



MARCELO DE SOUSA

**PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS NLS
PARA LIBERAÇÃO MODIFICADA/PROLONGADA DE FÁRMACOS
ANTIRETROVIRAIS (NEVIRAPINA, SAQUINAVIR E EFAVIRENZ)**

CAMPINAS

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

MARCELO DE SOUSA

**PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS NLS
PARA LIBERAÇÃO MODIFICADA/PROLONGADA DE FÁRMACOS
ANTIRETROVIRAIS (NEVIRAPINA, SAQUINAVIR E EFAVIRENZ)**

ORIENTADOR: PROF. DR. Francisco Benedito Teixeira Pessine

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR MARCELO DE SOUSA, E ORIENTADA PELO PROF.DR. FRANCISCO BENEDITO TEIXEIRA PESSINE.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2013

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR ANTONIO ANASTACIO - CRB8/7942 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

So85p Sousa, Marcelo de (1980-).
Preparação de nanopartículas lipídicas sólidas NLS para liberação modificada/prolongada de fármacos antiretrovirais (Nevirapina, Saquinavir e Efavirenz) / Marcelo de Sousa. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Francisco Benedito Teixeira Pessine.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Nanopartículas lipídicas sólidas. 2. Carregadores lipídicos nanoestruturados. 3. HIV. 4. *AIDS*. 5. Macrófagos. I. Pessine, Francisco Benedito Teixeira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Preparation of solid lipid nanoparticles SLN to prolonged/modified release of antiviral drugs (Nevirapine, Saquinavir, Efavirenz)

Palavras-chave em inglês:

Solid lipid nanoparticles
Nanostructured lipid carriers
HIV
AIDS
Mannose
Macrophages

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Francisco Benedito Teixeira Pessine [Orientador]
Ieda Spacino Scarminio
João Barros Valim
Roy Edward Bruns
Eneida de Paula

Data de defesa: 22/05/2013

Programa de pós-graduação: Química

"Não sou um computador como os outros querem pensar. Botvinnik disse uma vez que calculo melhor que os demais, que sou uma máquina, um homem prodígio e também fui uma criança prodígio. Aqui não há prodígio algum. Sou meramente um homem, mas um homem extraordinário. Estudo e aprendo cada dia mais e mais, um dia hão de ser meus o carro mais caro e a casa mais bonita. Na América não há ninguém que possa comparar-se comigo. Fui campeão nacional 7 vezes o que começa a ser fatigante. Aos 14 anos fui campeão nacional, com 16 "grande mestre", com 27 anos sou o melhor do mundo e com 28 serei declarado oficialmente campeão mundial. Meu objetivo é que ninguém no planeta saiba "mexer as peças" melhor do que eu!"

Robert James (Bobby) Fischer, 1971.

AGRADECIMENTOS

- * Aos meus familiares que me apoiaram em minha formação.
- * Ao Prof. Francisco B. T. Pessine pela orientação concedida no desenvolvimento do trabalho.
- * Ao grupo de pesquisa: Millene, Ana Claudia, Andreza, Letícia, Daniele, Adriana, Guilherme, Luciana, pelas discussões e aprendizado em conjunto.
- * Aos colegas de república Haroldo, Thiago, Diego, Jucélio, Renato, Pedro, Leandro, e aos demais colegas pela vivência que tivemos.
- * Ao Prof. Nelson E. D. Caballero que permitiu a utilização do aparelho de Espalhamento de Luz Dinâmico para as medidas das nanopartículas.
- * Aos funcionários dos Laboratórios de HPLC, UVVis, RMN, Infravermelho, Espectrometria de Massas, Análise Térmica, Microscopia Eletrônica de Varredura e raio-X, que deram grande colaboração nas caracterizações das nanopartículas.
- * Aos funcionários do IQ que auxiliaram no desenvolvimento dos trabalhos.
- * A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas com Nível Superior), pelo auxílio de bolsa concedida. Ao CBAN pelo auxílio concedido no curso de nanotecnologia.

CURRICULUM VITAE

Dados pessoais

Nome: Marcelo de Sousa

Data de Nascimento: 07/12/1980

Naturalidade: Apucarana - PR

Formação Acadêmica

Graduação

Curso: Química.

Modalidade: Licenciatura em Química.

Local: Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina -PR.

Período: Março de 2001 à Junho de 2005.

Pós-Graduação

Curso: Mestrado em Química.

Modalidade: Físico-Química.

Local: Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas-SP.

Período: Agosto de 2005 à Outubro de 2008.

Curso: Doutorado em Ciências

Modalidade: Físico-Química

Local: Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas-SP.

Período: Março de 2009 à Maio de 2013.

Atividades Acadêmicas

1. Estágio no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) entre Maio de 2003 à abril de 2005.
2. Programa Estágio Docente nas atividade da disciplina QF431-Físico-Química I, com dedicação de 8 horas semanais (Fevereiro de 2008 - Julho de 2008).
3. Programa Estágio Docente na disciplina QF632-Laboratório de Físico-Química Experimental I, com dedicação de 8 horas semanais (Agosto de 2010-Dezembro de 2010).
4. Nanotecnologia Terapêutica, coordenada pela Prof Sílvia Stanisçuaski Guterres, no período de 05 à 09 de dezembro de 2011 na cidade de Porto Alegre/RS, totalizando 30horas/aula.

Congressos

1. SOUSA, M. ; HASE, Y. . Correção de anarmonicidade do trans-ácido fórmico. In: XIV Simpósio Brasileiro de Química Teórica (SBQT), 2007, Poços de Caldas. XIV Simpósio Brasileirode Química Teórica (SBQT), 2007.
2. SOUSA, M. ; HASE, Y. . Análise de Coordenada normais do dímero do ácido fórmico utilizando um campo de força CCSD. In: XIV Simpósio Brasileiro de Química Teórica (SBQT), 2007, Poços de Caldas. XIV Simpósio Brasileirode Química Teórica (SBQT), 2007.
3. SOUSA, M. ; HASE, Y. . Análise de Coordenadas normais do trans-ácido fórmico. In: 30º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia.
4. SOUSA, M. ; PESSINE, F.B.T. . Nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com Desferal (mesilato de deferoxamina), In: 33º Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia.
5. SOUSA, M.; PESSINE, F.B.T.Produção de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NPLSS) para liberação prolongada de fármacos antirretrovirais para o tratamento da AIDS.
6. **3º Encontro sobre Estruturas Auto-Organizadas em Soluções e Interfaces – AutoOrg 2012** realizado na cidade de São Pedro SP, no período de 11 a 13 de abril de 2012.

Resumo

PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (NPLS) PARA LIBERAÇÃO MODIFICADA/PROLONGADA DE FÁRMACOS ANTIRETROVIRAIS (NEVIRAPINA, SAQUINAVIR E EFAVIRENZ). Nos dias atuais não há cura e nem vacina para as pessoas portadoras de HIV. A erradicação do vírus não é possível porque a maioria está depositado em órgãos que são de difícil acesso aos fármacos antirretrovirais. Uma alternativa seria direcionar os fármacos à estes órgãos por intermédio de nanocarreadores. Os fármacos utilizados neste trabalho foram a Nevirapina, o Saquinavir e o Efavirenz e o nanocarregador foi as Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS). As NLS foram produzidas utilizando ácido esteárico, ácido mirístico e Compritol 888 ATO como matrizes dos nanocarreadores, brometo de cetiltrimetilamônio, Lipoid-S75 e Tween 80 como surfatantes e n-butanol como co-surfatante. A formulação otimizada foi obtida através de um planejamento experimental 2^3 com ponto central utilizando os surfatantes como variáveis. A molécula direcionadora adicionada na superfície das nanopartículas foi a d-manose, a qual estava ligada na octadecilamina. Este açúcar foi escolhido por que é receptor dos macrófagos/monócitos. A estratégia é que estas células capturem os nanocarreadores carregados com fármacos antirretrovirais e os enviem aos órgãos depósitos de HIV. Estas NLS foram caracterizados pelas técnicas de espalhamento dinâmico de luz, potencial Zeta, Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Difractometria de raios-X e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), além dos estudos de liberação *in vitro*.

Palavras Chave: NLS, Nevirapina, Saquinavir, Efavirenz, HIV, planejamento experimental, d-manose.

Abstract

PREPARATION OF SOLID LIPID NANOPARTICLES (SLN) TO PROLONGED/MODIFIED RELEASE OF ANTIVIRAL DRUGS (NEVIRAPINE, SAQUINAVIR AND EFAVIRENZ). Nowadays there is neither cure nor vaccine for people living with HIV. However, virus eradication is not possible because most are deposited in organs that are difficult access to antiretroviral drugs. An alternative would be to target the drugs to these organs via nanocarriers. The drugs used in this work were Nevirapine, Saquinavir and Efavirenz and the nanocarriers were Solid Lipid Nanoparticles (SLN). The SLN were produced using stearic acid, myristic acid and Compritol 888 ATO as matrix of nanocarriers, cetyltrimethyl ammonium bromide, Lipoid-S75 and Tween 80 as surfactants and n-butanol as co-surfactant. The optimized formulation was obtained through an 2^3 experimental design with central point using surfactants as variable. The target molecule added in the nanocarriers surface was d-mannose, which was linked in the octadecylamine. This sugar was chosen because it is receptor of macrophages/monocytes. The strategy is that these cells capture the nanocarriers loaded antiretroviral drugs and it send deposit organs of HIV. These SLN were characterized by techniques dynamic light scattering (DLS), zeta Potential, Differential Scanning Calorimetry (DSC), X-ray diffraction and Scanning Electron Microscopy (MEV), beyond of *in vitro* released studies.

Keywords: : SLN, Nevirapine, Saquinavir, Efavirenz, HIV, planning design, d-mannose.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.....	xxi
Lista de Tabelas.....	xxv
Lista de Figuras.....	xxvii
1. Introdução.....	1
1.1. Ciclo de replicação do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e progressão para a Síndrome da Imunodeficiência Humana (AIDS).....	1
1.2. Fármacos antirretrovirais, Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (TARAA) e problemas para erradicar a AIDS.....	8
1.3. Proposta atual: aplicação de nanotecnologia ao tratamento do HIV/AIDS.....	12
1.4. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS).....	15
1.5. Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas dos fármacos Efavirenz (EFV), Saquinavir (SQV) e Nevirapina (NVP).....	21
1.5.1. Efavirenz (EFV).....	21
1.5.2. Saquinavir (SQV).....	22
1.5.3. Nevirapina (NVP).....	23
1.6. Planejamento Experimental.....	24
1.7. Estabilidade das NLS.....	26
1.7.1. Estabilidade termodinâmica das dispersões coloidais.....	26
1.7.2. Estabilidade cinética das dispersões coloidais.....	28
1.7.2.1. Forças elétricas de repulsão (dupla camada elétrica).....	29
1.7.2.2. Forças de atração (forças de London-van der Waals).....	31

1.7.2.3. Estabilidade das dispersões coloidais: forças de atração de London-van der Waals e forças elétricas de repulsão.....	33
1.7.2.4. Potencial Zeta (ζ).....	35
1.8. Modelos matemáticos para liberação de fármacos encapsulados em carreadores.....	38
1.8.1. Cinética de ordem zero.....	38
1.8.2. Cinética de primeira ordem.....	38
1.8.3. Modelo de Higuchi.....	39
1.8.4. Modelo de Peppas-Korsmeyer.....	39
1.8.5. Modelo de Baker-Lonsdale.....	40
2. Objetivos.....	41
2.1. Geral.....	41
2.2. Específicos.....	41
3. Materiais e Métodos.....	42
3.1. Reagentes, materiais e instrumentos.....	42
3.2. Produção de NLS e NLS-manosiladas pelo método de microemulsão O/A...	42
3.3. Quantificação dos fármacos nas NLS por HPLC.....	43
3.4. Reação de d-manose com octadecilamina produzindo octadecilamina manosilada.....	45
3.5. Estudo de liberação <i>in vitro</i> (Diálise).....	47
3.6. Caracterização das NLS e NLS-manosiladas.....	48

3.6.1. Determinação da distribuição de tamanho das partículas e Índice de Polidispersidade (PDI) das NLS e das NLS-manosiladas.....	48
3.6.2. Determinação do potencial Zeta das NLS e das NLS-manosiladas.....	48
3.6.3. Determinação da cristalinidade das amostras contendo NLS e NLS-manosiladas.....	48
3.6.4. Estudo da morfologia mediante Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	49
3.7. Caracterização da octadecilamina manosilada.....	49
3.7.1. Espectro de massas da octadecilamina manosilada.....	49
3.7.2. Espectros de RMN-N15 e C13 de d-manose, octadecilamina e octadecilamina manosilada sólidas.....	49
3.7.3. Análise elementar CHN da octadecilamina e octadecilamina manosilada..	50
3.7.4. Espectros no infravermelho (IV) de d-manose, octadecilamina e octadecilamina manosilada.....	50
4. Resultados e Discussão.....	51
4.1. Espectros, no UV-Vis, de EFV, SQV e NVP.....	51
4.2. Curvas de calibração por HPLC-UV-Vis, para EFV, SQV e NVP.....	53
4.3. Caracterização de octadecilamina manosilada.....	55
4.3.1. Obtenção dos espectros de massas.....	55
4.3.2. Análise elementar CHNO.....	57
4.3.3. Espectros de RMN-N15 para octadecilamina e octadecilamina manosilada.....	58
4.3.4. Espectros de RMN-C13 de d-manose, octadecilamina e octadecilamina manosilada.....	60

4.3.5. Espectros no IV de d-manose, octadecilamina e octadecilamina manossilada.....	62
4.4. Produção de NLS utilizando planejamento fatorial 2^3 com ponto central.....	63
4.5. Irregularidades no potencial Zeta: tensão interfacial, estabilidade estérica e força de repulsão coulômbica.....	69
4.6. Comprovação da ligação de octadecilamina manossilada às NLS.....	71
4.7. Aplicação da formulação desenvolvida para Nevirapina (NVP), Saquinavir (SQV) e Efavirenz (EFV).....	73
4.7.1. Diâmetro, Índice de Polidispersidade (PDI) e Potencial Zeta das NLS.....	73
4.7.2. Diâmetro, Índice de Polidispersidade e Potencial Zeta das NLS manossiladas.....	77
4.7.3. Eficiência de Encapsulação.....	82
4.7.4. Diálise.....	84
4.7.5. Aplicação de modelos matemáticos para liberação de EFV, SQV e NVP...	88
4.7.6. Difratomia de raios-X.....	91
4.7.7. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	93
4.7.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	99
5. Conclusões.....	103
6. Referências.....	105
7. Anexos.....	119
7.1 Gráficos de DLS dos diâmetros e potenciais Zeta das NPLS/CLN para as formulações desenvolvidas.....	119

LISTA DE ABREVIações

AE	ácido esteárico
AIDS	Síndrome da Imundo Deficiência Adquirida
AM	ácido mirístico
A/O	emulsão água em óleo
Avert	AIDS Education and Research Trust
AZT	zidovudina
BHC	Barreira hematoencefálica
CDs	células dendríticas
CDFs	células dendríticas foliculares
CLN	Carregadores Lipídicos Nanoestruturados
COM	Compritol 888 ATO
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
ddC	zalcitabina
ddl	didanosina
DLV	delavirdine
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
d4T	Estavudina
EE%	Eficiência de encapsulamento
EFV	Efavirenz
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IDV	Indinavir
IF	Inibidores de Fusão
II	Inibidores da Integrase

IMs	Inibidores de maturação
IN	Integrase viral
IP	Inibidores da Protease
ITRNs	Inibidores Nucleosídicos da Transcriptase Reversa
ITRNNs	Inibidores Não-Nucleosídicos da Transcriptase Reversa
ITRNTs	Inibidores Nucleotídicos da Transcriptase Reversa
ITV	Indinavir
IV	Infravermelho
LEC	Lipoid S75 ou lecitina de soja
MVC	Maraviroc
M/M	Monócitos/Macrófagos
NPLS	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
NVP	Nevirapina
O/A	emulsão óleo em água
OMS	Organização Mundial de Saúde
PMEA	Adefovir
PMPA	Tenovir
PR	Protease viral
RAL	Raltegravir
RTV	Ritonavir
TARAA	Terapia Antirretroviral Altamente Ativa
T-20	Efuvirtide
T20	Polisorbato 20 ou Tween 20
T80	Polisorbato 80 ou Tween 80
SQV	Saquinavir

TR

Transcriptase reversa

UNAIDS

Joint United Nations Program on HIV/AIDS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagens em massas, previstas pela fórmula molecular e análise elementar CHN para octadecilamina manosilada.....	57
Tabela 2. Porcentagens em massas, previstas pela fórmula molecular e análise elementar CHN para a octadecilamina, em duplicata.....	57
Tabela 3. Massas dos surfatantes (g) relativas aos níveis do planejamento fatorial 2^3 com ponto central.....	64
Tabela 4. Diâmetro médio (nm), Potencial Zeta (mV) e Índice de Polidispersidade (PDI) obtidos com o planejamento experimental 2^3 com ponto central.....	64
Tabela 5. Efeitos no diâmetro.....	65
Tabela 6. Massas (g) dos surfatantes correspondentes aos 4 deslocamentos em relação à do ponto central.....	67
Tabela 7. Diâmetro (nm), Potencial Zeta (mV) e PDI relativos aos 4 deslocamentos no planejamento experimental.....	67
Tabela 8. Composição percentual das formulações lipídicas.....	73
Tabela 9. Diâmetro (nm), PDI e potencial Zeta (mV) das formulações de NLS com EFV, SQV e NPV, monitoradas durante um mês, em temperatura ambiente.....	74
Tabela 10. Composição percentual, em massa, das formulações contendo NLS manosiladas.....	78
Tabela 11. Diâmetro (nm), PDI e potencial Zeta (mV) das formulações com NLS manosiladas contendo EFV, SQV e NPV, monitoradas durante seis meses em temperatura ambiente.....	78
Tabela 12. Eficiência de Encapsulação de EFV, SQV e NVP.....	82
Tabela 13: Ajuste dos modelos matemáticos aos perfis de liberação <i>in vitro</i> para as formulações de 80%AE/20%COM-manosiladas.....	88

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Curso da infecção global por HIV entre 1990 e 2009 (Avert, 2010).....	1
Fig. 2. Curso da infecção por HIV no Brasil entre 1990 e 2007 (OMS, 2011).....	2
Fig. 3. Ciclo de infecção do HIV (Janeway, 2005).....	3
Fig. 4. Ilustração simplificada do HIV com as glicoproteínas GP120 e GP41; RNAs virais; enzimas <i>protease</i> , <i>transcriptase reversa</i> e <i>integrase</i> (Janeway, 2005).....	6
Fig. 5. Esquema do HIV liberando RNA em célula CD4 através das glicoproteínas GP120 e GP41 atacando a superfície celular e co-receptores CXR4 e CCR5R (Gunaseelan, 2010).....	7
Fig. 6. Esquema da replicação viral. 1) Ataque e fusão do vírus; 2) Transcrição reversa; 3) Integração; 4) Transcrição; 5) Translação; 6) Germinação e maturação viral (Sierra, 2005).....	8
Fig. 7. Cintilografia gama de coelhos após 2 h da injeção. A) d4T livre; B) lipossomas; C) lipossomas galactosilados; após 24h da injeção D) d4T livre; E) lipossomas; F) lipossomas galactosilados. K representa os rins; L o fígado; S baço; U bexiga (Garg, 2008).....	14
Fig. 8. Estrutura molecular do EFV.....	21
Fig. 9. Estrutura molecular do SQV.....	22
Fig. 10. Estrutura molecular da NVP.....	23
Fig. 11. Representação da a) Dupla camada elétrica; b) Diferença de potencial na superfície.....	30
Fig. 12. Diagrama de energia potencial entre duas partículas.....	33
Fig. 13. Esquema da dupla camada elétrica e plano de cisalhamento onde o potencial Zeta é medido.....	36
Fig. 14. Interações eletrostáticas entre partículas.....	37
Fig. 15. Esquema do procedimento para produção de NPLS.....	43
Fig. 16. Esquema do dispositivo experimental usado na ultracentrifugação.....	44
Fig. 17. Centrifugação para limpar as membranas.....	44

Fig. 18. Aparato utilizado na reação entre octadecilamina e d-manose.....	46
Fig. 19. Esquema do dispositivo utilizado para diálise.....	47
Fig. 20. Espectros no UV-Vis. a) EFV; b) SQV; c) NVP.....	52
Fig. 21. Cromatogramas usados para obter as curvas de calibração. a) EFV; b) SQV; c) NVP.....	54
Fig. 22. Reação entre d-manose e octadecilamina.....	55
Fig. 23. Espectro de massas de octadecilamina manosilada após lavar com água e etanol.....	56
Fig. 24. Espectro de RMN-N15 de octadecilamina sólida.....	59
Fig. 25. Espectro de RMN-N15 de octadecilamina manosilada sólida.....	59
Fig. 26. Espectro de RMN-C13 de d-manose sólida.....	60
Fig. 27. Espectro de RMN-C13 de octadecilamina sólida.....	61
Fig. 28. Espectro de RMN-C13 de octadecilamina manosilada sólida.....	61
Fig. 29. Espectro no IV de octadecilamina manosilada; d-manose; octadecilamina.....	62
Fig. 30. Representação do planejamento experimental 2^3 com ponto central, deslocamentos realizados, níveis e diâmetros das NLS.....	69
Fig. 31. Potencial Zeta. a) 50%AE/50%AM+EFV; b) 60%AE/40%COM+SQV.....	70
Fig. 32. Espectro de massas da amostra contendo octadecilamina manosilada: sinal em 432 indica octadecilamina-manosilada.....	72
Fig. 33. Gráficos de: a) diâmetro e b) potencial Zeta da formulação.....	75
Fig. 34. Gráficos de: a) diâmetro e b) potencial Zeta da formulação 100%AE+NVP.....	76
Fig. 35. Gráficos de: a) diâmetro; b) potencial Zeta das NLS na formulação 80%AE/20%COM+EFV.....	80
Fig. 36. Gráficos de: a) diâmetro; b) potencial Zeta das NLS na formulação 80%AE/20%COM+SQV.....	81
Fig. 37. Perfis de liberação de EFV: 100%AE; 50%AE/50%AM; 80%AE/20%COM manosilada e 40%AE/40%AM20%COM manosilada.....	85

Fig. 38. Perfis de liberação das formulações contendo SQV: 100%AE; 50%AE/50%AM; 60%AE/40%COM; 80%AE/20%COM manossiladas; 40%AE/40%AM/20% COM manossilada; 60%AE/40%COM manossilada.....	86
Fig. 39. Perfis de liberação das formulações 100%AM; 60%AE/40%COM; 80%AM/40%COM manossilada e 60%AE/40%COM manossilada contendo NVP.....	87
Fig. 40. Perfil de liberação de EFV na formulação 80%AE/20%COM-manossilada, ajustado ao modelo de Peppas-Korsmeyer.....	89
Fig. 41. Perfil de liberação de SQV na formulação 80%AE/20%COM manossilada, ajustado ao modelo de Peppas-Korsmeyer.....	90
Fig. 42. Perfil de liberação de NVP na formulação 80%AE/20%%COM manossilada, ajustado ao modelo de Higuchi.....	91
Fig. 43. Difrátogramas de raios X dos lipídios puros e NLS sem manose: a) AE; b) COM; c) AM; d) 100%AE EFV; e) 50%AE/50%AM EFV; f) 100%AE SQV; g) 50%AE/50%AM SQV; h) 60%AE/40%COM SQV; i) 100%AE NVP; j) 60%AE/40%COM NVP.....	92
Fig. 44. Difrátogramas de raios X dos lipídios puros e NLS manossiladas: a) AE; b) COM; c) AM; d) 80%AE/20%COM EFV; e) 40%AE/40%AM/20%COM EFV; f) 80%AE/20%COM SQV; g) 40%AE/40%AM/20%COM SQV; h) 60%AE/40%COM SQV; i) 80%AE/20%COM NVP; j) 60%AE/40%COM NVP.....	93
Fig. 45. Curvas calorimétricas: a) AE; b) COM; c) AM.....	94
Fig. 46. Curvas calorimétricas: a) 100%AE EFV sem manose; b) 50%AE/50%AM EFV sem manose; c) 80%AE/20%COM EFV manossilada; d) 40%AE/40%AM/20%COM EFV manossilada.....	95
Fig. 47. Curvas calorimétricas: a) 100%AE SQV sem manose; b) 50%AE/50%AM SQV sem manose; c) 60%AE/40%COM SQV sem manose; d) 80%AE/20%COM SQV manossilada; e) 40%AE/40%AM/20%COM SQV manossilada; f) 60%AE/40%COM SQV manossilada.....	96
Fig. 48. Curvas calorimétricas: a) 100%AE NVP sem manose; b) 60%AE/40%COM NVP sem manose; c) 80%AE/20%COM NVP manossilada; d) 60%AE/40%COM NVP manossilada.....	97
Fig. 49. Curvas calorimétricas: a) Lecitina (Lipoid S75); b) CTAB.....	98

Fig. 50. Micrografias das formulações com EFV: a) 100%AE; b) 50%AE/50%AM; c) 80%AE/20%COM manosilada; d) 40%AE/40%AM/20%COM manosilada..... 100

Fig. 51. Micrografias das formulações com SQV: a) 100%AE; b) 50%AE/50%AM; c) 60%AE/40%COM; d) 80%AE/20%COM manosilada; e) 40%AE/40%AM/20%COM manosilada; f) 60%AE/40%COM manosilada..... 101

Fig. 52 . Micrografias das formulações com NVP: a) 100%AE; b) 60%AE/40%COM; c) 80%AE/20%COM manosilada; e) 60%AE/40%COM manosilada..... 102

1. Introdução

1.1. Ciclo de replicação do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e progressão para a Síndrome da Imunodeficiência Humana (AIDS)

Os primeiros casos documentados sobre a infecção com HIV e os problemas relacionados à AIDS ocorreram por volta de 1981 (Gottlieb, 1981; Masur 1981). Porém, de acordo com as fontes, os sintomas desta doença já haviam se manifestados anteriormente. Após mais de 30 anos e apesar dos grandes investimentos em pesquisas, ainda não há cura ou vacina para esta infecção, tornando o combate à AIDS um dos maiores desafios já enfrentados pelos profissionais da área da saúde. No começo da década de 90 o número de pessoas infectadas com HIV era de aproximadamente 8 milhões. Até o ano de 2011 a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2011) estima que aproximadamente 34 milhões de pessoas estivessem infectadas com HIV e desde o começo da infecção, ocorreram por volta de 20 milhões de mortes. O grande aumento no número de pessoas infectadas ocorreu na década de 90 e em um ritmo menos acelerado entre os anos 2000 e 2005. Nos últimos anos o crescimento total da epidemia parece estabilizado. O número de mortes por AIDS também tem diminuído devido ao uso de tratamentos antirretrovirais. A Fig. 1 apresenta o progresso da infecção mundial entre 1990 e 2009 (Avert, 2010).

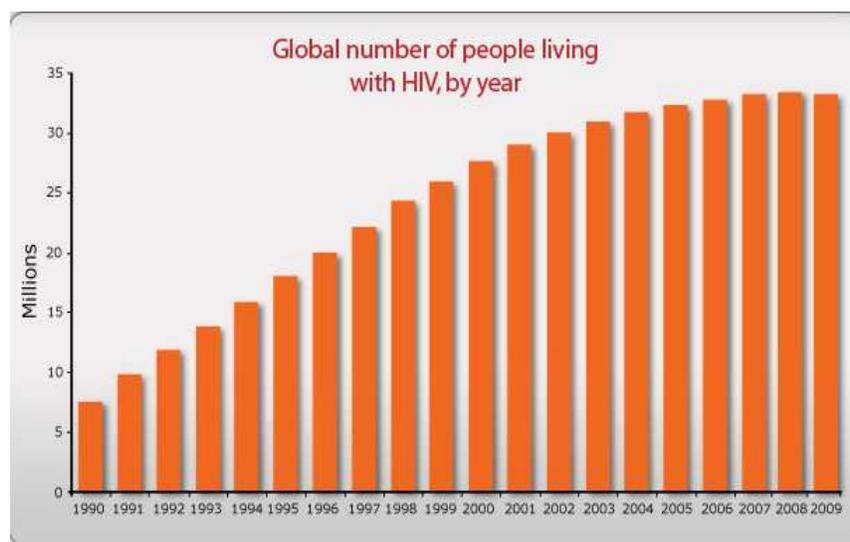


Fig. 1. Curso da infecção global por HIV entre 1990 e 2009 (Avert, 2010).

Atualmente os países mais afetados por esta doença são os do continente africano; onde o número de pessoas infectadas na África Subsaariana é próximo de 22,9 milhões (Avert, 2010). Na África do Sul a contaminação é estimada em 18% da população (UNAIDS, 2011). No Brasil foi estimado em 1990 que o número de portadores de HIV era por volta de 300 mil pessoas aumentando para 730 mil em 2007. Assim como a tendência mundial, no Brasil o ritmo do crescimento da epidemia tem reduzido e mesmo havendo novas infecções, o número de pessoas que vem sendo infectadas é bem menor. A Fig.2 mostra o curso da infecção no Brasil neste período (OMS, 2011). Muitas campanhas de prevenção foram e estão sendo realizadas por órgãos governamentais, OMS e UNAIDS (Joint United Nations Program on HIV/AIDS) na tentativa de reduzir a transmissão e contaminação por HIV.

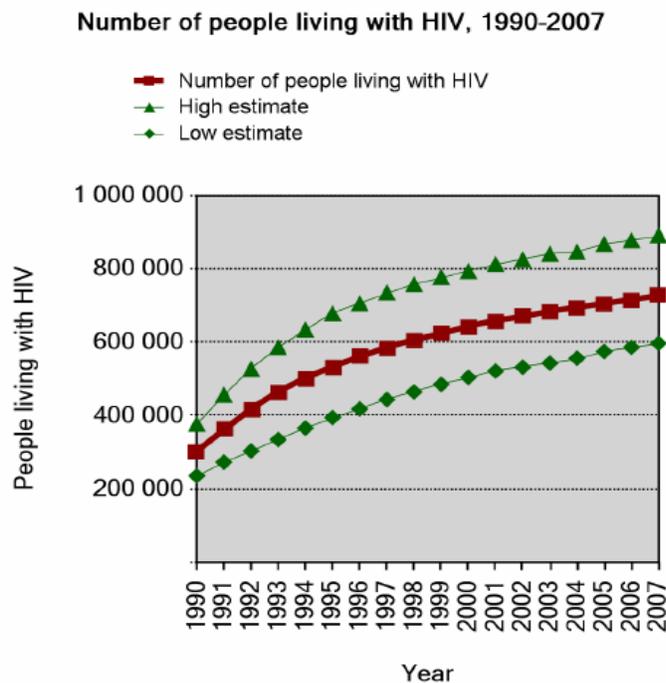


Fig. 2. Curso da infecção por HIV no Brasil entre 1990 e 2007 (OMS, 2011).

A contaminação ocorre pelo contato com fluidos orgânicos que pode ser no ato sexual, utilização de drogas ilícitas injetáveis, transfusões de sangue e de mãe para filho no parto. HIV tem capacidade de seletivamente infectar e incapacitar o sistema imune. A imunossupressão induzida por HIV leva o portador a desenvolver a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), causada pela redução da defesa imunológica do

hospedeiro, tornando o organismo altamente suscetível a infecções oportunistas. Existem dois tipos conhecidos deste vírus: HIV-I e HIV-II e ambos parecem ter sido transmitidos a partir de outras espécies de primatas (Fauci, 1988; Harman, 2003; Janeway, 2005; Gupta, 2010) . HIV-I é muito virulento e a causa da maioria de infectados. Provavelmente foi transmitido a partir do chimpanzé *Pan troglodytes* que abriga o vírus da imunodeficiência símia SIVcpz. Esta infecção pode ter ocorrido em três ocasiões distintas porque o vírus apresenta três grupos distintos com notável variabilidade genética e são classificados de acordo com a sequência viral como M (principal), O (outlier) e N (nem M, nem O) (Janeway, 2005). HIV-II possui quase 40% de identidade genética com HIV-I, é menos virulento, sendo mais comum em países da África Subsaariana e mais incomum no resto do planeta. Provavelmente foi transmitido pelo macaco *Cercocebus atys* natural do Senegal e Gana.

A imunossupressão é causada por que o HIV infecta as células de defesa T CD4+. Conforme a doença vai evoluindo o número destas células vai se reduzindo, tornando o corpo altamente suscetível a infecções oportunistas. A evolução desta doença pode variar muito devido à variação genética tanto no vírus como no hospedeiro. Conseqüentemente, isto pode alterar a taxa de progressão da doença, sendo mais rápida em alguns casos e mais lenta em outros. O curso típico desta infecção, desde a contaminação até a evolução para AIDS, está ilustrado na Fig. 3 (Janeway, 2005).

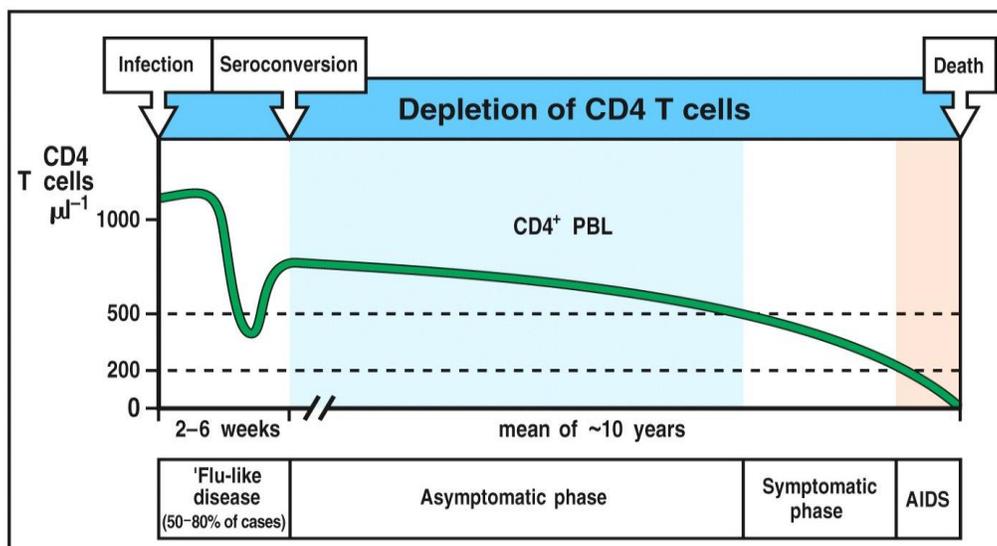


Fig. 3. Ciclo de infecção do HIV (Janeway, 2005).

O número de contagens de células T CD4+ em uma pessoa normal é por volta de 1200 células por microlitro de sangue (cel/ μ L). Nas primeiras semanas em que ocorre a infecção o número destas células cai a um nível inferior à 500 cel/ μ L e o organismo fica suscetível a infecções oportunistas. Neste estágio ocorre uma doença aguda como a gripe, algumas vezes chamada de soroconversão, com alta quantidade de vírus no sangue. Segue-se a resposta imune que controla a doença e restaura os níveis de células T CD4+ a uma quantidade próxima de 800 cel/ μ L, porém não erradica o vírus. Nesta fase, conhecida como fase assintomática, as infecções oportunistas cessam por causa da restauração da imunidade e o portador tem vida normal. A manifestação dos sintomas da doença pode ser rápida ou demorar vários anos. Devido a esta fase assintomática muitos portadores do HIV não sabem que estão contaminados e convivem com o vírus por muito tempo. Em muitos casos quando descobrem que são portadores de HIV a doença já está em estágio muito avançado. As infecções oportunistas e outros sintomas tornam-se mais frequentes a medida que a contagem das células T CD4+ volta a cair, começando em 500 cel/ μ L na fase conhecida como sintomática. Logo a contagem das células T CD4+ chega a um nível inferior a 200 cel/ μ L e diz-se que o paciente está com AIDS (Janeway, 2005).

Além de infectar os linfócitos T CD4+ HIV infecta os monócitos/macrófagos (M/M), células dendríticas (CDs) e células dendríticas foliculares (CDFs) porque expressam em suas superfícies o receptor CD4, essencial para que ocorra o ataque do HIV. Por intermédio destas células são infectados os tecidos linfóides secundários, rins, fígado, baço, pulmões, além do sistema nervoso central (atravessando a barreira hematoencefálica (BHC)), trato genital masculino e trato intestinal, tornando estes locais os principais reservatórios de vírus (Blankson, 2002; Hogan, 2002; Pomerantz, 2002; Gunasselan, 2010; Gupta, 2010; Bol, 2011)). Quase 99% da replicação viral ocorre nas células T CD4+ ativadas dos tecidos linfáticos e da circulação sanguínea. Os tecidos linfáticos tem a maior extensão da infecção porque abrigam a grande maioria destes linfócitos. Somente por volta de 2% destas células estão em circulação sanguínea periférica (Blankson, 2002; Pomerantz, 2002; Gunaseelan, 2010). Estes linfócitos carregam os vírus para todo o corpo, deslocando-os da circulação sanguínea para os tecidos/órgãos ou no sentido contrário. Embora haja relatos de que a replicação e o desenvolvimento do HIV possam ocorrer nos M/M, isto se dá em proporção menor que

nas células T CD4+ (Henderson, 1997; Aquaro, 2002; Fulcher, 2004). Diferente das células T CD4+, M/M são resistentes aos efeitos citopáticos do HIV, de modo que podem sobreviver por longos períodos quando infectados, tornando-se reservatórios dos vírus. Também podem ser infectados pela fusão com os linfócitos T CD4+ e migrar para diversas regiões do corpo. Por estas razões os M/M exercem papel crítico na propagação e persistência do HIV. CDFs são incapazes de produzir partículas virais através da replicação. Entretanto, são muito importantes na armazenagem viral e contribuem para a expansão da infecção do HIV para as células T. As células T CD4+ no estado latente ou em repouso também se comportam como potentes reservatórios virais porque, neste estado, estas células estão inativas e não desempenham suas funções vitais. Se estiverem infectadas, quando ativadas ao invés de desempenhar suas funções realizam a síntese proteica viral. Embora exista um número pequeno destas células no organismo, o principal problema é que sua sobrevivência média pode estender-se por meses ou anos. Com base nas atuais estratégias de tratamento com antirretrovirais seriam necessários mais de 100 anos para erradicar estas células infectadas e ter controle completo da replicação viral (Davey, 1999).

HIV é constituído das glicoproteínas essenciais GP120 e GP41 expressas na sua superfície, capsídeo, núcleo capsídeo, dois RNAs genômicos, *protease viral* (PR), *transcriptase reversa* (TR), *integrase* (IN) e alguns fatores celulares (Hardaman, 2003; Janeway, 2005; Sierra, 2005), Fig. 4. Na realidade cada vírus contém muitas moléculas destas enzimas.

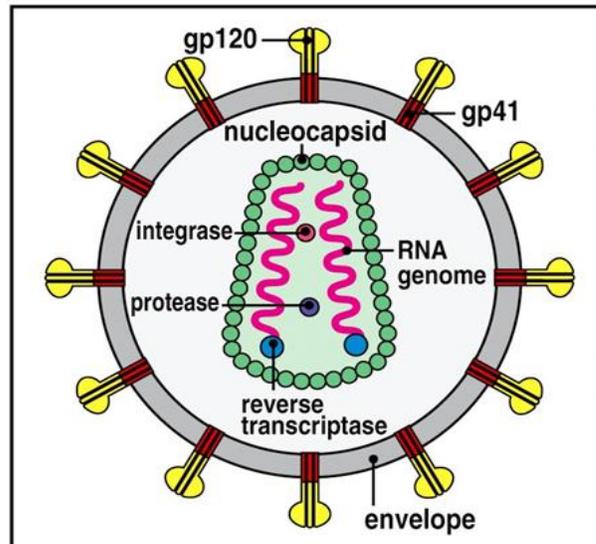


Fig. 4. Ilustração simplificada do HIV com as glicoproteínas GP120 e GP41; RNAs virais; enzimas *protease*, *transcriptase reversa* e *integrase* (Janeway, 2005).

A infecção por HIV só é possível porque a glicoproteína GP120 carregada positivamente possui grande afinidade pela molécula CD4 expressa nas células T CD4+, M/M e células dendríticas. Os macrófagos ainda podem ser infectados pela fagocitose ou mesmo ao se fundir com as células T CD4+ infectadas. Uma vez que o vírus esteja ligado à superfície celular esta mesma glicoproteína se liga aos co-receptores quimiocínicos celulares. Os dois co-receptores de quimiocinas principais são o CCR5, expresso predominantemente em células dendríticas, macrófagos e células T CD4+, e o CXCR4, expresso em células T ativadas. Isto faz com que o vírus fique muito próximo da superfície celular e em conformação adequada para que ocorra ligação com a glicoproteína viral GP41. Em sequência, ocorre fusão entre membrana celular e o capsídeo viral fazendo com que o vírus libere seu material genético no citoplasma celular, Fig. 5 (Gunaseelan, 2010).

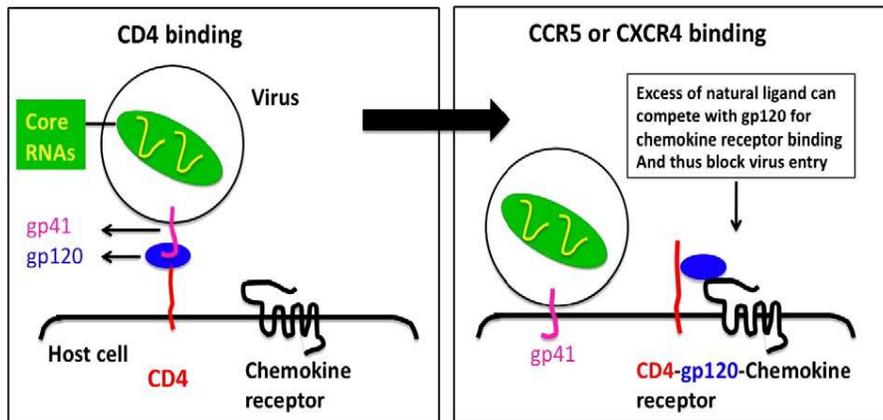


Fig. 5. Esquema do HIV liberando RNA em célula CD4 através das glicoproteínas GP120 e GP41 atacando a superfície celular e co-receptores CXR4 e CCR5R (Gunaseelan, 2010).

HIV é um retrovírus, pois a partir do RNA viral é produzido o DNA viral. Ele compartilha com os outros retrovírus três genes principais: *gag*, *pol* e *env*. O gene *gag* codifica as proteínas estruturais do núcleo viral, o *pol* codifica as enzimas envolvidas na replicação e na integração do vírus e o *env* codifica as glicoproteínas do envelope. Após a liberação do material genético a enzima TR faz a transcrição reversa deste RNA viral para uma fita dupla complementar de DNA no citoplasma celular, Fig. 6 (Sierra, 2005). Através dos poros nucleares este DNA penetra no núcleo da célula e pela enzima IN é incorporado ao DNA do hospedeiro. A cópia deste DNA integrado é conhecido como provírus. Em células T CD4+ ativadas o DNA viral faz a transcrição do RNA e a tradução de proteínas virais. Os RNA e proteínas virais transcritas se movem para a superfície da célula e ficam incorporados nos novos vírus formados. Estes vírus, no entanto, seriam ineficazes se não fosse à ação da PR, uma terceira enzima que processa as proteínas virais em proteínas e enzimas estruturais funcionais (Blankson, 2002; Sierra, 2005; Gunaseelan, 2010; Gupta, 2010).

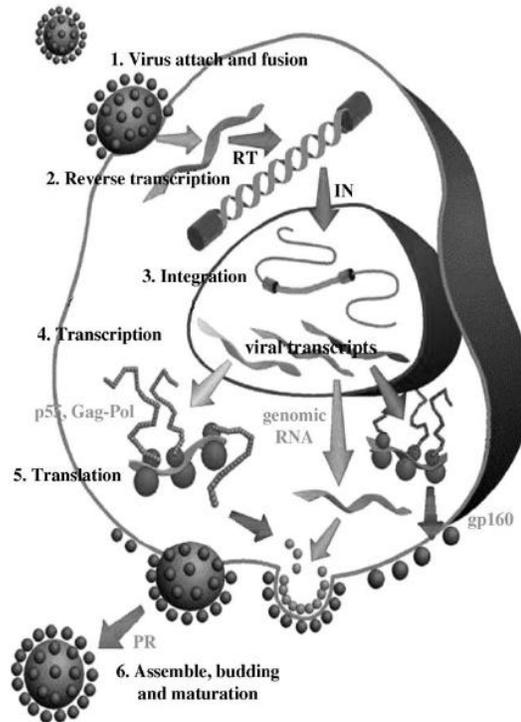


Fig. 6. Esquema da replicação viral. 1) Ataque e fusão do vírus; 2) Transcrição reversa; 3) Integração; 4) Transcrição; 5) Tradução; 6) Germinação e maturação viral (Sierra, 2005).

1.2. Fármacos antirretrovirais, Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (TARAA) e problemas para erradicar a AIDS

Atualmente não existe vacina contra HIV e nem cura para AIDS. No entanto, existem fármacos antirretrovirais que ajudam a controlar a viremia, evitando a rápida progressão para AIDS e prolongando o tempo de vida das pessoas infectadas. Estes fármacos foram desenvolvidos com base em estudos que descrevem o ciclo de vida do HIV. O principal objetivo destes fármacos é inibir a viremia, competindo com os substratos de enzimas essenciais no processo de replicação expressas exclusivamente pelo vírus e não pelo genoma humano, evitando ao máximo a toxicidade. Com redução da viremia a imunidade do hospedeiro é restaurada (aumento do número de células T CD4+), minimizando as infecções oportunistas e aumentando o tempo de vida do paciente. Estes fármacos são classificados de acordo com a fase da replicação em que atuam e são

definidos como Inibidores Nucleosídicos da Transcriptase Reversa (ITRNs), Inibidores Não-Nucleosídicos da Transcriptase Reversa (ITRNNs), Inibidores Nucleotídicos da Transcriptase Reversa (ITRNTs), Inibidores de Protease (IP), Inibidores de Fusão (IF), Inibidores de Integrase (II) e antagonistas do receptor CCR5 (Gupta, 2010; Gunaseelan, 2010; Sierra-Aragón, 2012; Hardman, 2003; FDA, 2012; Gulick, 2003). Existe também uma nova classe de fármacos, ainda não aprovada para comercialização, que são os inibidores de maturação (IM) (Sierra-Aragón, 2012).

ITRNs estão entre os primeiros agentes que foram utilizados no tratamento do HIV/AIDS e inibem a enzima transcriptase reversa, responsável pela conversão do RNA a DNA viral. Como atuam em uma etapa inicial e essencial da replicação do HIV, estes fármacos impedem a infecção aguda das células suscetíveis, mas exercem pouco efeito sobre as células já infectadas. Todos os fármacos desta classe são inibidores da enzima transcriptase reversa. Para serem ativos necessitam primeiro passar por três etapas de fosforilação, por enzimas presentes no citoplasma do hospedeiro. Se as etapas desta fase não ocorrerem estes fármacos serão inativos contra o HIV. ITRNs necessitam do grupo 3'-hidroxila que, quando incorporados ao DNA do vírus, interrompem o alongamento da cadeia. Alguns ITRNs aprovados são zidovudina (AZT), didanosina (ddI) e zalcitabina (ddC). Analogamente, os ITRNNs inibem a transcriptase reversa, mas não requerem ativação celular (fosforilação). Esses fármacos não atuam diretamente no DNA viral, mas bloqueiam a atividade da transcriptase reversa por meio de sua ligação adjacente ao sítio ativo da enzima, induzindo alterações na conformação da enzima. Mostram-se ativos apenas contra HIV-1, mas não contra HIV-2. Três ITRNNs atualmente disponíveis são Nevirapina (NVP), Delavirdine (DLV) e Efavirenz (EFV). Os ITRNTs desempenham as mesmas funções que os ITRNs, com a diferença que já são monofosforilados. Eles necessitam apenas de duas etapas de fosforilação para serem convertidos em trifosfatos ativos que atuam como terminadores de cadeia do DNA. Tenovir (PMPA) e adefovir (PMEA) são agentes desta categoria. A protease do HIV é outra enzima essencial para a infectividade do vírus e cliva a poliproteína viral (gal-pol) em enzimas virais ativas (transcriptase reversa, protease e integrase) e proteínas estruturais (p17, p24, p9 e p7). Os fármacos do tipo IPs são análogos de substratos de ligação altamente específica e atuam através de ligação reversível com o sítio ativo da protease do HIV. Esta ligação

impede a clivagem da protease do polipeptídeo precursor viral e bloqueia a maturação subsequente do vírus tal que as partículas virais produzidas fiquem ineficazes. Células incubadas na presença de inibidores da protease do HIV geram partículas virais que são imaturas e não-infecciosas. Como atuam em uma fase posterior da infecção os IPs não impedem que as células saudáveis sejam infectadas se houver vírus no meio circulante. São potentes fármacos antirretrovirais e vem sendo utilizados com muito sucesso na terapia antirretroviral. Alguns IPs conhecidos são Saquinavir (SQV), Ritonavir (RTV) e Indinavir (IDV). Os IFs atuam nas regiões helicoidais HR1 e HR2 da glicoproteína GP41 responsável pela fusão entre as membranas celulares e virais. Fármacos desta classe impossibilita que o vírus libere seu material genético no citoplasma. Enfuvirtide (T-20) pertence a esta categoria e é um análogo de HR2 o qual se liga na sequência HR1 e inibe a fusão. É ativo contra HIV-1 mas não contra HIV-2. Outros IFs, como TRI-1144 e Sifuvirtide, estão em desenvolvimento. Os II ligam-se ao sítio ativo da enzima integrase e bloqueiam sua atividade. O DNA viral não pode ser inserido no genoma do hospedeiro e é envolvido por enzimas de reparo celular, anulando a replicação viral irreversivelmente (Hazuda, 2000). O Raltegravir (RAL) é o único inibidor desta classe licenciado atualmente, com potente atividade contra HIV-1 e HIV-2. Os antagonistas do receptor CCR5 interagem com o co-receptor do hospedeiro e alteram sua estrutura, dificultando o reconhecimento e ligação à glicoproteína GP120. Eles são efetivos somente contra vírus R5 que utilizam o receptor CCR5 no ataque celular, mas não apresentam nenhum efeito contra os vírus X4 que utilizam o receptor CXCR4 para esta ligação. Foi verificado que a alteração no receptor CCR5 não conduz a grandes efeitos adversos na célula, e este receptor parece dispensável para a atividade celular imune *in vivo*. O primeiro inibidor desta classe é o Maraviroc (MVC) (Perry, 2010). IMs interferem na maturação do HIV. São fármacos que atuam nos estágios finais do processamento das proteínas Gag do HIV ou inibem as interações das proteínas capsídicas requeridas para a condensação. Diferente dos IPs, os IMs se ligam à proteína Gag e não à protease. Isto conduz à formação de vírus não-infecciosos incapazes de infectar outras células. Um fármaco desta classe, ainda não aprovado pela FDA e EMEA, é o Bevirimat (Nguyen, 2011), inativo contra HIV-2.

Os fármacos antirretrovirais podem reduzir a viremia e aumentar a contagem das células T CD4+ até níveis normais. No entanto, quando são utilizados no regime de

monoquimioterapia o vírus rapidamente se torna resistente. Isto ocorre porque uma vez que infectam as células de defesa e o processo de replicação se inicia, ocorrem mutações porque a replicação do genoma retroviral depende de duas etapas, sujeitas a erros. Uma é aquela desempenhada pela transcriptase reversa, que não possui mecanismos de reparo associados à DNA polimerase. Assim, o RNA do retrovírus é copiado em DNA com fidelidade relativamente baixa. Outra etapa é a transcrição do DNA proviral em cópias de RNA pela RNA polimerase, que também é de baixa fidelidade. Através das rápidas etapas de replicação repetidas pela qual o vírus passa durante a infecção, ele pode acumular muitas mutações e numerosas variantes do HIV surgem. Como consequência de sua alta variabilidade, os fármacos antirretrovirais e o sistema de defesa não conseguem reconhecer e eliminar todos os mutantes formados que, por sua vez, irão infectar as células de defesa, diminuindo muito o número de linfócitos T CD4+. Em função destas dificuldades a atual estratégia terapêutica envolve a combinação de agentes antirretrovirais de, no mínimo, duas classes diferentes, a chamada Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (TARAA). Atualmente esta terapia consiste em três diferentes tipos de regimes, baseados nas combinações de ITRNN (um ITRNN e dois ITRNs), combinações de PIs (um ou dois PIs e dois NRTIs) ou combinações triplas de NRTIs. Com o desenvolvimento de novas classes de fármacos antirretrovirais que atacam outros sítios de replicação é provável que os regimes do TARAA serão ampliados para novas combinações. Como resultado deste regime, a carga viral pode ficar abaixo do limite de detecção e a vida média dos pacientes com HIV/AIDS pode aumentar em vários anos (United States Pharmacopeia, 2000; Gupta, 2010; Hardman, 2001; Merck, 2001; Blankson, 2002). No entanto, mesmo utilizando esta estratégia terapêutica, o vírus do HIV adquire resistência ao longo do tratamento, devido a novas mutações e por residir em reservatórios anatômicos, conduzindo a resultados clínicos pobres. Quando isto ocorre o que se faz é alterar os fármacos antirretrovirais utilizados no regime do TARAA. Os chamados reservatórios anatômicos (sistema linfático, baço, pulmões, fígado e órgãos genitais) armazenam grande quantidade de vírus e são de difícil acesso a fármacos antirretrovirais, impedindo que a concentração mínima efetiva destes seja mantida por tempo necessário. Muitos fármacos antirretrovirais apresentam baixa biodisponibilidade oral, possivelmente devido ao metabolismo e a degradação gastrointestinal. O tempo de

meia vida para vários fármacos anti HIV é curto, exigindo altas e frequentes dosagens de administração, causando complicações ao paciente. Estes fármacos também tem propriedades físico-químicas desfavoráveis, como baixa solubilidade, o que pode conduzir a problemas no desenvolvimento de formulações. O conjunto das dificuldades relacionadas às mutações, armazenamento dos vírus nos reservatórios anatômicos/celulares e o desempenho limitado dos fármacos utilizados na terapia antirretroviral impede que a doença seja erradicada e o paciente fique curado (Blankson, 2002). Com o desenvolvimento de novos fármacos e o conhecimento que vem sendo adquirido ao longo dos anos sobre o comportamento do HIV no organismo humano, é possível que esta doença venha a se tornar crônica, visto o sucesso da TARAA em aumentar a expectativa de vida das pessoas infectadas (Sierra-Aragón, 2012).

1.3. Proposta atual: aplicação de nanotecnologia ao tratamento do HIV/AIDS

Recentemente tem se tornado mais evidente que o desenvolvimento de novos fármacos não é suficiente para assegurar o progresso terapêutico. Ótimos resultados experimentais obtidos *in vitro* foram frequentemente seguidos por resultados desapontadores *in vivo*. As principais razões para a falha na terapia incluem: concentrações insuficientes do fármaco *in loco* devido à pobre absorção, rápido metabolismo e eliminação; distribuição dos fármacos em tecidos não alvos combinada com alta toxicidade; baixa solubilidade dos fármacos, o que exclui administração intravenosa em soluções aquosas quando necessário; altas flutuações de níveis plasmáticos devido à biodisponibilidade imprevisível após administração oral, etc. Devido a estes problemas a pesquisa médica tem sugerido a liberação modificada de fármacos como solução viável para tratamento de doenças como desordens cardiovasculares, câncer, AIDS, etc. Esta estratégia objetiva assegurar melhor distribuição de agentes terapêuticos nos sítios alvos (ou parte do corpo afetado) e reduzir a distribuição nos sítios não-alvos do corpo. Como solução para este problema a nanotecnologia está ganhando grande destaque e é o foco das pesquisas terapêuticas atuais. Aplicações no diagnóstico, prevenção, tratamento de doenças e melhor entendimento de doenças complexas são os principais focos da tecnologia em nanoescala. O tipo e características físico-químicas do

carregador dependem da rota de administração desejada, sendo que o tamanho desses varia de poucos nanômetros (carregadores coloidais) a alguns micra (micropartículas) e ou mesmo milímetros (implantes). Para administração parenteral é altamente desejável o uso de materiais biocompatíveis e biodegradáveis, o que evita procedimentos cirúrgicos para remover implantes após a completa liberação do fármaco, tornando plausível a administração de micro- e nanopartículas. O tamanho nanométrico de carregadores permite eficiente passagem através de barreiras biológicas, aperfeiçoamento em tolerância tecidual, melhoria no transporte e absorção celulares, tornando possível a entrega eficiente de agentes terapêuticos a alvos como fígado, cérebro e tumores (Wong, 2012; Gupta 2006; Covreur, 2006; Lockman, 2002; Parboosing, 2012). Nanocarregadores podem ser fabricados para proteger moléculas de fármacos e, preferencialmente, direcioná-las para alvos anatômicos e celulares. A razão em utilizar nanocarregadores é que o padrão de distribuição deve ser ditado pelas propriedades do nanocarregador e não dos fármacos utilizados, o que permite liberação prolongada e localizada, de acordo com as necessidades específicas da terapia. Concentrações mais elevadas de fármacos antirretrovirais e tempo de residência expandido nas células alvo podem reduzir a carga viral. Existem vários tipos de carregadores nanoparticulados que podem ser usados na liberação de fármacos anti HIV/AIDS. Geralmente estes nanocarregadores são feitos com cargas superficiais positivas para aumentar a interação com as células, que possuem cargas superficiais negativas. No caso dos carregadores poliméricos podem ser citados nanoconjugados (Gunaseelan, 2004), nanopartículas poliméricas (Shah, 2006) e dendrímeros (Dutta, 2007). No caso dos nanocarregadores não-poliméricos podem ser citados lipossomas (Garg, 2006), entossomas (Jain, 2007), nanopartículas lipídicas sólidas (Kuo, 2009), carregadores lipídicos nanoestruturados (Kuo, 2011a) e nanoemulsões (Vyas, 2008). A estratégia para enviar os nanocarregadores aos órgãos depósitos de HIV é realizado por intermédio dos macrófagos, os quais tem capacidade de alcançar diversos órgãos e regiões do corpo que são potenciais depósitos de HIV. Para isto, os nanocarregadores são revestidos com moléculas que se ligam a receptores de macrófagos, o que facilita a captura por estas células. Três exemplos de receptores de macrófagos são o receptor de formil peptídeo que pode se ligar à molécula de N-formil metionil-leucil-fenilalanina, o receptor de galactose e o receptor de manose (Taylor, 2005).

Os macrófagos também possuem receptores para albumina do soro humano, como descrito por Schäfer (Schäfer, 1992). Neste trabalho foram produzidas nanopartículas poliméricas revestidas com albumina do soro humano e ficou evidente que os macrófagos as capturam. De fato, exemplos na literatura (Fig. 7, Garg et al, 2008), comprovam que lipossomas galactosilados conseguem eficientemente se concentrar nos órgãos. Este resultado abre grande perspectiva para utilizar açúcares, como galactose e manose, na superfície de nanocarregadores com finalidade de direcioná-los aos órgãos depósitos de HIV.

Nesta Tese utilizamos como carregadores Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS). A seguir comparamos as vantagens e desvantagens das NLS com outros sistemas nanocarregadores, enfatizando aspectos como os métodos de produção, toxicidade, problemas de estabilidade, custo de produção, possibilidade de produção em larga escala, etc.

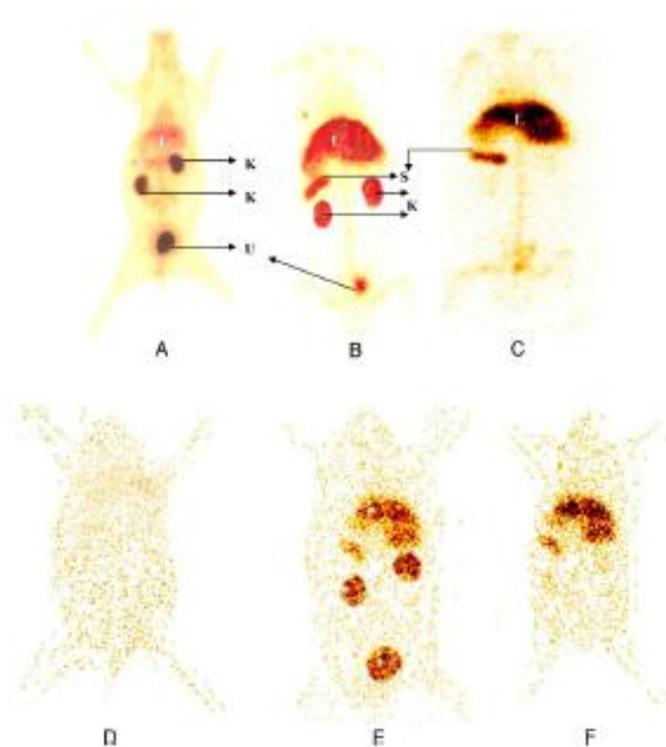


Fig. 7. Cintilografia gama de coelhos após 2 h da injeção. A) d4T livre; B) lipossomas; C) lipossomas galactosilados; após 24h da injeção D) d4T livre; E) lipossomas; F) lipossomas galactosilados. K representa os rins; L o fígado; S baço; U bexiga (Garg, 2008).

1.4. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)

A existência de diferentes tipos de carregadores coloidais suscita a questão de qual deles pode ser mais adequado para um dado propósito. A resposta para esta questão não é simples e aspectos a serem considerados incluem capacidade de carregamento de fármacos, possibilidade de direcionamento dos fármacos, rota de administração, destino *in vivo* do carregador, toxicidade aguda e crônica, metabolismo/depuração/excreção, facilidade de produção em escala industrial, estabilidade química e física durante a armazenagem e custos de produção.

Polímeros de fontes naturais (Scheffel, 1970; Müller, 1996) e sintéticas (Allémann, 1993) tem sido utilizados para produção de sistemas carregadores. Nanocarregadores poliméricos incluem conjugados de fármacos-polímeros solúveis em água (Vicent, 2007), nanocápsulas (Huertas, 2010) e nanoesferas (Carino, 2000). A principal vantagem destes sistemas é a possibilidade de incluir modificações químicas nos polímeros, incluindo a síntese de polímeros em blocos e combinações poliméricas. Já os problemas do uso destes sistemas para aplicação clínica em geral provem dos resíduos de solventes orgânicos usados na produção, toxicidade dos polímeros (Kumari, 2010) e dificuldade de produção em larga escala. Em vários processos de produção a concentração das nanopartículas é baixa e não excede 2%. Além disso, a hidrólise dos polímeros pode ocorrer durante armazenagem e liofilização é frequentemente requerida para evitar a degradação.

Dentre os carregadores não poliméricos destacam-se lipossomas que são vesículas esféricas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas, geralmente formadas por fosfatidilcolina ou outro fosfolípido, com ou sem colesterol. Fármacos lipofílicos podem ser incorporados na bicamada lipídica enquanto fármacos hidrofílicos são solubilizados no interior aquoso das vesículas (Lian, 2001; Kluza, 2011). A liberação do fármaco, estabilidade e biodistribuição são determinados pelo tamanho, carga superficial, hidrofobicidade da superfície e fluidez da membrana lipossomal. A permeabilidade através da membrana pode ser ajustada pela seleção do fosfolípido e incorporação de aditivos (como o colesterol) (Yeagle, 1985). É possível evitar a rápida absorção dos lipossomas por células do retículo endotelial incorporando compostos naturais (gangliosídeos) ou

usando polietileno glicóis modificados quimicamente (Hatakeyama, 2004; Moghimi, 2006). Lipossomas são apropriados à injeção intravenosa de fármacos lipofílicos, com solubilidade muito baixa. A toxicidade dos lipossomas é muito baixa comparada com carregadores como nanopartículas poliméricas e micelas. A estabilidade química e física pode conduzir os lipossomas à agregação e a degradação dos fármacos neles encapsulados durante a armazenagem, comprometendo sua performance como carregador de fármacos. Outro problema relacionado aos lipossomas é o custo de produção relativamente elevado.

Nanoemulsões lipídicas, desenvolvidas para fins de nutrição parenteral, são constituídas de óleos vegetais (como o de soja) ou triglicerídeos de cadeia média e estabilizados com fosfolípidios (Davis, 1987; Ammar, 2009). O glicerol, quando utilizado nessas emulsões regula a osmolaridade. Utilizando estes nanocarregadores alguns fármacos apresentaram perfil de liberação rápido. A possibilidade de liberação prolongada de nanoemulsões é limitada, devido ao pequeno tamanho e estado líquido do carregador. Para que a liberação seja prolongada deve-se utilizar fármacos muito lipofílicos. As vantagens destes carregadores incluem segurança toxicológica, alto conteúdo da fase lipídica e possibilidade de produção industrial em larga escala, por homogeneizadores de alta pressão (Qian, 2011).

A utilização de lipídios sólidos ao invés de óleos líquidos é uma idéia muito atrativa para o desenvolvimento de carregadores para liberação prolongada de fármacos. Isto se deve ao fato da mobilidade dos fármacos nos lipídios sólidos ser muito menor que nos líquidos, evitando liberação muito rápida dos fármacos. Neste contexto, Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) surgiram como sistemas carregadores alternativos aos carregadores lipídicos tradicionais, como emulsões, lipossomas e também às nanopartículas poliméricas (Müller, 2000; Mehnert e Mäder, 2001), devido ao fato das NLS combinarem vantagens e evitarem algumas desvantagens destes sistemas, como: processos de produção sem uso de solventes orgânicos, NLS são formadas por substâncias biocompatíveis/biodegradáveis, são obtidas a baixo custo, podem ser produzidas em larga escala, admitem incorporação de fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos, possibilitam liberação sustentada/prolongada, mantêm a estabilidade física e química dos fármacos e os protegem da biodegradação no sistema circulatório. NLS são produzidas a

partir de lipídios sólidos, emulsificantes e água. Geralmente o termo lipídio é utilizado em um sentido amplo para triglicerídeos, glicerídeos parciais, ácidos graxos e esteróides. Foi verificado que a combinação com emulsificantes evita de modo mais eficiente a aglomeração das nanopartículas. A clara vantagem das NLS é que as matrizes lipídicas são feitas de lipídios fisiologicamente compatíveis, o que diminui a toxicidade aguda e crônica. A escolha do emulsificante depende da rota de administração e é mais limitada para administrações parenterais. Vários métodos foram desenvolvidos para produção de NLS: homogeneização via alta velocidade e ultrassom (Mehnert, 2001), homogeneização sob alta pressão (Mühlen, 1998; You, 2007), microemulsões óleo/água (O/A) e água/óleo/água (A/O/A) (Morel et al, 1998) e evaporação por solventes (Zhang et al, 2006; Zhang et al, 2007). Algumas das desvantagens relatadas das NLS são: baixa capacidade de carregamento de fármacos, não ultrapassando 5% em relação à matriz lipídica; possível presença de estruturas paralelas (lipossomas, micelas, micelas mistas e nanocristais de fármacos) que diminuem a eficiência de encapsulação; problemas de estabilidade durante a armazenagem ou administração devido às transições polimórficas α , β e β' que, além de expulsar os fármacos, aumentam o tamanho das nanopartículas (Müller, 2000; Mehnert e Mäder, 2001).

As metodologias de homogeneização em alta velocidade e ultrassom são relativamente simples. Entretanto, a qualidade da dispersão é frequentemente comprometida pela presença de micropartículas. Além disto, no caso do uso de ultrassom, há possibilidade de contaminação com metais. Na homogeneização sob alta velocidade são utilizados cisalhadores como Ultra Turrax, que alcançam velocidades de rotação maiores que 25000 rpm. Este equipamento permite agitação de toda a dispersão, mediante passagem da amostra através de fendas do rotor-estator, formando as nanopartículas. Os lipídios e fármacos fundidos são dissolvidos em uma solução emulsificante 5 à 10°C acima do ponto de fusão do lipídio sólido e a amostra é submetida a altas velocidades, por determinado tempo (ex., 20000 rpm durante 8 min). Em seguida as NLS são submetidas à agitação com menor velocidade, à temperatura ambiente, por determinado tempo (ex., 5000 rpm durante 10min). Velocidades mais elevadas não mudam o tamanho das nanopartículas, mas podem diminuir a polidispersidade. Em muitos estudos foram obtidos tamanhos médios de partículas entre 100 e 200 nm (Hou, 2003).

A homogeneização sob alta pressão tem se destacado como a técnica mais confiável e poderosa para preparar NLS. Existem diferentes homogeneizadores em diferentes tamanhos, disponíveis comercialmente à preços razoáveis. A técnica tem despertado grande interesse porque é facilmente adaptável à produção em larga escala. Os homogeneizadores submetem uma pré-emulsão do fármaco, lipídios e surfatantes a alta pressão (100-2000 bar) através de uma fenda muito estreita. Os fluidos são acelerados, em uma distância muito curta, a alta velocidade. A alta força de cavitação rompe as partículas, fragmentando-as em escala nanométrica. Os conteúdos lipídicos estão na escala de 5-10% em relação à massa total das formulações. A homogeneização sob alta pressão pode ser realizada a frio ou a quente.

O passo inicial nestas duas técnicas é o mesmo e consiste em dissolver/dispersar o fármaco no lipídio fundido. Na homogeneização à quente (Dingler e Gohla, 2002; Hu, 2004; Martins, 2012; Noack, 2012), o próximo passo consiste em misturar o lipídio fundido com o fármaco, em uma solução contendo surfatante à quente, sob agitação feita com Ultra-Turrax, formando uma pré-emulsão. Esta é submetida à alta pressão no homogeneizador à temperatura pouco acima da temperatura de fusão do lipídio, formando inicialmente uma nanoemulsão O/A. Em geral, temperaturas altas resultam em tamanhos de partículas menores, devido à diminuição da viscosidade da fase interna. As NLS são formadas pelo esfriamento da nanoemulsão à temperatura ambiente ou abaixo desta. A homogeneização é realizada em ciclos, que podem ser repetidos varias vezes. Em muitos casos, 3-5 ciclos a 500-1500 bar são suficientes para obter NLS. Esta técnica tem a desvantagem de aumentar a taxa de degradação do fármaco e do sistema carregador por causa do tempo em que o sistema é submetido a altas temperaturas.

A técnica de homogeneização sob alta pressão a frio foi desenvolvida para reduzir a degradação do fármaco, induzida pela temperatura e distribuição do fármaco para a fase aquosa (Mühlen et al, 1998; Mehnert, 2001; You, 2007). Nesta técnica após dissolução do fármaco no lipídio fundido a dispersão é rapidamente esfriada em gelo seco ou nitrogênio líquido, favorecendo a distribuição homogênea do fármaco na matriz lipídica. Esta é moída, fornecendo micropartículas, as quais são dispersas em uma solução emulsificante formando uma pré-emulsão. O tamanho típico das partículas está entre 50 e 100 μm , quando moídas no moinho de bola. Sujeitando esta pré-emulsão a altas pressões são

formadas nanopartículas lipídicas. O controle e regulação da temperatura é necessário para assegurar o estado não fundido do lipídio durante a homogeneização. Quando estas nanopartículas são comparadas com as obtidas pela homogeneização à quente, foi observado que são maiores e possuem distribuição mais ampla de diâmetro. Esta técnica tem vantagem de não expor o fármaco a altas temperaturas por tempos prolongados, embora haja aquecimento no passo inicial. O maior interesse nesta técnica é a possibilidade de tornar possível o carregamento de fármacos hidrofílicos, pois o congelamento "prende" as moléculas do fármaco na matriz lipídica e o emulsificante contribui para reduzir o contato das nanopartículas com a água, estabilizando a dispersão. A produção de NLS pela técnica de microemulsão foi desenvolvida por Gasco e colaboradores (Gasco, 1993) e consiste basicamente na diluição de microemulsões. Microemulsões são sistemas de duas fases, uma interna e outra externa, como no caso de O/A. São produzidas pela agitação em temperaturas acima do ponto de fusão de lipídios, como ácidos graxos (como ácido esteárico) ou misturas destes com outros lipídios (como Compritol 888 ATO), surfatantes (como polisorbato 20, polisorbato 80, lecitina de soja), co-surfatantes (como n-butanol, ácido butírico) e água. A produção de NLS por microemulsão consiste na dispersão de microemulsões A/O ou A/O/A quentes, em água fria sob agitação (Kuo, 2011a). A técnica de microemulsões A/O geralmente é utilizada para fármacos hidrofóbicos, que possuem maior afinidade com a fase interna dos sistemas. Neste caso, o fármaco é fundido com o lipídio, sob agitação e a mistura é adicionada a uma solução com surfatante, à quente e sob agitação, formando microemulsão, que é adicionada lentamente a uma solução aquosa fria (1-2°C), também sob agitação, para formar NLS (Kuo, 2011b). A técnica de microemulsões A/O/A é aplicada para fármacos hidrofílicos (Morel et al, 1998; Cao, 2011): o fármaco é dissolvido em pequena quantidade de água e adicionado ao lipídio fundido junto com surfatantes, sob agitação, formando microemulsão A/O. Esta é adicionada à solução aquosa à quente, sob agitação, formando nova microemulsão A/O/A. As NLS são produzidas pela adição desta última microemulsão à uma solução aquosa, em baixa temperatura (1-2°C), sob agitação. O problema destes métodos é que a agitação pode expelir o fármaco do interior das NLS, reduzindo a eficiência de encapsulação. A razão de volume entre a microemulsão e a água fria deve estar entre 1:25 à 1:50, mas há trabalhos onde esta foi 1:10. De acordo com a literatura as gotas lipídicas já foram

formadas na microemulsão e nenhuma energia ou agitação em alta velocidade é requerida para as partículas alcançarem o tamanho nanométrico. Devido à diluição, o conteúdo lipídico alcançado é consideravelmente menor se comparado com as formulações obtidas mediante homogeneização sob alta pressão.

O método de evaporação de solvente consiste em dissolver o lipídio e o fármaco em um solvente orgânico, como acetona. Esta solução é então adicionada, lentamente, em outra contendo água e surfatantes, sob aquecimento ou à temperatura ambiente, sob agitação branda. Evaporando o solvente forma-se uma dispersão de nanopartículas, pela precipitação do lipídio no meio aquoso. O tamanho médio de partículas depende da concentração do lipídio na fase orgânica. Partículas muito pequenas são obtidas com baixa quantidade de lipídios em relação ao volume de solvente orgânico. Com aumento do conteúdo lipídico a eficiência da homogeneização diminui devido à maior viscosidade da fase dispersa. Esta técnica é muito eficiente para encapsular fármacos hidrofóbicos. A vantagem desta técnica em relação às demais é evitar o emprego de altas temperaturas. A clara desvantagem é o uso de solventes orgânicos (Zhang et al, 2006; Zhang et al, 2007; Delgado, 2012).

Dado às dificuldades enfrentadas por pacientes que dependem de tratamento antirretroviral e o surgimento das NLS revestidas com moléculas direcionadoras, tornou-se interessante tentar desenvolver uma metodologia com estes sistemas, que possibilite a encapsulação e garanta a liberação prolongada dos fármacos antirretrovirais nos sítios reservatórios do vírus. Os fármacos utilizados neste trabalho foram Nevirapina (NVP), Saquinavir (SQV) e Efavirenz (EFV) e a molécula direcionadora d-manose. Com esta, as NLS podem ser capturadas pelos macrófagos e enviadas aos órgãos depósitos de HIV, melhorando a eficiência terapêutica dos antirretrovirais. Este tipo de tratamento pode vir a substituir o TARAA, mas o principal objetivo do desenvolvimento é reduzir ao máximo a viremia e, se possível, alcançar um resultado quase impossível nos dias de hoje, que é a erradicação da carga viral. Este tipo de tratamento pode fazer com que o paciente leve vida normal, sem necessidade de tomar diariamente altas doses de coquetéis de fármacos antirretrovirais, reduzindo também a posologia. Altas doses e em elevada frequência de antirretrovirais são danosas e causam efeitos adversos como mal estar, fissuras na pele, diarreia, etc., comprometendo a qualidade de vida do paciente. Assim, os resultados deste

trabalho podem proporcionar avanços na área da saúde, em termos do tratamento da AIDS.

1.5. Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas dos fármacos Efavirenz (EFV), Saquinavir (SQV) e Nevirapina (NVP)

1.5.1. Efavirenz (EFV)

EFV, Fig. 8, é um ITRNNs tomado pela via oral em combinação com outros fármacos, que inibe a transcriptase reversa do HIV-1 tanto *in vitro* quanto *in vivo*, com IC₉₀ (concentração inibitória) entre 3 e 9nM (Young, 1995).

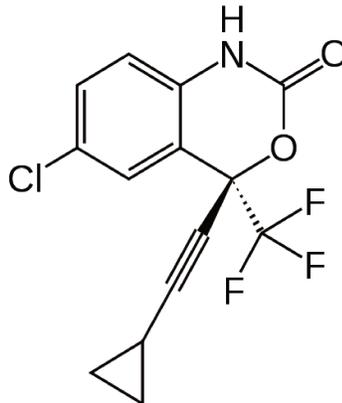


Fig. 8. Estrutura molecular do EFV.

Este fármaco difunde-se nas células e se liga a um local ativo da transcriptase reversa, produzindo alterações na configuração da enzima que inibe sua função. Quando administrado, é bem absorvido pelo trato gastrointestinal e atinge concentrações plasmáticas máximas em 3-4 h. A meia-vida longa do EFV, 40-55 h (DrugBank, EFV), permite administração de uma dose diária. EFV é metabolizado principalmente pelo citocromo P450, em particular a CYP3A4 e a CYP2B6. O metabólito 8-hidroxi é excretado na urina e o conjugado de 8-hidroxi-efavirenz é encontrado no plasma e urina. Ocorre excreção de 60% da dose na urina, em forma do conjugado glicuronídeo (Villani, 1999). Este fármaco possui solubilidade muito baixa em água, o que dificulta utilizá-lo em injeção

parenteral. O pKa deste fármaco é por volta de 10,2 (Kochansky, 2008). Este fármaco é muito solúvel em solventes orgânicos como etanol e metanol. Os efeitos colaterais comuns do EFV são cefaléia, tontura, sonhos anormais, comprometimento da concentração e exantema. Em relação à administração em conjunto, o efeito deste fármaco sobre as concentrações dos IP varia. No caso dos fármacos SQV, ITV e amprenavir os níveis são reduzidos, enquanto que nos RTV e nelfinavir os níveis são aumentados (Adkins, 1998).

1.5.2. Saquinavir (SQV)

SQV, Fig 9, é um potente inibidor da protease do HIV-1 e HIV-2 da classe hidroxi-etilamina, desenvolvido por planejamento farmacológico (Roberts, 1990).

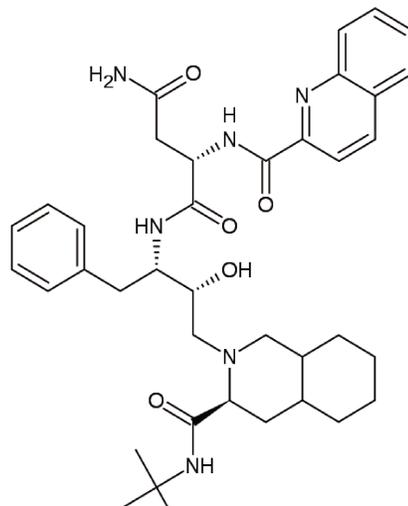


Fig. 9. Estrutura molecular do SQV.

Estes estudos foram realizados quando foi verificado que os locais clivados pela protease eucariótica eram similares aos locais clivados pela protease do HIV; assim, este fármaco foi sintetizado para imitar o estado de transição do local de clivagem da fenilalanina-prolina na proteína viral. Nos linfócitos e no sangue periférico, a IC₅₀ varia de 3,5 a 10,0nM (Craig, 1991). A protease do HIV cliva a poliproteína viral (gag-pol) em enzimas ativas e proteínas estruturais. O SQV liga-se reversivelmente ao local ativo da

enzima da protease do HIV, impedindo o processamento dos polipeptídeos e a maturação viral. As partículas produzidas na presença de SQV são imaturas e não-infecciosas. A biodisponibilidade oral do SQV na forma de cápsula gelatina mole é aproximadamente 12% (Perry, 1998). A meia-vida curta deste fármaco (entre 7-12 h), exige administração oral a cada 8 h. Assim como o EFV, possui solubilidade muito baixa em água, impossibilitando a utilização em injeção parenteral (DrugBank, SQV). Porém, é muito solúvel em metanol e etanol. Este fármaco apresenta dois pKas um em 1,1 e outro em 7,1 (Ford, 2004). SQV é metabolizado pela CYP3A4 hepática (Fitzsimmons, 1997). Os metabólitos são eliminados principalmente pelo sistema biliar e fezes (mais que 95%), com excreção urinária mínima (menos de 3%). Os efeitos colaterais mais frequentes das formulações de SQV em geral são leves: náuseas, vômitos, diarreia e desconforto abdominal. A administração concomitante de SQV com NVP e EFV reduz consideravelmente seus níveis plasmáticos. Entretanto, este efeito pode ser anulado com a co-administração de ritonavir (Flexner, 2000). Esta combinação dupla de IP é comumente prescrita.

1.5.3. Nevirapina (NVP)

NVP, Fig. 10, é potente ITRNN com atividade contra HIV-1, mas não contra HIV-2.

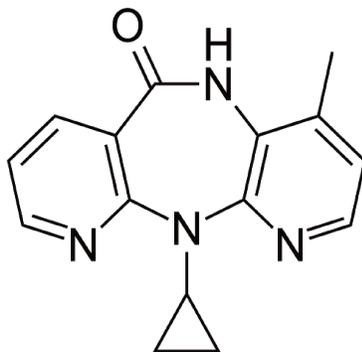


Fig. 10. Estrutura molecular da NVP.

A IC_{50} da NVP está por volta de 84nM (Hargrave, 1991). Mostra-se ativo contra várias linhagens de células, como os linfócitos T e macrófagos. NVP é bem absorvida pela via oral com biodisponibilidade de 90%, que não é afetada por alimentos (Cheeseman,

2000). O metabolismo de oxidação da NVP no fígado é realizado pelas isoformas CYP3A4 e CYP2B6 do citocromo P450. Este processo gera vários metabólitos que são eliminados principalmente por glicuronidação e pela via urinária (Erickson, 1999). A meia-vida plasmática da NVP diminui de 45 h, após a primeira dose, para 25 h, decorridos 2 semanas. Isto ocorre porque NVP induz a síntese de CYP3A4 (Hardman, 2003). Enquanto a NVP não sofre variação em sua concentração plasmática quando co-administrada com os IPs, estes últimos tem seus níveis reduzidos (Hardman, 2003). Os principais efeitos adversos relacionados a este fármaco são exantema, febre, fadiga, cefaleia, sonolência, náuseas e elevação das enzimas hepáticas. O pKa da NVP é 2,8 (Merck, 2001), o que a torna solúvel em meios ácidos. Assim como EFV e SQV, este fármaco apresenta solubilidade muito baixa em água, dificultando a administração pela via parenteral (DrugBank, NVP).

1.6. Planejamento Experimental

Em muitos casos, experimentos em laboratório são realizados alterando as proporções de reagentes e as condições experimentais, a partir das respostas obtidas. As vezes, a alteração de um único parâmetro não causa a mudança esperada ou satisfatória na resposta obtida. No entanto, quando todos os fatores são alterados ao mesmo tempo, a resposta obtida pode sofrer variação considerável, dificultando a compreensão do ensaio. Realizar experimentos desta maneira pode otimizar o experimento e satisfazer quem o realiza, mas nem sempre é conveniente. Dependendo do trabalho realizado, o objetivo final pode ser rapidamente alcançado, mas em muitos casos não, porque não se tem controle e nem entendimento do sistema estudado. Nestes casos, há gasto desnecessário de reagentes, que muitas vezes são caros, e perda de tempo. Dentro deste contexto a utilização de planejamentos experimentais é muito útil.

Planejamentos experimentais consistem em realizar experimentos fazendo mudanças conhecidas e determinadas nos parâmetros experimentais (Neto, 2007). No caso de estudos em bancada, o planejamento geralmente consiste em realizar diversos ensaios em diferentes condições e após alcançar uma região próxima daquela de interesse, aplicar o planejamento experimental. Dentro do planejamento experimental os

diferentes níveis fornecem respostas distintas, permitindo compreender o comportamento do sistema estudado. Utilizando as respostas e os níveis dos fatores podem ser desenvolvidos modelos matemáticos que descrevem esta região de interesse. Estes modelos podem ser simples, como equações de primeiro e segundo grau, ou complexos como equações de graus mais elevados. O objetivo é diminuir os erros entre o modelo e as respostas obtidas, mas sem que ocorra ajuste de erros experimentais. Os modelos são importantes porque permitem fazer suposições e previsões em outras condições experimentais. Os planejamentos experimentais também permitem calcular os efeitos dos fatores, mostrando quais parâmetros tem mais importância e a relevância da interação entre eles. Dependendo do tipo de sistema o efeito dos fatores de interação se mostra mais importante que o efeito de determinados fatores principais. Assim, para haver melhora significativa nos resultados, deve-se alterar os fatores ligados àqueles parâmetros de interação. Tratamentos estatísticos descrevem os modelos desenvolvidos e o quanto são confiáveis para descrever o sistema em estudo, de acordo com a Análise de Variância (ANOVA). Este tratamento descreve a falta de ajuste dos modelos, a significância estatística e permite calcular os intervalos de confiança. Outra vantagem que planejamentos experimentais permitem é a metodologia de modelagem e deslocamentos. Estes sempre são realizados ao longo do caminho de máxima inclinação do modelo desenvolvido. Esta estratégia é importante porque os planejamentos podem ser desenvolvidos em regiões que não são as desejadas e, a partir dos resultados, alcançar as melhores respostas. Dependendo do planejamento, pode haver vários parâmetros para descrever o modelo, o que aumenta a quantidade de experimentos necessários. Neste caso, o mais conveniente é realizar planejamentos saturados que vão indicar quais parâmetros são mais importantes e quais os significantes, simplificando o trabalho. Esta metodologia consiste em manter fixo os parâmetros menos significativos e realizar outro planejamento experimental com aqueles mais importantes reduzindo, desta maneira, o número de experimentos a serem realizados.

1.7. Estabilidade das NLS

Soluções contendo NLS são dispersões coloidais, de modo que as propriedades termodinâmicas e cinéticas destas dispersões permitem compreender a cinética de sua agregação e alternativas para tornar este processo mais demorado (Adamson, 1997; Miller, 1985; Shaw, 1992; Sato, 1980; Hunter, 1993).

Do ponto de vista termodinâmico a estabilidade das dispersões coloidais é tratada em termos de energia livre (Adamson, 1997; Miller, 1985; Rees, 1993), descrevendo o que acontece quando partículas com tamanho nanométricos não tendem a permanecer estáveis. Esta energia está relacionada à tensão interfacial entre a fase dispersa (partículas) e o meio de dispersão (fase contínua) e a variação da área superficial.

Termodinamicamente as dispersões coloidais são instáveis e deveriam estar agregadas. No entanto, mesmo instáveis termodinamicamente muitos destes sistemas continuam a existir, mas tendem a se agrupar com o decorrer do tempo, ora com uma velocidade alta, ora com uma velocidade pequena. Para explicar este fato deve-se complementar o estudo termodinâmico com a estabilidade cinética. Nas dispersões coloidais diferentes tipos de interações entre a fase dispersa e o meio de dispersão são fundamentais no comportamento de sua estabilidade. Tais interações entre as superfícies incluem principalmente repulsões eletrostáticas de Coulomb e as forças de atração de London-van der Waals, além de forças de repulsão estéricas e de solvatação. Estas interações indicam o quanto estas partículas são estáveis, mas não fornecem resultados quantitativos precisos. É com base nestes modelos que a cinética de agregação, como floculação e coagulação, é explicada.

1.7.1. Estabilidade termodinâmica das dispersões coloidais

Dispersões coloidais são sistemas particulados com tamanho entre 1nm e 1 μ m (Miller, 1985). A compreensão dos fundamentos termodinâmicos destes sistemas inicia-se com aqueles aplicados à termodinâmica de superfícies. Lipídios/óleos e água são imiscíveis em temperatura ambiente e, quando juntos, formam duas fases porque as forças de interações entre as moléculas de lipídios e entre as moléculas água são mais

intensas do que as de interações lipídios-água. As forças que comandam as interações entre lipídios são as interações de London-van der Waals e entre as moléculas de água, além destas, ocorre também as interações de hidrogênio. Quando estes compostos estão em contato, o termo que fornece uma idéia da intensidade de interação entre as diferentes fases é a tensão interfacial (Eq. 1), definida como a energia livre requerida para aumentar a área de uma superfície isotérmica, reversivelmente (Shaw, 1992). A tensão interfacil surge porque as moléculas do interior da solução atraem as moléculas da superfície, reduzindo e deformando a área superficial:

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{T,V,n_i} \quad (1)$$

∂G é a variação de energia livre, ∂A a variação da área e γ é a tensão interfacial. Outro termo importante na compreensão da estabilidade das dispersões coloidais é a área superficial das partículas. Neste caso, quanto menores forem as partículas em dispersão, maior será a área superficial. Experimentalmente quando se reduz uma matriz qualquer à escala nanométrica, observa-se tendência delas se agregarem, diminuindo a área superficial entre a fase dispersa e o meio de dispersão, o mesmo ocorrendo com a energia superficial. Isto evidencia que quanto menores as partículas, maior a área superficial e mais instável termodinamicamente é o sistema. A estabilidade termodinâmica é inversamente proporcional à área, porque a diminuição da área entre as diferentes fases é acompanhada pelo aumento de energia livre do sistema, que pode ser expressa pela Eq. 2:

$$dG = -SdT - PdV + \sum_i \mu_i dn_i + \gamma dA \quad (2)$$

onde dG representa a variação de energia livre, S a entropia, dT a variação de temperatura, P a pressão, dV a variação de volume, μ_i o potencial químico e dn_i variação do número de mols dos componentes do sistema. Considerando a variação de temperatura, volume e número de mols constantes na Eq. 2, temos a Eq. 3:

$$\Delta G \approx \gamma \Delta A \quad (3)$$

Considerando γ aproximadamente constante, esta Equação mostra que conforme a área das partículas aumenta maior será a energia livre do sistema. De fato, esta energia reflete o trabalho necessário para romper as partículas maiores, naquelas menores. Em relação à entropia (Eq. 2), para que ela desempenhe um papel positivo na estabilização das dispersões coloidais, a dT tem que ser positiva. Estas Equações mostram que o fator determinante na instabilidade dos sistemas particulados é a tensão interfacial, que permanece constante com aumento da área das partículas.

O que é necessário para aumentar a estabilidade termodinâmica das dispersões coloidais? Verificando as Eq. 1, 2 e 3 percebe-se que é necessário reduzir a tensão interfacial entre o dispersante e a fase dispersa. Normalmente esta diminuição é realizada pela adição de surfatantes e co-surfatantes ao sistema. Estas são moléculas grandes, contendo uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica. A parte hidrofílica normalmente é constituída de um grupo funcional, por exemplo $-\text{OH}$, $-\text{NH}_3^+$ e $-\text{COOH}$, e a hidrofóbica por cadeias de hidrocarboneto, com ligações simples e/ou duplas. A redução na tensão interfacial é alcançada porque estas moléculas se deslocam para a interface da dispersão, com a parte hidrofóbica em direção ao meio hidrofóbico e hidrofílica ao meio hidrofílico, impedindo o contato direto entre as diferentes fases e diminuindo a tensão interfacial. Esta redução não torna as nanopartículas termodinamicamente estáveis, mas diminui bastante a energia livre do sistema (Shaw, 1992; Adamson, 1997).

1.7.2. Estabilidade cinética das dispersões coloidais

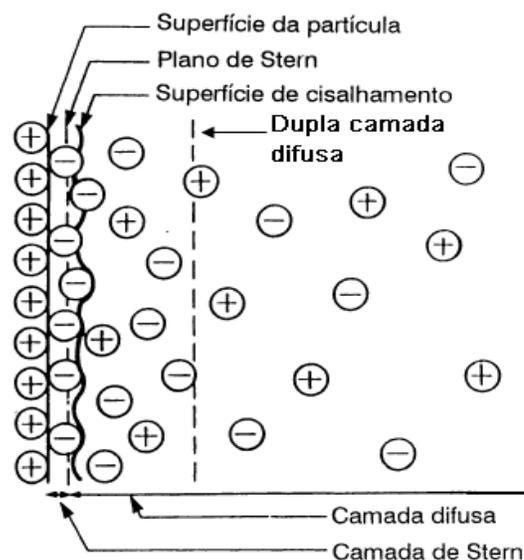
A estabilidade cinética das dispersões coloidais ocorre devido a um equilíbrio entre as forças de atração e de repulsão. As forças de repulsão são forças elétricas e tem sua origem na dupla camada elétrica. As de atração são principalmente de London-van der Waals e de longo alcance. Em curtas distâncias as forças de atração são mais intensas que as de repulsão. O movimento térmico entre as partículas vence as forças de repulsão tornando as interações inevitáveis. Como, em distâncias curtas, as forças de atração são maiores que as de repulsão as partículas tendem a se agrupar. Os tópicos seguintes têm como objetivo descrever a natureza das forças de repulsão elétricas, as forças de atração

de London-van der Waals e a estabilidade das dispersões coloidais pelo equilíbrio destas forças.

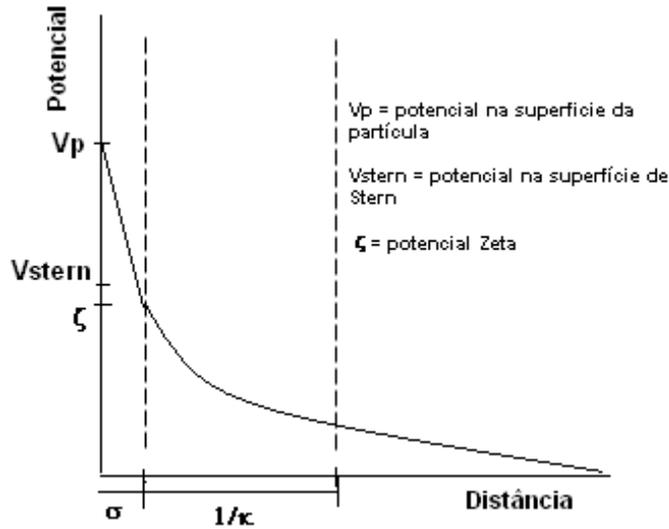
1.7.2.1. Forças elétricas de repulsão (dupla camada elétrica)

A dupla camada elétrica tem origem na carga superficial que partículas adquirem quando em solução e em seu movimento térmico. Esta carga superficial influencia a distribuição dos íons em solução próximo da superfície. A Fig. 11 a) apresenta de maneira geral uma dupla camada para uma superfície plana, segundo o tratamento de Stern e Gouy-Chapman (Shaw, 1992; Adamson, 1997) e a Fig. 11 b) o comportamento da diferença de potencial elétrico na superfície.

Neste caso, a superfície da partícula possui um potencial positivo e os íons negativos estão firmemente unidos a ela por forças elétricas e de London-van der Waals suficientes para superar a agitação térmica. O plano que passa no meio destes íons é definido como plano de Stern e está a uma distância σ da superfície da partícula. A Fig. 11 b) mostra que entre a superfície da partícula e o plano de Stern o decaimento de potencial é aproximadamente linear. A partir do plano de Stern em direção ao meio da solução pode ser verificado que os íons são distribuídos de maneira aleatória e o potencial tem decaimento aproximadamente exponencial.



(a)



(b)

Fig. 11. Representação da a) Dupla camada elétrica; b) Diferença de potencial na superfície.

$1/\kappa$ é definido como a distância da dupla camada difusa até a superfície da partícula (Eq. 4).

$$\kappa = \frac{4\pi e^2}{\epsilon kT} \sum_i n_i z_i^2 \quad (4)$$

onde e é a carga elementar, ϵ a permissividade do meio, T a temperatura, k a constante de Boltzmann, n_i a concentração do eletrólito e z_i a carga do íon ou contra-íon. A espessura da dupla camada depende da concentração e da carga dos íons. Quanto maior a concentração e/ou maior a carga dos íons mais estreita é esta dupla camada elétrica. Ela influi diretamente na estabilidade das partículas.

Segundo estas considerações Reerink e Overbeek (Shaw, 1992; Adamson, 1997) obtiveram uma expressão para o potencial da solução a partir do plano de Stern V_R . Assumindo duas partículas com raio a_1 e a_2 e distância r , eles desenvolveram a Eq. 5.:

$$V_R = \frac{64\pi\epsilon a_1 a_2 k^2 T^2 \gamma_1 \gamma_2}{(a_1 + a_2) e^2 z^2} \exp[-\kappa r] \quad (5)$$

$$\gamma = \frac{\exp[zeV_d/2kT]-1}{\exp[zeV_d/2kT]+1}$$

onde V_d é o potencial de Stern. Esta é uma expressão um tanto complicada para se tirar informações qualitativas. Considerando o mesmo raio a para as duas partículas e fazendo a aproximação de Debye-Hückel, $zeV_d/kT \ll 1$, chega-se à Eq. 6.:

$$V_R = 2\pi a V_d \exp[-\kappa r] \quad (6)$$

O potencial V_R diminui exponencialmente quando r e/ou κ aumentam. κ indica que o aumento da concentração de íons, juntamente com o aumento de sua valência, diminui V_R . Isto está relacionado à diminuição da espessura da dupla camada difusa, influenciando diretamente na estabilidade das partículas. Quanto maior este potencial e maior a dupla camada difusa, mais distantes as partículas tendem a permanecer umas das outras.

1.7.2.2. Forças de atração (forças de London-van der Waals)

As forças de atração entre moléculas neutras foram estudadas por van de Waals para explicar o comportamento não ideal dos gases. Estas forças, foram inicialmente explicadas por London e são conhecidas como forças de dispersão. Ocorrem devido à polarização e flutuação das cargas sobre as moléculas. Estas forças atuam em distâncias pequenas e variam com o inverso da sexta potência da distância. No caso de partículas constituídas por muitas moléculas, este decaimento é menor que nas moléculas individuais e as interações são mais intensas.

Para compreender o comportamento das interações de London-van der Waals entre as partículas, Hamaker (Miller, 1985; Shaw, 1992; Adamson, 1997) derivou uma

expressão aproximada para o potencial elétrico V_A de partículas esféricas de raio a_1 e a_2 à distância r , Eq. 7:

$$V_A = -\frac{A}{12} \left[\frac{y}{x^2+xy+x} + \frac{y}{x^2+xy+y} + 2\ln \left(\frac{x^2+xy+x}{x^2+xy+x+y} \right) \right] \quad (7)$$

onde

$$x = \frac{r}{a_1+a_2} \quad \text{e} \quad y = \frac{a_1}{a_2}$$

A é a constante de Hamaker.

Como na Eq. 5 para forças de repulsão, conclusões qualitativas não são diretamente obtidas a partir desta expressão. Considerando ambas as partículas com mesmo raio $a_1 = a_2 = a$ e a distância entre elas muito pequena ($r \ll a$) esta expressão simplifica-se para Eq. 8.

$$V_A = -\frac{A}{12} \cdot \frac{1}{2r} = -\frac{Aa}{12r} \quad (8)$$

Esta expressão é super estimada em relação à anterior, mas útil para obter algumas conclusões sobre a estabilidade de dispersões coloidais. A avaliação mais importante nesta expressão é que, quanto mais próximas as partículas se encontram umas das outras, maior é o potencial de atração, visto que este é proporcional ao inverso da distância. Qualitativamente isto permite concluir que quando as partículas estão muito próximas, as forças de atração prevalecerão sobre as de repulsão. Na Eq. 6 as forças de repulsão variam com o inverso do exponencial da distância e será menor que as forças de atração, em distâncias muito pequenas. As forças de atração são as principais responsáveis pelos fenômenos de agrupamento das partículas.

1.7.2.3. Estabilidade das dispersões coloidais: forças de atração de London-van der Waals e forças elétricas de repulsão

A estabilidade das dispersões coloidais em termos das energias de interação pode ser compreendida pela teoria de DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) (Milleri, 1985; Shaw, 1992; Adamson, 1997), na qual a estabilidade é determinada pelo balanço entre as forças atrativas e repulsivas. Nesta teoria a energia total é determinada pelo somatório das forças elétricas de repulsão e de atração de London-van der Waals. As forças de atração favorecem a formação de agregados e as de repulsão a estabilidade. Este balanço é apresentado pela energia total (V_T) (Eq. 9) pela soma das energias atrativas (V_A) e repulsivas (V_R) entre as duas partículas.

$$V_T = V_A + V_R \quad (9)$$

As curvas de energia potencial para V_T , V_A e V_R versus distância entre as partículas são ilustradas na Fig. 12.

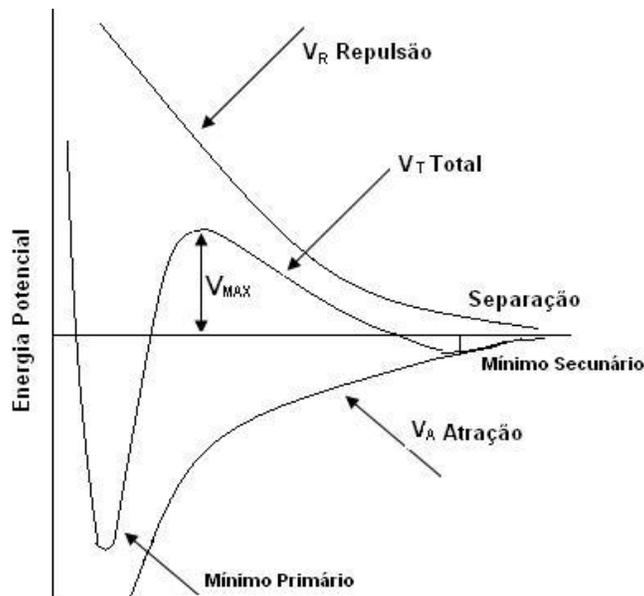


Fig. 12. Diagrama de energia potencial entre duas partículas.

A forma da curva V_T depende de V_A e V_R . V_R varia aproximadamente como o inverso da exponencial, tanto da distância entre as partículas como de κ . V_A varia com o inverso da distância entre as partículas. Conseqüentemente V_R deverá predominar em distâncias intermediárias e V_A tanto em distâncias pequenas como em muito grandes. O comportamento conjunto destes potenciais origina um máximo de potencial V_{MAX} que é a barreira de potencial repulsivo que impede aglomeração das partículas.

A altura desta barreira depende da magnitude de V_D (potencial de Stern) e de $1/\kappa$ (espessura da dupla camada difusa). Quanto maiores estes parâmetros, maior esta barreira e mais estáveis serão as partículas. Se o sistema não for perturbado, a única energia presente é a energia térmica. Se as partículas tiverem energia térmica suficiente para vencer esta barreira e ficarem muito próximas, as forças de atração prevalecerão sobre as de repulsão, havendo coalescência. Este é um processo irreversível, as partículas se fundem e não é possível obtê-las novamente por trabalho mecânico. Este potencial de repulsão é similar a uma energia de ativação que as partículas têm que vencer para agregar. Quanto maior o potencial, mais difícil e mais lenta é a agregação. Esta barreira pode ser diminuída aumentando κ ou diminuindo o potencial da superfície da partícula. κ pode ser aumentada pela adição de eletrólito inerte, pois este irá comprimir a dupla camada difusa. O potencial da superfície da partícula pode ser alterado pela adição de um reagente ativo que interage com a superfície da partícula. Se na superfície da partícula estiverem ancoradas moléculas anfifílicas com grupos funcionais como $-\text{COO}^-$ e $-\text{NH}_3^+$, as alterações do pH reduzirão a carga superficial da partícula. No caso do $-\text{COO}^-$ a adição de íons H^+ diminui a carga superficial por causa da formação de $-\text{COOH}$. Para o grupo funcional $-\text{NH}_3^+$ a adição de íons OH^- forma $-\text{NH}_2$ e H_2O . Esta diminuição de carga pode ser observada nas medidas do potencial Zeta.

A Fig. 9 exibe um segundo mínimo em que o potencial de repulsão é sobreposto ao de atração em uma distância considerável. Este segundo mínimo pode ser suficientemente profundo podendo superar o movimento térmico das partículas. Quando isto ocorre, as partículas também formarão aglomerados, mas não ocorre coalescência e elas permanecem próximas, unidas por forças de atração. Mesmo sendo fracas estas interações, os aglomerados podem se mover livremente pela dispersão. Este fenômeno é chamado de floculação e é diferente da coalescência. Devido às interações serem fracas o

fenômeno é reversível e as partículas podem ser facilmente re-dispersadas por agitação mecânica.

1.7.2.4. Potencial Zeta (ζ)

Experimentalmente não é possível medir o potencial da superfície da partícula ou o potencial de Stern. As medidas com relação à carga superficial são estimadas pelo potencial Zeta, cujo valor é próximo do potencial de Stern. O potencial Zeta está diretamente relacionado aos fenômenos eletrocinéticos da parte móvel da dupla camada elétrica. Ele é definido no plano de cisalhamento, que delimita o meio de dispersão e a camada estacionária do fluido em contato com a superfície da partícula. A importância nas medidas do potencial Zeta é que seu valor está relacionado à estabilidade das dispersões coloidais, indicando o grau de repulsão entre as partículas. Para partículas com potencial Zeta alto (positivo ou negativo) a repulsão eletrostática confere estabilidade, impedindo que ocorra floculação e coagulação. Quando este potencial é baixo a atração excede a repulsão e a dispersão aglomera. A Fig. 13 apresenta a localização do plano de cisalhamento na dupla camada elétrica de uma partícula carregada negativamente e um gráfico relacionando o potencial Zeta com o potencial de superfície e o decaimento do potencial do meio de dispersão.

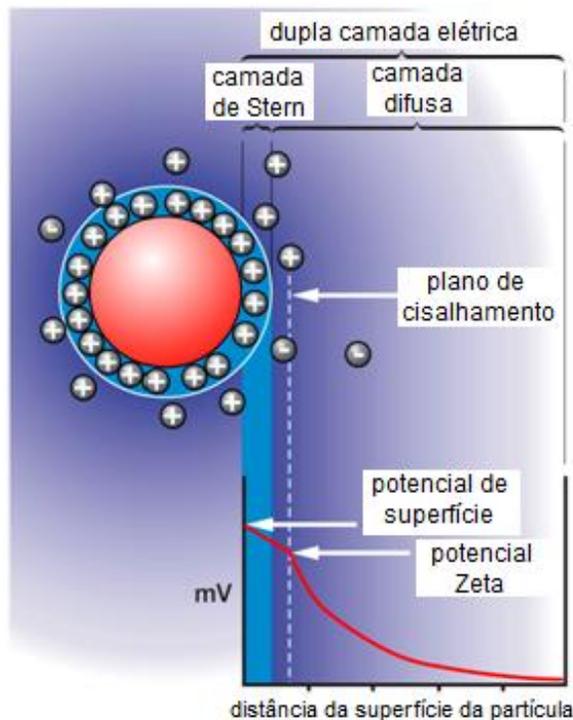


Fig. 13. Esquema da dupla camada elétrica e plano de cisalhamento onde o potencial Zeta é medido.

As cargas positivas estão fortemente unidas à superfície negativa da partícula. O ponto central destas cargas positivas indica a camada de Stern. O plano de cisalhamento fica muito próximo desta camada em uma região mais distante da superfície da partícula. Em seguida encontra-se a parte difusa da dupla camada elétrica. O potencial de superfície é maior que o de Stern e este maior que o potencial Zeta. Há um decaimento quase linear do potencial de superfície até o potencial Zeta. O potencial do meio de dispersão da dupla camada elétrica apresenta um decaimento exponencial com a distância.

O potencial Zeta não é medido experimentalmente mas pode ser calculado a partir de modelos teóricos e de resultados experimentais da mobilidade eletroforética, a qual é obtida aplicando um campo elétrico uniforme nas partículas carregadas dispersas no meio. Este campo exerce força eletrostática nas partículas nos íons dispersos na dupla camada elétrica. Parte da força aplicada aos íons é transferida à superfície da partícula através da viscosidade (Fig. 14).

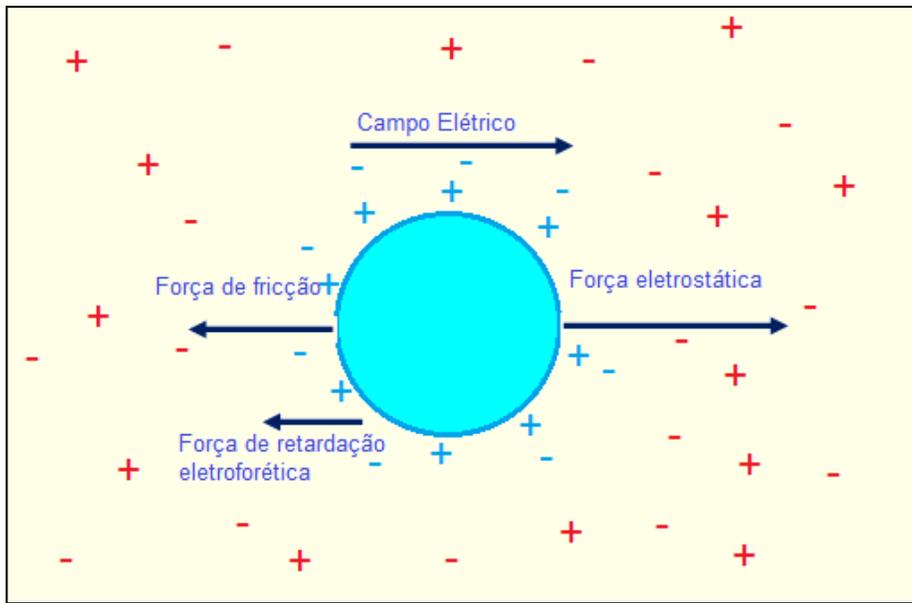


Fig. 14. Interações eletrostáticas entre partículas.

A mobilidade eletroforética está relacionada ao potencial Zeta pela equação de Henry, Eq 10:

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon_r f(ka)\zeta}{\eta} \quad (10)$$

onde μ_e é a mobilidade eletroforética, ε_r é a constante dielétrica do meio de dispersão, $f(ka)$ é a função de Henry, η a viscosidade do meio e ζ é potencial Zeta; k é o comprimento de Debye, diretamente relacionado à espessura da dupla camada elétrica (k^{-1}), e a é o raio da partícula. Para partículas em meio aquoso e concentrações eletrolíticas moderadas (aproximação de Smoluchowski), $f(ka)$ tem valor 1,5. Para partículas dispersas em meio de constante dielétrica baixa (aproximação de Huckel) o valor de $f(ka)$ é 1,0 (Adamson 1997; Shaw, 1992).

1.8. Modelos matemáticos para liberação de fármacos encapsulados em carreadores

A cinética de liberação de fármacos foi estudada a partir modelos matemáticos aplicados a nanopartículas poliméricas (Costa 2002; Lopes, 2005). A erosão, a difusão e o intumescimento das matrizes influenciam a liberação de substâncias encapsuladas nesses sistemas. A predominância de cada fator depende das propriedades da matriz empregada no carreador. No caso das NLS a liberação ocorre devido às transições polimórficas (α , β' e β) das cadeias lipídicas e pela difusão quando o meio receptor é muito solúvel (Müller, 2000; Müller, 2002).

1.8.1. Cinética de ordem zero

Baseia-se na liberação lenta do ativo a partir de formas farmacêuticas que não desagregam (Eq. 11):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_0 t + b \quad (11)$$

M_t é a quantidade de fármaco liberada no tempo t ; M_∞ a quantidade total de fármaco liberado num tempo infinito (quantidade total de fármaco incorporado no carreador em $t=0$); K_0 é a constante de velocidade e b a quantidade inicial de fármaco no meio receptor.

1.8.2. Cinética de primeira ordem

Tem sido empregado para descrever a dissolução (Gibaldi, 1967; Wagner, 1969) e a absorção ou eliminação de fármacos (Gibaldi, 1982), embora seja difícil conceituar este mecanismo em bases teóricas (eq. 12)..

$$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t \quad (12)$$

Q_t a quantidade de fármaco liberada no tempo t , Q_0 a quantidade inicial de fármaco na solução e K_1 o coeficiente de velocidade de liberação.

1.8.3. Modelo de Higuchi

É utilizado para descrever a velocidade de liberação sustentada de fármacos a partir de um sistema matricial (Eq. 13) (Costa 2002; Lopes, 2005).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_H \sqrt{t} + b \quad (13)$$

K_H corresponde à constante de liberação de Higuchi. Esta equação descreve o mecanismo de liberação baseado na lei de Fick. O uso desta relação em sistemas que intumescem pode tornar-se insuficiente, pois sistemas deste tipo podem ser erodíveis, devendo o relaxamento das cadeias poliméricas atender ao transporte de fármacos. Assim, a equação de Higuchi apresenta fortes limitações na interpretação dos mecanismos de liberação sustentada. No entanto, é a mais realista, representando os vários mecanismos que ocorrem nos sistemas matriciais de ordem zero. Este modelo pode-se aplicar com maior exatidão a matrizes pouco solúveis que não apresentem capacidade de intumescimento, exemplo acetato de celulose.

1.8.4. Modelo de Peppas-Korsmeyer

Baseia-se na equação semi-empírica (Eq. 14) proposta por Korsmeyer (Korsmeyer, 1981; Korsmeyer, 1983).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n + b \quad (14)$$

K é o coeficiente de velocidade que incorpora características estruturais e geométricas do carreador; n é o expoente que, de acordo com o valor numérico que assume, caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco. Esta equação é utilizada para descrever a liberação quando o mecanismo que prevalece é uma combinação da difusão do fármaco (transporte Fickiano) e do transporte (não-Fickiano) controlado pela relaxação das cadeias poliméricas do carreador, o que envolve a transição entre um estado semi-rígido para outro mais flexível.

1.8.5. Modelo de Baker-Lonsdale

Foi desenvolvido por Baker e Lonsdale utilizando o modelo de Higuchi e descreve a liberação sustentada de fármacos encapsulados em matriz esférica (Eq. 15) (Costa 2002; Lopes, 2005).

$$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = K_{BL} t \quad (15)$$

M_t/M_∞ é a fração do fármaco liberado e K_{BL} é a constante de liberação.

2. Objetivos

2.1. Geral

Preparar e caracterizar formulações de NLS carregadas com NVP, SQV e EFV para o tratamento do HIV/AIDS, acoplado à superfície octadecilamina manosilada para que os carregadores sejam direcionados e façam liberação prolongada nos macrófagos e órgãos reservatórios de HIV.

2.2. Específicos

Sintetizar octadecilamina manosilada a partir da octadecilamina e d-manose e caracterizá-la por espectrometria de massas, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de sólidos (RMN) de C13 e N15, análise elementar CHN e espectroscopia no infravermelho (IV);

Caracterizar as NLS através da eficiência de encapsulação (EE%), perfil de liberação *in vitro*, Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), potencial Zeta, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Difratomia de raios-X;

Monitorar a estabilidade dos nanocarregadores, realizando medidas de DLS e potencial Zeta ao longo do tempo;

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes, materiais e instrumentos

Reagentes: ácido esteárico (AE) (PA, LabSynth), Compritol 888 ATO (COM) (Brasquim), ácido mirístico (AM) (Sigma Aldrich), brometo de cetiltrimetilamônio 95% (CTAB) (Sigma Aldrich), Polisorbato 80/Tween 80 (T80) (USP, Makeni Chemicals), Polisorbato 20/Alkamuls/Tween 20 (T20) (Rhodia), Lipoid S-75/lecitina de soja (LEC) (Lipoid), n-butanol (PA, LabSynth), Nevirapina base (NVP) (Farmanguinhos), Efavirenz base (EFV) (Farmanguinhos), Saquinavir base (SQV) (Cristália), fosfato de potássio monobásico (PA, LabSynth), octadecilamina 97% (Sigma Aldrich), d-manose 99% (Acros Organics), hidróxido de potássio teor 85% (Grupo Química), cloreto de sódio 99% (Chemco), acetonitrila (grau HPLC, Tedia), metanol (grau HPLC, Tedia), metanol (PA, LabSynth), filtros de centrifuga Ultracel de corte molecular 100 kDa (Amicon Ultra), membranas de diálise de corte molecular 12 kDa-16 kDa e 1 kDa (Alamar) e água deionizada.

Equipamentos: Ultra Turrax IKA mod. T25; Centrífuga Eppendorf; analisador de partículas Zetasizer Malvern Instruments; HPLC-UV-Vis, marca Agilent, série 1200; Espectrofotômetro FTIR Bomem mod. MB-Series B100; Analisador Elementar CHN Perkin Elmer mod. Series II CHNS/O Analyser 2400; Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker mod. Avance II 400MHz; Difrátômetro de raios X Shimadzu mod. XRD-700; Calorímetro Diferencial de Varredura DSC DuPont Instruments mod. 2910; Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Jeol mod. JSM 6360 LV; Espectrômetro de massas Xevo Q-ToF Waters; Espectrofotômetro UV-Vis.

3.2. Produção de NLS e NLS-manosiladas pelo método de microemulsão O/A

As NLS foram produzidas pela técnica de microemulsão, com algumas modificações. Em um frasco foram pesadas as quantidades necessárias de fármaco e lipídios. Em um segundo frasco foram adicionados surfatantes e água. Os lipídios e fármaco foram fundidos 5-10°C acima do ponto de fusão do lipídio, até dissolução

completa. AE tem ponto de fusão 68,8°C (DrugBank, AE), COM 70°C (Libiol, COM) e AM 54°C-55°C (Chemblink, AM). Os surfatantes e água foram misturados à mesma temperatura. A solução de surfatantes foi adicionada à de lipídios/fármaco e agitadas sob alta velocidade no Turrax, formando uma emulsão/microemulsão. Em um terceiro frasco contendo água gelada (2-3°C) foi adicionada gota a gota, sob agitação, esta emulsão/microemulsão. A razão volumétrica entre a emulsão/microemulsão e o produto final (emulsão/microemulsão + água gelada) foi aproximadamente 1:10. A Fig.15 apresenta um esquema geral desta metodologia.

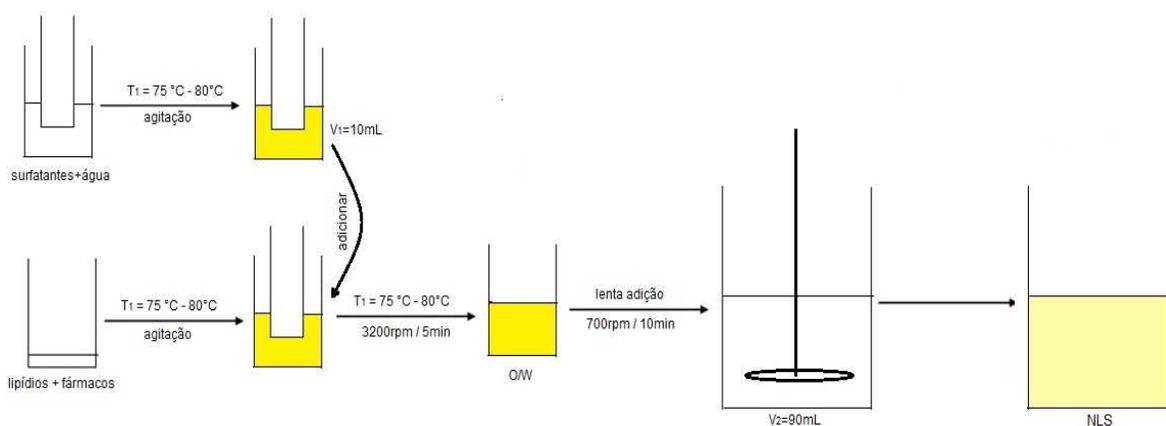


Fig. 15. Esquema do procedimento para produção de NPLS.

Para produção das nanopartículas manossiladas adicionou-se a quantidade desejada de octadecilamina manossilada ao frasco da solução de surfatantes e água aquecida, prosseguindo com o procedimento descrito.

3.3. Quantificação dos fármacos nas NLS por HPLC

A quantificação foi realizada utilizando filtros de centrifuga Ultracel, corte molecular 100 kDa. Estes filtros foram escolhidos por que as nanopartículas não se separavam do meio de dispersão mesmo centrifugando em alta velocidade (90000g) por longo tempo (4 h). A Fig. 16 esquematiza o dispositivo experimental usado.

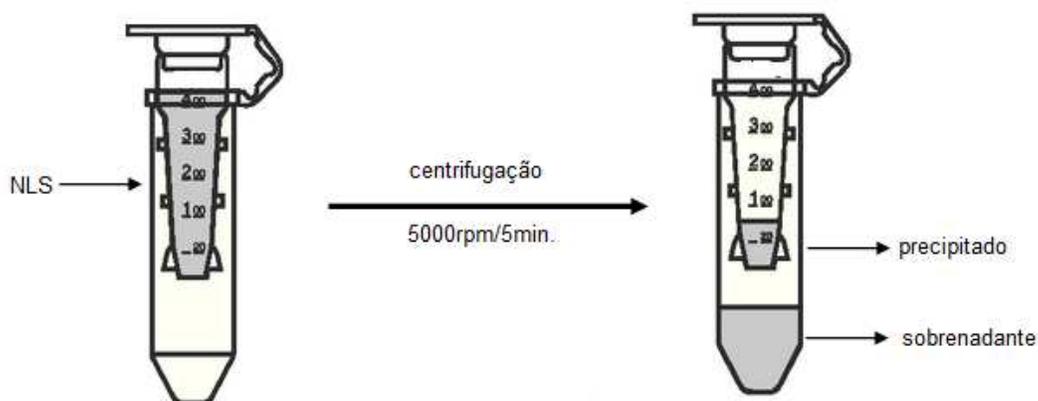


Fig. 16. Esquema do dispositivo experimental usado na ultracentrifugação.

De cada vez foram centrifugados 500 μ L de amostra contendo NLS, à velocidade 1845g, durante 5 min, separando as NLS do sobrenadante. O volume de sobrenadante, com fármaco não encapsulado, variou entre 200 μ L e 300 μ L. Estas membranas eram limpas e reutilizadas em outras centrifugações. Para fazer a limpeza elas eram invertidas no Eppendorf, centrifugadas novamente nas mesmas condições e guardadas em solução de hidróxido de sódio 1,00 mM (Fig. 17).

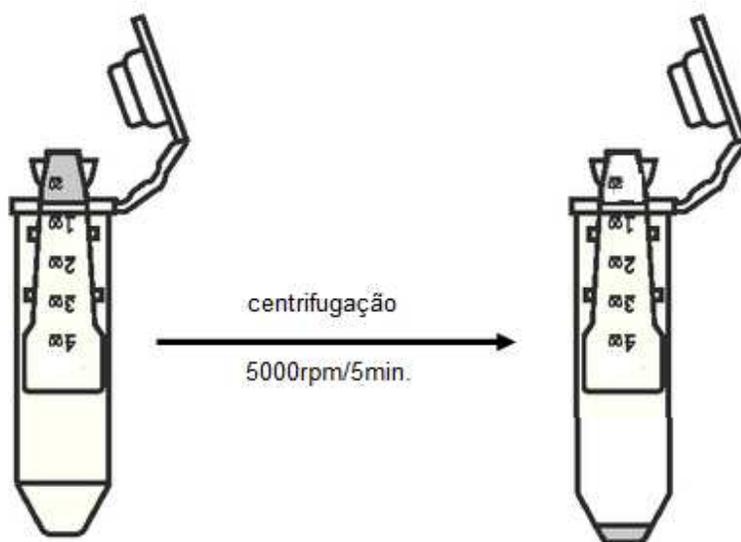


Fig. 17. Centrifugação para limpar as membranas.

O sobrenadante foi diluído com metanol, filtrado em membranas Millipore (4,5 µm) e quantificado por HPLC-UV-Vis. A mesma diluição foi feita com NLS em metanol, para medir a concentração total dos fármacos. Neste último caso a amostra foi aquecida para completa diluição dos lipídios seguido de filtração com as membranas Millipore. As medidas foram realizadas usando coluna ACE 3 C18 100x4,6 mm, com diâmetro de partículas de 5,00 µm. Para EFV e SQV as amostras foram diluídas 20 vezes antes de serem injetadas. Isto equivale a diluir 200 µL de amostra com NLS ou sobrenadante em 3,8 mL de metanol. Para NVP a diluição foi 5 vezes, colocando 400µL da amostra com NLS ou sobrenadante em 1,80 mL de metanol. A fase móvel foi tampão fosfato e acetonitrila, mas em condições diferentes. Para NVP a fase móvel foi tampão fosfato 0,052 mM/pH 5,0 e acetonitrila na proporção de 75:25 (v:v) com absorvância medida em 239 nm. Para SQV foi tampão fosfato 0,022 M, pH 5,0 na proporção 60:40 (v:v) tampão: acetonitrila, sendo medida absorvância em 238nm e para EFV foi empregado tampão 0,010 mM, pH 2,5 na proporção com acetonitrila de 40:60 (v:v) sendo lida a absorvância em 246nm. Antes das análises as fases móveis e acetonitrila foram filtradas e desgaseificadas em banho de ultrassom.

A eficiência de encapsulação (EE%) das NLS foi obtida, via HPLC, fazendo a diferença entre a concentração do fármaco livre (no sobrenadante) e quantidade total das NLS (Eq. 16).

$$EE\% = \frac{(A_t - A_s)}{A_t} 100\% \quad (16)$$

A_t é área total (s*mAu) sob o pico cromatográfico correspondente ao fármaco nas NLS e A_s tem o mesmo significado para o fármaco no sobrenadante.

3.4. Reação de d-manose com octadecilamina produzindo octadecilamina manosilada

Este método, baseado no trabalho de Mitts (Mitts, 1944) e Lockhoff (Lockhoff, 1998), foi aplicado com algumas modificações. Adicionou-se 2,00 g ($\approx 7,43$ mmol) de octadecilamina e 2,34 g ($\approx 7,43$ mmol) de d-manose em 12,00 mL de etanol em balão de

fundo redondo. A mistura foi aquecida a 80 °C durante 1-1:30 h, sob refluxo, seguida de resfriamento a 40 °C e adicionados 24,00 mL de n-hexano, sob agitação com agitador magnético, entre 30 min e 1 h, em recipiente fechado. A Fig.18 esquematiza o aparato utilizado na reação. A seguir o recipiente foi aberto, à temperatura ambiente, até completa evaporação do n-hexano/etanol. Foram adicionados 100,00 mL de água deionizada, agitada e filtrada em papel de filtro. O procedimento foi repetido mais uma vez. Foram adicionados 100,00 mL de etanol, seguida de agitação e filtração em papel de filtro e o procedimento novamente repetido. Após filtração o papel de filtro foi lavado com etanol para recuperar a amostra aderida ao papel. A lavagem com água deionizada é feita para eliminar o excesso de d-manose e com etanol o de octadecilamina. O produto final foi caracterizado por espectrofotometria no infravermelho IV, espectrometria de massas por Electro spray no modo positivo em analisador TOF, ressonância magnética nuclear de N15 e C13 em sólido e análise elementar CHN.

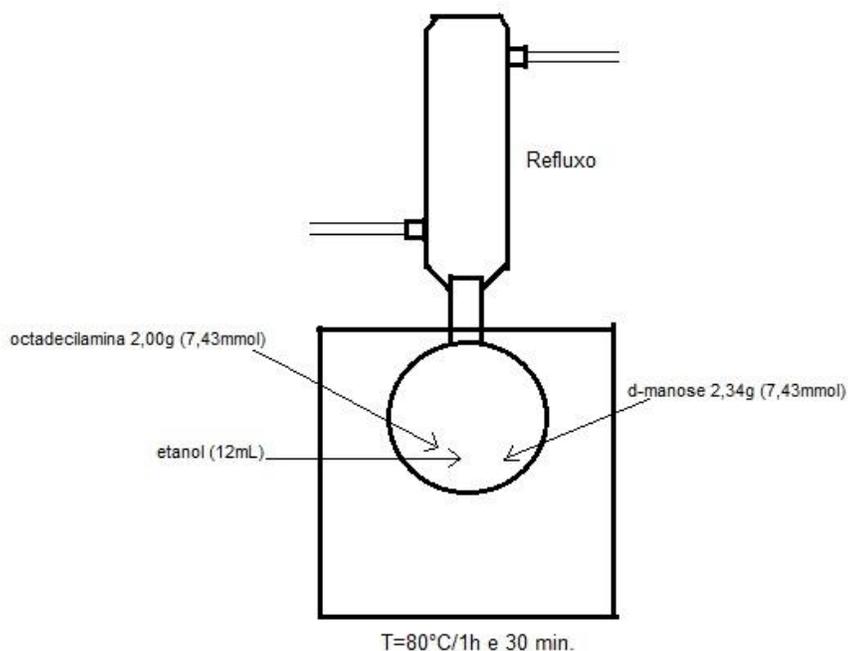


Fig. 18. Aparato utilizado na reação entre octadecilamina e d-manose.

3.5. Estudo de liberação *in vitro* (Diálise)

A diálise foi feita para estimar a quantidade de fármaco liberado *in vitro*, utilizando o dispositivo mostrado na Fig. 19. Um dado volume de solução contendo NLS (3,00 mL para as formulações com SQV e EFV e 10,00 mL para as formulações com NVP) foi colocado em tubo Falcon que continha membrana de diálise em sua extremidade. O meio receptor foi tampão fosfato 50,00 mM com força iônica similar à do sangue (154 mM). O corte molecular das membranas empregadas as amostras com SQV e EFV foi 16 kDa e para as amostras com NVP 1 kDa. O meio receptor continha 50,00 mL de tampão fosfato pH 7,40 com 2% de T20 para as formulações com EFV e 4% de T80 para as formulações com NVP e SQV. Estes surfatantes foram adicionados para tornar os fármacos mais solúveis no meio externo, alcançando a condição *sink*, em que o meio receptor solubiliza muito mais o fármaco (pelo menos 10 vezes mais) que o meio onde as NLS estão dispersas. O meio receptor foi agitado a 100 rpm, à 37 °C durante o experimento. Em tempos determinados (0:00h; 0:20h; 0:40h; 1:00h; 2:00h; 4:00h; 6:00h; 8:00h; 12:00h; 24:00h; 36:00h; 48:00h) foram retiradas alíquotas, com reposição do mesmo volume para manter o volume do meio receptor constante. As amostras foram analisadas por HPLC-UV-Vis.

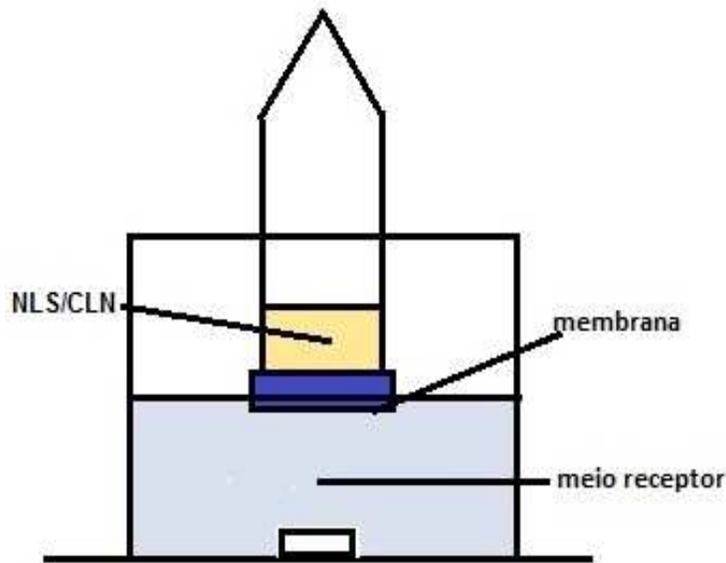


Fig. 19. Esquema do dispositivo utilizado para diálise.

3.6. Caracterização das NLS e NLS-manosiladas

3.6.1. Determinação da distribuição de tamanho das partículas e Índice de Polidispersidade (PDI) das NLS e das NLS-manosiladas

A caracterização das NLS e das NLS-manosiladas em termos de tamanho de partículas e PDI foi realizada por espectroscopia de correlação de fótons (espalhamento dinâmico de luz) utilizando equipamento Malvern Zetasizer. As amostras foram colocadas em água deionizada (5 gotas da amostra contendo NLS em 1,00mL de água), adicionadas nas cuvetas e analisadas.

3.6.2. Determinação do potencial Zeta das NLS e das NLS-manosiladas

O potencial Zeta das NLS e das NLS-manosiladas foi determinado pelo analisador eletroforético do equipamento Malvern Zetasizer. As amostras foram diluídas em água deionizada (na mesma proporção mencionada), colocadas na cela eletroforética e o potencial Zeta foi determinado.

3.6.3. Determinação da cristalinidade das amostras contendo NLS e NLS-manosiladas

As análises por difração de raios-X e DSC foram realizadas com o pó liofilizado das NLS e com os lipídios puros. Estas medidas são essenciais para observar o grau de desorganização da matriz lipídica que forma as nanopartículas. As medidas foram realizadas em difratômetro Shimadzu, com taxa de varredura 2°/min, radiação CuKa em 1,54184 nm e os difratogramas foram obtidos entre 5° e 50°.

Na análise por DSC foram usadas placas de alumínio com tampa, contendo 2-5 mg de amostra, fechadas hermeticamente. A linha de base foi determinada para todos os termogramas, utilizando placas vazias. As amostras foram aquecidas a 10°C/min entre 20°C e 100°C. Os resultados forneceram as temperaturas de transição e entalpias de transição das NLS, das NLS-manosiladas e dos lipídios puros.

3.6.4. Estudo da morfologia mediante Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das NLS e NLS-manosiladas foi estudada por Microscopia Eletrônica de Varredura utilizando o equipamento Jeol JSM - 6360 LV. As amostras foram diluídas 20 vezes e depositadas sobre placas de vidro, colocadas sobre stubs e secas no dessecador por, no mínimo, 24 h. A metalização foi feita com 80% Au + 20% Pd e a diferença de potencial aplicado para aceleração dos elétrons foi 5 kV.

3.7. Caracterização da octadecilamina manosilada

3.7.1. Espectro de massas da octadecilamina manosilada

Os espectros de massas foram obtidos via ionização por Eletrospray no modo positivo em analisador TOF. Aproximadamente 100 ppm da amostra foram dissolvidos em metanol grau HPLC, sendo adicionada pequena quantidade da solução de 0,1% de ácido fórmico (HCOOH) para ionização.

3.7.2. Espectros de RMN-N15 e C13 de d-manose, octadecilamina e octadecilamina manosilada sólidas

Para d-manose foram obtidos espectros de RMN-C13 e para octadecilamina e octadecilamina manosilada espectros de RMN-C13 e N15. As amostras foram secadas durante 24 h em estufa a 50°C e guardadas no dessecador. Para obter os espectros as amostras foram compactadas em rotor de zircônia e analisadas em sonda 3R com rotação de 10 kHz. Os espectros de C13 foram obtidos nas condições: tempo de aquisição 0,03 s; tempo de relaxação 1,00 s; tempo de contato 4,00 ms; frequência de operação do carbono 100 MHz. As condições para a obtenção dos espectros de N15 foram: tempo de aquisição 0,05 s; tempo de relaxação 1,00 s, tempo de contato 5,00 ms, frequência de operação do nitrogênio 40 MHz.

3.7.3. Análise elementar CHN da octadecilamina e octadecilamina manosilada

A análise elementar CHN foi feita para octadecilamina e octadecilamina manosilada. As amostras foram secadas por pelo menos 24 h em estufa a 50°C e guardadas no dessecador para eliminação completa de água. As amostras foram oxidadas com excesso de oxigênio para combustão completa, seguido de redução formando CO₂, H₂ e N₂, sendo quantificadas mediante detector de condutividade térmica.

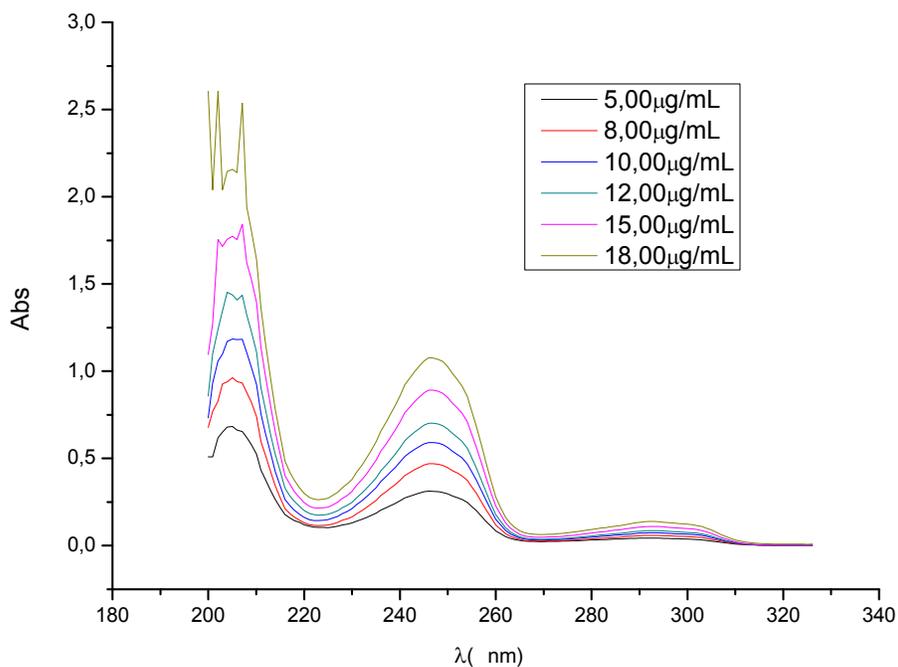
3.7.4. Espectros no infravermelho (IV) de d-manose, octadecilamina e octadecilamina manosilada

Estes espectros foram obtidos entre 400 cm⁻¹ e 4000 cm⁻¹, resolução 5 cm⁻¹, com as amostras em pastilhas de KBr.

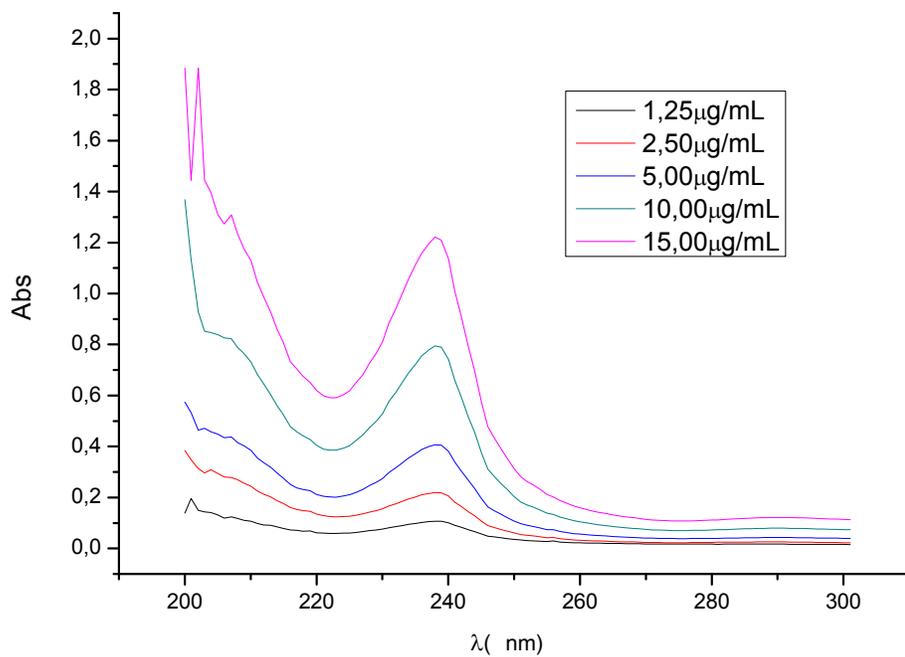
4. Resultados e Discussão

4.1. Espectros, no UV-Vis, de EFV, SQV e NVP

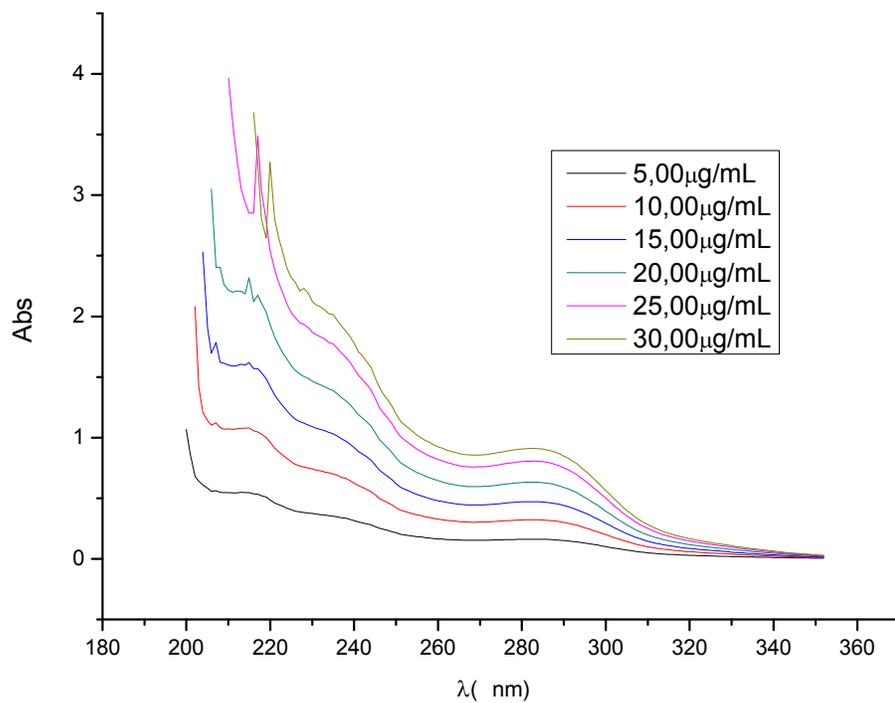
Os espectros de UV-Vis foram obtidos antes dos estudos por HPLC UV-Vis para determinar os máximos de absorção de cada fármaco. Para cada fármaco, em metanol, foi obtida a curva de calibração, de acordo com as concentrações e máximos de absorção. A Fig. 20 a), b) e c) apresenta os espectros de absorção e as concentrações de EFV, SQV e NVP, respectivamente.



(a)



(b)



(c)

Fig. 20. Espectros no UV-Vis. a) EFV; b) SQV; c) NVP.

Os máximos de absorção foram 246 nm para EFV, 238 nm para SQV e 239nm e 283nm para NVP. As Eq. 17, 18 e 19 fornecem a curva de calibração utilizando a concentração em $\mu\text{g/L}$ ajustada para EFV, SQV e NVP, respectivamente. A curva de calibração da NVP foi calculada usando comprimento de onda 239nm.

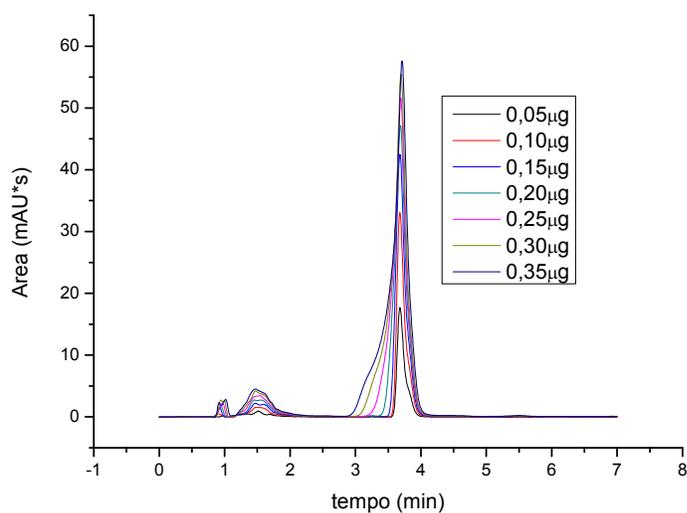
$$\text{Abs} = 62326,66.\text{Conc}-0,05 \quad R=0,99 \quad (17)$$

$$\text{Abs} = 66766,65.\text{Conc}-0,01 \quad R=0,99 \quad (18)$$

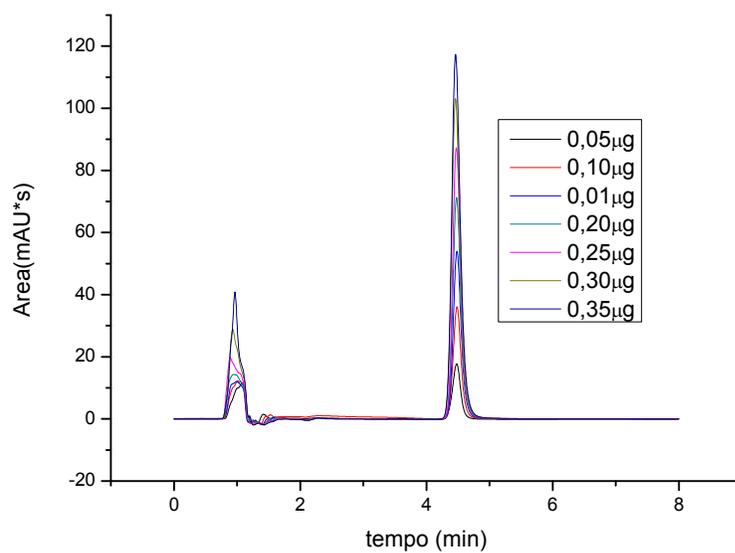
$$\text{Abs} = 31695,47.\text{Conc}-0,05 \quad R=0,99 \quad (19)$$

4.2. Curvas de calibração por HPLC-UV-Vis, para EFV, SQV e NVP

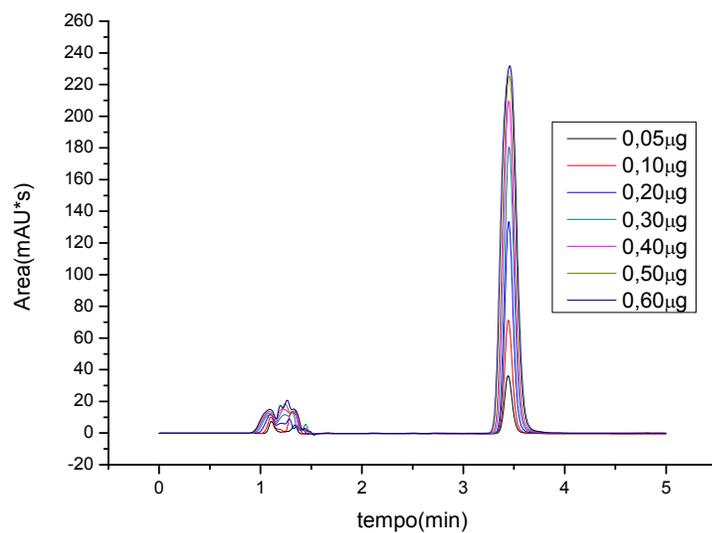
As curvas de calibração dos fármacos foram obtidas de acordo com os métodos de Ramachandran (Ramachandran, 2006) para EFV, Pathak (Pathak, 2007) para SQV e Silva (Silva, 2006) para NVP. Para EFV e SQV foram injetadas 0,05 μg ; 0,10 μg ; 0,15 μg ; 0,20 μg ; 0,25 μg ; 0,30 μg e 0,35 μg . Para NVP foram injetadas 0,10 μg , 0,20 μg , 0,30 μg , 0,40 μg , 0,50 μg e 0,60 μg . As Fig. 21 a), b) e c) mostram os tempos de eluição para EFV, SQV e NVP, respectivamente.



(a)



(b)



(c)

Fig. 21. Cromatogramas usados para obter as curvas de calibração. a) EFV; b) SQV; c) NVP.

O tempo de retenção para SQV foi 4,3min, para EFV 3,9min e para NVP 3,5min. Observa-se que os componentes indesejados para as análises eluem entre 1 e 2 min. Utilizando as áreas sob os picos cromatográficos (s*mAu) e as massas (μg), foram obtidas equações para o ajuste das retas para EFV (Eq. 20), SQV (Eq. 21) e NVP (Eq. 22).

$$\text{Area} = 3010,575 * \text{Massa} - 0,388 \quad R = 0,99 \quad (20)$$

$$\text{Area} = 3336,034 * \text{Massa} - 0,580 \quad R = 0,99 \quad (21)$$

$$\text{Area} = 4079,719 * \text{Massa} - 1,087 \quad R = 0,99 \quad (22)$$

4.3. Caracterização de octadecilamina manosilada

4.3.1. Obtenção dos espectros de massas

A reação entre octadecilamina e d-manose está representada na Fig. 22.

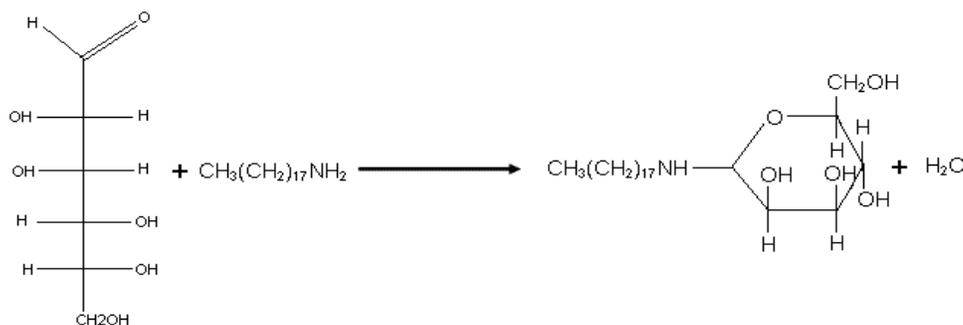


Fig. 22. Reação entre d-manose e octadecilamina.

Uma vez produzida octadecilamina manosilada o passo seguinte foi purificá-la. Foram feitas várias tentativas utilizando coluna de sílica como fase estacionária e mistura de etanol/acetato de etila como fase móvel. Esta tentativa não forneceu bons resultados e alguns motivos podem ser apontados para tal. Primeiro, octadecilamina manosilada é muito pouco solúvel nos solventes que deveriam ser utilizados (etanol, acetato de etila,

metanol, água) impossibilitando sua purificação. Segundo, a sílica utilizada na coluna torna o meio ácido e neste a octadecilamina manosilada sofre reação de hidrólise. Quando o composto purificado foi analisado por espectrometria de massas, usando a técnica de Elestrospray no modo positivo no analisador TOF, foram identificados vários sinais indicativos de degradação da amostra. Verificados estes problemas, o produto reacional foi lavado com etanol e água tirando vantagem da baixa solubilidade da octadecilamina manosilada. Utilizando estes solventes tanto os produtos de reação hidrofóbicos como os hidrofílicos seriam eliminados. Pequena quantidade deste produto purificado foi diluído em metanol (grau HPLC) adicionada a pequena quantidade de HCOOH 1% (em volume) e analisada no espectrômetro. As análises foram realizadas no modo positivo porque tanto octadecilamina como octadecilamina manosilada apresentam átomo de nitrogênio passível de ionização. O espectro de massas foi obtido na escala entre 100 à 600 Da (Fig. 23).

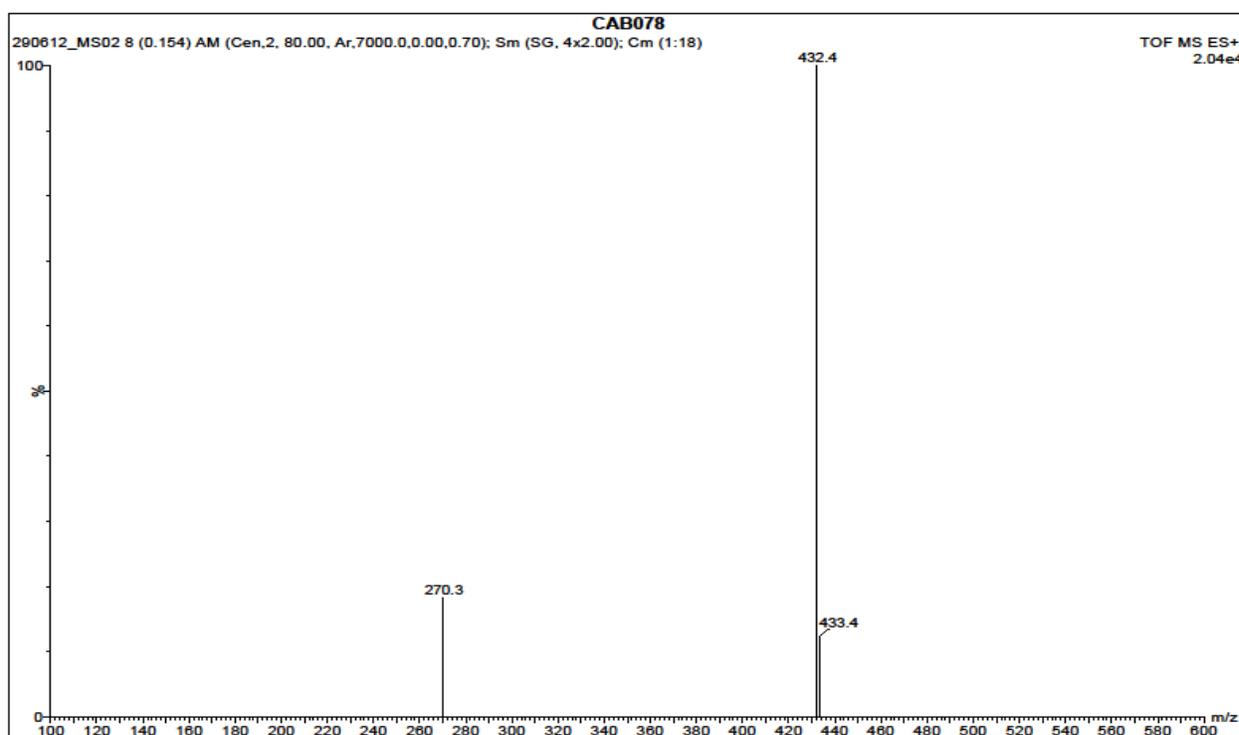


Fig. 23. Espectro de massas de octadecilamina manosilada após lavar com água e etanol.

Este espectro mostra sinais em 432,4 e em 270,3. O primeiro corresponde a octadecilamina manosilada (431g/mol) ionizada e o segundo à octadecilamina (269g/mol)

que não reagiu. Não foram detectados produtos de reação indesejáveis e excesso de d-manose. Deve ser lembrado ainda que octadecilamina é mais solúvel que o produto final em metanol e o sinal em 270,3 pode não estar representando o rendimento real da reação. Se o produto final e a octadecilamina se solubilizassem na mesma proporção seria esperado um sinal menos intenso em 270,3. Além disto, pequena parcela da octadecilamina manosilada pode ter sido degradada, na fonte de ionização, em octadecilamina e d-manose.

4.3.2. Análise elementar CHNO

Esta análise complementa os resultados de espectrometria de massas. A Tabela 1 apresenta as porcentagens em massa previstas pela fórmula molecular e os resultados (obtidos em duplicata) por análise elementar para octadecilamina manosilada.

Tabela 1. Porcentagens em massas, previstas pela fórmula molecular e análise elementar CHN para octadecilamina manosilada.

	Fórmula molecular	Análise elementar 1	Análise elementar 2
C%	66,82	68,12	68,24
H%	11,37	11,41	11,92
N%	3,25	3,07	3,10
O%	18,56	17,40	16,74

A massa do oxigênio foi calculada a partir das porcentagens de C, H e N. Os resultados previstos foram muito próximos ao da fórmula molecular, mostrando que o composto está puro. A Tabela 2 mostra os resultados da análise elementar de octadecilamina obtidos pela análise. A maior diferença entre os resultados previstos e calculados foi 1,89% para o carbono.

Tabela 2. Porcentagens em massas, previstas pela fórmula molecular e análise elementar CHN para a octadecilamina, em duplicata.

	Fórmula molecular	Análise elementar 1	Análise elementar 2
C%	80,30	82,19	81,46
H%	14,50	15,07	15,46
N%	5,20	5,28	5,09

Os resultados obtidos pela análise elementar da octadecilamina manosilada mostraram que a pureza do produto final é maior que a detectada por espectrometria de massas. Caso o produto final apresentasse 20% de octadecilamina mostrado no espectro de massas, seria esperado pelo menos uma quantidade maior de carbono na análise elementar, o que não foi observado. A vantagem em utilizar a análise elementar é que é uma técnica simples, de fácil aplicação e fornece resultados quantitativos.

4.3.3. Espectros de RMN-N15 para octadecilamina e octadecilamina manosilada

Após as análises por espectrometria de massas e análise elementar tentou-se obter os espectros de RMN-H e C13 para d-manose, octadecilamina e octadecilamina manosilada em solução. Para os dois primeiros compostos os espectros foram obtidos, mas para o último não. No último caso, os sinais obtidos foram muito pouco intensos e não concordavam com o esperado. Isto ocorreu por que octadecilamina manosilada é muito pouco solúvel em dimetilsulfóxido deuterado, clorofórmio deuterado e tetracloreto de carbono. Espectros de RMN-H e C13 em líquido são resultados interessantes, pois são obtidos rapidamente e fornecem informações importantes sobre a estrutura molecular. Como as molécula de octadecilamina e octadecilamina manosilada possuem um átomo de nitrogênio, primeiramente foram obtidos espectros de RMN-N15 nas amostras sólidas, para fins de comparação. As Fig. 24 e Fig. 25 mostram estes espectros para octadecilamina e octadecilamina manosilada, respectivamente.

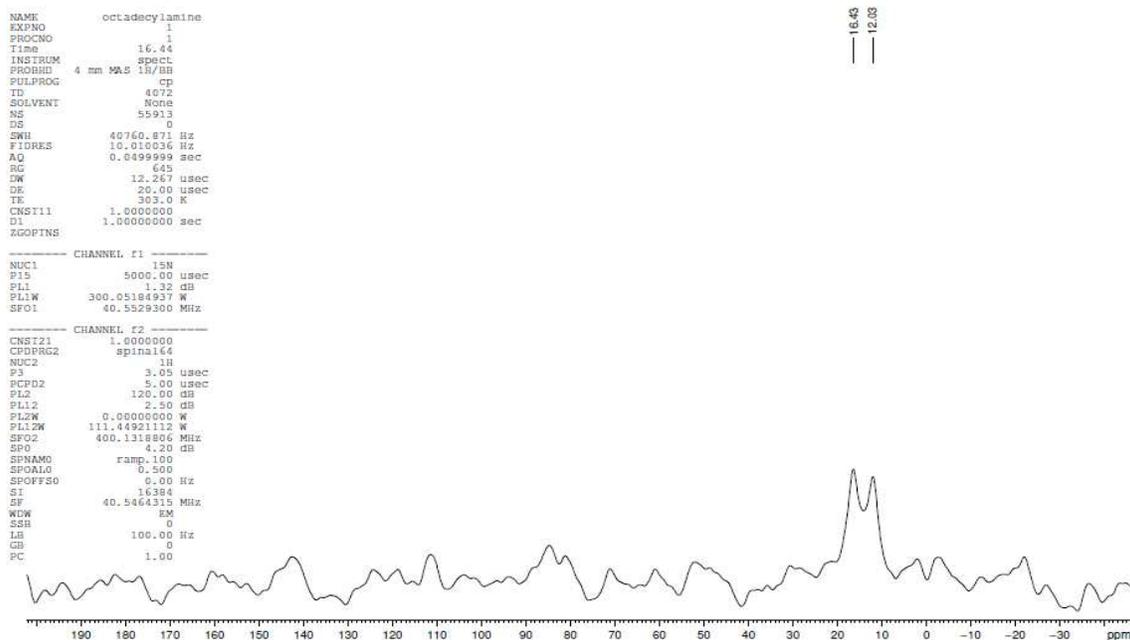


Fig. 24. Espectro de RMN-N15 de octadecilamina sólida.

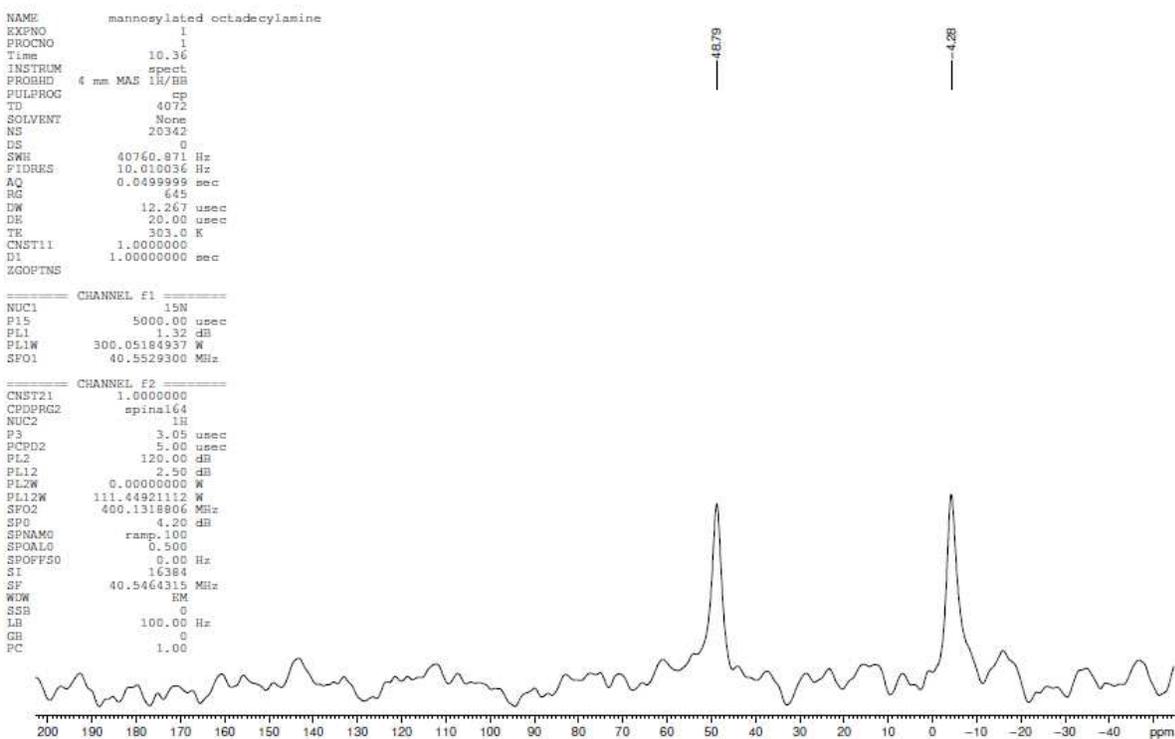


Fig. 25. Espectro de RMN-N15 de octadecilamina manosilada sólida.

Como cada composto possui um átomo nitrogênio era esperado apenas um sinal para cada, mas foram observados dois sinais. Para octadecilamina estes sinais estavam em 16,43ppm e 12,03ppm e para octadecilamina manosilada os sinais estavam em 48,79ppm e -4,28ppm. Para a octadecilamina é mais provável que estes sinais sejam devidos a polimorfos do composto. Para octadecilamina manosilada além do polimorfismo os dois sinais poderiam também ser devidos às formas α e β de d-manose, pois quando estas duas formas se ligam na octadecilamina o ambiente químico na região do átomo N é diferente.

4.3.4. Espectros de RMN-C13 de d-manose, octadecilamina e octadecilamina manosilada

Em seguida, foram obtidos os espectros de RMN-C13 de d-manose, octadecilamina e octadecilamina manosilada, sólidas (Figs. 26; 27; 28).

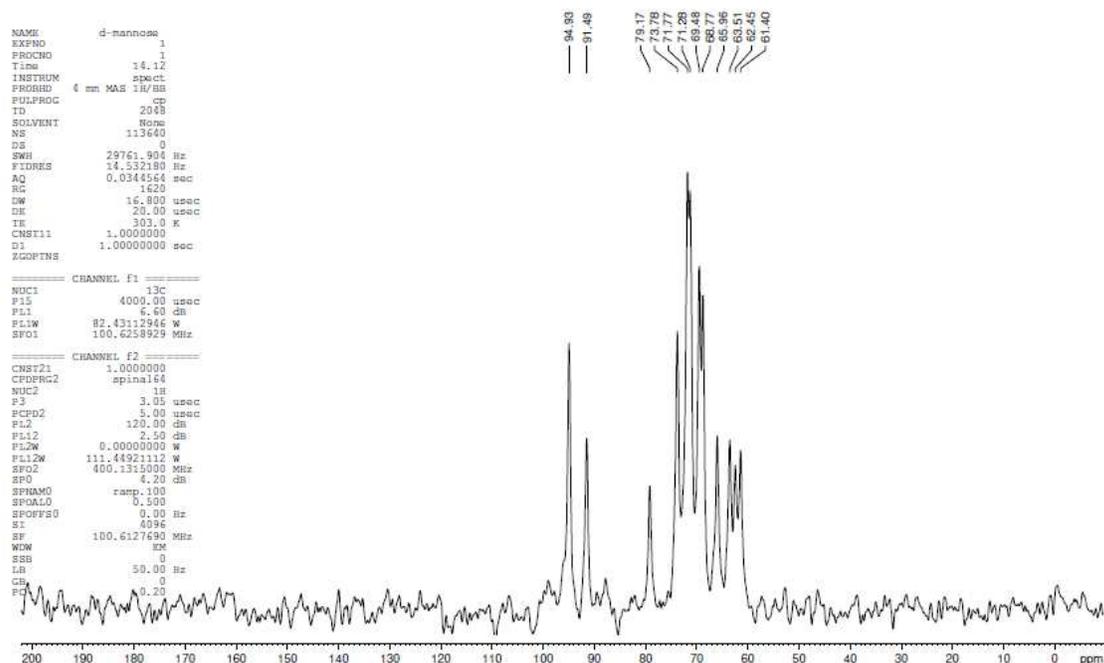


Fig. 26. Espectro de RMN-C13 de d-manose sólida.

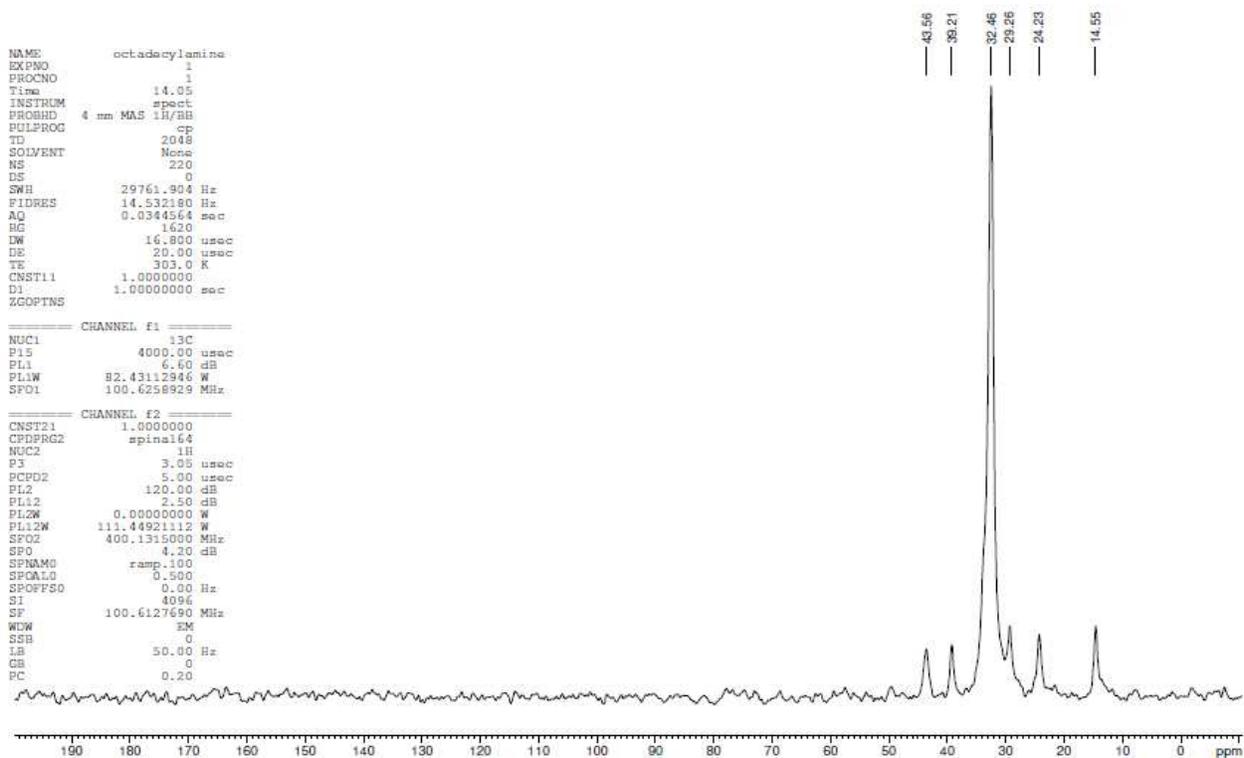


Fig. 27. Espectro de RMN-C13 de octadecilamina sólida.

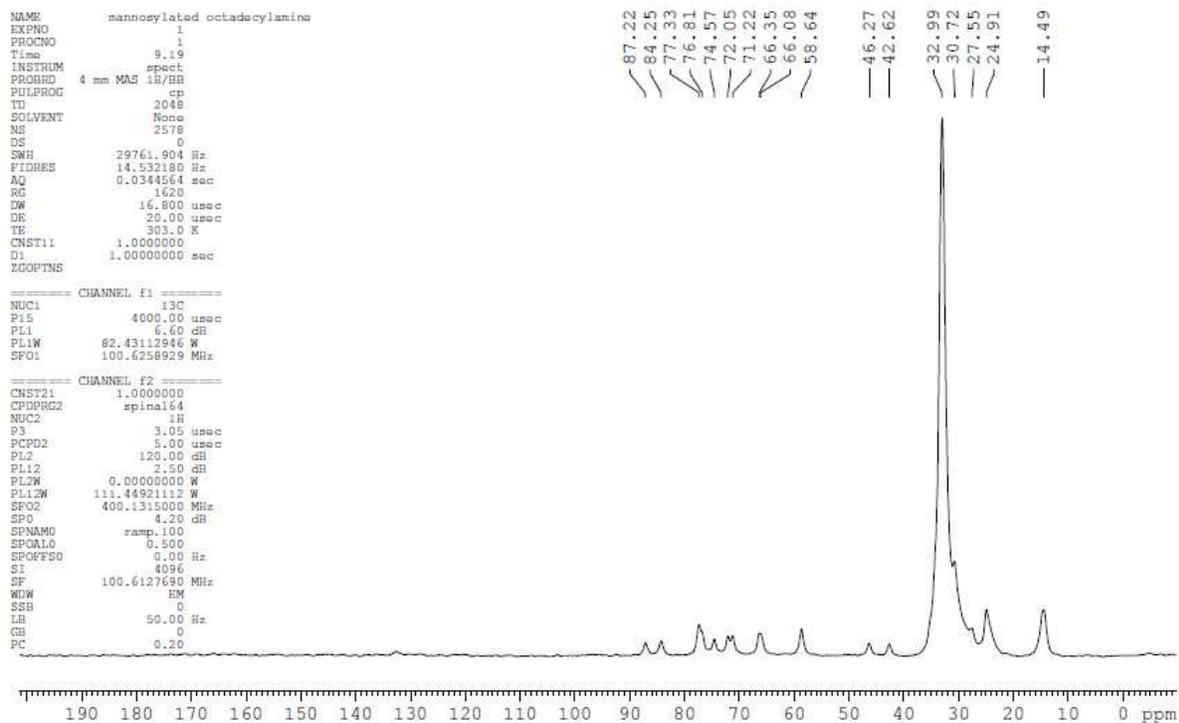


Fig. 28. Espectro de RMN-C13 de octadecilamina manosilada sólida.

d-manose apresentou 12 sinais entre 61,40ppm e 94,93ppm. Como cada molécula de d-manose possui 6 átomos de carbono, provavelmente, 6 sinais são devidos à forma α e os outros 6 à β . Octadecilamina apresentou 6 sinais entre 14,55ppm e 43,56ppm. Como os deslocamentos químicos dos dois compostos estão em regiões diferentes e não se sobrepõem, o espectro da octadecilamina manosilada deverá ser uma combinação dos espectros de octadecilamina e de d-manose. O espectro de RMN-C13 da octadecilamina manosilada sólida apresentou 17 sinais entre 14,49ppm e 87,22ppm. O sinal em 32,99ppm foi tão intenso quanto aquele em 32,46ppm da octadecilamina e provém da cadeia carbônica do surfatante. Os sinais entre 14,49ppm e 46,27ppm da octadecilamina manosilada provém da parte da cadeia carbônica da octadecilamina e os sinais entre 58,64ppm e 87,22ppm são devidos à d-manose.

4.3.5. Espectros no IV de d-manose, octadecilamina e octadecilamina manosilada

Para complementar a caracterização da octadecilamina manosilada foram obtidos os espectros no IV entre 400cm^{-1} e 4000cm^{-1} deste composto, da d-manose e da octadecilamina (Fig. 29).

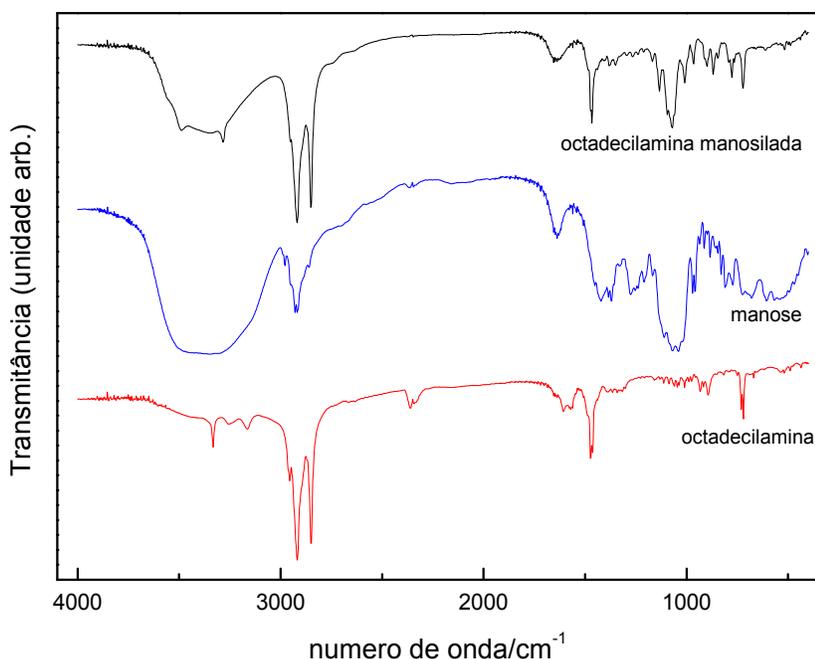


Fig. 29. Espectro no IV de octadecilamina manosilada; d-manose; octadecilamina.

O espectro da octadecilamina manosilada é combinação daqueles da d-manose e da octadecilamina. As similaridades entre os espectros da octadecilamina manosilada e da d-manose ocorrem entre 3100cm^{-1} e 3600cm^{-1} e em 1081cm^{-1} . A primeira banda, larga, é atribuída ao estiramento do grupo OH e a segunda corresponde ao estiramento do grupo CO, ambos da manose (SDBS). Comparando os espectros da octadecilamina manosilada e da octadecilamina observa-se bandas próximas em 2850cm^{-1} e 2920cm^{-1} e outra em 1470cm^{-1} . As duas primeiras podem ser atribuídas ao estiramento CH e a última à deformação angular CH_2 , ambos da cadeia de surfatante (SDBS).

4.4. Produção de NLS utilizando planejamento fatorial 2^3 com ponto central

Os experimentos para produzir NLS consistiram inicialmente na mistura de vários reagentes em diferentes proporções, com temperatura e velocidades de agitação variadas. Isto foi realizado para saber quais seriam os reagentes mais adequados para produzir as NLS e a condição que possibilitaria obter a formulação. É muito difícil otimizar uma formulação fazendo alterações intuitivas nas velocidades de agitação, temperaturas e concentrações dos reagentes. Estas formulações exigem proporções apropriadas de surfatantes e co-surfatantes para as matrizes lipídicas, além das condições experimentais, como temperatura e velocidade de agitação, que devem ser otimizadas. Por isto planejamentos experimentais são indispensáveis neste tipo de trabalho. Nos experimentos iniciais não foram adicionados fármacos, pois o objetivo era apenas obter NLS. Dentre os experimentos realizados aquele feito com ácido esteárico (AE) como matriz lipídica, lecitina de soja (Lipoid-S75), Tween 80 (T80) e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) como surfatantes e n-butanol como co-surfatante, foi o que apresentou resultado mais promissor. Foi verificado no decorrer do trabalho que a concentração de surfatantes era um dos fatores que mais influenciava o diâmetro e índice de polidispersidade das NLS. Assim, fixando todos os parâmetros e variando apenas a concentração de surfatantes foi feito um planejamento fatorial 2^3 , com ponto central. A otimização dos experimentos foi monitorada via medidas de diâmetro de nanopartículas, PDI e potencial Zeta, por espalhamento dinâmico de luz (DLS). Esta técnica é de fácil aplicação e os resultados são

obtidos rapidamente. A Tabela 3 mostra as massas dos surfatantes em gramas usadas no planejamento fatorial 2^3 com ponto central.

Tabela 3. Massas dos surfatantes (g) relativas aos níveis do planejamento fatorial 2^3 com ponto central.

Surfatante	Nível		
	-	0	+
T80 (g)	0,10	0,15	0,20
Lec (g)	0,10	0,15	0,20
CTAB (g)	0,10	0,15	0,20

Os parâmetros mantidos fixos foram temperaturas, velocidades de agitação, tempos de agitação, volumes de água e de n-butanol: temperatura do frasco 1 (T_1) 75-80 °C; temperatura do frasco 2 (T_2) 2–3 °C; tempo de agitação do frasco 1 (t_1) 5 min; tempo de agitação do frasco 2 (t_2) 10 min; volume do frasco 1 (V_1) 10,00 mL; volume do frasco 2 (V_2) 90,00 mL; volume de butanol 1,00 mL, velocidade de agitação do frasco 1 (v_1) 3200 rpm; velocidade de agitação do frasco 2 (v_2) 3200 rpm. Conforme os experimentos eram realizados estes parâmetros também iam sendo ajustados. Os resultados estão na Tabela 4.

Tabela 4. Diâmetro médio (nm), Potencial Zeta (mV) e Índice de Polidispersidade (PDI) obtidos com o planejamento experimental 2^3 com ponto central.

Formulação	Níveis			Resultados		
	Lec	T80	CTAB	Diâmetro médio (nm)	Zeta (mV)	PDI
1	-	-	-	573,1	21,7	0,45
2	+	-	-	720,2	46,3	0,70
3	-	+	-	351,0	46,8	0,44
4	+	+	-	288,7	43,6	0,48
5	-	-	+	197,6	25,3	0,56
6	+	-	+	193,7	11,1	0,42
7	-	+	+	219,2	47,7	0,44
8	+	+	+	166,2	49,2	0,56
9	0	0	0	255,6	52,1	0,58

Lec: Lecitina de soja (Lipoid-S75); T80: Tween 80; CTAB: brometo de cetiltrimetilamônio

Esta Tabela mostra que, entre os três parâmetros, o que mais sofre variação com a concentração dos surfatantes é o diâmetro das nanopartículas e que entre os surfatantes

aquele que mais influenciou o diâmetro das nanopartículas foi o CTAB. Para as formulações com menor concentração de CTAB (experimentos 1; 2; 3; 4) o diâmetro das NLS foi maior. Nos experimentos com maior concentração de CTAB (experimentos 5; 6; 7; 8) o diâmetro das NLS foi bem menor, mas ainda não adequado para injeção parenteral devido ao grande valor do PDI. O potencial Zeta parece independer de concentrações mais elevadas do CTAB, pois nos menores níveis os potenciais eram tão elevados quanto aqueles dos maiores. O valor de PDI foi grande para todas as amostras e não foi possível reduzi-lo para menos de 0,20 (valor para amostra monodispersa). A Tabela 2 foi utilizada para realizar os cálculos dos efeitos principais nos diâmetros e verificar a influência dos surfatantes entre os níveis, o que está mostrado na Tabela 5. Os efeitos cruzados não foram calculados.

Tabela 5. Efeitos no diâmetro.

	Diâmetros (nm)
Média Global	329,5 (\pm 40,2)
LEC	7,0 (\pm 85,2)
T80	-164,9 (\pm 85,2)
CTAB	-289,1 (\pm 85,2)

LEC: Lecitina (Lipoid-S75); T80: Tween 80; CTAB: Brometo de cetiltrimetilamônio

Os erros nos efeitos foram grandes porque os experimentos foram realizados apenas uma vez, para cada nível. Se fossem realizados em duplicata ou triplicata teriam sido menores. Nestas condições o modelo linear explica 96,8% da região estudada. Com modelos de segundo ou terceiro grau este resultado teria sido melhor, mas aumentaria o número de experimentos que deveriam ser realizados. Esta Tabela mostra que a variação entre os níveis de LEC causa alteração de apenas 7,0 nm no diâmetro das NLS, mostrando que este parâmetro já está otimizado. Em relação ao T80 e CTAB pode ser visto que com o aumento das concentrações houve uma diminuição significativa no diâmetro, que para T80 foi -164,9 nm e para CTAB -289,1 nm. Como CTAB apresentou valor mais pronunciado, isto indica que este surfatante teve maior importância para a redução do diâmetro. Assim, para reduzir o diâmetro das NLS deve-se aumentar as concentrações de CTAB e T80, mas não a de LEC.

Com finalidade de melhorar estes parâmetros foi empregada a metodologia de modelagem e deslocamento. Com os níveis do planejamento experimental 0, -1 e +1 e os resultados da Tabela 2 foram encontradas equações lineares para modelar o diâmetro de partículas, potencial Zeta e PDI. Devido ao truncamento realizado nestas expressões, considerando-as como de grau 1 em relação à massa de cada surfatante, os parâmetros calculados não foram idênticos aos obtidos experimentalmente. As expressões lineares foram obtidas utilizando o Programa Estatística 7.0 (Eq. 23; 24; 25):

$$\text{Diâmetro} = 3,488(\text{Lec}) - 82,438(\text{T80}) - 144,537(\text{CTAB}) + 329,478 \quad (23)$$

$$\text{Zeta} = 1,08750(\text{Lec}) + 10,36250(\text{T80}) - 3,13750(\text{CTAB}) + 38,2000 \quad (24)$$

$$\text{PDI} = 0,033125(\text{Lec}) - 0,025875(\text{T80}) - 0,010625(\text{CTAB}) + 0,513222 \quad (25)$$

Considerando que o principal parâmetro a ser ajustado era o diâmetro, a Eq. 23 foi utilizada para o deslocamento no planejamento experimental, cujo objetivo é seguir a direção de máxima inclinação, visando otimizar o parâmetro selecionado. O tratamento matemático para a otimização consistiu em dividir todos os coeficientes desta expressão pelo coeficiente do CTAB, -144,537.

Lec	T80	CTAB
$\frac{3,488}{-144,537} = -0,024$	$\frac{-82,438}{-144,537} = 0,570$	$\frac{-144,537}{-144,537} = 1,000$

Estes valores foram multiplicados por 0,05, que é a diferença de massa entre o nível central e os níveis -1 ou +1 (Tabela 3).

Lec	T80	CTAB
$-0,024 * 0,05 = -0,001$	$0,570 * 0,05 = 0,029$	$1,000 * 0,05 = 0,050$

Os quatro deslocamentos foram obtidos pela multiplicação de cada conjunto destes valores por 1, 2, 3 e 4. A massa a ser usada em cada deslocamento é conhecida somando

estes valores à 0,15 que é a massa relativa ao ponto central do planejamento experimental.

<u>Centro + 1 Δ</u>		
Lec	T80	CTAB
$-0,001*1 + 0,150 = 0,149$	$0,029*1 + 0,150 = 0,179$	$0,050*1 + 0,150 = 0,200$
<u>Centro + 2 Δ</u>		
Lec	T80	CTAB
$-0,001*2 + 0,150 = 0,148$	$0,029*2 + 0,150 = 0,208$	$0,050*2 + 0,150 = 0,250$
<u>Centro + 3 Δ</u>		
Lec	T80	CTAB
$-0,001*3 + 0,150 = 0,147$	$0,029*3 + 0,150 = 0,237$	$0,050*3 + 0,150 = 0,300$
<u>Centro + 4 Δ</u>		
Lec	T80	CTAB
$-0,001*4 + 0,150 = 0,146$	$0,029*4 + 0,150 = 0,266$	$0,050*4 + 0,150 = 0,350$

Os resultados destes deslocamentos estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6. Massas (g) dos surfatantes correspondentes aos 4 deslocamentos em relação à do ponto central.

	Lec	T80	CTAB
Centro + 1Δ	0,149	0,179	0,200
Centro + 2Δ	0,148	0,208	0,250
Centro + 3Δ	0,147	0,237	0,300
Centro + 4Δ	0,146	0,266	0,350

Lec: Lecitina (Lipoid-S75); T80: Tween 80; CTAB: Brometo de cetiltrimetilamônio.

Os resultados obtidos para o tamanho de partículas, potencial Zeta e PDI utilizando os dados da Tabela 6, estão na Tabela 7.

Tabela 7. Diâmetro (nm), Potencial Zeta (mV) e PDI relativos aos 4 deslocamentos no planejamento experimental.

	Diâmetro	Zeta	PDI
Centro + 1Δ	141,0	21,8	0,50
Centro + 2Δ	119,0	50,5	0,24
Centro + 3Δ	109,9	41,2	0,23
Centro + 4Δ	100,9	42,9	0,21

Diâmetro (nm); Zeta: Potencial Zeta (mV); PDI: Índice de Polidispersidade

Nestes deslocamentos a massa de lecitina ficou constante e a de T80 aumentou muito pouco, mostrando que a quantidade destes surfatantes já é quase suficiente para obter NLS e variações em suas massas não melhoram os resultados. CTAB foi o surfatante que teve maior variação na massa, pois de 0,15 g no ponto central deslocou-se para 0,35 g no quarto ponto, equivalente a um aumento de quase 133%. Isto evidencia a importância do aumento da massa deste surfatante para a formulação.

A Tabela 7 mostra que a otimização, além de diminuir o tamanho das partículas, também ajustou os valores de PDI. Os experimentos centro+2 Δ , centro+3 Δ e centro+4 Δ apresentaram valores de PDI aceitáveis para injeção parenteral. Caso o desejo seja reduzir ainda mais este parâmetro, pode-se filtrar as amostras em papel filtro de pequeno corte molecular (1,00 μ m) ou submetê-las ao homogeneizador de alta pressão. Quando estas formulações foram armazenadas para verificar a estabilidade temporal, as formulações centro+1 Δ e centro+2 Δ sofreram coalescência em menos de uma semana, enquanto as formulações centro+3 Δ e centro+4 Δ permaneceram estáveis por pelo menos um mês. Esta estabilidade é uma grande vantagem porque não há necessidade de realizar liofilização para armazenar as amostras, pois é difícil reproduzir as NLS originais ao ressuspender o pó liofilizado. Para injeção parenteral NLS não podem possuir tamanho elevado devido à obstrução dos capilares sanguíneos. Na ressuspensão do pó liofilizado de NLS muitas partículas ficam maiores que 1,00 μ m devido à aglomeração, obstruindo capilares sanguíneos. Além disto, a liofilização seria um processo a mais a ser empregado, aumentando o custo de produção das NLS. Os valores de potencial Zeta foram muito similares aos do planejamento experimental, mostrando que este parâmetro chegou ao limite, mesmo aumentando a quantidade de CTAB.

A Fig. 30 apresenta o diâmetro das NLS para o planejamento experimental completo 2³ com ponto central e os 4 deslocamentos realizados, fornecendo uma visão geral da região de concentração dos surfatantes para o planejamento experimental e aquela dos quatro deslocamentos para obter os parâmetros otimizados.

Os experimentos poderiam ter sido feitos em duplicata ou triplicata seguido de um tratamento estatístico (para verificar a significância). Isto não foi feito porque o objetivo não é o desenvolvimento de modelos matemáticos, mas sim a obtenção de NLS adequadas para injeção parenteral. O planejamento experimental foi uma ferramenta eficiente para

obter NLS porque, além de requerer um número relativamente pequeno de experimentos, permitiu compreender os resultados. Foi tentado, sem sucesso, obter NLS aniônicas utilizando Tween 80, Lecitina e Pluronic 68 como surfatantes e ácido esteárico como matriz lipídica, sendo observado separação de fases entre um gel e uma solução transparente.

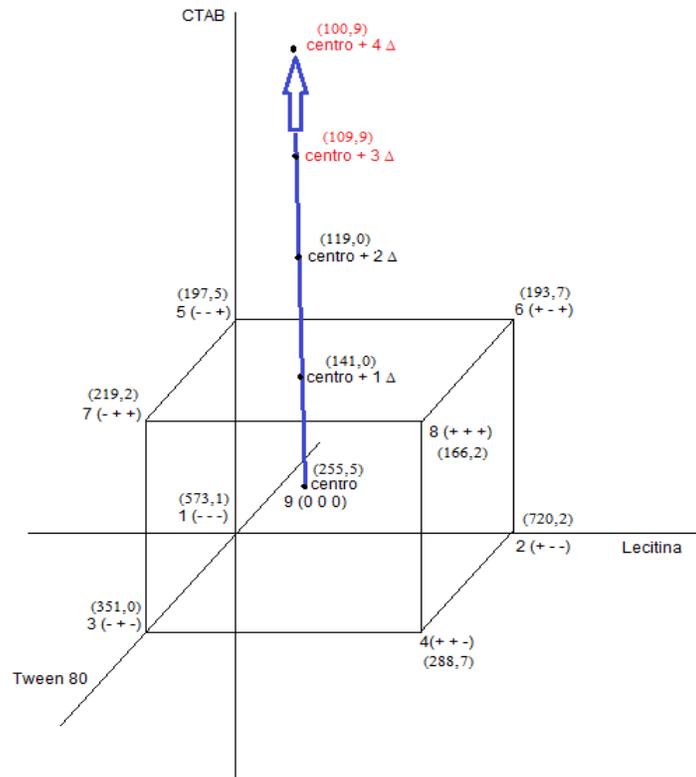
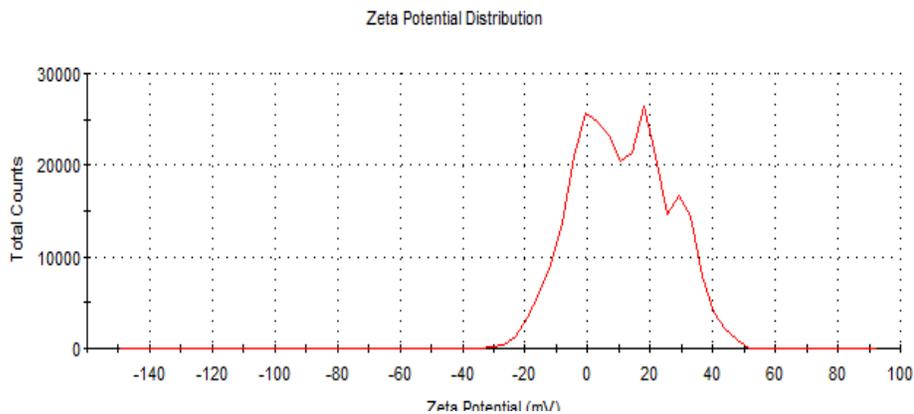


Fig. 30. Representação do planejamento experimental 2^3 com ponto central, deslocamentos realizados, níveis e diâmetros das NLS.

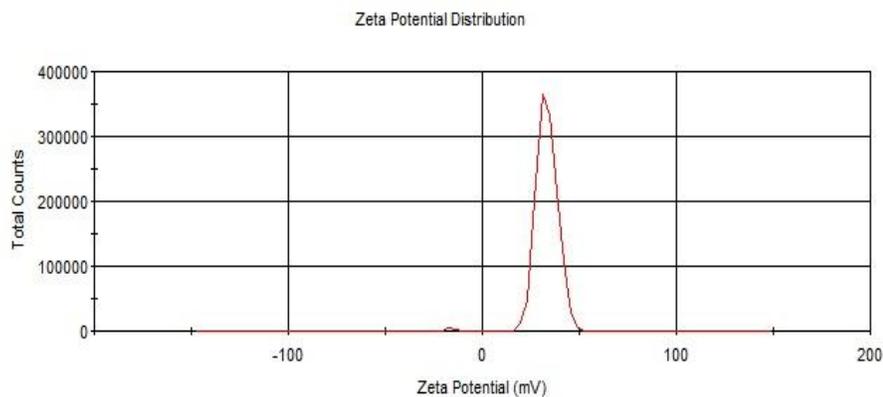
4.5. Irregularidades no potencial Zeta: tensão interfacial, estabilidade estérica e força de repulsão coulômbica

No decorrer dos trabalhos foram feitas diferentes formulações com mistura de lipídios. Além do ácido esteárico (AE) foram utilizados ácido mirístico (AM) e Compritol 888 ATO (COM). Nas formulações que foram feitas com ácido esteárico ou misturas de ácidos

esteárico e mirístico, as curvas de potencial Zeta formaram um pico largo e irregular, indicando que a distribuição de carga superficial não era homogênea. Nas formulações em que foram utilizados ácido esteárico e Compritol 888 ATO as curvas de potencial Zeta foram intensas, estreitas e bem definidas. Estas formulações foram estáveis por pelo menos um mês. A Fig. 31 compara as curvas de dois potenciais Zeta das formulações: Fig. 31 a) 50%AE/50%AM, contendo EFV e Fig. 31 b) 60%AE com 40%COM, contendo SQV.



(a)



(b)

Fig. 31. Potencial Zeta. a) 50%AE/50%AM+EFV; b) 60%AE/40%COM+SQV.

Três fatores principais são os responsáveis pela estabilidade destas formulações: repulsão eletrostática, estabilidade estérica e redução na tensão interfacial. Neste caso a redução da tensão interfacial é evidente, devido aos surfatantes e n-butanol na superfície das nanopartículas. A estabilidade das formulações que apresentaram curvas de potencial Zeta largas e irregulares provavelmente é devida à fatores estéricos das cadeias de polisorbato do T80 que impedem o contato do meio externo com a superfície lipídica das NLS. No caso da formulação 60%AE/40%COM+SQV, além da estabilidade estérica ocorre também contribuição da repulsão eletrostática causada por CTAB. Uma suposição para o potencial Zeta da formulação 60%AE/40%COM ter se tornado homogêneo pode ser obtida comparando a natureza química dos lipídios. O AE e o AM são ácidos graxos e possuem grupo carboxílico -COOH que pode ser ionizado a carboxilato -COO⁻. Isto pode ter ocorrido porque o pH das formulações é quase 3 o que evidencia a ionização destes grupos. A carga negativa do carboxilato contrabalança a positiva do CTAB impedindo uma distribuição homogênea da carga. Compritol é um triglicerídeo, não possui prótons ionizáveis. Assim, aumentando a concentração deste lipídio diminui o número de grupos -COO⁻ fazendo prevalecer a carga positiva do CTAB. No caso das formulações de ácido esteárico e mistura AE+AM a carga positiva do CTAB não prevalece sobre as negativas dos grupos -COO⁻. O resultado final do balanceamento entre estas cargas negativas e positivas é a distribuição não homogênea da carga na superfície das nanopartículas.

4.6. Comprovação da ligação de octadecilamina manosilada às NLS

Como a produção de NLS manosiladas envolveu alta temperatura e agitação em alta velocidade, o próximo passo foi comprovar a existência de octadecilamina manosilada nas formulações. Para isto foi produzida uma formulação sem fármaco. Pequena quantidade desta formulação foi secada sob fluxo de nitrogênio seguida de evaporação da água restante, à 40°C durante 2 dias. Após, uma alíquota foi dissolvida em metanol grau HPLC e injetada no espectrometro de massas como anteriormente. O sinal esperado em 432 não foi observado, mas apenas um sinal muito intenso em 284, devido ao CTAB, suprimindo os sinais dos demais compostos da amostra. Isto ocorre porque este surfatante contém 3 grupos metil ligados a um átomo de nitrogênio, além da cadeia

carbônica. Devido a isto, a carga positiva muito intensa do átomo de nitrogênio suprime os sinais das demais moléculas ionizadas com prótons. Na tentativa de resolver esta questão a amostra foi lavada 3 vezes com água deionizada para tentar eliminar CTAB e novamente injetada no espectrômetro de massas. Apareceu um pequeno sinal em 432 e outro em 270 provenientes da octadecilamina manosilada e da octadecilamina, respectivamente (Fig. 32).

Seria interessante eliminar completamente o CTAB ou extrair a octadecilamina manosilada não manipulando muito a amostra. Com o procedimento citado, pode ter ocorrido eliminação da octadecilamina manosilada junto com CTAB e um pouco de d-manose pode ter sido oxidada ou eliminada do surfatante. Realizar uma análise quantitativa também será muito difícil, visto a baixa solubilidade deste compostos nos solventes utilizados. No entanto, o mais importante foi observar que octadecilamina manosilada ainda persiste, mesmo com todos os procedimentos experimentais empregados na produção das NLS.

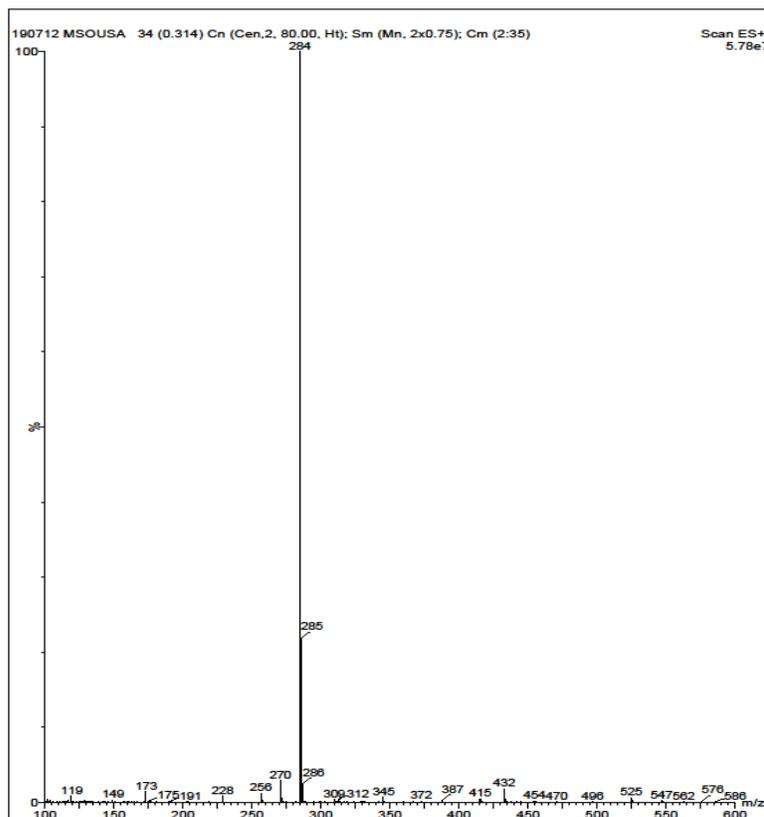


Fig. 32. Espectro de massas da amostra contendo octadecilamina manosilada: sinal em 432 indica octadecilamina-manosilada.

4.7. Aplicação da formulação desenvolvida para Nevirapina (NVP), Saquinavir (SQV) e Efavirenz (EFV)

4.7.1. Diâmetro, Índice de Polidispersidade (PDI) e Potencial Zeta das NLS

A formulação utilizada para encapsular os fármacos foi a conseguida com o deslocamento centro+3 Δ , pois apresentou NLS com diâmetro adequado para injeção parenteral, PDI menor que 0,25, menor quantidade de CTAB e foi estável por pelo menos 1 mês.

A partir desta formulação foram desenvolvidas outras, com objetivo de reduzir a quantidade de n-butanol e aumentar a EE%. Butanol reduz a tensão interfacial evitando coalescência e para isto é preciso que a proporção (m:m) de n-butanol para ácido esteárico fique entre 2,3 e 2,9 (Kuo, 2011). No início deste trabalho houve tentativa de não usar n-butanol, mas em pouco tempo ocorria coalescência. Isto foi feito porque este álcool possui toxicidade para humanos e a injeção máxima permitida diariamente é 50mg (EMEA, 2009). Os lipídios utilizados na mistura com ácido esteárico foram ácido mirístico e Compritol 888 ATO. Com esta mistura a matriz das nanopartículas fica mais desestruturada, permitindo que maior quantidade de fármaco seja incorporada. A Tabela 8 apresenta a composição destas formulações.

Tabela 8. Composição percentual das formulações lipídicas.

	AE(%)	AM(%)	COM(%)	LEC(%)	T80(%)	CTAB(%)	But(%)	H ₂ O(%)
100%AE	3,75	-	-	1,10	1,78	2,25	8,51	82,61
50%AE/50%AM	1,95	1,95	-	1,15	1,85	2,34	4,87	85,89
60%AE/40%COM	2,32	-	1,55	1,14	1,83	2,32	5,82	85,02

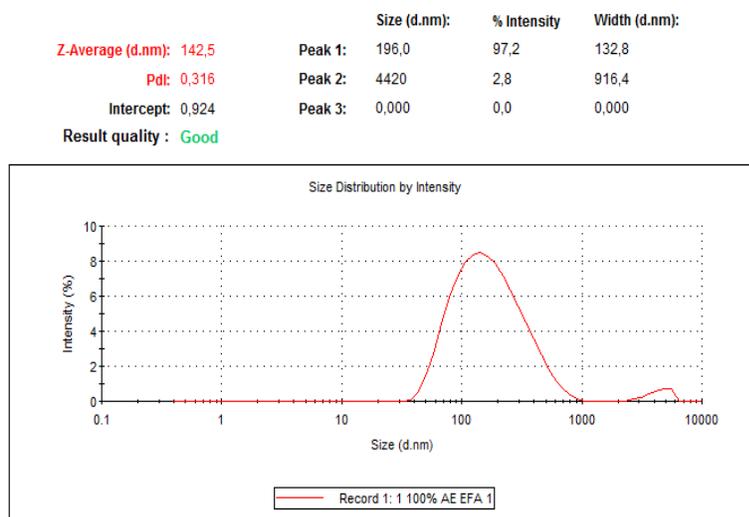
A Tabela 9 apresenta os valores de diâmetro de partículas, PDI e potencial Zeta das formulações com EFV, SQV e NVP.

Tabela 9. Diâmetro (nm), PDI e potencial Zeta (mV) das formulações de NLS com EFV, SQV e NPV, monitoradas durante um mês, em temperatura ambiente.

	1 dia			1 semana			1 mês		
	Diâmetro	Zeta	PDI	Diâmetro	Zeta	PDI	Diâmetro	Zeta	PDI
EFV									
100% AE *	142,5	4,17	0,316	186,8	1,66	0,402	143,7	0,79	0,275
50%AE/50%AM*	117,1	5,31	0,380	129,7	24,20	0,414	115,3	17,70	0,385
SQV									
100% AE *	112,4	49,50	0,204	116,4	5,05	0,243	114,9	0,42	0,205
50%AE / 50% AM *	132,1	8,85	0,503	144,1	1,88	0,691	150,5	0,74	0,523
60% AE /40% COM	110,6	33,00	0,357	108,6	34,30	0,414	2620**	32,40	1,000
NVP									
100 % AE *	135,5	0,586	0,252	122,2	1,44	0,205	130,1	38,70	0,231
60%AE/40%COM	128,7	33,20	0,239	174,1	20,00	0,265	182,2	27,00	0,274

*partículas com potencial Zeta muito pequeno. ** partículas muito grandes para injeção parenteral.

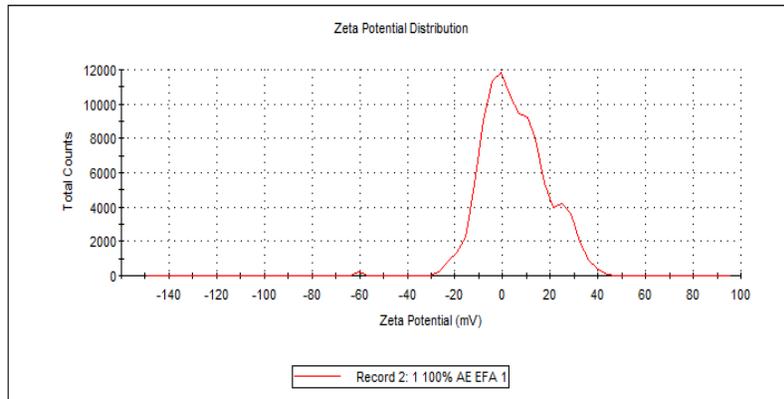
As Fig. 33 a) e b) contem os gráficos obtidos, respectivamente, para o diâmetro e potencial Zeta da formulação 100%AE+EFV e as Fig. 34 a) e b) os mesmos resultados para 100%AE+NPV no primeiro dia da análise.



(a)

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 4,17	Peak 1: 2,19	85,3	10,3
Zeta Deviation (mV): 22,1	Peak 2: 27,1	14,5	4,97
Conductivity (mS/cm): 0,202	Peak 3: -60,3	0,2	6,74e-7

Result quality : See result quality report

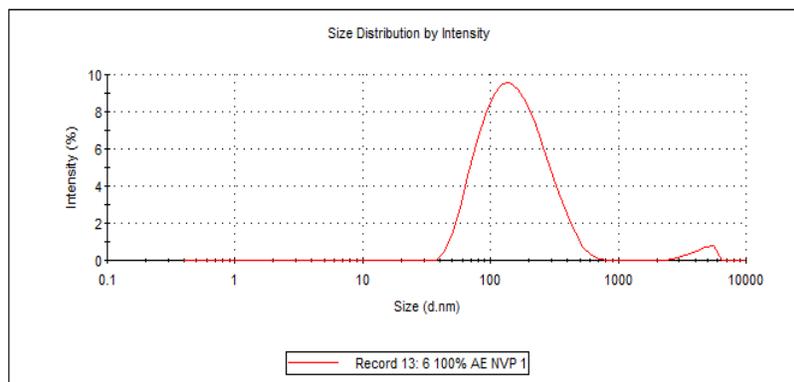


(b)

Fig. 33. Gráficos de: a) diâmetro e b) potencial Zeta da formulação 100%AE+EFV.

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 135,5	Peak 1: 171,1	97,4	99,09
PdI: 0,252	Peak 2: 4543	2,6	858,8
Intercept: 0,908	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

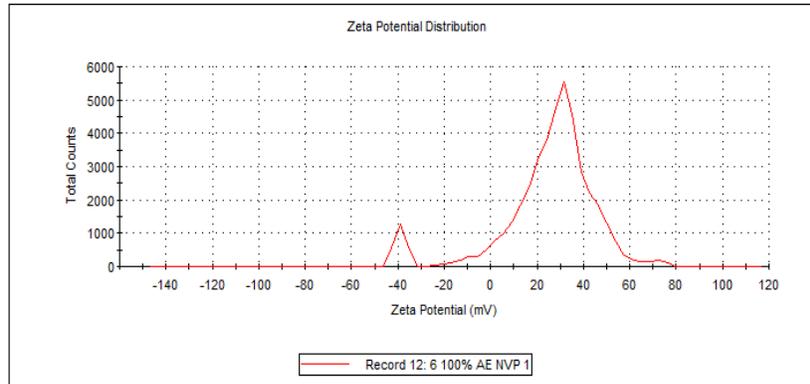
Result quality : Good



(a)

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 0,586	Peak 1: 28,1	93,1	14,2
Zeta Deviation (mV): 91,9	Peak 2: -39,1	5,5	2,55
Conductivity (mS/cm): 0,235	Peak 3: 70,2	1,4	3,88

Result quality : [See result quality report](#)



(b)

Fig. 34. Gráficos de: a) diâmetro e b) potencial Zeta da formulação 100%AE+NVP.

Em ambos os gráficos para o diâmetro das nanopartículas, um pequeno pico indica existir NLS com tamanho por volta de 900,00 nm. Estas nanopartículas tem grande influência no aumento da PDI. O valor do potencial Zeta indica a estabilidade da formulação.

Para EFV foram usadas NLS utilizando somente ácidos graxos. Na formulação 60%AE/40%COM o tamanho dos NLS foi grande e inadequado para injeção parenteral (diâmetro 404,4nm e PDI 0,504). Isto provavelmente ocorreu porque a interação entre EFV e COM torna incompatível a formação desses nanocarregadores. No início dos experimentos foi verificado que mesmo em altas temperaturas, este fármaco não se solubilizava bem no COM fundido e isto pode ser um dos motivos da instabilidade anotada. A formulação 50%AE/50%AM foi aplicada a NVP e forneceu resultados tão bons quanto aqueles da Tabela 9, mas não houve aumento na EE%, sendo descartada. A formulação descrita na Tabela 9 e que não permaneceu estável durante um mês foi aquela feita com 60%AE/40%COM contendo SQV. Da mesma maneira que ocorreu para EFV, SQV era muito pouco solúvel em COM fundido. Todavia, diferentemente do que ocorreu com EFV esta formulação permaneceu estável por, pelo menos, uma semana. Esta formulação usada com NPV foi estável durante pelo menos um mês por que a EE% é

pequena, indicando que pequena quantidade de NPV está solubilizada na matriz lipídica, não interferindo na estabilidade da formulação. A Tabela 9 mostra que, no período de um mês, seis formulações ficaram estáveis e com diâmetros adequados para administração endovenosa, embora ocorra pequeno aumento no diâmetro e na PDI. A redução do diâmetro pode ser feita mediante passagem da amostra em filtros com diâmetro de poro 1,20µm ou com uso de homogeneizador de alta pressão. A segunda opção seria a mais conveniente no caso de escalonamento da produção. As formulações contendo apenas AE ou com AM apresentaram curvas de potencial Zeta de pequena intensidade, com picos largos e, em alguns casos, irregulares com o decorrer do tempo. Isto foi corrigido pela adição de 40% (em massa) de COM à formulação. No entanto, valores elevados e uniformes do potencial Zeta não foram suficientes para que a formulação permanecesse estável por longos períodos, pois na formulação 60%AE/40%COM + SQV as NLS aumentaram de tamanho no período de um mês. Possivelmente, a estabilidade das atuais NLS se deve à estabilização estérica havendo também contribuição do n-butanol reduzindo a tensão interfacial entre o meio e as NLS. Outro ponto a ser considerado é que a estabilidade das NLS também depende da interação fármaco e lipídio e uma dada formulação pode ser não adequada para determinado fármaco, mas útil para outros.

4.7.2. Diâmetro, Índice de Polidispersidade e Potencial Zeta das NLS manossiladas

As NLS manossiladas foram produzidas de modo diferente do descrito na literatura (Jain, 2008; Jain, 2010). Nestas referências a d-manose é adicionada à superfície das NLS em meio tamponado, utilizando a metodologia de Mitchell (Mitchell, 1999), sendo necessária grande quantidade de d-manose para ocorrer a reação. Nesses trabalhos a caracterização foi feita de maneira qualitativa e não há menção sobre o rendimento desta reação. Nesta Tese primeiro a d-manose foi ligada à octadecilamina para depois ser adicionada às NLS. Pequena quantidade de octadecilamina manossilada foi dissolvida na solução aquecida de surfatantes antes de serem adicionados o fármaco e lipídios fundidos. Foram adicionados 0,025 g de octadecilamina manossilada às formulações de 40%AE/40%AM/20%COM e 0,05 g às demais. A adição de 0,05 g deste composto para a formulação de 40%AE/40%AM/20%COM tornava as NLS grandes e inadequadas para

uso parenteral. Os diâmetros e PDI obtidos foram, respectivamente, 5000 nm e 1,00 para a formulação com EFV e 805,2 nm e 0,705 para aquela com SQV. A mudança realizada no procedimento experimental em relação às NLS anteriores foi o uso de tampão fosfato pH 7,40 10,00 mM à 2-3°C ao invés de água gelada. Isto foi feito para evitar reação de hidrólise em meio ácido da manose, com subsequente saída da superfície das NLS. O pH das amostras contendo NLS produzidas anteriormente, em geral, era menor que 3 sendo esta uma possível condição para a d-manose se desligar da octadecilamina. O pH final das formulações manosiladas foi aproximadamente 5 e manose permaneceu ligada à octadecilamina. Algumas alterações também foram feitas nas formulações contendo AE e AE+AM. Como a adição de 40% de COM às NLS tornava o potencial Zeta positivo e homogêneo, foi adicionado a estas formulações 20% deste lipídio. Não houve aumento acentuado do potencial Zeta mas este ficou mais homogêneo. A Tabela 10 apresenta a porcentagem dos reagentes utilizados na produção das NLS manosiladas.

Tabela 10. Composição percentual, em massa, das formulações contendo NLS manosiladas.

	AE(%)	AM(%)	COM(%)	LEC(%)	T80(%)	CTAB(%)	But(%)	OM	H ₂ O(%)
80%AE/20%COM	3,04	-	0,76	1,12	1,80	2,28	6,90	0,38	83,72
40%AE/40%AM/20%COM	1,57	1,57	0,79	1,16	1,86	2,36	3,95	0,20	86,54
60%AE/40%COM	2,31	-	1,54	1,13	1,82	2,31	5,80	0,38	84,71

AE: ácido esteárico; AM: ácido mirístico; COM: Compritol; LEC: lecitina (Lipoid-S75); T80: Tween80; CTAB: brometo de cetiltrimetilamônio; But: n-butanol; OM: octadecilamina manosilada.

O diâmetro, potencial Zeta e PDI das NLS-manosiladas estão na Tabela 11.

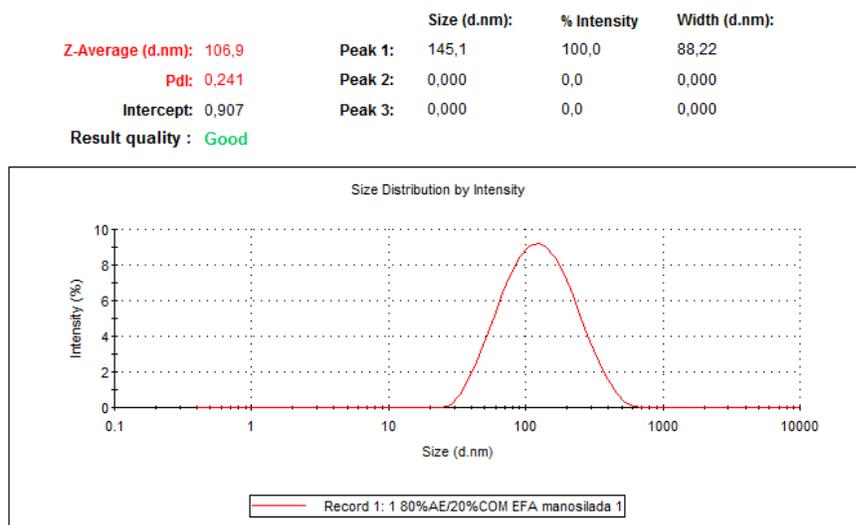
Tabela 11. Diâmetro (nm), PDI e potencial Zeta (mV) das formulações com NLS manosiladas contendo EFV, SQV e NPV, monitoradas durante seis meses em temperatura ambiente.

	1 dia			1 semana			1 mês		
	Diâmetro	Zeta	PDI	Diâmetro	Zeta	PDI	Diâmetro	Zeta	PDI
EFV									
80% AE/20%COM *	106,90	3,43	0,241	143,2	2,83	0,495	120,4	4,66	0,343
40%AE/40%AM/20%COM***	114,2	11,10	0,200	124,1	12,50	0,254	111,0	1,18	0,187
SQV									
80%AE/20%COM	113,30	13,60	0,258	121,5	8,21	0,319	134,7	1,98	0,434
40%AE/40%AM/20%COM***	107,8	4,20	0,201	118,9	0,94	0,249	106,6	1,55	0,190
60% AE /40% COM*	160,90	34,90	0,289	115,6	16,1	0,375	113,5	21,4	0,437
NPV									
80%AE/20%COM	132,60	25,10	0,347	153,3	14,40	0,392	132,5	3,69	0,294
60%AE/40%COM	165,30	18,00	0,252	127,9	21,30	0,450	129,3	14,00	0,332

	3 meses			6 meses		
	Diâmetro	Zeta	PDI	Diâmetro	Zeta	PDI
EFV						
80% AE/20%COM *	104,7	2,53	0,198	131,9	0,71	0,210
40%AE/40%AM/20%COM***	117,4	8,21	0,234	114,1	0,57	0,230
SQV						
80%AE/20%COM	112,3	8,29	0,260	126,7	2,12	0,282
40%AE/40%AM/20%COM***	109,3	12,10	0,191	108,3	0,46	0,182
60% AE /40% COM*	126,7	36,90	0,402	122,4	20,90	0,432
NVP						
80%AE/20%COM	134,4	16,50	0,301	134,9	0,93	0,349
60%AE/40%COM	195,5	18,40	0,291	196,2	10,90	0,293

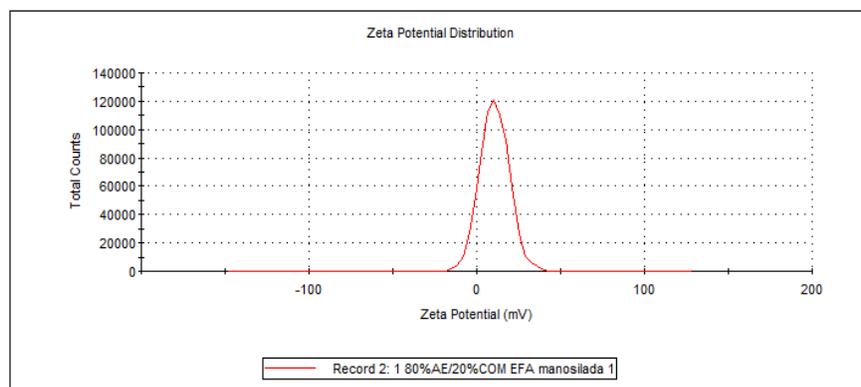
*partículas com potencial Zeta pequeno. *** Formulações contendo 40%AE/40%AM/20%COM + 0,025 g de octadecilamina manosilada.

As NLS manosiladas foram estáveis durante 6 meses, o que é importante para o prazo de validade das amostras. Os diâmetros e potenciais Zeta não sofreram grandes alterações com o tempo. PDI sofreu maior alteração, indicando agregação. As Fig. 35 a) e b) apresentam, respectivamente, o diâmetro e o potencial Zeta das NLS na formulação 80%AE/20%COM+EFV manosilada e as Fig. 36 a) e b) os resultados para a formulação 80%AE/20%COM+SQV manosilada, medidos após o primeiro dia de preparo.



(a)

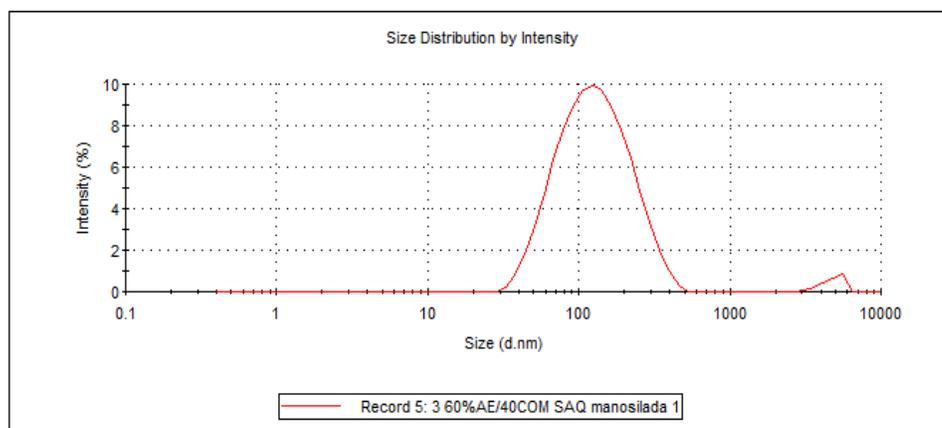
	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 3,43	Peak 1: 10,6	100,0	8,68
Zeta Deviation (mV): 50,5	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,204	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality : Good			



(b)

Fig. 35. Gráficos de: a) diâmetro; b) potencial Zeta das NLS na formulação 80%AE/20%COM+EFV.

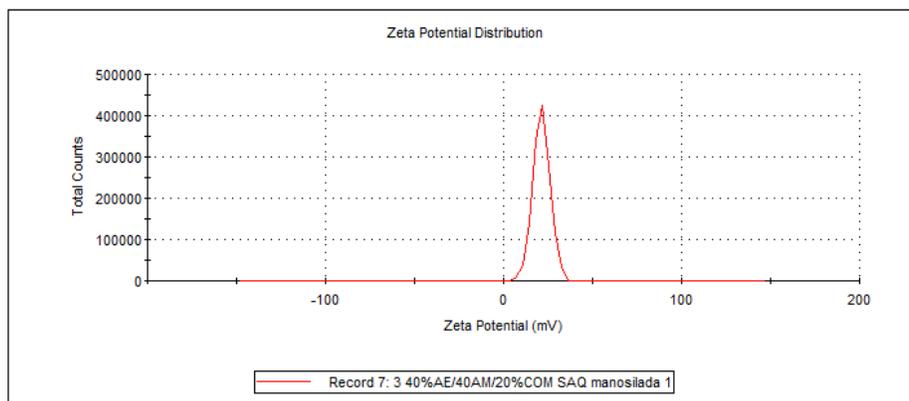
	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 113,3	Peak 1: 141,6	97,9	76,53
Pdl: 0,258	Peak 2: 4847	2,1	702,7
Intercept: 0,903	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



(a)

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 21,2	Peak 1: 21,2	100,0	4,86
Zeta Deviation (mV): 4,86	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 1,23	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



(b)

Fig. 36. Gráficos de: a) diâmetro; b) potencial Zeta das NLS na formulação 80%AE/20%COM+SQV.

As Fig. 35 a) e 36 a) mostram resultados muito similares aos das Figs. 33 a) e 34 a) que se referem às NLS sem manose. A Fig. 36 a) ainda apresentou um pequeno pico, sugerindo a presença de NLS com diâmetro 900,00 nm. As formulações com 20% de COM os potenciais Zeta foram pequenos, e com distribuição superficial homogênea de carga. Como o potencial Zeta é pequeno, conclui-se que a estabilidade das partículas provém da redução da tensão interfacial, devido ao uso de n-butanol e à estabilização estérica devida aos surfatantes. A adição de octadecilamina manosilada aumentou a estabilidade das NLS e pode ter contribuído para reduzir o tempo das transições polimórficas da forma α para forma β' e desta para forma β . Surfatantes também contribuem para retardar estas transições. NLS geralmente estão na forma α (menos cristalina) e quando sofrem transição para β ficam mais cristalinas e, conseqüentemente, aumentam de tamanho. Neste processo pode ocorrer expulsão do fármaco. Nos experimentos iniciais com adição da octadecilamina manosilada, tentou-se utilizar 0,10 g deste composto. O diâmetro destas NLS foi 150,0 nm, o potencial Zeta -0,644 mV e o PDI 0,405 mas estas NLS não ficaram estáveis nem por 3 dias, coalescendo. Caso haja

interesse em aumentar a concentração de octadecilamina manosilada nas NLS o melhor a fazer seria novo planejamento experimental, ou adicionar quantidade fixa deste composto e repetir o mesmo tratamento anterior ou incluir este composto como variável no planejamento experimental. Outra possibilidade também seria substituir algum dos surfatantes usados por octadecilamina manosilada, desenvolver o planejamento e prosseguir com a otimização.

4.7.3. Eficiência de Encapsulação

Os fármacos foram adicionados em quantidades diferentes de acordo com a mistura dos lipídios nas formulações das NLS. Para as formulações 50%AE/50%AM sem manose e 40%AE/40%AM/20%COM manosilada com EFV foram adicionados 0,02 g do fármaco (3,85% em relação à matriz lipídica). Às formulações contendo 100%AE sem manose e 80%AE/20%COM manosilada foram adicionados 0,01g do fármaco (1,96% em relação à matriz lipídica). Para SQV foram adicionados 0,02 g do fármaco em todas as formulações. Foram adicionadas 0,01 g de NVP nas formulações com 60%AE/40%COM e 0,016 g nas demais, equivalente a 1,96% e 3,10%, em relação a matriz lipídica, respectivamente. A Tabela 12 apresenta a eficiência de encapsulação (EE%), em duplicata, para todas as formulações.

Tabela 12. Eficiência de Encapsulação de EFV, SQV e NVP.

	sem manose		com manose			
EFV EE%	100%AE	97,24	97,72	80%AE/20%COM	98,24	96,13
	50%AE/50%AM	97,72	96,36	40%AE/40%AM/20%	97,52	99,15
SQV EE%	100%AE	45,68	47,25	80%AE/20%COM	46,87	55,93
	50%AE/50%AM	44,03	46,44	40%AE/40%AM/20%	28,74	34,96
	60%AE/40%COM	47,12	45,61	60%AE/40%COM	68,59	74,28
NVP EE%	100%AE	20,91	20,47	80%AE/20%COM	19,33	30,96
	60%AE/40%COM	25,76	25,35	60%AE/40%COM	18,40	19,07

As formulações com EFV apresentam maior EE% (96%). Para SQV estes valores foram menores que 50%, exceto para a formulação com 60%AE/40%COM manosilada que apresentou EE% entre 68% e 74%. A formulação com NVP apresentou as menores EE% chegando ao máximo em 25%. Uma possível explicação para estes diferentes resultados está no pH do meio e nas estruturas dos fármacos. Quando as NLS são produzidas com AE e AE+AM o pH final ficou entre 2,5 e 3,0. NVP (massa molar 266,888 g/mol) é uma molécula relativamente pequena, com 4 átomos de nitrogênio e 1 de oxigênio que podem ser protonados (pKa 2,8). SQV tem massa molar 670,841 g/mol, possui 6 átomos de nitrogênio e 5 de oxigênio, passíveis de protonação. Esta molécula possui dois pKas, em 1,1 e em 7,1. EFV possui massa molar 315,675 g/mol, 1 átomo de nitrogênio, 2 de oxigênio que podem ser protonados e pKa 10,20. Provavelmente a EE% é menor nas amostras com NVP e SQV porque possuem mais átomos protonáveis e pKas menores. Assim, nos meios ácidos em que estão as NLS estes fármacos são mais solúveis. EFV possui poucos átomos passíveis de protonação e pKa elevado, sendo pouco solúvel nos meios ácidos em que estão as NLS.

Na produção de NLS por microemulsão as nanopartículas já estão formadas na microemulsão e são adicionadas em água gelada apenas para que ocorra rápida solidificação. No caso atual, há muitos íons H⁺ na microemulsão, provenientes dos ácidos graxos, que se ligam aos receptores de prótons da NVP e do SQV, tornando-os solúveis e diminuindo a EE%. Tentou-se produzir esta microemulsão/emulsão em tampão fosfato pH 7,4 em várias concentrações. Nas menores concentrações foram produzidas NLS mas EE% não aumentou. Nas maiores concentrações a microemulsão/emulsão não era formada, produzindo um sistema bifásico. Assim, é difícil aumentar a EE% utilizando ácidos graxos e a técnica de microemulsão para produzir NLS contendo NVP e SQV. Para EFV a EE% é alta, pois este fármaco é mais solúvel nos lipídios fundidos e mesmo em meios ácidos das microemulsões/emulsões, como este fármaco tem valor grande de pKa tende a permanecer incorporados nas NLS.

4.7.4. Diálise

A diálise foi feita para investigar a liberação, *in vitro*, dos fármacos. Estes são muito pouco solúveis em tampão pH 7,40 e houve necessidade de tornar o meio receptor mais adequado à solubilização dos fármacos, o que foi feito adicionando surfatantes, em concentração superior à CMC os quais, via formação de micelas, podem alcançar esta condição. Porém, os surfatantes não devem interagir com as NLS porque podem mudar o perfil de liberação dos fármacos encapsulados. Por exemplo, Dodecilsulfato de sódio (SDS) é um surfatante aniônico que aumenta muito a solubilidade de fármacos em meio aquoso, mas para este trabalho não foi adequado pois interage com o CTAB, formando um precipitado sobre a membrana de diálise, obstruindo os poros. Outro fator que deve ser considerado é a interação surfatante-fármaco que pode ser um problema em análises por HPLC, pois pode alterar o tempo de eluição do fármaco e o perfil dos picos, fazendo com que os sinais obtidos não sejam confiáveis. Nesta Tese foram utilizados Tween 80 e Tween 20 (surfatantes não iônicos) no meio receptor. No caso do EFV, o Tween 80 não foi adequado, pois distorceu os picos cromatográficos e as amostras eluíram em tempos diferentes daqueles da curva de calibração. Tween 20 não apresentou estes problemas e pôde ser utilizado nos estudos de liberação deste fármaco. No caso das formulações com SQV e NVP, Tween 80 não alterou o tempo de eluição e a forma dos picos, podendo ser utilizado no meio receptor destes fármacos.

Foi realizado um estudo preliminar para verificar o quanto estes surfatantes solubilizam os fármacos. Foram adicionados 0,02 g de fármaco em 20 mL de tampão fosfato contendo os surfatantes e agitados durante 24 h. Estas soluções foram filtradas, diluídas e injetadas no HPLC. Para NVP e SQV foi utilizado 2% (em massa) de T80 e para o EFV 2% de T20, sendo solubilizados cerca de 0,008 g de NVP, 0,016 g de SQV e 0,014 g de EFV, que em 50 mL de tampão fosfato correspondem a 0,02 g, 0,040 g e 0,034 g, respectivamente. No caso de NVP foram usados 10,00 mL da formulação (0,002 g de fármaco). A quantidade de fármaco que a solução com 2% T80 pôde solubilizar é 10 vezes maior que 0,02 g, alcançando a condição "*sink*" necessária (Rohrs, 2001). Para SQV e EFV foram utilizados 3,00 mL da formulação, correspondente a 0,0006 g de fármaco. No primeiro caso a solubilidade de fármaco em 50,00 mL de tampão fosfato com

surfatante foi 60 vezes maior e, no segundo, 50 vezes, mais que suficiente para fazer os estudos.

A Fig. 37 apresenta o perfil de liberação para as formulações com EFV sem e com d-manose. Nos primeiros ensaios tentou-se utilizar 3,85% de EFV em relação a matriz lipídica nas formulações com 100%AE e 80%AE/20%COM manosiladas; porém, estas formulações não foram estáveis durante a diálise, pois em 1h as NLS dissolviam e o fármaco era liberado para o meio receptor. Assim, foi usado 1,96% de EFV nestas formulações e mesmo assim houve liberação de todo o fármaco em 1h, provavelmente porque conforme o fármaco na matriz lipídica vai sendo liberado, n-butanol dissolve a matriz, aumentando a velocidade de liberação. Nas formulações com menos ácido esteárico existe n-butanol em quantidade insuficiente para exercer este efeito. No caso das formulações de NVP e SQV este efeito não foi observado.

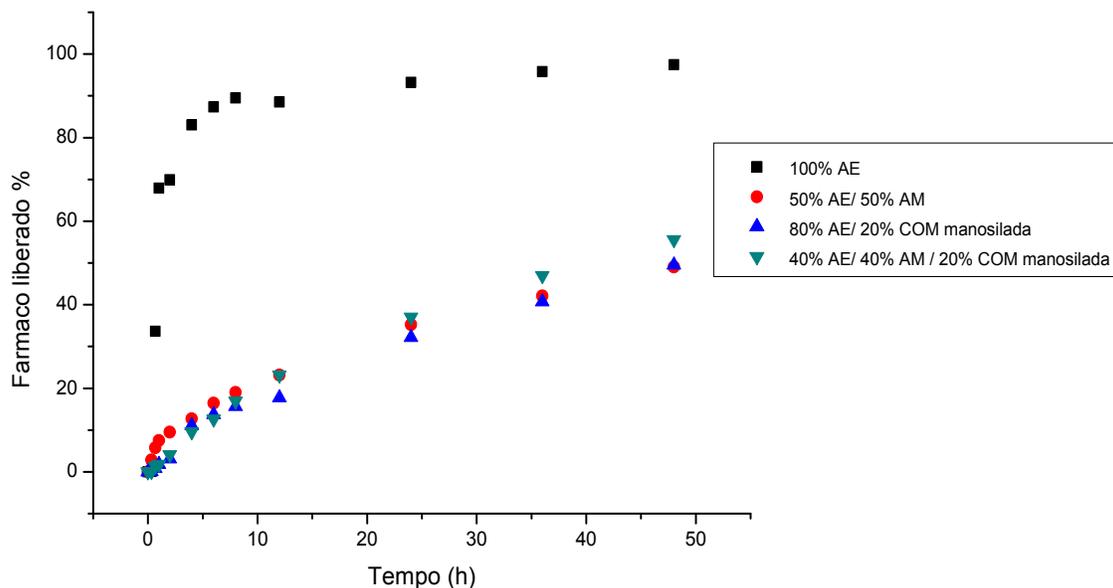


Fig. 37. Perfis de liberação de EFV: 100%AE; 50%AE/50%AM; 80%AE/20%COM manosilada e 40%AE/40%AM20%COM manosilada.

Excetuando a formulação 100%AE, todas as demais apresentaram perfis de liberação prolongada muito parecidos, não ocorrendo "burst". Em 12 h foram liberados cerca de 20% de fármaco e em 48 h 50%. Estes perfis sugerem que o fármaco está

distribuído homoganeamente na matriz lipídica, com elevada EE% ($\approx 97\%$) (Tabela 12). Este comportamento é o mais indicado em tratamento clínico de longa duração, como é o caso da AIDS em que os medicamentos tem que ser administrados por toda a vida. No entanto, isto não quer dizer que o fármaco será liberado desta maneira *in vivo*, porque este modelo não mimetiza as condições do organismo vivo. *In vivo* é possível que a liberação seja mais rápida, devido às lipases que aceleram as reações de degradação dos lipídios.

A Fig. 38 mostra os perfis de liberação para as formulações com SQV, que são as mesmas usadas com EFV mais aquelas com 60%AE/40%COM sem manose e manosilada.

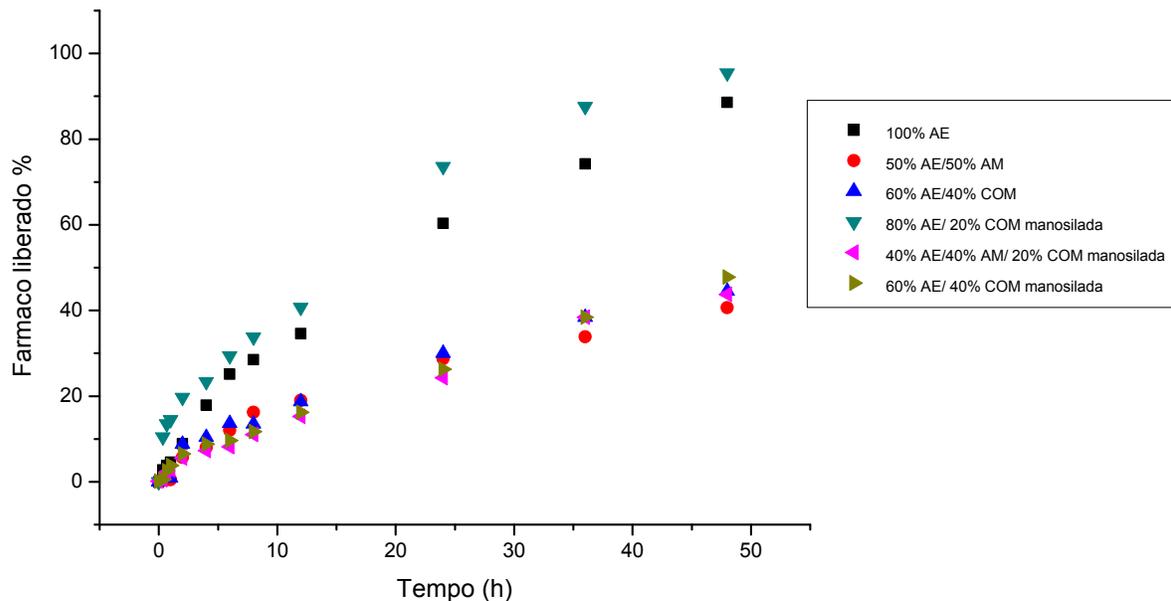


Fig. 38. Perfis de liberação das formulações contendo SQV: 100%AE; 50%AE/50%AM; 60%AE/40%COM; 80%AE/20%COM manosiladas; 40%AE/40%AM/20% COM manosilada; 60%AE/40%COM manosilada.

As formulações com 100%AE e 80% AE/20%COM manosiladas apresentaram liberação mais rápida e com perfis similares: não há "burst" e em 12 h foram liberados perto de 40% de fármaco e em 48h 90%. A liberação foi mais rápida, possivelmente por que estas formulações continham maior quantidade de n-butanol, situação análoga à

mencionada para EFV. As demais formulações apresentaram liberação mais prolongada e semelhantes às das formulações com EFV. Em 12 h foram liberados quase 17% de fármaco e, em 48 h, 43%. Na maioria dos casos a EE% das formulações com SQV esteve entre 45% e 50% (Tabela 12). Como não houve "burst", pode-se supor que o fármaco esteja homogeneamente distribuído na matriz lipídica. No caso de administração parenteral o perfil de liberação será diferente, por causa da complexidade da composição do sangue.

A Fig. 39 apresenta os perfis de liberação relativos às formulações com 100%AE, 50%AE/50%AM, 80%AE/20%COM manossilada e 40%AE/40% AM/20%COM manossilada contendo NVP.

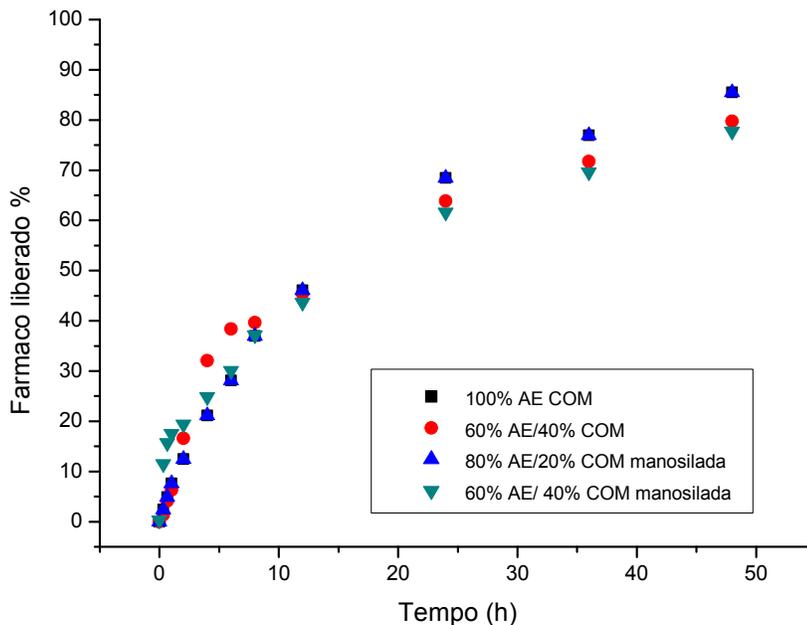


Fig. 39. Perfis de liberação das formulações 100%AM; 60%AE/40%COM; 80%AM/40%COM manossilada e 60%AE/40%COM manossilada contendo NVP.

Todas as formulações apresentaram perfis de liberação semelhantes. A liberação do fármaco foi mais rápida que aquelas formulações aplicadas ao EFV e SQV. Não houve efeito *burst*, em 12 h foram liberados quase 40% em 48h foram liberados entre 80% e 85% de fármaco. No caso de NVP as EE% foram de 10% a 25% (Tabela 12). Sendo assim,

poderia ser esperada liberação inicial entre 90% e 75%, mas isto não ocorreu. As mesmas considerações com relação à EE% e perfis de liberação das amostras com SQV podem ser observadas para NVP.

4.7.5. Aplicação de modelos matemáticos para liberação de EFV, SQV e NVP

Os modelos matemáticos discutidos na secção 1.7. foram aplicados aos perfis de liberação *in vitro* das formulações de 80%AE/20%COM manosiladas (Tabela 13). Os três primeiros pontos da curva de diálise foram desconsiderados porque apresentam comportamento diferente dos demais. Os testes estatísticos foram realizados comparando χ^2 (soma quadrática dos erros) e R^2 (coeficiente de correlação).

Tabela 13: Ajuste dos modelos matemáticos aos perfis de liberação *in vitro* para as formulações de 80%AE/20%COM-manosiladas.

		EFV	SQV	NVP
Ordem zero	χ^2	0,99	112,72	74,85
	R	0,85	0,97	0,89
	κ_0	$9,8(\pm 0,3) \cdot 10^{-3}$	$1,8(\pm 0,1) \cdot 10^{-2}$	$2,0(\pm 0,2) \cdot 10^{-2}$
	b	$53,6(\pm 6,8) \cdot 10^{-3}$	$18,3(\pm 1,2) \cdot 10^{-2}$	$11,2(\pm 2,9) \cdot 10^{-2}$
Primeira ordem	χ^2	2,24	415,86	948,21
	R	0,96	0,93	0,556
	κ_1	$3,3(\pm 0,2) \cdot 10^{-1}$	$3,1(\pm 0,3) \cdot 10^{-2}$	$0,5(\pm 0,1) \cdot 10^{-1}$
	B	$-103,7(\pm 1,4) \cdot 10^{-1}$	$-962,4(\pm 0,7) \cdot 10^{-2}$	$-86,2(\pm 3,7) \cdot 10^{-1}$
Higuchi	χ^2	1,63	122,72	6,71
	R	0,99	0,966	0,99
	κ_H	$7,7(\pm 0,3) \cdot 10^{-2}$	$14,1(\pm 0,9) \cdot 10^{-2}$	$14,8(\pm 0,5) \cdot 10^{-2}$
	b	$-6,3(\pm 1,3) \cdot 10^{-2}$	$-3,7(\pm 2,5) \cdot 10^{-2}$	$-6,2(\pm 1,3) \cdot 10^{-2}$
Peppas-Korsmeyer	χ^2	0,12	99,96	57,20
	R	1,00	0,98	0,97
	κ_{PK}	$0,3(\pm 0,4) \cdot 10^{-1}$	$1,1(\pm 0,7) \cdot 10^{-1}$	$0,7(\pm 1,0) \cdot 10^{-1}$
	n	$7,2(\pm 0,1) \cdot 10^{-1}$	$5,6(\pm 0,2) \cdot 10^{-1}$	$7,0(\pm 0,4) \cdot 10^{-1}$
Baker-Lonsdale	χ^2	7,30	184,49	18,61
	R	0,89	0,78	0,90
	κ_{BL}	$8,2(\pm 0,9) \cdot 10^{-4}$	$2,9(\pm 0,5) \cdot 10^{-3}$	$4,1(\pm 0,5) \cdot 10^{-3}$
	b	$-9,6(\pm 5,7) \cdot 10^{-4}$	$0,4(\pm 2,5) \cdot 10^{-3}$	$-3,2(\pm 0,8) \cdot 10^{-3}$

Para EFV o perfil de liberação se ajustou melhor ao modelo de Peppas-Korsmeyer, com χ^2 0,12 e R^2 1,00. A Fig. 40 apresenta a reta deste ajuste e a Eq. 26 representa a velocidade de liberação do EFV, segundo os dados na Tabela 13.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 0,3(\mp 0,4) * 10^{-1} t^{0,72(\mp 0,1)} \quad (26)$$

Considerando $M_\infty = M_t$, levaria quase 130 h (perto de 5,5 dias) para todo fármaco ser liberado.

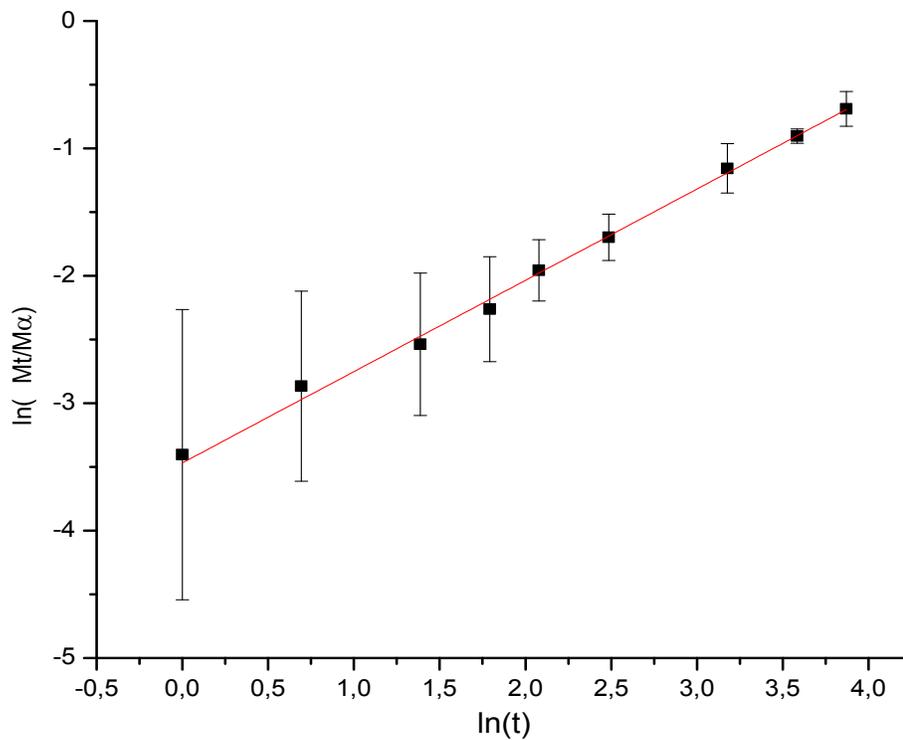


Fig. 40. Perfil de liberação de EFV na formulação 80%AE/20%COM-manosilada, ajustado ao modelo de Peppas-Korsmeyer.

O perfil de liberação de SQV também foi melhor ajustado ao modelo de Peppas-Korsmeyer, com χ^2 de 99,961 e R^2 de 0,98. A Fig. 41 apresenta a reta deste ajuste.

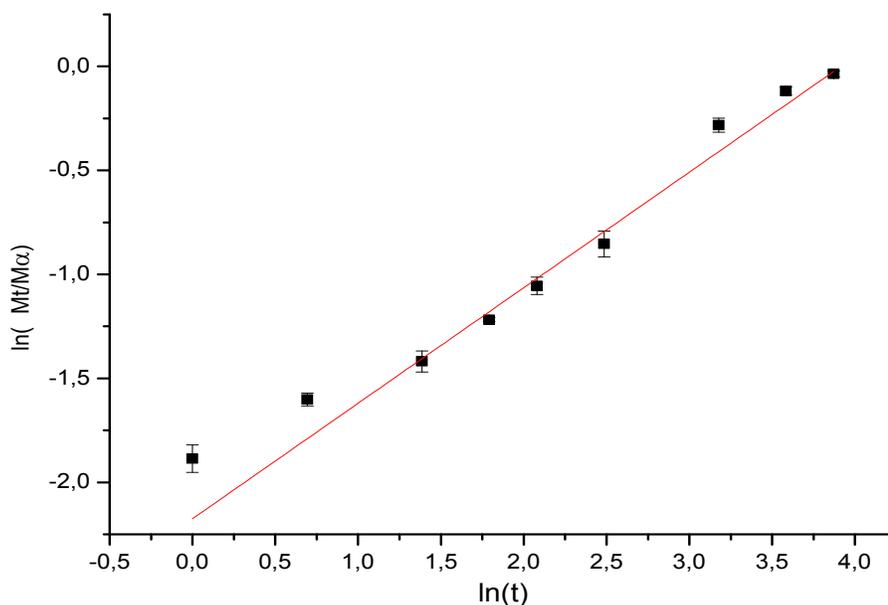


Fig. 41. Perfil de liberação de SQV na formulação 80%AE/20%COM manosilada, ajustado ao modelo de Peppas-Korsmeyer.

A Eq. 27, aplicada aos dados da Tabela 9, apresenta a velocidade de liberação de SQV, segundo o modelo de Peppas-Korsmeyer.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1,1(\mp 0,7) * 10^{-1} t^{0,56(\mp 0,2)} \quad (27)$$

Todo o SQV será liberado perto de 51,5 h, concordando com os resultados mostrados na Fig. 37 (mais que 90% de fármaco liberado em 48 h).

Para NVP o perfil de liberação melhor se ajusta ao modelo de Higuchi, com χ^2 6,71 e R^2 0,99 (Tabela 13). A Fig. 42 apresenta a reta deste ajuste.

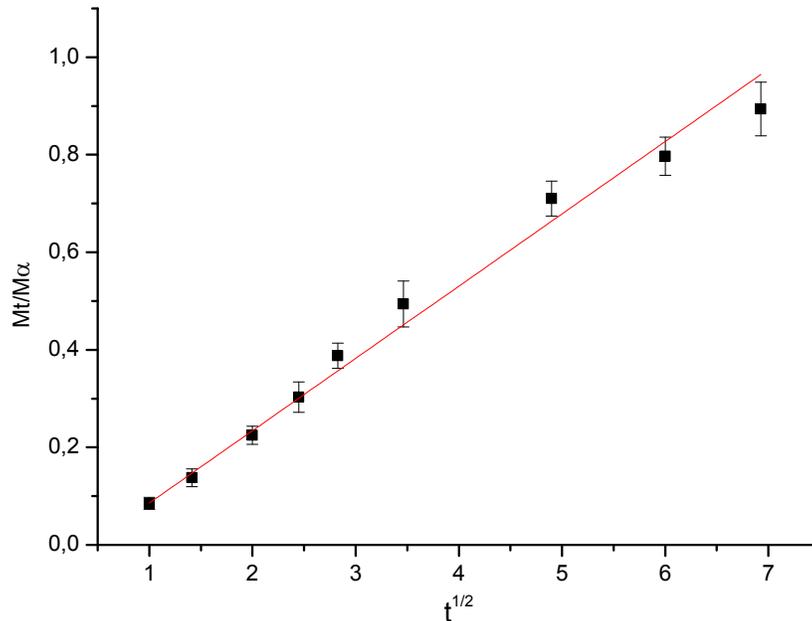


Fig. 42. Perfil de liberação de NVP na formulação 80%AE/20%COM manosilada, ajustado ao modelo de Higuchi.

A Eq. 28, aplicada aos dados da Tabela 13, representa a velocidade de liberação de NVP.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 14,8(\pm 0,5) * 10^{-2} t^{\frac{1}{2}} - 6,2(\pm 1,3) * 10^{-2} \quad (28)$$

Analogamente ao EFV e SQV, toda NVP seria liberada em cerca de 51,5 h, em concordância com a Fig. 35, a qual mostra que em 48 h foram liberados quase 85% de NVP.

4.7.6. Difractometria de raios-X

A estrutura das NLS sem e com manose foi investigada por difratometria de raios-X, comparando seus difratogramas com os dos lipídios puros. Os difratogramas das amostras com NLS sem manose e manosiladas foram muito similares e não apresentaram picos intensos sugerindo estrutura amorfa, ou seja, a estrutura organizada dos lipídios empacotados é perdida quando os lipídios são fundidos e solidificados para formar NLS. A

Fig. 43 compara os difratogramas dos lipídios puros e o das NLS sem manose e a Fig. 44 faz a mesma comparação para NLS manosiladas.

AE apresentou picos intensos em 6,46°; 21,48° e 23,82°. COM apresentou picos em 21,28° e 23,54°. AM apresentou 3 picos mais intensos em 5,72°, 8,52° e 14,04°. Todas as formulações com NLS apresentaram pico pouco intenso em 21,48°. Nas formulações em que foi adicionado AM nenhum sinal foi observado nas regiões características deste lipídio.

A estrutura desorganizada da matriz lipídica das NLS possibilita a existência de sítios em que os fármacos ficam alojados. Quanto mais desestruturada maior a possibilidade de carregamento de fármacos. Os difratogramas mostraram que as nanopartículas possuem estruturas desorganizadas possibilitando encapsulação de moléculas. Com o decorrer do tempo aumenta a cristalinidade das NLS e, em consequência, expulsão das moléculas alojadas.

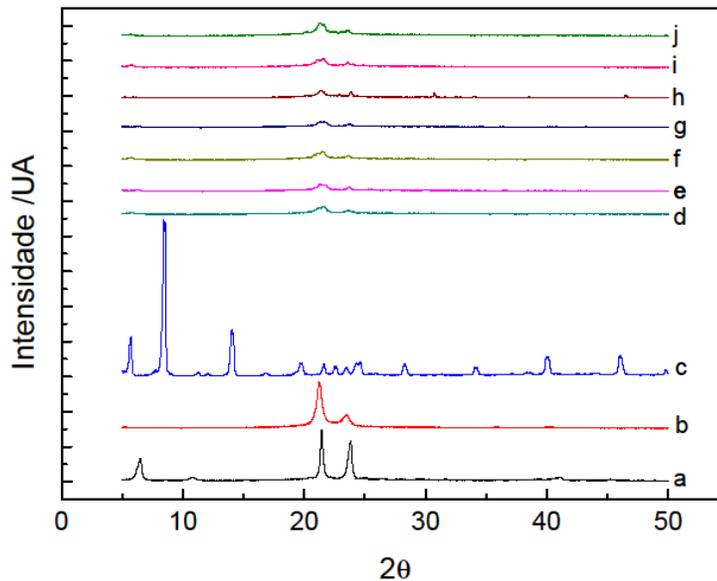


Fig. 43. Difratogramas de raios X dos lipídios puros e NLS sem manose: a) AE; b) COM; c) AM; d) 100%AE EFV; e) 50%AE/50%AM EFV; f) 100%AE SQV; g) 50%AE/50%AM SQV; h) 60%AE/40%COM SQV; i) 100%AE NVP; j) 60%AE/40%COM NVP

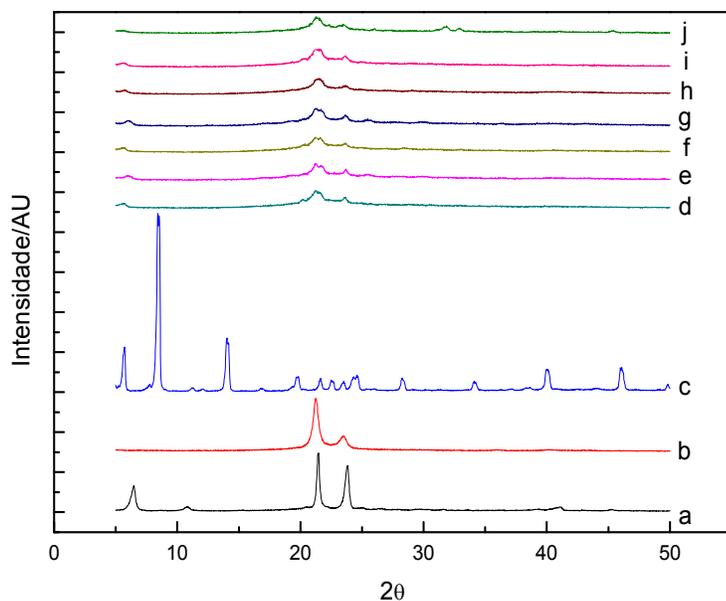


Fig. 44. Difratoogramas de raios X dos lipídios puros e NLS manosiladas: a) AE; b) COM; c) AM; d) 80%AE/20%COM EFV; e) 40%AE/40%AM/20%COM EFV; f) 80%AE/20%COM SQV; g) 40%AE/40%AM/20%COM SQV; h) 60%AE/40%COM SQV; i) 80%AE/20%COM NVP; j) 60%AE/40%COM NVP

4.7.7. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As medidas de DSC (taxa de aquecimento 10°C/min) foram feitas para os lipídios puros e para amostras com NLS sem e com manose. Esta técnica também permite obter informações sobre a cristalinidade das NLS complementando os resultados obtidos por difratometria de raios X. A partir das mudanças que ocorrem nas temperaturas de fusão e entalpias de fusão das NLS em relação aos lipídios puros, pode-se obter informações sobre a cristalinidade desses sistemas. Na Fig. 45 estão as curvas calorimétricas dos lipídios puros e as Fig. 46, 47 e 48 das formulações com EFV, SQV e NVP, respectivamente.

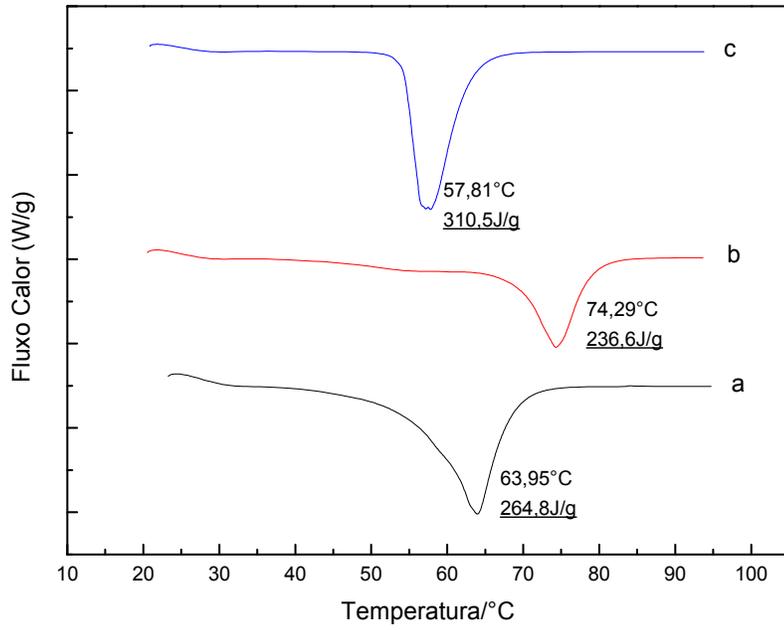
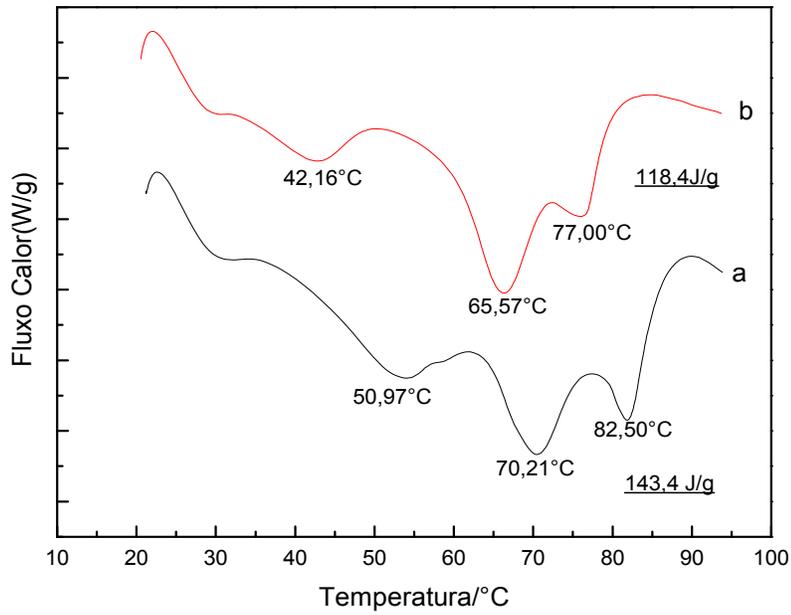


Fig. 45. Curvas calorimétricas: a) AE; b) COM; c) AM.



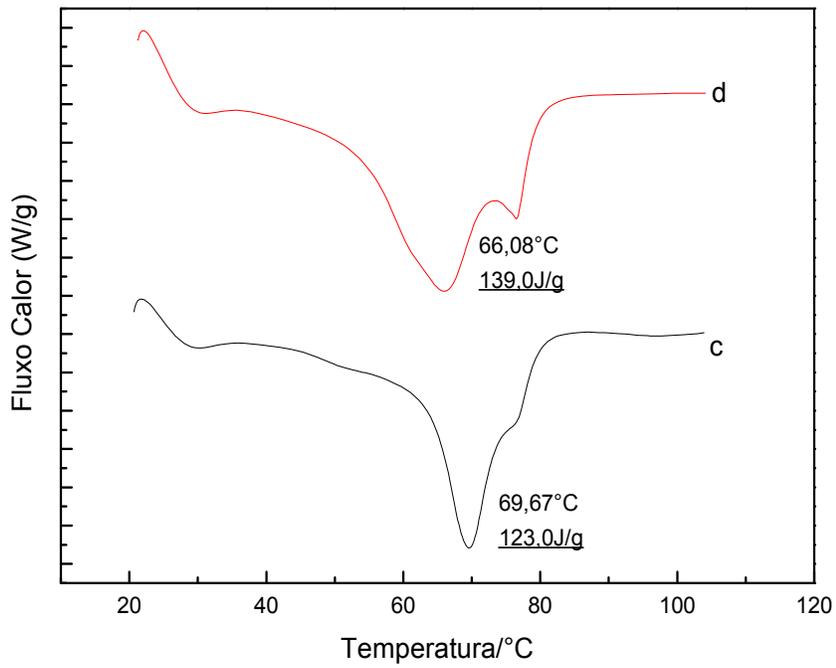
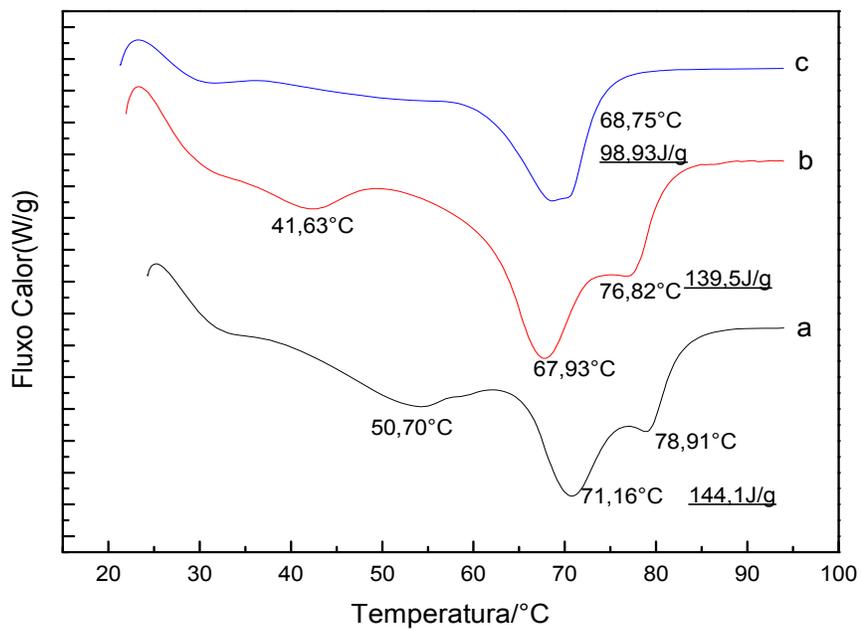


Fig. 46. Curvas calorimétricas: a) 100%AE EFV sem manose; b) 50%AE/50%AM EFV sem manose; c) 80%AE/20%COM EFV manosilada; d) 40%AE/40%AM/20%COM EFV manosilada



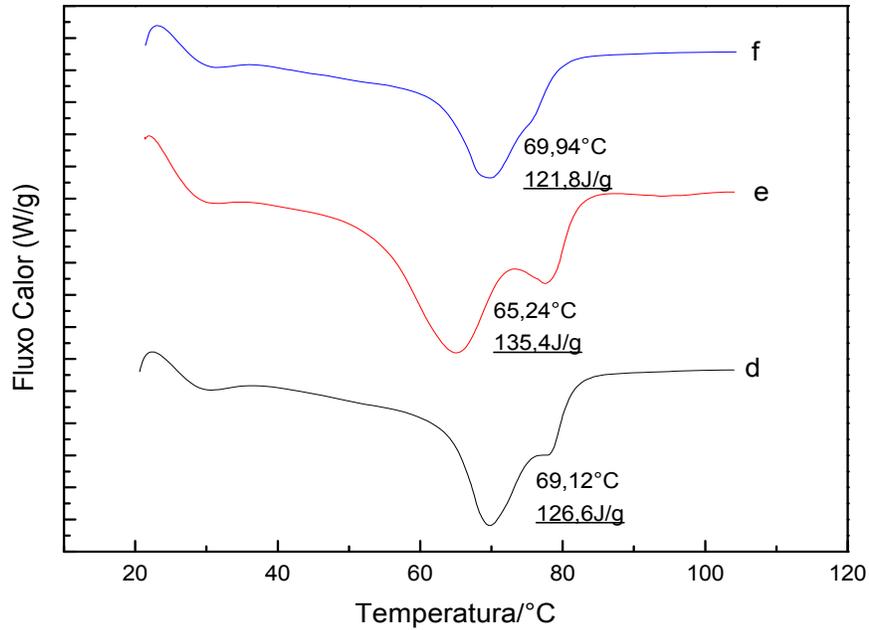
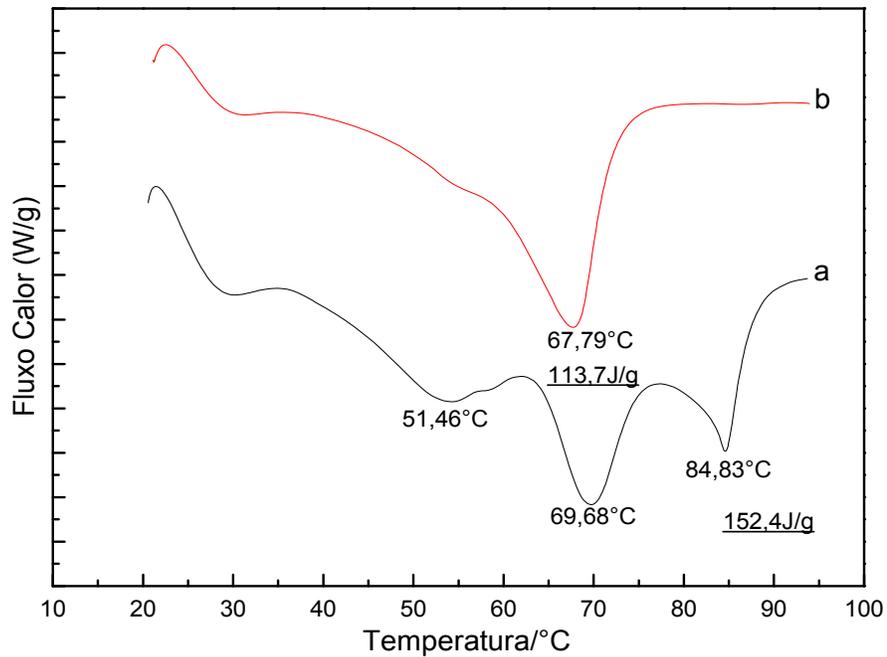


Fig. 47. Curvas calorimétricas: a) 100%AE SQV sem manose; b) 50%AE/50%AM SQV sem manose; c) 60%AE/40%COM SQV sem manose; d) 80%AE/20%COM SQV manosilada; e) 40%AE/40%AM/20%COM SQV manosilada; f) 60%AE/40%COM SQV manosilada.



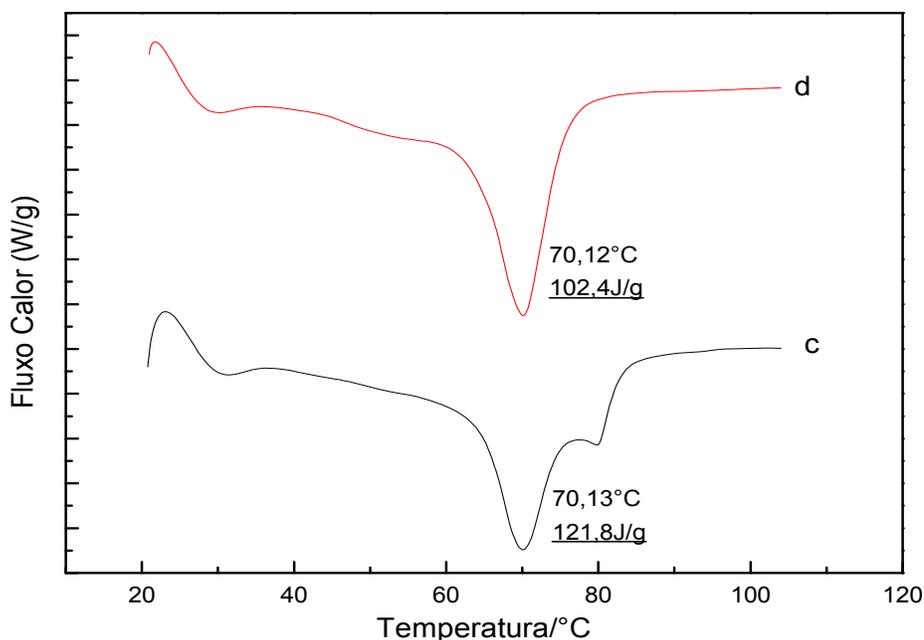


Fig. 48. Curvas calorimétricas: a) 100%AE NVP sem manose; b) 60%AE/40%COM NVP sem manose; c) 80%AE/20%COM NVP manosilada; d) 60%AE/40%COM NVP manosilada

As temperaturas e entalpias de fusão dos lipídios puros foram, respectivamente, 63,95°C e 264,8 J/g para AE, 74,29°C e 236,6 J/g para COM e 57,81°C e 310,5 J/g para AM. Os termogramas mostram que as entalpias de fusão das amostras com NLS foram menores que as dos lipídios puros. Para as amostras com EFV a que apresentou maior entalpia de fusão (143,4 J/g) foi aquela com 100%AE sem manose; para SQV foi a 50%AE/50%AM sem manose (139,5 J/g); para NVP foi a 100%AE sem manose (152,4 J/g). As formulações produzidas com AE e misturas AE + AM forneceram 2 ou 3 temperaturas de fusão. As formulações feitas com mistura de 60% de COM + 40% de AE tiveram temperatura de fusão menor que a do COM. Quando se obtém a curva DSC de lipídios fundidos e solidificados espera-se que a temperatura e entalpia de fusão seja menor que as dos lipídios puros. Isto ocorre por que, no rápido processo de esfriamento do lipídio fundido, este se solidifica no arranjo cristalino menos estruturado (forma α). Com o decorrer do tempo as cadeias carbônicas vão se empacotando, ocorrendo transições polimórficas de α para β' e por fim chegando à forma β , mais estável (Freitas, 1999). As

NLS geralmente estão solidificadas na forma α que tem temperatura de fusão menor que as dos lipídios puros. Isto é favorecido pelo fato dos surfatantes utilizados na formulação ajudarem a manter a matriz lipídica das NLS nessa forma. Em casos em que as NLS não são estáveis e sofrem gelatinização, medidas de DSC mostram que a temperatura de fusão é semelhante às dos lipídios puros indicando que podem estar na forma β .

No caso das formulações com AE e AE + AM o pico correspondente à menor temperatura de fusão pode ser devido à matriz lipídica das NLS, indicando que está mais desestruturada que o lipídio puro (forma polimórfica α), mas os picos associados à maior temperatura de fusão não podem ser atribuídos a esta forma. Os componentes em maior quantidade na produção das NLS foram os surfatantes T80 (líquido), lecitina e CTAB, estes sólidos. A Fig. 49 mostra as curvas DSC para lecitina e CTAB.

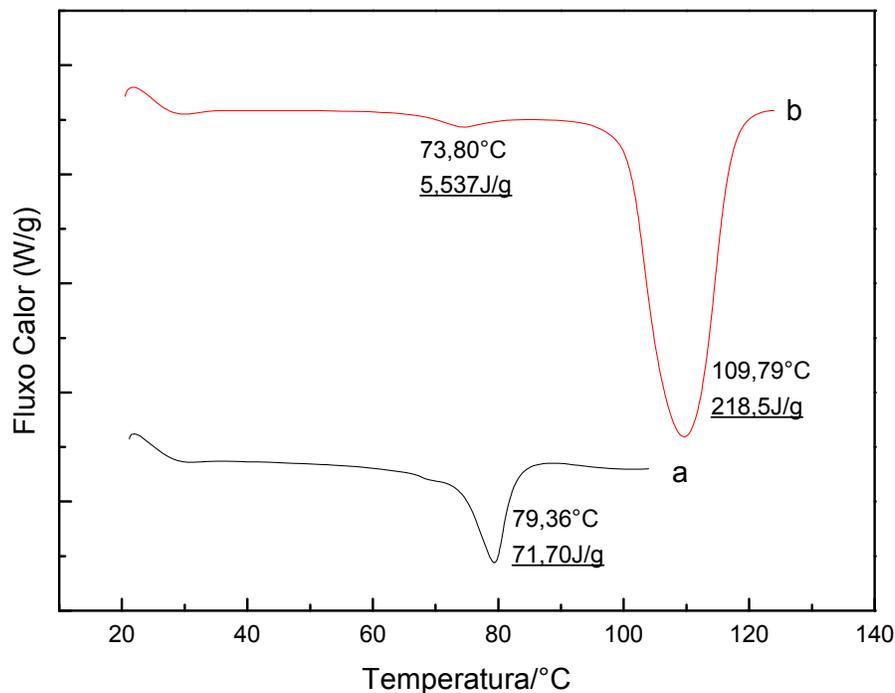


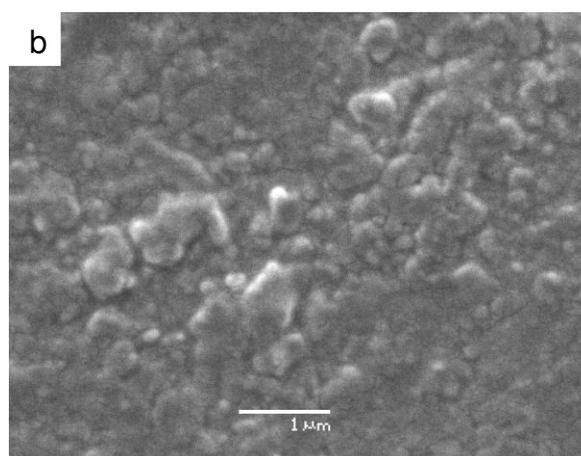
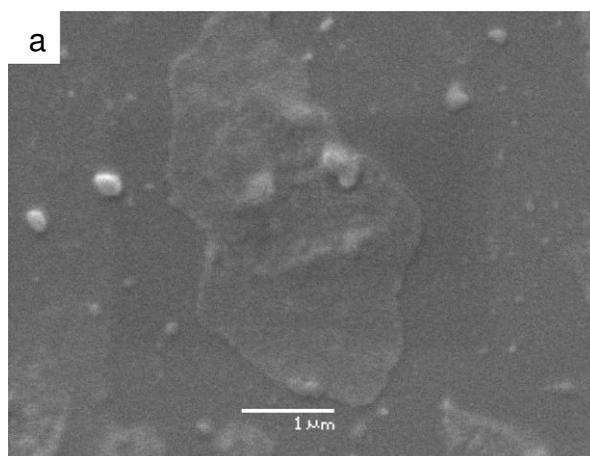
Fig. 49. Curvas calorimétricas: a) Lecitina (Lipoid S75); b) CTAB.

A lecitina apresentou temperatura de fusão 79,36°C e entalpia de fusão 71,70J/g. CTAB apresentou 2 temperaturas de fusão, uma em 73,80°C (entalpia de fusão 5,537 J/g)

e outra em 100,79°C (entalpia de fusão 218,5 J/g). Este resultado evidencia que os picos observados nas curvas DSC das amostras AE e AE+AM, correspondentes a pontos de fusão mais elevados que os dos lipídios puros podem ser devidos a estes surfatantes. Para NLS feitas com 60%COM e 40%AE a temperatura de fusão foi intermediária entre as dos lipídios puros. Como COM tem temperatura de fusão mais elevada que os demais lipídios e relativamente próxima da maior temperatura das formulações com AE e AE+AM, pode ser que os picos de fusão dos surfatantes estejam sobrepostos com os dos lipídios.

4.7.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram obtidas micrografias MEV das NLS sem e com manose para verificar sua morfologia, complementando os resultados obtidos por DLS. As Fig. 50 a) e b) são das amostras com EFV sem manose e as Fig. 50 c) e d) são das amostras com manose. As Fig. 51 a); b); c) são das formulações com SQV sem manose e as Fig. 51 d); e); f) são das formulações manosiladas. As Fig. 52 a) e b) são das formulações com NVP sem manose e as Fig. 52 c) e d) são das com manose.



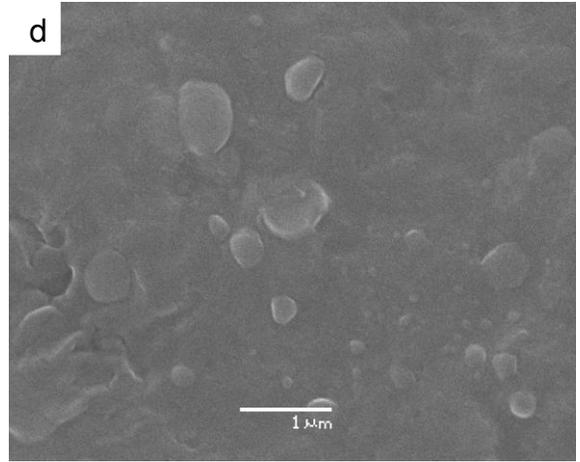
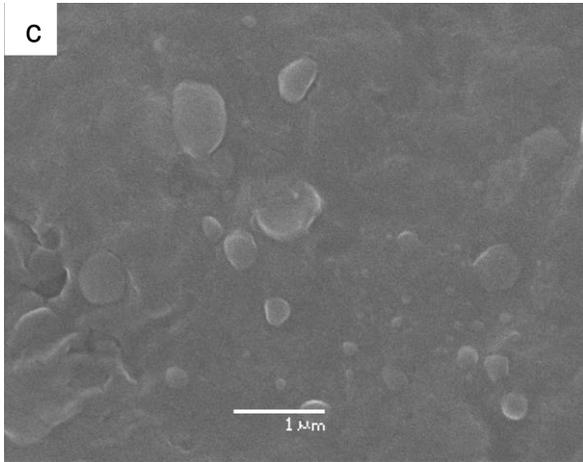
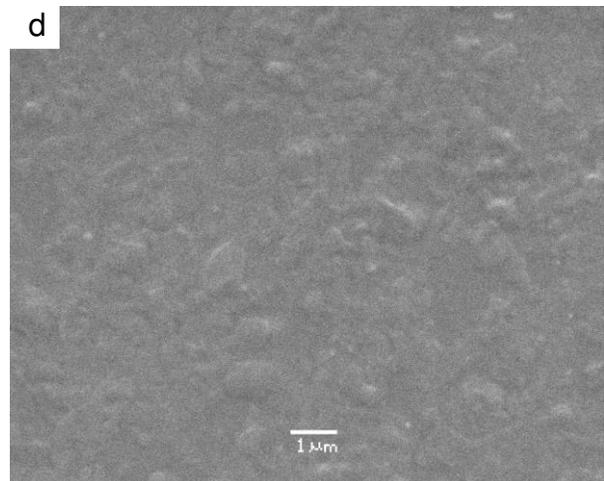
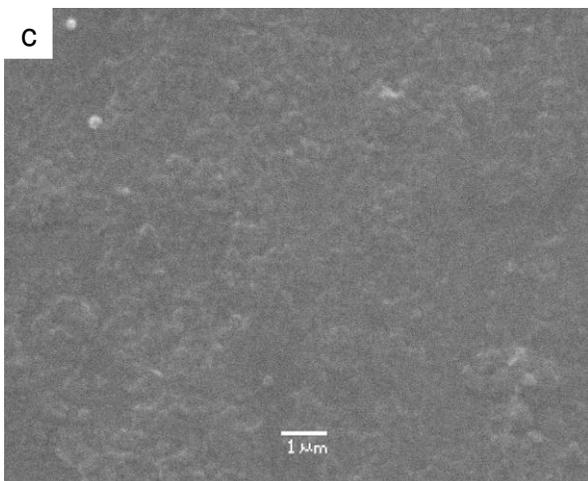
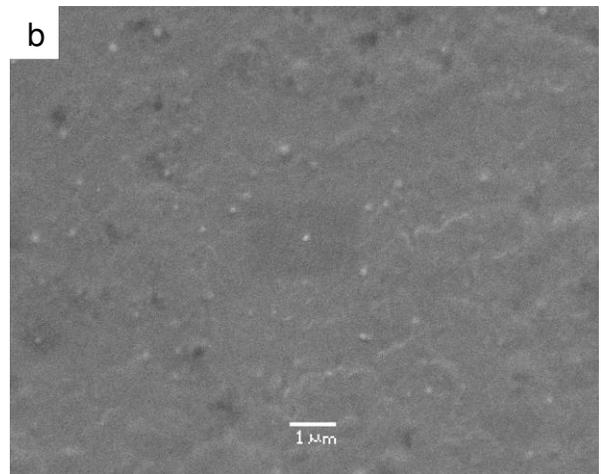
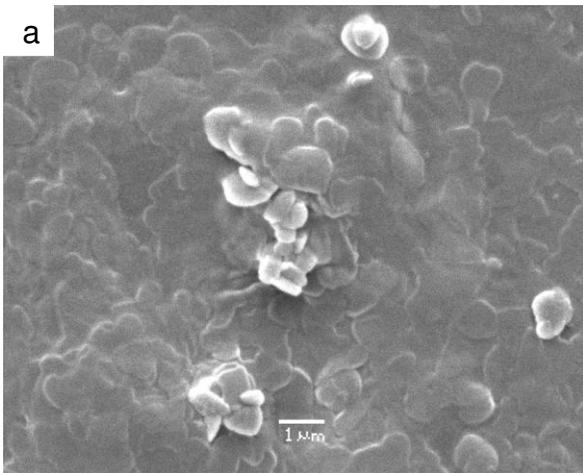


Fig. 50. Micrografias das formulações com EFV: a) 100%AE; b) 50%AE/50%AM; c) 80%AE/20%COM manosilada; d) 40%AE/40%AM/20%COM manosilada.



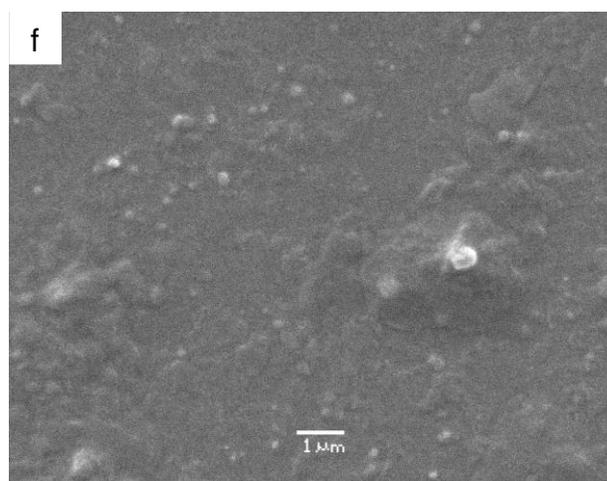
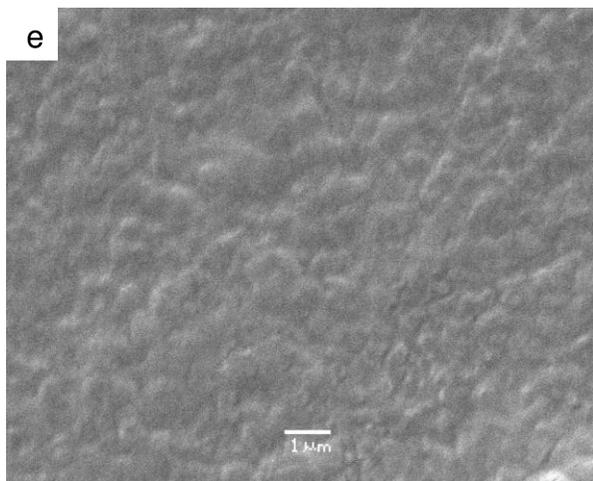
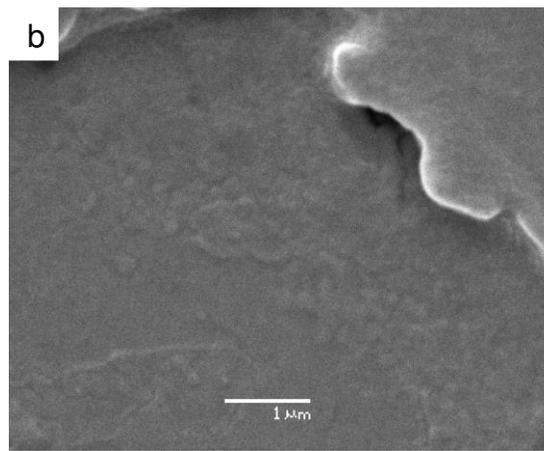
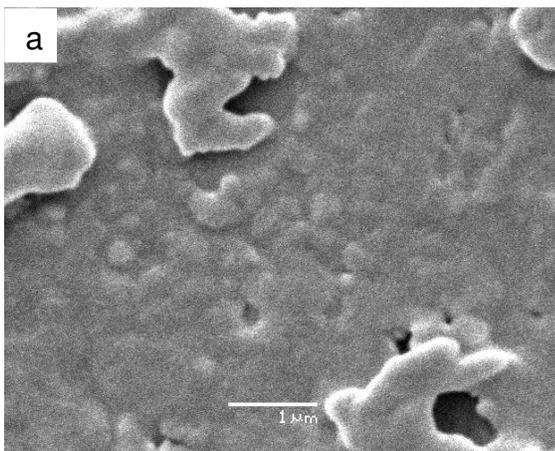


Fig. 51. Micrografias das formulações com SQV: a) 100%AE; b) 50%AE/50%AM; c) 60%AE/40%COM; d) 80%AE/20%COM manossilada; e) 40%AE/40%AM/20%COM manossilada; f) 60%AE/40%COM manossilada.



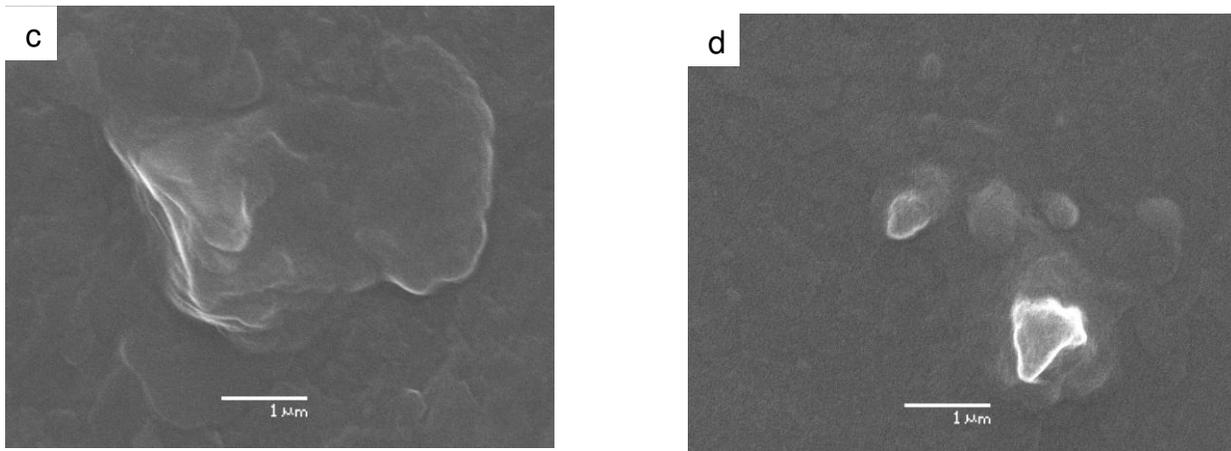


Fig. 52 . Micrografias das formulações com NVP: a) 100%AE; b) 60%AE/40%COM; c) 80%AE/20%COM manossilada; e) 60%AE/40%COM manossilada.

Pode ser observada formação de NLS, mas a aglomeração impossibilitou obter imagens mais nítidas para estimar os diâmetros. Três podem ser os motivos para isto: baixo potencial Zeta das formulações, artefato instrumental e quantidade de surfatante. No primeiro caso pode-se estimar, a partir do potencial Zeta, que a repulsão eletrostática entre as nanopartículas era pequena. Assim, durante a evaporação da água, conforme as nanopartículas ficavam mais próximas, as forças de London-van der Waals se sobrepõem às de repulsão fazendo com que ocorra aglomeração. No segundo caso, a metalização é realizada pela deposição de Pd e Au em altas temperaturas sobre o *stub* que contém as amostras. Como os lipídios são sensíveis ao calor, as nanopartículas podem aglomerar. No caso do surfatante observa-se em todas as micrografias uma placa de material sobre o *stub*, que interfere na metalização das nanopartículas. As Fig. 50 a), 51 b) e f), mostraram imagens melhores, sugerindo diâmetros de nanopartículas entre $\approx 100\text{nm}$ e $\approx 300\text{nm}$. Outras tentativas foram realizadas utilizando MEV por emissão de campo, na qual o vácuo à que a amostra é submetida é maior e o potencial aplicado menor. Porém, as micrografias foram similares às mostradas.

5. Conclusões

O planejamento experimental 2^3 com ponto central foi eficiente para obter amostras com NLS pelo método de emulsão/microemulsão e a metodologia de deslocamento foi fundamental para otimizar a concentração de surfatantes. Os valores de PDI foram grandes por causa do uso de agitador mecânico (Turrax) e melhores resultados poderiam ser obtidos com homogeneizador de alta pressão. NLS-manosiladas apresentaram estabilidade por pelo menos 6 meses. Os potenciais Zeta das NLS feitas somente com ácido esteárico e mistura de ácidos esteárico + mirístico foram irregulares, o que foi corrigido pela adição de 20% de Compritol 888 ATO. A EE% foi diferente para os fármacos, devido à natureza química e o meio de dispersão. Os meios ácidos das NPLS produzidas com ácido esteárico e ácidos esteárico + mirístico tornaram NVP e SQV solúveis, não ocorrendo o mesmo com EFV. Como os fármacos eram insolúveis em meio com pHs por volta de 7, nos estudos sobre liberação foi necessário adicionar surfatantes à solução receptora. Para as amostras com SQV e NVP foi adicionado T80 e, para aquelas com EFV, T20. Estes surfatantes aumentaram a solubilidade dos fármacos e não interferiram na forma do pico e no tempo de eluição nas análises por HPLC. Os perfis de liberação das formulações de EFV foram similares para as quatro formulações contendo SQV (50%AE/50%AM, 60%AE/40%COM, 40%AE/40%AM/20%COM manosilada e 60%AE/40%COM manosilada), apresentando liberação prolongada sem efeito *burst*. Nestas amostras, em 48h foram liberados $\approx 43\%$ de fármaco. Duas formulações com SQV apresentaram liberação mais rápida, sem efeito *burst* e em 48h foram liberados entre 80% e 85%. Com relação ao diâmetro, potencial Zeta, PDI e EE% as NLS manosiladas apresentaram qualidade tão boa quanto aquelas sem octadecilamina manosilada. Porém, as amostras com ácidos esteárico + mirístico precisaram utilizar metade da quantidade de octadecilamina manosilada que as demais. Caso se deseje aumentar a quantidade de octadecilamina manosilada, sugere-se fazer novo planejamento experimental incluindo este reagente como variável ou mantendo-o fixo com uma quantidade maior e variando os demais parâmetros. Foi possível caracterizar octadecilamina manosilada sólida por RMN de C^{13} e N^{15} , análise elementar CHNO, espectroscopia IV e espectrometria de massas. .

Os difratogramas de raios X mostraram que as amostras com NLS são amorfas, o que foi confirmado mediante por DSC.

6. Referências

- Adamson A.W., Gast A.G., 1997. *Physical Chemistry of Surfaces 6th ed.* John Wiley & Sons, Inc.: New York
- Adkins J.C., Noble S., 1998. Efavirenz, *Drugs* 56, 1055-1064.
- Allémann E., Gurny R., Doelker E., 1993. Drug loaded nanoparticles - preparation methods and drug targeting issues. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 39, 173-191.
- Ammar H.O., Salama H.A., Ghorab M., Mahmoud A.A. , 2009. Nanoemulsion as a potential ophthalmic delivery system for Dorzolamide hydrochloride. *AAPS PharmSciTech* 10, 808-819.
- Aquaro S., Bagnarelli P., Guenci T., De Luca A., Clementi M., Balestra E., Calì R., Perno C.F., 2002. Long-term survival and virus production in human primary macrophages infected by human immunodeficiency virus. *J. Med. Virol.* 68, 479-488.
- Avert, 2010. AIDS Education and Research Trust. <http://www.avert.org/worldstats.htm>
- Blankson J.N., Persaud D., Siliciano R.F., 2002. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Med.* 53, 557-593.
- Bol S.M., Cobos-Jiménez V., Kootstra N.A., Wout A.B., 2011. HIV-1 and the macrophage. *Future Virol.* 6, 187-208.
- Cao Q., Wu H., Zhu L., Wu D., Zhu Y., Zhu Z., Cui J., 2011. Preparation and evaluation of zanamivir-loaded solid lipid nanoparticles. *J. Control. Release* 152, e2-e4.
- Carino G.P., Jacob J.S., Mathiowitz E., 2000. Nanosphere based oral insulin delivery. *J. Control. Release* 65, 261-269.

Cheeseman S.H., Hattox S.E., McLaughlin M.M., Koup R.A., Andrews C., Bova C.A., Pav J.W., Roy T., Sullivan J.L., Keirns J.J., 1993. Pharmacokinetics of nevirapine: initial single-rising-dose study in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 178-182.

Chemblink, A.M. <http://www.chemblink.com/products/544-63-8.htm>

Covreur P., Vauthier C., 2006. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res.* 23, 1417-1450.

Costa P.J.C., 2002. Avaliação *in vitro* da bioequivalência de formulações farmacêuticas. *Braz. J. Pharm. Sci.* 38, 142-153.

Craig J.C., Duncan I.B., Hockley D., Grief C., Roberts N.A., Mills J.S., 1991. Antiviral properties of Ro 31-8959, an inhibitor of human immunodeficiency virus (HIV) proteinase. *Antiviral Res.* 16, 295-305.

Davey R.T.V., Bhat N., Yoder C., Chun T.W., Metcalf J.A., Dewar R., Natarajan V., Lempicki R.A., Adelsberger J.W., Miller K.D., Kovacs J.A., Polis M.A., Walker R.E., Falloon J., Masur H., Gee D., Baseler M., Dimitrov D.S., Fauci A.S., Lane H.C., 1999. HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 15109-15114.

Delgado D., Gascón A.R., Del Pozo-Rodríguez A., Echevarría E., Ruiz de Garibay A.P., Rodríguez J.M., Solinís M.Á., 2012. Dextran–protamine–solid lipid nanoparticles as a non-viral vector for gene therapy: In vitro characterization and in vivo transfection after intravenous administration to mice. *Int. J. Pharm.* 425, 35-43.

Dingler A., Gohla S., 2002. Production of solid lipid nanoparticles (SLN): scaling up feasibilities. *J. Microencapsulation* 19, 11-16.

DrugBank, AE. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB03193>

DrugBank, EFV. <http://www.drugbank.ca/drugs/APRD00059>

DrugBank, NVP. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00238>

DrugBank, SQV. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01232>

Dutta T., Agashe H.B., Garg M., Balakrishnan P., Kabra M., Jain N.K., 2007. Poly(propyleneimine) dendrimer based nanocontainers for targeting of efavirenz to human monocytes/macrophages in vitro. *J. Drug Target.* 15, 89-98.

EMA, 2009. European Medicines Agency Science Medicines Health, February. ICH Topic Q3C (R4), Impurities: Guideline for Residual Solvents, pg 8.

Erickson D.A., Mather G., Trager W.F., Levy R.H., Keirns J.J., 1999. Characterization of the *in vitro* biotransformation of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor nevirapine by human hepatic cytochromes p-450. *Drug Metab. Dispos.* 27, 1488-1495.

Fauci A.S., 1988. The Human Immunodeficiency Virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* 239, 617-622.

FDA,2012.<http://www.fda.gov/ForConsumers/byAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm118915.htm>

Fitzsimmons M.E., Collins J.M., 1997. Selective biotransformation of the human immunodeficiency virus protease inhibitor saquinavir by human small-intestinal cytochrome P4503A4: potential contribution to high first-pass metabolism. *Drug Metab. Dispos.* 25, 256-266.

Flexner C., 2000. Dual protease inhibitor therapy in HIV-infected patients: Pharmacologic rationale and clinical benefits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 649-673.

Ford J., Khoo S.H., Back D.J., 2004. The intracellular pharmacology of antiretroviral protease inhibitors. *J. Antimicrob. Chemoth* 54, 982-990.

Freitas C., Müller R.H., 1999. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 47, 125-132.

Fulcher J.A., Hwangbol Y., Zionil R., Nickle D., Lin X., Health L., Mullins J.I., Corey L., Zhu T., 2004. Compartmentalization of Human Immunodeficiency Virus type 1 between blood monocytes and CD4+ T cells during Infection. *J. Virol.*78, 7883-7893.

Garg M., Asthana A., Agashe H.B., Agrawal G.P., Jain N.K., 2006. Stavudine-loaded mannosylated liposomes: in-vitro anti-HIV-I activity tissue distribution and pharmacokinetics. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 605-616.

Garg M., Dutta T., Jain N.K., 2007. Reduced hepatic toxicity, enhanced cellular uptake and altered pharmacokinetics of stavudine loaded galactosylated liposomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67, 76-85.

Gasco M.R., 1993. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. United States Patent, US 188837.

Gazzard B.G., Moyle G.J., Weber J., Johnson M., Bingham J.S., Brettle R., Churchill D., Fisher M., Griffin G., Jefferies D., King E., Gormer R., Lee C., Pozniak A., Smith J.R., Tudor-Williams G., Williams I., 1997. British HIV Association guidelines for antiretroviral treatment of HIV seropositive individuals. *Lancet* 349, 1086-1092.

Gibaldi M., Feldman S., 1967. Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations - theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms. *J. Pharm. Sci.* 56, 1238-1242.

Gibaldi M., Perrier D., 1982. *Pharmacokinetics. Drugs and the Pharmaceutical Sciences.* 2nd ed. Marcel Dekker, Inc.: New York, 15, 1-451.

Gottlieb M.S, Schroff R., Schanker H.M., Weisman J.D., Fan P.T., Wolf R.A., Saxon A., 1981. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *New Engl. J. Med.* 305, 1425-1431.

Gulick R.M., 2003. New antiretroviral drugs. *Clin. Microbiol. Infect.* 9, 186-193.

Gunaseelan S., Debrah O., Wan L., Leibowitz M.J., Rabson A.B., Stein S., Sinko P.J., 2004. Synthesis of poly(ethylene glycol)-based saquinavir prodrug conjugate and assessment of release and anti-HIV-1 bioactivity using a novel protease inhibition assay. *Bioconj. Chem.* 15, 1322-1333.

Gunaseelan S., Gunaseelan K., Deshmukh M., Zhang X., Sinko P.J., 2010. Surface modifications of nanocarriers for effective intracellular delivery of anti-HIV drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 518-531.

Gupta U., Agashe H.B., Asthana A., Jain N.K., 2006. Dendrimers: novel polymeric nano-architectures of solubility enhancement. *Biomacromolecules* 7, 649-658.

Gupta U., Jain N.K., 2010. Non-polymeric nano-carriers in HIV/AIDS drug delivery and targeting. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 478-490.

Hardman J.G., Limbird L.E., Gilman A.G., 2001. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. Mc Graw-Hill: New York.

Hardman J.G., Limbird L.E., Gilman A.G., 2003. *Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 10^a ed. Mc Graw-Hill: Rio de Janeiro.

Hargrave K.D., Proudfoot J.J.R., Grozinger K.G., Cullern E., Kapadia S.R., Patel U.R., Fuchs V.U., Mauldin S.C., Vitous J., Behnke M.L., Klunder J.M., Pal K., Skiles J.W., McNeil D.W., Rose J.M, Chow G.C., Skoog M.T., WU J.C., Schmidt G., Engel W.W., Eberlin W.G., Saboe T.D., Campbell S.J., Rosenthal A.S., Adamsf J., 1991. Novel Non-Nucleoside

inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. 1. Tricyclic pyridobenzo- and dipyridodiazepinones. *J. Med. Chem.* 34, 2231-2241.

Hatakeyama H., Akita H., Maruyama K., Suhara T., Harashima H., 2004. Factors governing the in vivo tissue uptake of transferrin-coupled polyethylene glycol liposomes in vivo. *Int. J. Pharm.* 281, 25-33.

Hazuda D.J., Felock P., Witmer M., Wolfe A., Stillmock K., Grobler J.A. Espeseth A. Gabryelski L., Schleif W., Blau C., Miller M.D., 2000. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* 287, 646-650.

Henderson A.J., Calame K.L., 1997. CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) sites are required for HIV-1 replication in primary macrophages but not CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 8714-8719.

Hogan T.H., Krebs F.C., Wigdahl B., 2002. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 gene expression and pathogenesis by CCAAT/enhancer binding proteins in cells of the monocyte/macrophage lineage. *J. NeuroVirol.* 8 (suppl. 2), 21-26.

Hou D. Z., Xie C.S., Huang K.J., Zhu C.H., 2003. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials* 24, 1781-1785.

Hu L., Tang X., Cui F., 2004. Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 1527–1535.

Huertas C.E.M., Fessi H., Elaissari A., 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 385, 113-142.

Hunter R.J., 1993. *Introduction to Modern Colloid Science*. Oxford University Press, Inc.: New York.

Jain S., Tiwary A.K., Sapra B., Jain N.K., 2007. Formulation and evaluation of ethosomes for transdermal delivery of lamivudine, *AAPS PharmSciTech* 8, E1-E9.

Jain S.K., Gupta Y., Jain A., Saxena A.R., Khare P., Jain A., 2008. Mannosylated gelatin nanoparticles bearing an anti-HIV drug didanosine for site-specific delivery. *Nanomedicine* 4, 41-48.

Jain A., Agarwal A., Majumder S., Lariya N., Khaya A., Agrawal H., Majumdar S., Agrawal G.P., 2010. Mannosylated solid lipid nanoparticles as vectors for site-specific delivery of an anti-cancer drug. *J. Control. Release* 148, 359-367.

Janeway C.A., Travels P., Walport M., Shlomchik M.J., 2005. Immunobiology: The immune system in health and disease, 6th ed. Garland Science Publ. New York.

Jayasree A., Sasidharan S., Koyakutty M., Nair S., Menon D., 2011. Mannosylated chitosan-zinc sulphide nanocrystals as fluorescent bioprobes for targeted cancer imaging. *Carbohydrate Polymers* 85, 37-43.

Kluza E., Yeo S.Y., Schmid S., van der Schaft D.W., Boekhoven R.W., Schiffelers R.M., Storm G., Strijkers G.J., Nicolay K., 2011. Anti-tumor activity of liposomal glucocorticoids: the relevance of liposome-mediated drug delivery, intratumoral localization and systemic activity. *J. Control. Release* 151, 10-17.

Kochansky C.J., McMasters D.R., Lu P., Koeplinger K.A., Kerr H.H., Shou M., Korzekwa K.R., 2008. Impact of pH on plasma protein binding in equilibrium dialysis. *Mol. Pharm.* 5, 438-448.

Korsmeyer R.W., Peppas N.A., 1981. Macromolecular and modeling aspects of swelling-controlled systems. In: ROSEMAN, T.J.; MANSDORF, S.Z., (Eds.). *Controlled release delivery systems*. Marcel Dekker, Inc.: New York, pg. 77-90.

Korsmeyer R.W., Gurny R., Doelker E., Buri, Peppas N.A., 1983. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* 15, 25-35.

Kumari A., Yadav S.K., Yadav S.C., 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloid Surface B* 75, 1-18.

Kuo Y.C., Chen H.H., 2009. Entrapment and release of saquinavir using novel cationic solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 365, 206-213.

Kuo Y.C., Chung J.F., 2011a. Physicochemical properties of nevirapine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *Colloid Surf. B* 83, 299-306

Kuo Y.C., Chung J.F., 2011b. Solid lipid nanoparticles comprising internal Compritol 888 ATO, tripalmitin and cacao butter for encapsulating and releasing stavudine, delavirdine and saquinavir. *Colloid Surface B* 88, 682-690.

Lian T., Ho R.J.Y., 2001. Trends and Developments in liposome drug delivery systems. *J. Pharm. Sci.* 6, 667-680.

Libiol,COM.<http://www.libiol.com/internet/gattwk3.nsf/TECHDOCPARCLEFPOPUP/PRD00003414?OpenDocument>

Lockman P., Mumper R.J., Khan M.A., Allen D.D., 2002. Nanoparticles technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28, 1-23.

Lockoff O., Stadler P., 1998 Syntheses of glycosylamides as glycolipid analogs. *Carbohydr. Res.* 314, 13-24.

Lopes C.M., Lobo J.M.S., Costa P., 2005. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Braz. J. Pharm. Sci.* 41, 143-154.

Martins S., Tho I., Reimold I., Fricker G., Souto E., Ferreira D., Brandl M., 2012. Brain delivery of camptothecin by means of solid lipid nanoparticles: formulation design, in vitro and in vivo studies. *Int. J. Pharm.* 439, 49-62.

Masur H., Michelis M.A., Greene J.B., Onorato I., Stouwe R.A., Holzman R.S., Wormser G., Brettman L., Lange M., Murray H.W., Cunningham-Rundles S., 1981. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *New Engl. J. Med.* 305, 1431-1438.

Mehnert W., Mäder K., 2001. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 47, 165-196.

Merck & Co. Inc., 2001. The Merck Index, 13th ed. WhiteHouse Station: New Jersey.

Miller C.A., Neogi P., 1985. *Interfacial Phenomena: Equilibrium and Dynamic Effects*, vol. 17. Marcel Dekker, Inc.: New York.

Mitchell J.P., Roberts K.D., Langley J., Koentgen F., Lambert J.N., 1999. A direct method for the formation of peptide and carbohydrate dendrimers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 2785-2788.

Mitts E., Hixon R.M., 1944. The reaction of glucose with some amines. *J. Am. Chem. Soc.* 66, 483-486.

Moghimi S.M., Hamad I., Andresen T.L., Jørgensen K., Szebeni J., 2006. Methylation of the phosphate oxygen moiety of phospholipid-methoxy(polyethylene glycol) conjugate prevents PEGylated liposome-mediated complement activation and anaphylatoxin production. *FASEB J.* 20, 2057-2067.

Morel S., Terreno E., Ugazio E., Aime S., Gasco M.R., 1998. NMR relaxometric investigations of solid lipid nanoparticles (SLN) containing gadolinium (III) complexes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45, 157-163.

Mühlen A., Schwarz, C. Mehnert, W., 1998. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - Drug release and release mechanism. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45, 149-155.

Müller B.G., Leuenberger H., Kissel T., 1996. Albumin nanospheres as carries for passive drug targeting: an optimized manufacturing technique. *Pharm. Res.* 13, 32-37.

Müller R.H., Mäder K., Gohla S., 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50,161-177.

Müller R.H., Radtke M., Wissing S.A., 2002. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int. J. Pharm.* 242, 121-128.

Neto B.B, Scarminio I.S., Bruns R.E., 2007. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3^a ed. Editora da Unicamp: Campinas.

Nguyen A.T., Feasley C.L., Jackson K.W., Nitz T.J., Salzwedel K., Air G.M., Sakalian M., 2011. The prototype HIV-1 maturation inhibitor, bevirimat, binds to the CA-SP1 cleavage site in immature Gag particles. *Retrovirology* 8, 1-13.

Noack A., Hause G., Mäder K., 2012. Physicochemical characterization of curcuminoid-loaded solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 423, 440-451.

OMS, 2011. Organização Mundial de Saúde. <http://www.who.int/en/>

Parboosing R., Maguire G.E.M., Govender P., Jruger H.G., 2012. Nanotechnology and the treatment of HIV infection. *Viruses* 4, 488-520.

Pathak S.M., Kumar A.R., Subramanian G., Udupa N., 2007. Development and validation of a reversed-phase liquid chromatographic method with fluorescence detection for the study of Saquinavir pharmacokinetics in rat plasma. *Anal. Chim. Acta* 594, 248-256.

Perry C.M., 2010. Maraviroc: a review of its use in the management of CCR5-tropic HIV-1 infection. *Drugs* 70, 1189-1213.

Pomerantz R.J., 2002. Reservoirs of Human Immunodeficiency Virus type 1: the main obstacles to viral eradication. *Clin. Infect. Dis.* 34, 91-97.

Qian C., McClements D.J., 2011. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size. *Food Hydrocolloid* 25, 1000-1008.

Ramachandran G., Kumar A.K., Swaminathan S., Venkatesan P., Kumaraswami V., Greenblatt D.J., 2006. Simple and rapid liquid chromatography method for determination of efavirenz in plasma. *J. Chromatogr. B* 835, 131-135.

Rees G.D., Robinson B.H., 1993. Microemulsions and organogels: properties and novel applications. *Adv. Mater.* 5, 608-619.

Roberts N.A., Martin J.A., Kinchington D., Broadhurst A.V., Craig J.C., Duncan I.B., Galpin S.A., Handa B.K., Kay J., Krohn A., 1990. Rational design of peptide-based HIV protease inhibitors. *Science* 248, 358-361.

Rohrs B.R., 2001. Dissolution method development for poorly soluble compounds. *Dissolut Technol.* 3, 1-5.

Sato T., Ruch R., 1980. *Stabilization of Colloidal Dispersions by Polymer Adsorption. vol. 9.* Marcel Dekker, Inc.: New York.

Schäfer V., Briesen H., Andreesen R., Steffan A.M., Royer C., Tröster S., Kreuter J., Rübsamen-Waigmann H., 1992. Phagocytosis of nanoparticles by Human Immunodeficiency Virus (HIV)-infected macrophages: a possibility for antiviral drug target. *Pharm. Res.* 9, 541-546.

Scheffel U., Rhodes B.A., Natarajan T.K., Wagner H.N. Jr., 1970. Albumin microspheres for study of the reticuloendothelial system. *J. Nucl. Med.* 13, 498-503.

SDBS. http://sdb.srioddb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi

Shah L.K., Amiji M.M., 2006. Intracellular delivery of saquinavir in biodegradable polymeric nanoparticles for HIV/AIDS. *Pharm. Res.* 23, 2638-2645.

Shaw J.D., 1992. *Introduction to Colloid & Surface Chemistry*. 4th ed. Butterworth-Heinemann: Oxford.

Sierra-Aragón S., Walter H., 2012. Targets for inhibition of HIV replication: entry, enzyme action, release and maturation. *Intervirology* 55, 84-97.

Sierra S., Kupfer B., Kaiser R., 2005. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J. Clin. Virol.* 34, 233-244.

Silva G.R., Lages G.P., Pianetti G.A., Nunam E.A., Soares C.D.V., Campos L.M.M., 2006. Determinação de lamivudina, estavudina e nevirapina, em comprimidos, por cromatografia líquida de alta eficiência. *Quim. Nova* 6, 1159-1163.

Taylor P.R., Martinez-Pomares L., Stacey M., Lin H.H., Brown G.D., Gordon S., 2005. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 901-944.

United States Pharmacopea, 2000. *Drug information for the health care professional*. 20th ed., Micromedex: Englewood.

Villani P., Regazzi M.B., Castelli F., Viale P., Torti C., Seminari E., Maserati R., 1999. Pharmacokinetics of efavirenz (EFV) alone and in combination therapy with nelfinavir (NFV) in HIV-1 infected patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 48, 712-715.

Vicent M.J., 2007. Polymer-drug conjugates as modulators of cellular apoptosis. *AAPS J.* 9, 2000-2007.

Vyas T.K., Shahiwala A., Amiji M.M., 2008. Improved oral bioavailability and brain transport of saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations. *Int. J. Pharm.* 347, 93-101.

Wong H.L., Wu X.Y., Bendayan R., 2012. Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. *Adv. Drug Del. Rev.* 64, 686-700.

Yeagle P.L., 1985. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 822, 267–287

You J., Wan F., de Cui F., Sun Y., Du Y.Z., Hu F.Q., 2007. Preparation and characteristic of vinorelbine bitartrate-loaded solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 343, 270-276.

Young S.D., Britcher S.F., Tran L.O., Payne L.S., Lumma W.C., Lyle T.A., Huff J.R., Anderson P.S., Olsen D.B., Carroll S.S., 1995. L-743,726 (DMP-266): a novel, highly potent nonnucleoside inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2602-2605.

Zhang N., Ping Q., Huang G., Xu W., Cheng Y., Han X., 2006. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. *Int. J. Pharm.* 327, 153-159.

Zhang J.Q., Liu J., Li X.L., Jasti B.R., 2007. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing Silibinin. *Drug Deliv.* 14, 381-387.

UNAIDS, 2011. Joint United Nations Program on HIV/AIDS. <http://www.unaids.org/en/>.

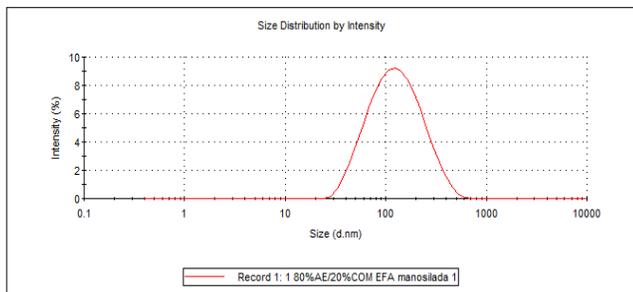
Wagner J.G., 1969. Interpretation of percent dissolved-time plots derived from In vitro testing of conventional tablets and capsules. *J. Pharm. Sci.* 58, 1253- 1257.

7. Anexos

7.1. Gráficos dos diâmetros e potenciais Zeta das NLS das formulações

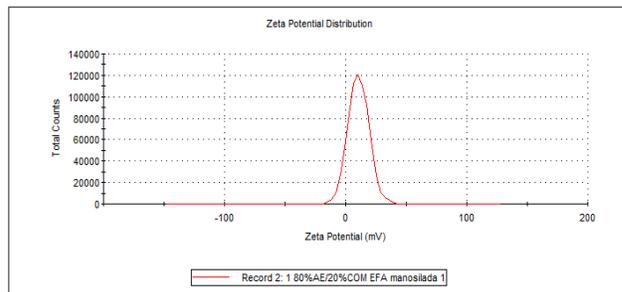
Z-Average (d.nm): 106,9
Pdi: 0,241
Intercept: 0,907
Result quality : Good

Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Peak 1: 145,1	100,0	88,22
Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Peak 3: 0,000	0,0	0,000



Zeta Potential (mV): 3,43
Zeta Deviation (mV): 50,5
Conductivity (mS/cm): 0,204
Result quality : Good

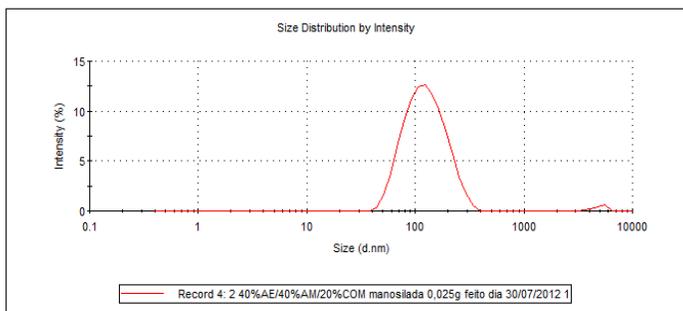
Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Peak 1: 10,6	100,0	8,88
Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Peak 3: 0,00	0,0	0,00



80%AE/20%COM+EFV manosilada

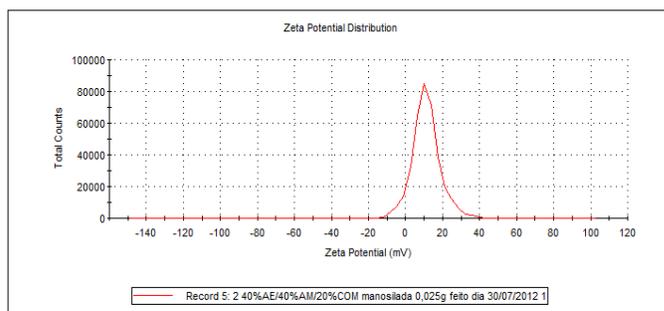
Z-Average (d.nm): 114,2
Pdi: 0,200
Intercept: 0,907
Result quality : Good

Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Peak 1: 132,2	98,5	57,10
Peak 2: 4901	1,5	670,0
Peak 3: 0,000	0,0	0,000



Zeta Potential (mV): 11,1
Zeta Deviation (mV): 7,56
Conductivity (mS/cm): 0,223
Result quality : Good

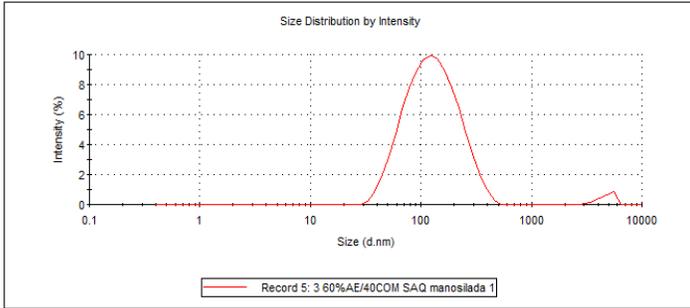
Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Peak 1: 11,1	100,0	7,56
Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Peak 3: 0,00	0,0	0,00



40%AE/40%AM/20%COM+EFV manosilada

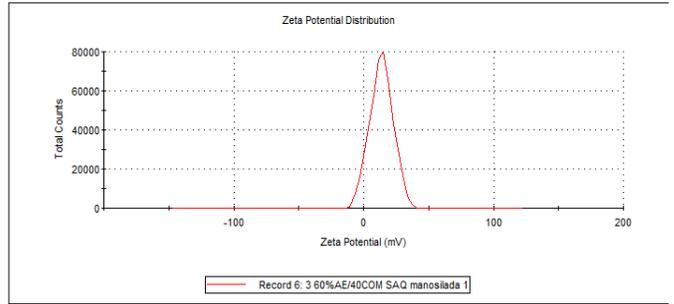
Z-Average (d.nm): 113,3
Pdl: 0,258
Intercept: 0,903
Result quality: Good

Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Peak 1: 141,6	97,9	76,53
Peak 2: 4847	2,1	702,7
Peak 3: 0,000	0,0	0,000



Zeta Potential (mV): 13,6
Zeta Deviation (mV): 9,94
Conductivity (mS/cm): 0,204
Result quality: Good

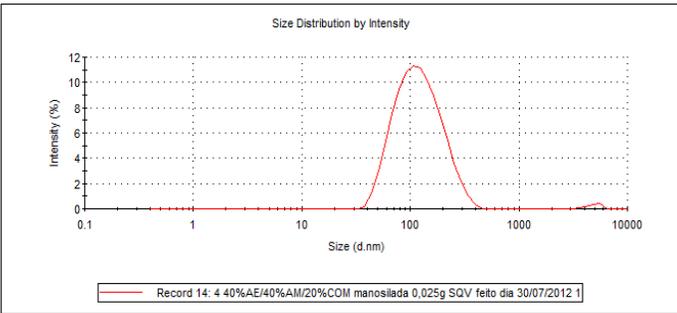
Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Peak 1: 13,6	100,0	8,93
Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Peak 3: 0,00	0,0	0,00



80%AE/20%COM+SQV manoslada

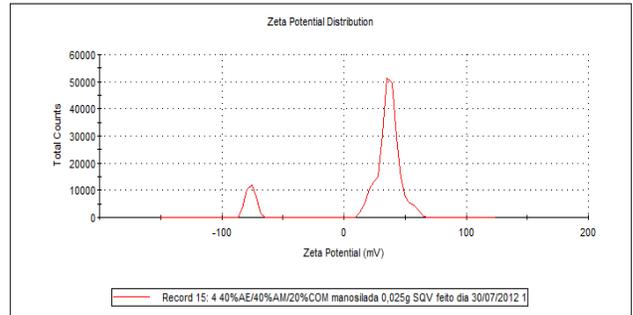
Z-Average (d.nm): 107,8
Pdl: 0,201
Intercept: 0,871
Result quality: Good

Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Peak 1: 129,9	98,9	63,60
Peak 2: 4859	1,1	695,0
Peak 3: 0,000	0,0	0,000



Zeta Potential (mV): 4,20
Zeta Deviation (mV): 85,4
Conductivity (mS/cm): 0,204
Result quality: See result quality report

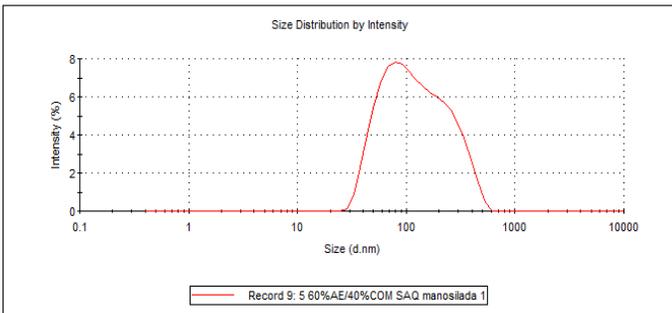
Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Peak 1: 36,6	87,5	8,93
Peak 2: -76,3	12,5	3,81
Peak 3: 0,00	0,0	0,00



40%AE/40%AM/20%COM+SQV manoslada

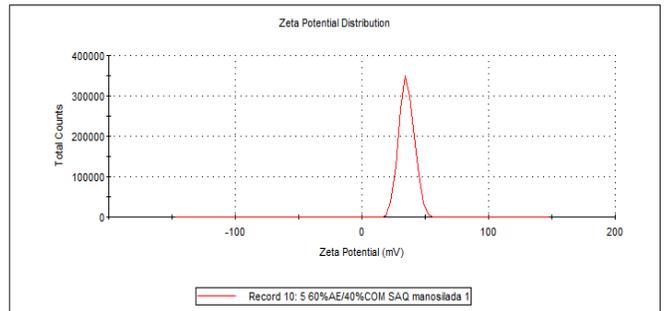
Z-Average (d.nm): 160,9
Pdl: 0,289
Intercept: 0,903
Result quality: Refer to quality report

Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Peak 1: 148,2	100,0	102,2
Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Peak 3: 0,000	0,0	0,000



Zeta Potential (mV): 34,9
Zeta Deviation (mV): 13,2
Conductivity (mS/cm): 0,235
Result quality: Good

Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Peak 1: 35,3	100,0	5,96
Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Peak 3: 0,00	0,0	0,00



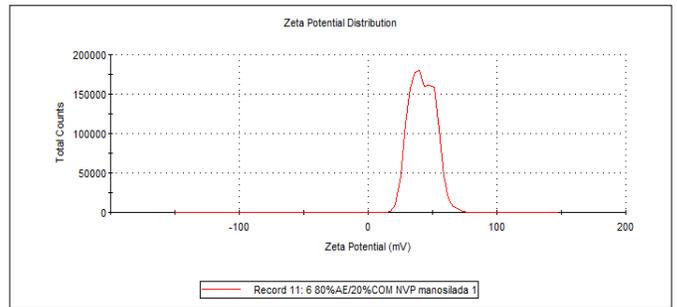
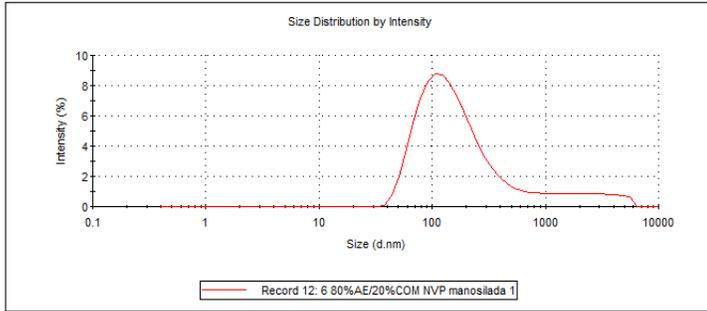
60%AE/40%COM+SQV manoslada

Z-Average (d.nm): 132,6
Pdl: 0,374
Intercept: 0,918
Result quality : Good

Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Peak 1: 425,5	100,0	859,6
Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Peak 1: 36,0	56,1	5,77
Peak 2: 50,2	43,9	5,56
Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Zeta Potential (mV): 25,1
Zeta Deviation (mV): 76,5
Conductivity (mS/cm): 0,215
Result quality : See result quality report



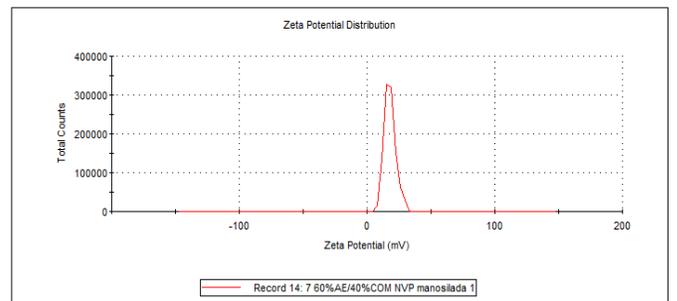
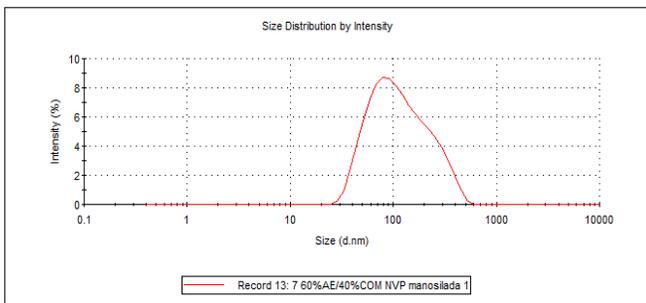
80%AE/20%COM+NVP manosilada

Z-Average (d.nm): 165,3
Pdl: 0,252
Intercept: 0,832
Result quality : Refer to quality report

Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Peak 1: 136,6	100,0	92,34
Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Peak 1: 18,0	100,0	4,59
Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Zeta Potential (mV): 18,0
Zeta Deviation (mV): 4,59
Conductivity (mS/cm): 0,539
Result quality : Good



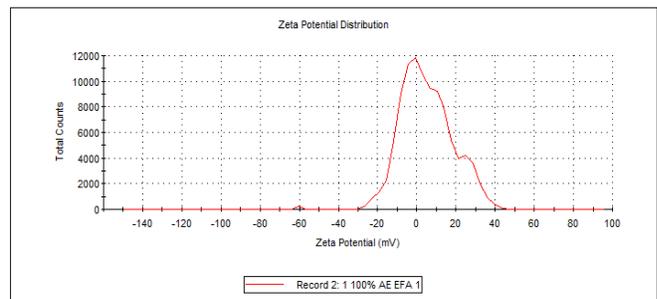
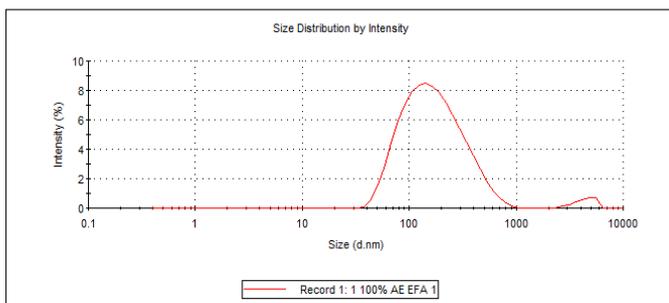
60%AE/40%COM+NVP manosilada

Z-Average (d.nm): 142,5
Pdl: 0,316
Intercept: 0,924
Result quality : Good

Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Peak 1: 196,0	97,2	132,8
Peak 2: 4420	2,8	916,4
Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Peak 1: 2,19	85,3	10,3
Peak 2: 27,1	14,5	4,97
Peak 3: -60,3	0,2	6,74e-7

Zeta Potential (mV): 4,17
Zeta Deviation (mV): 22,1
Conductivity (mS/cm): 0,202
Result quality : See result quality report



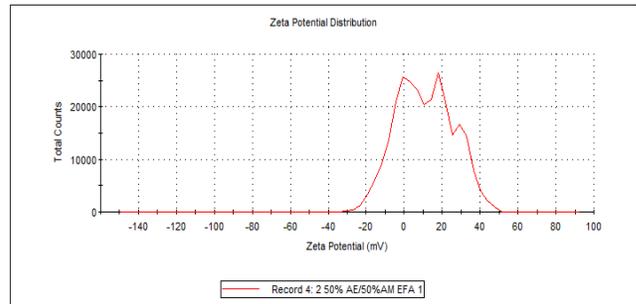
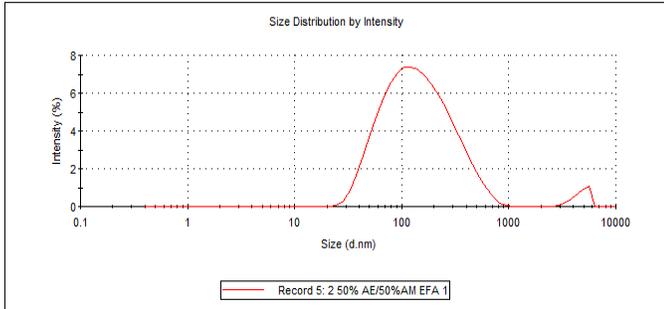
100%AE+EFV sem manose

Z-Average (d.nm): 117,1
PdI: 0,380
Intercept: 0,926
Result quality : Good

Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Peak 1: 172,9	97,0	129,9
Peak 2: 4772	3,0	744,1
Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Peak 1: -0,432	47,6	8,13
Peak 2: 17,6	33,1	4,91
Peak 3: 31,7	19,4	5,38

Zeta Potential (mV): 5,31
Zeta Deviation (mV): 47,6
Conductivity (mS/cm): 0,241
Result quality : See result quality report



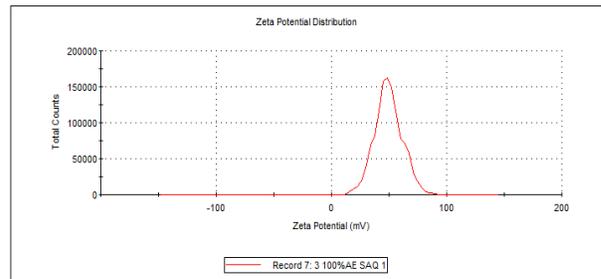
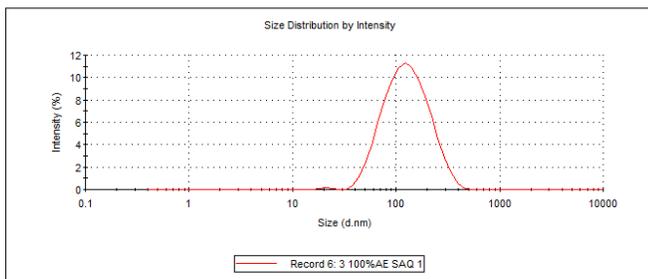
50%AE/50%AM+EFV sem manose

Z-Average (d.nm): 112,4
PdI: 0,204
Intercept: 0,913
Result quality : Good

Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Peak 1: 138,9	99,6	67,93
Peak 2: 21,15	0,4	2,493
Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Peak 1: 49,5	100,0	12,1
Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Zeta Potential (mV): 49,5
Zeta Deviation (mV): 12,1
Conductivity (mS/cm): 0,213
Result quality : See result quality report



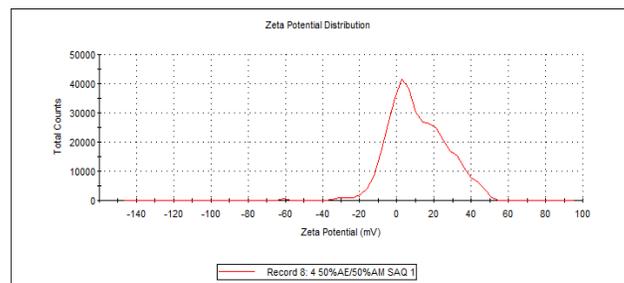
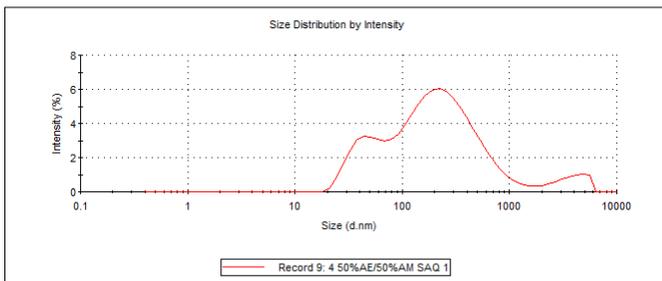
100%AE+SQV sem manose

Z-Average (d.nm): 132,1
PdI: 0,503
Intercept: 0,917
Result quality : Good

Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Peak 1: 297,8	73,8	247,1
Peak 2: 46,08	20,0	13,46
Peak 3: 3751	6,1	1192

Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Peak 1: 11,3	99,3	14,8
Peak 2: -29,6	0,5	2,36
Peak 3: -60,8	0,2	0,00

Zeta Potential (mV): 8,85
Zeta Deviation (mV): 31,7
Conductivity (mS/cm): 0,254
Result quality : See result quality report

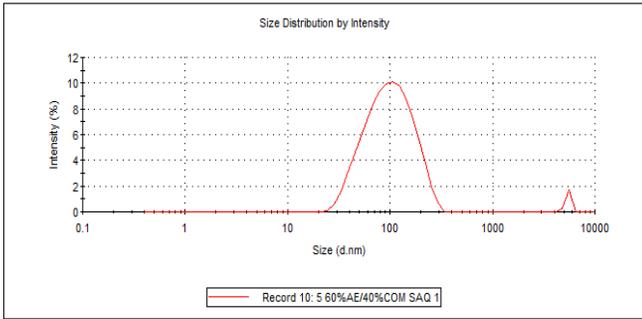


50%AE/50%AM+SQV sem manose

Z-Average (d.nm): 110,6
Pdi: 0,357
Intercept: 0,885

Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Peak 1: 108,6	98,1	54,67
Peak 2: 5474	1,9	239,6
Peak 3: 0,000	0,0	0,000

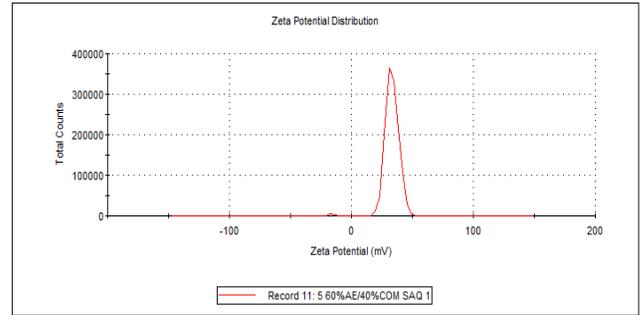
Result quality : **Refer to quality report**



Zeta Potential (mV): 33,0
Zeta Deviation (mV): 6,34
Conductivity (mS/cm): 0,218

Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Peak 1: 33,3	99,5	5,23
Peak 2: -16,3	0,5	1,68
Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : **See result quality report**

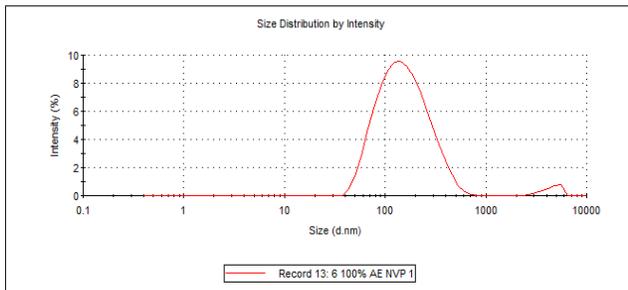


60%AE/40%COM+SQV sem manose

Z-Average (d.nm): 135,5
Pdi: 0,252
Intercept: 0,908

Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Peak 1: 171,1	97,4	99,09
Peak 2: 4543	2,6	858,8
Peak 3: 0,000	0,0	0,000

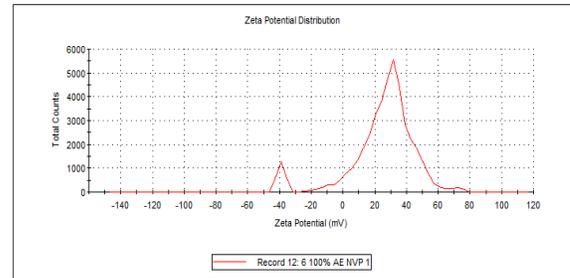
Result quality : **Good**



Zeta Potential (mV): 0,586
Zeta Deviation (mV): 91,9
Conductivity (mS/cm): 0,235

Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Peak 1: 28,1	93,1	14,2
Peak 2: -39,1	5,5	2,55
Peak 3: 70,2	1,4	3,88

Result quality : **See result quality report**

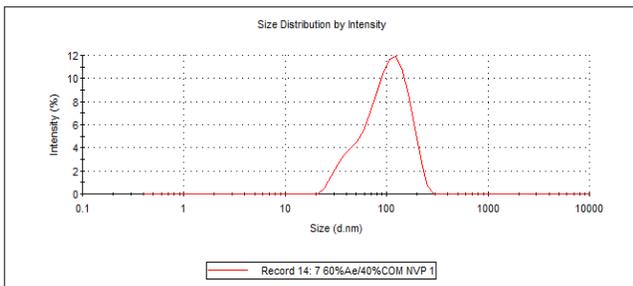


100%AE+NVP sem manose

Z-Average (d.nm): 128,7
Pdi: 0,239
Intercept: 0,886

Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Peak 1: 105,9	100,0	48,93
Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Peak 3: 0,000	0,0	0,000

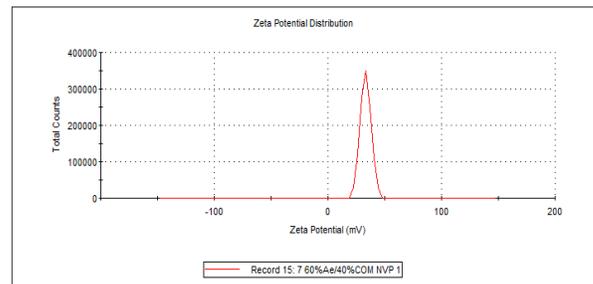
Result quality : **Refer to quality report**



Zeta Potential (mV): 33,2
Zeta Deviation (mV): 4,83
Conductivity (mS/cm): 0,191

Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Peak 1: 33,2	100,0	4,83
Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : **Good**



60%AE/40%COM+NVP sem manose