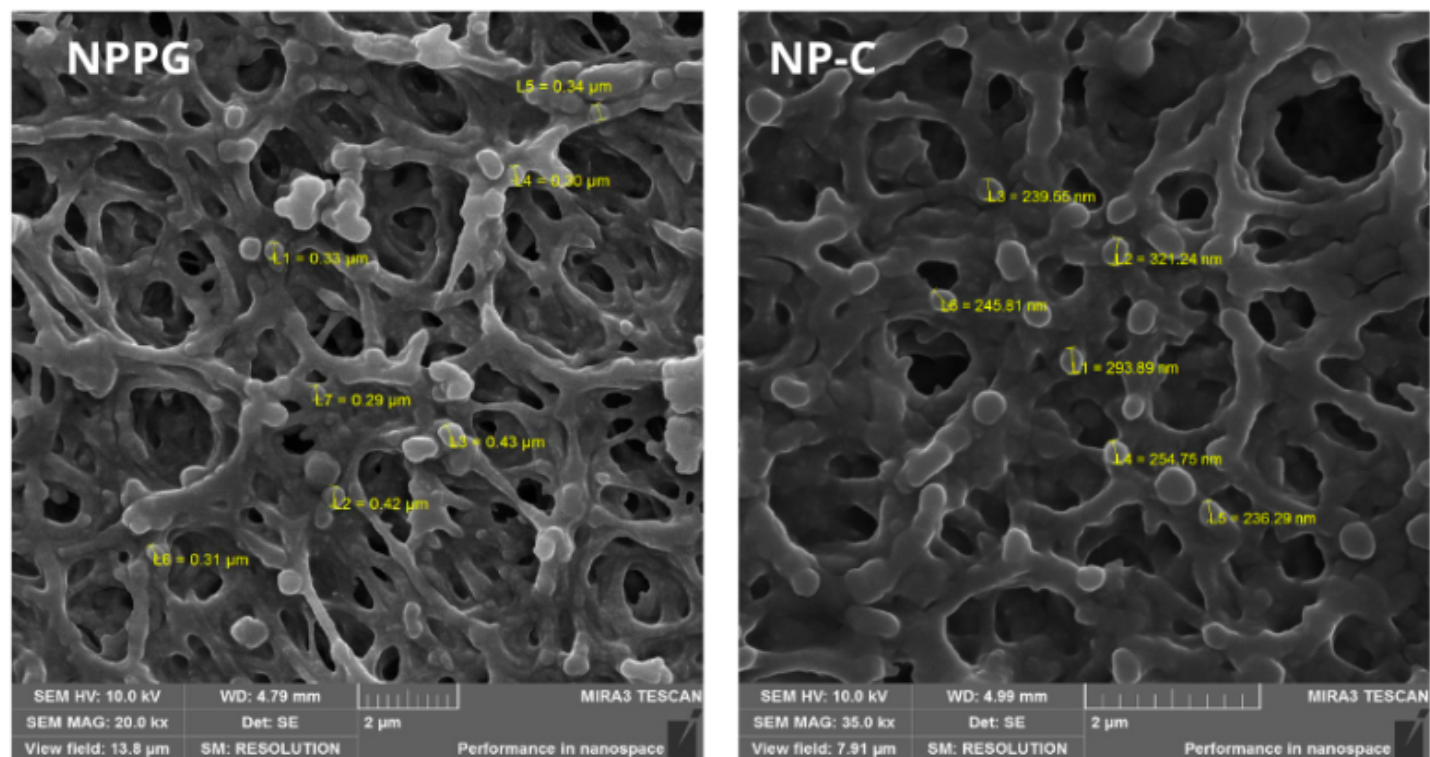
As imagens obtidas por MEV-FEG podem ser observadas nas Figuras 19 e 20.

Figura 19 - Aspectos morfológicos da quitosana (QS); lecitina (LC) e progesterona pura (PG) por FEG-SEM, em aumento de 2000x.



Fonte: A autora.

Figura 20 - Aspectos morfológicos das nanopartículas otimizadas (NPPG) e nanopartícula controle negativo (NP-C) por FEG-SEM, em aumento de 2000x e 3500x.



Fonte: A autora.

Pelas imagens do MEV-FEG (Figura 19) foi possível visualizar que a quitosana (QS) apresentou partículas de superfície irregular, dura e quebradiça. Enquanto a lecitina apresentou partículas de tamanho e superfície irregulares e áspera (LC). Ainda, pode se verificar que a PG apresentou morfologia cristalina, irregular e lisa.

Foi evidenciado que a NPPG possui formato esférico bem definido com superfície lisa e uniforme, com ausência de poros (Figura 20) e diâmetro nanométrico na ordem de 290 nm a 490 nm, valores próximos ao determinado pela análise de espalhamento dinâmico de luz.

A análise morfológica da NP-C apresentou características semelhantes à NPPG, sugerindo que a presença da progesterona não causou modificações na estrutura das nanopartículas obtidas. Ademais, a ausência de cristais do fármaco na superfície das partículas formadas sugerem que o fármaco foi encapsulado, reforçando o sucesso na obtenção das nanopartículas pelo método proposto (Souza *et al.*, 2014).

As características observadas nas imagens obtidas são semelhantes às descritas na literatura para nanopartículas híbridas de lecitina/quitosana carregadas com progesterona (Sonvico *et al.*, 2006), propionato de clobetasol (Senyigit *et al.*, 2010), quercetina (Souza *et al.*, 2014; Hao *et al.*, 2017) e doxorrubicina e piperina (Alkoholief, 2019). Nesses estudos, assim como no presente trabalho, foi utilizado o mesmo método e matriz encapsulante para a obtenção das nanopartículas.

5.4 ANÁLISE ESTRUTURAL

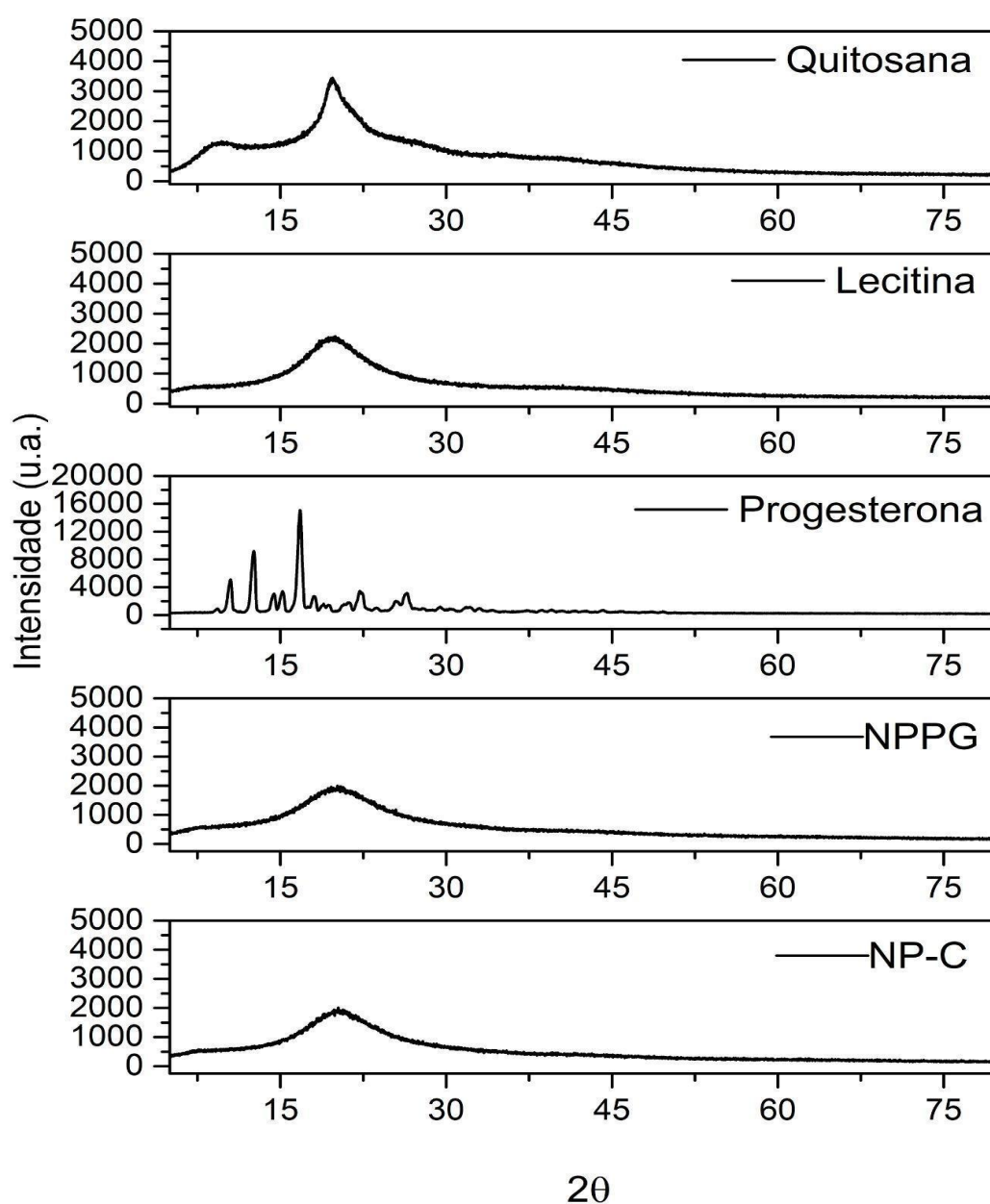
5.4.1 Análise por Difração de Raios X (X Ray Diffraction – DRX)

A difração de raios X (DRX) é amplamente utilizada para analisar as propriedades cristalinas e amorfas de fármacos. Substâncias cristalinas apresentam uma organização ordenada e repetitiva de partículas em uma estrutura tridimensional, enquanto substâncias amorfas possuem uma disposição desordenada e aleatória (Lia *et al.*, 2023). Devido a essa estrutura desorganizada, as substâncias amorfas tendem a ser mais solúveis em solventes do que as cristalinas, exigindo menos energia para se dissolverem. Essas características afetam diretamente a solubilidade e a cinética de dissolução dos fármacos,

influenciando sua eficácia terapêutica (Lia *et al.*, 2023; El Hady *et al.*, 2024). No difratograma, picos bem definidos indicam substâncias cristalinas, enquanto bandas largas são características das amorfas (Zhang *et al.*, 2023).

Para o ensaio, analisamos as matérias-primas isoladas e a formulação otimizada (NPPG) e controle negativo (NP-C). A Figura 21 mostra os resultados da análise do difratograma de DRX para a quitosana, lecitina, progesterona e NPPG e NP-C.

Figura 21 - Difratograma da quitosana, lecitina, progesterona, nanopartículas híbridas otimizadas (NPPG) e nanopartículas híbridas controle negativo (NP-C).



No difratograma da progesterona (PG), observou-se uma natureza cristalina, com picos agudos característicos ($2\theta = 10,49; 12,62; 16,78; 18,09$ e $22,19^\circ$) semelhante ao encontrado na literatura para a PG (Brako *et al.*, 2018; Vieira *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). Enquanto a quitosana e a lecitina apresentaram perfil semi-cristalino, com picos de cristalinidade em $19,62$ e $19,91^\circ$ respectivamente. Tais comportamentos então em conformidade com dados da literatura para as duas matérias-primas isoladas (Abosabaa; Arafa; Elmeshad, 2021; Jiang *et al.*, 2024; Tian *et al.*, 2024).

Com relação ao difratograma da NPPG, observou-se o desaparecimento dos picos de cristalinidade da PG, indicando sua amorfização durante o processo de nanoencapsulação. Assim, os resultados sugerem que a PG se encontra predominantemente em dispersão molecular no núcleo apolar, composto por lecitina e miristato, o que impede sua detecção por técnicas de análise de superfície.

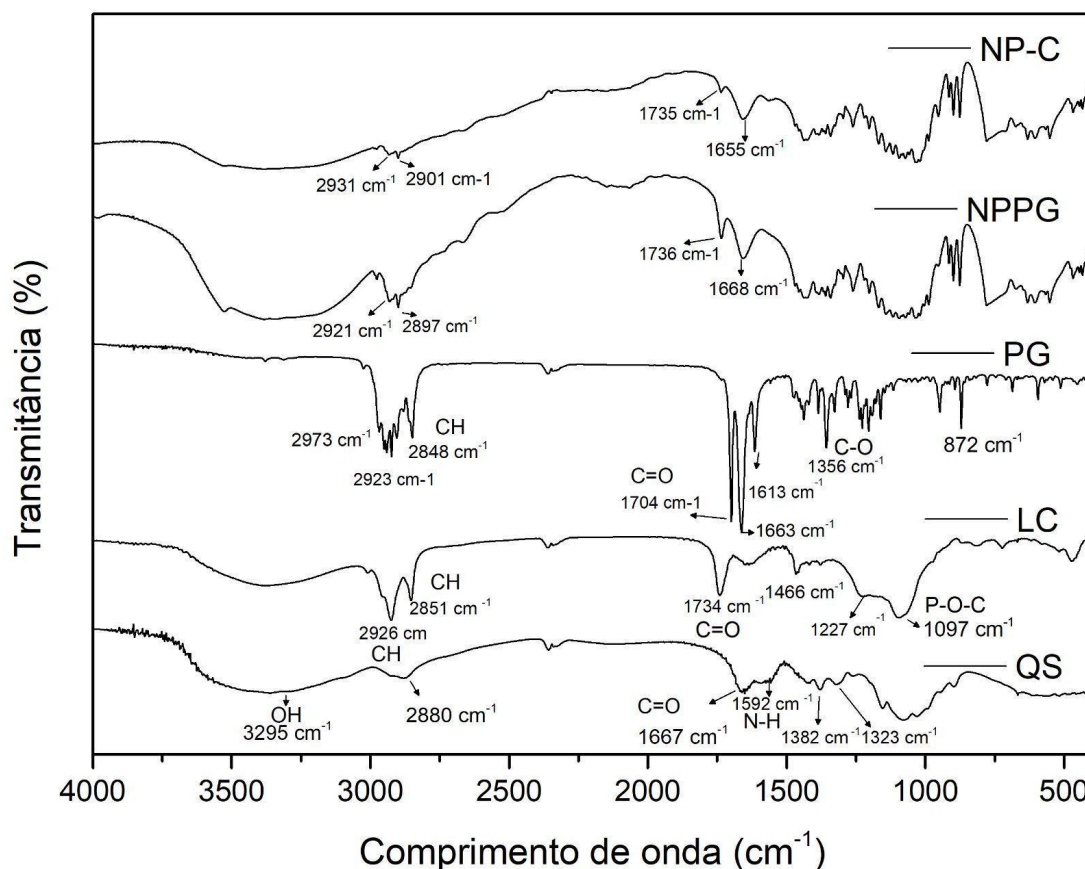
Essa amorfização da PG quando encapsulada pode ter implicações positivas para a dissolução do fármaco. Essa alteração estrutural tende a favorecer o aumento da solubilidade e da biodisponibilidade da PG, reforçando a nanotecnologia como uma abordagem promissora para sistemas de liberação controlada de fármacos (Lia *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2023).

Além disso, tanto a NPPG quanto a NP-C apresentaram picos de semi-cristalinidade que se assemelha aos encontrados para a quitosana e para a lecitina, sugerindo que a adição de PG não alterou a estrutura da matriz da nanopartículas obtidas, preservando sua integridade.

5.4.2 Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

A análise de FTIR foi utilizada para avaliar a presença de grupos funcionais característicos das nanopartículas e as possíveis interações moleculares entre a PG e a formulação. A Figura 22 apresenta o espectro de FTIR das NPPG, NP-C, progesterona (PG), quitosana (QS) e lecitina (LC).

Figura 22 - Espectros de FTIR das nanopartículas híbridas otimizadas (NPPG); nanopartículas híbridas controle negativo (NP-C), progesterona (PG), quitosana (QS) e lecitina (LC).



Fonte: A autora.

O espectro de FTIR da lecitina apresentou bandas de absorção de grupo carbonila de ácidos graxos em torno de 1734 cm^{-1} , uma banda de absorção devido à flexão CH em 1466 cm^{-1} , bandas de ligação P=O em 1227 cm^{-1} e P-O-P em 1097 cm^{-1} referentes aos grupos do ácido fosfórico presente na lecitina foram visualizadas. Além disso, a vibração de estiramento CH do grupo metileno foi claramente identificada pela presença de bandas de absorção intensa em 2926 cm^{-1} e 2851 cm^{-1} . Resultados esses, semelhantes ao observado por outros autores (Abosabaa; Arafa; Elmeshad, 2021; Fereig *et al.*, 2021; Ning *et al.*, 2023; El Hady *et al.*, 2024).

A desacetilação incompleta da quitosana foi confirmada pela existência de grupos N-acetil residuais presentes na banda de adsorção 1667 cm^{-1} e 1323 cm^{-1} que corresponderam ao alongamento C=O no grupo amida, vibração da amida primária e alongamento C-N da amida terciária, respectivamente (Sonvico *et al.*, 2006; Abosabaa; Arafa; Elmeshad, 2021; Ning *et al.*, 2023). Uma banda

correspondente ao alongamento O–H e N–H foi observada ao redor da região 3295 cm^{-1} . Uma banda de absorção discreta foi observada em 2880 cm^{-1} devido ao alongamento C–H que está tipicamente presente em espectros de FTIR de polissacarídeos (Abosabaa; Arafa; Elmeshad, 2021; Fereig *et al.*, 2021). O grupo funcional amina primária foi detectado devido à presença de flexão NH na banda 1592 cm^{-1} .

Fortes bandas de absorção na região em 2973 , 2923 e 2848 cm^{-1} foram observadas para o FTIR para PG, que correspondem ao estiramento das ligações de carbono -O-CH₃, -C-CH₃ e C-H (Fogolari *et al.*, 2023). O espectro ainda apresenta bandas características de alongamento de C=O ligada a um grupo metil em 1704 cm^{-1} e à cadeia cíclica em 1663 cm^{-1} (Leimann *et al.*, 2015; Fogolari *et al.*, 2023). Também apresentou absorção em 872 cm^{-1} que se refere à deformação fora do plano do hidrogênio ligado a um carbono sp³ (Leimann *et al.*, 2015).

Foi possível observar na Figura 21 que a NPPG apresentou bandas em torno de 2921 cm^{-1} e 2897 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento de ligações C-H de cadeias alquílicas, semelhantes às visualizadas no FTIR da lecitina e da progesterona (PG) puras (Abosabaa; Arafa; Elmeshad, 2021; El Hady *et al.*, 2024). A banda em 1736 cm^{-1} refere-se à vibração da carbonila (C=O), sendo comparável ao FTIR da lecitina pura, o que sugere que a lecitina contribuiu para a estrutura da NPPG. A banda larga próxima a 3279 cm^{-1} indica o estiramento de grupos O-H, possivelmente associados a interações intermoleculares como ligações de hidrogênio, e pode ser relacionada também a grupos N-H, com características comparáveis ao espectro da quitosana. Também se observou o desaparecimento de picos de absorção de P=O da lecitina, ao mesmo tempo que o estiramento de N-H apareceu aproximadamente em 1668 cm^{-1} (Fereig *et al.*, 2021; El Hady *et al.*, 2024). Sugerindo a presença de interações iônicas entre o grupo fosfato da lecitina e grupos aminas da quitosana, que pode ser indicado pela semelhança no perfil do espectro da NPPG e a NP-C. Além disso, o desaparecimento das bandas características da PG sugerem o encapsulamento bem-sucedido do fármaco nas nanopartículas híbridas.

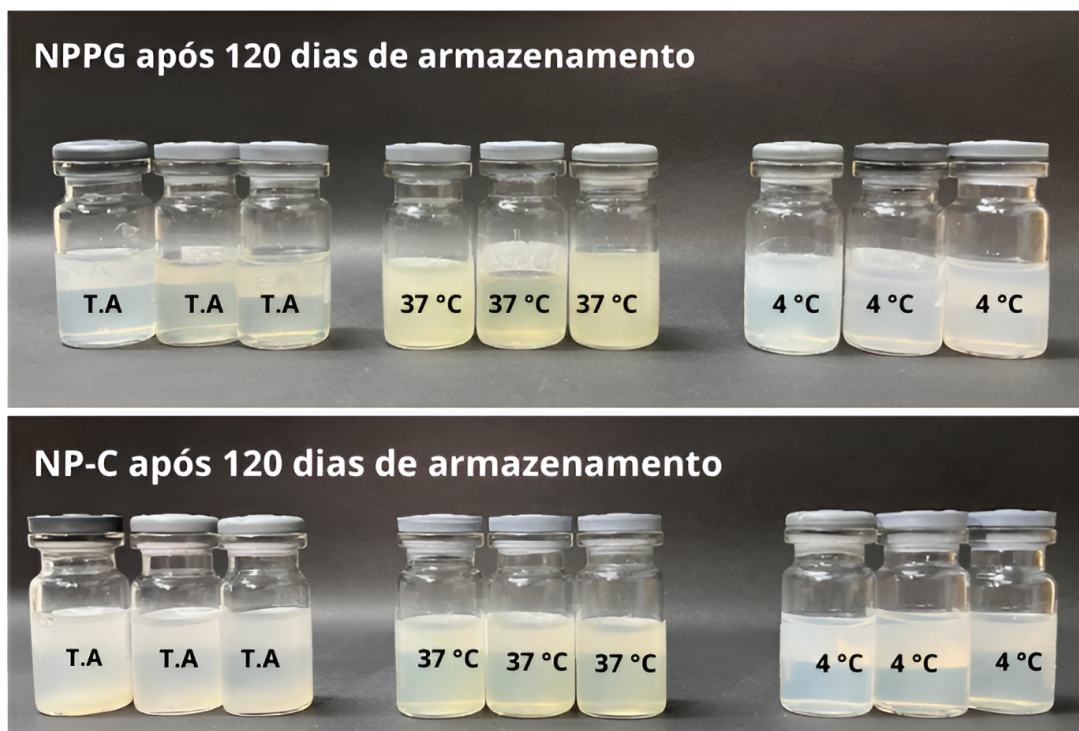
5.5 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS

Ao se desenvolver um sistema nanoestruturado, espera-se que o sistema

seja capaz de manter suas características físico-químicas como tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta por períodos prolongados, de modo garantir a viabilidade dessa nanoestrutura como carreador de fármacos. Isso porque, processos de instabilidade podem influenciar na degradação do material encapsulante, bem como na degradação, absorção e liberação prematura do fármaco (Schafazick *et.al.*, 2003; José *et al.*, 2018; Deng *et al.*, 2020). Por isso, se torna importante acompanhar esses parâmetros.

Dessa forma, o estudo de estabilidade foi conduzido em diferentes temperaturas por um período de 120 dias a fim de verificar o comportamento das nanopartículas. Os resultados podem ser analisados por meio das Figuras 23 - 26. A Figura 23 apresenta o aspecto macroscópico das formulações após 120 dias de análise.

Figura 23 - Aspectos macroscópicos das NPPG e NP-C armazenadas ao abrigo da luz, em temperatura ambiente (T.A.), 37 °C (estufa), e 4 °C (geladeira) durante 120 dias para o estudo de estabilidade.



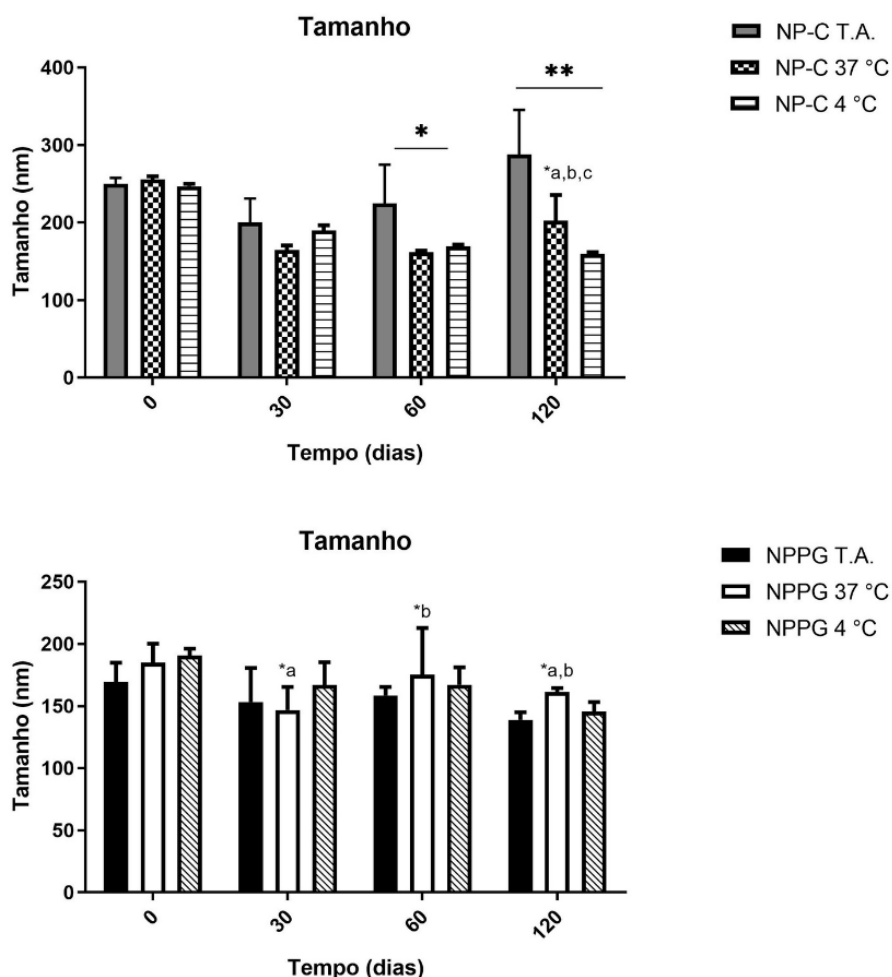
Fonte: A autora.

A análise macroscópica das formulações revelou que tanto as NPPG quanto às NP-C armazenadas à temperatura ambiente e a 37 °C apresentaram uma coloração levemente amarelada (sendo mais evidente para as amostras

armazenadas em estufa), enquanto as amostras mantidas sob refrigeração preservaram sua transparência inicial. Apesar dessa variação de cor, todas as formulações mantiveram características de fluidos translúcidos típicos de nanocápsulas em suspensão coloidal. Além disso, demonstraram boa estabilidade físico-química, sem indícios de formação de cremeação, sedimentação ou floculação, conforme apresentado na Figura 23.

Os valores de diâmetro médio das nanopartículas ao longo do período de armazenamento estão apresentados na Figura 24.

Figura 24 - Estudo de estabilidade das NPPG e NP-C em diferentes temperaturas, com análise do diâmetro de partículas.



Fonte: A autora.

Nota: Temperatura ambiente: T.A. *p <0,05; **p <0,01. Colunas com a presença de letras (a-c) se diferem estatisticamente com a mesma amostra em tempos diferentes. a) Mesma amostra comparada com o Tempo 0; b) Mesma amostra comparada com Tempo 30; c) Mesma amostra comparada com Tempo 60.

A Figura 24 mostra que as NPPG, em diferentes temperaturas de armazenamento, apresentaram diâmetro de partícula menor que as NP-C ($p < 0,05$). Isso sugere que a presença da progesterona, devido ao seu caráter lipofílico, contribuiu para a formação de um núcleo mais compacto e estável, resultando em nanopartículas menores. Além disso, os valores mais elevados de potencial zeta das NPPG em relação às NP-C (Figura 26) indicam uma maior repulsão eletrostática entre as partículas, o que também pode ter influenciado a redução do tamanho (Abruzzo *et al.*, 2021). Essa diferença no potencial zeta entre NPPG e NP-C foi estatisticamente significativa no tempo 0.

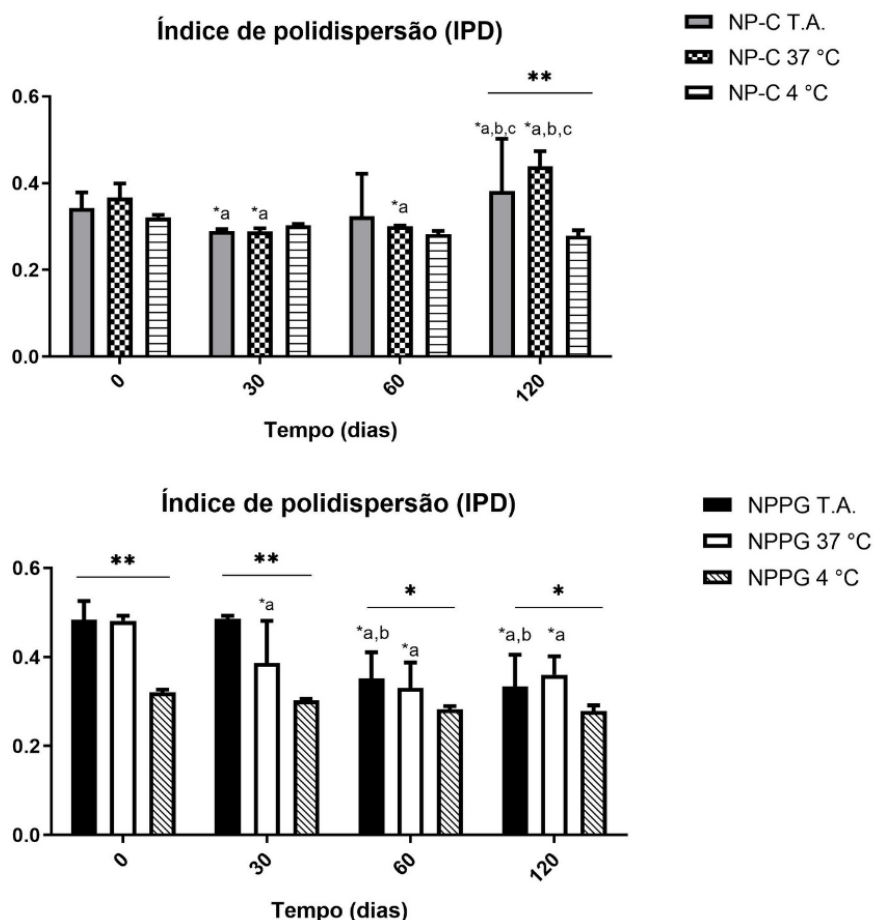
Não foi observado mudanças significativas no tamanho ($p > 0,05$) das NPPG nas diferentes temperaturas obtidas ao longo dos 120 dias, apesar disso, as NPPG armazenadas em 37 °C ($161,13 \pm 3,26$ nm) apresentaram tamanho maior quando comparada a NPPG T.A. ($138,86 \pm 6,13$ nm) e NPPG 4 °C ($145,44 \pm 7,79$ nm). Enquanto as NP-C armazenadas em temperatura ambiente apresentou tamanho maior ($287,63 \pm 57,47$ nm) que as armazenadas à 37 ($202,20 \pm 33,48$ nm) e 4 °C ($159,55 \pm 2,27$ nm) em 120 dias, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Dessa maneira, a diferença no tamanho das NP-C pode ser justificada pela influência da temperatura na cinética molecular e na estabilidade das nanopartículas (Liu *et al.*, 2022). Em temperatura ambiente, onde há oscilações térmicas e em temperatura elevadas, a variação na energia das moléculas pode favorecer a agregação das partículas ao longo do tempo, resultando em um tamanho maior devido ao aumento das forças de Van der Waals sobre as forças eletrostáticas (Casarella; Tarantino; Di Donna, 2024).

Mesmo com essas variações, tanto as NPPG quanto as NP-C mantiveram um tamanho inferior a 300 nm em todas as temperaturas de armazenamento por 120 dias. Essa característica é favorável para a veiculação da progesterona na mucosa vaginal, pois, segundo Obuobi e Škalko-Basnet (2024), formulações mucoadesivas com diâmetro entre 50 e 300 nm apresentam maior eficiência na penetração do muco e na interação com os tecidos mucosos, promovendo uma liberação controlada do fármaco.

A Figura 25 dispõe os resultados obtidos para índice de polidispersão durante o estudo de estabilidade.

Figura 25 - Estudo de estabilidade das NPPG e NP-C em diferentes temperaturas, com análise do índice de polidispersão.



Fonte: A autora.

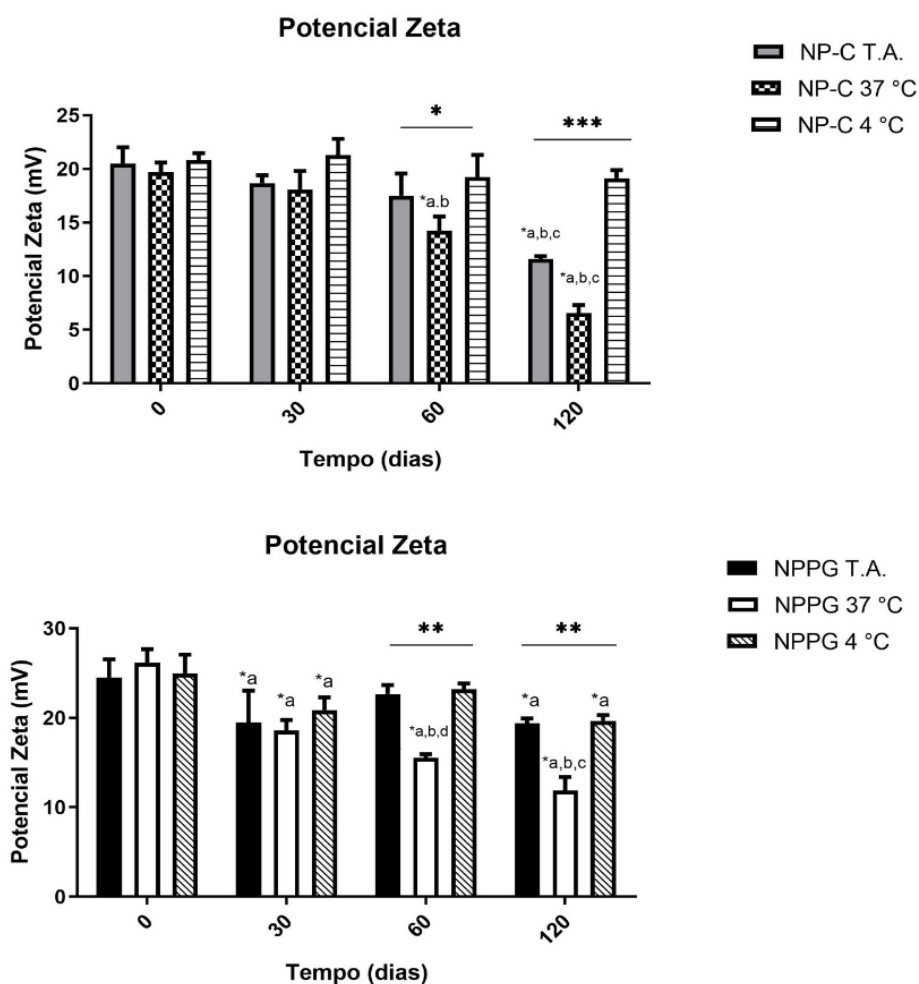
Nota: Temperatura ambiente: T.A. *p <0,05; **p<0,01. Colunas com a presença de letras (a-c) se diferem estatisticamente com a mesma amostra em tempos de análise diferentes. a) Mesma amostra comparada com o Tempo 0; b) Mesma amostra comparada com Tempo 30; c) Mesma amostra comparada com Tempo 60.

Na análise do índice de polidispersão (Figura 25), observou-se que as NP-C armazenadas em temperatura ambiente e a 37°C permaneceram estáveis até 60 dias. A NP-C em temperatura ambiente passou de $0,343 \pm 0,03$ (dia 0) para $0,381 \pm 0,12$ (dia 120), enquanto a NP-C a 37°C variou de $0,367 \pm 0,032$ (dia 0) para $0,439 \pm 0,03$ (dia 120). Embora tenha ocorrido um aumento ao longo do tempo, as nanopartículas mantiveram o caráter monodisperso ($IPD < 0,5$) em todas as condições de armazenamento. Já a NP-C armazenada a 4°C e a NPPG, independentemente da temperatura, não apresentaram aumento significativo no índice de polidispersão durante os 120 dias, demonstrando maior estabilidade. Além disso, assim como na análise de tamanho, as amostras armazenadas em temperaturas mais baixas sofreram menos variações no índice de polidispersão.

Isso porque, suspensões de nanopartículas são cineticamente mais estáveis ao longo do tempo do que formulações em maior escala, devido à baixa tendência à separação de fases. Pois, a sedimentação de partículas nanométricas é lenta e minimizada pelo movimento Browniano nas moléculas que mantêm a distribuição homogênea. Característica que reforça o uso nanopartículas como sistema de entrega interessante para a progesterona (Schaffazick *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2020; Fereig *et al.*, 2021; Casarella; Tarantino; Di Donna, 2024).

A Figura 26 mostra os resultados da estabilidade para o potencial zeta.

Figura 26 - Estudo de estabilidade das NPPG e NP-C em diferentes temperaturas, com análise do potencial zeta.



Fonte: A autora.

Nota: Temperatura ambiente: T.A. *p <0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Colunas com a presença de letras (a-c) se diferem estatisticamente com a mesma amostra em tempos diferentes. a) Mesma amostra comparada com o Tempo 0; b) Mesma amostra comparada com Tempo 30; c) Mesma amostra comparada com Tempo 60.

O potencial zeta das NPPG T.A, NPPG 4 °C e NP-C 4 °C manteve-se

positivo, elevado e estável ao longo dos 120 dias de armazenamento. Paralelamente as amostras armazenadas à 37 °C e a NP-C T.A tiveram uma redução significativa no seu potencial zeta. Assim, após 60 dias de análise a NPPG 4 °C apresentou $p < 0,05$ quando comparada a NPPG 37 °C, NP-C 37°C, NP-C T.A. e a NP-C 37 °C apresentou $p < 0,05$ com relação a NP-C 4 °C, NPPG T.A.

Após 120 dias de análise, as amostras NP-C e NPPG armazenadas à 37 °C e NP-C armazenadas em temperatura ambiente apresentaram menores valores de potencial zeta em relação às demais amostras, sendo respectivamente $6,55 \pm 0,76$ mV; $11,86 \pm 1,52$ mV e $11,60 \pm 0,26$ com $p < 0,05$. O potencial zeta mais próximo do neutro obtidos para essas amostras, sugerem que o aumento da temperatura pode acelerar o movimento térmico e cinético das partículas, reduzindo a repulsão eletrostática entre elas (Fereig *et al.*, 2021; Casarella; Tarantino; Di Donna, 2024).

Essa diminuição da repulsão eletrostática, pode favorecer alterações na homogeneidade e tamanho das nanopartículas, justificando o maior tamanho médio e IPD dessas amostras no tempo 120 quando comparadas aos valores dos demais grupos (Fereig *et al.*, 2021; Casarella; Tarantino; Di Donna, 2024). No entanto, apesar desse aumento, a diferença não foi estatisticamente significativa em relação aos demais grupos no mesmo tempo de análise (T120) e também não houve variação significativa em comparação ao tempo inicial (T0) ($p > 0,05$). Além disso, não foram observados sinais de precipitação, aglomeração ou coagulação das partículas na nanoformulação.

Em geral, a manutenção do tamanho durante o armazenamento pode ser atribuída aos valores positivos do potencial zeta que provavelmente limitaram a agregação e precipitação das nanopartículas. Esses resultados concordam com descobertas anteriores relatando que altos valores de potencial zeta favorecem a repulsão eletrostática entre as partículas e, conseqüentemente, melhora sua estabilidade (Abruzzo *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022).

Os resultados do estudo de estabilidade indicam que o armazenamento a 4°C foi a condição mais adequada para a NPPG e a NP-C, pois garantiu a maior preservação das características iniciais das nanopartículas ao longo do tempo. Nessa temperatura, os parâmetros macroscópicos e físico-químicos, como diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta, permaneceram mais estáveis em comparação com as demais condições testadas. Esse achado reforça os resultados de Valencia *et al.* (2021), Abruzzo *et al.* (2021) e Liu *et al.* (2022), que também

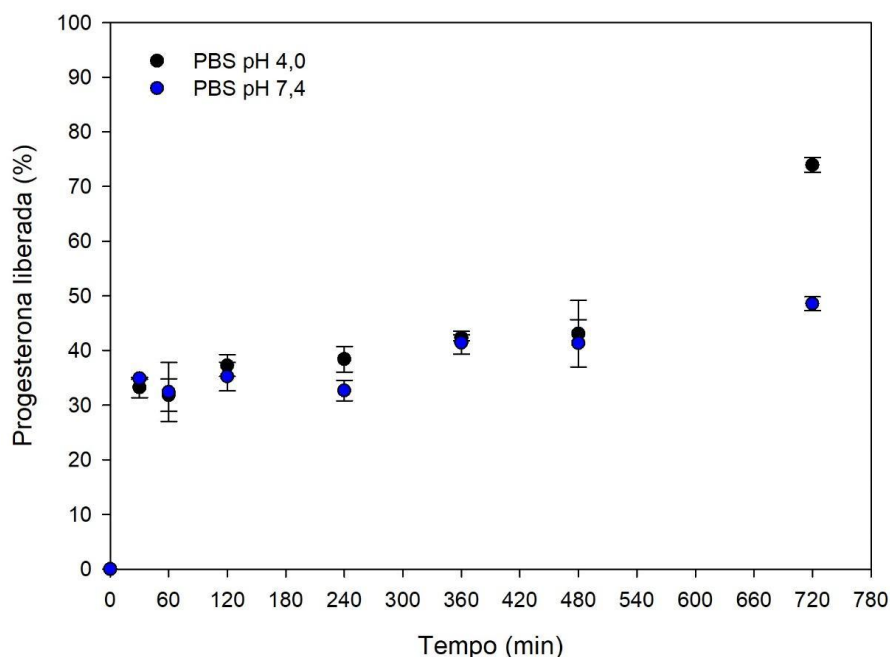
apontaram temperaturas mais baixas como ideais para a manutenção da estabilidade de nanopartículas híbridas de lecitina e quitosana.

5.6 ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

5.6.1 Ensaio do perfil de liberação *in vitro*

Para o ensaio de liberação da progesterona, foi escolhido como meio de dissolução a solução de PBS com 0,5% de Tween® 80 em pH 4,0 e pH 7,4, com o intuito de simular as características de pH da mucosa vaginal e da corrente sanguínea, respectivamente e garantir a quantificação da progesterona liberada. O perfil de liberação da progesterona pelas as NPPG estão representadas na Figura 27.

Figura 27 - Perfil de liberação *in vitro* para nanopartículas híbridas contendo progesterona (NPPG) em pH 4,0 e 7,45.



Fonte: A autora.

O estudo da liberação de fármacos é essencial para compreender o comportamento de diferentes formas farmacêuticas, visando aprimorar a farmacocinética do fármaco e, conseqüentemente, aumentar sua eficácia terapêutica, ao passo que reduz os efeitos adversos associados ao seu uso. Por

essa razão, essa análise é fundamental na síntese de nanossistemas baseados em polímeros e lipídios, que têm como objetivo transportar os ativos de maneira direcionada (Paarakh *et al.*, 2018).

A partir da Figura 26 observou-se que para o meio com pH 7,4, cerca de 34,86% do fármaco foi liberado nos primeiros 30 minutos de análise e se manteve até 4 horas de análise. Após 6 horas, houve um aumento da taxa para aproximadamente 41 %, atingindo 48,56% em 12 horas de análise. Sugerindo uma liberação com taxas moderadas e progressivas ao longo do tempo. Essa taxa de liberação pode ser explicada pela estabilidade das interações eletrostática entre a quitosana e lecitina, que reflete na diminuição do intumescimento da quitosana na presença de solução com pH mais elevado, que diminui com o tamanho das nanopartículas, e consequentemente a sua taxa de liberação do fármaco (Ma *et al.*, 2019; Binesh; Farhadian; Mohammadzadeh, 2021).

Esse resultado é semelhante ao obtido por Wang *et al.* (2017), que, utilizando meio PBS de pH 7,4, registrou uma liberação cumulativa de 53,26% após 72 horas. No entanto, o autor empregou a análise em períodos mais longos e com método de diálise, diferindo do utilizado neste estudo.

Para o meio de pH 4,0, nas primeiras horas, observou-se uma liberação semelhante ao visualizado no meio pH 7,4, com uma taxa de liberação aproximadamente de 33%, atingindo 43,06 % em 8 horas. No entanto, entre 8 e 12 horas, houve um aumento significativo na liberação, chegando a 73,94%. Esse comportamento sugere que o pH ácido causou mudanças nas forças iônicas e enfraqueceram as interações eletrostáticas entre a quitosana e a lecitina. Como consequência, a quitosana apresentou maior solubilização, acelerando a liberação do fármaco do núcleo lipídico da nanopartícula (Son; Le; Cho, 2017; Ma *et al.*, 2019; Anand *et al.*, 2021). Esse comportamento sugere que a liberação da progesterona pelas nanopartículas é sensível ao pH do meio, assim como foi visto para nanopartículas híbridas de lecitina e quitosana contendo o pigmento rubropunctatina que mostrou sensibilidade em pH 6,0 (Ning *et al.*, 2023).

O perfil de liberação ambos pHs analisados apresentou-se como bifásico, em que a liberação rápida da progesterona nos primeiro 30 minutos de análise pode estar relacionada a moléculas de progesterona adsorvidas presentes na superfície das nanopartículas, conforme relatado por Than *et al.* (2014). Que posteriormente foi mantida por um padrão de liberação sustentada resultante da presença de lecitina e

miristato, que devido à maior lipofilicidade comparada ao meio de dissolução, pode dificultar a liberação do fármaco, conforme relatado em estudo anterior por Than et al., (2014); Liu et al., (2016) Soares et al., (2020) em pH 7,4.

Apesar dessa variação observada após 12 horas de análise, os resultados demonstram a boa capacidade que as nanopartículas híbridas possuem em manter uma liberação progesterona constante independente do pH do meio em que elas foram submetidas. Esse padrão é benéfico para manter uma concentração de fármaco relativamente constante e melhorar a segurança da progesterona.

5.6.2 Cinética e mecanismo de liberação

Com os resultados da análise de liberação da progesterona, também foi possível avaliar a cinética de liberação *in vitro* desse fármaco pelas nanopartículas por meio de modelos matemáticos. Esses modelos consideram fenômenos como dissolução, difusão, intumescimento, erosão, precipitação e/ou degradação. A liberação do fármaco é determinada por mecanismos que dependem da composição da matriz, da geometria das partículas, do método de preparação e das características do meio de dissolução (Paarakh et al., 2018).

Além disso, a liberação do fármaco é influenciada por fatores como o diâmetro médio das partículas, o estado físico, a concentração do fármaco, as propriedades viscoelásticas do polímero e suas características de dissolução e difusão (Son; Le; Cho, 2017; Paarakh et al., 2018).

Vários modelos cinéticos têm sido usados para ajustar os dados de liberação *in vitro* com base nos resultados experimentais encontrados. Esses resultados podem ser ajustados a modelos como a ordem zero, a primeira ordem, o Higuchi, o Hixson-Crowell, o Korsmeyer-Peppas e outros (Son; Le; Cho, 2017; Paarakh et al., 2018). A Tabela 19 apresenta os modelos de liberação aplicados para avaliar os perfis de liberação da progesterona.

Tabela 19 - Dados ajustados para o perfil de liberação *in vitro* das nanopartículas híbridas de lecitina-quitosana contendo progesterona (NPPG).

Liberação em PBS pH 4,0					Liberação em PBS pH 7,4			
Modelo	Equação	Equação linear	r ajustado	Expoente de liberação	Equação linear	r ajustado	Expoente de liberação	Mecanismo de liberação
Ordem zero	$Q = Q_0 + K_0 t$	$y = 0,0736x + 20,574$	0,6642289	-	$y = 0,0618x + 21,627$	0,5963221	-	-
Primeira ordem	$dC/dT = -Kt$	$y = -0,0004x + 1,8929$	0,7078135	-	$y = -0,0004x + 1,886$	0,6265780	-	-
Higuchi	$Q = KH t^{1/2}$	$y = 0,3753x - 1,675$	0,8402976	-	$y = 0,3501x - 0,7192$	0,7745321	-	-
Korsmeyer-Peppas	$Mt/M^\infty = Kt^n$	$y = 0,6424x + 0,2015$	0,9961	$n = 0,1102$	$y = 0,6281x + 0,2204$	0,9732	$n = 0,1134$	Difusão fickiana
		-	0,9849	$b = 0,6115$	-	0,9267	$b = 0,4478$	Difusão fickiana
Weibull	$m = \exp\left[-\frac{t-T_i}{a}\right]^b$							

Fonte: A autora.

Notas: Ordem zero: Q é a quantidade de fármaco liberado ou dissolvido, Q₀ é a quantidade inicial de fármaco em solução (geralmente é zero), t é o tempo, K₀ é a constante de liberação de ordem zero; Primeira ordem: dC é a derivada da concentração, dT é a derivada do tempo, K é a constante da velocidade de primeira ordem expresso em unidade de tempo⁻¹ ; Higuchi: KH é a constante de dissolução de Higuchi; Kors-Peppas: Mt/M[∞] é a fração do fármaco liberado pelo tempo t, K é a taxa constante (tendo unidades de tⁿ) incorporando características estruturais e geométricas do sistema de liberação. n é o expoente indicativo do mecanismo de liberação do fármaco através do polímero; Weibull: "a" define a escala temporal do processo; T_i: representa o intervalo de tempo antes do início do processo de dissolução ou de liberação (na maioria das vezes é igual a zero); b: é o parâmetro de forma que caracteriza a curva como exponencial sendo (b=1), sigmóide (b>1) ou parabólica (b<1).

De acordo com os resultados, o modelo que melhor se ajustou foi o de Korsmeyer-Peppas, com valor de R sendo superior aos demais modelos ($R_{aj} = 0,9961$ em pH 4,0 e $R_{aj}=0,9732$ em pH 7,4). O modelo de Korsmeyer-Peppas é geralmente usado para analisar a liberação de fármacos de formas farmacêuticas poliméricas, quando o mecanismo não é bem conhecido ou quando mais de um tipo de mecanismo pode estar envolvido (Paarakh *et al.*, 2018). Esse resultado reforça o que foi encontrado na literatura para nanossistemas híbridos de lecitina e quitosana, nos quais os autores também identificaram o modelo de Korsmeyer-Peppas como o mais adequado para descrever a liberação do fármaco pelas nanopartículas híbridas (Than *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016; Soares *et al.*, 2020; Abosabaa *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022).

O parâmetro n no modelo de Korsmeyer-Peppas é usado para caracterizar diferentes mecanismos de liberação. Se o valor de n é igual ou menor que 0,45, o mecanismo de liberação segue a difusão Fickiana; um valor de n acima de 0,89 representa que a liberação do fármaco pelo polímero ocorre por erosão (transporte caso II ou mecanismo de transporte não Fickiano); e um valor de n entre 0,45 e 0,89 caracteriza o transporte anômalo com características de ambos os mecanismos (Son; Le; Cho, 2017; Paarakh *et al.*, 2018).

Dessa forma, a NPPG apresentou um valor de $n = 0,1102$ (pH 4,0) e $n=0,1134$ (pH 7,45) pelo modelo Korsmeyer-Peppas, logo, sendo menores que 0,45, indicam que o mecanismo físico de liberação da progesterona pelas nanopartículas híbridas de quitosana e lecitina em ambos os meios avaliados ocorreu por difusão Fickiana, a medida que a quitosana se tornou solúvel e permeável (Abosabaa *et al.*, 2021). Nesse modelo, a liberação ocorre por difusão, com o fármaco se distribuindo ao longo do tempo para o meio de dissolução. No caso da progesterona, sua migração para a camada de quitosana e, em seguida, sua difusão para o meio de liberação (Liu *et al.*, 2022).

Embora apresente um coeficiente de correlação ajustado (R_{aj}) inferior ao modelo de Korsmeyer-Peppas, os valores ($R_{aj} = 0,9849$ em pH 4,0 e $R_{aj} = 0,9267$ em pH 7,45) para o modelo de Weibull permanecem acima de 0,9, indicando uma boa correlação com os dados obtidos.

De acordo com o modelo de Weibull, valores do parâmetro b menores que 0,75 ($b = 0,615$ para pH 4,0 e $b = 0,4478$ para pH 7,45) são indicativos de difusão Fickiana, o que corrobora aos resultados obtidos pelo modelo de Korsmeyer-Peppas

(Papadopoulou *et al.*, 2006). Além disso, o modelo de Weibull permite avaliar o perfil da curva de dissolução. O parâmetro b define sua progressão: quando $b = 1$, o perfil é exponencial; para $b > 1$, a curva assume um formato sigmoidal; e quando $b < 1$, a curva tem perfil parabólico, com declive inicial acentuado seguido por um comportamento exponencial bifásico (Paarakh *et al.*, 2018).

Portanto, os resultados indicam que a liberação da progesterona pelas nanopartículas é baseada na liberação por difusão Fickiana com curva de liberação parabólica.

5.7 ESTUDO DE MUCOADESÃO *IN VITRO*

A mucoadesão é uma propriedade fundamental para avaliar a interação entre nanopartículas e a mucosa vaginal, pois essa interação contribui para a estabilidade do sistema na região e favorece a liberação prolongada do fármaco (Puri *et al.*, 2022; Valamla *et al.*, 2022; Obuobi *et al.*, 2024). Dessa forma, sabendo das propriedades de mucoadesão que a quitosana apresenta, foi avaliado qualitativamente as propriedades mucoadesivas das nanopartículas. Os resultados estão apresentados na Tabela 20 a seguir.

Tabela 20 - Eficiência de ligação, diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta da NPPG antes e após o contato com diferentes concentrações de mucina.

Concentração de mucina	Eficiência de ligação (%) $\pm$ DP	Diâmetro médio (nm) $\pm$ DP	Índice de polidispersão $\pm$ DP	Potencial zeta (mV) $\pm$ DP
NPPG antes do contato	-	259,20 $\pm$ 8,48	0,39 $\pm$ 0,09	+20,40 $\pm$ 0,20
0,08 mg. mL⁻¹	-	765,86 $\pm$ 56,87	0,51 $\pm$ 0,05	-14,76 $\pm$ 0,64
0,1 mg. mL⁻¹	14,43 $\pm$ 0,79	827,53 $\pm$ 5,09	0,49 $\pm$ 0,01	-14,13 $\pm$ 1,96
0,25 mg. mL⁻¹	27,97 $\pm$ 0,69	1036,00 $\pm$ 35,51	0,50 $\pm$ 0,04	-13,13 $\pm$ 0,35
0,5 mg.mL⁻¹	16,15 $\pm$ 0,29	1291,67 $\pm$ 168,73	0,54 $\pm$ 0,01	-12,53 $\pm$ 0,11

Fonte: A autora.

Antes do contato com a mucina, a NPPG apresentou potencial zeta de

+20,40 $\pm$ 0,20, indicando uma superfície carregada positivamente, o que favorece a interação eletrostática com a mucina. Após o contato com diferentes concentrações, observou-se a diminuição desse residual positivo no potencial zeta da NPPG, que pode ser explicado pela adsorção gradual da mucina carregada negativamente na camada superficial carregada positivamente das NPPG, uma vez que, quanto maior foi a concentração da solução de mucina menor foi o residual positivo observado para o potencial zeta. Essa adsorção da mucina na camada de quitosana é principalmente devido à forças eletrostática entre o ácido siálico carregado negativamente da mucina e o grupo amino carregado positivamente da quitosana (que é o material polimérico que constitui a camada superficial da NPPG) (Abruzzo *et al.*, 2021; Puri *et al.*, 2022; Valamla *et al.*, 2022). Essa mudança no potencial zeta reflete a significativa cobertura das nanopartículas pela mucina, confirmando o caráter mucoadesivo da NPPG.

Além disso, essa adsorção também é acompanhada pela contribuição de ligações de hidrogênio, efeitos hidrofóbicos e emaranhamento físico entre a mucina e a quitosana, que é comprovado pelo aumento do diâmetro das NPPG após o contato com a mucina, sendo essa relação concentração-dependente, pois conforme aumentou a concentração da mucina também aumentou seu tamanho (Abruzzo *et al.*, 2021). Essa adsorção da mucina parece não influenciar significativamente na heterogeneidade do meio, pois apesar do aumento no IPD observado, os valores de IPD mantiveram-se menores que 0,5, ou seja, o sistema preservou seu caráter homogêneo. Isto é importante em termos de movimento/difusão de nanopartículas através de uma camada mucosa *in vivo* (Hejjaji *et al.*, 2018).

Para contribuir com os resultados, a eficiência de ligação também foi analisada, por meio da absorbância das amostras. A eficiência de ligação variou conforme a concentração de mucina. Em 0,1 mg. mL⁻¹ a ligação foi de 14,43 $\pm$ 0,79 %. O aumento da concentração para 0,25 mg. mL⁻¹ apresentou a maior eficiência de ligação de 27,97 $\pm$ 0,69 %, sugerindo uma ligação mais intensa entre a NPPG e a mucina. Entretanto, ao elevar a concentração para 0,5 mg. mL⁻¹ observou-se uma diminuição da eficiência de ligação para 16,15 $\pm$ 0,29 %, o que pode ser associado a um efeito de saturação da superfície das nanopartículas ou a agregação entre moléculas de mucina, o que comprometem a interação com a nanopartícula. Esse efeito pode resultar na predominância das cargas negativas da mucina sobre as cargas positivas da nanopartícula, reduzindo a eficiência de ligação entre elas, o que

pode ser justificado pela menor potencial zeta ($-12,53 \pm 0,11$) obtido para essa concentração, já que se sabe que a mucoadesão é diretamente proporcional a carga positiva da nanopartícula (Abruzzo *et al.*, 2021; Puri *et al.*, 2022; Valamla *et al.*, 2022).

O fato dessas nanopartículas apresentarem propriedades mucoadesivas podem representar vantagens significativas para a sua administração na mucosa vaginal. A capacidade de adesão à mucosa vaginal pode prolongar a retenção local da progesterona, reduzir a sua toxicidade sistêmica e favorecer o controle da sua liberação no tecido. Isso melhora a biodisponibilidade, minimiza efeitos adversos, diminui a frequência de doses e consequentemente melhora a adesão do paciente. Ainda, a interação do nanosistema com a mucosa otimiza a permeabilidade e absorção do fármaco, potencializando sua eficácia (Puri *et al.*, 2022; Valamla *et al.*, 2022; Obuobi *et al.*, 2024).

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que as nanopartículas híbridas de lecitina e quitosana são sistemas promissores e eficazes para a encapsulação de progesterona. O método de síntese por injeção etanólica, aliado ao planejamento fatorial 3^2 , mostrou-se uma estratégia eficiente para a otimização de variáveis críticas, como tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação e teor de fármaco.

A formulação otimizada NPPG composta por 25 mg de quitosana e 10 mg apresentou características ideais para este tipo de sistema, tais como: tamanho nanométrico, baixo índice de polidispersão, potencial zeta positivo, altos valores de eficiência de encapsulação e teor de fármaco. A morfologia esférica e a superfície lisa, observadas nas análises por microscopia eletrônica de varredura com feixe de elétrons, corroboraram os resultados obtidos pela técnica de espalhamento dinâmico de luz. Além disso, as análises estruturais de FTIR sugerem o encapsulamento do fármaco, bem como sua amorfização durante o processo de encapsulamento visto pela técnica de DRX.

O estudo de estabilidade revelou que os valores positivos do potencial zeta desempenham um papel fundamental na manutenção da estabilidade das nanopartículas. Além disso, o armazenamento a 4 °C mostrou-se a opção mais

recomendada por preservar suas características físico-químicas.

Os resultados obtidos no ensaio de liberação *in vitro* demonstraram uma liberação controlada e progressiva da progesterona ao longo do tempo em pH 4,0 e pH 7,4. A cinética de liberação foi melhor ajustada pelo modelo Korsmeyer-Peppas e Weibull que caracterizaram o mecanismo de liberação da progesterona a partir das nanopartículas baseadas em transporte por difusão Fickiana com curva parabólica.

O estudo de mucoadesão *in vitro* evidenciou que a NPPG possui boa capacidade mucoadesiva, atribuída a carga positiva da quitosana. Essa é uma característica favorável, pois pode prolongar e intensificar o contato da progesterona com a mucosa vaginal aumentando sua absorção e eficácia.

Dessa forma, as nanopartículas híbridas de lecitina e quitosana demonstram ser um nanocarreador eficiente e promissor para a veiculação tópica da progesterona na mucosa vaginal, apresentando-se como uma alternativa aos tratamentos convencionais à base de progesterona.

REFERÊNCIAS

- ABOSABAA, S.A.; ARAFA, M.G.; ELMESHAD, A.N. Hybrid chitosan-lipid nanoparticles of green tea extract as natural anti-cellulite agent with superior *in vivo* potency: full synthesis and analysis. **Drug Delivery**. V. 28, ed. 1, p. 2160-2176, 2021.
- ABRUZZO, A. *et al.* Mucoadhesive and mucopenetrating chitosan nanoparticles for glycopeptide antibiotic administration. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 606, n. 120874. 2021.
- AFZAL, O. *et al.* Nanoparticles in Drug Delivery: From History to Therapeutic Applications. **Nanomaterials**. V. 12, n. 24:4494. 2022.
- ALAVI, S., HAERI, A., DADASHZADEH, S. Utilization of chitosan-caged liposomes to push the boundaries of therapeutic delivery. **Carbohydrate Polymers**. v. 157, p. 991-1012. 2017.
- ALKHOLIEF, M. Optimization of Lecithin-Chitosan nanoparticles for simultaneous encapsulation of doxorubicin and piperine. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v.22, p.204-214. 2019.
- ALMOMEN, A., CHO, S., YANG, C. H., LI, Z., JARBOE, E. A., PETERSON, C. M., HUH, K. M., & JANÁT-AMSBURY, M. M. Progesterone Hydrogel: A Safe and Effective New Formulation for Vaginal Application. **Pharms Res.**v.32, n. 7, p. 2266-2279.2015.
- ANAND, T. *et al.* A comparison between plain eugenol and eugenol-loaded chitosan nanoparticles for prevention of in vitro selenite-induced cataractogenesis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 65, 2021.
- ANDERSEN, T. *et al.* Chitosan-Based Nanomedicine to Fight Genital *Candida* Infections: Chitosomes. **Marine Drugs**. v. 15, n. 3, ed. 64. 2017.
- ASIF, A. *et al.* Development, Statistical Optimization and Characterization of Fluvastatin Loaded Solid Lipid Nanoparticles: A 32 Factorial Design Approach. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 3, p. 584, 8 mar. 2022.
- BARROS, L.A., TUFIK, S., ANDERSEN, M.L. The role of progesterone in memory: An overview of three decades. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**.v. 49, p. 193-204. 2015.
- BARROS, NETO, *et al.* Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. **Editores Unicamp**. 4^a edição. 2003.
- BHATIA, S. Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. *In*: BHATIA, S. **Natural Polymers Drug Delivery Systems**. 1. ed. Springer, p. 33-93, 2016.

BINESH, N.; FARHADIAN, N.; MOHAMMADZADEH, A. Enhanced antibacterial activity of uniform and stable chitosan nanoparticles containing metronidazole against anaerobic bacterium of *Bacteroids fragilis*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 202, 2021.

BRASIL. Resolução RDC no 166, de 24 de julho de 2017. Aprova o “**Critérios para a validação de métodos analíticos**”. Órgão emissor: Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em: 5 ago. 2024.

BULLETTI, C., BULLETTI, F. M., SCIORIO, R., & GUIDO, M. Progesterone: The Key Factor of the Beginning of Life. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 23, n. 22, p.2-25. 2022.

CARDIA MC, CARTA AR, CABONI P, MACCIONI AM, ERBÌ S, BOI L, MELONI MC, LAI F, SINICO C. Trimethyl Chitosan Hydrogel Nanoparticles for Progesterone Delivery in Neurodegenerative Disorders. **Pharmaceutics**. v.11, n.12:657. 2019.

CASARELLA, A.; TARANTINO, A.; DI DONNA, A. Revisiting DLVO theory to inform particle-scale modelling of clays. **Computers and Geotechnics**, v. 165, p. 105876, jan. 2024.

CHANPHAI, P. & TAJMIR-RIahi, H.A. Encapsulation of testosterone by chitosan nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**. V.98, p. 535-541. 2017.

CORREIA, A. *et al.* Pessaries containing nanostructured lipid carriers (NLC) for prolonged vaginal delivery of progesterone. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.153, n. 105475. 2020.

DALAGNOL, M. **Desenvolvimento de sistemas de liberação nano- e microestruturados constituídos de complexos de lecitina e quitosana para a liberação colônica da naringenina**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2011. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/95263/294995.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 7 abr. 2024.

DEHARIYA, P. *et al.* Design of experiment based formulation optimization of chitosan-coated nano-liposomes of progesterone for effective oral delivery. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. V. 13, n. 06, p. 256-270. 2023.

DENG, S. *et al.* Polymeric Nanocapsules as Nanotechnological Alternative for Drug Delivery System: Current Status.**Challenges and Opportunities. Nanomaterials**, v. 10, n. 5, p. 1-36, 2020.

DI RENZO, G.C. Progesterone in normal and pathological pregnancy. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**. v.27, n.1, p. 35–48. 2016.

DOS SANTOS, A. M. *et al.* Recent advances in hydrogels as strategy for drug delivery intended to vaginal infections. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 590, n. 119867. 2020.

DUBEY, V.; MOHAN, P.; DANGI, J. S.; KESAVAN, K. Brinzolamide loaded chitosan pectin mucoadhesive nanocapsules for management of glaucoma: Formulation, characterization and pharmacodynamic study. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 152, p. 1224-1232, 2019.

EL HADY, W.E. A, *et al.* Diosmin-loaded lipid chitosan hybrid nanoparticles boost the anti-inflammatory, antioxidant, and protective effects against acetic acid-induced colitis in rodents. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v.98; n.105846, 2024.

ELGINDY, N.A., MEHANNA, M.M., MOHYELDIN, S.M. Self-assembled nano-architecture liquid crystalline particles as a promising carrier for progesterone transdermal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**.v. 501, p.167-179. 2016.

ELHABAK, M.; IBRAHIM, S. & IBRAHIM, R.R. Intra-vaginal gemcitabine-hybrid nanoparticles for effective cervical cancer treatment. **OpenNano**. v.8, n. 100090, 2022.

ELMI, T. *et al.* In Vitro Antiprotozoal Effects of Nano-chitosan on Plasmodium falciparum, Giardia lamblia and Trichomonas vaginalis. **Acta Parasit.** v. 66, p.39–52, 2021.

ELMOWAFY, M. *et al.* Fatty alcohol containing nanostructured lipid carrier (NLC) for progesterone oral delivery: *In vitro* and *ex vivo* studies. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v.45, p. 230-239. 2018.

EL-SAY, K.M., EL-SAWY, H.S. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. **Int. J. Pharm.**v.528, ed. 1-2, p.675-691.2017.

ESPOSITO, E. *et al.* Progesterone lipid nanoparticles: Scaling up and in vivo human study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.119,p. 437-446. 2017.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopéia Brasileira: volume 2. Brasília: **Anvisa**. 2010.

FERENG, S.A. *et al.* Self-assembled tacrolimus-loaded lecithin-chitosan hybrid nanoparticles for *in vivo* management of psoriasis. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 608, n.12114,2011.

FOGOLARI, O. *et al.* Progesterone-loaded solid lipid nanoparticles for use in the regulation of the estrous cycle in female rats. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v. 88, n. 104954. 2023.

FRANK, L.A., *et al.* Chitosan as a coating material for nanoparticles intended for biomedical applications. **Reactive and Functional Polymers**. v. 147, n.104459, 2020.

GRAHAM, J.D., CLARKE, C.L. Physiological action of progesterone in target tissues. **Endocrine reviews**. v.18, n.4, p. 502–519. 1997.

GRUPTA, V. *et al.* Nanotechnology in Cosmetics and Cosmeceuticals—A Review of Latest Advancements. **Gels**.v. 8, n. 3:173.2022.

HAO, J. *et al.* Encapsulation of the flavonoid quercetin with chitosan-coated nano-liposomes. **LWT - Food Science and Technology**. v. 85, part. A, p. 37-44, 2017.

HOANG, T. *et al.* Development of a mucoinert progesterone nanosuspension for safer and more effective prevention of preterm birth.**Journal of controlled release:official journal of the Controlled Release Society**. v. 295, p.74-86, 2019.

HOSSAIN, M.R., MALLIK, A.K., RAHMAN, M.M Chapter 7 - Fundamentals of chitosan for biomedical applications. Handbook of Chitin and Chitosan. **Volume 3: Chitin and Chitosan based Polymer Materials for Various Applications**.p. 199-230. 2020.

ILK, S.; SAGLAM, N.; ÖZGEN, M. Kaempferol loaded lecithin/chitosan nanoparticles: preparation, characterization, and their potential applications as a sustainable antifungal agente. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**. v. 45, n. 5, p. 907–916. 2017.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Validation of analytical procedures: Text and methodology**. Q2(R1). London: ICH, 2005 (ICH Harmonised Tripartite Guideline).

JARDIM, K.V., SIQUEIRA, J.L.N, BÁO, S.N., SOUSA, M.H., PARIZE, A.L. The role of the lecithin addition in the properties and cytotoxic activity of chitosan and chondroitin sulfate nanoparticles containing curcumin. **Carbohydrate Polymers**. v.227, n. 115351. 2020.

JIANG, X. *et al.* Chitosan nanoparticles loaded with Eucommia ulmoides seed essential oil: Preparation, characterization, antioxidant and antibacterial Properties. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.257, ed. 2, n.128820. 2024.

JOACHIM, E. *et al.* Single intranasal administration of 17 β -estradiol loaded gelatin nanoparticles confers neuroprotection in the post-ischemic brain. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 29, n. 102246. 2020.

JØRAHOLMEN, M.W. *et al.* Chitosan-coated liposomes for topical vaginal therapy: Assuring localized drug effect. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 472, ed. 1-2, p.94-101. 2014.

JOSE, C. *et al.* Polymeric lipid hybrid nanoparticles: Properties and therapeutic applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 35, n. 6, p. 555–588, 2018.

KIM, S. Nanomateriais lipídicos imunomoduladores para entrega de produtos biofarmacêuticos. **Pharmaceutics**. v. 15, n.6:1760. 2023.

KOGA, A. Y. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade cicatrizante de nanopartículas contendo 17- β -estradiol e/ou óxido de zinco**. 2021. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa -PR. 2021. Disponível em: <https://tede2.uepg.br/jspui/bitstream/prefix/3394/1/Adriana%20Yuriko%20Koga.pdf>. Acesso em: 7 abr. 2024.

KUMAR, R.; ISLAM, T.; NURUNNABI, M. Mucoadhesive carriers for oral drug delivery. **Journal of Controlled Release**. V. 351, p. 504-559, 2022.

KUMAR, S. *et al.* A systematic study on chitosan-liposome based systems for biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 160, p.470-481. 2020.

LIA, J. *et al.* Molecular complexes of drug combinations: A review of cocrystals, salts, coamorphous systems and amorphous solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**. v.648, n.123555, 2023.

LEIMANN, F.V. *et al.* Characterization of progesterone loaded biodegradable blend polymeric nanoparticles. **Ciência Rural**. v.45, n.11, nov, 2015.

LIU, L. *et al.* Self-assembled lecithin/chitosan nanoparticles for oral insulin delivery: preparation and functional evaluation. **International journal of nanomedicine**. v.11,p. 761–769. 2016.

LIU, L. Efficient epidermal delivery of antibiotics by self-assembled lecithin/chitosan nanoparticles for enhanced therapy on epidermal bacterial infections. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.2018; p. 568-579, out, 2022.

MA, Q. *et al.* Self-Assembled chitosan/phospholipid nanoparticles: from fundamentals to preparation for advanced drug delivery. **Drug delivery**. v. 27, n.1, p.200-215. 2020.

MACHADO, A.R.; ASSIS, L.M.; MACHADO, M.I.R.; SOUZA-SOARES, L.A. Importance of lecithin for encapsulation processes. **African Journal of Food Science**. v. 8, n.4, p. 176- 183, 2014.

MALEKI, A.; KARIMPOUR, A.; MALEKI DIZAJ, S. The role of mechanical engineering in the development of nano drug delivery systems; a review. **International Journal of Nano Dimension**. v. 9, n. 1, p. 1–6, 2018.

MANDAL, B. *et al.* Core-shell lipid polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and medicine**. v. 9, ed. 4, p. 474-491. 2013.

MANSURI, S. *et al.* Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. **Reactive and Functional Polymers**, v. 100, p. 151- 172, 2016.

MEHANDOLE, A. *et al.* Dasatinib loaded mucoadhesive lecithin-chitosan hybrid nanoparticles for its augmented oral delivery, in-vitro efficacy and safety. **International Journal of Pharmaceutics**. v.651; n. 123784, 2024.

MFOAFO, K.; OMIDI, Y.; OMIDIAN, H. Thermoresponsive mucoadhesive hybrid gels in advanced drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 635, n. 122799, 2023.

MOLINA, P. E. Fisiologia Endócrina. 2ª ed. São Paulo, SP: **McGraw-Hill**, 2007.

MUKHERJEE, A. *et al.* Lipid–polymer hybrid nanoparticles as a next-generation drug delivery platform: state of the art, emerging technologies, and perspectives. **International Journal of Nanomedicine**. v. 14, p. 1937-1952, 2019.

MURTHY, A. *et al.* Self-assembled lecithin-chitosan nanoparticles improve the oral bioavailability and alter the pharmacokinetics of raloxifene. **International Journal of Pharmaceutics**. v.588, n. 119731. 2020.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2024). **PubChem Compound Summary for CID 5994, Progesterone**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Progesterone>. Acesso em: 5 abr. 2024.

NING, S. *et al.* Lecithin/chitosan nanoparticle drug carrier improves anti-tumor efficacy of *Monascus* pigment rubropunctatin. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 242, n. 125058, 2023.

OBUOBI, S. & Škalko-Basnet, N. Understanding vaginal biofilms: The first step in harnessing antimicrobial nanomedicine. **Journal of Controlled Release**. v.376, p. 1190–1208, 2024.

OJO, O.A. *et al.* Apoptosis, inflammation, and oxidative stress in infertility: A mini review. **Toxicology Reports**. V. 10, p. 448-462.2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Relatório da OMS diz que 1 em cada 6 pessoas, no mundo, é afetada por infertilidade**. Nações Unidas. 2023. Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2023/04/1812312>. Acesso em: 30 abr. 2024.

PAARAKH, M. P. *et al.* Release kinetics – concepts and applications. **International Journal of Pharmacy Research & Technology**, v. 8, n. 1, p. 12-20, 2018.

PAIVA, N. A. **Citotoxicidade da Curcumina presente em nanopartículas de quitosana/sulfato de condroína contendo lecitina**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências de Biomateriais) – Universidade de Brasília, Brasília. 2015.

PANDEY, M., CHOUDHURY, H.; ABDUL-AZIZ, A.; BHATTAMISRA, S.K.; GORAIN, B.; CARINE, T.; WEE TOONG, T.; YI, N.J.; WIN YI, L. Promising Drug Delivery Approaches to Treat Microbial Infections in the Vagina: A Recent Update. **Polymers**. v.13, n.1. 2021.

PAPADOPOULOU V, KOSMIDIS K, VLACHOU M, MACHERAS P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**.v. 309, ed.1-2, p.44-50, 2006.

PARVEEN, S. *et al.* Lipid polymer hybrid nanoparticles as potent vehicles for drug delivery in cancer therapeutics. **Medicine in Drug Discovery**. v. 20, n. 100165. 2023.

PATIL, N., MAHESHWARI, R., WAIRKAR, S. Advances in progesterone delivery systems: Still work in progress? **International Journal of Pharmaceutics**. v. 643, n. 123250. 2023.

PUKALE, S.S. *et al.* Coenzyme Q10 loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles in gel for the treatment of psoriasis like skin condition. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v. 76, n. 103672, 2022.

PURI, V. *et al.* Recent advances on drug delivery applications of mucopenetrative/mucoadhesive particles: A review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. V.75, n.103712, 2022.

RAMPINO, A. *et al.* Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, p. 219-228, 2013.

ROBY, K.F. Synthesis, Secretion, and Action of Estrogen and Progesterone. **Reference Module in Biomedical Sciences**. Elsevier. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11378-9>. Acesso em: 7 abr. 2024.

RUAN, X.; MUECK, A. O. Systemic progesterone therapy: oral, vaginal, injections and even transdermal. **Maturitas**, v.79, p.248–255. 2014.

SAHU, T. *et al.* Nanotechnology based drug delivery system: Current strategies and emerging therapeutic potential for medical Science. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 63, n.102487, p. 1-15, 2021.

SALEM, H. F., *et al.* Progesterone-loaded nanosized transethosomes for vaginal permeation enhancement: formulation, statistical optimization, and clinical evaluation in anovulatory polycystic ovary syndrome. **Journal of Liposome Research**, v.29, ed. 2, p. 183–194. 2019.

SCHAFFAZICK, S. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**. v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SENYIGIT, T., *et al.* Lecithin/chitosan nanoparticles of clobetasol-17- propionate capable of accumulation in pig skin. **Journal of Controlled Release**.v.142, p.368-373.2010.

SHAH, S. *et al.* Lipid polymer hybrid nanocarriers: Insights into synthesis aspects, characterization, release mechanisms, surface functionalization and potential implications. **Colloid and Interface Science Communications**. V. 46, n. 10570. 2022.

SHAH, S., *et al.* PEG-coated folic acid-modified superparamagnetic MnFe₂O₄ nanoparticles for hyperthermia therapy and drug delivery. **Materials Chemistry and Physics**. v. 486,p. 703-708, mar. 2013.

SHAIKH, R. *et al.* Mucoadhesive drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**. v. 3, n. 1, p. 89–100, 2011.

SILVERBERG, K. M., VAUGHN, T. C., HANSARD, L. J., BURGER, N. Z., & MINTER, T. Vaginal (Crinone 8%) gel vs. intramuscular progesterone in oil for luteal phase support in in vitro fertilization: a large prospective trial. **Fertil Steril**. v. 97, n.2, p.344–348. 2012.

SIVADASAN, D. *et al.* Polymeric Lipid Hybrid Nanoparticles (PLNs) as Emerging Drug Delivery Platform-A Comprehensive Review of Their Properties, Preparation Methods, and Therapeutic Applications. **Pharmaceutics**. V. 13, n. 8:1291,2021.

SOARES,D.C.F. *et al.* Polymer-hybrid nanoparticles: Current advances in biomedical applications. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v.131, n.110695, 2020.

SON, G.H., LEE, B.J., CHO, C.W.Mechanisms of drug release from advanced drug formulations such as polymeric-based drug-delivery systems and lipid nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Investigation**. v. 47, p. 287–296. 2017.

SONVICO, F. *et al.* Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 324, p. 67-73.2006.

SOUZA, M.P., *et al.* Quercetin-Loaded Lecithin/Chitosan Nanoparticles for Functional Food Applications. **Food Bioprocess Technol**.v. 7, p. 1149-1159.2014.

SOUTO, E.B.; SEVERINO,P.; SANTANA, M.H.A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de Polímeros Pré-formados – Parte II. **Polímeros**.vol. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

SULTANA, A. *et al.* Nano-based drug delivery systems: Conventional drug delivery routes, recent developments and future prospects. **Medicine in Drug Discovery**.v.15, n.100134. 2022.

TAJBAKSHI, M. et al. An investigation on parameters affecting the optimization of testosterone enanthate loaded solid nanoparticles for enhanced transdermal delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 589, n. 124437. 2020.

TAN, Q. Preparation and evaluation of quercetin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for topical delivery. **International Journal of Nanomedicine**.v. 6,p. 1621-1630, 2011.

TAYLOR, J. et al. Nanomedicine strategies to improve therapeutic agents for the prevention and treatment of preterm birth and future directions. **Nanoscale Advances**. v.5; Ed. 7; p.1870-1889. 2023.

TOMA, H.E. Nanotecnologia Molecular: Materiais e Dispositivos, 1ª ed.; **Editora Blucher**: São Paulo, 2016.

TIAN, B. et al. Synthesis of β -acids loaded chitosan-sodium tripolyphosphate nanoparticle towards controlled release, antibacterial and anticancer activity. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.257, ed.2; n. 128719;2024.

TOMODA, K., et al. Enhanced transdermal permeability of estradiol using combination of PLGA nanoparticles system and iontophoresis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. V. 97, p. 84-89. 2012.

TUNDISI, L.L., et al. Nanotechnology as a tool to overcome macromolecules delivery issues. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. V.222, n. 113043. 2023.

TUSHAR, D. et al. Lipid-polymer hybrid nanocarriers for delivering cancer therapeutics. **Journal of Controlled Release**. v. 271, p. 60-73. 2018.

VALAMLA, B. et al. Engineering drug delivery systems to overcome the vaginal mucosal barrier: Current understanding and research agenda of mucoadhesive formulations of vaginal delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v. 70, n. 103162. 2022.

VALENCIA, M.S., et al. Characterization of curcumin-loaded lecithin-chitosan bioactive nanoparticles. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**.v. 2, n. 100119. 2021.

WAHAB, S. et al. Current trends and future perspectives of nanomedicine for the management of colon cancer. **European Journal of Pharmacology**, v. 910, nov. 2021.

WANG, M. et al. Chitosan-modified cholesterol-free liposomes for improving the oral bioavailability of progesterone. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 159, p.580-585. 2017.

WONG, H.L. et al. Development of Solid Lipid Nanoparticles Containing Ionically Complexed Chemotherapeutic Drug and Chemosensitizers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 93, n.8, 2004.

WU , X. Y. Strategies for optimizing polymer-lipid hybrid nanoparticle-mediated drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**. v. 13, n. 5, p. 609–612, 2016.

YADAV, M., KAUSHIK, B., RAO, G.K., SRIVASTAVA, C.M., VAYA, D. Advances and challenges in the use of chitosan and its derivatives in biomedical fields: A review. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**. v.5, n.100323. 2023.

YU, C.W. *et al.* Comparing the effects of two different progesterone vaginal gels, Progeson™ and Crinone™, from pharmacokinetics study to clinical applications in patients undergone fresh embryo transfer and frozenthawed embryo transfer via natural cycle endometrial preparation protocol. **Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology**. V. 62, ed. 2, p. 280-285. 2023.

YUAN, H., *et al.* Preparation and characteristics of nanostructured lipid carriers for control-releasing progesterone by melt-emulsification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. V.60, ed. 2, p. 174-179, 2007.

ZARGAR, V., ASGHARI, M., DASHTI, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. **ChemBioEng Ver**. v.2, n. 3, p. 204–226. 2015.

ZHANG, Y. *et al.* Copolymer Composition and Nanoparticle Configuration Enhance in vitro Drug Release Behavior of Poorly Water-soluble Progesterone for Oral Formulations. **International Journal of Nanomedicine**. v. 15, p. 5389-5403. 2020.

ZHANG, C. *et al.* Fresh, mechanical and microstructural properties of alkali-activated composites incorporating nanomaterials: A comprehensive review. **Journal of Cleaner Production**. v. 384, n. 135390, 2023.