



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CEILÂNDIA

CURSO DE FARMÁCIA

VICTOR CARLOS MELLO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS, BASEADAS
EM MANTEIGAS NATURAIS DA AMAZÔNIA, PARA CARREAMENTO DE
FÁRMACOS**

BRASÍLIA, 2018

VICTOR CARLOS MELLO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS, BASEADAS
EM MANTEIGAS NATURAIS DA AMAZÔNIA, PARA CARREAMENTO DE
FÁRMACOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília.

Orientador: Luis Alexandre Muehlmann

Brasília, 2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SV645d Silva, Victor Carlos
DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS,
BASEADAS EM MANTEIGAS NATURAIS DA AMAZÔNIA, PARA CARREAMENTO
DE FÁRMACOS. / Victor Carlos Silva; orientador Luis
Alexandre Muehlmann. -- Brasília, 2018.
33 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2018.

1. nanopartículas lipídicas sólidas. 2. nanotecnologia. 3.
manteigas naturais. I. Muehlmann, Luis Alexandre, orient.
II. Título.

VICTOR CARLOS MELLO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS, BASEADAS
EM MANTEIGAS NATURAIS DA AMAZÔNIA, PARA CARREAMENTO DE
FÁRMACOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília.

Orientador: Luis Alexandre Muehlmann

Brasília, 2018

VICTOR CARLOS MELLO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS, BASEADAS
EM MANTEIGAS NATURAIS DA AMAZÔNIA, PARA CARREAMENTO DE
FÁRMACOS**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann

(FCE/Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Graziella Anselmo Joanitti

(FCE/Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Kariane Mendes Nunes

(Universidade Federal do Oeste do Pará)

Brasília, 2018

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem o apoio e colaboração de muitos. Assim, venho agradecer a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este momento chegasse.

Primeiramente, gostaria de agradecer o meu grande orientador LUIS ALEXANDRE por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa por quase 5 anos. E ter proporcionado um ambiente onde eu aprimorasse minha prática em laboratório, aprendesse novas técnicas e conhecesse ótimas pessoas. Assim, pude crescer não só como profissional, mas também como pessoa.

Agradeço ao MOSAR por ter sido meu primeiro orientador, tenho certeza que eu não poderia ter tido um primeiro “chefe” mais paciente. Com a RAY foi meio difícil, ela é muito organizada e eu o oposto, então, obrigado por me fazer tentar melhorar sempre. Ainda falando dos amigos de laboratório, um grande beijo de agradecimento aos meus Nano Pocs: MARINA, VICTOR, GABS E GOODJACK. Acho que se não fosse vocês eu já teria desistido logo no primeiro MTT que deu errado.

Agradeço aos meus amigos do EGONHA: AMANDS, CAMIS, GABS, IVS, ANA KRAUSE, BRUBS, JEIDI e FERNANDS, que fizeram da minha graduação uma fase cheia de boas lembranças e bons momentos. Agradeço ao LUCAS, MARINA e IVAN por não enjoarem de mim e estarem sempre presentes nos bons e maus momentos. Beijos bbs amo vocês. E agradeço imensamente Ana Lidia e Stefanie pelos conselhos e boa amizade durante esses anos.

Bom, poucas pessoas podem dizer que tiveram amigas de quase 15 anos... eu tive! CAROL, ERIKA, KELLEN E ISA, obrigado pelas inúmeras risadas, noites do pijama, jogos de tabuleiro, rolês furados, bombas, elefantes, mil molhos, calafs, la ursas e por todos esses anos. Saudades!

Por fim e mais importante... MAMÃE, PAPAI E VOVÓ, obrigado por me proporcionarem educação de qualidade e um lar cheio de amor e compreensão, tudo que eu sou hoje é por vocês. Amo vocês!

Gostaria de agradecer as professoras GRAZI E KARI pelo aceite da banca, bem como a todos os professores da FCE, que foram essenciais para minha formação.

RESUMO

A floresta amazônica tem enorme riqueza e diversidade quando se trata de plantas oleaginosas, assim, torna-se única. Investimento científico nas manteigas amazônicas pode agregar valor a elas, aos seus derivados, e possibilitar futuras aplicações tecnológicas, inclusive em nanotecnologia. Uma moderna aplicação tecnológica é a produção de nanopartículas, que em termos gerais, têm propósito de tornar medicamentos mais seguros e eficazes. Dentre os inúmeros tipos destas, destaca-se a nanopartícula lipídica sólida (NLS). As NLSs possuem uma alta estabilidade, o sistema é pouco tóxico, não é necessário o uso de solventes orgânicos em seu desenvolvimento e têm possibilidade de produção em escala industrial. Desta maneira, este plano de trabalho visou desenvolver nanopartículas lipídicas sólidas, utilizando em sua composição manteigas naturais da Amazônia, dentro do contexto da nanotecnologia verde. As nanopartículas do presente trabalho foram preparadas pelo método de temperatura de inversão de fases (PIT). Ao final, sete formulações foram escolhidas para os testes seguintes. Para avaliar o efeito citotóxico das formulações obtidas, as células NIH 3T3 (fibroblastos murinos) foram incubadas com diferentes concentrações das formulações desenvolvidas. Então foi avaliada a redução na viabilidade celular com o teste de MTT. A composição das formulações desenvolvidas e baixa toxicidade permitem a administração por via oral, tópica ou até parenteral, reforçando o amplo espectro de aplicações das nanopartículas desenvolvidas.

Palavras Chave: nanopartículas lipídicas sólidas, nanotecnologia, manteigas naturais

ABSTRACT

The Amazon rainforest has enormous wealth and diversity when it comes to oleaginous plants, so it becomes unique. Scientific investment in Amazonian butters can add value to this, its derivatives, and enable future technological applications, including in nanotechnology. A modern technological application is the production of nanoparticles, which in general terms, are intended to make medicines safer and more effective. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) are promising drug release systems, and may be described in a simplified manner as nanoemulsions which the internal phase consists of lipid in a solid state. In this way, this work plan aimed to develop solid lipid nanoparticles, using in their composition natural butters from Amazonia, within the context of green nanotechnology. The solid lipid nanoparticles were prepared by a phase inversion temperature (PIT) method. Seven formulations based on Amazonian butters were developed in the present study, which presented an average diameter ranging from 20nm to 230nm, thus providing a broad spectrum of technological applications. All PDIs were below 0.200, which shows homogeneity of the samples. The results on cytotoxicity indicated a low toxicity on the NIH-3T3 cell line.

Keywords: nanostructured lipid carrier, SLN, NLC, nanotechnology, natural butters

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Influence of the concentration of Muru-Muru butter, Ucuuba butter, Cacao butter, Babassu oil, Cupuaçu butter and Bacuri butter in the lipid mix.	21
Figure 2. Macroscopic aspect of solid lipid nanoparticle final formulations.	22
Figura 3. SEM photomicrographs of NLB formulation.	24
Figura 4. TEM photomicrographs of NLM formulation.	25
Figura 5. Cell viability assay (MTT) in Murine Fibroblast cells (NIH-3T3) exposed at different concentrations.	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and its components.	18
Tabela 2. Composition of solid lipid nanoparticles (SLN).	22
Tabela 3. Colloidal characteristics of solid lipid nanoparticles (SLN).	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
IC 50 %	Concentração que reduz em 50 % a viabilidade celular
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo
NLC	Nanostructured Lipid Carrier
NLS	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
PBS	Tampão Fosfato Salina
PDI	Índice de Polidispersão
PIT	Phase Inversion Temperature
SEM	Scanning Electron Microscope
SLN	Solid Lipid Nanoparticle
TEM	Transmission Electron Microscopy

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	9
SUMÁRIO.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS).....	12
1.2. Técnicas de preparo.....	12
1.2.1 <i>Emulsificação e evaporação do solvente</i>	12
1.2.2. <i>Homogeneização de alta pressão</i>	13
1.2.3 <i>Modelo a partir de microemulsões</i>	13
1.2.4 <i>Técnica de inversão de fases (PIT)</i>	13
1.3 Técnicas de caracterização das Nanopartículas lipídicas sólidas.....	14
1.3.1 <i>Avaliação morfológica</i>	14
1.3.2 <i>Diâmetro Hidrodinâmico</i>	14
1.3.3 <i>Potencial Zeta</i>	15
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo Geral	15
3.2. Objetivos específicos.....	15

4. Development of Solid Lipid Nanoparticles, based on natural Amazonian lipids, for drug delivery	16
4.1. Abstract	16
4.2. Introduction	17
4.3. Materials and Methods	17
4.4. Results and Discussion	20
4.5. Conclusions	27
4.6. References	27
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

1.INTRODUÇÃO

1.1 Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são partículas com diâmetros médios menores que 1000nm. São constituídas por uma matriz lipídica sólida – composta geralmente de glicerídeos, ácidos graxos ou ceras –, estabilizada por surfactantes fisiologicamente compatíveis (CORRIAS; LAI, 2011). Introduzidas por volta de 1990, as NLS estão a frente quando se trata de sistemas de liberação para a entrega de fármacos. Vieram como uma alternativa segura e eficaz para sistemas já existentes – nanopartículas poliméricas, nanoemulsões e lipossomas – e está a uma geração acima das emulsões lipídicas, nas quais os lipídeos líquidos (óleos) são substituídos por lipídeos sólidos à temperatura ambiente. Em virtude da estrutura sólida, é concedida uma menor mobilidade aos ativos nela incorporados, por conseguinte, é possível sustentar ou mesmo controlar a liberação dessas substâncias (MUKHERJEE, 2009; PARDESHI, 2012; CORRIAS 2011). Conforme a composição da NLS, ou estrutura do fármaco incorporado, o ativo pode ser encontrado disperso na matriz lipídica, na parede lipídica ou mesmo aderido à superfície do sistema. (SCHÄFER-KORTING et al., 2007). É possível listar consideráveis vantagens deste sistema de liberação. Elas possuem uma alta estabilidade, o sistema não é tóxico, não é necessário o uso de solventes orgânicos tóxicos em seu desenvolvimento, e tem possibilidade de produção em escala industrial (RUKTANONCHAI, 2009).

1.2 Técnicas de preparo

São inúmeras as formas de preparação de nanopartículas lipídicas sólidas, cada uma com suas singularidades. A partir de cada técnica podem ser formadas nanopartículas com características diferentes. A seguir, estão descritas as metodologias mais comumente utilizadas.

1.2.1 Emulsificação e evaporação do solvente

A técnica consiste na dissolução da matriz lipídica em solventes orgânicos – etanol, acetona e isopropanol são exemplos –. A solução então é vertida em água sob agitação, e por fim o solvente deve ser evaporado para que os lipídeos se precipitem

em nanopartículas na fase aquosa (WISSING et al., 2004; CORRIAS, 2011). Uma das principais vantagens dessa técnica é que não é necessária a utilização de altas temperaturas. Assim, é adequado para encapsulação de drogas termosensíveis (CORRIAS, 2011).

1.2.2 Homogeneização de alta pressão

A dispersão de lipídeos é sugada em alta pressão (100 a 2000 bar), por um pistão de escala nanométrica, onde a dispersão será acelerada a uma alta velocidade por uma curta distância. Após ser submetido a este estresse, forças de cavitação romperão as gotículas e então serão formadas as nanogotículas. O homogeneizador de alta pressão, equipamento utilizado na técnica, pode ser utilizado tanto com a dispersão – matriz lipídica e fármaco – quente ou também a frio. É importante salientar que o tipo de homogeneizador, o número de ciclos, a temperatura empregada e a pressão aplicada, tem influência sobre as características físico-químicas das nanopartículas formadas (CORRIAS, 2011; WISSING et al., 2004).

1.2.3 Modelo a partir de microemulsões

Inicialmente desenvolvida por Gasco e colaboradores (2016), a técnica vem sofrendo inúmeras adaptações por muitos pesquisadores. Basicamente prepara-se vertendo sob agitação uma microemulsão ainda quente em água gelada, então, o excesso de água é retirado por liofilização ou ultracentrifugação. Devem ser utilizados lipídeos de baixo ponto de fusão. Assim, quando a matriz lipídica entra em contato com a água gelada, as nanogotas lipídicas se solidificarão, formando assim as NLSs (CORRIAS; LAI, 2011).

1.2.4 Técnica de inversão de fases (PIT)

O método de inversão de fases (PIT) é definido como a temperatura em que as propriedades hidrofílicas e lipofílicas de um surfactante não iônico se equilibram. Na técnica de inversão de fases usa-se a capacidade específica de alguns surfactantes polietoxilados, em modificar suas afinidades com água e óleo em função da temperatura. Na preparação, a utilização desse tipo de surfactante leva a uma inversão do tipo: macro emulsão óleo em água (O/A) para uma macroemulsão água em óleo (A/O), durante o aumento de temperatura. E durante o arrefecimento ocorre

a inversão novamente de uma macroemulsão (A/O) para uma nanoemulsão (O/A) (CORRIAS; LAI, 2011).

1.3 Técnicas de caracterização das Nanopartículas lipídicas sólidas

Compreender as nanopartículas lipídicas sólidas desenvolvidas é uma etapa crucial para escolher melhor a aplicação desta. Assim, conhecer parâmetros físico-químicos da NLS torna-se essencial para o sucesso no desenvolvimento desse sistema de liberação. A caracterização das NLS reúne: A avaliação morfológica da partícula, determinação de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico, determinação da quantidade de fármaco associado às partículas, a cinética de liberação do fármaco e o acompanhando dos parâmetros citados em função do tempo e temperatura de armazenamento (TAVEIRA, 2009; MEYAGUSKU, 2014).

1.3.1 Avaliação morfológica

Para a avaliação morfológica utilizam-se especialmente as microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e transmissão (MET) ou mesmo microscopia de força atômica. Com esta última, é possível obter informações de alta resolução em três dimensões das nanopartículas e ainda é capaz de detalhar a superfície da partícula a nível atômico (TAVEIRA, 2009; MEYAGUSKU, 2014).

1.3.2 Diâmetro Hidrodinâmico

O diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta são frequentemente utilizados não apenas para caracterização de NLS, como também de nanopartículas em geral. Para formulações adequadas, são aceitos tamanhos menores que 1000nm e baixo índice de polidispersão (PDI), este índice informa o grau de homogeneidade de uma amostra: quanto menor o seu valor, mais homogêneos serão os diâmetros da amostra. O diâmetro e PDI de uma NLS podem ser influenciados por alguns parâmetros, os principais são: a composição da matriz lipídica e o método de produção, como já citado anteriormente. Pode-se usar como exemplo a quantidade de surfactante utilizada, pois ao aumentar a sua proporção, as nanopartículas tendem a ficar menores (TAVEIRA, 2009; MEYAGUSKU, 2014).

1.3.3 Potencial Zeta

O potencial zeta (PZ) indica o potencial de superfície das partículas, influenciado por alterações na interface da partícula com o meio dispersante. Este parâmetro permite prever a estabilidade da formulação, visto que, é comum que a agregação das partículas seja menor se houver repulsão eletrostática entre elas. E também é possível prever possíveis interações com o fármaco incorporado (TAVEIRA, 2009; MEYAGUSKU, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

É latente a necessidade de desenvolvimento sustentável dos produtos locais amazônicos com redução da geração de resíduos. Desta maneira, este trabalho visou desenvolver nanopartículas lipídicas sólidas, utilizando em sua composição manteigas naturais da Amazônia – Babaçu (*A. speciosa*), Cupuaçu (*T. grandiflorum*), Cacau (*T. cacao*), Bacuri (*P. insignis*), Ucuuba (*V. surinamensis*) e Muru-Muru (*A. murumuru*) – dentro do contexto da nanotecnologia verde, visto que o trabalho, possui uma metodologia de baixa energia e livre de solventes orgânicos tóxicos, além de utilizar manteigas oriundas das sementes dos frutos, que possuem baixo valor comercial, agregando valor a estes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver nanopartículas lipídicas sólidas, utilizando em sua composição manteigas naturais da Amazônia – Babaçu (*A. speciosa*), Cupuaçu (*T. grandiflorum*), Cacau (*T. cacao*), Bacuri (*P. insignis*), Ucuuba (*V. surinamensis*) e Muru-Muru (*A. murumuru*) –.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver nanopartículas lipídicas sólidas utilizando manteigas amazônicas;
- Analisar parâmetros físico-químicos das nanopartículas desenvolvidas;
- Verificar a toxicidade in vitro em fibroblastos murinos (NIH-3T3).

Development of Solid Lipid Nanoparticles, based on natural Amazonian lipids, for drug delivery.

Victor Carlos Mello da Silva¹, Luis Alexandre Muehlmann^{1*}

¹ *Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília 72220275, Brasil*

ABSTRACT

The Amazon rainforest has enormous wealth and diversity when it comes to oleaginous plants, so it becomes unique. Scientific investment in Amazonian butters can add value to this, its derivatives, and enable future technological applications, including in nanotechnology. A modern technological application is the production of nanoparticles, which in general terms, are intended to make medicines safer and more effective. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) are promising drug release systems, and may be described in a simplified manner as nanoemulsions which the internal phase consists of lipid in a solid state. In this way, this work plan aimed to develop solid lipid nanoparticles, using in their composition natural butters from Amazonia, within the context of green nanotechnology. The solid lipid nanoparticles were prepared by a phase inversion temperature (PIT) method, and in the end, seven formulations with different combinations of lipid matrix were chosen for the subsequent tests, based on its colloidal properties. To evaluate the cytotoxic effect of the formulations obtained, NIH 3T3 cells (murine fibroblasts) were incubated with different concentrations of the developed formulations. The NLB formulation has the lowest IC₅₀ (3.846 mg / mL), which means a concentration of 3,846 mg/mL is required for cell viability to decrease by 50%. In contrast, the formulations NLSC and NLM were not cytotoxic against NIH-3T3 cells even at the highest concentration. Its composition and low toxicity allows administration by oral, topical or even parenteral, reinforcing the wide spectrum of applications.

Keywords: nanostructured lipid carrier, SLN, NLC, nanotechnology, natural butters.

INTRODUCTION

The Amazon rainforest has enormous wealth and diversity when it comes to oleaginous plants, so it becomes unique. Although in recent years this region has become a major food production hub in Brazil, many products, such as native butter in the region, traditionally used by local communities, have not yet been significantly inserted in the context of Brazilian agribusiness, either by sociocultural aspects, extractivist exploitation, lack of technology for production, or even by the lack of scientific knowledge in the subject ¹. Scientific investment in butters can add value to this, its derivatives, and enable future technological applications, including in nanotechnology. A modern technological application is the production of nanoparticles, which in general terms, are intended to make medicines safer and more effective.². Among the many types of these, the solid lipid nanoparticle (SLN) stands out. The SLNs have a high stability, the system is a little toxic, it is not necessary to use organic solvents in its development, and it has the possibility of industrial scale production. ³ SLNs can be administered orally, parenterally or transdermally. The increase in the production of nanomaterials and their extensive use in several industries also increases the production of impurities, including remnants of toxic solvents and of the raw materials used. Green nanotechnology comes to reduce these unwanted consequences using common or naturally occurring reagents in nanoparticle composition. ⁴ In this way, this work plan aimed to develop solid lipid nanoparticles, using in their composition natural butters from Amazonia, within the context of green nanotechnology.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Babassu oil and butters from Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), Bacuri (*Platonia insignis*), Ucuuba (*Virola surinamensis*), Murumuru (*Astrocaryum murumuru*), Cacao (*Theobroma cacao*) and Babassu (*Attalea speciosa*) were obtained from Amazon oil, Brazil. Dimethyl sulfoxide (DMSO), Tween 80, Span 20, Compritol® 888 ATO and Kholiphor® HS were obtained from Sigma, USA. The Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) were obtained from Gibco, EUA. The 3-(4,5-

dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was purchased from Invitrogen, EUA. The phosphate buffered saline (PBS) was supplied by Laborclin, Brazil.

Preparation. The solid lipid nanoparticles were prepared by a phase inversion temperature (PIT) method, and in the end, seven formulations with different combinations of lipid matrix were chosen for the subsequent tests, based on its colloidal properties.

Table 1. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and its components.

	Natural Lipid	Surfactant
NLM	Muru Muru	Twenn 80/Span 20 (4:1)
NLMM	Muru Muru	Kolliphor [®] HS
NLU	Ucuuba	Twenn 80/Span 20 (4:1)
NLC	Cacau	Kolliphor [®] HS
NLB	Babassu	Kolliphor [®] HS
NLBA	Bacuri	Kolliphor [®] HS
NLSC	Cupuaçu	Kolliphor [®] HS

Then, different proportions of lipids, and different ratios of the surfactants to the lipid mix were tested. In brief, the lipid mix and surfactant were mixed at 60 °C, under magnetic stirring (350 RPM) for 5 minutes. Then, this mixture was diluted with water (1:10, w:v), and the coarse emulsion formed was then heated to 75 °C (formulations which used the Kolliphor[®] HS) or 91 °C (formulations which used the mix Tween/Span). The transparent emulsion was left to cool to room temperature, with the nanostructured lipid carriers being formed by the solidification of lipid/surfactant droplets.

Evaluation of colloidal properties. The mean particle size and polydispersity index (PDI) of NLC were evaluated at 25 °C by photon correlation spectroscopy and electrophoretic laser Doppler velocimetry (ZetaSizer Nano ZS[®], Malvern Instruments,

Malvern, UK) with the angle of 90°. Prior to measurement, samples were diluted with water distilled (1:10, v:v).

Morphology. The determination of SLNs morphology was performed by scanning electron microscopy (A) and transmission electron microscopy (B). (A) Employing scanning electron microscope JEOL. A drop of them was applied to the stub surface containing a carbon tape and let to natural drying. Then the stub containing sample was coated with copper, aiming to create a conductive layer on the surface. Subsequently, micrographs were obtained using electron beam of 15 KV. (B) Employing Transmission electron microscope JEOL operating at 120 kV, with an increase of 120,000 times. The suspensions were diluted 1:10 (v / v) in Milli-Q® water and deposited directly into the carbon coated grids used for the observation of the samples using as contrast solution of Osmium. For morphological analysis the Transmission electron microscope TEM was operated in bright field mode with magnification above 10,000 times.

Biological assays

Cell culture. Murine fibroblasts (NIH-3T3) were maintained in DMEM supplemented with 10% (v:v) FBS and 1% (v:v) antibiotic solution. Cells were kept in an incubator under a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C.

***In vitro* treatment design.** The cells were culture for 24 h at an initial concentration of 1×10⁴ cells per well, washed twice with PBS, and then exposed for 24 h to 100 µL of culture medium containing different concentrations of NLCs. Then, the cells were washed with PBS. The control consisted of cells that received only culture medium. Then the cells were washed with PBS, cultured for further 24 h, and their viability was measured.

Cell viability assay. The cells were treated as described above, then exposed to 200 µL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution (0.5 mg/mL in culture medium), as previously described¹⁸. Next, the MTT solution was removed, the cells were washed with PBS, and the formazan formed by viable cells was extracted with 200 µL DMSO. The absorption at λ 595 nm was then measured using a spectrophotometer (SpectramaxM2; Molecular Devices LLC). This experiment was performed in sextuplicate for each treatment, and the results were expressed as

percentages relative to control. Two-way ANOVA was performed with Bonferroni post-test, for comparison between treatments and concentrations at different times, the analysis of the repeatability of the data by the calculation of the Intraclass Correction Interval at 95% by means of the program GraphPad prism version 6.0.

RESULTS AND DISCUSSION

Solid Lipid Nanoparticle. For the development of these nanostructures, different proportions of Compritol® 888 ATO and Natural Lipids were tested. Based on previous formulations, the amount of surfactant in the lipid matrix was maintained in a ratio 1: 1 (w:w) in all formulations tested in the present study. As shown in **figure 1** these parameters affect the colloidal properties of the formulation.

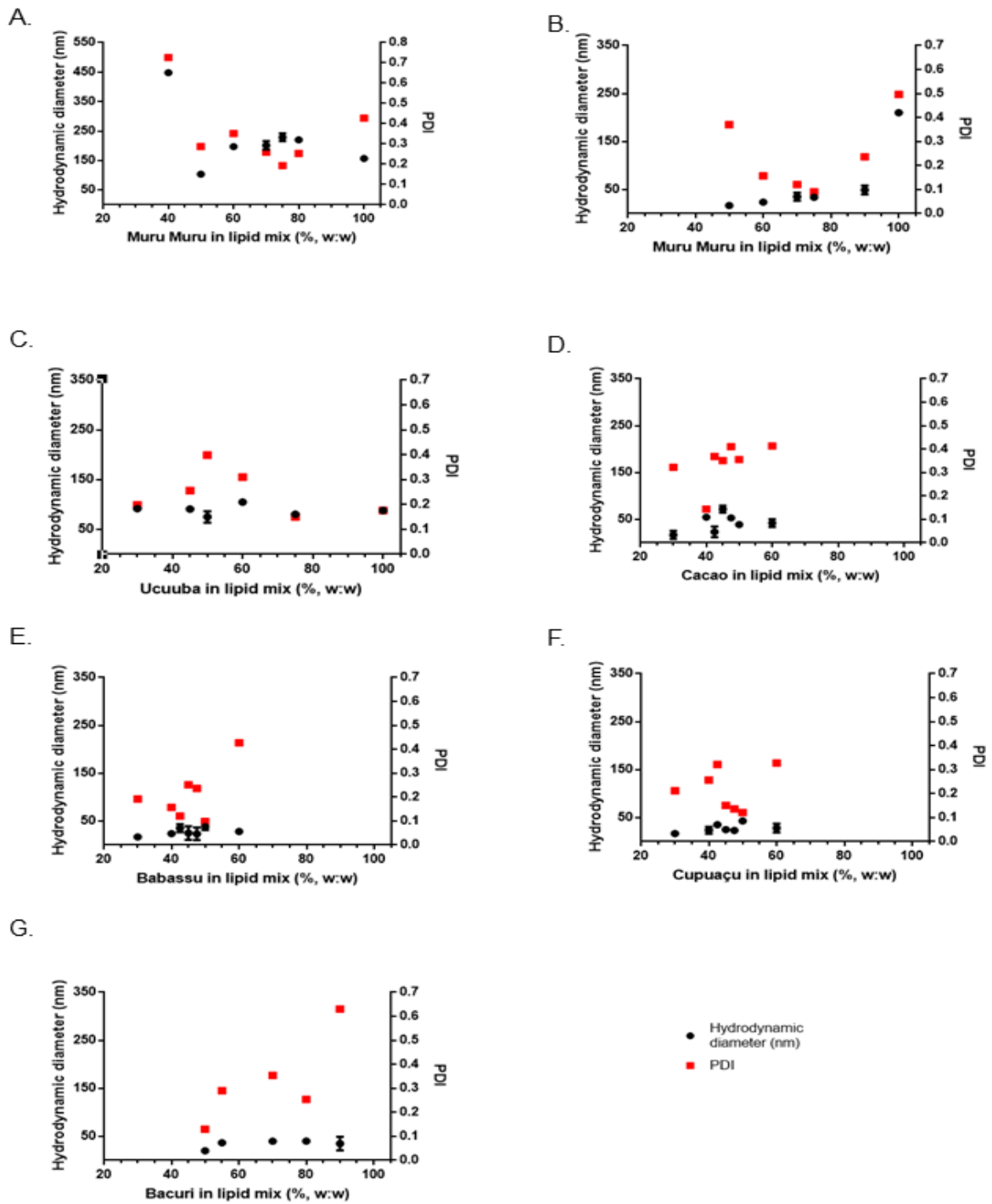


Figure 1. Influence of the concentration of Muru-Muru butter (A, B), Ucuuba butter (C), Cacao butter (D), Babassu oil (D), Cupuaçu butter (E) and Bacuri butter in the lipid mix, on the hydrodynamic diameter and polydispersity index (PDI) of solid lipid nanoparticles produced by phase inversion temperature.

The average diameters tended to remain similar, thus the factor for the choice of better formulation was the formulation with lower PDI. The concentration of babassu oil, cupuaçu butter and bacuri butter in the lipid mix used for the production of final formulations was set to 50% (w:w), muru muru butter 75% (w:w), Ucuuba butter 100%(w:w) and Cacao butter (w:w) 40%. Therefore, giving all these results, the final formulations of SLNs and their Macroscopic aspect are shown in **table 2**, and **figure 2** respectively.

Table 2. Composition of solid lipid nanoparticles (SLN)

	Natural Lipid	Concentration of natural lipid in lipid mix	Surfactant
NLM	Muru Muru	75%	Twenn 80/Span 20 (4:1)
NLMM	Muru Muru	75%	Kolliphor® HS
NLU	Ucuuba	100%	Twenn 80/Span 20 (4:1)
NLC	Cacau	40%	Kolliphor® HS
NLB	Babassu	50%	Kolliphor® HS
NLSC	Bacuri	50%	Kolliphor® HS
NLBA	Cupuaçu	50%	Kolliphor® HS

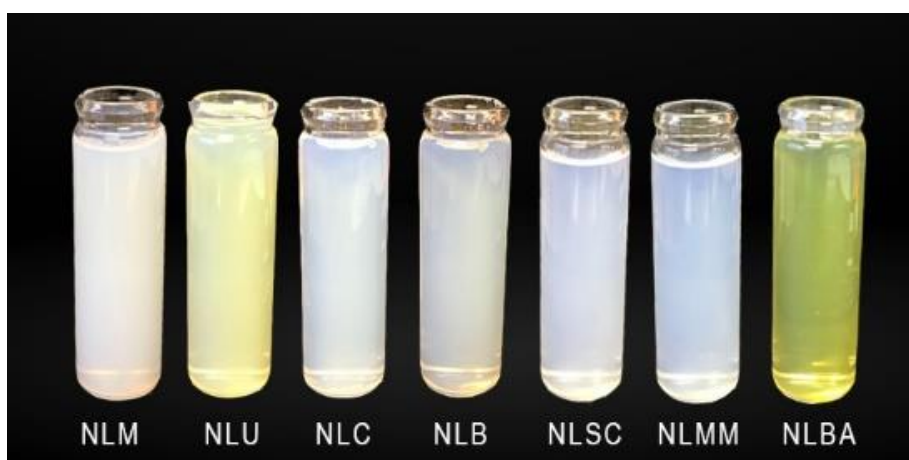


Figure 2. Macroscopic aspect of solid lipid nanoparticle final formulations

The macroscopic analysis of the formulations studied revealed the characteristic Tyndall effect of colloidal suspensions. After macroscopic analysis, the formulation was taken to the analysis by Dynamic light dispersion (DLS) and its colloidal characteristics can be viewed in table 3.

Table 3. Colloidal characteristics of solid lipid nanoparticles (SLN)

	Hydrodynamic diameter (nm)	Polydispersity index	Zeta Potential (mV)
NLM	229.0 ± 7.10	0.140 ± 0.022	-1,18 ± 0.12
NLMM	33 ± 1.66	0.09 ± 0.015	-6,01 ± 0.07
NLU	88 ± 2.79	0.110 ± 0.031	-13,18 ± 0.09
NLC	54 ± 0.81	0.143 ± 0.033	-1,12 ± 0.16
NLB	52 ± 6.8	0.076 ± 0.049	-3,28 ± 0.11
NLSC	43 ± 2.8	0.121 ± 0.019	-18,1 ± 0.13
NLBA	20 ± 2.01	0.195 ± 0.038	-11,12 ± 0.15

The SLNs obtained with the use of the mixture of Tween 80 and Span 20 surfactants (NLU and NLM) showed greater diameter, which can be explained by its higher molecular weight when compared to Kholiphor HS 15. thus they were selected for the development of this project, aiming to enable different future technological applications.⁵

Morphology. It can be observed in **Figure 3** a scan micrograph of the NLB formulation.

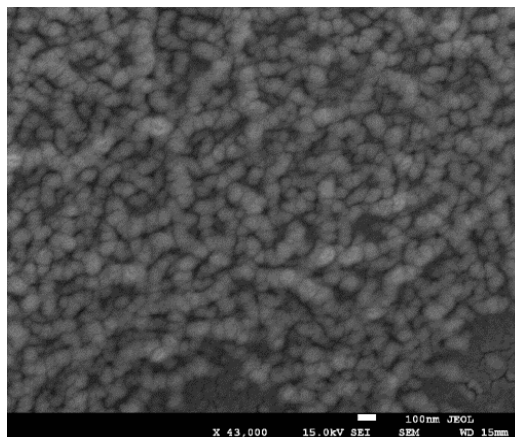


Figure 3. SEM photomicrographs of NLB formulation.

In scanning electron microscopy (SEM) the electrons are released with low energy, thus, they do not cross the sample, on the other hand they spread through the surface of the particle providing a topographic electrodensity. A SEM image of the NLB formulation can be seen in **figure 2**. It shows that the SLNs have a spherical morphology in this formulation.⁶ In a certain way, this can be related to the amount of surfactant used in it. It was perceived in previous studies that in formulations with high surfactant concentrations, the size tends to be smaller, in contrast to the Toxicity increases, showing an important technological bottleneck.

However, it was not possible to make an adequate analysis of the micrographs, since the SLNs are grouped, making it difficult to count, this can be explained by the sample preparing process in which the samples are dehydrated, and thus particle clustering occurs. In order to avoid clustering of nanoparticles, the transmission electron microscopy technique was adopted for the next photomicrographs. Thus, it can be seen in **figure 4** the micrographies referring to the NLM formulation.

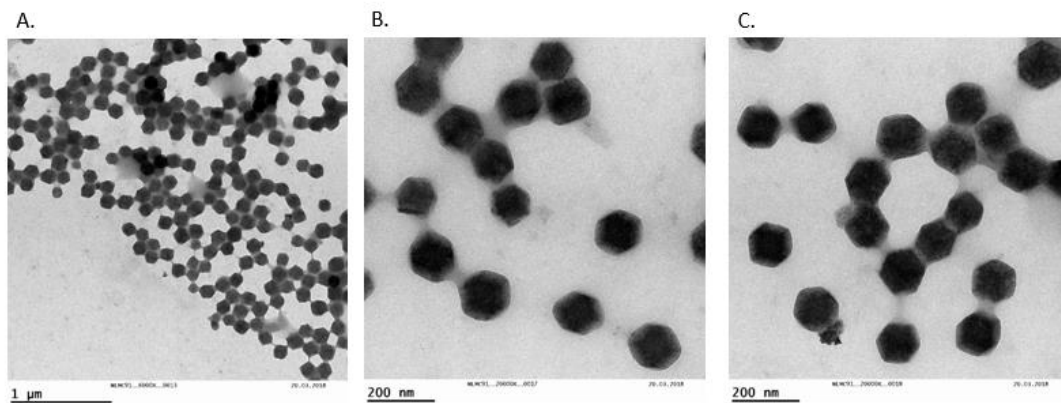


Figure 4. TEM photomicrographs of NLM formulation.

While the NLB formulation presented spherical shape, the NLM formulation presented cubic format, characteristic of cubic isomeric systems. This is likely to be due to the fact that NLB contains babassu oil which is liquid at room temperature, whereas NLM contains only solid lipids at room temperature in its composition (muru muru butter).⁷

Biological assays

Cell viability assays. Understanding how the different constituents of the formulation combined as nanoparticles act on the cell viability, can make possible important knowledge for the choice of a final formulation. To evaluate the cytotoxic effect of the formulations obtained, NIH 3T3 cells (murine fibroblasts) were incubated with different concentrations of the developed formulations. Several studies report cytotoxicity of solid lipid nanoparticles, depending on preparation methodologies, nature of the components and amounts of them.^{8,9,10,11}

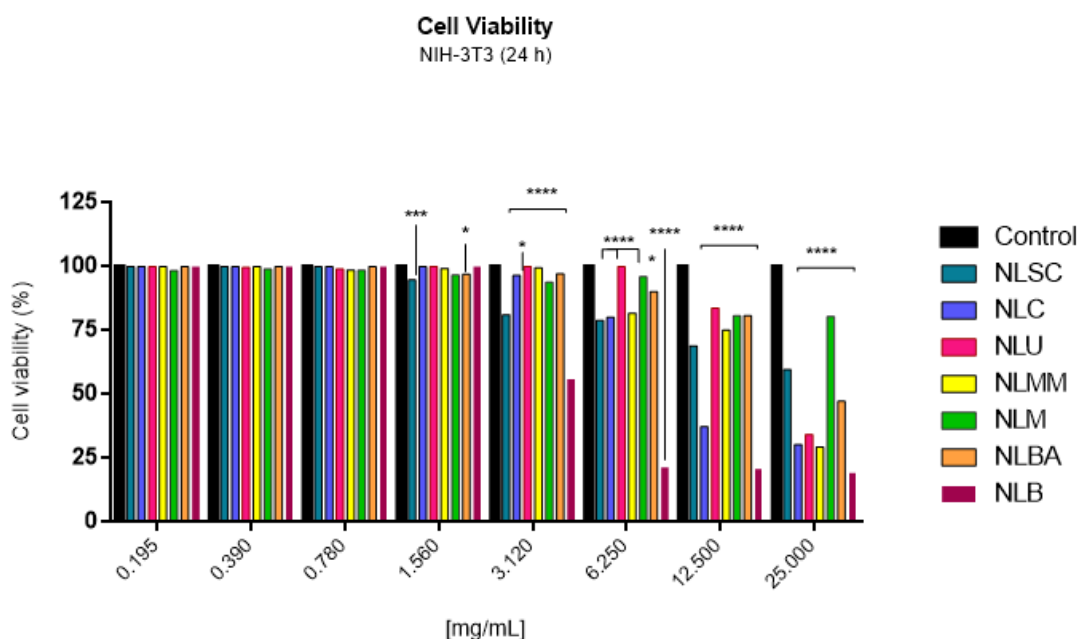


Figure 5. Cell viability assay (MTT) in Murine Fibroblast cells (NIH-3T3) exposed at different concentrations (0.195 mg / mL to 25 mg / mL) of NLSC, NLC, NLU, NLMM, NLM, NLBA and NLB were compared with control for 24 hours; represented by the bar chart with a 95% confidence interval. (****: $P < 0,0001$ / ***: $P < 0,0001$ / **: $P < 0,001$ e *: $P < 0,01$)

In **figure 5**, we can observe the cytotoxicity profile of the formulations based on Amazonian butters. NIH / 3T3 cell viability was established after incubation of the cells for 24 h at different formulations concentrations, ranging from 0.195 mg / mL to 25 mg / mL of these. It is noted that ICs 50 of all formulations are greater than 3.0 mg / mL. The NLB formulation has the lowest IC50 (3.846 mg / mL), which means a concentration of 3,846 mg/mL is required for cell viability to decrease by 50%. In contrast, the formulations NLSC and NLM were not cytotoxic against NIH-3T3 cells even at the highest concentration. The NLC, NLU, NLMM and NLBA formulations showed an IC 50 of 8.72 mg / mL, 19.02 mg / mL, 17.22 mg / mL and 22.53 mg / mL, respectively. This is a good result when compared to other formulations of this nanocarrier model. Since the great majority of this class of nanocarriers has IC 50 in the range of 0.1-1 mg / mL, considering both tumor and non-tumor lines. ^{12,13}

CONCLUSIONS

Seven formulations based on Amazonian butters were developed in the present study, which presented an average diameter ranging from 20nm to 230nm, thus providing a broad spectrum of technological applications. All PDIs were below 0.200, which shows homogeneity of the samples. The results on cytotoxicity indicated a low toxicity on the NIH-3T3 cell line, since the lowest IC 50 is still high when compared to formulations found in other studies. Its composition and low toxicity allows administration by oral, topical or even parenteral, reinforcing the wide spectrum of applications. Surprisingly, a hexagonal-format SLN formulation was presented by transmission electron microscopy. However, due to technical limitations, it was not possible to carry out the microscopic analysis of all the nanoparticles. Nonetheless, the full analysis will be made shortly, for the publication of the final article.

REFERENCES

1. Santilli, Juliana. "Biodiversidade e conhecimentos tradicionais associados: o novo regime jurídico de proteção." **Revista de Direito Ambiental [recurso eletrônico]** (2015).
2. Moghimi, S. Moein, A. Christy Hunter, and J. Clifford Murray. "Nanomedicine: current status and future prospects." **The FASEB Journal** 19.3 (2005): 311-330.
3. Ruktanonchai, Uracha, et al. "Effect of lipid types on physicochemical characteristics, stability and antioxidant activity of gamma-oryzanol-loaded lipid nanoparticles." **Journal of Microencapsulation** 26.7 (2009): 614-626.
4. Kumar, Sandeep, Viney Lather, and Deepti Pandita. "Green synthesis of therapeutic nanoparticles: an expanding horizon." **Nanomedicine** 10.15 (2015): 2451-2471.
5. Mukherjee, S., S. Ray, and R. S. Thakur. "Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system." **Indian Journal Of Pharmaceutical Sciences** 71.4 (2009): 349.
6. Owuor, J. J., et al. "Optimization and Characterization of Primaquine-Loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Liver Schinonticide Targeting by Freeze

- Drying." **MOJ Drug Des Develop Ther** 1.4 (2017): 00021.
7. Nemen, Daiane, and Elenara Lemos-Senna. "Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea." **Química Nova** 34.3 (2011): 408-413.
 8. Liu, Jie, et al. "Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin." **International Journal Of Pharmaceutics** 356.1-2 (2008): 333-344.
 9. Joshi, Medha D., and Rainer H. Müller. "Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives." **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics** 71.2 (2009): 161-172.
 10. Kepp, Oliver, et al. "Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death." **Oncoimmunology** 3.9 (2014): e955691.
 11. Petersen, Silvia, et al. "The physical state of lipid nanoparticles influences their effect on in vitro cell viability." **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 79.1 (2011): 150-161.
 12. Silva, Adny Henrique, et al. "In vitro biocompatibility of solid lipid nanoparticles." **Science Of The Total Environment** 432 (2012): 382-388.
 13. Doktorovova, Slavomira, Eliana B. Souto, and Amélia M. Silva. "Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers—a systematic review of in vitro data." **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 87.1 (2014): 1-18.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CORRIAS, Francesco; LAI, Francesco. New Methods for Lipid Nanoparticles Preparation. *Recent Patents On Drug Delivery & Formulation*, [s.l.], v. 5, n. 3, p.201-213, 1 set. 2011.

DOKTOROVOVA, S., SOUTO, E., SILVA, A. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers – A systematic review of in vitro data. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics*, 2014.

GHARPURE, M. et al. “Nanotechnology: Future of Oncotherapy.” *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21.14 (2015): 3121–3130. PMC. Web. 18 Apr. 2017.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. *cell*, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

JOSHI, M. D., MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.71, n. 2, p. 161-172, 2009.

KEPP O., SENOVILLA L., VITALE I., VACCHELLI E., ADIEMIAN S., AGOSTINIS P., GALLUZZI L. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology*, 2014. 3(9), e955691.

KHERADMANDNIA, S., VASHEGHANI-FARAHANI, E., NOSRATI, M., ATYABI, F. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. v. 6, n. 6, p.753-759, 2010.

KUMAR S., LATHER V. & PANDITA D. Green synthesis of therapeutic nanoparticles: an expanding horizon. *Nanomedicine(Lond.)*, 2015.

LIU, J., GONG, T., FU, H., WANG, C., WANG, X., CHEN, Q., ZHANG, Q., HE, Q., ZHANG, Z. Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 356, 333-344, 2008.

MARTINS, S., COSTA-LIMA, S., CARNEIRO, T., CORDEIRO-DASILVA, A., SOUTO, E.B., FERREIRA, D.C. Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: An

investigation of the uptake mechanism and pathway. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 430 n. 1-2, p. 216227, 2012.

MEYAGUSKU, Vanessa Maria. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO CIPROFLOXACINO. 2014. 96 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara –, 2014.

MOGHIMI, S. M., HUNTER, A. C., and MURRAY, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. *Faseb J* 19(3), 311–330. 2005.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunol. Methods*. v. 16, p. 55-63, 1983.

MUKHERJEE, S. RAY, S. and THAKUR, R S. Solid lipid nanoparticles: A modern formulation approach in drug delivery system, *Ind. J. Pharm. Sci.* 71 (2009) 349–358.

PARDESHI, Chandrakantsing et al. Solid lipid based nanocarriers: An overview/Nanonosači na bazi čvrstih lipida: Pregled. *Acta Pharmaceutica*, v. 62, n. 4,p. 433-472, 2012.Pae, H. et al. Curcumin induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in human leukemia HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 1040–1045 (2007).

PETERSEN, S., STEINIGER, F., FISCHER, D., FAHR, A., BUNJES, H. The physical state of lipid nanoparticles influences their effect on in vitro cell viability. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics*, v. 79, p. 150-161, 2011.

POLÍTICA AMBIENTAL: Economia verde Desafios e portunidades. Belo Horizonte: Conservação Internacional, v. 8, 8 jun. 2011.

RUKTANONCHAI, U.; SAKULKHU, U., BEJRAPHA, P.; OPANASOPIT, P.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; JUNYAPRASERT, V.; PUTTIPIPATKHACHORN, S. Effect of lipid types on physicochemical characteristics, stability and antioxidant activity of gamma-oryzanolloaded lipid nanoparticles. *Journal of microencapsulation*, v.26, n. 7, p. 614-626, 2009.

SANTILLI, Juliana. Biodiversidade e conhecimentos tradicionais associados: o novo regime jurídico de proteção. Revista do Ministério Público do Distrito Federal e Territórios, Brasília, n. 9, p. 21-73, 2015. Anual.

SILVA, A., FILIPPIN-MONTEIRO, F., MATTEI, B., ZANETTI-RAMOS, T., CRECZYNSKI-PASA. In vitro biocompatibility of solid lipid nanoparticles. Sci. Total Environ. 432 (2012) 382-388

SILVA, Luciano Paulino et al. NANOTECNOLOGIA VERDE PARA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS. In: RESENDE, Rodrigo Ribeiro et al. BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGRO&INDÚSTRIA: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES. 4. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2009. Cap. 26. p. 967-968.

SOUZA, M.H.S.L.; MONTEIRO, C.A.; FIGUEREDO, P.M.S; NASCIMENTO, FRF.; GUERRA, R.N.M. Ethnopharmacological use of babaçu (*Orbignya phalerata* Mart) in communities of babaçu nut breakers in Maranhão, Brazil. Journal of Ethnopharmacology. 2011;133(1):1-5. doi: 10.1016

TAVEIRA, Stephânia Fleury. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para o tratamento tópico do câncer de pele. 2009. 36 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

WANG, J.; WANG, H.; ZHU, R.; LIU, Q.; FEI, J.; WANG, S. Anti-inflammatory activity of curcuminloaded solid lipid nanoparticles in IL-1 β transgenic mice subjected to the lipopolysaccharideinduced sepsis, Biomaterials, Volume 53, 2015, Pages 475-483

WISSING, S. A., KAYSER, O., MULLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. Adv. Drug Deliv. Ver., v.56, n.9 2004.

YUAN, H.; ZHANG, W.; DU, Y. Z.; HU, F.Q. Ternary nanoparticles of anionic lipid nanoparticles/protamine/DNA for gene delivery. International of Journal of Pharmaceutical, v. 392, p. 224-231, 2010.