

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS NANOESTRUTURADOS
COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA TERAPÊUTICA**

CRISTINA DE GARCIA VENTURINI

TESE DE DOUTORADO

PORTO ALEGRE, 2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

CRISTINA DE GARCIA VENTURINI

**DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS NANOESTRUTURADOS
COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA TERAPÊUTICA**

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em
Química

Prof Dr^a Adriana Raffin Pohlmann
Orientadora

Porto Alegre, dezembro 2009.

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre (fevereiro/2006) e (dezembro/2009 da defesa), no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Adriana Raffin Pohlmann. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Valdir Soldi

Prof. Dr. Ruy C. R. Beck

Prof. Dr. César L. Petzhold

Prof. Dr. Nádyá P. da Silveira

Prof. Dr^a Adriana Raffin Pohlmann
Orientadora

Cristina de Garcia Venturini

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

“Procure ser um homem de valor, em vez de ser um homem de sucesso”.

(Albert Einstein)

**À minha família pelo apoio
para chegar à conclusão
deste trabalho.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à DEUS pela nossa existência nesse mundo e pela saúde que proporciona condições para irmos em busca de nossos sonhos tornando-os objetivos concretizados.

Aos meus pais, Pedro e Eliane, ao meu irmão, Vinícius e minha irmã, Patrícia por sempre acreditarem na minha determinação e busca dos meus objetivos de vida.

Ao Dago pelo carinho, compreensão, amor e aos seus pais, Júlio e Vera, por me acolherem como filha.

À Professora Dr^a Adriana Raffin Pohlmann pela acolhida, bem como por sua orientação dedicada nesses quatro anos de convívio e paciência prestada para a concretização deste trabalho.

À Professora Dr^a Silvia Stanisçuaski Guterres por sua colaboração dedicada. À Professora Dr^a Ana Maria Battastini por possibilitar a realização de análises de gradiente de densidade. À Professora Dr^a Márcia Gallas por possibilitar a realização de análises de difração de raios-X e ao Professor Dr Jairton Dupont por possibilitar a realização das análises de área superficial e espectroscopia de infravermelho.

À CAPES e ao CNPQ pela obtenção de bolsa de doutorado e a Rede de Nanotecnologia/CNPq/MCT, pelo suporte financeiro deste projeto e oportunidades de crescimento científico.

Aos amigos do laboratório K-204 pelo apoio e troca de conhecimentos.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

Meu Sincero Obrigado.

Artigos completos relacionados com a Tese publicados em periódicos

1. Pohlmann, A. R.; Mezzalira, G.; **Venturini, C. G.**; Cruz, L.; Bernardi, A.; Jäger, E.; Battastini, A. O.; Silveira, N. P.; Guterres, S. Determining the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-loaded polymeric nanocapsule aqueous suspensions: A relation between light scattering and drug content. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 359, p.288-293, 2008.

2. Jäger, E., **Venturini, C. G.**, Poletto, F., Colome, L. M., Pohlmann, J. P. U., Bernardi, A., Battastini, A. M. O., Guterres, S. S., Pohlmann, A. R., 2009. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. *Journal Biomedical Nanotechnology* 5, 130-140.

3. **Venturini, C. G.**, Jäger, E., Oliveira, C. P., Bernardi, A., Battastini, A. M. O., Guterres, S. S., Pohlmann, A. R. Optimization of lipid-core nanocapsule formulation to provide a highly physical stable suspensions. (Manuscrito).

4. Poletto, F.; Donida, B.; **Venturini, C. G.**; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. Physicochemical characterization of polymeric nanocapsules using light scattering and electron microscopy techniques. (Submetido ao *Journal Chemical Education*)

Trabalhos resumidos publicados em anais de eventos

1. Jager, E.; **Venturini, C. G.**; Colome, L. M.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. A variação da concentração de monoestearato de sorbitano na formulação de nanocápsulas influencia no tempo de consumo total de uma sonda lipofílica. *Mostra de Nanociência e Nanotecnologia da UFRGS*, 2006, Porto Alegre. v. único. p. 1-1.

2. Jager, E.; **Venturini, C. G.**; Cruz, L.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Influence of the sorbitan monostearate concentration on the hydrolysis profiles of indomethacin ethyl ester encapsulated in polymeric nanocapsules. *XI International Macromolecular Colloquium*, 2007, Gramado. p. P026.

3. Jager, E.; **Venturini, C. G.**; Colome, L. M.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Drug Release mechanism after varying the sorbitan monostearate concentration in polymeric nanocapsules. 6o International Congress of Pharmaceutical Science, 2007, Ribeirão Preto.
4. **Venturini, C. G.**; Jager, E.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Influence of the capric/caprilic triglyceride concentration on the hydrolysis profile of indomethacin ethyl ester encapsulated in nanocapsules. 6o International Congress of Pharmaceutical Science, 2007, Ribeirão Preto.
5. Ortiz, M.; **Venturini, C. G.**; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.. Microaglomerados orgânico-inorgânicos nanoestruturados para a liberação controlada de fármacos hidrofílicos. XX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2008, Porto Alegre.
6. **Venturini, C. G.**; Ortiz, M.; Colome, L. M.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Nanocapsule@inorganic-organic microparticles: an in vitro drug release study. VII Encontro da SBPMat, 2008, Guarujá. Program Book, p. 81.
7. **Venturini, C. G.**; Jager, E.; Poletto, F.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Influência da concentração do óleo em nanocápsulas na cinética de hidrólise do éster etílico de indometacina. XVI Encontro de Química da Região Sul: A química como ciência, educação e tecnologia., 2008, Blumenau. Livro de Resumos, v. 11.
8. **Venturini, C. G.**; Ortiz, M.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. . Liberação controlada de um fármaco hidrofílico a partir de sistemas nanoestruturados. XVI Encontro de Química da Região Sul: A química como ciência, educação e tecnologia., 2008, Blumenau. Livros de Resumos, v. 11.
9. Jager, E.; **Venturini, C. G.**; Poletto, F.; Colome, L. M.; Pohlmann, J. P. U.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Varying viscosity and tortuosity or surface area as strategies to sustain the drug release from polymeric nanocapsules. II Mostra de Nanociência e Nanotecnologia, 2008, Porto Alegre. CNANO, v. 2.

10. **Venturini, C. G.**; Ortiz, M.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. The effect of the beta-cyclodextrin on the drug release from innovative nanocapsule@inorganic-organic agglomerates. II Mostra de Nanociência e Nanotecnologia, 2008, Porto Alegre. CNANO, v. 2.
11. **Venturini, C. G.**; Jager, E.; Poletto, F.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Varying the capric/caprylic triglyceride concentration to control the release of indometacin ester from polymeric nanocapsules. 9th International Conference on Nanostructured Materials, Rio de Janeiro-RJ. Nano 2008-Abstracts. Rio de Janeiro, v. único. p. 71-71.
12. Pohlmann, A. R.; Jager, E.; **Venturini, C. G.**; Jager, A.; Poletto, F.; Guterres, S. S. Molecular organization of drug carrier polymeric nanoparticles. Particles, 2008, Orlando. v. unico. p. 211-211.
13. Jager, E.; Poletto, F.; **Venturini, C. G.**; Colome, L. M.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. The effect of the sorbitan monostearate concentration on the apparent permeability of indomethacin ethyl ester from polymeric nanocapsules. Second French-Brazilian Meeting on Polymers, 2008, Florianopolis. Abstracts, v. unico. p. B-17-B-17.
14. Pohlmann, A. R.; Jager, E.; **Venturini, C. G.**; Jager, A. ; Poletto, F.; Guterres, S. S. Supramolecular architecture of materials in polymeric nanocapsules. Workshop on nanotechnology, drug delivery and poverty related diseases, 2009, Pretoria. Program, abstracts, delegate details, v. unico. p. 11-11.
15. **Venturini, C. G.**, Jäger, E., Bernardi, A., Battastini, A. M. O., Guterres, S. S., Pohlmann, A. R. Optimization of the nanocapsule formulation to provide a suspension containing exclusively one type of colloid with high physical stability. 11th International Conference on Advanced Materials, 2009, Rio de Janeiro. Abstracts.

Demais produções no período

Trabalhos resumidos publicados em anais de eventos

1. Rizzi, M.; Donida, B.; Paese, K.; **Venturini, C. G.**; Siqueira, N.; Poletto, F.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Determinação do perfil de benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas empregando o método de diálise direta. XX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2008, Porto Alegre.

2. Fiel, L.; **Venturini, C. G.**; Bernardi, A.; Battastini, A. M. O.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Physicochemical properties of polymeric nanocapsules containing different surfactant compositions. II Mostra de Nanociência e Nanotecnologia, 2008, Porto Alegre. CNANO, 2008. v. 2. p. 53-53.

3. Fiel, L.; Rizzi, M.; Adorne, M.; **Venturini, C. G.**; Bernardi, A.; Battastini, A. M. O.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. . Rigid and resilient nanocapsules: Physico-chemical and stability studies. Skin and Formulation, 3rd Symposium - Skin Forum, 10th Annual Meeting, 2009, Versailles. APGI and Skin Forum, 2009. v. unico. p. 72-P-041-72

4. Donida, B.; Poletto, F.; **Venturini, C. G.**; Oliveira, C. P.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Determinação da partição do fármaco lipofílico em suspensões de nanocápsulas poliméricas por ultrafiltração-centrifugação e HPLC. XXI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2009, Porto Alegre.

5. Rizzi, M.; Fiel, L.; **Venturini, C. G.** ; Bernardi, A.; Battastini, A. M. O.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Caracterização físico-química de dispersões coloidais contendo diferentes composições de tensoativos. XXI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2009, Porto Alegre.

6. Silva, D. O; **Venturini, C. G.**; Pohlmann, A. R.; Dupont, J. Preparation of stable dispersions of Co and Pd nanoparticles using an imidazolium ionic liquid. Icam 2009, Rio de Janeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XIV
LISTA DE TABELAS	XVII
ABREVIATURAS	XVIII
RESUMO	XIX
ABSTRACT	XX
1. INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO I: ESTUDO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO INDOMETACINA	4
1. REVISÃO DE LITERATURA	5
2. OBJETIVOS	7
2.1 OBJETIVO GERAL	7
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1 MATERIAIS.....	8
3.2 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS.....	8
3.3 QUANTIFICAÇÃO DA INDOMETACINA	8
3.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA	9
3.5 ANÁLISE POR ESPALHAMENTO MÚLTIPLO DE LUZ.....	9
4. RESULTADOS	11
4.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE INDOMETACINA EM FORMULAÇÃO DE NANOCÁPSULAS POR CLAE	11
4.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICA DAS FORMULAÇÕES DE NC E ND POR ESPALHAMENTO MÚLTIPLO DE LUZ.....	12
4.3 ANÁLISE DAS SUSPENSÕES POR MET.....	16
5. CONCLUSÃO.....	18
CAPÍTULO II: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS DOS ÁCIDOS CÁPRICO E CAPRÍLICO NO PERFIL DE LIBERAÇÃO DO ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA A PARTIR DE NANOCÁPSULAS.....	19
1. REVISÃO DE LITERATURA	20
1.1 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DE SUSPENSÕES DE NC PREPARADAS VARIANDO-SE A CONCENTRAÇÃO DE SEUS COMPONENTES.....	21
2. OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26

3.1 MATERIAIS.....	26
3.2 PREPARAÇÃO DO ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA.....	26
3.3 PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS.....	27
3.4 QUANTIFICAÇÃO DO ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA.....	27
3.5 HIDRÓLISE DO ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA EM MEIO ALCALINO.....	28
3.6 MODELAGEM MATEMÁTICA DOS PERFIS CINÉTICOS.....	28
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
3.8 TURBIDIMETRIA.....	29
3.9 ESTABILIDADE.....	30
3.9.1 Caracterização físico-química das formulações.....	30
3.9.2 Análise por espalhamento múltiplo de luz.....	31
3.10 ESTUDO DE DENSIDADE.....	31
3.11 ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS.....	32
4.2 ESTUDO DO CONSUMO DO INDOET A PARTIR DAS NANOCÁPSULAS ATRAVÉS DA HIDRÓLISE ALCALINA.....	33
4.3 DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE LIBERAÇÃO.....	35
4.4 TURBIDIMETRIA.....	38
4.5 DETERMINAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL.....	40
4.6 PERMEABILIDADE APARENTE E FLUXO.....	41
4.7 ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....	42
4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	50
4.9 ESTUDOS DE DENSIDADE.....	51
5. CONCLUSÃO.....	60
CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO DE MICROAGLOMERADOS ORGÂNICOS-INORGÂNICOS PARA O CONTROLE DA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS HIDROFÍLICOS.....	61
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	62
1.1 SISTEMAS MICROPARTICULADOS PARA A ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS.....	62
1.2 SECAGEM POR ASPERSÃO.....	63
1.3 DICLOFENACO.....	65
1.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	67
2.OBJETIVOS.....	71
2.1 OBJETIVO GERAL.....	71
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	71
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
3.1 MATERIAIS.....	72
3.2 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS.....	72
3.2.1 Caracterização físico-química das formulações.....	72
3.3 PREPARAÇÃO DOS MICROAGLOMERADOS.....	73
3.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	74
3.4.1 Determinação de rendimento.....	74
3.4.2 Teor de DicONa nos microaglomerados.....	74
3.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho.....	75
3.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	75
3.4.5 Análises de Difração de Raios - X.....	75
3.4.6 Determinação da Distribuição Granulométrica.....	75
3.4.7 Determinação da área superficial dos microaglomerados.....	76
3.4.8 Liberação In Vitro.....	76
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	76

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS	77
4.2 OBTENÇÃO DOS MICROAGLOMERADOS	77
4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FÁRMACO	77
4.4 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X	78
4.5 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	81
4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	87
4.7 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	93
4.7.1 <i>Gastroresistência</i>	93
4.7.2 <i>Liberação em tampão fosfato pH 6,8</i>	94
5. CONCLUSÃO	99
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ANEXO 1	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil de retro-espalhamento da NC ⁰	13
Figura 2. Perfil de retro-espalhamento da NC ¹	13
Figura 3. Perfil de retro-espalhamento da NC ³	14
Figura 4. Perfil de transmissão da ND ⁰	15
Figura 5. Perfil de transmissão da ND ¹	15
Figura 6. Fotomicrografias de MET das nanocápsulas aumentos de 75,000 e 120,000 vezes NC ⁰ , NC ¹ , NC ³	17
Figura 7. Fotomicrografias de MET das nanodispersões aumentos de 75,000 e 120,000 vezes ND ⁰ , ND ¹	18
Figura 8. Correlação do diâmetro das NC com a concentração do TG.	33
Figura 9. Perfil cinético da hidrólise do IndOEt em NC (♦) IIIA; (■) IIIB; (▲) IIIC; (Δ) IIID; (□) IIIE.....	34
Figura 10. Diâmetro e polidispersão da NC IIIA durante a hidrólise alcalina.....	36
Figura 11. Diâmetro e polidispersão da NC IIIB durante a hidrólise alcalina.	37
Figura 12. Diâmetro e polidispersão da NC IIIC durante a hidrólise alcalina.	37
Figura 13. Diâmetro e polidispersão da NC IIID durante a hidrólise alcalina.....	37
Figura 14. Diâmetro e polidispersão da NC IIIE durante a hidrólise alcalina.	38
Figura 15. Correlação linear do número de partículas e a concentração do TG das suspensões IIIA a IIIE.....	39
Figura 16. Volume de partículas em função do diâmetro das nanocápsulas. (a) IIIA, (b) IIIB, (c) IIIC, (d) IIID, (e) IIIE.	43
Figura 17. Perfil de Δ retro-espalhamento da suspensão IIIA.....	44
Figura 18. Perfil de Δ retro-espalhamento da suspensão IIIB.	45
Figura 19. Perfil de Δ retro-espalhamento da suspensão IIIC.....	45
Figura 20. Perfil de Δ retro-espalhamento da suspensão IIID.....	46
Figura 21. Perfil de Δ retro-espalhamento da suspensão IIIE.	47
Figura 22. Cinética de cremagem dos picos das formulações IIID e IIIE.	47
Figura 23. Em detalhe o pico de Δ retro-espalhamento da suspensão IIIE.....	48
Figura 24. Diâmetro médio durante 60 dias das suspensões de nanocápsulas.....	48
Figura 25. Fotomicrografias das suspensões obtidas (75,000 e 120,000 vezes) com a variação da concentração do TG.....	50

Figura 26. Fotomicrografias das suspensões obtidas (75,000 e 120,000 vezes) com a variação da concentração do TG.....	51
Figura 27. Resultados de ultracentrifugação na presença do gradiente de densidade: a) marcadores e suas densidades ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), b) nanoemulsão, c) nanoesferas, d) nanocápsulas, e)nanodispersão.	52
Figura 28. Ilustração dos resultados de ultracentrifugação na presença do gradiente de densidade para as suspensões IIIA a IIIE.....	53
Figura 29. Volume em função do diâmetro da suspensão IIIEA.....	54
Figura 30. Perfil de retro-espalhamento da suspensão IIIEA.....	54
Figura 31. Fotomicrografia da suspensão IIIEA.	55
Figura 32. Volume em função do diâmetro da suspensão IIIEB.....	55
Figura 33. Perfil de retro-espalhamento da suspensão IIIEB.....	56
Figura 34. Fotomicrografia da suspensão IIIEB.....	56
Figura 35. Volume em função do diâmetro da suspensão N2 e N3 (n=3).....	58
Figura 36. Perfil de retro-espalhamento da suspensão N2.....	58
Figura 37. Perfil de retro-espalhamento da suspensão N3.....	59
Figura 38. Ilustração dos resultados de ultracentrifugação na presença do gradiente de densidade para as suspensões N2 e N3.	59
Figura 39. Estrutura química do diclofenaco sódico.	65
Figura 40. Difração de raios-X dos componentes dos microaglomerados.....	79
Figura 41. Difração de raios-X dos microaglomerados.	80
Figura 42. Espectros de absorção na região do infravermelho do polímero HPMC.	81
Figura 43. Espectros de absorção na região do infravermelho do Aerosil 200 [®]	82
Figura 44. Espectros de absorção na região do infravermelho do polímero Eudragit S100 [®]	82
Figura 45. Espectros de absorção na região do infravermelho do polímero PCL.....	83
Figura 46. Espectros de absorção na região do infravermelho do DicONa.	84
Figura 47. Espectros de absorção na região do infravermelho por transmissão a) MA1, b) MA1-EUD, c) MA1-PCL e por refletância d) MA1, e) MA1-EUD e f) MA1-PCL.....	85
Figura 48. Espectros de absorção na região do infravermelho por transmissão a) MA2, b) MA2-EUD, c) MA2-PCL e por refletância d) MA2, e) MA2-EUD e f) MA2-PCL.....	86
Figura 49. Fotomicrografias dos microaglomerados em 500x (A) MA1, (B)MA2, (C) MA1-EUD, (D) MA2-EUD, (E) MA1-PCL, (F) MA2-PCL.	88

Figura 50. Fotomicrografias dos microaglomerados em 1.500x (A) MA1, (B) MA2, (C) MA1-EUD, (D) MA2-EUD, (E) MA1-PCL, (F) MA2-PCL.	89
Figura 51. Fotomicrografias dos microaglomerados em 6.000x (A) MA1, (B) MA2, (C) MA1-EUD, (D) MA2-EUD, (E) MA1-PCL, (F) MA2-PCL.	90
Figura 52. Fotomicrografias dos microaglomerados em 10.000x (A) MA1, (B) MA2, (C) MA1-EUD, (D) MA2-EUD, (E) MA1-PCL, (F) MA2-PCL.	91
Figura 53. Perfil de liberação do DicONa livre e a partir dos microaglomerados em tampão fosfato pH 6,8.	94
Figura 54. Proposta de modelo estrutural para MA1.	95
Figura 55. Proposta de modelo estrutural para MA1-PCL e MA1-EUD.	96
Figura 56. Proposta de modelo estrutural para MA2.	97
Figura 57. Proposta de modelo estrutural para MA2-PCL e MA2-EUD.	98
Figura 58. Espectro de absorção na região do infravermelho do HPMC.	106
Figura 59. Espectro de absorção na região do infravermelho do Aerosil 200 [®]	106
Figura 60. Espectro de absorção na região do infravermelho do DicONa.	107
Figura 61. Espectro de absorção na região do infravermelho do Eudragit S100 [®]	107
Figura 62. Espectro de absorção na região do infravermelho da PCL.	108

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Quantificação do teor da formulação NC ³ durante 180 dias.....	11
Tabela II. Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas preparadas com concentrações crescentes (16,0 a 47,0 mg/mL) do triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico (n=3).	32
Tabela III. Parâmetros de modelagem matemática da hidrólise do IndOEt em nanosuspensões IIIA a IIIE.	35
Tabela IV. Parâmetros de modelagem matemática para a hidrólise do IndOEt em IIIA a IIIE utilizando o modelo da lei da Potência.	36
Tabela V. Diâmetro, α , k , NW e número de partículas por unidade de volume para nanocápsulas preparadas com aumento da concentração do triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico (n=3).....	39
Tabela VI. Diâmetro, número de partículas e área superficial para nanocápsulas preparadas com aumento da concentração do triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico.....	40
Tabela VII. Parâmetros da determinação do fluxo (J) das suspensões de nanocápsulas (n=3).....	41
Tabela VIII. Permeabilidade aparente (P_{app}) das suspensões de nanocápsulas (n=3).	42
Tabela IX. Composição quali-quantitativa dos microaglomerados.....	73
Tabela X. Condições operacionais utilizadas durante o processo de aspersão.	74
Tabela XI. Concentração teórica, teor e eficiência de encapsulação do DicONa em microaglomerados.....	78
Tabela XII. Valores de área por integração das bandas de estiramento C=O e Si-O e a razão (C=O/Si-O).....	87
Tabela XIII. Área superficial dos microaglomerados.....	92
Tabela XIV. Diâmetro dos microaglomerados (μm) (n=3).....	92
Tabela XV. Percentual liberado de DicONa em solução aquosa de HCl.	93

ABREVIATURAS

CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DCC	diciclohexilcarbodiimida
DicONa	diclofenaco sódico
DLS	espalhamento de luz dinâmico
DMAP	4-(N,N-dimetil)aminopiridina
EHL	equilíbrio hidrófilo-lipófilo
HPMC	hidróxipropilmetilcelulose
IndOEt	éster etílico de indometacina
IndOH	indometacina
<i>J</i>	fluxo
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MS	monoestearato de sorbitano
MSC	critério de seleção do modelo
NC	nanocápsula
ND	nanodispersão
P_{app}	permeabilidade aparente
PCL	poli(ϵ -caprolactona)
PEG	poli(etilenoglicol)
PIBCA	poli(isobutilcianoacrilato)
PLA	poli(ácido-lático)
PLGA	poli(ácido-lático- <i>co</i> -glicolídeo)
$R\theta$	razão de Rayleigh
RE	retro-espalhamento
<i>S</i>	área superficial
SLS	espalhamento de luz estático
T	transmissão
$t_{1/2}$	tempo de meia-vida
TG	triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico
NC ^{3a}	suspensão de nanocápsula de indometacina 3 mg/mL agitada
NC ^{3a}	suspensão de nanocápsula de indometacina 3 mg/mL mantida imóvel

RESUMO

O primeiro capítulo desta tese teve como objetivo verificar a estabilidade física e química de indometacina em suspensões de nanopartículas. Os resultados mostraram que a quantificação adequada por CLAE pode demonstrar a presença simultânea de nanocápsulas e nanocristais de fármacos nas suspensões.

O segundo capítulo teve como objetivo determinar a influência da concentração de triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (TCC), componente do núcleo das nanocápsulas, na cinética de liberação do éster etílico de indometacina. Com este propósito a sonda foi associada às nanocápsulas e sua hidrólise alcalina foi realizada para simular uma condição *sink*. A velocidade de consumo do éster foi menor com o aumento da concentração do TCC. O tempo de meia-vida do consumo da sonda associada às nanocápsulas foi maior quanto maior a concentração do TCC. O mecanismo de liberação foi determinado como sendo por transporte anômalo. O controle da liberação é decorrente da diminuição da área superficial das nanocápsulas.

O terceiro capítulo teve como objetivo verificar se a presença de hidróxipropilmetilcelulose nos microaglomerados preparados por nebulização controlaria a desaglomeração do sistema contendo um fármaco hidrofílico. Com este propósito o diclofenaco foi associado aos microaglomerados e sua liberação a partir dos mesmos foi realizada. A maior concentração da HPMC e o revestimento dos microaglomerados influenciou a liberação do diclofenaco sódico nos microaglomerados, desta forma obtendo-se o controle da desaglomeração do sistema.

Palavras-chave: indometacina, estabilidade, nanocápsulas poliméricas, éster etílico de indometacina, liberação controlada, diclofenaco sódico, microaglomerados.

ABSTRACT

The objective of the first chapter of this thesis was to verify the physical-chemical stability of indomethacin in nanoparticle suspensions. The results showed that with proper quantification by HPLC can demonstrate the simultaneous presence of both drug nanocrystals and nanocapsule suspensions.

The objective of the second chapter was to determine the influence of the concentration of caprylic/capric triglyceride (CCT), the core component of the nanocapsules, in the release kinetics of the ethyl ester of indomethacin. For this purpose the probe was associated with the nanocapsules and its alkaline hydrolysis was carried out to simulate a *sink* condition. The rate of ester consumption was lower with increasing concentration of CCT. The half-life of probe consumption associated with nanocapsules increased with increased concentrations of CCT. The release mechanism was found to be transport anomalous. The ester release is controlled by the reduction in surface area of the nanocapsules.

The objective of the third chapter was to verify the presence of HPMC in the microagglomerate that controls the disagglomeration system containing a hydrophilic drug. For this purpose, diclofenac was associated with the microagglomerates and their release was carried out. The higher concentrations of HPMC in the microagglomerates influenced the DicONa release in microagglomerates, thereby obtaining control of disagglomeration system.

Key-words: indomethacin, stability, polymeric nanocapsules, indomethacin ethyl ester, control release, diclofenac, microagglomerates.

1. INTRODUÇÃO

A resposta farmacológica de um fármaco é diretamente relacionada a sua concentração no sítio de ação, sendo sua distribuição no organismo determinada pelas suas propriedades físico-químicas, as quais não necessariamente proporcionam uma afinidade particular pela área afetada. A administração de formas farmacêuticas convencionais pode ocasionar uma alta concentração de fármaco em órgãos, tecidos e células saudáveis contribuindo para o aparecimento de efeitos adversos no organismo¹.

Na intenção de direcionar fármacos ao sítio de ação, sistemas carreadores vêm sendo utilizados com o objetivo de aperfeiçoar o transporte e a liberação de substâncias ativas otimizando sua eficiência no organismo através do controle de parâmetros que incluem o aumento da biodisponibilidade, controle de liberação e redução de efeitos adversos resultantes de sua absorção sistêmica^{2,3,4}. Além dessas vantagens, estes sistemas são capazes de proteger a substância ativa frente à degradação enzimática, química ou imunológica⁵.

Os carreadores de fármacos podem ser classificados como micro ou nanoparticulados, dependendo das faixas de diâmetros das formulações. As micropartículas apresentam diâmetro entre 1 até 1000 µm e as nanopartículas apresentam dimensões situadas entre 10 e 1000 nm^{6,1}. Nanopartículas poliméricas é um termo genérico para referir-se à nanocápsulas e nanoesferas, as quais são carreadores com um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso⁷ e uma matriz polimérica^{8,9,10} respectivamente. Na ausência de polímero pode-se obter nanoemulsão pela fina dispersão de óleo em água (emulsificação espontânea) e na ausência de polímero e de óleo pode-se obter uma nanodispersão dos tensoativos. As nanopartículas poliméricas apresentam como vantagem uma maior estabilidade que é associada à presença do polímero¹¹.

As formulações de nanopartículas poliméricas podem ser preparadas por diferentes métodos como polimerização *in situ* de monômeros dispersos¹², ou por precipitação de polímeros pré-formados como emulsificação-difusão¹³, nanoprecipitação e deposição interfacial¹⁴.

As nanopartículas poliméricas são estáveis até alguns meses após a preparação, no entanto com o tempo de armazenamento pode ocorrer aglomeração das partículas por tratar-se de suspensões aquosas. Pode ocorrer também degradação do polímero e outros

componentes presentes na suspensão, contaminação microbiológica e perda da substância ativa encapsulada durante o armazenamento⁹. A estabilidade das suspensões de nanopartículas pode ser melhorada por uma operação de secagem como a aspersão^{15,16}.

As micropartículas são geralmente formadas a partir de materiais poliméricos podendo ser preparadas por métodos como coacervação complexa, polimerização interfacial, centrifugação-extrusão, evaporação do solvente e secagem por aspersão¹⁷. A aspersão consiste em nebulizar através de uma câmara de secagem uma solução ou suspensão contendo polímero e fármaco. Devido à circulação de ar aquecido no equipamento, o solvente é rapidamente evaporado, transformando as gotículas em partículas sólidas¹⁸. Esta técnica apresenta vantagens por ser um processo rápido, de baixo custo, que não necessita utilizar solventes orgânicos, sendo ainda passível de transposição de escala^{3,19}.

Nosso grupo de pesquisa vem se dedicando ao desenvolvimento de sistemas micro e nanoparticulados contendo anti-inflamatórios não esteróides. Em um estudo físico-químico das suspensões de nanocápsulas contendo indometacina por espalhamento de luz estático verificou-se que as suspensões saturadas de fármaco contém nanocristais concomitantes com as nanocápsulas. A partir disto, o primeiro capítulo desta tese consistiu em verificar a correlação entre o espalhamento Rayleigh e os teores de fármacos em suspensão de nanocápsulas com e sem agitação, pressupondo-se que a diminuição do teor em função do tempo seria devido à presença dos nanocristais, já detectados por espalhamento de luz estático.

Estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o éster etílico de indometacina está disperso no núcleo oleoso de nanocápsulas composto por triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico e por monoestearato de sorbitano^{20,21}. Desta forma, presume-se que o consumo da sonda lipofílica poderia ser modulado através da variação dos componentes do núcleo das nanocápsulas. Assim, o segundo capítulo da tese teve como objetivo o estudo da influência da variação da concentração do triglicerídeo dos ácidos cáprico/caprílico nos perfis de liberação do éster etílico de indometacina a partir de nanocápsulas. Finalmente, estudos de secagem de suspensões de nanopartículas contendo anti-inflamatórios não-esteróides demonstraram que as nanopartículas aglomeram com o adjuvante de secagem, dióxido de silício, organizado em micropartículas^{15,22,16,23}. Com o objetivo de aumentar a carga de fármaco nos sistemas nanoestruturados, esse foi impregnado ao adjuvante de secagem formando um núcleo que foi recoberto pela

suspensão coloidal como material de revestimento para controlar a liberação de fármacos lipofílicos ou hidrofílicos²⁴. Uma nova arquitetura de micropartículas organizadas em escala nanométrica foi desenvolvida para estudar a potencialidade de controlar a liberação do diclofenaco sódico a partir de xerogéis²⁵ pelo revestimento dos aglomerados com nanocápsulas. Micropartículas nanorrevestidas foram preparadas pelo método sol-gel seguida de aspersão. Os estudos de liberação demonstraram a gastrorresistência e a eficiência do sistema apresentando uma liberação sustentada do diclofenaco sódico. A preparação de microaglomerados nanorrevestidos contendo indometacina, dióxido de silício e nanocápsulas poliméricas mostrou que o mecanismo de liberação do modelo de fármaco lipofílico foi dependente da desaglomeração das partículas²⁶.

Desta forma, o terceiro capítulo da tese apresenta o desenvolvimento de sistemas inovadores de microaglomerados de nanocápsulas em microgéis de HPMC, empregando-se dióxido de silício como adjuvante de secagem. Um modelo de fármaco hidrofílico foi usado, assim como Eudragit S100[®] como polímero das nanocápsulas. Esse polímero confere propriedades de gastrorresistência aos microaglomerados. A poli(ϵ -caprolactona) foi também utilizada por ser um polímero biodegradável e como controle na comparação com Eudragit S 100[®]. Os novos microaglomerados poderiam modular o perfil de liberação de fármacos hidrofílicos, retardando a desaglomeração das nanocápsulas durante a liberação.

**CAPÍTULO I: ESTUDO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE
NANOPARTÍCULAS CONTENDO INDOMETACINA**

1. REVISÃO DE LITERATURA

O entendimento da organização estrutural dos sistemas nanoparticulados é de extrema importância devido ao tamanho reduzido das partículas e a variedade de componentes utilizados na sua preparação⁸. Visando a aplicação na área farmacêutica, torna-se importante que características como pH, distribuição do tamanho de partículas, potencial zeta, capacidade de encapsulação e cinética de liberação de fármacos, além da avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenagem, sejam bem definidos⁹. Devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e ausência de toxicidade, poliésteres derivados de monômeros como lactídeo, glicolídeo e caprolactona são empregados no preparo de nanocarreadores de fármacos^{27,28,29}.

A distribuição do tamanho das partículas é uma das mais importantes caracterizações físico-químicas das suspensões coloidais. A tendência à sedimentação do fármaco durante a armazenagem e estudos de estabilidade podem ser monitorados medindo-se a mudança da distribuição do tamanho das partículas⁸.

A determinação da concentração de fármaco encapsulada nas nanocápsulas é complexa devido ao tamanho reduzido destas, dificultando a separação da fração de fármaco livre da fração encapsulada. Uma técnica bastante empregada é a ultrafiltração-centrifugação que permite a separação entre a fase aquosa dispersante e a fração de nanopartículas, sendo a concentração de fármaco livre determinada no ultrafiltrado. A concentração de fármaco encapsulado é determinada pela diferença entre a concentração total de fármaco contido na suspensão e a concentração de fármaco livre no ultrafiltrado^{30,31}. No entanto, essa técnica não permite quantificar-se a concentração de fármaco na forma de nanoaglomerados ou nanocristais estabilizados por tensoativos que estejam presentes concomitantemente com as nanopartículas em suspensão.

Em um estudo realizado por Calvo¹¹ e colaboradores (1996) utilizou-se a técnica de MET para verificar a presença de cristais de fármacos concomitantes às nanopartículas. Formulações de nanoesferas de poli(ϵ -caprolactona) apresentaram cristais de indometacina aderidos à superfície das partículas, o mesmo não ocorreu com as formulações de nanocápsula e nanoemulsão, as quais continham Miglyol[®] 840 como componente oleoso.

Guterres³¹ e colaboradores (1995) ao determinar a concentração de diclofenaco associado à nanocápsulas de poli(ácido láctico) observaram um encapsulamento de aproximadamente 100 % do fármaco logo após o preparo das suspensões independente do núcleo oleoso. Após 30 dias de armazenagem, o teor de fármaco caiu para valores próximos a 50 % tanto nas suspensões contendo 3 mg/mL de diclofenaco e núcleo de benzoato de benzila, quanto naquelas contendo 2 mg/mL de diclofenaco com núcleo de Miglyol[®] 840, sendo estas as formulações mais concentradas em fármaco. Após 8 meses de armazenagem foi possível observar a formação de cristais do fármaco aderidos às paredes do recipiente. Esses cristais poderiam ser formados durante a preparação das nanopartículas, quando a concentração de fármaco excede sua saturação no sistema, e estabilizados pelos tensoativos. Com a mesma dimensão de tamanho das nanocápsulas os nanocristais de fármaco não são quantificados no ultrafiltrado. Com o passar do tempo estes cristais cresceriam e precipitariam o que causaria a diminuição do teor de fármaco em função do tempo e a visualização de cristais micrométricos após armazenamento.

Suspensões de nanocápsulas contendo diferentes concentrações de indometacina (1 e 3 mg/mL) foram estudadas pela técnica de espalhamento de luz^{32, 33}. Uma comparação do grau de despolarização da luz espalhada ($\rho_{c \rightarrow 0}$) entre as formulações mostrou que aquelas preparadas com 0 e 1 mg/mL de fármaco apresentavam baixa anisotropia e, por outro lado, aquela preparada com 3 mg/mL de indometacina apresentou valores de $\rho_{c \rightarrow 0}$ maiores. Esses resultados sugerem que as nanocápsulas preparadas com 3 mg/mL de indometacina poderiam apresentar nanocristais de fármaco concomitantes às nanocápsulas em suspensão. A partir disto, analisou-se a intensidade de luz espalhada para as formulações de nanocápsulas contendo ou não indometacina (0, 1 e 3 mg/mL) comparadas com a dispersão de tensoativos contendo ou não fármaco (0 e 1 mg/mL). Observou-se uma queda brusca nas intensidades médias de luz espalhada após armazenagem para as formulações de nanocápsulas e nanodispersão com maior concentração de fármaco. Os resultados evidenciados também foram normalizados obtendo-se as razões de Rayleigh. O melhor modelo de organização molecular das nanocápsulas de indometacina (1 mg/mL) é um núcleo contendo o triglicerídeo de cadeia média e o monoestearato de sorbitano que é revestido com uma parede polimérica que contém a indometacina adsorvida^{20,21}.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Com o objetivo de verificar a correlação entre os dados de espalhamento de luz estático (SLS) e o decréscimo no teor de fármaco quando a formulação de nanocápsulas está super-saturada, propôs-se neste estudo a avaliação da estabilidade físico-química da indometacina por um período de 6 meses através de sua quantificação por CLAE, assim como através da análise do retro-espalhamento de luz em equipamento Turbiscan[®].

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a estabilidade físico-química da indometacina em suspensões de nanocápsulas através da sua quantificação por CLAE;
- Investigar as suspensões de nanocápsulas e nanodispersão por retro-espalhamento de luz para verificar se o método distinguiria nanocristais de fármaco de nanopartículas poliméricas presentes nas formulações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (MW=65,000 g/mol) foi obtida da Aldrich (Strasbourg, France). Monoestearato de sorbitano (MS) e polissorbato 80 foram fornecidos pela Delaware (Porto Alegre, Brasil). Triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (TG) foram adquiridos pela Brasquim (Porto Alegre). Indometacina (IndOH) foi obtida da Sigma (St. Louis, USA). Todos os demais produtos químicos e solventes empregados foram utilizados em grau farmacêutico. Todos os reagentes foram utilizados como fornecidos.

3.2 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

As suspensões de nanocápsulas (NC) foram preparadas por deposição interfacial conforme proposto por Fessi¹⁴ e colaboradores (1989). Uma solução de PCL (100 mg), MS (77 mg), TG (310 mg) e IndOH em acetona (27 mL) foi preparada sob agitação magnética constante à 40 °C. Em frasco separado, o polissorbato 80 (77 mg) foi dissolvido em água (53 mL). A solução orgânica, totalmente solubilizada, foi injetada na fase aquosa, sob agitação magnética constante à temperatura ambiente, através de um funil. A suspensão foi mantida sob agitação por 10 min. A seguir, cada suspensão foi concentrada em evaporador rotatório à pressão reduzida, eliminando-se a acetona e ajustando-se o volume final a 10 mL. As formulações foram designadas NC⁰, NC¹ e NC³ quando preparadas com 0, 1 e 3 mg/mL de indometacina. Para fins de comparação, nanodispersões dos tensoativos foram preparadas omitindo-se o polímero e o óleo na ausência (ND⁰) e com 1 mg/mL (ND¹) de fármaco.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DA INDOMETACINA

A quantificação de indometacina foi realizada por CLAE (detecção 267 nm) (Perkin Elmer S-200 com injetor S-200, detector UV-Vis) usando-se pré-coluna e coluna (Novapak C18, 150 mm, 3,9 mm, 4 μ m, Waters). A fase móvel (0,7 mL/min¹) consistiu de acetonitrila/água (70:30 v/v), com pH aparente 5,0 \pm 0,5 ajustado com ácido acético 10% (v/v). O método de CLAE foi validado considerando a linearidade, variabilidade intra e inter dia, seletividade, precisão, limite de quantificação e recuperação²⁰. Curvas analíticas

para a indometacina foram obtidas entre 1,00-25,00 $\mu\text{g/mL}$ apresentando coeficientes de correlação maiores que 0,9992. A variabilidade intra e inter dia foi determinada para diferentes concentrações de indometacina (3,00, 12,00 e 17,00 $\mu\text{g/mL}$) e para cada concentração da curva de calibração (1,00, 2,00, 5,00, 10,00, 15,00, 20,00 e 25,00 $\mu\text{g/mL}$). Variabilidade intra e inter dia não excederam 1,68 % e a precisão foi de 99,0 %. O limite de quantificação foi 1,00 $\mu\text{g/mL}$.

Para determinar, respectivamente, a estabilidade física e química da indometacina na formulação NC³, volumes iguais da formulação foram separados em dois frascos diferentes (A e B). A amostra do frasco A foi constantemente agitada e a amostra do frasco B não foi agitada durante o experimento. Uma alíquota de cada frasco (0,1 mL) foi diluída com 10 mL de acetonitrila para dissolver todos os componentes. Esta solução foi filtrada (Millipore 0,45 μm) e injetada para análise em CLAE. Todos os frascos foram estocados à temperatura ambiente e protegidos da luz.

3.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA

A análise morfológica foi realizada com Microscópio Eletrônico de Transmissão (TEM; JEM 1200 ExII), operando a 80 kV (Centro de Microscopia -UFRGS). As suspensões foram diluídas 10 vezes sendo depositados em um grids (Formvar-Carbon support film, Electron Microscopy Sciences) e recobertas com acetato de uranila (2 % p/v), para contraste.

3.5 ANÁLISE POR ESPALHAMENTO MÚLTIPLO DE LUZ

As suspensões de NC foram analisadas por um Turbiscan *Lab* (Formulation, Laboratório K213, IQ-UFRGS). As formulações foram colocadas dentro de uma cubeta de vidro transparente (20 mL) e analisadas a 25 °C.

Uma técnica que tem sido utilizada recentemente para analisar a estabilidade de suspensões de nanopartículas, é o espalhamento múltiplo de luz³⁴ realizado através de um aparelho chamado Turbiscan *Lab* (Formulation, France). O sistema de detecção do Turbiscan *Lab* é composto por um feixe de luz no infravermelho próximo ($\lambda=880\text{nm}$) e dois detectores: um de transmissão (T) e outro de retro-espalhamento (RE). O detector de T recebe a luz que atravessa a amostra (a 180° do feixe incidente), enquanto o detector de

RE, recebe a luz espalhada e refletida pela amostra (a 45° do feixe de luz incidente). O sistema detector realiza uma varredura do fundo ao topo da cubeta, adquirindo dados de transmissão e retro-espalhamento. O princípio da medida baseia-se na variação de fração volumétrica ou diâmetro da partícula, resultando em uma variação dos sinais de T e RE. Para partículas que não absorvem luz no comprimento de luz utilizado (880 nm), a intensidade de transmissão e retro-espalhamento é essencialmente dependente da concentração de partículas, diâmetro de partícula e índice de refração da mistura³⁵.

4. RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE INDOMETACINA EM FORMULAÇÃO DE NANOCÁPSULAS POR CLAE

A razão de Rayleigh ($R\theta$) das suspensões NC⁰ e NC¹ mostraram pequenas flutuações durante 14 dias armazenadas à 25° C e um aumento em $R\theta$ em 120 dias. NC⁰ e NC¹ apresentaram perfis similares, enquanto NC³ mostrou uma $R\theta$ superior até 7 dias de armazenamento que diminuiu bruscamente em 7 dias após preparação. A razão de Rayleigh observada para NC³ comparada com a $R\theta$ das NC⁰ e NC¹ indicou a formação de nanocristais na formulação NC³ ³².

Para comparar os dados previamente obtidos por SLS (razão de Rayleigh)³² com o teor de fármaco na suspensão em função do tempo, as amostras de nanocápsulas e de nanodispersões foram analisadas por CLAE. NC¹ apresentou teor constante próximo a 1 mg/mL durante 150 dias quando o frasco permaneceu imóvel. No entanto, NC³ e ND¹ apresentaram um decréscimo no teor total de indometacina em 20 dias passando, respectivamente, para 1,5 mg/mL e 0,2 mg/mL, quando os frascos permaneceram imóveis.

Com o objetivo de diferenciar se o decréscimo no teor foi causado por uma instabilidade química ou devido à sedimentação por instabilidade física, a amostra NC³ foi separada em 2 frascos, que foram armazenados ao abrigo da luz. O primeiro foi agitado NC^{3A} logo antes de cada tomada de alíquota e o segundo foi mantido imóvel NC^{3B} para determinação do teor de IndOH (Tabela I).

Tabela I. Quantificação do teor da formulação NC³ durante 180 dias.

NC/dias	0	4	7	11	17	21	30	40	180
NC ^{3A}	3,024 (98,2%)	3,035 (98,6%)	3,027 (98,3%)	3,018 (98,0%)	3,015 (97,9%)	3,030 (98,4%)	3,026 (98,3%)	3,049 (99,0%)	3,084 (100,1%)
NC ^{3B}	3,024 (98,2%)	2,443 (79,3%)	2,066 (67,1%)	1,845 (59,9%)	1,482 (48,1%)	1,395 (45,3%)	1,056 (34,3%)	0,697 (22,6%)	0,679 (22,0%)

A concentração da NC^{3A} apresentou-se constante ($p > 0,05$) enquanto que a concentração da NC^{3B} diminuiu ao longo do tempo ($p < 0,05$), indicando que a instabilidade da suspensão foi física e não química. A diminuição do teor em função do tempo é devida à separação de fases do sistema e não é decorrente de uma degradação da indometacina.

Durante o período de armazenamento, os nanocristais aglomeram e precipitam, causando a diminuição na razão de Rayleigh. Desta forma, os resultados obtidos pela quantificação do teor de IndOH em função do tempo para a formulação NC³ corroboraram com os resultados obtidos através da razão de Rayleigh para a NC³. Assim, pode-se sugerir o método de separar a suspensão de nanopartículas em dois frascos, sendo que um frasco permanece imóvel e o outro frasco sempre será agitado antes da retirada de cada alíquota para posteriormente quantificar em CLAE, como alternativo para a determinação de nanocristais presentes nas suspensões.

4.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICA DAS FORMULAÇÕES DE NC E ND POR ESPALHAMENTO MÚLTIPLO DE LUZ

Sistemas coloidais e dispersões apresentam-se geralmente instáveis. Os fenômenos de desestabilização consistem na migração de partículas (cremagem e sedimentação) e variação do diâmetro de partícula ou agregação (floculação e coalescência)^{34,35}. Sendo assim, estudos de estabilidade de suspensões de nanopartículas são de extrema importância, os quais são realizados por técnicas de espalhamento de luz³⁶. Todavia, estes métodos requerem a diluição da amostra podendo ocasionar modificações estruturais nos sistemas, conseqüentemente, modificando suas propriedades. A técnica de espalhamento múltiplo de luz não requer diluição da amostra, desta forma fornecendo resultados de estabilidade sem qualquer alteração prévia no sistema³⁴. A utilização de técnicas que necessitam de diluição de amostra, para a verificação da presença de nanocristais concomitante com outras nanoestruturas, tornam-se inviáveis devido à dissolução do nanocristal. Desta forma, o espalhamento múltiplo de luz poderia também ser uma alternativa à determinação da presença de nanocristais nas suspensões coloidais. As formulações NC⁰ e NC¹ foram analisadas por espalhamento múltiplo de luz (Figura 1 e 2).

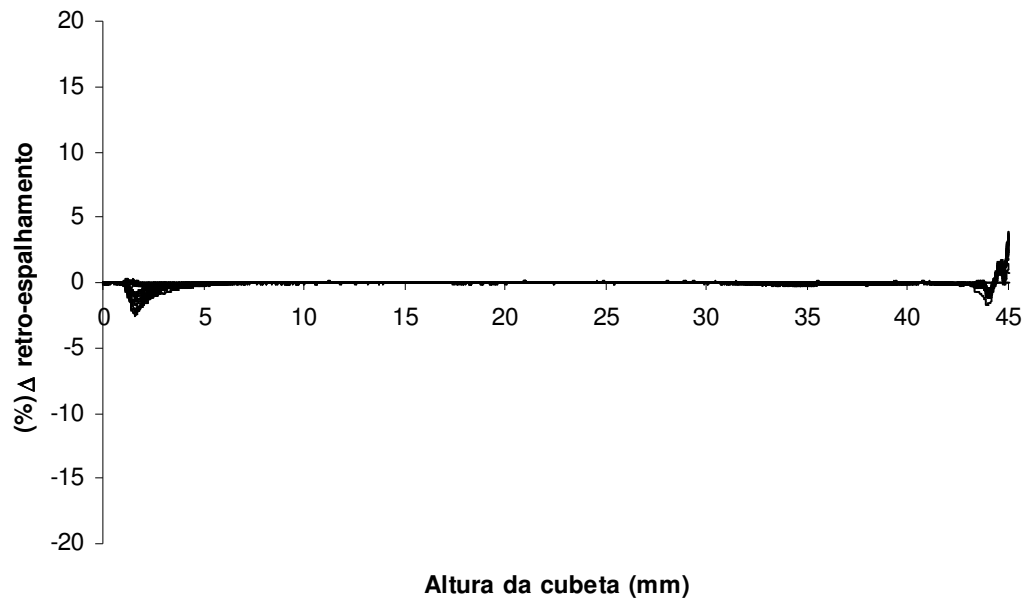


Figura 1. Perfil de retro-espalhamento da NC⁰.

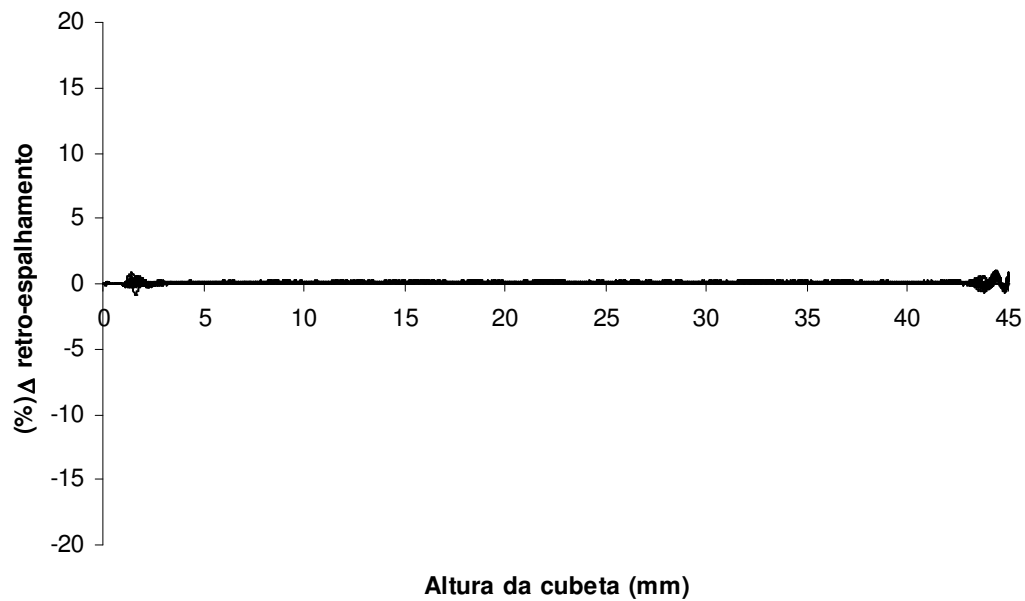


Figura 2. Perfil de retro-espalhamento da NC¹.

As análises de transmissão para as suspensões de nanocápsulas foram nulas, propiciando-se a análise de retro-espalhamento de luz. Para a NC⁰ a variação de retro-espalhamento (Figura 1) mostrou uma leve tendência a clarificação no fundo da cubeta,

apresentando uma tendência à cremagem. A análise no topo dessa cubeta mostra diminuição de retro-espalhamento em função do tempo, o que sugere que a cremagem é seguida de clarificação devido provavelmente à coalescência no topo. Por outro lado, a amostra NC¹ preparada com 1 mg.mL⁻¹ de IndOH mostrou-se mais estável que NC⁰, com menor tendência à clarificação no fundo ou mudanças no topo (Figura 2). No caso de NC³ houve uma pequena variação de retro-espalhamento na parte central da cubeta (Figura 3) (tempo 0 h = 255 nm, tempo 6 h = 258 nm), mas que não é suficiente para constatar aumento de tamanho de partículas em função do tempo.

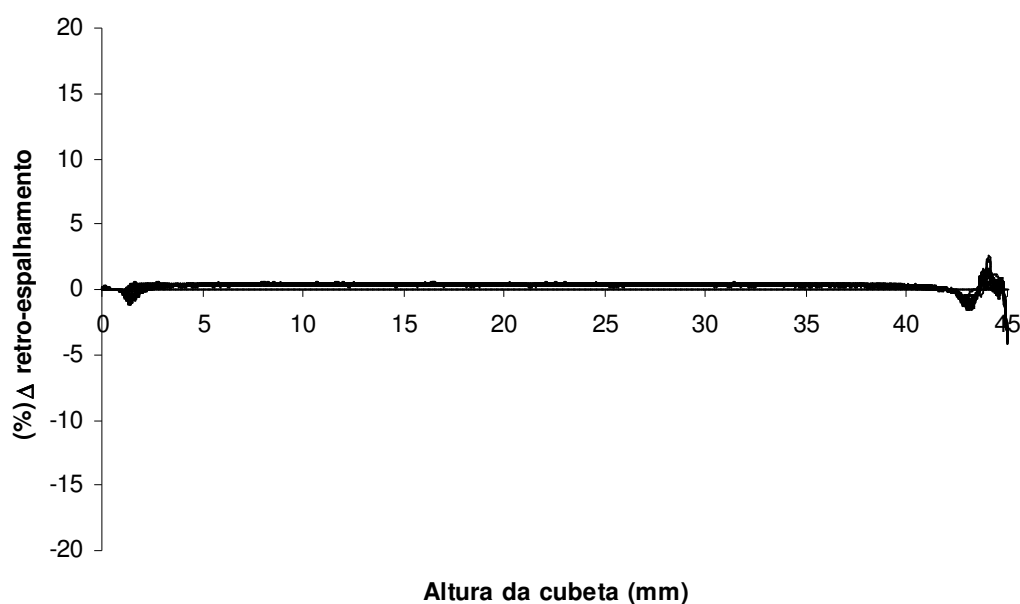


Figura 3. Perfil de retro-espalhamento da NC³.

Amostras de ND⁰ e ND¹ apresentaram um perfil de transmissão, sendo necessário, portanto, a análise da variação de transmissão e não de retro-espalhamento das suspensões. As amostras apresentaram uma variação de transmissão no centro da cubeta (Figura 4 e 5). A presença de indometacina na formulação ND¹ levou a uma variação no sinal de transmissão maior do que para ND⁰. Pode-se verificar que as formulações de nanodispersão são menos estáveis do que as formulações de nanocápsulas, pois apresentam variação de transmissão no meio dos perfis. Considerando-se as análises de SAXS²¹ de ND⁰, que indicam que a nanodispersão é formada por nanoaglomerados de

monoestearato de sorbitano, a aglomeração/desaglomeração deve estar ocorrendo durante uma varredura e por isso o perfil no meio da cubeta apresenta a variação de transmissão. A amostra ND¹ é fisicamente instável frente às outras amostras analisadas.

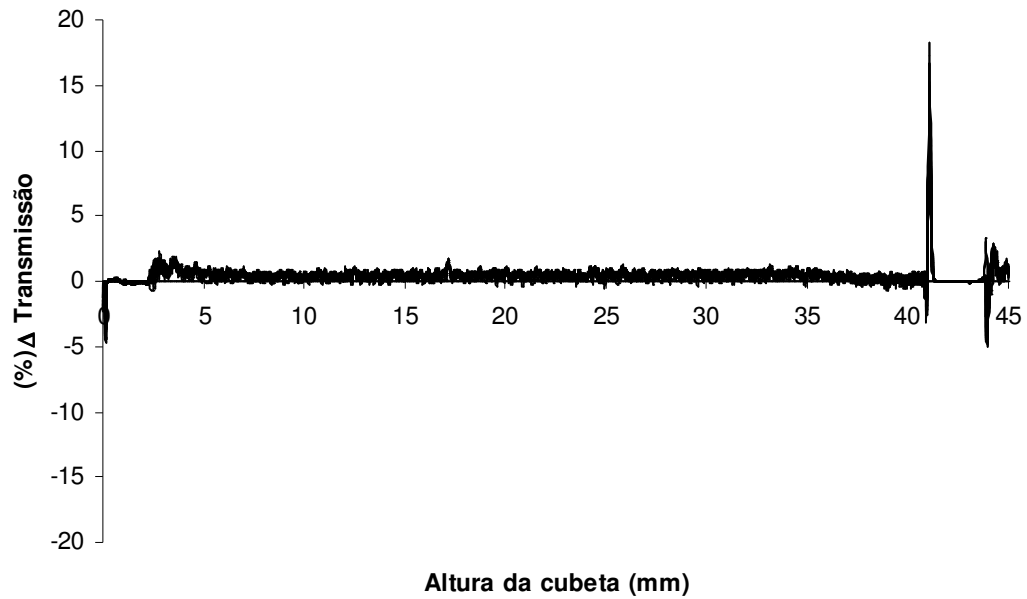


Figura 4. Perfil de transmissão da ND⁰.

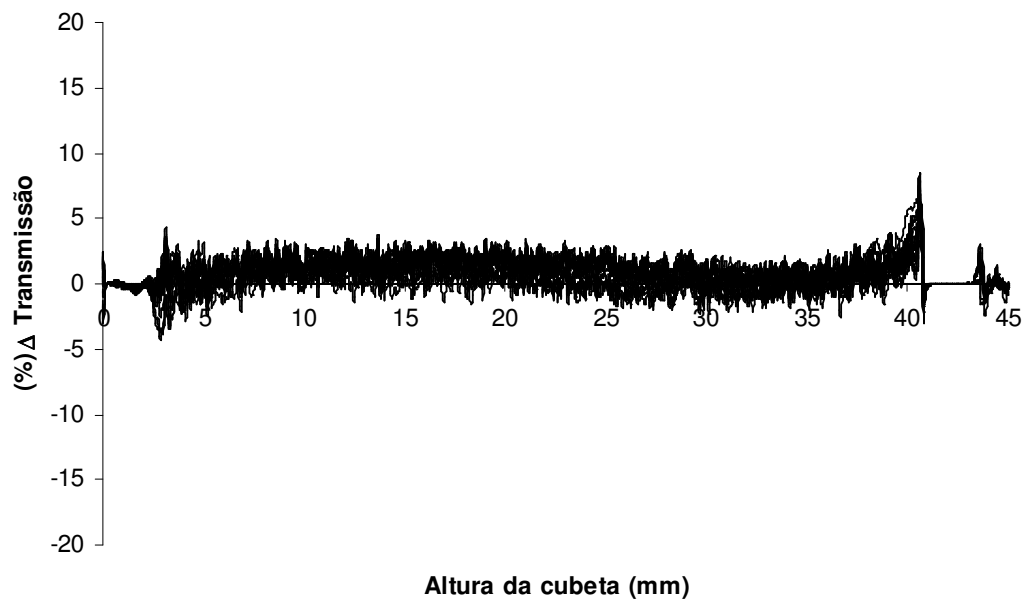


Figura 5. Perfil de transmissão da ND¹.

4.3 ANÁLISE DAS SUSPENSÕES POR MET

Com o intuito de poder-se observar os cristais e a forma das nanopartículas as amostras NC⁰, NC¹, NC³, ND⁰ e ND¹ foram analisadas por MET. A Figura 6 mostra que as nanocápsulas são partículas esféricas com diâmetros similares aos determinados por espalhamento de luz dinâmico³². NC⁰ e NC¹ mostraram imagens similares, enquanto que NC³ apresenta partículas esféricas circundadas por partículas menores. Estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a presença do polímero nas nanocápsulas diminui a tendência à coalescência observada em sistemas nanoestruturados preparados sem polímero^{21,29}. As fotomicrografias destes sistemas na ausência de polímero são semelhantes às fotomicrografias da formulação NC³, sugerindo desestabilização do sistema levando à coalescência.

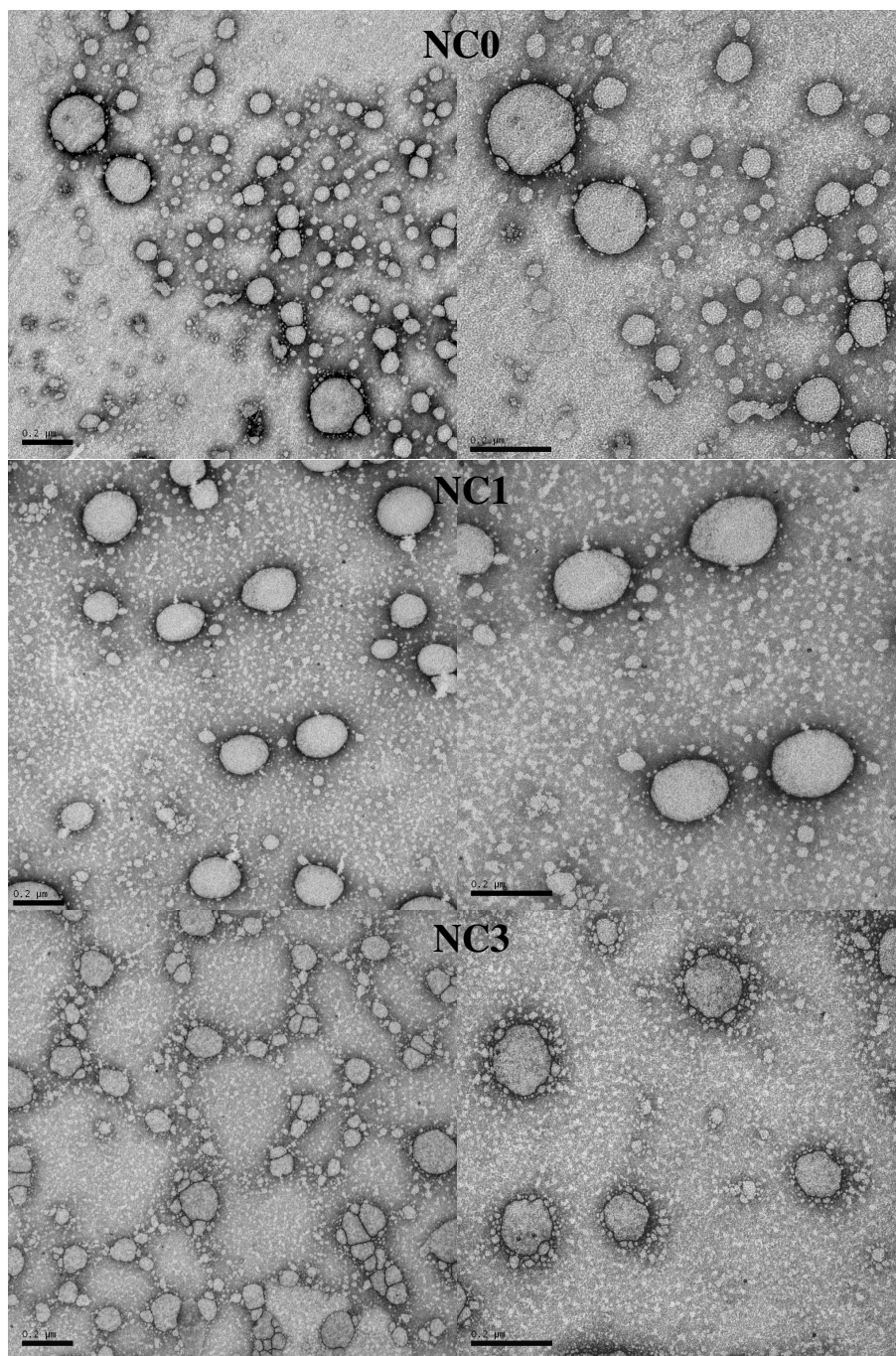


Figura 6. Fotomicrografias de MET das nanocápsulas aumentos de 75,000 e 120,000 vezes NC⁰, NC¹, NC³.

As amostras de nanodispersão analisadas por MET mostraram para ND⁰ aglomerados de monoestearato de sorbitano estabilizados por polissorbato 80 (Figura 7). No caso de ND¹, a presença de indometacina parece ter desestabilizado os aglomerados que estão dispersos em partículas menores. Estes dados corroboram com as análises de

Turbiscan[®] e com análises prévias de SAXS²¹ onde aglomerados de monoestearato de sorbitano nanoorganizados tinham sido propostos.

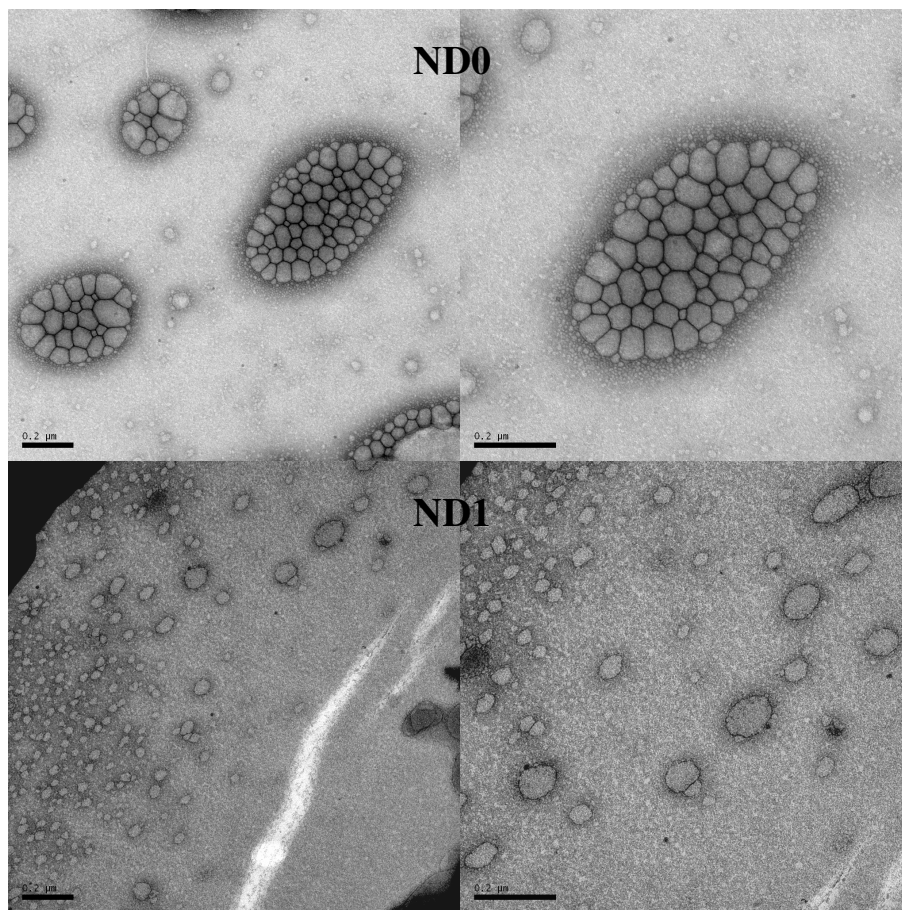


Figura 7. Fotomicrografias de MET das nanodispersões aumentos de 75,000 e 120,000 vezes ND⁰, ND¹.

5. CONCLUSÃO

Uma análise global dos resultados mostrou que um protocolo de quantificação adequado por CLAE pode demonstrar a presença simultânea de nanocápsulas e nanocristais de fármacos nas suspensões. Por outro lado, não foi possível determinar-se, nas condições experimentais escolhidas, de forma conclusiva que o espalhamento múltiplo de luz pode ser uma alternativa para determinar que suspensões de nanocápsulas estão super-saturadas de fármacos.

**CAPÍTULO II: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO
DE TRIGLICERÍDEOS DOS ÁCIDOS CÁPRICO E CAPRÍLICO NO
PERFIL DE LIBERAÇÃO DO ÉSTER ETÍLICO DE
INDOMETACINA A PARTIR DE NANOCÁPSULAS**

1. REVISÃO DE LITERATURA

Nanopartículas poliméricas têm atraído grande atenção no campo das ciências farmacêuticas por oferecerem um apropriado sistema para a liberação de vários agentes terapêuticos em áreas específicas do corpo, objetivando aumentar o índice terapêutico e diminuir efeitos colaterais⁵.

As nanocápsulas apresentam uma série de vantagens em relação a outros sistemas carreadores, por proteger a substância ativa nela incorporada frente à degradação química, uma vez que a mesma fica retida no interior de um invólucro polimérico possibilitando uma liberação controlada no organismo¹. Estas estruturas são potencialmente capazes de proteger o fármaco frente à degradação enzimática e imunológica, aumentar a especificidade de ação, desta forma aumentando a atividade terapêutica de muitas substâncias, resultando em doses terapêuticas menores, com redução dos efeitos tóxicos^{37,38}. Por outro lado, um grande número de fármacos apresenta pouca solubilidade ou instabilidade em meio aquoso, fatores que podem originar problemas no desenvolvimento de formulações. Neste sentido, as nanopartículas poliméricas podem proteger moléculas lábeis e moléculas com problemas de solubilidade³⁹.

Em 1989, Fessi e colaboradores propuseram o método baseado na deposição do polímero pré-formado biodegradável. Este método consiste em dissolver o polímero, óleo, estabilizador (tensoativo de baixo EHL) e substância ativa em um solvente miscível em água. Essa fase orgânica é vertida em uma fase aquosa contendo estabilizador hidrofílico (tensoativo de alto EHL). As nanopartículas são originadas espontaneamente pela rápida difusão do solvente que é posteriormente eliminado da suspensão através da evaporação sob pressão reduzida. Este método produz nanopartículas com elevadas taxas de encapsulação, principalmente para fármacos lipofílicos¹⁴.

O método de deposição interfacial é simples de ser executado, reprodutível e aplicável a muitos polímeros. As limitações incluem a necessidade do emprego de solventes miscíveis em água para que a razão de difusão seja suficiente para a produção espontânea da emulsão, a solubilidade das substâncias empregadas e a quantidade significativa de solvente orgânico utilizado³⁹.

Para a obtenção de nanocápsulas através do método de deposição interfacial as matérias-primas imprescindíveis são o polímero biodegradável, componente oleoso e tensoativos. Os polímeros mais utilizados são poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-

co-glicolídeo) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e ainda os copolímeros do ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico⁹. Os óleos mais utilizados são os ésteres de ácidos graxos iodados, Mygliol 810[®] e 812[®] e misturas de triglicerídeos de ácidos graxos de cadeia longa⁴⁰. Estas formulações exigem também o uso de uma associação de tensoativos, um de elevado EHL (Tween 80[®]) e outro de baixo EHL (monoestearato de sorbitano)^{41,42} ou ainda a presença de fosfolipídios³⁸ ou de polímeros oxigenados como PEG e os poloxameros^{43,44}. A presença dos tensoativos confere maior viscosidade ao sistema após a evaporação do solvente, aumentando a estabilidade do mesmo por prevenir a agregação com o passar do tempo.

1.1 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DE SUSPENSÕES DE NC PREPARADAS VARIANDO-SE A CONCENTRAÇÃO DE SEUS COMPONENTES

Nos últimos anos, pesquisas científicas vêm sendo realizadas na intenção de relacionar a influência dos componentes das nanopartículas na caracterização físico-química destes sistemas^{1,9}. Neste sentido, a estrutura molecular e a concentração do polímero, dos tensoativos (alto e baixo EHL) e do óleo empregados na preparação direcionam para diferenças nas características e estruturas das nanopartículas.

Valero⁴⁵ e colaboradores (1996) observaram diferenças no diâmetro de partícula ao utilizarem diferentes concentrações de cianoacrilato de *iso*-butila e Miglyol[®] 812 na preparação de nanocápsulas contendo triamcinolona. As concentrações do monômero e do óleo apresentaram-se diretamente proporcionais ao diâmetro das nanocápsulas. A técnica de ultracentrifugação detectou a presença de nanoesferas (≈ 85 nm) nas suspensões de nanocápsulas (≈ 170 nm). Essa população de nanoesferas presente na suspensão de nanocápsulas poderia estar ocasionando uma diminuição do diâmetro médio das partículas.

Mosqueira⁴⁰ e colaboradores (2000) avaliaram a influência da composição nas características físico-químicas e estruturais de nanocápsulas de PLA. Formulações de nanocápsulas foram preparadas com os seguintes óleos: Miglyol 810[®], Miglyol 812[®], Miglyol 829[®], Miglyol 840[®], oleato de etila, óleo de soja, óleo mineral e dodecano. Os valores de potencial zeta (-55 ± 6 mV) não mudaram significativamente em função da natureza do núcleo oleoso, sugerindo que o óleo não está localizado na interface, mas completamente encapsulado pelo polímero. Por outro lado, os valores de diâmetro

sofreram alterações, sendo observado que quanto menor a tensão interfacial do óleo menor o diâmetro das nanocápsulas. Ainda, nesse estudo foram avaliados diferentes tensoativos na formação das nanopartículas: Epikuron[®] 170, Epikuron[®] 200, fosfatidilcolina de soja, poloxamer 188, fosfolipon[®] 90, dimiristoil-fosfatidilcolina e Span[®] 80. Os autores observaram uma diminuição do tamanho das nanocápsulas até uma concentração de 30 mg/mL de Epikuron[®] 170. Para confirmar a presença das nanocápsulas foi realizado ultracentrifugação em gradiente de densidade de Percoll[®]. Os resultados constataram a presença de lipossomas nas formulações, quando a lecitina foi utilizada. Ainda, nanoesferas foram obtidas nas suspensões de nanocápsulas.

Müller⁴⁶ e colaboradores (2004) observaram que formulações preparadas com apenas um dos tensoativos em concentração de 7,66 mg/mL, apresentaram precipitado macroscópico após a evaporação do solvente orgânico e concentração da água. O tensoativo lipofílico é importante para a obtenção de uma população de partículas com distribuição de tamanho homogênea e estreita evitando também a sedimentação das partículas e a passagem da substância ativa para o meio aquoso¹.

A composição quali-quantitativa dos sistemas, como a natureza e a concentração do polímero, do tensoativo, do núcleo oleoso podem influenciar a cinética de liberação *in vitro* ou a ação *in vivo* do fármaco⁴². Para uma caracterização completa dos sistemas nanoestruturados contendo fármaco faz-se necessário a determinação da cinética de liberação *in vitro* do mesmo. A substância ativa pode estar adsorvida na parede polimérica ou dissolvida no núcleo oleoso de nanocápsulas, devido a isto o comportamento cinético de um fármaco será diferente para cada caso^{47,20,21}.

O perfil de liberação do fármaco a partir das nanopartículas é dependente da natureza do sistema de liberação. No caso das nanocápsulas, quando o fármaco encontra-se envolto pelo polímero a liberação ocorre pela difusão do fármaco através da barreira polimérica o que, teoricamente, descreve cinética de ordem zero⁴.

Losa³⁰ e colaboradores (1993) avaliaram a influência de dois óleos, Labrafil[®] 1944 e Miglyol[®] 840 (razão 1/20 ou 1/40 O/A) na preparação de nanocápsulas contendo metipranolol obtidas por polimerização interfacial (cianoacrilato de *iso*-butila) (PIBCA) e por deposição interfacial (PCL). O diâmetro de partícula sofreu alteração dependendo da origem do óleo, mas não dependeu da concentração utilizada. Labrafil[®] 1944 por ter características hidrofílicas apresentou-se disperso na suspensão sendo formadas partículas de menores diâmetros. A presença do polímero reduziu o tamanho das NC em relação a

nanoemulsão. A eficiência de encapsulação do fármaco foi relacionada com a solubilidade do mesmo no óleo, tendo sido maior para o Labrafil[®] 1944. Desta forma, a natureza do óleo influenciou na cinética de liberação do metipranolol para nanocápsulas de PIBCA, sendo mais rápida quando o Miglyol[®] 840 foi utilizado. Para as nanocápsulas de PCL, a cinética de liberação foi influenciada pela concentração de óleo apresentando uma menor constante de liberação quanto maior a concentração de óleo.

Santos-Magalhães⁴⁸ e colaboradores (2000) observaram perfis de liberação similares para nanocápsulas de PLGA e nanoemulsão contendo penicilina G benzatina. A liberação de penicilina G benzatina a partir da nanoemulsão foi ligeiramente mais lenta devido a diferenças na natureza da fase oleosa dos dois vetores nanoestruturados. Na preparação das nanocápsulas foi usado óleo de girassol e na nanoemulsão foi usado Miglyol 812[®]. Assumindo que o processo cinético é governado pelo coeficiente de partição óleo/água, os autores sugeriram que a diferença nos valores de força iônica e constante dielétrica dos óleos poderia explicar as diferenças observadas nos perfis de liberação da penicilina G benzatina a partir das nanocápsulas e da nanoemulsão.

Ferranti⁴⁹ e colaboradores (1999) avaliaram o perfil de liberação *in vitro* de nanocápsulas de PCL contendo primidona e álcool benzílico como núcleo oleoso. As amostras de nanocápsulas foram colocadas em meio gástrico simulado (pH 1,2) e em meio intestinal simulado (pH 7,4). Uma solução padrão de primidona em álcool benzílico foi utilizada como controle. A liberação total da primidona na solução controle foi alcançada após 8 horas de experimento, enquanto que o percentual para a primidona liberado a partir das nanocápsulas foi de $76,0 \pm 1,4$ % (pH 7,4) e de $83,0 \pm 4,5$ % (pH 1,2). Os autores sugeriram que ocorra uma interação entre o fármaco e o polímero para explicar a menor liberação a partir das nanocápsulas. A rápida liberação do fármaco, durante a primeira hora, sugere que uma parte da primidona estaria adsorvida na superfície das nanocápsulas.

Em um estudo realizado em nosso laboratório⁵⁰ foi avaliado o mecanismo de associação da etionamida a nanocápsulas e nanoesferas de Eudragit S90[®] através de seus perfis de liberação. As suspensões nanoestruturadas foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, sendo o fármaco adicionado antes da formação das nanopartículas ou por incubação, adicionado após a preparação das nanopartículas. Foi observada a liberação rápida e total do fármaco a partir das formulações obtidas por incubação e liberação de 80 % e de 90 % a partir das nanopartículas preparadas por incorporação. Desta forma, os

autores consideraram que a adsorção na superfície das nanopartículas é o mecanismo preferencial de incorporação do fármaco.

Pohlmann²⁰ e colaboradores (2004) determinaram a forma de associação da indometacina (IndOH) e de seu éster etílico (IndOEt) em nanocápsulas (PCL) utilizando a hidrólise alcalina interfacial como método para simular uma condição *sink* perfeita. O consumo total da indometacina encapsulada às nanocápsulas foi de 2 min, enquanto para o éster etílico de indometacina foi de 1440 min (24 horas). O consumo do éster foi dependente de sua difusão do interior das nanocápsulas para a interface partícula/água, enquanto que o consumo da indometacina foi devido à hidrólise alcalina em solução, após rápida desorção.

Cruz²¹ e colaboradores (2006a) objetivaram diferenciar os sistemas nanocápsulas, nanoemulsão e nanoesferas a partir da análise dos perfis cinéticos obtidos através de hidrólise alcalina da IndOH e IndOEt. Os perfis cinéticos do consumo da IndOH foram similares para nanocápsulas, nanoemulsão, e nanoesferas concluindo-se que o mecanismo de encapsulação é a adsorção. No caso da hidrólise do IndOEt encapsulado nas nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão, os teores de IndOEt para a fase rápida de liberação foram calculadas correspondendo 5 à 15 % da concentração inicial enquanto que os teores de IndOEt para a fase de liberação sustentada variaram de 84 à 93 % das concentrações iniciais. Estes valores indicam que o IndOEt está majoritariamente encapsulado por dispersão no interior dos colóides. A presença do polímero aumentou a meia-vida da fase rápida e a presença do óleo aumentou a meia-vida da fase de liberação sustentada.

Em outro estudo, uma série de formulações de nanocápsulas foi preparada variando-se a concentração de polímero⁵¹. A hidrólise interfacial de IndOEt demonstrou que quanto maior a concentração de PCL nos sistemas maior o tempo de meia-vida de consumo. O resultado poderia estar relacionado tanto à área superficial quanto à espessura de parede das nanocápsulas. Desta forma, um estudo subsequente mostrou que o número de partículas dessas formulações era constante e independente da concentração de polímero. Considerando que o diâmetro das nanocápsulas também era constante e independente da concentração da PCL, e área superficial não mudava com o aumento da concentração do polímero²⁹. Desta forma, concluiu-se que o consumo de IndOEt era retardado pelo aumento na espessura da parede das nanocápsulas, e o polímero é uma barreira difusional.

Baseado nos achados anteriores, este capítulo foi dedicado ao estudo da variação da concentração de óleo nas formulações de nanocápsulas no intuito de se verificar a influência desse parâmetro no controle de liberação de um modelo de fármaco a partir de nanocápsulas. Um estudo paralelo foi dedicado a verificação da influência da variação da concentração do monoestearato de sorbitano, componente do núcleo das nanocápsulas, nos perfis de consumo de IndOEt⁵².

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este capítulo teve como objetivo verificar a influência da concentração do triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico no perfil de liberação do éster etílico de indometacina a partir de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar suspensões de nanocápsulas empregando diferentes concentrações de triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico contendo éster etílico de indometacina como sonda lipofílica;
- Determinar a velocidade do consumo da sonda utilizando a reação interfacial de hidrólise alcalina como ferramenta;
- Modelar matematicamente os dados experimentais para a determinação do mecanismo de liberação da sonda.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) ($M_w = 65,000$) foi obtida da Aldrich (Strasbourg, France). O monoestearato de sorbitano e polissorbato 80 foram adquiridos da Delaware (Porto Alegre, Brasil). A mistura de triglicéridios dos ácidos cáprico e caprílico foi enviada pela Brasquim (Porto Alegre). Diciclohexilcarbodiimida (DCC), 4-(*N,N*-dimetil)aminopiridina (DMAP) e indometacina foram obtidos da Sigma (St. Louis, USA). Todos os demais produtos químicos e solventes empregados foram utilizados em grau farmacêutico. Todos os reagentes foram utilizados como fornecidos.

3.2 PREPARAÇÃO DO ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA

O éster etílico de indometacina (IndOEt) foi sintetizado como descrito por Kalgutkar⁵³ e colaboradores (2000) e adaptado por Soares⁴⁷ (2003). A uma solução de IndOH (5,0 mmol) em etanol (20 mL) foi adicionado 0,2 mmol de 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina sob argônio e após agitação por 10 minutos foi adicionado diciclohexilcarbodiimida (5,0 mmol). A reação permaneceu à temperatura de 0 °C por mais 30 minutos e, então, foi mantida à temperatura ambiente por 16 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada.

Ao final da reação evaporou-se o excesso de solvente sob pressão reduzida (Buchi V-500/R-114/B-480). O resíduo foi dissolvido em diclorometano (30 mL) e filtrado. O filtrado foi lavado com solução aquosa saturada de NaHCO₃ (3 x 10 mL) e o precipitado de diciclohexiluréia foi descartado. A fase orgânica foi seca com MgSO₄ anidro, filtrada e o solvente foi evaporado. O produto foi purificado através de coluna cromatográfica (sílica-gel 60, 70-230 mesh), empregando uma mistura de ciclohexano e acetato de etila (2:1 v/v) como eluente. O éster foi obtido com 65 % de rendimento, após purificação. O ponto de fusão não corrigido do IndOEt foi determinado em equipamento de ponto de fusão em bloco situando-se na faixa de 96 - 99 °C.

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas em Espectrômetro Varian (VXR-200 ou YH-300) à temperatura ambiente, usando o tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

RMN do ^1H 200 MHz (δ , ppm) CDCl_3 : 7,66 e 7,46 (AB, 2H + 2H, ArH *p*-clorobenzoila), 6,97 (d, 1H $J = 2,5$ Hz, H-4); 6,87 (d, 1H $J = 9,0$ Hz, H-7); 6,67 (dd, 1H $J = 9,0$ e 2,5 Hz, H-6); 4,16 (q, 2H $J = 7,1$ Hz, OCH_2), 3,84 (s, 3H, OCH_3); 3,65 (s, 2H, CH_2); 2,38 (s, 3H, CH_3); 1,27 (t, 3H $J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$).

RMN do ^{13}C 75 MHz (APT, δ , ppm) CDCl_3 : 170,9 (CO-éster); 168,3 (CO-amida); 156,0, 139,2, 135,9, 134,0, 130,8, 130,7 e 112,7 (7 x Cq); 131,1 e 129,1 (4 x CH *p*-clorobenzoila); 114,9, 111,6 e 101,3 (3 x CH indol); 61,0 (OCH_2); 55,7 (OCH_3); 30,4 (CH_2); 14,2 e 13,3 (CH_3 e CH_3CH_2).

3.3 PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas por deposição interfacial conforme proposto por Fessi¹⁴ e colaboradores (1989). Para uma suspensão de nanocápsulas a PCL, o MS, TG e IndOEt foram dissolvidos em acetona (27 mL) sob agitação magnética constante à 40 °C. Em frasco separado, o polissorbato 80 foi adicionado à água (53 mL). Nanocápsulas foram preparadas com diferentes concentrações de TG: 16 (IIIA), 23 (IIIB), 31 (IIIC), 39 (IIID) e 47 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (IIIE). A solução orgânica, totalmente solubilizada, foi injetada na fase aquosa, sob agitação magnética constante, à temperatura ambiente. As suspensões foram mantidas sob agitação por 10 min. A seguir, procedeu-se à evaporação de cada suspensão em evaporador rotatório, eliminando a acetona à pressão reduzida. O volume final foi ajustado a 10 mL. As concentrações de PCL, IndOEt, polissorbato 80 foram 10, 1 e 7,7 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DO ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA

A concentração do éster etílico de indometacina nas formulações foi determinada por CLAE, uma alíquota de 100 μL da suspensão foi tratada com 10 mL de acetonitrila filtrada (Millipore 0,45 μm) e injetada no CLAE. O sistema de CLAE consistiu de um cromatógrafo Perkin Elmer S-200 com injetor S-200, detector UV-VIS, pré-coluna e coluna (LiChrospher[®] 100 RP₁₈, 250mm, 4mm, 5 μm , Waters). A fase móvel (1,2

mL.min⁻¹) consistiu de acetonitrila/água (70:30 v/v), pH 5,0 ± 0,5 ajustado com ácido acético 10 % (v/v). O éster etílico de indometacina foi detectado a 267 nm com um tempo de retenção de 9,6 min. O método de CLAE foi validado considerando a linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e limite de quantificação. Curvas analíticas para o IndOEt foram obtidas entre 1,0-25,00 µg/mL apresentando coeficientes de correlação maiores que 0,999. As amostras de controle de qualidade nas concentrações de 12, 15 e 20 µg.mL⁻¹ apresentaram exatidão de 99,92 %, 97,18 % e 100,18 %, respectivamente. Os dados de repetibilidade e de precisão intermediária apresentaram coeficientes de variação abaixo de 2 % . O limite de quantificação foi de 0,85 µg/mL.

3.5 HIDRÓLISE DO ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA EM MEIO ALCALINO

As reações de hidrólise alcalina do IndOEt associado às nanocápsulas foram realizadas à temperatura de 37 °C por adição de 2 mL de cada formulação em 8 mL de solução aquosa de NaOH 0,05 M. Alíquotas (300 µL) foram coletadas entre 10 minutos e 1440 minutos e tratadas com 5 µL de HCl 2,5 M, seguido de diluição com 1,2 mL de acetonitrila. Após centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos, os sobrenadantes foram analisados por CLAE observando-se o desaparecimento do substrato. As reações foram realizadas em triplicatas.

3.6 MODELAGEM MATEMÁTICA DOS PERFIS CINÉTICOS

A descrição matemática das curvas cinéticas foi realizada pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo monoexponencial (Equação 1).

$$C = C_0 e^{-kt} \quad (1)$$

Onde: C é a concentração da sonda no tempo t ;

C_0 é a concentração inicial da sonda;

k é a constante cinética observada.

Com a finalidade de explicar os perfis cinéticos obtidos a partir das reações do IndOEt aos sistemas nanoestruturados foi aplicado o modelo da Lei da Potência (Equação 2).

$$f_t = at^n \quad (2)$$

onde a é uma constante que incorpora as características estruturais e geométricas do sistema, n é o expoente de liberação e a função de t é M_∞/Mt (fração de fármaco liberado no tempo t). Esta equação é aplicável à porção da curva onde M_∞/Mt é $< 60\%$.

A modelagem dos perfis cinéticos experimentais foi realizada através do programa Micromath Scientist[®] apresentando os seguintes parâmetros: critério de seleção do modelo (MSC), constante cinética (k) e coeficiente de correlação (r).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) e teste- t . O nível de significância foi de 0,05%.

3.8 TURBIDIMETRIA

A turbidez, τ (cm^{-1}) (Equação 3), foi calculada a partir do método descrito por Zattoni^{54,55} e colaboradores. As suspensões foram diluídas em água MilliQ[®] e analisadas utilizando-se um espectrofotômetro de UV-1601PC (Shimadzu, Japão).

$$\tau = \frac{1}{b} \ln(10).A \quad (3)$$

onde b (cm) é o caminho óptico da cubeta e A é o sinal da absorbância. Em uma amostra diluída de partículas esféricas, τ , é dado em função do diâmetro de partícula, d (cm), da concentração das partículas, N (partículas. cm^{-3}), e a grandeza W , adimensional, a qual é o coeficiente de extinção (Equação 4).

$$\tau = \frac{\pi}{4} d^2 . N . W \quad (4)$$

W é uma função do tipo $W(x, m)$, onde x é o parâmetro de diâmetro definido como $x = \pi d / \lambda$, na qual λ (cm) é o comprimento de onda de luz incidente do meio de dispersão, e o parâmetro m é o índice de refração relativo da partícula. Há um índice de refração relativo fixo, W , que pode ser obtido pela equação 5.

$$W = K.2 \ln(10).\alpha.d/3 \quad (5)$$

onde d (cm) é o diâmetro de partícula, α (g.cm^{-3}) é a densidade da partícula e K ($\text{cm}^2.\text{g}^{-1}$) é o coeficiente de extinção, que pode ser calculado utilizando-se a equação 6.

$$\tau = \ln(10).K.c \quad (6)$$

onde c (g.cm^{-3}) é a concentração da amostra.

As suspensões foram diluídas (MilliQ[®]) dentro das concentrações da lei de Lambert-Beer. As suspensões diluídas foram analisadas a 380 nm (não ocorre absorção do éster neste comprimento de onda). Os diâmetros, d , (equação 5) foram determinados experimentalmente conforme descrito no item 3.9.1.

3.9 ESTABILIDADE

3.9.1 Caracterização físico-química das formulações

A avaliação do diâmetro, distribuição do diâmetro e polidispersão das nanopartículas foi realizada por espalhamento de luz dinâmico (DLS), usando um Zetasizer[®] (Malvern) no Laboratório de Sistemas Nanoestruturados para Administração de Fármacos, Faculdade de Farmácia – UFRGS com a colaboração da Prof^a Sílvia Guterres. Para evitar qualquer seleção da amostra, apenas o meio de diluição (água Milli-Q[®]) foi filtrado. Determinou-se o potencial zeta das suspensões após a prévia diluição das amostras em NaCl (10 mM). Os valores de pH foram determinados com um potenciômetro (Micronal B-474). Cada lote (n=3) foi analisado 3 vezes e cada análise é uma média de 10 medidas para diâmetro e 20 medidas para potencial zeta.

3.9.2 Análise por espalhamento múltiplo de luz

As suspensões de NC foram avaliadas por um Turbiscan *Lab* (Formulation, Laboratório K213, IQ-UFRGS). As formulações foram colocadas dentro de uma cubeta de vidro transparente (20 mL) e analisadas a 25 °C. Cada amostra foi analisada por 24 horas.

3.10 ESTUDO DE DENSIDADE

O estudo de densidade das partículas foi realizado utilizando um gradiente de sílica coloidal (Percoll[®] 54% em NaCl 0,15M, densidade inicial: 1,074g/cm³) formado *in situ* durante ultracentrifugação em rotor modelo PS28T (Hitachi CP70 MX, Japão) a 20 °C e 30000 x g por 90 min. NC (0,4 mL) foram adicionadas ao gradiente de sílica coloidal (19,6 mL). Em tubo separado, marcadores de densidade (Density marker beads[®]) de diferentes densidades pré-determinadas foram adicionados sob as mesmas condições e usados para calibração externa das bandas (Experimento realizado no Laboratório 22 do Departamento de Bioquímica com a colaboração da Prof^a Ana Maria O. Battastini). A distância do menisco até o limite de cada banda foi medida utilizando-se papel milimetrado. A densidade das partículas foi calculada através da curva entre a distância do menisco *versus* a densidade de cada banda do marcador.

3.11 ANÁLISE MORFOLÓGICA

A análise morfológica foi realizada com Microscópio Eletrônico de Transmissão (TEM; JEM 1200 ExII), operando a 80 kV (Centro de Microscopia -UFRGS). As suspensões previamente diluídas foram depositadas em um grid (Formvar-Carbon support film, Electron Microscopy Sciences) e contrastadas com acetato de uranila (2 % p/v).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS

As nanocápsulas foram obtidas como suspensões opalescentes brancas com pH entre 5,12 e 5,96, contendo teor de IndOEt entre 1,008 e 1,046 mg/mL (Tabela II). Todas as formulações apresentaram potencial zeta entre -8,6 e -12,7 mV.

Tabela II. Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas preparadas com concentrações crescentes (16,0 a 47,0 mg/mL) do triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico (n=3).

Formulações	Teor de IndOEt (mg/mL)	pH	Potencial Zeta (mV)	Diâmetro (nm)	PDI*
IIIA	1,046 ± 0,013	5,25 ± 0,10	-9,4 ± 0,7	215 ± 14	0,14 ± 0,03
IIIB	1,016 ± 0,012	5,52 ± 0,09	-11,9 ± 3,2	230 ± 10	0,15 ± 0,04
IIIC	1,027 ± 0,016	5,12 ± 0,08	-8,8 ± 0,6	246 ± 17	0,18 ± 0,04
IIID	1,014 ± 0,008	5,74 ± 0,04	-12,7 ± 2,5	317 ± 21	0,27 ± 0,06
IIIE	1,008 ± 0,004	5,96 ± 0,07	-10,1 ± 0,2	392 ± 21	0,33 ± 0,11

*(PDI) = índice de polidispersão.

Observou-se um aumento exponencial no diâmetro médio das partículas (Figura 8) e no índice de polidispersão com uma maior concentração de TG. Estes resultados corroboram com outros trabalhos que verificaram também um aumento de diâmetro em função do aumento da concentração de óleo de nanocápsulas^{11,45,56}.

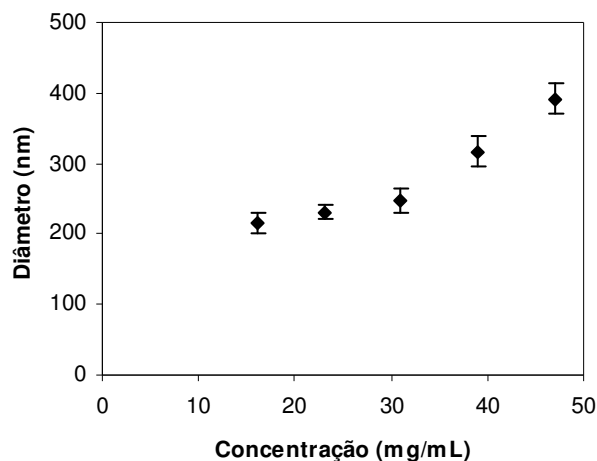


Figura 8. Correlação do diâmetro das NC com a concentração do TG.

4.2 ESTUDO DO CONSUMO DO IndOEt A PARTIR DAS NANOCÁPSULAS ATRAVÉS DA HIDRÓLISE ALCALINA

O éster etílico de indometacina foi escolhido como modelo de sonda por estar dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas e ser solúvel (4,131 mg/mL) no triglicerídeo²⁰. A reação de hidrólise alcalina interfacial do IndOEt é uma consequência da sua liberação a partir da nanocápsula por estabelecer um gradiente de concentração entre o núcleo da nanocápsula e a interface partícula/água²¹. Portanto, para avaliar a influência da concentração do triglicerídeo, um componente do núcleo das nanocápsulas, no consumo do IndOEt a partir das suspensões de nanocápsulas, a hidrólise alcalina interfacial foi realizada. Os resultados demonstraram que quanto maior a concentração do triglicerídeo maior o tempo necessário para o consumo total do éster etílico de indometacina (Figura 9).

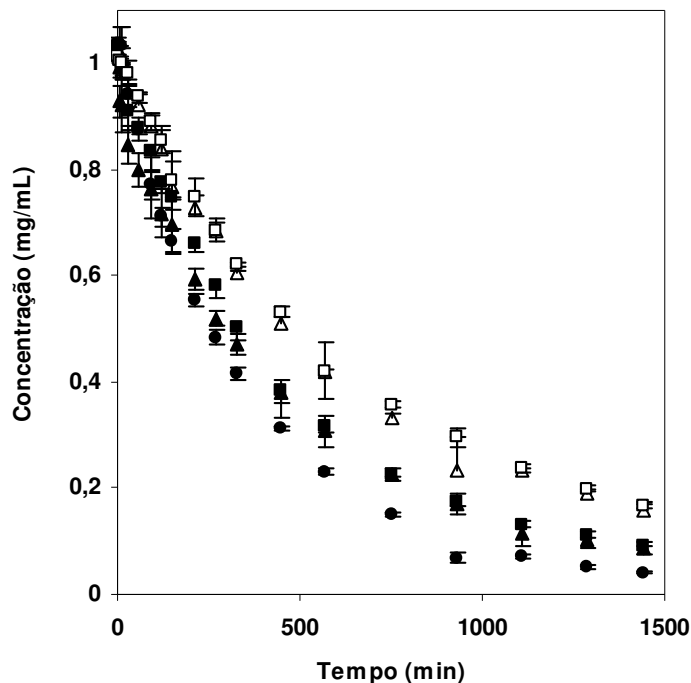


Figura 9. Perfil cinético da hidrólise do IndOEt em NC (◆) IIIA; (■) IIIB; (▲) IIIC; (△) IIID; (□) IIIE.

Altos coeficientes de correlação e os valores de MSC indicam que os dados foram adequados para o modelo de equação monoexponencial (Tabela III). A modelagem matemática dos dados forneceu a constante cinética aparente (k). A partir das constantes cinéticas obtidas, o tempo de meia-vida do consumo do IndOEt pode ser determinado. A constante cinética do IndOEt diminuiu ($p > 0,05$) de $k = 0,0026 \pm 0,0001 \text{ min}^{-1}$ ($r = 0,9980 \pm 0,0003$) (IIIA) a $k = 0,0014 \pm 0,0001 \text{ min}^{-1}$ ($r = 0,9970 \pm 0,0013$) (IIIE), conseqüentemente o tempo de meia-vida aumentou ($p > 0,05$) de 263 (IIIA) para 508 min (IIIE) com o aumento da concentração do triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico (Tabela III). Cruz e colaboradores (2006)²¹ mostraram que com o aumento da concentração do polímero (0-10 mg/mL) em suspensões de nanopartículas, um aumento no tempo de meia-vida (147 para 289 min) do consumo do IndOEt a partir da hidrólise foi verificado. Neste caso, o controle da liberação deveu-se à presença da parede polimérica, a qual age como uma barreira para a difusão da sonda. Jäger (2008)⁵² verificou um aumento proporcional no tempo de meia-vida (198 para 378 min) do consumo do IndOEt a partir da hidrólise realizada em suspensões de nanocápsulas com diferentes concentrações de

monoestearato de sorbitano (3,8-11,5 mg/mL). O monoestearato de sorbitano é um lipídeo usado na composição de nanocápsulas e está disperso no núcleo desses nanosistemas quando o triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico está presente^{16,21}. Portanto, o controle da liberação do IndOEt foi verificado pela variação da concentração do triglicerídeo em suspensões de nanocápsulas.

Tabela III. Parâmetros de modelagem matemática da hidrólise do IndOEt em nanosuspensões IIIA a IIIE.

Parâmetros	k (min^{-1})	r	MSC	$t_{1/2}$ (min)
IIIA	0,0026 ± 0,0001	0,9980 ± 0,0003	5,06 ± 0,38	263 ± 6
IIIB	0,0020 ± 0,0001	0,9982 ± 0,0003	5,16 ± 0,23	346 ± 17
IIIC	0,0022 ± 0,0002	0,9956 ± 0,0013	3,64 ± 0,71	322 ± 29
IIID	0,0014 ± 0,0001	0,9961 ± 0,0014	4,58 ± 0,37	484 ± 19
IIIE	0,0014 ± 0,0001	0,9970 ± 0,0013	4,98 ± 0,50	508 ± 22

4.3 DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE LIBERAÇÃO

Métodos empíricos para descrever a liberação de fármacos são direcionados por observações experimentais e baseados em considerações teóricas⁵⁷. A Lei da Potência é um modelo semi-empírico desenvolvido com base nas leis de Fick para estudar a liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos⁵⁸. Os perfis cinéticos da hidrólise alcalina do IndOEt associado aos sistemas nanoestruturados foram avaliados segundo a equação desse modelo (Equação 6) através da modelagem matemática dos dados experimentais obteve-se as curvas f_i em função do tempo e os parâmetros a e n . Para todas as formulações os pontos experimentais foram modelados até à porção da curva onde M_∞/Mt é < 60% conforme proposto por Peppas⁵⁹.

A Tabela IV mostra os parâmetros a e n , assim como o coeficiente de correlação (r) e o critério de seleção de modelo (MSC) para as formulações IIIA a IIIE.

Tabela IV. Parâmetros da modelagem matemática para a hidrólise do IndOEt em IIIA a IIIE utilizando o modelo da lei da Potência.

Parâmetros	<i>a</i>	<i>n</i>	MSC	<i>r</i>
IIIA	0,012 ± 0,003	0,68 ± 0,03	4,22 ± 0,17	0,9953 ± 0,0008
IIIB	0,009 ± 0,001	0,69 ± 0,02	4,82 ± 0,36	0,9969 ± 0,0011
IIIC	0,030 ± 0,012	0,51 ± 0,06	4,32 ± 0,62	0,9946 ± 0,0036
IIID	0,006 ± 0,002	0,72 ± 0,05	4,78 ± 0,29	0,9968 ± 0,0010
IIIE	0,006 ± 0,002	0,72 ± 0,03	3,93 ± 0,12	0,9930 ± 0,0012

Para todos os sistemas estudados observou-se um ajuste satisfatório dos dados experimentais ao modelo da Lei da Potência através de coeficientes de correlação maiores que 0,99. Os expoentes de liberação obtidos apresentaram valores entre 0,50 e 0,72 caracterizando o mecanismo como transporte anômalo. O mecanismo de liberação para estes sistemas está relacionado com a sobreposição dos fenômenos de difusão do IndOEt e interação da fase aquosa com o polímero. Os resultados de análise de diâmetro em função do tempo durante a reação de hidrólise mostraram que IIIA, IIIB, IIIC e IIID têm diâmetros constantes durante a reação (Figura 10 a 13), no entanto IIIE mostra uma tendência de aumento de tamanho de partículas. A variação entre os lotes foi grande para as medidas de diâmetro IIIE, assim como as de polidispersão (Figura 14).

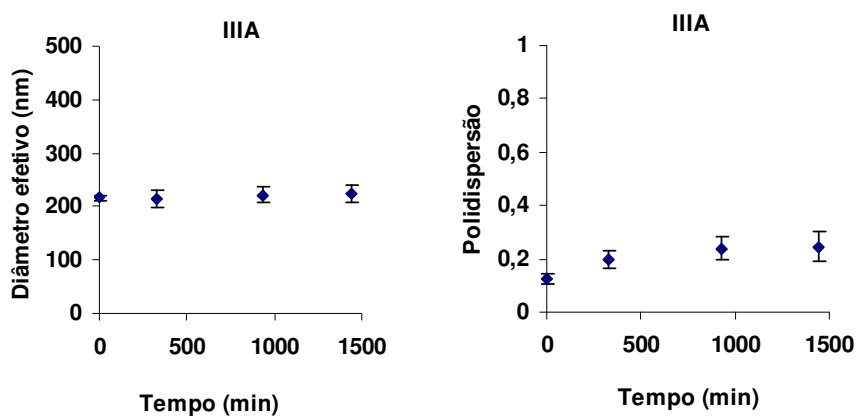


Figura 10. Diâmetro e polidispersão da NC IIIA durante a hidrólise alcalina.

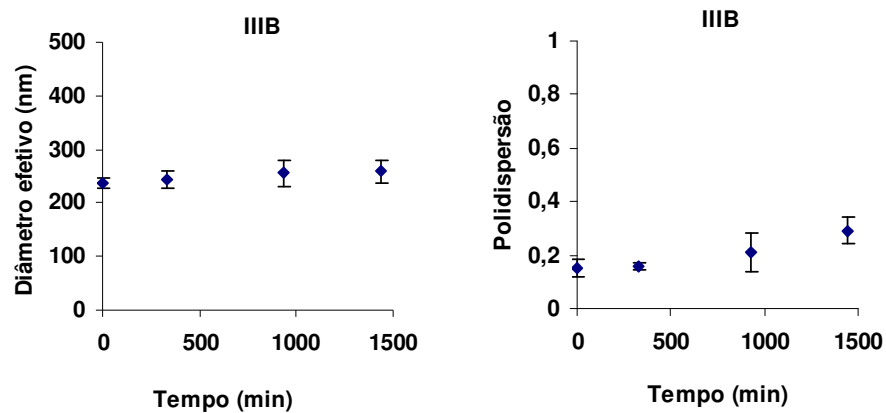


Figura 11. Diâmetro e polidispersão da NC IIIB durante a hidrólise alcalina.

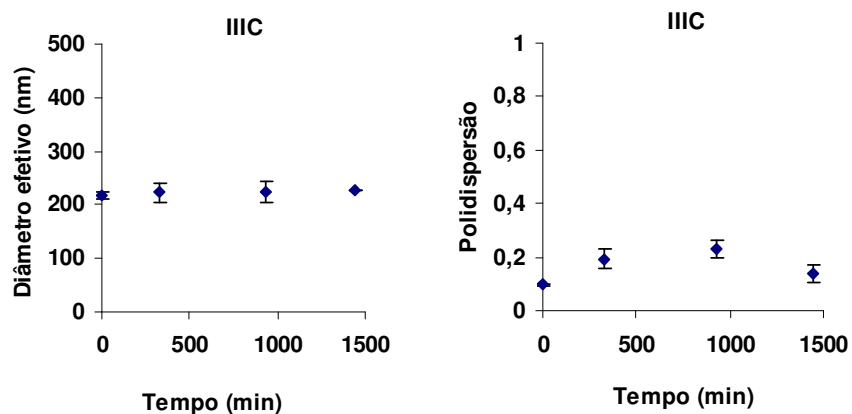


Figura 12. Diâmetro e polidispersão da NC IIIC durante a hidrólise alcalina.

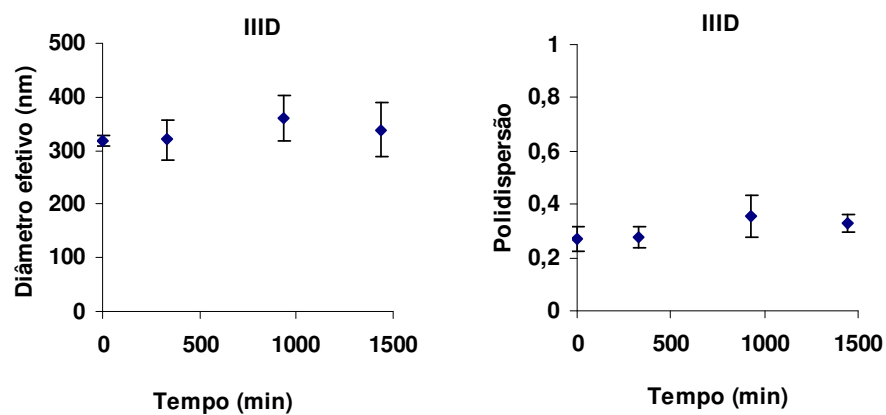


Figura 13. Diâmetro e polidispersão da NC IIID durante a hidrólise alcalina.

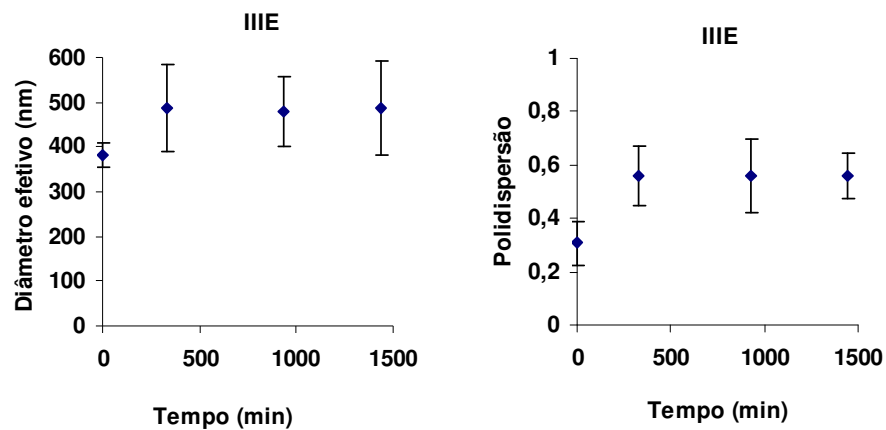


Figura 14. Diâmetro e polidispersão da NC IIIE durante a hidrólise alcalina.

4.4 TURBIDIMETRIA

Considerando que o diâmetro médio das partículas aumentou com o aumento da concentração de TG nas formulações foi realizado um estudo de turbidimetria para a determinação do número de partículas por unidade de volume nas suspensões IIIA a IIIE. O número de partículas por mL diminuiu de $10,0 \times 10^{12}$ para $2,20 \times 10^{12}$ com o aumento da concentração de TG de 16 para 47 mg/mL (Tabela V). Observou-se uma correlação linear entre a concentração de TG e o número de partículas, ($r = 0,9961$) (Figura 15). Com o aumento da concentração do triglicerídeo observou-se um aumento de diâmetro e uma diminuição no número de partículas. Correlações similares foram previamente observadas^{60,61}.

Tabela V. Diâmetro, α , k , NW e número de partículas por unidade de volume para nanocápsulas preparadas com aumento da concentração do triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico (n=3).

Suspensões	Diâmetro (nm)	κ ($\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	NW (partículas. cm^{-3}) $\times 10^{11}$	N (partículas. cm^{-3}) $\times 10^{12}$
IIIA	215 \pm 14	3242 \pm 300	10,5 \pm 0,64	10,0 \pm 0,60
IIIB	230 \pm 10	4417 \pm 40	12,2 \pm 0,00	7,80 \pm 0,03
IIIC	246 \pm 17	4386 \pm 16	9,6 \pm 0,19	5,87 \pm 0,11
IIID	317 \pm 21	5127 \pm 160	9,2 \pm 0,18	3,59 \pm 0,07
IIIE	392 \pm 21	6051 \pm 8	8,1 \pm 0,05	2,20 \pm 0,01

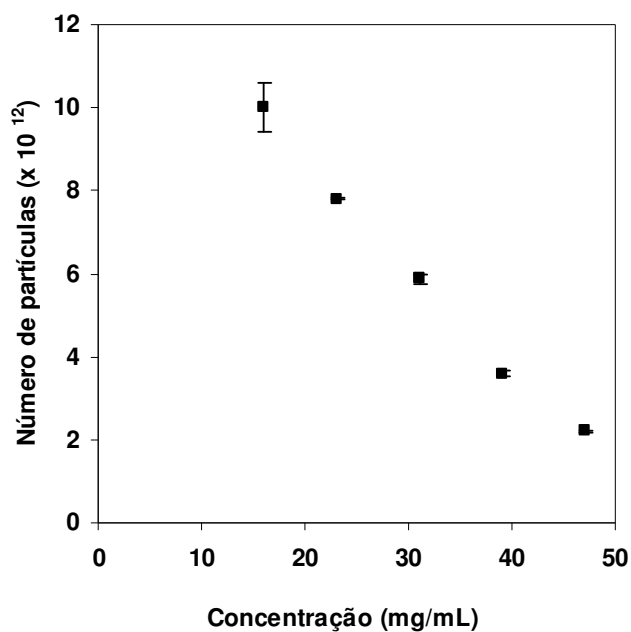


Figura 15. Correlação linear do número de partículas e a concentração do TG das suspensões IIIA a IIIE.

4.5 DETERMINAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL

A partir dos resultados de número de partículas e diâmetro pode-se calcular a área superficial de cada sistema com a intenção de explicar diferenças na cinética de consumo do éster de indometacina. A área superficial (S) foi calculada usando a equação 7:

$$S = 4 \pi (d/2)^2 \times N \quad (7)$$

onde N é o número de partículas por unidade de volume, π equivale a 3,1416 e d é o diâmetro médio em centímetros. Para as suspensões IIIA a IIIE, a área superficial diminuiu ($P > 0,05$) de $1,45 \times 10^4$ a $1,06 \times 10^4 \text{ cm}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$ conforme foi aumentada a concentração do óleo (Tabela VI).

Tabela VI. Diâmetro, número de partículas e área superficial para nanocápsulas preparadas com aumento da concentração do triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico.

Suspensões	Diâmetro (nm)	N (partículas. cm^3) x 10^{12}	S ($\text{cm}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$) x 10^4
IIIA	215 ± 14	10,0 ± 0,60	1,46 ± 0,20
IIIB	230 ± 10	7,80 ± 0,03	1,30 ± 0,11
IIIC	246 ± 17	5,87 ± 0,11	1,12 ± 0,16
IIID	317 ± 21	3,59 ± 0,07	1,14 ± 0,16
IIIE	392 ± 21	2,20 ± 0,01	1,06 ± 0,12

O aumento no diâmetro das partículas observado com o aumento da concentração do triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico resultou na diminuição do número de partículas, assim como a diminuição da área superficial. O consumo mais lento do éster etílico de indometacina é consequência da menor área superficial.

4.6 PERMEABILIDADE APARENTE E FLUXO

Com o intuito de verificar se o controle da cinética de consumo do IndOEt nas suspensões IIIA a IIIE era preferencialmente determinado pela variação da área superficial do sistema e não pela variação da permeabilidade aparente do IndOEt, o fluxo do IndOEt foi determinado com base na primeira lei de Fick. Assim, a teoria de Higuchi foi empregada⁶² para se obter o fluxo (J) do IndOEt nas formulações IIIA a IIIE. Os valores de J ($\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$) foram determinados a partir do coeficiente angular (inclinação) da reta obtida correlacionando a quantidade liberada do éster, M_t , (mol) em função do tempo, t , (s) (Equação 8).

$$M_t = M_0 - SJ \cdot t \quad (8)$$

onde, M_0 (mol) é quantidade total do IndOEt quando $t = 0$ e S (cm^2) é a área superficial das nanocápsulas. A permeabilidade aparente, P_{app} , ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) foi então obtida (Equação 9).

$$P_{app} = \frac{J}{Cm_0} \quad (9)$$

onde Cm_0 ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$) é a concentração inicial do éster etílico de indometacina na suspensão. Os ajustes dos perfis cinéticos, equações 8 e 9, foram avaliados usando o método dos mínimos quadrados. Para as suspensões preparadas com a variação do TG, IIIA a IIIE, os valores de J variaram entre $7,58 \times 10^{-10}$ e $8,27 \times 10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Tabela VII). Os resultados mostraram-se diferentes ($p < 0,05$) entre os grupos, mas comparação múltipla entre os pares usando o método Holm-Sidak indicou que somente IIIC e IIID são diferentes ($p < 0,05$). Portanto, não existe correlação entre os valores de J e a variação de concentração de TG nas formulações.

Tabela VII. Parâmetros da determinação do fluxo (J) das suspensões de nanocápsulas (n=3).

Parâmetros	$-SJ$ ($\times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{s}^{-1}$)	r	J ($\times 10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)
IIIA	$2,399 \pm 0,053$	$0,964 \pm 0,002$	$8,27 \pm 0,183$
IIIB	$2,069 \pm 0,062$	$0,983 \pm 0,001$	$7,99 \pm 0,240$
IIIC	$1,920 \pm 0,009$	$0,964 \pm 0,007$	$8,61 \pm 0,405$
IIID	$1,717 \pm 0,023$	$0,986 \pm 0,008$	$7,58 \pm 0,100$
IIIE	$1,748 \pm 0,064$	$0,989 \pm 0,005$	$8,27 \pm 0,306$

A partir dos dados de J obtidos, a permeabilidade aparente (P_{app} cm·s⁻¹) foi então calculada para as suspensões de nanocápsulas (Tabela VIII).

Tabela VIII. Permeabilidade aparente (P_{app}) das suspensões de nanocápsulas (n=3).

Parâmetros	P_{app} ($\times 10^{-7}$ cm.s⁻¹)
IIIA	3,07 ± 0,03
IIIB	3,00 ± 0,09
IIIC	3,23 ± 0,13
IIID	2,86 ± 0,04
IIIE	3,16 ± 0,11

A permeabilidade aparente é praticamente constante com o aumento da concentração do triglicerídeo. Estes resultados demonstram que a variação da concentração do óleo das nanocápsulas controla a velocidade de consumo do éster etílico de indometacina devido a um aumento do diâmetro nas nanocápsulas ocorrendo a diminuição da área superficial. Portanto, o aumento do $t_{1/2}$ do IndOEt ocorre devido a uma diminuição da área superficial, uma vez que o fluxo e a permeabilidade permanecem constantes.

4.7 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

Resultados anteriores verificaram um aumento de diâmetro e polidispersão com o aumento da concentração do triglicerídeo. Dessa forma, os diâmetros e polidispersão obtidos para IIIE durante a reação de hidrólise apresentaram um leve aumento mostrando desvios padrão maiores que as outras formulações. A partir disto, uma verificação da estabilidade dessas formulações foi realizada. As distribuições de tamanho de partículas por volume são apresentados na Figura 16. A repetição de análise para cada lote demonstrou que os sistemas IIIA, IIIB e IIIC são estáveis, enquanto que os sistemas IIID e IIIE são dinâmicos, mostrando perfis distintos para 3 análises consecutivas do mesmo lote.

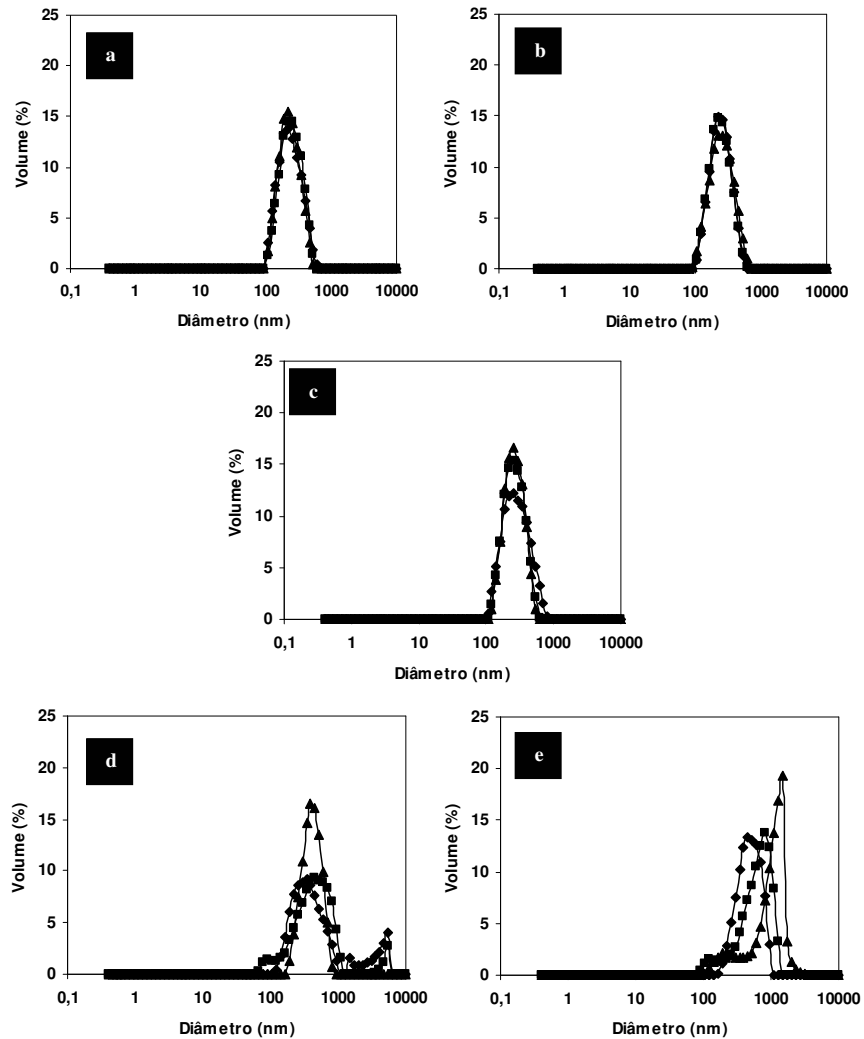


Figura 16. Volume de partículas em função do diâmetro das nanocápsulas. (a) IIIA, (b) IIIB, (c) IIIC, (d) IIID, (e) IIIE.

Para avaliar a estabilidade das suspensões foi utilizada a técnica de espalhamento múltiplo de luz, que detecta fenômenos de instabilidade física de dispersões. Os perfis de transmissão e retro-espalhamento (RE) são relacionados à migração das partículas (cremagem e sedimentação) e ao aumento no tamanho de partículas (coalescência ou floculação). Em todas as formulações analisadas o sinal de transmissão foi nulo, desta forma os perfis de RE por um período de 24 horas foram analisados. Para a suspensão IIIA foi observada uma tendência à sedimentação (Figura 17).

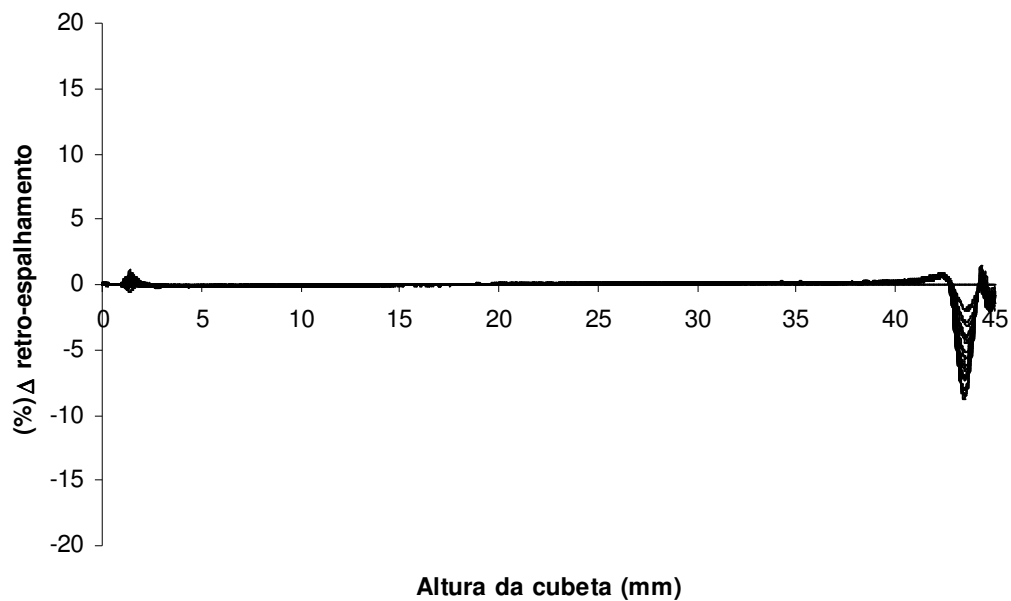


Figura 17. Perfil de Δ retro-espalhamento da suspensão IIIA.

Para IIIB, o sinal de RE sofreu primeiramente um aumento no fundo e uma diminuição no topo da cubeta, seguido de diminuição no fundo (Figura 18). Desta forma, esta formulação apresenta uma tendência à sedimentação, e o sedimento sofreu uma compactação diminuindo o RE no fundo com o passar do tempo.

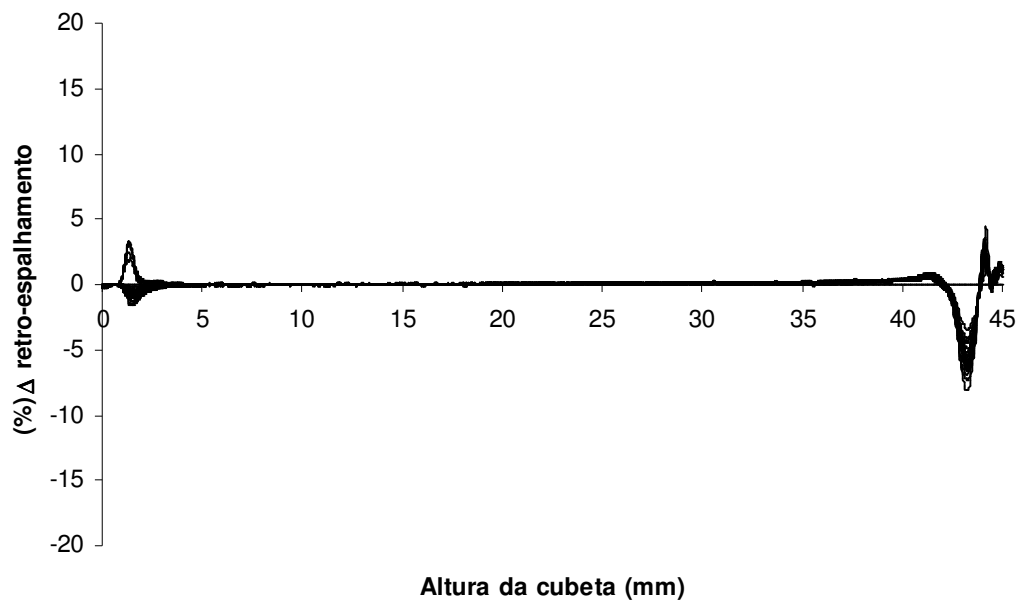


Figura 18. Perfil de Δ retro-espalhamento da suspensão IIIB.

Verificou-se para IIIC, a mesma tendência de sedimentação que para IIIB, sendo que o sedimento também mostrou diminuição do RE com o passar do tempo (Figura 19).

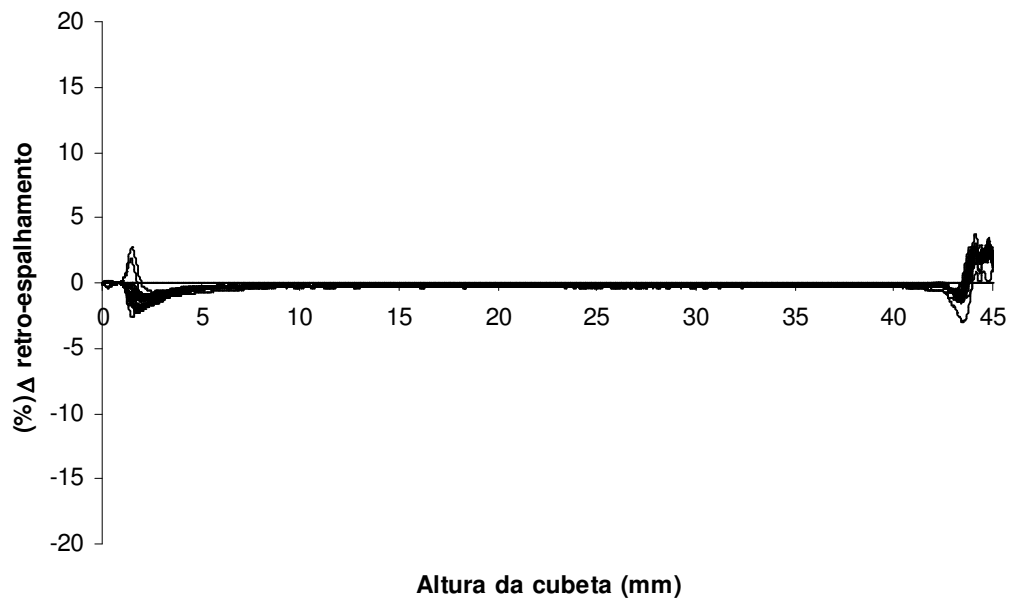


Figura 19. Perfil de Δ retro-espalhamento da suspensão IIIC.

Por outro lado, para as suspensões IIID e IIIE foram observados aumento no topo da cubeta e diminuição de RE no fundo da cubeta (Figuras 20 e 21). Os resultados indicam fenômeno de cremagem para ambas formulações. Ou seja, as formulações com maior concentração de óleo apresentam migração das partículas para a região do topo da cubeta. A cinética da cremagem das formulações IIID e IIIE é apresentada na Figura 22.

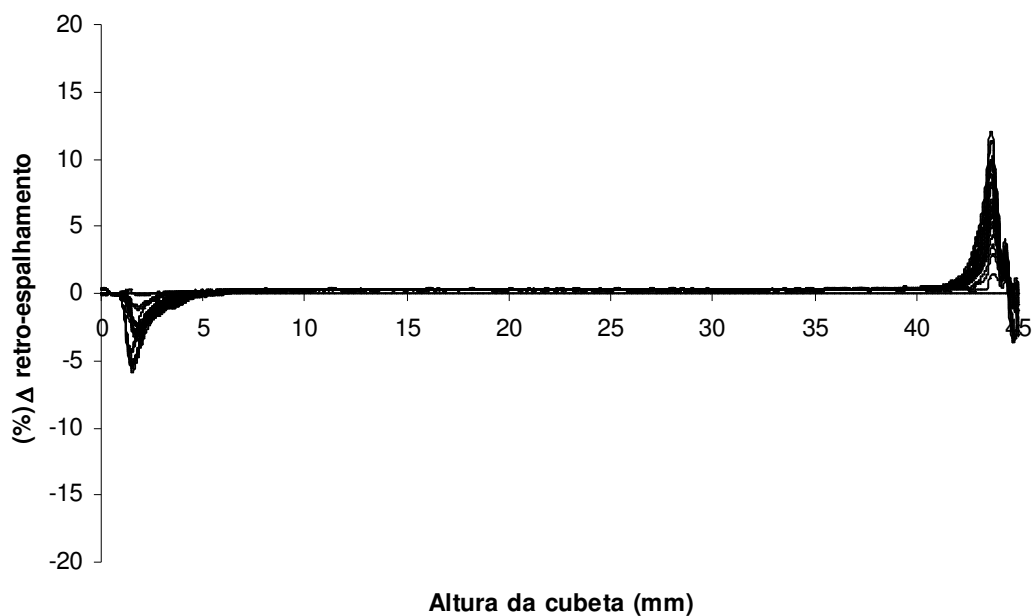


Figura 20. Perfil de Δ retro-espalhamento da suspensão IIID.

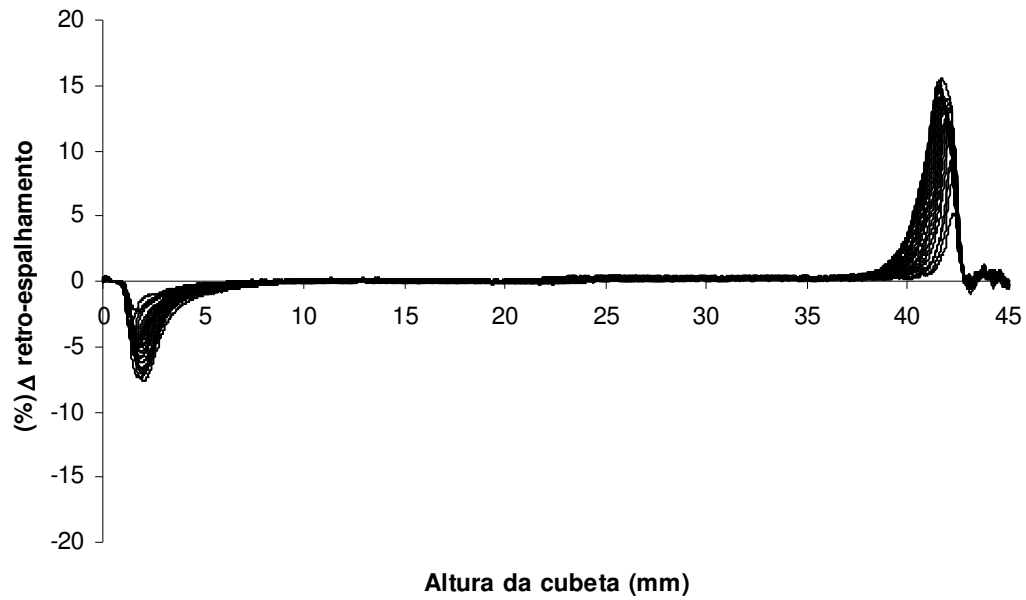


Figura 21. Perfil de Δ retro-espalhamento da suspensão III E.

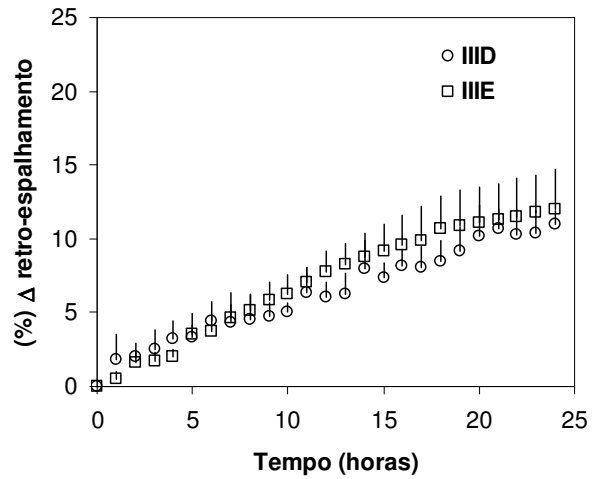


Figura 22. Cinética de cremagem dos picos das formulações III D e III E.

A partir de uma análise mais detalhada do pico de cremagem da formulação III E, podemos verificar que juntamente com a migração das partículas para a região superior da cubeta ocorre o fenômeno de coalescência (Figura 23).

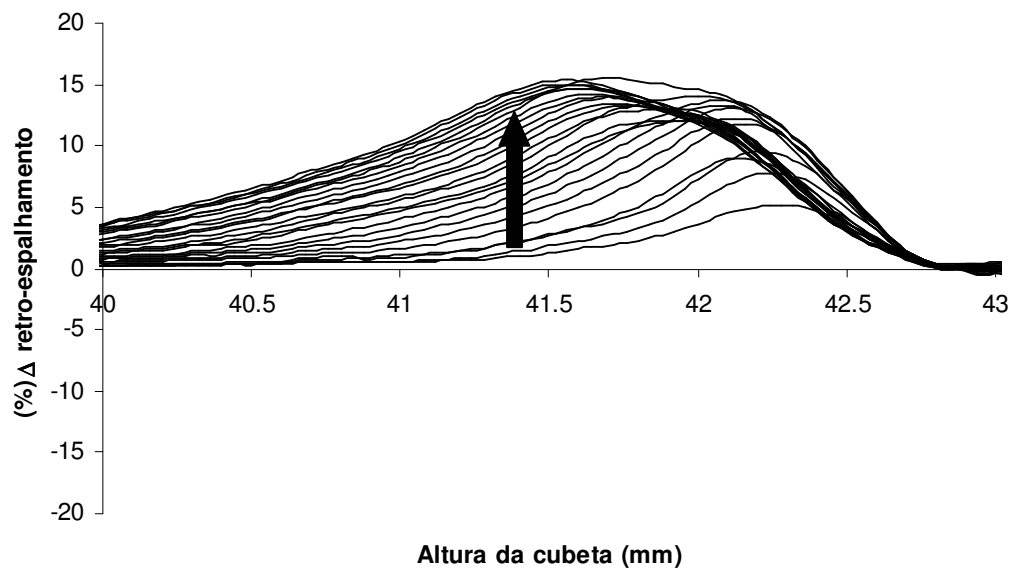


Figura 23. Em detalhe o pico de Δ retro-espalhamento da suspensão III E.

Com o intuito de comparar duas técnicas de espalhamento, estudos de estabilidade foram realizados por espalhamento de luz dinâmico ao longo de 60 dias de armazenagem. A Figura 24 apresenta os diâmetros médios em função do tempo para as formulações.

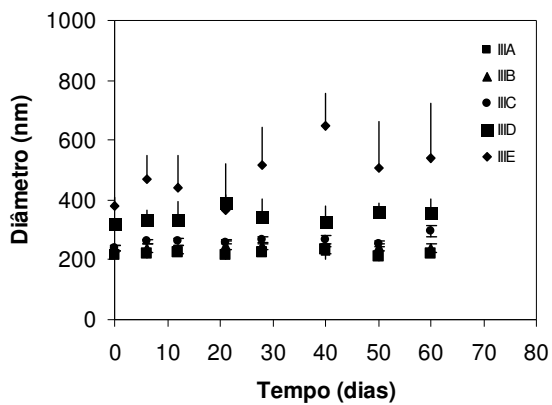


Figura 24. Diâmetro médio durante 60 dias das suspensões de nanocápsulas.

O diâmetro das nanocápsulas apresentou-se constante em função do tempo para IIIA a IIIC compreendendo valores entre 209 ± 12 e 296 ± 17 nm. Para as suspensões IIID e IIIE, os diâmetros oscilaram ao longo dos 60 dias de armazenamento compreendendo valores entre 318 ± 9 e 387 ± 133 nm e 365 ± 51 e 650 ± 105 , respectivamente. A polidispersão compreendeu valores entre 0,22 e 0,37 para IIID, e para IIIE entre 0,24 e 0,58. Portanto, observou-se que com o aumento da concentração do óleo ocorre um aumento no diâmetro e na polidispersão das nanocápsulas. As análises realizadas no período de 60 dias indicaram a instabilidade das formulações com maior concentração do óleo. Os resultados obtidos por espalhamento de luz dinâmico corroboram os resultados obtidos por espalhamento múltiplo de luz no qual verificou-se o fenômeno de cremagem e coalescência nas suspensões com maior concentração do triglicerídeo dos ácidos cáprico/caprílico.

4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada para observar a morfologia e tamanho das nanocápsulas. As Figuras 25 e 26 apresentam as fotomicrografias das formulações contendo IndOEt.

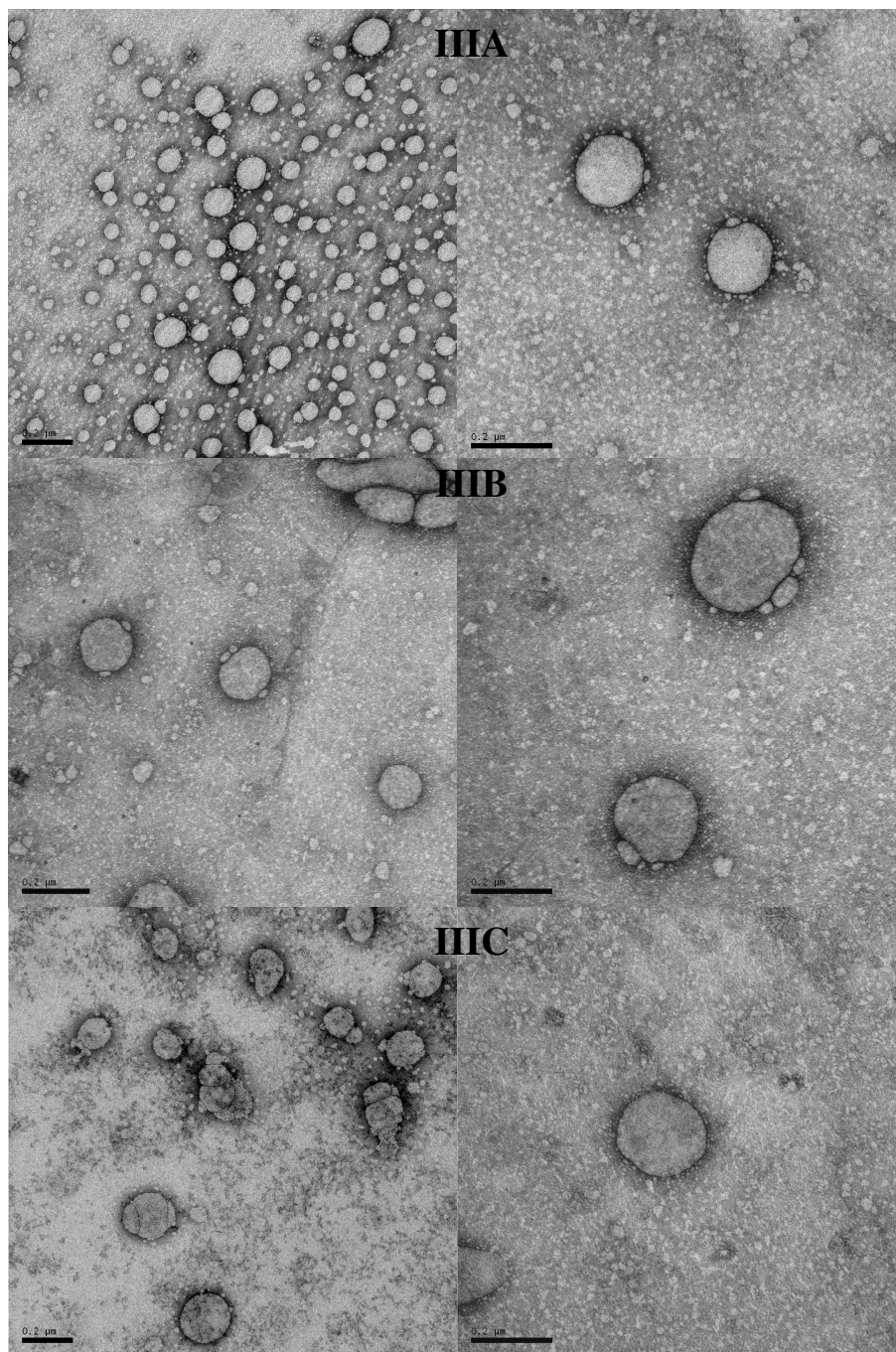


Figura 25. Fotomicrografias das suspensões obtidas (75,000 e 120,000 vezes) com a variação da concentração do TG.

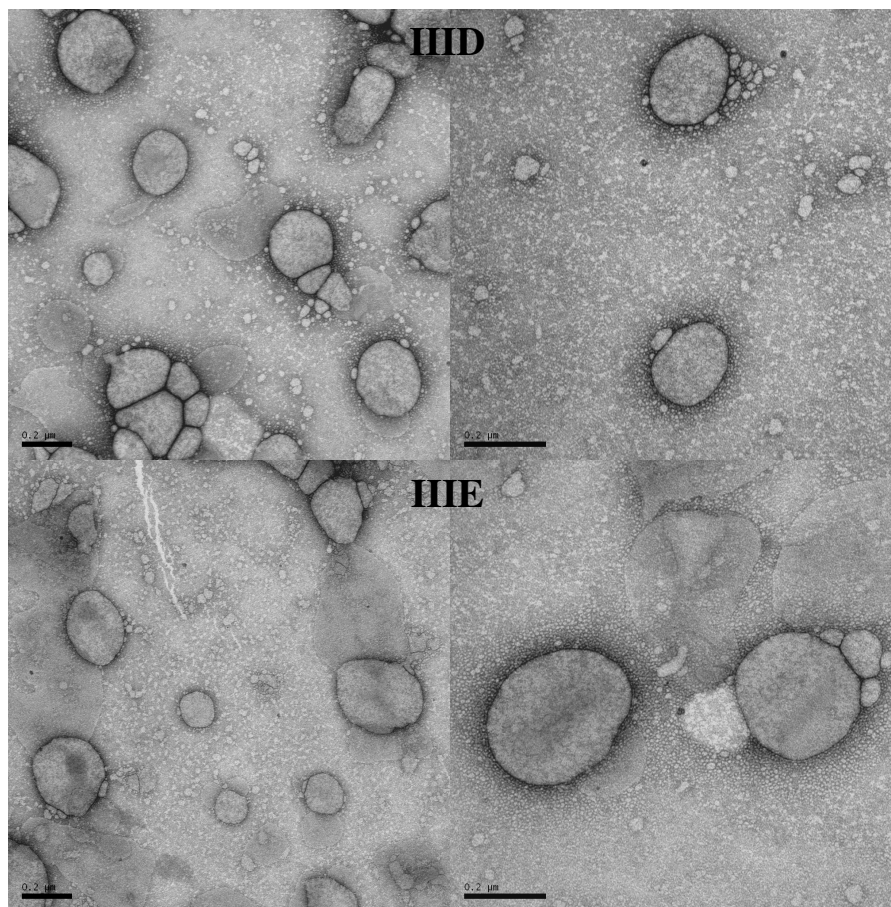


Figura 26. Fotomicrografias das suspensões obtidas (75,000 e 120,000 vezes) com a variação da concentração do TG.

Pode-se verificar a forma esférica das nanocápsulas IIIA, IIIB e IIIC. As fotomicrografias das suspensões IIID e IIIE apresentaram-se semelhantes as fotomicrografias de nanoemulsões^{21,29}, formulações preparadas sem polímero, sugerindo a mistura de nanoestruturas devido a um excesso de óleo no preparo destes sistemas.

4.9 ESTUDOS DE DENSIDADE

Com os resultados obtidos para diâmetro, polidispersão e fotomicrografias que apresentaram uma tendência a coalescência da formulação IIIE levantou-se a hipótese da presença de partículas de nanoemulsão. Desta forma, a ultracentrifugação foi realizada em gradiente de densidade de Percoll[®], para verificar esta hipótese.

Estudos anteriores de gradiente de densidade com suspensões de nanocápsulas, nanoesferas, nanoemulsão e nanodispersão mostraram diferentes densidades para cada nanoestrutura⁵² (Figura 27).

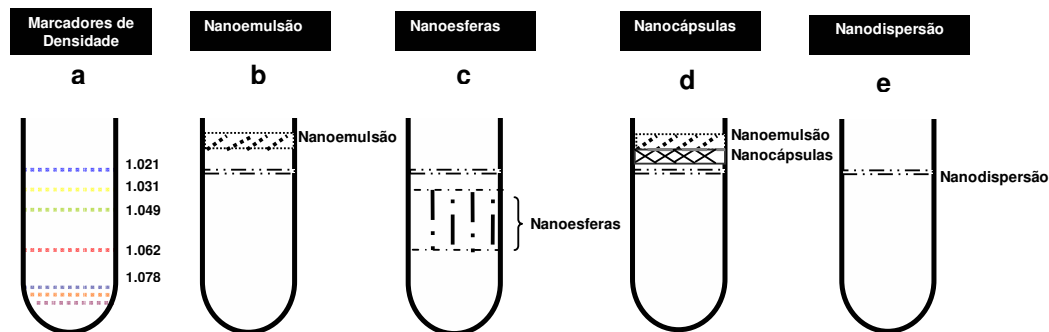


Figura 27. Resultados de ultracentrifugação na presença do gradiente de densidade: a) marcadores e suas densidades (g.mL^{-1}), b) nanoemulsão, c) nanoesferas, d) nanocápsulas, e) nanodispersão¹.

Paralelamente, um estudo de densidade a partir de nanocápsulas com diferentes concentrações de monoestearato de sorbitano ($3,8-11,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) um lipídeo sólido que encontra-se dissolvido no óleo presente no núcleo das nanocápsulas⁵², mostrou que em todas as formulações havia uma banda de nanoemulsão com densidade acima de $1,015 \text{ g.mL}^{-1}$, uma banda de nanocápsulas com densidade entre $1,015-1,018 \text{ g.mL}^{-1}$ e uma banda de nanodispersão com densidade de $1,021 \text{ g.mL}^{-1}$. Os resultados da ultracentrifugação na presença de um gradiente de densidade para as nanocápsulas com diferentes concentrações de TG são apresentados na Figura 28.

¹ Dados obtidos da dissertação de mestrado de Eliézer Jäger-PPGCF-UFRGS. Resultados utilizados como referência para analisar os dados obtidos a partir das formulações de nanocápsulas com diferentes concentrações de TG.

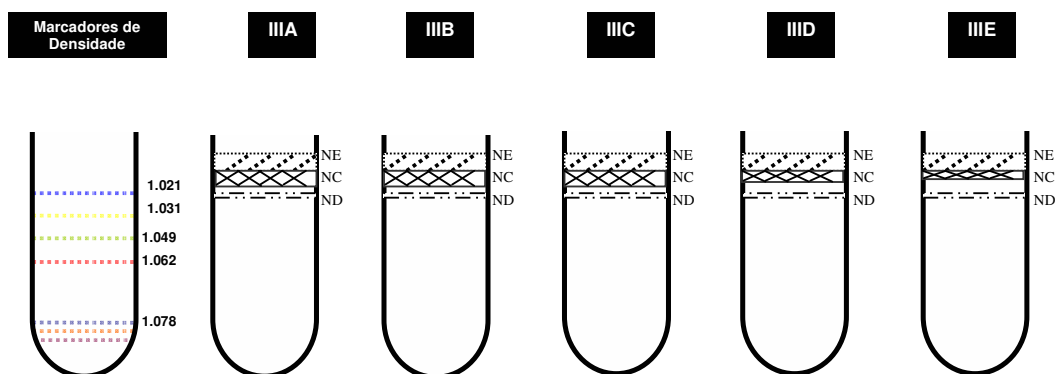


Figura 28. Ilustração dos resultados de ultracentrifugação na presença do gradiente de densidade para as suspensões IIIA a IIIE.

Pode-se verificar a presença de uma banda de nanoemulsão, uma banda de nanocápsulas e uma banda de nanodispersão em todas as formulações. Ainda, observou-se uma diferença de densidade na banda de nanocápsulas ($1.017-1.018 \text{ g.mL}^{-1}$) em função da concentração do triglicerídeos. A presença de nanoesferas não foi verificada. Para as suspensões IIID e IIIE observou-se um excesso de óleo presente no sobrenadante. A partir destes resultados pode-se constatar a presença de diferentes nanoestruturas nas suspensões analisadas.

O diâmetro das nanocápsulas pode sofrer alterações tanto pelo tipo e concentração do polímero^{11,49,63,64}, quanto pela concentração do tensoativo^{65,66,67}. Considerando a formulação IIIE, a qual apresentou cremagem e coalescência, com a intenção de verificar se estes resultados são consequência da baixa concentração de polímero em relação a concentração do triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico empregado, procedeu-se à preparação de uma formulação com maior concentração de polímero utilizando $15,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ (IIIEA). Essa suspensão apresentou diâmetro de $380 \text{ nm} \pm 18$ e polidispersão de 0,26. Ainda, um comportamento dinâmico para a distribuição de tamanho de partículas foi verificado pela presença de diferentes picos da mesma amostra (Figura 29).

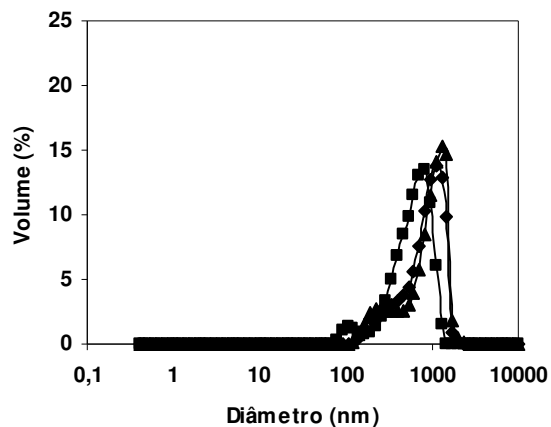


Figura 29. Volume em função do diâmetro da suspensão IIIEA.

O aumento da concentração de polímero não proporcionou estabilidade para a suspensão. Adicionalmente, medidas por espalhamento múltiplo de luz foram determinadas para IIIEA. A Figura 30 mostra o perfil de retro-espalhamento observado para a formulação.

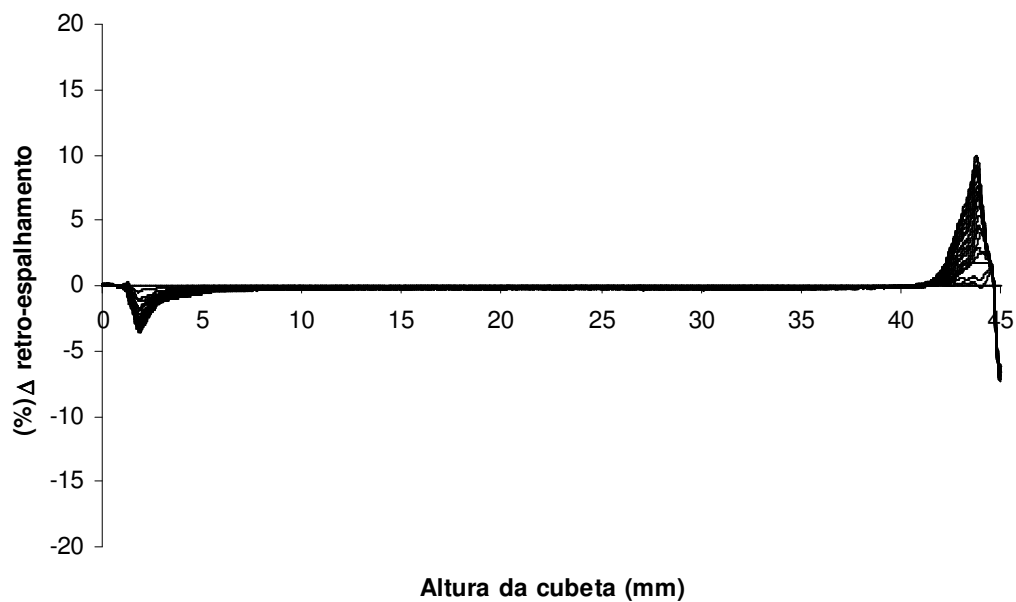


Figura 30. Perfil de retro-espalhamento da suspensão IIIEA.

O perfil de RE para IIIEA mostrou que o aumento da concentração do polímero na formulação não estabilizou o fenômeno de cremagem. A fotomicrografia da formulação IIIEA mostra tendência à coalescência das partículas (Figura 31).

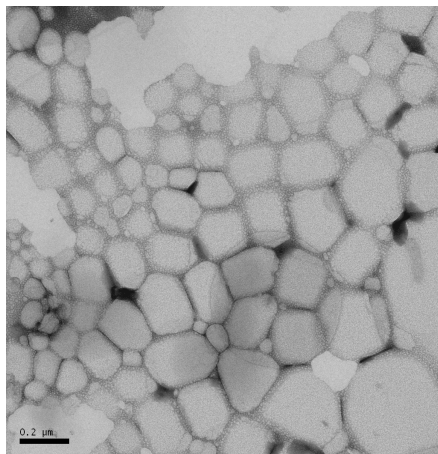


Figura 31. Fotomicrografia da suspensão IIIEA.

A formação das nanopartículas acontece quando o solvente orgânico difunde para a fase aquosa e evapora na interface água/ar¹⁴. Devido a alta tensão interfacial entre as fases orgânica e aquosa, um tensoativo, como o polissorbato 80 é necessário para evitar a coalescência das nanocápsulas formadas. A partir de um aumento na concentração do tensoativo poderia se obter a estabilidade da suspensão. Desta forma, preparou-se uma formulação com maior concentração de polissorbato 80, utilizando-se 15,4 mg.mL⁻¹ (IIIIEB). Essa suspensão apresentou diâmetro de 297 ± 40 nm e polidispersão de 0,15. A Figura 32 apresenta a distribuição de tamanho de partículas por volume IIIIEB.

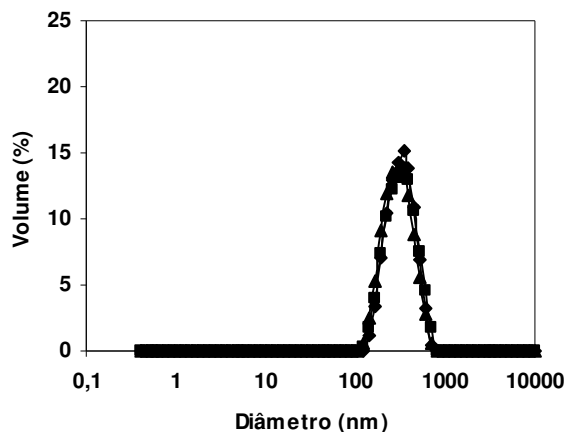


Figura 32. Volume em função do diâmetro da suspensão IIIIEB.

A formulação IIIEB apresentou uma distribuição de tamanho de partículas monomodal, mostrando reprodutibilidade nas análises do mesmo lote. O perfil de retro-espalhamento é apresentado na Figura 33.

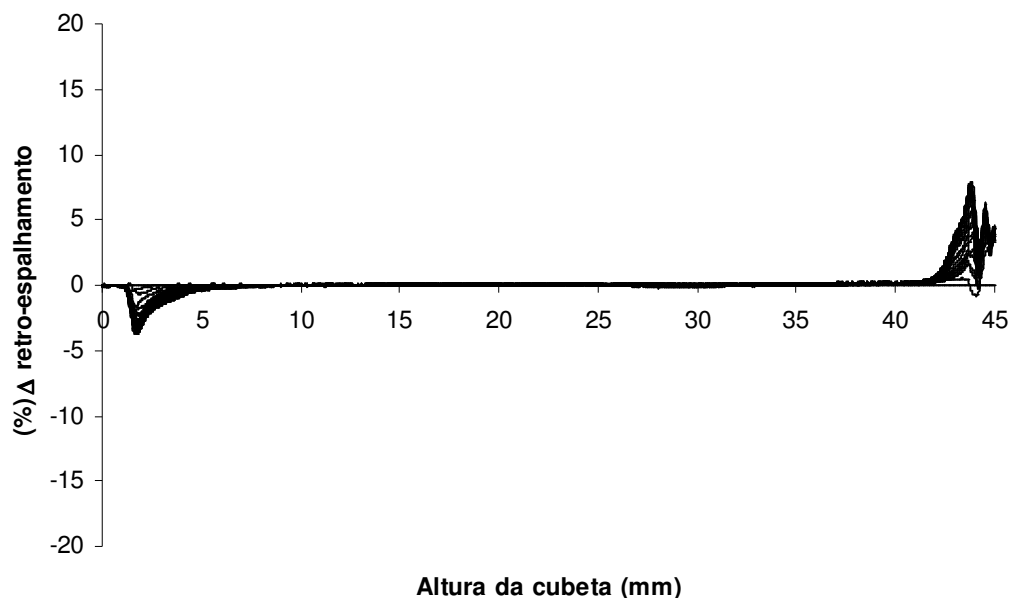


Figura 33. Perfil de retro-espalhamento da suspensão IIIEB.

A suspensão IIIEB apresentou menor tendência à cremagem e uma maior estabilidade em comparação com a suspensão IIIEA, preparada com o aumento da concentração do polímero, mas uma tendência à coalescência foi observada por MET (Figura 34).

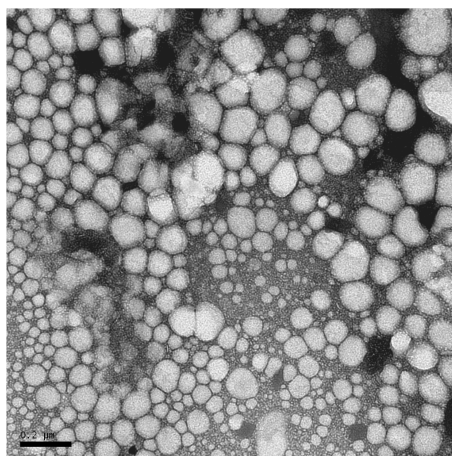


Figura 34. Fotomicrografia da suspensão IIIEB.

Com o intuito de verificar se a distribuição de tamanho de partículas monomodal observada na formulação IIIEB era devido à presença de apenas nanocápsulas no sistema, a análise de gradiente de densidade, também foi realizada para esta suspensão. A presença das mesmas bandas de nanoestruturas que a suspensão IIIE foi verificada para a IIIEB. Desta forma, foi constatado que todas as formulações apresentaram a mistura de nanopartículas.

Com o preparo destas suspensões verificou-se que o fenômeno de cremagem deve-se ao excesso do triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico observado no sobrenadante quando realizado experimento de ultracentrifugação. Adicionalmente, com o aumento da concentração de polissorbato 80 ocorreu o revestimento de todas as partículas, inclusive as gotas de óleo em excesso, mesmo na ausência de polímero. Desta forma, estabilizando a distribuição de diâmetro da formulação IIIEB.

A partir dos resultados de estabilidade obtidos para as formulações com diferentes concentrações de triglicerídeos e analisando resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa com formulações variando a concentração do monoestearato de sorbitano⁵² (3,8-11,5 mg.mL⁻¹), observou-se que as formulações mais estáveis são as que apresentam menor concentração de ambos componentes presentes no núcleo das nanocápsulas. Desta forma, uma formulação otimizada (N1) foi preparada contendo as menores concentrações utilizadas para o triglicerídeo (16 mg.mL⁻¹) e monoestearato (3,8 mg.mL⁻¹). Essa formulação apresentou uma leve tendência a sedimentação, sendo que o diâmetro e polidispersão apresentaram-se estáveis. Ainda, o gradiente de densidade mostrou que o sistema é homogêneo formado somente por nanocápsulas⁵². Portanto, apresentou-se a hipótese de que uma proporção otimizada de lipídeos e polímero poderia fornecer uma suspensão coloidal contendo exclusivamente um sistema nanoestruturado, nanocápsulas com núcleo lipídico. Para verificar a hipótese duas formulações foram preparadas com a mesma proporção de monoestearato, triglicerídeo e polímero (1:4,1:2,6) que a formulação otimizada.

As suspensões N2 (5,77:24:15 mg.mL⁻¹) e N3 (7,7:32:20 mg.mL⁻¹) apresentaram diâmetros de 411 ± 42 e 527 ± 22 nm, respectivamente. Distribuição de diâmetro de partícula monomodal foram obtidos para as formulações (Figura 35).

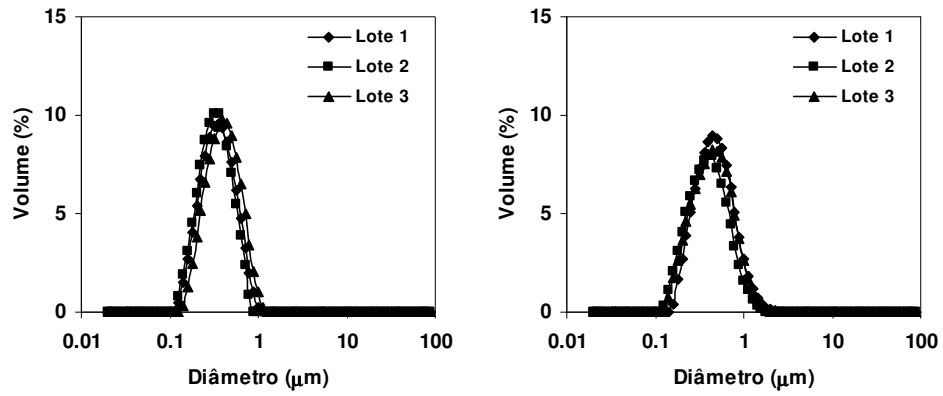


Figura 35. Volume em função do diâmetro da suspensão N2 e N3 (n=3).

Análises de espalhamento múltiplo de luz apresentaram uma leve tendência a sedimentação tanto para N2 quanto para N3 (Figura 36 e 37).

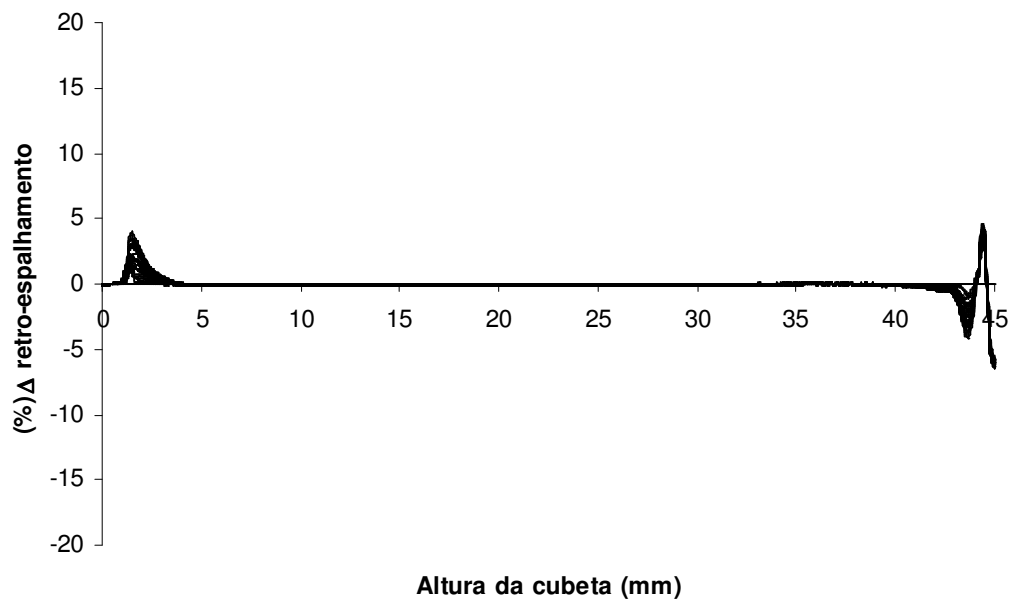


Figura 36. Perfil de retro-espalhamento da suspensão N2.

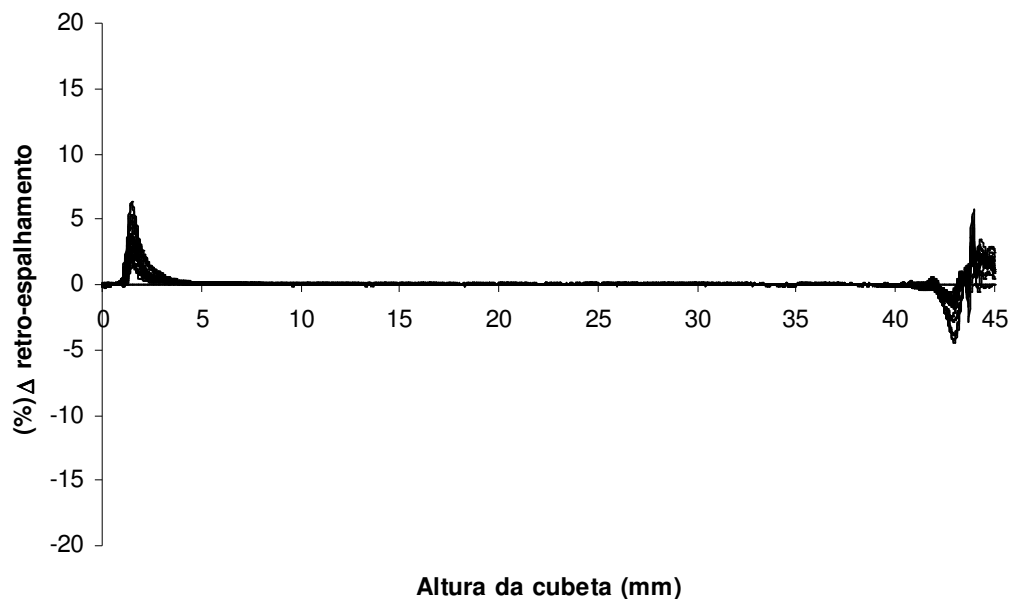


Figura 37. Perfil de retro-espalhamento da suspensão N3.

A partir da constatação que suspensões N2 e N3 apresentaram-se sistemas estáveis, análises de gradiente de densidade foram realizadas para verificar se somente um sistema nanoestruturado foi formado (Figura 38). Pode-se observar apenas uma banda de nanocápsulas presente nas suspensões com densidade entre 1,013-1,024 g.mL⁻¹.

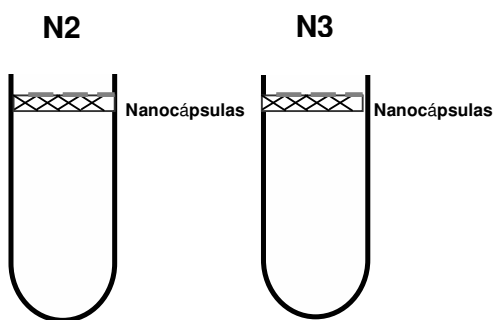


Figura 38. Ilustração dos resultados de ultracentrifugação na presença do gradiente de densidade para as suspensões N2 e N3.

A hipótese foi validada, demonstrando que formulações contendo exclusivamente nanocápsulas com núcleo lipídico podem ser preparadas a partir de proporções otimizadas de monoestearato, triglicerídeo e polímero.

5. CONCLUSÃO

A série de nanocápsulas preparadas variando-se a concentração do triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico apresentou o consumo do éster etílico de indometacina dependente da concentração do óleo, sendo mais lento o consumo quanto maior a concentração do óleo. O controle da liberação é decorrente da diminuição da área superficial das nanocápsulas. Estudos de estabilidade destas formulações foram importantes para verificar que com o aumento da concentração do triglicerídeo o fenômeno de cremagem nas suspensões foi detectado. A cremagem ocorreu devido ao excesso de óleo que não foi estabilizado pelo polissorbato 80. Ainda, a partir dos estudos de estabilidade foi possível determinar formulações otimizadas contendo a mesma proporção de polímero e lipídeos, as quais apresentam somente um nanosistema.

**CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO DE MICROAGLOMERADOS
ORGÂNICOS-INORGÂNICOS PARA O CONTROLE DA
LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS HIDROFÍLICOS**

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 SISTEMAS MICROPARTICULADOS PARA A ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS

Sistemas poliméricos carreadores de fármacos vêm despertando crescente interesse do meio científico devido à sua capacidade de liberação controlada e vetorização das substâncias ativas aos seus locais de ação específico⁵⁷. Micropartículas poliméricas sólidas apresentam tamanho na faixa de 1 a 1000 µm. A microencapsulação tem sido estudada no âmbito farmacêutico objetivando o desenvolvimento de formas de liberação controlada^{19,68}, micropartículas gastrorresistentes²⁴, melhoria na estabilidade de fármacos¹⁸, diminuição da toxicidade gastrointestinal¹⁶ e aumento da biodisponibilidade⁶⁹.

Após a administração oral, sistemas microparticulados distribuem-se de forma uniforme e rápida no trato gastrointestinal, minimizando o risco de dano local. Desta forma, apresentam menor variação em relação ao tempo de trânsito gástrico em comparação com sistemas unitários, o que ocasiona menor flutuação na biodisponibilidade do fármaco entre indivíduos⁷⁰. A influência dos componentes das micropartículas pode ser estudada a partir do perfil de liberação de fármacos empregados como modelo. As micropartículas podem ser preparadas por uma variedade de métodos como polimerização interfacial, centrifugação-extrusão, evaporação do solvente e secagem por aspersão⁷¹. A escolha da técnica deve levar em consideração certos requisitos, como a manutenção da estabilidade e atividade biológica do fármaco, a obtenção de alta eficiência de encapsulação, uma distribuição apropriada de tamanho de partícula e a reprodutibilidade da qualidade das micropartículas e do perfil de liberação, além da produção de pó de fluxo livre, sem agregação ou aderência⁷². Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa produziu sistemas microparticulados nanoestruturados para o controle de liberação de fármacos lipofílicos e hidrofílicos^{73,15,23,24,25}. Esses sistemas são diferentes das micropartículas convencionais por apresentarem modelos de estruturação de seus componentes que não podem ser classificados nos modelos usualmente propostos para as micropartículas: microesferas, microcápsulas⁷⁴ e *microballoons*⁷⁵. Os sistemas microparticulados nanoestruturados são obtidos por aspersão (*spray-drying*) de suspensões de nanopartículas previamente

preparadas, cuja supraestrutura pode ser classificada como nanoesferas ou nanocápsulas poliméricas⁷⁶.

1.2 SECAGEM POR ASPERSÃO

A secagem por aspersão consiste em uma operação de secagem de sistemas dispersos fluidos na qual ocorre a divisão em pequenas gotículas da suspensão, no interior de uma torre de secagem onde há ar quente produzindo pós secos particulados. O processo consiste em quatro etapas essenciais: aspersão da amostra, contato líquido-vapor aquecido, evaporação e separação sólido-gás/vapor⁷⁷. Como vantagens podem-se empregar substâncias termossensíveis, a facilidade de produção em escala industrial, obtenção de produtos secos com baixa higroscopicidade, produção em etapa única e sem uso de solventes orgânicos sendo considerado um processo de baixo custo.

Os pós obtidos pela aspersão são geralmente esféricos e porosos. A porosidade confere uma baixa densidade bruta, porém o seu caráter esférico permite que geralmente estes pós tenham fluxo livre. Modificando-se os parâmetros do processo de secagem, é possível alterar e controlar algumas propriedades dos pós, tais como: aparência, tamanho de partícula e distribuição granulométrica, porosidade, umidade, fluxo, estabilidade, dispersibilidade, friabilidade e manutenção da atividade, aroma e sabor⁶⁹.

Quando a secagem por aspersão é utilizada na preparação de sistemas multiparticulados para a administração de fármacos, podem-se obter sistemas de estruturas diferentes se o fármaco estiver dissolvido ou disperso (emulsão ou suspensão) na solução polimérica a ser aspergida. Microcápsulas são obtidas pela aspersão de uma suspensão ou emulsão do fármaco na solução polimérica, enquanto que se obtêm microesferas (matrizes poliméricas) quando o fármaco e o polímero estão dissolvidos nesta solução⁷⁸.

Palmieri e colaboradores¹⁹ estudaram a preparação de microesferas através da secagem por aspersão contendo paracetamol utilizando como polímero o Eudragit RL[®] e Eudragit RS[®] e a etilcelulose. Os resultados do estudo de liberação *in vitro* foram similares àqueles obtidos para o fármaco livre. Porém, com a utilização destas microesferas na preparação de comprimidos através da compressão direta, os resultados de liberação apresentaram uma menor taxa de liberação do fármaco, explicada pela redução da porosidade das partículas pela compressão.

A secagem por aspersão foi proposta para a preparação de microaglomerados revestidos de nanopartículas^{24,25}, de nanopartículas lipídicas sólidas⁷⁹, assim como na secagem de nanopartículas poliméricas^{15,23}.

Müller e colaboradores¹⁵ utilizaram a secagem por aspersão para obter nanocápsulas de diclofenaco ácido, utilizando o dióxido de silício coloidal (3,0 % m/v) como adjuvante de secagem. Esta técnica demonstrou-se eficaz na obtenção de produtos secos a partir de sistemas coloidais poliméricos, os quais apresentaram uma redução na toxicidade gastrointestinal do diclofenaco, similares àquela verificada após a administração oral da suspensão de nanocápsulas contendo o mesmo fármaco¹⁶.

Weiss⁸⁰ estudou a aplicação da secagem por aspersão na obtenção de produtos secos a partir de suspensões de nanocápsulas e nanoesferas de indometacina, utilizando o Miglyol 810[®] como fase oleosa. Neste estudo, foi demonstrada a viabilidade da secagem tanto de suspensões contendo nanocápsulas, quanto nanoesferas, embora tenha se observado uma redução do tamanho de partícula, no caso das nanoesferas, após o processo de secagem, que foi explicada pelo rearranjo destas após a etapa de secagem²³.

Müller⁸¹ aplicou o método de secagem por aspersão de nanopartículas poliméricas utilizando nanocápsulas obtidas tanto pelo método de deposição interfacial, quanto pelo método de emulsificação-difusão. A otimização do processo de secagem foi realizada pelo estudo de diferentes adjuvantes de secagem, sendo que o dióxido de silício coloidal foi o que apresentou os melhores resultados. Também neste estudo foi realizada a otimização da concentração de tensoativos na preparação de suspensões estáveis. Paralelamente, foi estudada a transposição de escala na preparação destas suspensões coloidais e posterior secagem. A secagem das suspensões promoveu uma melhora na estabilidade química das suspensões de nanocápsulas contendo diclofenaco⁴⁴, embora tenha sido observado o aparecimento de picos de degradação do diclofenaco. Entretanto, a redução do teor de diclofenaco foi dependente do tipo e da concentração do tensoativo utilizado na preparação das formulações. A presença de Epikuron 170[®] tanto nas suspensões quanto nos produtos secos previnem a degradação do diclofenaco.

As condições operacionais podem ser escolhidas de acordo com características desejadas para a secagem e quanto às especificações requeridas para o produto. Alto conteúdo de umidade e baixo rendimento freqüentemente são encontrados com o uso de equipamentos de escala laboratorial. Dentro desta perspectiva, Alves e Santana⁸² realizaram um estudo da influência das variáveis operacionais e da composição das

formulações, na obtenção de partículas lipídicas secas, utilizando a secagem por aspersão. O processo de secagem empregando um menor fluxo (3 mL/min), uma menor concentração de lipídeos e realizado na presença de manitol, levou a obtenção de partículas com estruturas mais amorfas, conforme observado através das análises por difração de raios-X. Pelo emprego da mesma técnica, os autores também observaram que houve uma incorporação total do manitol na formulação, pois para concentrações maiores que 170 mM foi possível observar a presença de manitol não-incorporado, pela visualização de picos característicos deste açúcar nos difratogramas.

Beck e colaboradores⁸³ avaliaram o efeito de parâmetros do processo e o tipo de nanopartículas (nanocápsulas e nanoesferas) nas características de micropartículas revestidas por nanopartículas usando uma matriz 3². Utilizando nanoesferas como revestimento de um núcleo composto por Aerosil 200[®] e diclofenaco ácido, os autores constataram que o rendimento dependeu principalmente do fluxo de alimentação. Ainda, utilizando nanocápsulas como revestimento, observou-se uma diminuição nos rendimentos em relação ao revestimento com nanoesferas sendo que a temperatura de entrada e o fluxo de alimentação influenciaram nesse caso. O rendimento foi consideravelmente aumentado pela redução do fluxo de alimentação para o revestimento com as nanopartículas. No caso das nanocápsulas, uma menor temperatura de entrada aumentou o rendimento.

1.3 DICLOFENACO

O diclofenaco (Figura 39) é um derivado do ácido fenilacético, disponível no mercado internacional desde 1973, na forma de sal sódico ou potássico.

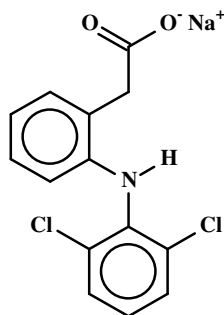


Figura 39. Estrutura química do diclofenaco sódico.

O pKa do diclofenaco na sua forma de ácido livre é de 3,8 e sua solubilidade em água é baixa (6×10^{-5} M, a 25 °C) na forma não-ionizada⁸⁴.

Embora os anti-inflamatórios não-esteróides constituam uma das classes de fármacos mais prescritas no mundo, seus efeitos adversos principalmente sobre o trato gastrointestinal, como irritação, ulceração, dano à mucosa e perfuração são uma limitação⁸⁵. Por esta razão, várias estratégias têm sido descritas na literatura para redução da toxicidade gastrointestinal desses fármacos. Entre estas estratégias, podem-se citar a complexação com ciclodextrinas⁸⁶, a nanoencapsulação^{31,16}, o desenvolvimento de formas farmacêuticas de ação modificada⁸⁷, entre outras.

Guterres e colaboradores³¹ avaliaram a incorporação do diclofenaco ácido em nanocápsulas de poli(ácido láctico), como estratégia para melhorar a tolerância gastrointestinal do fármaco após administração oral e intravenosa. Os autores demonstraram uma significativa capacidade de redução na toxicidade sobre a mucosa gastrointestinal quando o fármaco está associado às nanocápsulas, quando comparada a uma solução aquosa do sal do fármaco, apresentando concentrações plasmáticas similares. Porém, esse efeito protetor foi evidenciado somente no caso da administração oral, demonstrando que sua ação é decorrente da diminuição do efeito lesivo pelo contato direto do fármaco com a mucosa. Em 2001, Guterres e colaboradores⁷¹ demonstraram a manutenção dos efeitos protetores sobre a mucosa gástrica dos produtos secos contendo nanocápsulas de diclofenaco, comparando com dados anteriores obtidos com suspensões de nanocápsulas. Ainda, foi demonstrada a completa absorção do diclofenaco a partir dos produtos secos, sendo que um perfil plasmático diferenciado foi observado, comparado àquele obtido pela administração de uma solução aquosa do diclofenaco sódico.

Em 2003, Schaffazick e colaboradores⁸⁸ avaliaram a utilização da liofilização na secagem de nanocápsulas e nanoesferas de poli(ϵ -caprolactona) e Eudragit S90[®], para a obtenção de produtos secos, bem como o efeito protetor destes liofilizados sobre a mucosa gastrointestinal. No estudo, foi demonstrada a potencialidade de emprego da liofilização de sistemas coloidais poliméricos, empregando o Aerosil 200[®] (3,0% m/v) como adjuvante de secagem. Em relação ao estudo da toxicidade gastrointestinal, observou-se que os liofilizados contendo nanocápsulas de diclofenaco exerceram um efeito protetor significativo sobre a mucosa gastrointestinal dos ratos, em comparação aos efeitos apresentados pela administração da solução aquosa do fármaco. Um efeito protetor similar

já havia sido relatado para a suspensão de nanocápsulas e nanoesferas de diclofenaco, bem como para os respectivos produtos secos^{31,71}.

1.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Uma caracterização criteriosa das micropartículas é fundamental para garantir suas qualidades, especialmente na fase de desenvolvimento desses sistemas. Através da microscopia eletrônica de varredura, é possível avaliar forma, distribuição de tamanho, presença de poros, de agregados ou de cristais de fármaco adsorvidos nas partículas, bem como sua morfologia de superfície⁸⁹. A microscopia óptica pode ser empregada para a avaliação preliminar de forma e tamanho de micropartículas, bem como no monitoramento de etapas de processos de fabricação de sistemas microparticulados que envolvam evaporação de solvente. Adicionalmente, a utilização de filtros polarizadores permite a distinção entre materiais isotrópicos e anisotrópicos. Desse modo, fármacos cristalinos podem ser identificados na superfície das partículas através dessa técnica^{90,91}.

A porosidade de sistemas particulados pode ser um fator determinante para a eficiência de encapsulação e o perfil de liberação de fármacos⁹². Esse parâmetro pode ser obtido através de isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio gasoso à temperatura de ebulição do nitrogênio líquido. Materiais porosos apresentam histerese nos gráficos de isotermas de adsorção/dessorção. Isso ocorre em função do fenômeno de condensação/evaporação do adsorvato nos poros. Além disso, o tipo de gráfico de histerese formado pode fornecer informações a respeito da forma do poro⁹³.

O tamanho das partículas em um pó pode ser determinado por difratometria de laser, o qual permite calcular o diâmetro das partículas analisadas a partir dos volumes de esfera equivalente, ou D[4,3]. Essa técnica segue o princípio de Fraunhofer, que descreve a interação entre a luz e partículas muito maiores que o seu comprimento de onda. Nessa situação, o raio de luz incidente é difratado na direção frontal à partícula com uma pequena alteração de ângulo. Os padrões de intensidade luminosa gerados apresentam-se a intervalos angulares regulares, que são proporcionais ao diâmetro da partícula responsável pela difração⁸⁷.

Outro fator fundamental na caracterização de micropartículas consiste na determinação da cristalinidade do sistema, pois o perfil de liberação é influenciado pelo estado físico do composto bioativo na matriz. Além disso, o grau de cristalinidade do

polímero está relacionado com características do sistema, como por exemplo, a eficiência de encapsulação do fármaco. Essa determinação pode ser feita através de difratometria de raios - X ou análise térmica⁹⁴. Na primeira, um feixe colimado de raios - X monocromático é difratado em várias direções quando atinge um pó cristalino. O cristal atua como um retículo de difração tridimensional dessa radiação. Esse fenômeno é descrito pela lei de Bragg (Equação 10), onde as ondas que são espalhadas a partir de diferentes regiões do cristal, em uma direção específica, se propagam por distâncias correspondentes a múltiplos inteiros (n) do comprimento de onda (λ) do feixe de raios-x incidente:

$$\frac{n\lambda}{2\sin\theta} = d_{hkl} \quad (10)$$

onde d_{hkl} corresponde à distância entre as lamelas que compõem um cristal e θ é o ângulo de difração. Nessas circunstâncias, as ondas estão em fase. Tal condição ocorre apenas em materiais que apresentam periodicidade em sua estrutura molecular. Dessa forma, materiais cristalinos resultam em picos de difração bem definidos e característicos. No entanto, o arranjo randômico das moléculas em materiais amorfos resulta em espalhamento não-coerente dos raios - X e em picos largos e difusos.

O perfil de liberação de fármacos a partir de sistemas microparticulados constitui um aspecto extremamente relevante no que concerne à eficiência terapêutica. Dessa maneira, sua determinação é fundamental para a caracterização de micropartículas. As informações podem ser obtidas por experimentos *in vitro* ou *ex vivo*, sendo que os principais mecanismos utilizados para explicar perfis de liberação obtidos consistem em processos de difusão e/ou erosão. Os resultados devem ser compatíveis com a via de administração desejada. Cabe salientar que tais estudos devem ser realizados sob condição *sink*, onde o volume do meio de dissolução é grande o suficiente para que a concentração do fármaco presente não chegue a exceder 10% do valor de sua concentração de saturação.

Jeong e colaboradores⁹⁴ investigaram a liberação de papaverina a partir de micropartículas de PCL preparadas por emulsificação/evaporação do solvente e relacionaram os resultados observados com a microestrutura desses sistemas. Mudanças nas condições de processamento alteraram o meio pelo qual ocorreu a difusão do fármaco, resultando em diferentes perfis de liberação. Maiores concentrações de PCL formaram partículas de maior tamanho, ocasionando liberação mais lenta. Perfis de liberação mais rápidos foram observados com o aumento da massa molar da PCL utilizada na preparação

das formulações. Desta forma, evidenciou-se a influência da microestrutura cristalina, pois com o aumento da massa molar a cristalinidade do sistema diminuiu, facilitando a difusão do fármaco.

Beck e colaboradores²⁴ prepararam e caracterizaram sistemas orgânico-inorgânicos, nos quais o fármaco foi adsorvido ao Aerosil 200[®] e nanocápsulas e nanoesferas de poli(ϵ -caprolactona) ou de Eudragit S100[®] foram utilizadas como revestimento dos microaglomerados. Evidenciou-se o nanorrevestimento através de MEV e, após estudo de liberação *in vitro*, as propriedades de gastrorresistência dos microaglomerados obtidos com Eudragit S100[®] foram demonstradas. Ainda, avaliou-se o controle da liberação do diclofenaco a partir das micropartículas e do núcleo orgânico-inorgânico em três diferentes meios. Dessa maneira, o núcleo contendo diclofenaco, em pH 1,2 apresentou taxa de liberação de 12,26% após 5 minutos. Em pH 5,0 o equilíbrio ácido-base do diclofenaco foi alcançado após 15 minutos e a concentração de fármaco no meio foi de 35,66%, mantendo-se durante o período de experimento. Em pH 7,4, 15 minutos foram suficientes para se atingir 97,04% de diclofenaco no meio e 30 minutos para 98,99%. Para os microaglomerados nanorrevestidos, em pH 1,2 encontram-se valores de 16,28% e de 5,27% para a formulação obtida a partir de nanocápsulas e nanoesferas, respectivamente. Em pH 5,0 os valores foram 64,09% após 15 minutos e 80,60% após 60 minutos, no caso das nanocápsulas e para formulações a partir de nanoesferas os valores foram de 31,03% (15 min) e 39,71% (60 min). Em pH 7,4 alcançaram-se valores próximos a 100% (5 min) para a formulação a partir de nanocápsulas enquanto, para a formulação contendo nanoesferas em 5 minutos houve liberação de 61,14 e de 95,97% (60 min).

A partir desse estudo de liberação do diclofenaco observou-se que a taxa de liberação em pH 5,0 foi superior para os microaglomerados nanorrevestidos quando comparadas com o núcleo orgânico-inorgânico. Dessa maneira, foi sugerida a existência de uma adsorção do fármaco às nanopartículas. Para verificar essa hipótese foi incorporado às suspensões das nanoestruturas a triacetina, um plastificante hidrofóbico, antes da dispersão no núcleo inorgânico-orgânico, com o objetivo de impedir que o fármaco associasse às nanopartículas através da saturação à superfície polimérica. Quando estas formulações foram submetidas ao experimento de liberação em pH 5,0 o diclofenaco liberado foi de 23,9 % (15 min) e 33,35 % (60 min) para o revestimento de nanocápsulas e 55,86 (15 min) e 60,04 (60 min) para nanoesferas. Desta forma, a composição das nanopartículas e a

presença de triacetina nas formulações apresentou diferenças nos perfis de liberação do diclofenaco em diferentes meios.

Beck e colaboradores⁹⁵ prepararam e caracterizaram microaglomerados com revestimento nanoestruturado contendo diclofenaco ácido e empregando uma dispersão polimérica contendo Eudragit S100[®] e tampão fosfato pH 7,4. O percentual de dissolução em célula de fluxo em pH 5,0 do diclofenaco a partir dos microaglomerados revestidos foi de 75 % em 360 minutos e para o núcleo 53 % no mesmo tempo. Não foram observadas diferenças entre o núcleo e os microaglomerados revestidos. O tratamento matemático a partir da modelagem selecionado para a liberação em pH 5,0 foi o biexponencial, enquanto para o pH 7,4 o melhor modelo foi o monoexponencial.

Domingues e colaboradores²⁶ prepararam micropartículas nanorrevestidas contendo indometacina, modelo de fármaco hidrofóbico, dióxido de silício e nanocápsulas poliméricas sendo compostas de poli(ϵ -caprolactona) ou um copolímero acrílico. Através de estudos de liberação e a aplicação de modelos matemáticos os autores mostraram que o mecanismo de liberação do fármaco foi dependente da desaglomeração das partículas. Os valores de coeficiente de liberação (n) após modelagem dos dados pelo modelo de Korsmeyer-Peppas, foram superiores a 0,85 indicando que a liberação é não-fickiniana, sendo super-caso-II. O modelo estrutural para essas micropartículas é o revestimento das nanocápsulas ao redor de um núcleo de dióxido de silício. Quando o sistema entra em contato com o meio de liberação o sistema desaglomera liberando o fármaco.

Considerando todos os dados anteriores, o presente trabalho teve como hipótese a utilização de HPMC para a formação de microaglomerados, com o intuito de retardar a desaglomeração dos microaglomerados na presença de nanocápsulas poliméricas. Adicionalmente, o uso de HPMC no sistema poderia propiciar a formação de poros levando a uma desaglomeração controlável pela presença e concentração desse componente na formulação.

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O trabalho teve como objetivo verificar se a presença de HPMC nos microaglomerados seria capaz de retardar a desaglomeração do sistema, controlando a liberação de um modelo de fármaco hidrofílico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar microaglomerados contendo diclofenaco sódico, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), e dióxido de silício coloidal na presença ou não de nanocápsulas poliméricas;
- Preparar e caracterizar suspensões de nanocápsulas de Eudragit S100[®] e poli(ϵ -caprolactona) através do método de deposição interfacial;
- Determinar o perfil de liberação do diclofenaco sódico a partir dos microaglomerados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

O poli(metacrilato de metila-co-ácido metacrílico) (Eudragit S100[®]) (110.000 g/mol) foi obtido da Almapal (São Paulo, Brasil). A poli(ϵ -caprolactona) (65.000 g/mol) foi obtida da Sigma-Aldrich (Alemanha). O monoestearato de sorbitano e polissorbato 80 foram fornecidos pela Delaware (Porto Alegre, Brasil). A mistura de triglicerídios dos ácidos cáprico e caprílico foi enviada pela Brasquim (Porto Alegre). O Aerosil[®] 200 foi fornecido pela Degussa (São Paulo, Brasil). O HPMC E4M foi fornecido pela Colorcon (Cotia, Brasil). O diclofenaco sódico (DicONa) foi obtido de Galena (Campinas, Brasil). Todos os demais produtos químicos e solventes empregados foram utilizados em escala farmacêutica. Todos os reagentes foram utilizados como fornecidos.

3.2 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas por deposição interfacial de polímero pré-formado conforme proposto por Fessi e colaboradores¹⁴. Para uma suspensão de nanocápsulas o Eudragit S100[®] ou poli(ϵ -caprolactona) (0,5 g), o monoestearato de sorbitano (0,38 g) e triglicerídeos (1,65 g) foram dissolvidos em acetona (135mL) sob agitação magnética constante à 40°C. Em frasco separado, o polissorbato 80 (0,38 g) foi adicionado à água (265 mL). A solução orgânica, totalmente solubilizada, foi vertida sobre a fase aquosa, sob agitação magnética constante, à temperatura ambiente, através de um funil. As suspensões foram mantidas sob agitação por 10 min. A seguir, procedeu-se à evaporação de cada suspensão em evaporador rotatório, eliminando a acetona à pressão reduzida. O volume final foi ajustado a 50 mL.

3.2.1 Caracterização físico-química das formulações

A avaliação do diâmetro, distribuição do diâmetro e polidispersão das nanopartículas foi realizada por espalhamento de luz dinâmico, usando um Zetasizer[®] (Malvern, Laboratório de Sistemas Nanoestruturados para Administração de Fármacos,

Faculdade de Farmácia – UFRGS em colaboração com a Prof^a Silvia Guterres). Para evitar qualquer seleção da amostra, apenas o meio de diluição (água Milli-Q[®]) foi filtrado. Determinou-se o potencial zeta das suspensões após a prévia diluição das amostras em NaCl (10 mM). Cada lote (n=3) foi analisado 3 vezes e cada análise é uma média de 10 medidas para diâmetro e 20 medidas para potencial zeta. Os valores de pH foram determinados usando um potenciômetro (Micronal B-474).

3.3 PREPARAÇÃO DOS MICROAGLOMERADOS

Os microaglomerados foram preparados em duas etapas pela adição de DicONa, Aerosil 200[®] e HPMC (MA1 e MA2) em 200 mL de água conforme Tabela IX. A mistura foi mantida sob agitação mecânica à temperatura ambiente por 10 minutos e colocada a 4 °C por 48 horas. Após, foi retirada da geladeira e deixado agitar até temperatura ambiente essa solução foi aspergida em um spray-dryer (MSD 1,0, LabMaaq, Brasil), conforme os parâmetros descritos na Tabela X. Em uma segunda etapa este pó foi disperso em uma suspensão de nanocápsulas (50 mL). A mistura foi mantida sob agitação magnética e aspergida obtendo-se os microaglomerados. Para fins analíticos foi preparada uma amostra nas mesmas condições, porém sem adição de fármaco.

Tabela IX. Composição quali-quantitativa dos microaglomerados.

Microaglomerados	DicONa (g)	Aerosil [®] (g)	HPMC (g)	NC (mL)
MA1	0,140	2,0	0,5	---
MA1-EUD		1,0 g de MA1		50
MA1-PCL		1,0 g de MA1		50
MA2	0,140	0,5	2,0	---
MA2-EUD		1,0 g de MA2		50
MA2-PCL		1,0 g de MA2		50

Tabela X. Condições operacionais utilizadas durante o processo de aspersão.

Parâmetros	Condição
Fluxo de alimentação	0,3 Lh ⁻¹
Fluxo de ar	500 NLh ⁻¹
Pressão de comprimido	5 kPa
Temperatura de entrada do ar de secagem	150 ± 1°C
Temperatura do ar de secagem	98 ± 2°C
Diâmetro do atomizador	1,3 mm

3.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

3.4.1 Determinação de rendimento

O rendimento foi calculado somando-se todas as massas das matérias-primas de cada formulação, excluindo-se a água, e dividindo pela massa pesada após a preparação dos microaglomerados, conforme descrito na equação 11.

$$R = \frac{\text{Massa pesada}}{\text{Massa das matérias - primas}} \times 100 \quad (11)$$

3.4.2 Teor de DicONa nos microaglomerados

Para quantificar o DicONa, uma massa de aproximadamente 20 mg (MA1, MA2) e 50 mg (MA1-EUD, MA1-PCL, MA2-EUD, MA2-PCL) dos microaglomerados foram suspensas em tampão fosfato 7,4 em balão volumétrico de 25mL, sob agitação por 1 hora. As amostras foram diluídas em balão de 10 mL. Alíquotas foram retiradas, filtradas através de membrana (0,22 µm) e quantificadas em HPLC. O sistema de CLAE consistiu de um cromatógrafo Perkin Elmer S-200 com injetor S-200, detector UV-Vis, pré-coluna e coluna (LiChrospher[®] 100 RP₁₈, 250mm, 4mm, 5µm, Merck). A fase móvel (1,0 mL/min⁻¹) consistiu de acetonitrila/água (65:35 v/v), pH aparente 5,0 (ácido acético 10% (v/v)). Após a injeção de 20 µL, o DicONa foi detectado em 280 nm. O método de CLAE foi validado considerando a linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, seletividade,

limite de quantificação e exatidão. Curvas analíticas para o DicONa foram obtidas entre 0,5-25,00 µg/mL apresentando coeficientes de correlação maiores que 0,998. Os dados de repetibilidade e de precisão intermediária apresentaram coeficientes de variação abaixo de 4,5 %. As amostras de controle de qualidade nas concentrações de 3, 9 e 16 µg.mL⁻¹ apresentaram exatidão de 100,8 ± 1,7 %, 102,1 ± 0,6 % e 100,5 ± 1,4 %, respectivamente. O limite de quantificação foi de 0,52 µg/mL.

3.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho

As análises de espectroscopia na região do infravermelho foram realizadas em dois espectrômetros um Brooker ATR e um Bomen FTLA 2000 (pastilhas de KBr), no modo transmitância, com uma resolução 4 cm⁻¹ e 64 scans, cobrindo a faixa de frequência de 4000 a 500 cm⁻¹.

3.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os microaglomerados foram analisados quanto à forma e à superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS. As amostras foram metalizadas em ouro (metalizador Jeol Jee 4B SVG-IN) e analisadas em aumentos entre 500 a 10000 vezes utilizando microscópio eletrônico de varredura Jeol Scanning Microscope, JSM-5800.

3.4.5 Análises de Difração de Raios - X

Análises de difração de raios-X foram realizadas para os componentes e para os microaglomerados com um difratômetro Siemens (modelo D500) usando radiação de cobre a 35kV, em colaboração com a Prof^a Márcia R. Gallas do IF-UFRGS.

3.4.6 Determinação da Distribuição Granulométrica

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho de partícula (Span) foram determinados por difratometria de laser (Malvern Mastersizer 2000, Laboratório de Sistemas Nanoestruturados para Administração de Fármacos, Faculdade de Farmácia –

UFRGS em colaboração com a Prof^a Silvia Guterres). O Span é definido como (equação 12):

$$Span = \frac{D(90) - D(10)}{D(50)} \quad (12)$$

onde $D_{(10)}$, $D_{(50)}$ e $D_{(90)}$ representam os diâmetros cumulativos de 10 %, 50 % e 90 % das partículas, respectivamente.

3.4.7 Determinação da área superficial dos microaglomerados

A área de superfície dos microaglomerados foi determinada pelo método BET (TriStar II 3020, Micromeritics).

3.4.8 Liberação *In Vitro*

Uma quantidade de microaglomerados foi adicionada a 50 mL de solução aquosa de HCl pH 1,2 e tampão fosfato pH 6,8 (fosfato de sódio monobásico e hidróxido de sódio) na proporção para se ter concentrações equivalente a 20 µg/mL de fármaco em cada solução. Os experimentos foram realizados em banho termostático a $37,0 \pm 0,5$ °C. As amostras coletadas foram centrifugadas (27900 g) por 5 min, filtradas (0,22 µm) e quantificadas por HPLC.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA). O nível de significância foi de 0,05%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS

As nanocápsulas foram obtidas como suspensões opalescentes brancas com pH de $4,1 \pm 0,05$ (Eudragit S 100[®]) e $5,3 \pm 0,02$ (PCL). O diâmetro médio (*z-average*) foi de 205 ± 12 (Eudragit S 100[®]) e 236 ± 5 (PCL) com índice de polidispersão menor que 0,3. Valor de potencial zeta foi de $-19,2 \pm 0,9$ mV (Eudragit S 100[®]) e $-10,2 \pm 0,9$ mV (PCL). Estes resultados estão em concordância com relatos anteriores^{24,26,83,95}.

4.2 OBTENÇÃO DOS MICROAGLOMERADOS

Na preparação dos microaglomerados de DicONa, os rendimentos dos pós obtidos apresentaram-se satisfatórios para a escala de bancada, MA1-EUD ($62\% \pm 3$), MA1-PCL ($35\% \pm 2$), MA2-EUD ($53\% \pm 8$) e MA2-PCL ($48\% \pm 6$). Estes valores situam-se em faixa compatível ao descrito na literatura para micropartículas revestidas com nanocápsulas preparadas por *spray-drying*⁸³.

4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FÁRMACO

Os valores de concentração teórica, teores experimentais e eficiência de encapsulação do DicONa nos microaglomerados são apresentados na Tabela XI. O teor do DicONa nas formulações é variável devido à adição de suspensão de nanocápsulas na formulação.

Tabela XI. Concentração teórica, teor e eficiência de encapsulação do DicONa em microaglomerados.

Microaglomerados	Concentração teórica (mg/g)	Teor experimental (mg/g)	Eficiência de Encapsulação (%)
MA1	50	49,8 ± 1,2	99,8 ± 1,8
MA1-EUD	10	9,8 ± 0,5	98,6 ± 5,2
MA1-PCL	10	10,1 ± 0,2	101,3 ± 2,3
MA2	50	49,0 ± 0,2	98,0 ± 0,4
MA2-EUD	10	9,9 ± 0,2	99,8 ± 1,5
MA2-PCL	10	10,1 ± 0,3	100,5 ± 3,3

4.4 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Com a finalidade de identificar a cristalinidade dos materiais nos microaglomerados e identificar o estado físico do fármaco nas formulações, análises de difração de raios-X foram realizadas. As Figuras 40 e 41 apresentam os difractogramas de cada componente e dos microaglomerados, respectivamente. Os microaglomerados MA1-PCL e MA2-PCL apresentam dois picos o primeiro em 21,5 e o segundo em 23,6. Estes mesmos picos estão presentes no difractograma do polímero PCL, demonstrando que a técnica de aspersão não tornou o polímero amorfo, sugerindo que as nanocápsulas permaneceram íntegras nos microaglomerados. Para todos os outros pós observa-se a ausência de picos mesmo tendo em sua composição o DicONa, cuja matéria-prima apresenta-se cristalina. Beck⁹⁶ e colaboradores verificaram também a ausência de cristalinidade em micropartículas compostas de dióxido de silício e DicONa preparadas pelo método de secagem por aspersão. Adicionalmente, verifica-se que não há presença de DicOH nos microaglomerados, que poderia ser oriundo de uma neutralização durante o processo. Linhas largas dos padrões de sílica e de polímero Eudragit S 100[®], componentes amorfos, são observados na série MA1, MA1-PCL e MA1-EUD. Os resultados sugerem que o fármaco tornou-se amorfo ou que está molecularmente disperso nos microaglomerados. Ainda, para MA2 pode-se observar a presença de duas linhas largas referentes ao padrão da HPMC, sugerindo que a HPMC está organizada em

domínios nos microaglomerados. Por outro lado, no pó de MA1 não há banda na região entre 5 e 13, sugerindo que HPMC está dispersa no microaglomerado, provavelmente interagindo com a sílica.

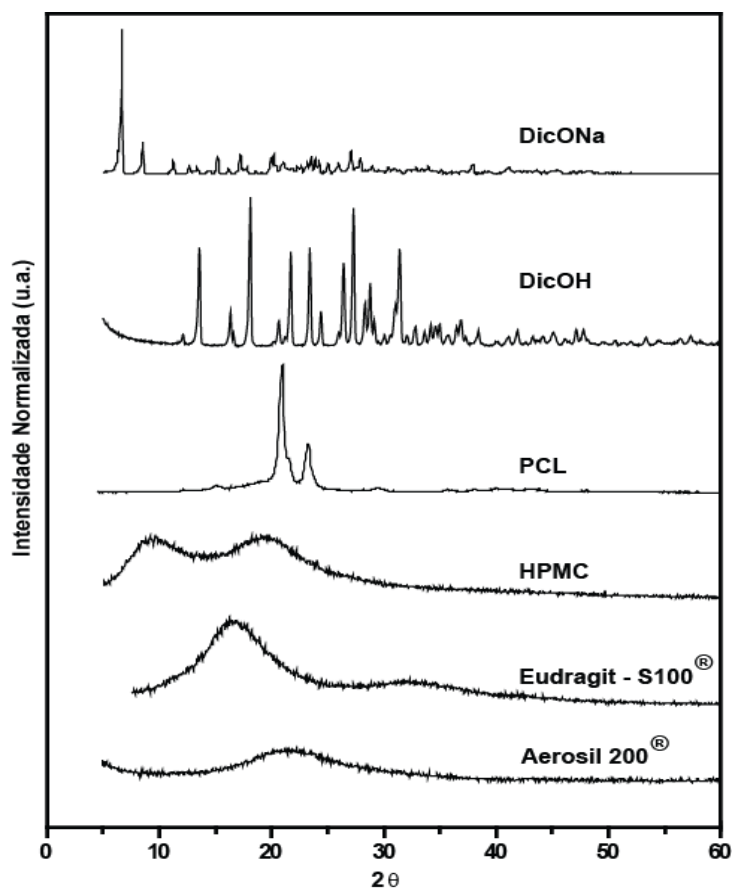


Figura 40. Difração de raios-X dos componentes dos microaglomerados.

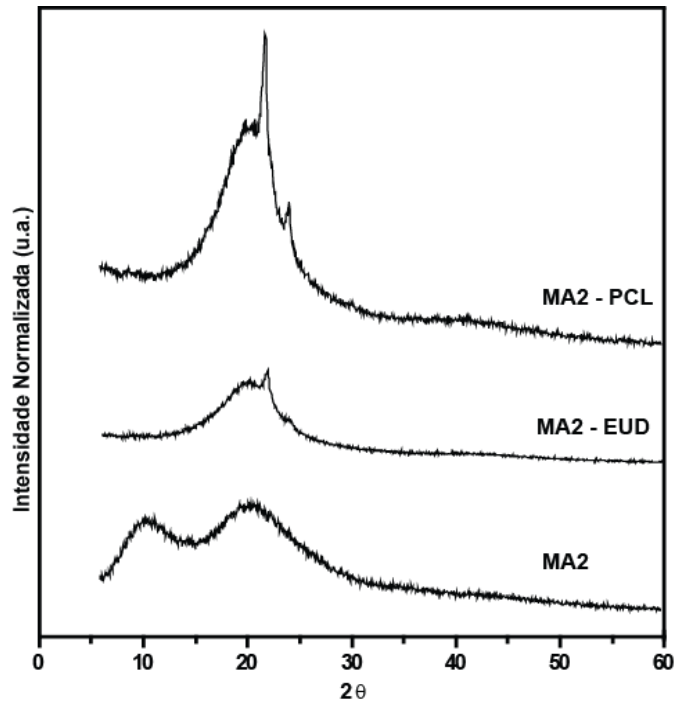
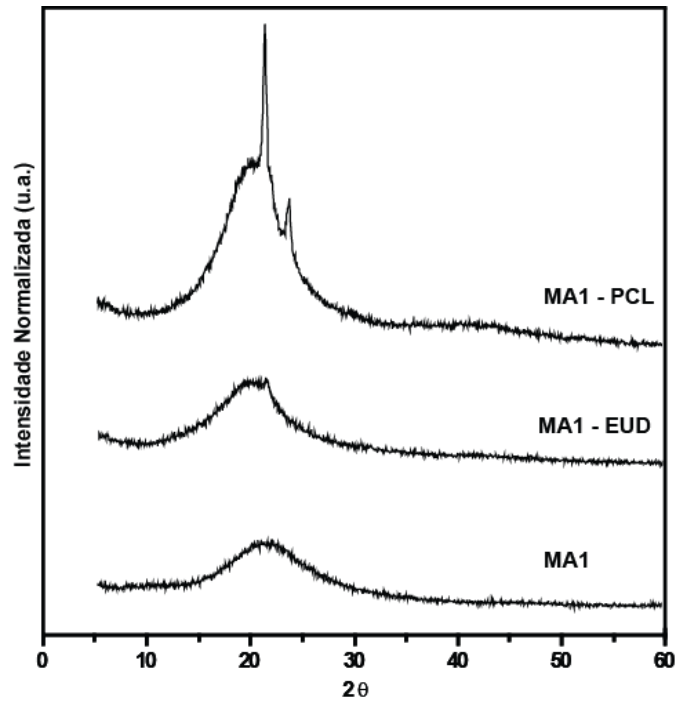


Figura 41. Difração de raios-X dos microaglomerados.

4.5 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

A espectrometria na região do infravermelho foi realizada com a finalidade de identificação das substâncias dos microaglomerados, tanto no interior quanto na superfície. Para isso as análises foram realizadas por transmissão (FTIR) com o preparo de pastilhas de KBr e por refletância (ATR) sem preparo prévio. As análises por transmissão dos componentes foram inseridas no Anexo 1. Desta forma, o espectro de infravermelho da Figura 42 demonstrou que o polímero HPMC, derivado de sacarídeos, apresenta uma banda característica de estiramento C-O em 1090 cm^{-1} , bandas referentes à deformação dos grupos CH alifático em 1380 e 1470 cm^{-1} , uma banda larga em 2903 cm^{-1} referente ao estiramento dos grupos CH alifático e uma banda próxima a 3380 cm^{-1} , referente ao estiramento O-H. Na Figura 43 tem-se o espectro do Aerosil 200[®], no qual podem-se observar a banda característica de estiramento Si-O em 1100 cm^{-1} .

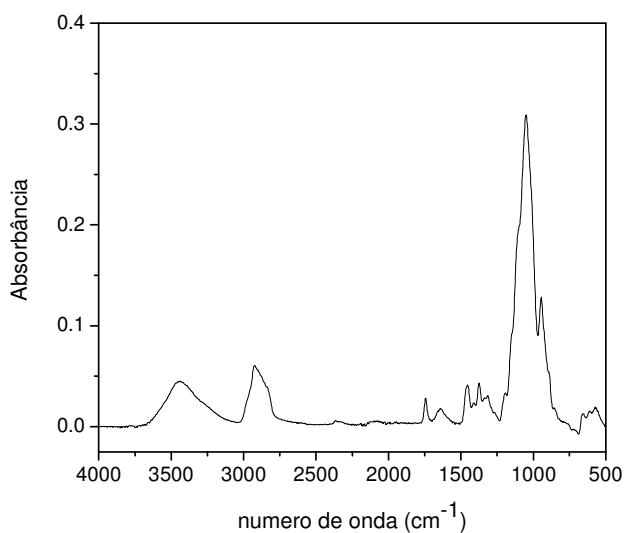


Figura 42. Espectros de absorção na região do infravermelho do polímero HPMC.

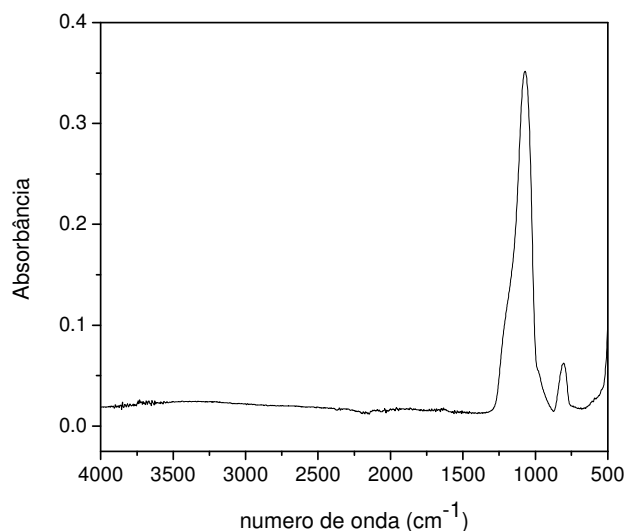


Figura 43. Espectros de absorção na região do infravermelho do Aerosil 200[®].

No espectro de Eudragit[®] S100 (Figura 44) é possível observar bandas características de vibração C=O de carboxilatos em 1730 cm⁻¹, bem como vibrações referentes ao éster em 1150, 1190 e 1275 cm⁻¹. Em 2900 a 3000 cm⁻¹ observam-se vibrações características de grupos CH alifático, o que é confirmado pela presença das bandas 1385, 1450 e 1485 cm⁻¹. Uma banda larga detectada próxima a 3500 cm⁻¹ pode ser atribuída a presença de grupos OH e água.

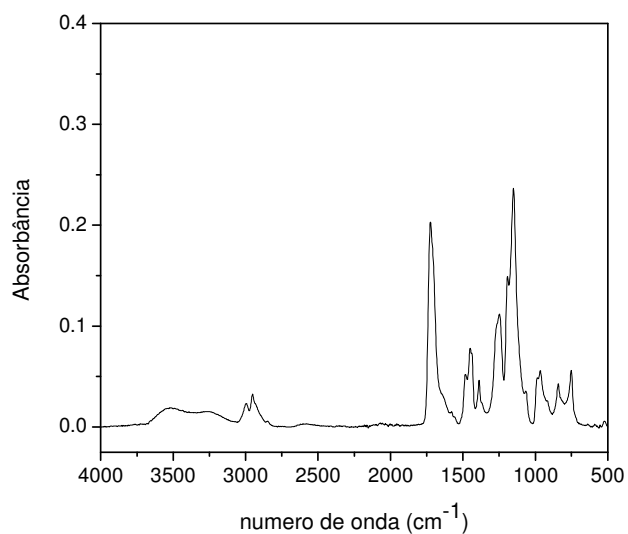


Figura 44. Espectros de absorção na região do infravermelho do polímero Eudragit S100[®].

A Figura 45 consiste no espectro da PCL, apresentando estiramento C=O do éster a 1730 cm^{-1} , além das bandas de estiramento de CH alifático em 2940 cm^{-1} e 2860 cm^{-1} . Ainda, é possível verificar a presença de bandas características de éster em 1172 , 1230 e 1305 cm^{-1} .

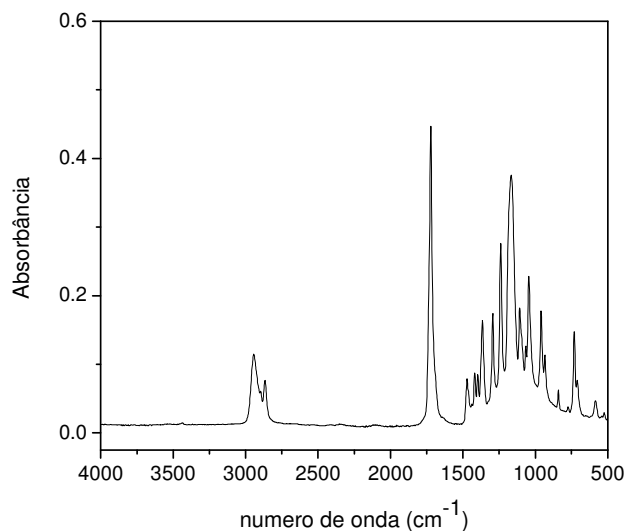


Figura 45. Espectros de absorção na região do infravermelho do polímero PCL.

O espectro do diclofenaco sódico (Figura 46) apresentou uma banda em 3300 cm^{-1} , característica de vibrações de estiramento de grupo N-H não-associado. As bandas em 1570 e 1548 cm^{-1} , bem como em 1504 e 1450 cm^{-1} , indicam vibração do estiramento da ligação C=C do anel aromático. Ainda, uma banda em 1280 cm^{-1} indica estiramento C-O de ácido carboxílico.

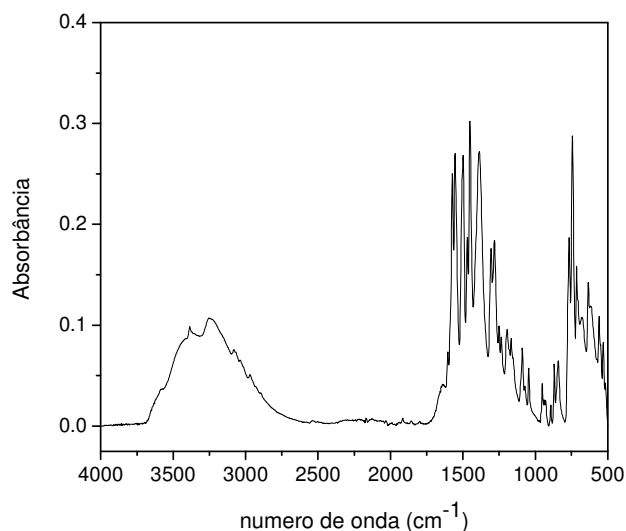


Figura 46. Espectros de absorção na região do infravermelho do DicONa.

Por sua vez, MA1 (Figura 47) apresenta uma banda referente ao estiramento Si-O em 1100 cm^{-1} , comprovando a presença do dióxido de silício. Ainda, bandas referentes ao estiramento de grupos CH alifático entre $3000\text{ a }2900\text{ cm}^{-1}$ e bandas referentes à deformação de grupos CH alifático podem ser observadas próximas a $1470\text{ e }1380\text{ cm}^{-1}$. Para a espectroscopia por refletância para MA1 (Figura 47) é possível observar apenas a banda de estiramento Si-O em 1100 cm^{-1} .

Tanto para espectroscopia de infravermelho por transmissão quanto para a por refletância no caso dos outros microaglomerados os espectros são semelhantes. Para a MA2 (Figuras 48) uma banda referente ao estiramento Si-O em 1100 cm^{-1} sobreposta por uma banda característica de estiramento C-O em 1090 cm^{-1} é observada, ainda, para MA2, bandas referentes ao estiramento de grupos CH alifático entre $2800\text{ a }3000$ estão presentes. A banda entre $3000\text{ a }3600\text{ cm}^{-1}$ é referente às ligações OH dos materiais, assim como da água residual.

Para os microaglomerados contendo nanocápsulas poliméricas observou-se a sobreposição das bandas características de ésteres em $1090, 1160\text{ e }1250\text{ cm}^{-1}$ e bandas em 1100 cm^{-1} referentes ao estiramento Si-O da sílica. A banda referente ao estiramento da carboxila (C=O) próximo a 1730 cm^{-1} também é observada. Ainda, foi possível confirmar a presença das nanocápsulas de Eudragit S100[®] e PCL contendo triacilglicerol, monoestearato de sorbitano e polissorbato 80 pelos estiramentos de grupos C-H alifático

(2960 e 2840 cm^{-1}). Não foram observadas bandas relacionadas ao fármaco devido à diluição do mesmo nas formulações.

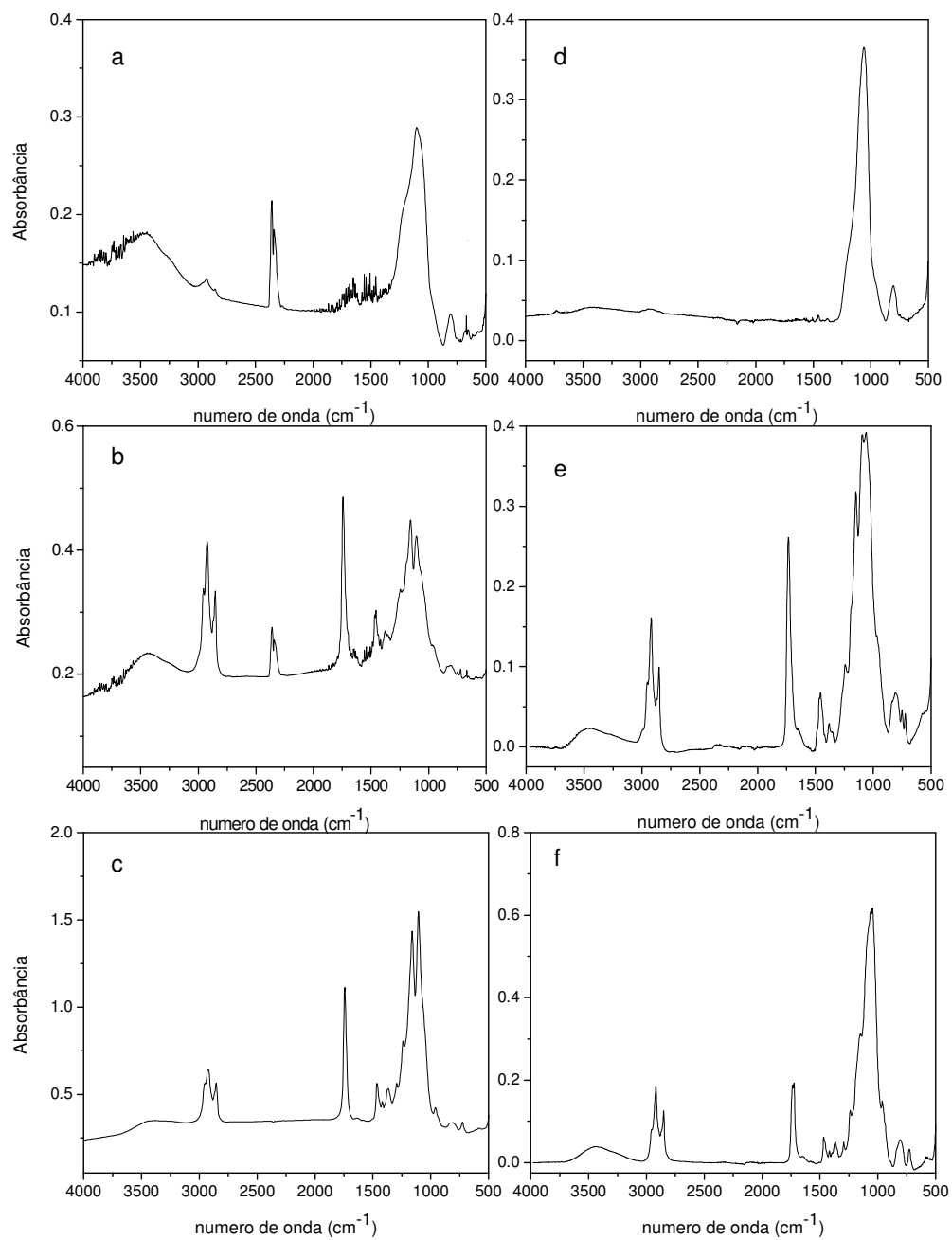


Figura 47. Espectros de absorção na região do infravermelho por transmissão a) MA1, b) MA1-EUD, c) MA1-PCL e por refletância d) MA1, e) MA1-EUD e f) MA1-PCL.

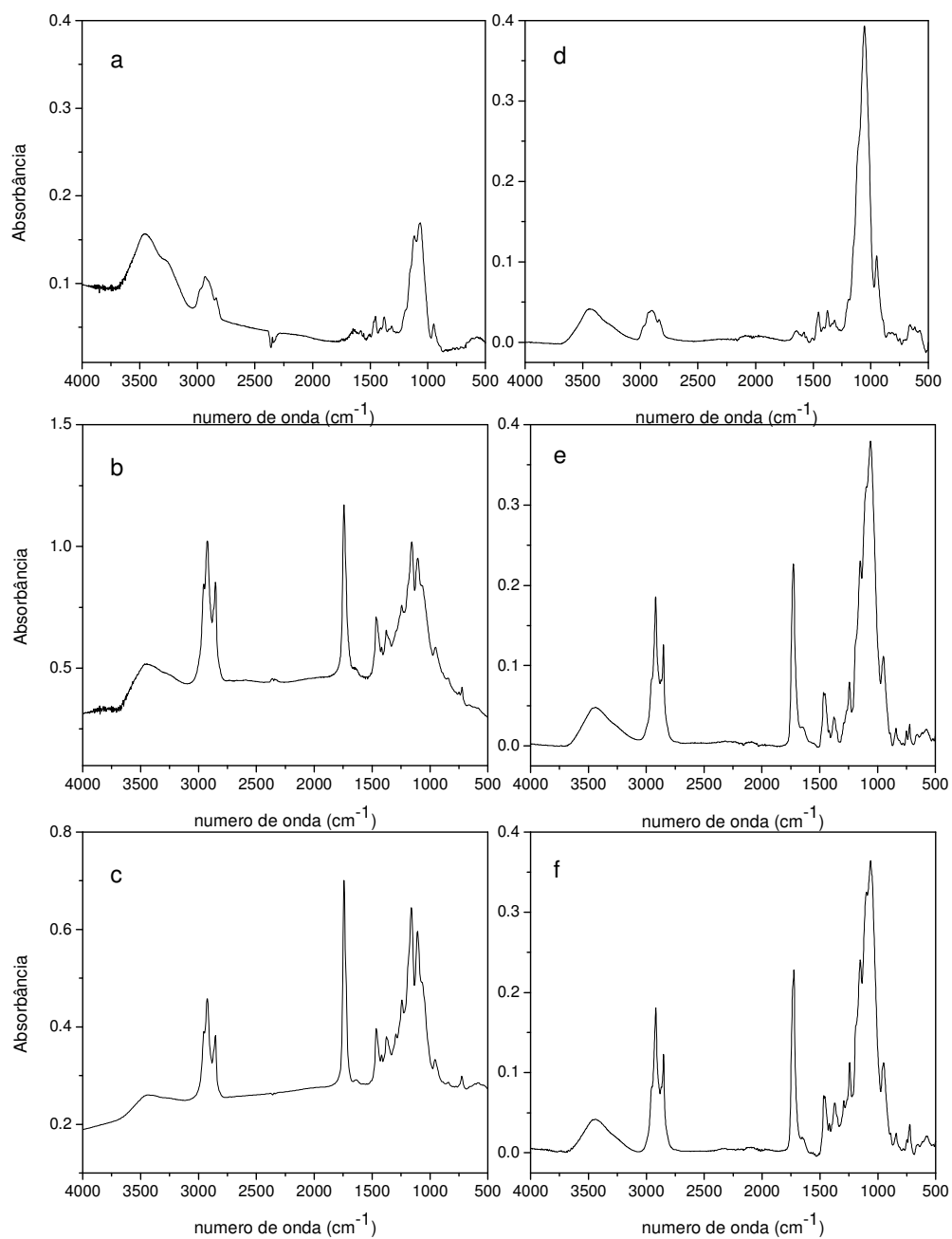


Figura 48. Espectros de absorção na região do infravermelho por transmissão a) MA2, b) MA2-EUD, c) MA2-PCL e por refletância d) MA2, e) MA2-EUD e f) MA2-PCL.

Com o intuito de localizar (interior ou superfície) as nanocápsulas poliméricas nos microaglomerados, integração das bandas referentes a C=O dos polímeros presentes nas nanocápsulas e da banda de estiramento Si-O foi realizada e suas áreas são apresentadas na Tabela XII.

Tabela XII. Valores de área por integração das bandas de estiramento C=O e Si-O e a razão (C=O/Si-O).

	Banda C=O (cm ⁻¹)	Área	Banda Si-O (cm ⁻¹)	Área	Razão (C=O/Si-O)
		Refletância			
MA1-EUD	1730	15,76	1091	25,35	0,621
MA1-PCL	1741	4,05	1089	45,67	0,088
MA2-EUD	1728	11,27	1061	16,75	0,672
MA2-PCL	1729	11,25	1056	27,94	0,402
		Transmissão			
MA1-EUD	1740	13,53	1105	11,04	1,225
MA1-PCL	1741	33,64	1104	53,36	0,630
MA2-EUD	1740	39,79	1105	11,77	3,380
MA2-PCL	1740	19,37	1106	9,06	2,137

Pode-se observar que a razão C=O/Si-O é menor para espectroscopia de infravermelho por refletância do que por transmissão. Isto demonstra que o microaglomerado é formado por nanocápsulas tanto na região externa quanto na região interna da sua estrutura.

4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A análise morfológica das partículas realizada através de MEV com aumento de 500 e 1500 vezes (Figuras 49 e 50) mostrou microaglomerados polidispersos, sendo que MA1 e MA2 apresentam uma superfície lisa, enquanto as formulações contendo nanocápsulas (Figuras 51 e 52) apresentam a formação de aglomerados de partículas com superfície rugosa. Ainda, para a MA2-EUD foi possível verificar a presença de filmes de HPMC em torno da partícula. Beck e colaboradores⁹⁶ observaram que para micropartículas contendo um núcleo de dióxido de silício e diclofenaco revestidas por nanocápsulas de Eudragit S100[®] os diâmetros das nanoestruturas apresentaram-se similares aos da suspensão de nanocápsulas original. Para micropartículas revestidas por suspensões de nanoesferas foi possível observar uma superfície rugosa nos microsistemas^{24,93}. Estas diferenças observadas na morfologia da superfície dos microaglomerados podem resultar em diferença na área superficial.

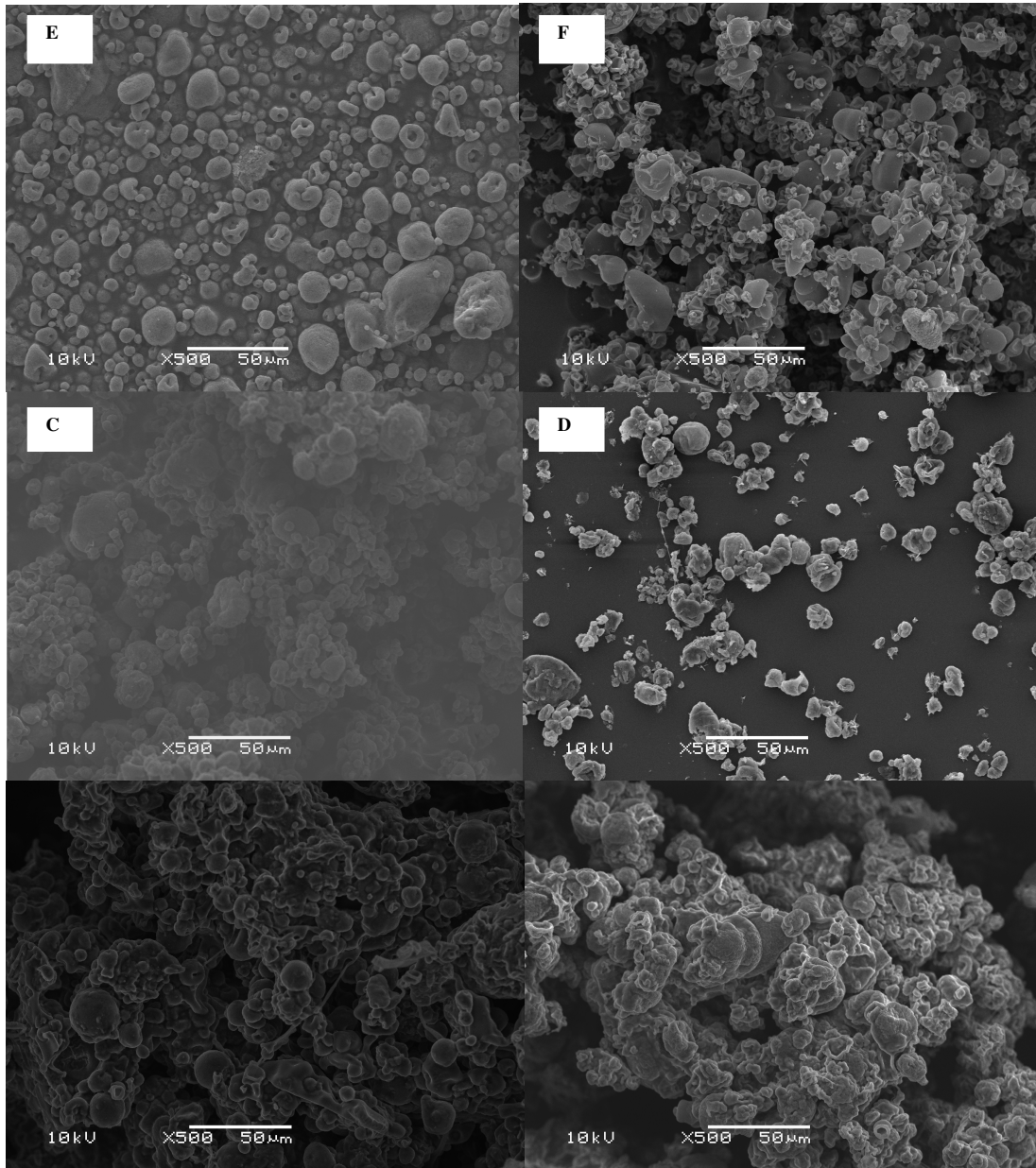


Figura 49. Fotomicrografias dos microaglomerados em 500x (A) MA1, (B)MA2, (C) MA1-EUD, (D) MA2-EUD, (E) MA1-PCL, (F) MA2-PCL.

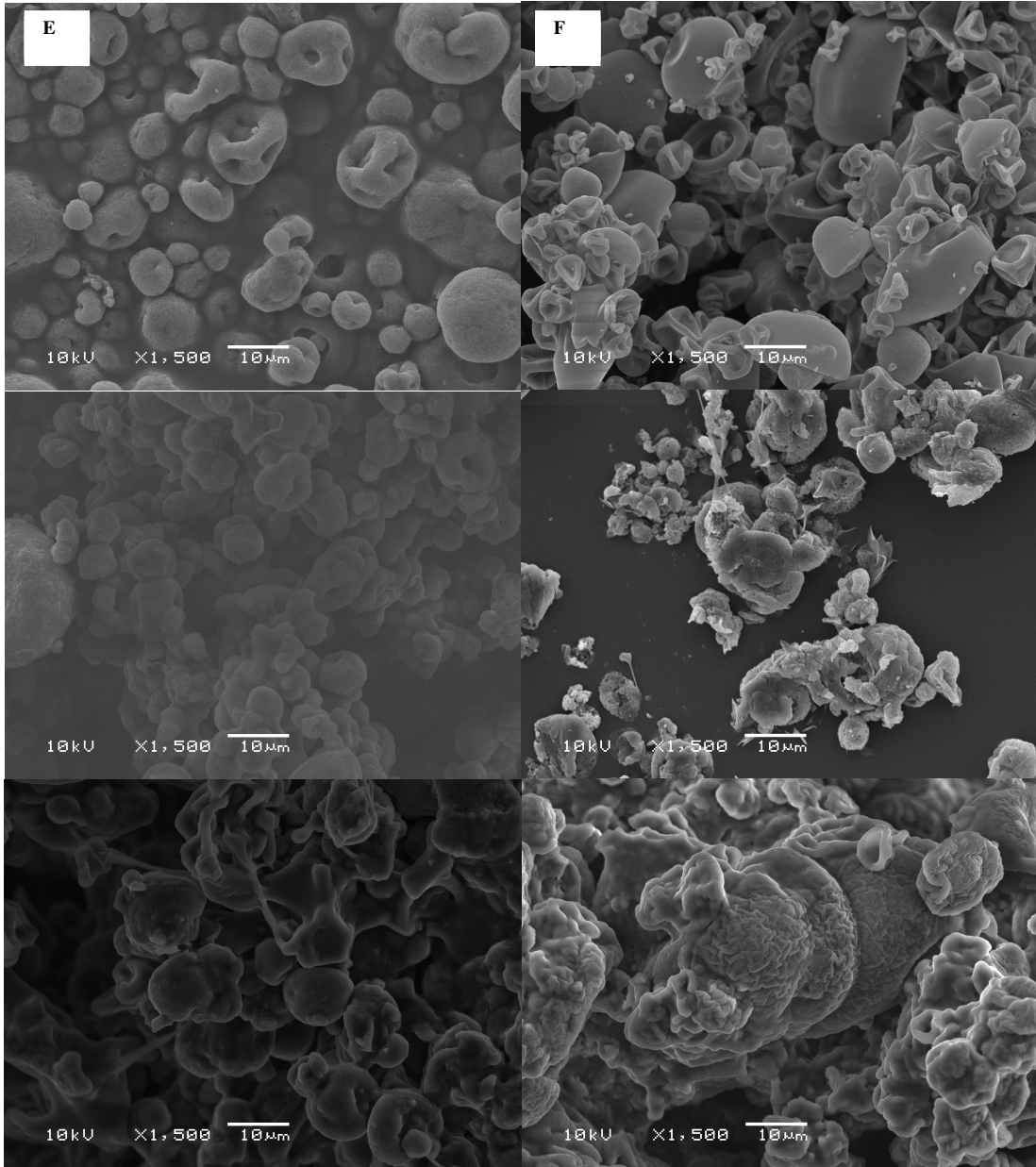


Figura 50. Fotomicrografias dos microaglomerados em 1.500x (A) MA1, (B) MA2, (C) MA1-EUD, (D) MA2-EUD, (E) MA1-PCL, (F) MA2-PCL.

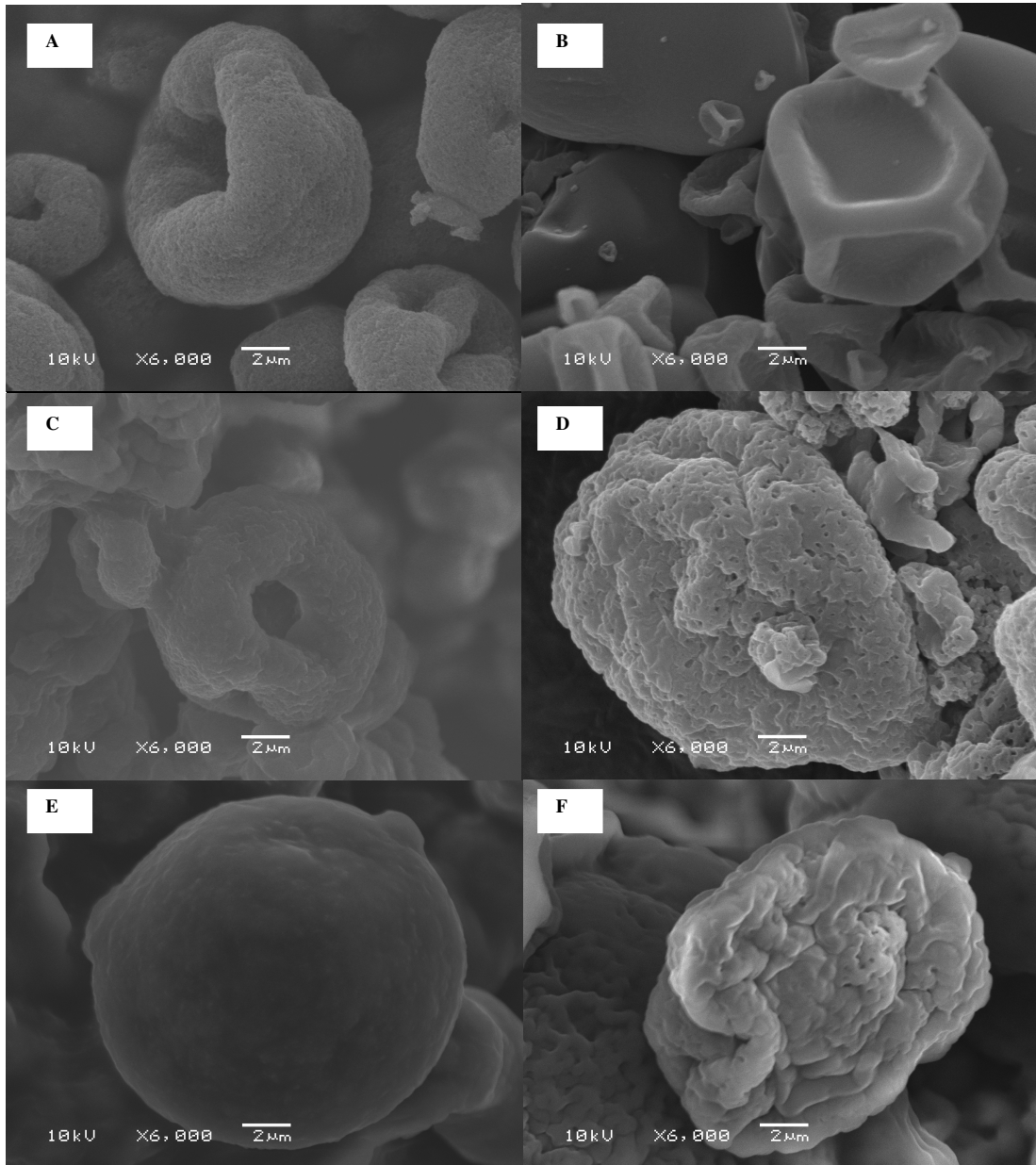


Figura 51. Fotomicrografias dos microaglomerados em 6.000x (A) MA1, (B) MA2, (C) MA1-EUD, (D) MA2-EUD, (E) MA1-PCL, (F) MA2-PCL.

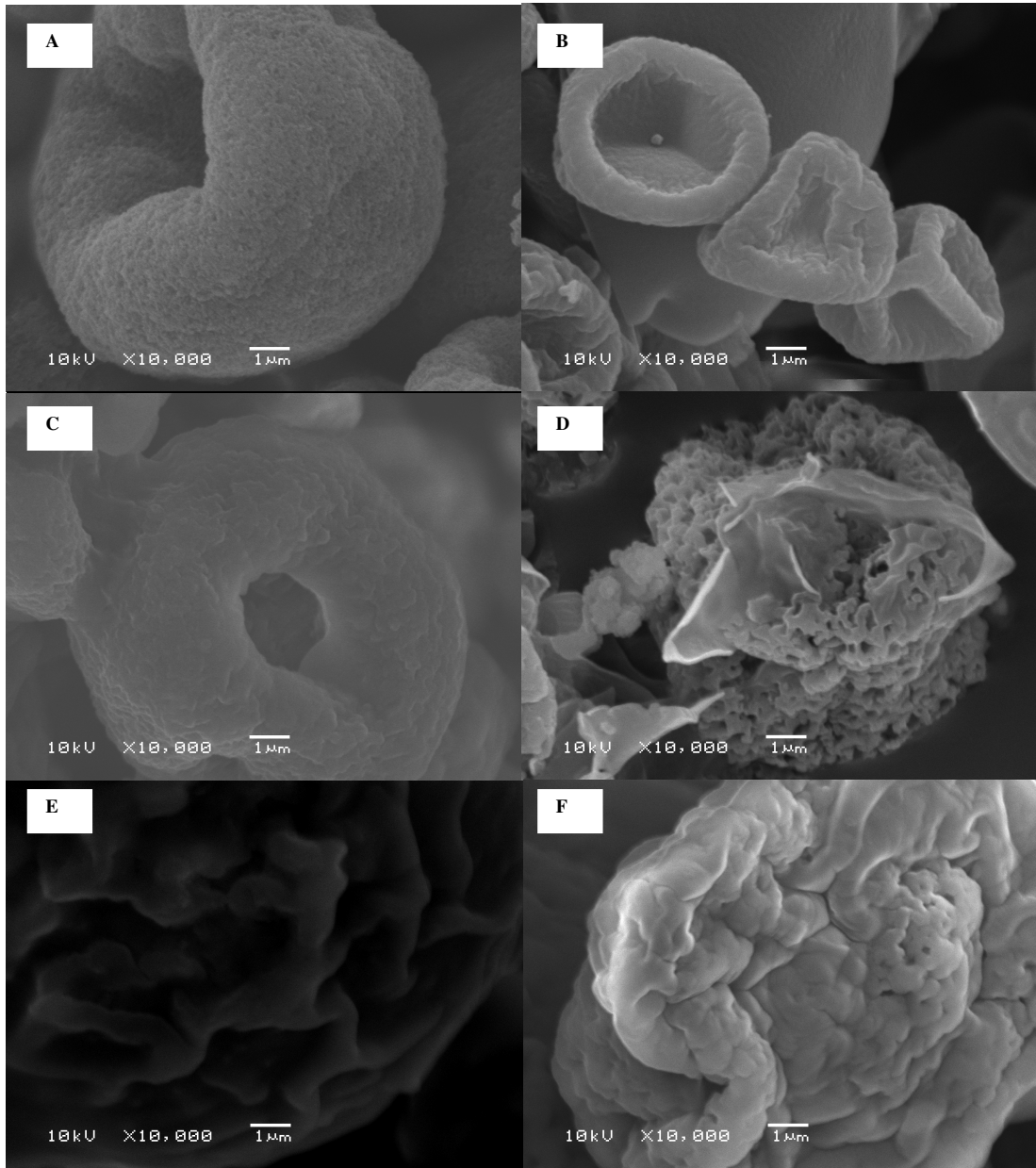


Figura 52. Fotomicrografias dos microaglomerados em 10.000x (A) MA1, (B) MA2, (C) MA1-EUD, (D) MA2-EUD, (E) MA1-PCL, (F) MA2-PCL.

A formulação MA1 apresenta uma área superficial maior do que o pó MA2, provavelmente devido à maior concentração de Aerosil 200[®] na primeira amostra, uma vez que o dióxido de silício coloidal tem uma área superficial de 214 m²/g^{1 96}. Em ambas as séries, a diminuição da área superficial ocorreu pela microaglomeração com nanocápsulas independente do tipo de polímero usado como parede das nanocápsulas (Tabela XIII). Essa diminuição na área superficial poderia ser devido a um aumento no diâmetro dos microaglomerados. Para confirmar essa hipótese a análise do tamanho dos microaglomerados, através de difratometria de *laser* foi realizada (Tabela XIV).

Tabela XIII. Área superficial dos microaglomerados.

Microaglomerados	Área Superficial (m²/g¹)
MA1	127,5 ± 12,7
MA1-EUD	1,2 ± 0,5
MA1-PCL	2,1 ± 3,3
MA2	24,6 ± 8,6
MA2-EUD	0,7 ± 0,5
MA2-PCL	0,4 ± 0,2

Tabela XIV. Diâmetro dos microaglomerados (µm) (n=3).

Microaglomerados	D[4,3]	D₍₁₀₎	D₍₅₀₎	D₍₉₀₎	Span
MA1	22,1 ± 6,0	6,2 ± 0,7	16,6 ± 2,5	36,2 ± 5,9	1,8 ± 0,1
MA1-EUD	114,0 ± 12,4	8,8 ± 9,0	56,5 ± 0,8	329,4 ± 37,0	5,6 ± 0,4
MA1-PCL	414,2 ± 48,4	3,8 ± 0,8	282,5 ± 125,9	1040,1 ± 174,0	4,3 ± 2,5
MA2	373,4 ± 74,3	21,8 ± 13,5	345,8 ± 90,6	762,1 ± 92,2	2,2 ± 0,4
MA2-EUD	185,6 ± 92	6,3 ± 2,2	124,6 ± 104,4	479,4 ± 173,8	4,7 ± 1,8
MA2-PCL	219,9 ± 24,2	3,0 ± 0,9	145,6 ± 53,8	559,9 ± 9,0	4,1 ± 1,3

A hipótese é confirmada e um menor diâmetro é verificado para MA1, formulação com menor concentração de HPMC sem nanocápsulas. Com a presença de nanocápsulas houve a formação do microaglomerado aumentando os diâmetros. Isto sugere que quando é colocada a MA1 na suspensão de nanocápsulas para posterior nebulização, não ocorre a desaglomeração deste microsistema e sim a agregação das

nanocápsulas ao redor da MA1. Ainda, para MA2 a maior concentração de HPMC forneceu um maior diâmetro e a presença das nanocápsulas resultou na diminuição de diâmetro. Estes resultados sugerem que a MA2 em contato com a suspensão de nanocápsulas sofre uma desaglomeração e posterior aglomeração de todos componentes presentes nesta suspensão, formando MA2-PCL ou EUD. Analisando os valores de span, pode-se observar um baixo índice de polidispersão para MA1 e MA2, enquanto para as formulações compostas de nanocápsulas estes valores são maiores, indicando a aglomeração do sistema.

4.7 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

4.7.1 Gastroresistência

A avaliação dos microaglomerados quanto à gastroresistência foi realizada pelo estudo de liberação em solução aquosa de HCl (pH 1,2) sendo retirada uma alíquota em 60 min. A Tabela XV apresenta o percentual de DicONa liberado.

Tabela XV. Percentual liberado de DicONa em solução aquosa de HCl.

Microaglomerados	60 minutos
DicONa	4,6 ± 1,1
MA1	12,8 ± 1,5
MA1-EUD	4,0 ± 0,9
MA1-PCL	15,9 ± 4,0
MA2	20,2 ± 2,0
MA2-EUD	6,5 ± 1,2
MA2-PCL	12,0 ± 3,8

Os resultados mostraram os maiores percentuais liberados para os microaglomerados na ausência de nanocápsulas e na presença de nanocápsulas de PCL contendo polissorbato 80. Mesmo apresentando solubilidade dependente do pH o DicONa que pode ser protonado em pH 1,2, tornando-se insolúvel em meio aquoso, foi disperso no tensoativo apresentando dissolução micelar de 15% em 1 hora.

4.7.2 Liberação em tampão fosfato pH 6,8

A liberação do fármaco a partir dos microaglomerados em tampão fosfato pH 6,8 foi investigada durante 180 minutos. Os perfis de liberação são apresentados na Figura 53.

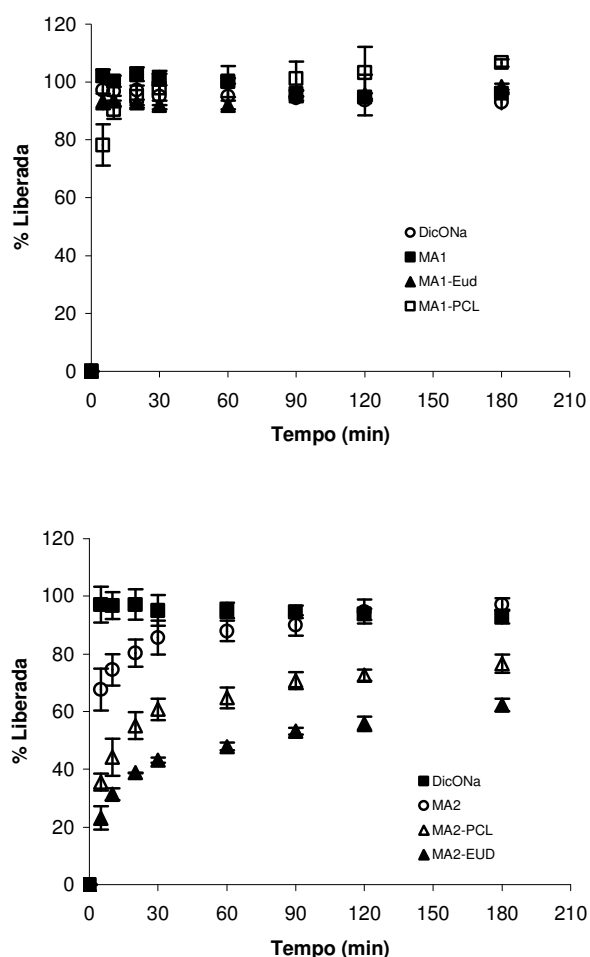


Figura 53. Perfil de liberação do DicONa livre e a partir dos microaglomerados em tampão fosfato pH 6,8.

A dissolução do DicONa livre atingiu valor de 97,1% em 5 minutos, sendo que a liberação a partir dos microaglomerados foi de 102,1% (MA1), 93,3% (MA1-EUD), 78,2% (MA1-PCL), 67,5% (MA2), 23,1% (MA2-EUD) e 35,5% (MA2-PCL). Os resultados mostraram que com o aumento da concentração da HPMC é possível obter o controle da liberação do DicONa. Para as formulações com menor concentração de HPMC, o revestimento de PCL, permitiu uma diminuição significativa ($P < 0.05$) na liberação do fármaco. Para todas as formulações com maior concentração de HPMC uma redução inicial significativa ($P < 0.05$) da liberação do fármaco foi verificada, e após uma liberação lenta do mesmo. MA2-EUD permitiu a menor liberação do fármaco em um meio de pH 6,8, no qual o polímero Eudragit S100[®] dissolve-se completamente nesse pH.

A partir dos resultados obtidos propõem-se um modelo estrutural para estes microaglomerados. Para MA1, a qual foi verificada a ausência da linha da HPMC por difração de raios $-X$, uma banda de estiramento Si-O (ATR), uma maior área superficial, menor diâmetro e uma rápida liberação do fármaco sugere-se que sua estrutura consiste em um microaglomerado de partículas de sílica interagindo tanto com o fármaco quanto com a HPMC (Figura 54).

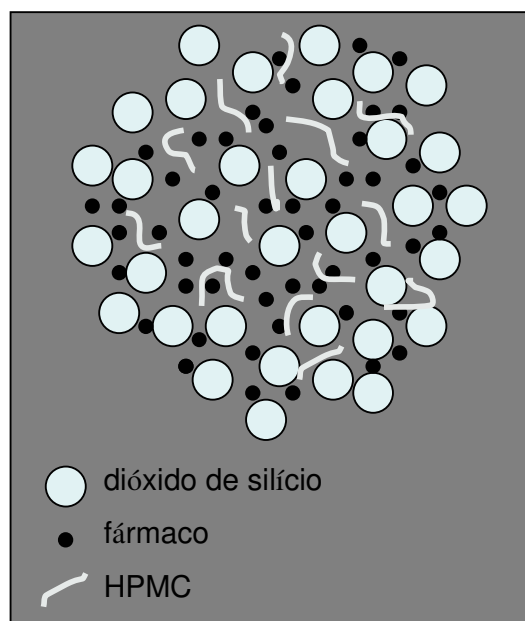


Figura 54. Proposta de modelo estrutural para MA1.

Para MA1-PCL e MA1-EUD, nas quais também se verificou ausência da linha padrão da HPMC por difração de raios -X, uma menor área superficial, maior diâmetro e uma rápida liberação do fármaco sugere-se que sua estrutura consiste em um microaglomerado de partículas de sílica interagindo tanto com o fármaco quanto com a HPMC e as nanocápsulas (Figura 55). Nosso grupo de pesquisa propôs pela primeira vez a técnica de secagem por aspersão para a secagem de suspensões de nanopartículas utilizando o dióxido de silício como adjuvante de secagem¹⁵. Através de microscopia eletrônica de varredura foi possível observar micropartículas esféricas apresentando nanopartículas na superfície. Beck²⁴ e colaboradores relataram o preparo de micropartículas revestidas por nanopartículas utilizando o diclofenaco como fármaco, sendo que os microsistemas apresentam nanoestruturas na superfície formando uma camada de recobrimento com partículas de diâmetros de acordo com a suspensão original.

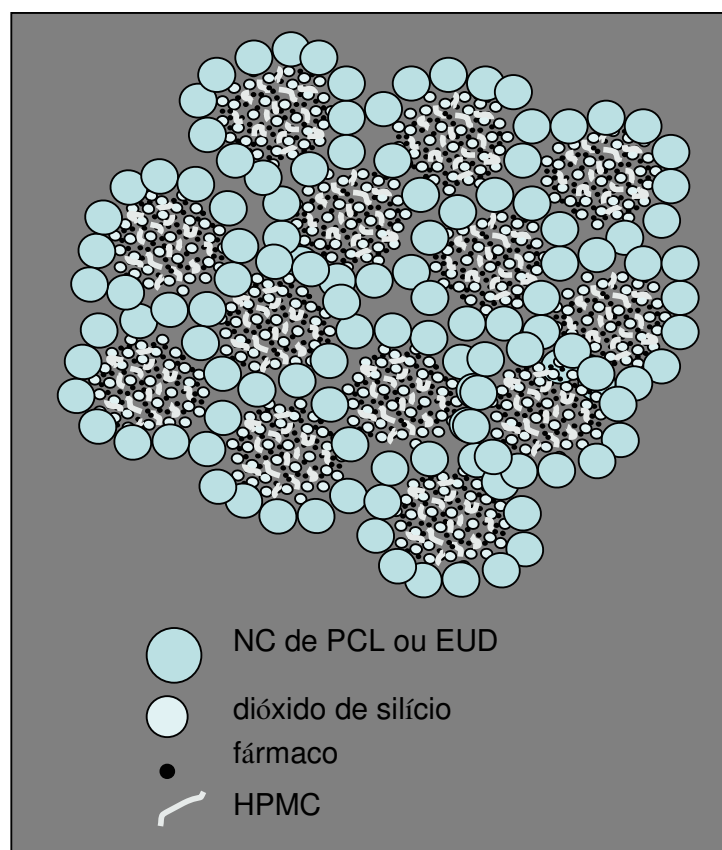


Figura 55. Proposta de modelo estrutural para MA1-PCL e MA1-EUD.

Para MA2, a qual verificou-se a linha padrão da HPMC por difração de raios-x, uma menor área superficial em relação a MA1, maior diâmetro e uma liberação inicial mais lenta do fármaco sugere-se que sua estrutura consiste em um microaglomerado contendo partículas de sílica interagindo com o fármaco e a HPMC em concentração suficiente para interagir consigo mesma (Figura 56).

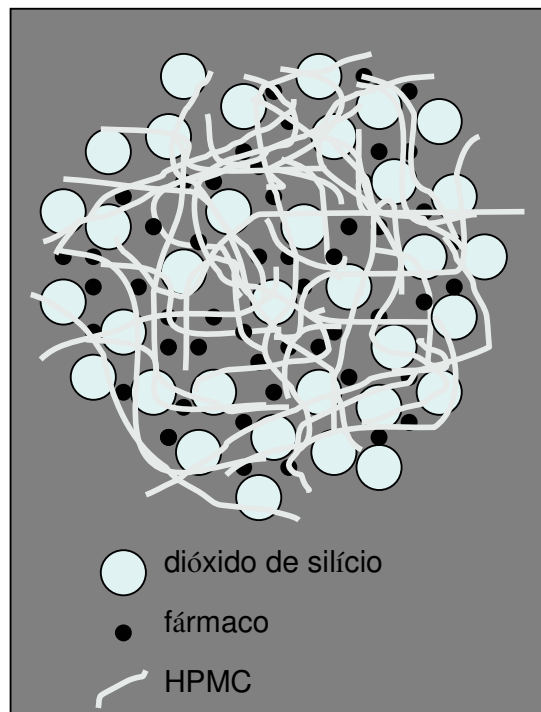


Figura 56. Proposta de modelo estrutural para MA2.

Para MA2-EUD e MA2-PCL, a qual verificou-se uma menor área superficial em relação a MA2, menor diâmetro e uma liberação sustentada do fármaco sugere-se que sua estrutura consiste em um microaglomerado contendo partículas de sílica, o fármaco interagindo com a parede polimérica das nanocápsulas devido a presença dos polímeros, e a HPMC formando uma matriz ao redor deste sistema pelo fato de interagir consigo mesma (Figura 57).

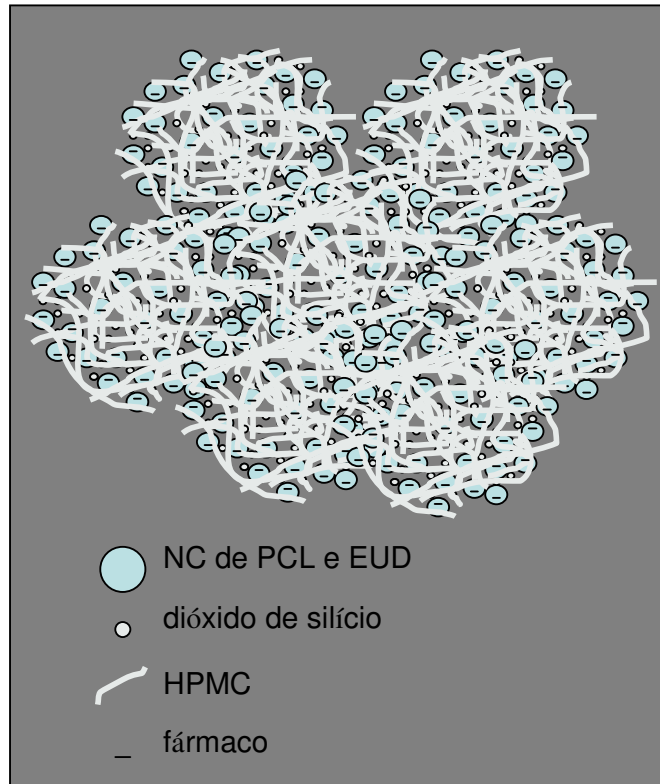


Figura 57. Proposta de modelo estrutural para MA2-PCL e MA2-EUD.

A partir de estudos anteriores²⁶, que provaram que o mecanismo de liberação de micropartículas revestidas por nanocápsulas é a desaglomeração do sistema, pode-se sugerir que os microaglomerados MA2-PCL e MA2-EUD, por apresentarem uma maior concentração de HPMC poderia englobar o sistema não permitindo sua rápida desaglomeração. Dessa forma esses novos microaglomerados são capazes de retardar a desaglomeração rápida liberando de forma lenta o fármaco hidrofílico.

5. CONCLUSÃO

Estudos de liberação do DicONa a partir de microaglomerados em pH 1,2, comprovaram a gastrorresistência dos microsistemas, devido à presença do Eudragit S100[®] um polímero com solubilidade dependente do pH nas nanocápsulas. Pode-se concluir também que a HPMC, não está em concentração suficiente nos microaglomerados MA1, MA1-EUD e MA1-PCL para influenciar a liberação do DicONa a partir destes sistemas em pH 6,8. Ainda, a maior concentração da HPMC permitiu a interação com ela mesma ocorrendo a formação de uma rede e a presença dos polímeros (PCL e EUD) nos microsistemas influenciou a liberação do fármaco. Desta forma, a hipótese de controlar a liberação de um fármaco hidrofílico através do retardo da desaglomeração do sistema foi validada. Portanto, este sistema inovador é um microaglomerado composto por um nanosistema polimérico e uma rede de HPMC, sendo capaz de retardar a desaglomeração do sistema assim, controlando a liberação de fármacos hidrofílicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Couvreur, P.; Gillian, B.; Fattal, E.; Legrand, P.; Vauthier, V. *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst.* **2002**, 19, 99.
2. Couvreur, P.; Page-Clisson, M-E.; Gibaud, S.; Pinto-Alphandary, H.; Weingarten, C. *Int. J. Pharm.* **1998**, 166, 117.
3. Ravi Kumar, M. *J. Pharm. Sci.* **2000**, 3, 234.
4. Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E. *J. Control. Rel.* **2001**, 70, 1.
5. Barratt G. M. *Pharm. Sci. Tech. Today*, **2000**, 3, 163.
6. Couvreur, P.; Dubernet, C.; Puisieux, F. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1995**, 41, 2.
7. Jäger, A.; Stefani, V.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. *Int. J. Pharm.* **2007**, 338, 297.
8. Magenheim, B. and Benita, S. *S. T. P. Pharma Sci.* **1991**, 1, 221.
9. Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. L.; Pohlmann A. R. *Quím. Nova*, **2003a**, 26, 726.
10. Pohlmann, A. R.; Cruz, L.; Mezzalira, G.; Soares, L. U.; Silveira, N. P.; Guterres, S. S. *Int. J. Nanotechnol.* **2007**, 4, 454.
11. Calvo, P.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J. *J. Pharm. Sci.* **1996**, 85, 530.
12. Lambert, G.; Fattal, E.; Pinto-Alphandary, H.; Gulik, A.; Couvreur, P. *Pharm. Res.* **2000**, 17, 707.
13. Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Doelker, E.; Fessi, A. *Pharm. Res.* **1998**, 15, 1056.
14. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.P.; Amoury, N.; Benita, S. *Int. J. Pharm.* **1989**, 113, rl.
15. Müller, C. R.; Bassani, V. L.; Pohlmann, A. R.; Michalowski, C. B.; Petrovick, P. R.; Guterres, S.S. *Drug Develop. Ind. Pharm.* **2000**, 26, 343.
16. Müller, C. R.; Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; Luccas Freitas, L.; Pesce Da Silveira, N.; Dalla Costa, T.; Guterres, S. S. *Pharmazie*, **2001**, 56, 864.

17. Thies, C. A Survey of Microencapsulation Processes. In: Benita, S. *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*. 10th ed. New York: Marcel Dekker, 1996.
18. Esposito, E.; Cervellati, F.; Menegatti, E.; Nastruzzi, C.; Cortesi, R. *Int. J. Pharm.* **2002**, 242, 329.
19. Palmieri, G.; Bonacucina, G.; Di Martino, P.; Martelli, S. *Drug Develop. Ind. Pharm.* **2001**, 27, 195.
20. Pohlmann, A. R.; Soares, L. U.; Cruz, L.; Da Silveira, N. P.; Guterres, S. S. *Curr. Drug Delivery*, **2004**, 1, 103.
21. Cruz, L.; Soares, L. U.; Costa, T. D.; Mezzalira, G.; da Silveira, N. P.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. *Int. J. Pharm.* **2006**^a, 313, 198.
22. Guterres, S. S.; Weiss, V.; Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R. *Drug Delivery*, **2000**, 7, 195.
23. Pohlmann, A. R.; Weiss, V.; Mertins, O.; Silveira, N. P.; Guterres, S. S. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, 16, 305.
24. Beck, R. C. R.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. *J. Microcapsulation*, **2004**, 21, 5, 499.
25. Fonseca, L. S.; Silveira, R. P.; Deboni, A. M.; Benvenuti, E. V.; Costa, T. H.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. *Int. J. Pharm.* **2008**, 358, 292.
26. Domingues, G. S.; Beck, R.C.R.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. *Quim. Nova*, **2008**, 31, 1966.
27. Sinha, V.R.; Bansal, K.; Kaushik, R.; Kumbria, R.; Trehan, A. *Int. J. Pharm.* **2004**, 278, 1.
28. Zhang, H.; Cui, W.; Bei, J.; Wang, S. *Polym. Degrad. Stabil.* **2006**, 91, 1929.
29. Poletto, F. S.; Jäger, E.; Cruz, L.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. *Mat. Sci. Eng. C*, **2008**, 28, 472.
30. Losa, C.; Marchal-Heussler, L.; Orallo, F.; Vila-Jato, J.; Alonso, M. J. *Pharm. Res.* **1993**, 10, 80.
31. Guterres, S. S.; Fessi, H.; Barrat, G.; Devissaguet, J-P.; Puisieux, F. *Int. J. Pharm.* **1995**, 13, 57.

32. Mezzalira, G. Dissertação-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2005.
33. Pohlmann, A. R.; Mezzalira, G.; Venturini, C. G.; Cruz, L.; Bernardi, A.; Jäger, E.; Battastini, A. O.; Silveira, N. P.; Guterres, S. *Int. J. Pharm.* **2008**, 359, 288.
34. Mengual, O.; Meunier, G.; Cayre, I.; Puech, K.; Snabre, P. *Talanta*, **1999**, 50, 445.
35. Buron, H.; Mengual, O.; Meunier, G.; Cayré, I.; Snabre, P. *Polym. Int.* **2004**, 53, 1205.
36. Yegin, B. A., Lamprecht, A., *Int. J. Pharm.* **2006**, 320, 165.
37. Panyam, J.; Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, 55, 329.
38. Mundargi, R. C.; Babu, V. R.; Rangaswamy, V.; Patel, P.; Aminabhavi, T. M. *J. Control. Rel.*, **2008**, 125, 193.
39. Legrand, P.; Barrat, G.; Mosqueira, V.; Fessi, H.; Devissaguet, J.P. *Sci. Tech. Pract. Pharm.* **1999**, 9, 411.
40. Mosqueira, V. C. F.; Legrand, P.; Pinto-Alphandary, H.; Puisieux, F.; Barrat, G. *J. Pharm. Sci.* **2000**, 89, 614.
41. Palumbo, M.; Russo, A.; Cardile, V.; Renis, M.; Paolino, D.; Puglisi, G.; Fresta, M. *Pharm. Res.* **2002**, 19, 71.
42. Mu, L.; Seon, P-H.; Ang, S-H.; Feng, S-S. *Colloid Polym. Sci.* **2004**, 283, 58.
43. Prego, C.; Torres, D.; Fernandez-Megia, E.; Novoa-Carballal, R.; Quinoa, E.; Alonso, M. J. *J. Control. Rel.* **2006**, 111, 299.
44. Zhang, Y.; Zhu, S. Y.; Yin, L. C.; Qian, F.; Tang, C.; Yin, C. H. *Eur. Polym. J.* **2008**, 44, 1654.
45. Valero, J.; Egea, M.A.; Espina, M.; Gamisans, F.; Garcia, M.L. *Drug Develop. Ind. Pharm.* **1996**, 22, 167.
46. Müller, C. R.; Haas, S. E.; Bassani, V. L.; Guterres, S. S.; Fessi, H.; Peralba, M. C. R.; Pohlmann, A. R. *Quí. Nova*, **2004**, 27, 555.
47. Soares, L. U. Dissertação-Programa de Pós-Graduação em Química, UFRGS, 2003.

48. Santos-Magalhães, N. S.; Pontes, A.; Pereira, V. M. W.; Caetano, M. N. P. *Int. J. Pharm.* **2000**, 208, 71.
49. Ferranti, V.; Marchais, H.; Chabenat, C.; Orecchioni, A. M.; Lafont, O. *Int. J. Pharm.* **1999**, 193, 107.
50. Lopes, E. C.; Pohlmann, A.R.; Bassani, V.; Guterres, S.S. *Pharmazie*, **2000**, 55, 7, 527.
51. Cruz, L.; Schaffazick, S. R.; Costa, T. D.; Soares, L. U.; Mezzalira, G.; da Silveira, N. P.; Shapoval, E.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. *J. Nanosci. Nanotecnol.* **2006b**, 6, 3154.
52. Jäger, E. Dissertação-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2008.
53. Kalgutkar, A. S.; Marnett, A. B.; Crews, B. C.; Remmel, R. P.; Marnett, L. J. *J. Medicinal Chem.* **2000**, 43, 2860.
54. Zattoni, A., Piccolomini, E. L., Torsi, G., Reschiglian, P. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 6469.
55. Zattoni, A., Melucci, D., Reschiglian, P., Sanz, R., Puignou, L., Galceran, M. T. *J. Chrom. A* **2004**, 1054, 293.
56. Wohlgemuth, M.; Mächtle, W.; Mayer, C. *J. Microencapsulation*, **2000**, 17, 437.
57. Washington, C. *Int. J. Pharm.* **1990**, 58, 1.
58. Korsmeyer, R. W.; Gurny, R.; Doelker, E.; Buri, P.; Peppas, N. A. *Int. J. Pharm.* **1983**, 15, 25.
59. Peppas, N. A. *Pharm. Acta Helv.* **1985**, 60, 110.
60. Vauthier, C.; Seiller, M.; Weingarten, C.; Couvreur, P. *STP Pharma Sci.* **1999**, 9, 391.
61. Epstein, H.; Afergan, E.; Moise, T.; Richter, Y.; Rudich, Y.; Golomb, G. *Biomaterials*, **2006**, 27, 651.
62. Higuchi, T. *J. Pharm. Sci.* **1963**, 52, 1145.
63. Jackson, J. K.; Liang, L. S.; Hunter, W. L.; Reynolds, M.; Sandberg, J. A.; Springate, C.; Burt, H. M. *Int. J. Pharm.* **2002**, 243, 43.
64. Prakobvaitayakit, M.; Nimmannit, U. *AAPS Pharm. Sci. Technol.* **2004**, 4, 1.
65. Quintanar-Guerrero, D.; Fessi, H.; Allémann, E.; Doelker, E. *Int. J. Pharm.* **1996**, 143, 133.

66. Gullapalli, R. P.; Sheth, B. B. *Eur. J. Pharm Biopharm.* **1999**, 48, 233.
67. Lim, S-J.; Kim, C-K. *Int. J. Pharm.* **2002**, 243, 135.
68. Raffin, R. P.; Colomé, L. M. ; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. *Pharm. Develop. Technol.* **2007**, 12, 1.
69. Morishita, M.; Goto, T.; Peppas, N. A.; Joseph, J. I.; Torjman, M. C.; Munsick, C.; Nakamura, K.; Yamagata, T.; Takayama, K.; Lowman, A. M. *J. Control. Rel.* **2004**, 97, 115.
70. Kurkuri, M. D.; Aminabhavi, T. M. *J. Control. Rel.* **2004**, 96, 1, 9.
71. Thies, C. A Survey of Microencapsulation Processes. In: Benita, S. *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*. 10th ed. New York: Marcel Dekker, 1996.
72. Jain, R.; Shah, N. H.; Malick, A. W.; Rhodes, C. T. *Drug Develop. Ind. Pharm.* **1998**, 24, 703.
73. Guterres, S. S.; Müller, C. R.; Michalowski, C. B.; Pohlmann, A. R.; Costa, T. D. *STP Pharma Sci.* **2001**, 11, 229.
74. Drusch, S and Mannino, S. *Trends Food Sci. Technol.* **2009**, 20, 237.
75. Lin, T. C.; Gupta, N.; Talalayev, A. *J. Mater. Sci.* **2009**, 44, 1520.
76. Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.; Costa, T. D.; Bassani, V.; Muller, C. R. Processo de secagem de suspensões coloidais de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas por aspersão. BR 09906081-7. 1999.
77. Broadhead, J.; Rouan, S. K. E.; Rhodes, C. T. *Develop. Ind. Pharm.* **1992**, 18, 1169.
78. Wan, L. S. C.; Heng, P. W. S.; Chia, C. G. H. *Drug Develop. Ind. Pharm.* **1992**, 18, 997.
79. Freitas, C.; Müller, R.H. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, 46, 145.
80. Weiss, V. Dissertação. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2001.
81. Müller, C. R. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2003.

82. Alves, G. P.; Santana, M. H. A. *Powder Technology*, **2004**, 145, 139.
83. Beck, R. C. R.; Hass, S. E.; Guterres, S.S.; Re, M. I.; Benvenuti, E. V.; Pohlmann, A. R. *Quím. Nova*, **2006**, 29, 990.
84. O'Connor, K. M.; Corrigan, O. I. *Int. J. Pharm.* **2001**, 226, 163.
85. Kourounakis, P. N.; Tsiakitzis, K.; Kourounakis, A. P.; Galanakis, D. *Toxicology*, **2000**, 144, 205.
86. Lin, S. Z.; Wouessidjewe, D.; Poelman, M.-C.; Duchêne, D. *Int. J. Pharm.* **1994**, 106, 63.
87. González-Rodríguez, M. L.; Maestrelli, F.; Mura, P.; Rabasco, A. M. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, 20, 125.
88. Schaffazick S. R.; Pohlmann, A. R.; Dalla-Costa, T.; Guterres, S. S. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2003b**, 56, 501.
89. Giovanelli, L.; Bellomi, S.; Pattarino, F.; Albertini, B. *Int. J. Pharm.* **2005**, 293, 225.
90. Maia, J. L.; Santana, M. H. A.; Re, M. I. *Braz. J. Chem. Eng.* **2004**, 21, 1.
91. Rosca, I. D.; Watarib, F.; Uo, M. *J. Control. Rel.* **2004**, 99, 271.
92. Mandal, T. K.; Bostanian, L. A.; Graves, R. A.; Chapman, S. R.; Idodo, T. U. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2001**, 52, 91.
93. Martin, A.; Bustamante, P.; Chun, A. H. C. *Physical Pharmacy*. Philadelphia: Lea and Febiger, **1993**.
94. Jeong, J.-C.; Lee, J.; Cho, K. *J. Control. Rel.* **2003**, 92, 249.
95. Beck, R. C. R.; Pohlmann, A. R.; Benvenuti, E. V.; Dalla Costa, T.; Guterres, S. S. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, 16, 1233.
96. Beck, R. C. R.; Lionzo, M. I. Z.; Costa, T. M. H.; Benvenuti, E. V.; Re, M. I.; Gallas, M. R.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. *Braz. J. Chem. Eng.* **2008**, 25, 389.

ANEXO 1

Espectros de absorção na região do infravermelho dos componentes dos microaglomerados (pastilha de KBr).

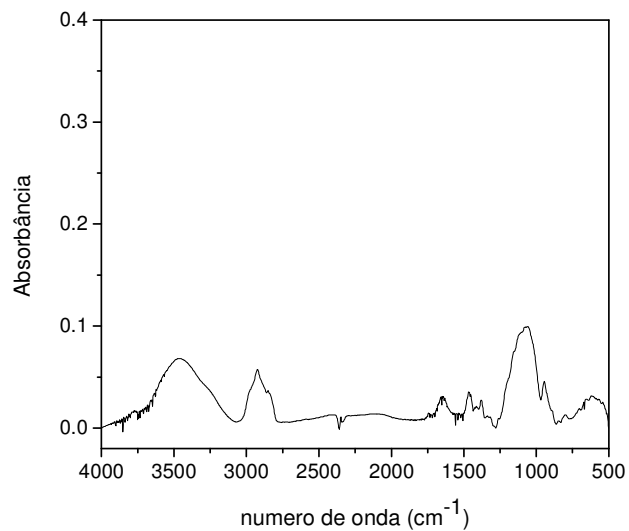


Figura 58. Espectro de absorção na região do infravermelho do HPMC.

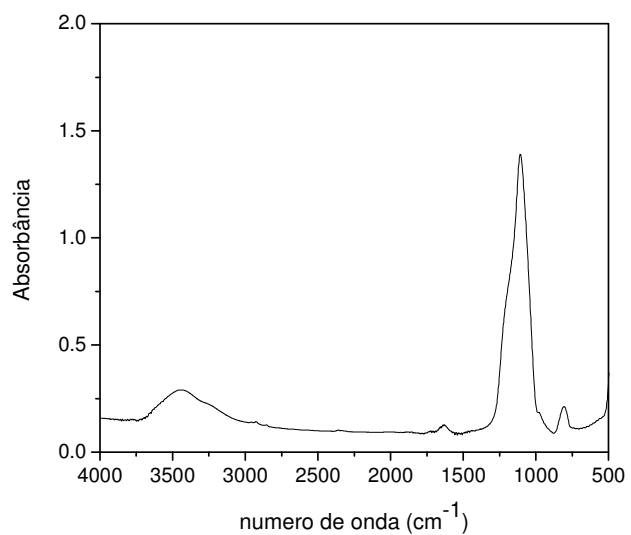


Figura 59. Espectro de absorção na região do infravermelho do Aerosil 200[®].

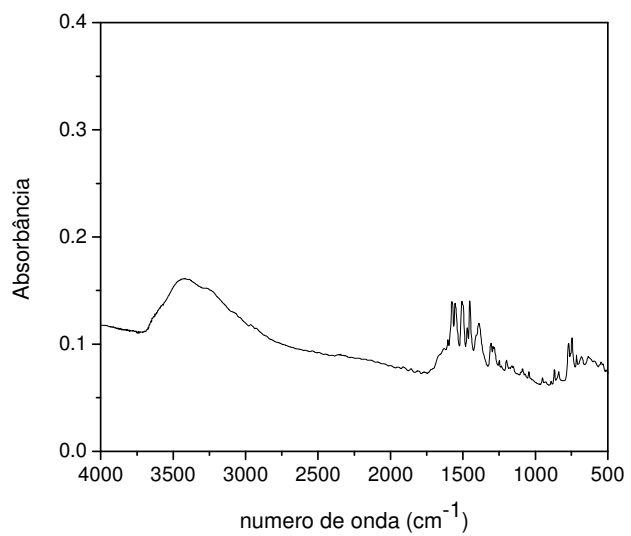


Figura 60. Espectro de absorção na região do infravermelho do DicONa.

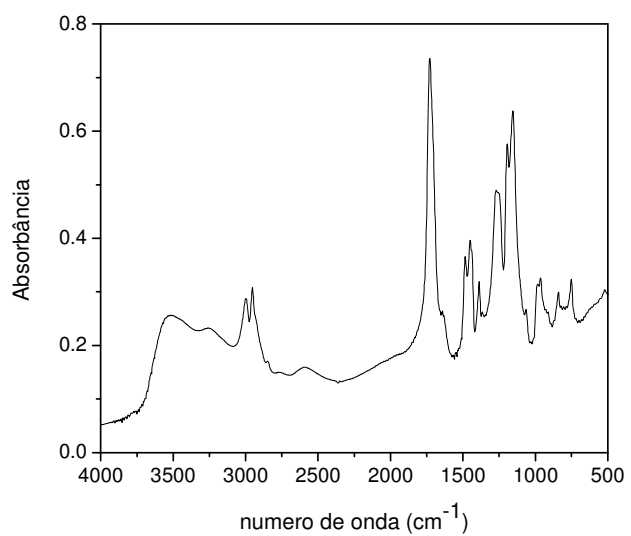


Figura 61. Espectro de absorção na região do infravermelho do Eudragit S100[®].

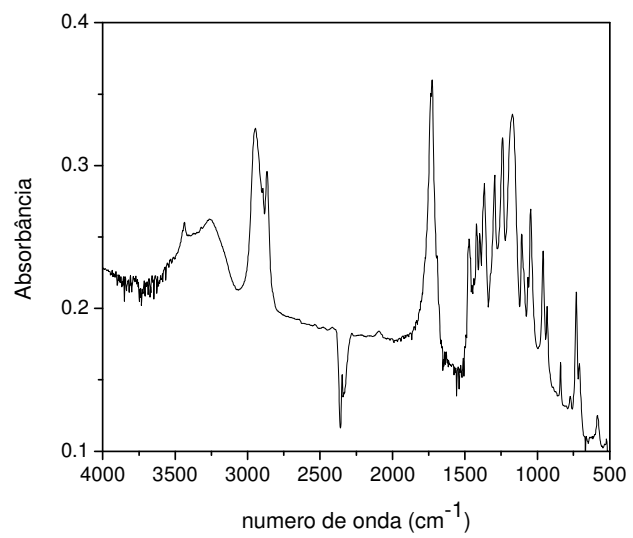


Figura 62. Espectro de absorção na região do infravermelho da PCL.