



LETÍCIA PAIFER MARQUES

**DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIA DEPOT PARA ENTREGA
MODIFICADA DE FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS ENCAPSULADOS EM
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS E CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS**

CAMPINAS

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

LETÍCIA PAIFER MARQUES

**DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIA DEPOT PARA ENTREGA
MODIFICADA DE FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS ENCAPSULADOS EM
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS E CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS**

ORIENTADOR: PROF. DR. FRANCISCO BENEDITO TEIXEIRA PESSINE

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM QUÍMICA NA
ÁREA DE FÍSICO-QUÍMICA.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
LETÍCIA PAIFER MARQUES E ORIENTADA PELO PROF. DR. FRANCISCO BENEDITO
TEIXEIRA PESSINE.**

Assinatura do Orientador

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR DANIELLE DANTAS DE SOUSA -
CRB8/6490 - BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

M348d Marques, Leticia Paifer (1989-).
Desenvolvimento de tecnologia Depot para entrega modificada de fármacos anti-inflamatórios encapsulados em nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados / Leticia Paifer Marques. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Francisco Benedito Teixeira Pessine.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Hidrogel. 2. Nanopartículas lipídicas sólidas. 3. Carreadores lipídicos nanoestruturados. 4. Betametasona. 5. Dexametasona. I. Pessine, Francisco BeneditoTeixeira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Depot technology development for anti-inflammatory drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers delivery

Palavras-chave em inglês:

Hydrogel
Solid lipid nanoparticles
Nanostructured lipid carriers
Betamethasone
Dexamethasone

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestra em Química na área de Físico-Química

Banca examinadora:

Francisco Benedito Teixeira Pessine [Orientador]
Ljubica Tasic
Eneida de Paula

Data de defesa: 09/08/2013

Programa de pós-graduação: Química

Dedicatória

A meus amados pais, Osmar e Eunice, pelo apoio incondicional.
A Julinda Sodré, Paulo Magrini e Lucimar Magrini pela imensa
generosidade.

"Autoritárias paralisadoras, circulares, às vezes elípticas, as frases de efeito, também jocosamente denominadas pedacinhos de ouro, são uma praga maligna, das piores que tem assolado o mundo. Dizemos aos confusos, Conhece-te a ti mesmo, como se conhecer-se a si mesmo não fosse a quinta e mais dificultosa operação das aritméticas humanas, dizemos aos abúlicos, Querer é poder, como se as realidades bestiais do mundo não se divertissem a inverter todos os dias a posição relativa dos verbos, dizemos aos indecisos, Começar pelo princípio, como se esse princípio fosse a ponta sempre visível de um fio mais enrolado que bastasse puxar e ir puxando até chegarmos à outra ponta, a do fim, e como se, entre a primeira e a segunda, tivéssemos tido na mão uma linha lisa e contínua em que não havia sido preciso desfazer nós e desenredar estrangulamentos, coisa impossível de acontecer na vida dos romanos e, se uma outra frase de efeito é permitida, nos romanos da vida."

José Saramago – "A caverna"

Agradecimentos

Agradeço à minha família pelo incentivo e apoio em todas as etapas deste trabalho que, muitas vezes, não foram fáceis. A todos os amigos que ajudaram de forma direta ou indireta ao longo desta jornada. Em especial, agradeço a Larissa e a Guilherme por escutarem todos os desabafos com paciência e me ajudarem a enxergar as situações com mais clareza e a meus pais por serem compreensivos, pacientes e estarem sempre prontos a me oferecer bons conselhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine, por todo o auxílio e por manter sua porta sempre aberta para tirar minhas dúvidas, mesmo nas horas mais inconvenientes.

Aos meus queridos companheiros de laboratório: Ana Cláudia, Andreza, Caio, Cássia, Daniela, Francieli, Kátia, Luciana, Marcelo, Milene e Viviane por todas as explicações, discussões, risadas e por todo o conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Dr. Néelson E. Durán por autorizar a utilização do equipamento para medidas de Espalhamento Dinâmico de Luz e potencial Zeta ao longo de todo o trabalho.

Ao Prof. Dr. Watson Loh e a Prof^a Dr^a Eneida de Paula por permitirem a utilização de seus liofilizadores.

Aos técnicos Anderson Pedrosa, Gustavo Shimamoto e Sônia Fanelli do laboratório de Ressonância Magnética Nuclear pelo treinamento e por todo o auxílio ao longo das análises; à Fabiana Favoretto do laboratório de Análises Térmicas, Raquel Miller do laboratório de Difractometria de Raios-X e Ricardo Pereira do laboratório de Cromatografia Líquida por realizarem minhas análises de forma extremamente competente; à Márcia Antonelli do laboratório de Espectroscopia na Região do Infravermelho e Cláudia Martelli do laboratório de Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível pelo auxílio durante as medidas espectroscópicas; à Daniel Razzo pelo auxílio na obtenção das imagens através de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Aos demais funcionários do Instituto de Química, que de alguma forma me auxiliaram ao longo do projeto.

À empresa CPKelco pela doação das amostras de pectina cítrica.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

CURRICULUM VITAE

Letícia Paifer Marques

Data de nascimento: 15/03/1989

Cidade: São Paulo Estado: SP

E-mail: leticia.paifer@anspharma.com.br

Formação Acadêmica

Graduação

Bacharelado em Química com habilitação em Química Forense

Departamento de Química - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - Universidade de São Paulo - USP - Ribeirão Preto - SP (Março de 2007-Dezembro de 2010)

Pós-graduação

Mestrado em Química - Físico-Química

Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - Campinas - SP (Março de 2011- Agosto de 2013)

Atividades Acadêmicas

Programa de Estágio Docente

Disciplina QF531/Físico-química II - carga horária: 8h semanais - Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas (Setembro de 2011-Dezembro de 2011)

Disciplina QF632/Físico-química Experimental - carga horária: 8h semanais - Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas (Agosto de 2012-Dezembro de 2012)

Apresentação de Trabalho em Congresso (pôster)

MARQUES, L.P.; PESSINE, F.B.T.

"Estudo Preliminar para Encapsulação de Dexametasona em Nanopartículas Lipídicas Sólidas". In: 3º Encontro sobre Estruturas Auto-organizadas em Soluções e Interfaces - AutoOrg, 2012, São Pedro, SP.

Resumo

DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIA DEPOT PARA ENTREGA MODIFICADA DE FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS ENCAPSULADOS EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS E CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS. Através de modificações na estrutura química da molécula de pectina cítrica, polissacarídeo utilizado nas indústrias alimentícias como agente gelificante/espessante, foi desenvolvido um Sistema Depot para entrega subcutânea de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo, respectivamente, Dexametasona (DXM) e Valerato de Betametasona (BTM). Os fármacos foram encapsulados nesses sistemas devido à necessidade de modificar seus perfis de liberação, diminuindo o número de aplicações e sua dosagem, reduzindo ocorrência de efeitos adversos. O produto da reação de oxidação da pectina cítrica foi caracterizado através de Espectroscopia da região do Infravermelho, Análise Termogravimétrica e Calorimetria Diferencial de Varredura. Os resultados indicaram o sucesso da reação, confirmado através da gelificação do hidrogel de pectina cítrica oxidada. As NLS e os CLN apresentaram valores de diâmetro médio em torno de 80nm, alta eficiência de encapsulação e perfis de liberação prolongada; para os CLN o fármaco BTM foi liberado ao longo de 144 horas e para as NLS o fármaco DXM foi liberado ao longo de 24 horas. Estes resultados mostram que as NLS de DXM poderiam ser utilizadas para tratar processos inflamatórios agudos e que os CLN de BTM seriam úteis no tratamento de processos inflamatórios crônicos.

Abstract

DEPOT TECHNOLOGY DEVELOPMENT FOR ANTI-INFLAMMATORY DRUGS ENCAPSULATED IN SOLID LIPID NANOPARTICLES AND NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS DELIVERY. A modified chemical structure of citrus pectin was used to develop a Depot system for subcutaneous delivery of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) containing, respectively, Dexamethasone (DXM) and Betamethasone Valerate (BTM). Citrus pectin is a polysaccharide used in food industry as a gelling/thickener agent. The drugs were encapsulated in this system with the aim to modify their release profiles. This would result in the reduction of the number of applications and dosage. As a consequence, it would also reduce adverse side effects that these drugs may cause. The citrus pectin oxidation product was characterized by Infrared Spectroscopy, Thermogravimetric Analysis and Differential Scanning Calorimetry. The results indicated that the reaction occurred. This was confirmed by gelation of the citrus pectin oxidation product. SLN and CLN showed values with diameters around 80nm, high encapsulation efficiency and sustained release profiles. BTM was released from the CLN over 144 hours and DXM was released from the NLS over 24 hours. These results showed that the DXM-NLS would be useful in the treatment of acute inflammatory processes. BTM-CLN could be applied in the treatment of chronic inflammatory processes.

Índice

Lista de Abreviaturas.....	XXV
Lista de Tabelas.....	XXVII
Lista de Figuras.....	XXXI
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Géis.....	1
1.1. Hidrogéis.....	2
2. Sistemas Depot.....	4
2.1. Pastas Termoplásticas.....	4
2.2. Sistemas de reticulação <i>in situ</i>	6
2.2.1. Géis termofixos.....	6
2.2.2. Géis foto reticulados.....	7
2.2.3. Géis de reticulação mediada por íons.....	7
2.3. Sistemas de precipitação <i>in situ</i>	8
2.4. Sistemas de gelificação termicamente induzida.....	9
3. Pectina cítrica.....	10
4. Nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados.....	15
4.1. Métodos de preparação.....	18
4.1.1. Homogeneização a alta pressão.....	19
a) Homogeneização a quente.....	19
b) Homogeneização a frio.....	20
4.1.2. Ultrassonicação e homogeneização a alta velocidade.....	20
4.1.3. Dupla emulsão.....	20
4.2. Técnicas de caracterização.....	21
4.2.1. Espectroscopia de correlação de fótons e potencial Zeta.....	21
4.2.2. Difractometria de raios-X.....	22
4.2.3. Calorimetria diferencial de varredura.....	22
5. Esteroides.....	23
5.1. Corticosteroides.....	26

II. OBJETIVOS.....	31
1. Gerais.....	31
2. Específicos.....	31
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	33
1. Equipamentos utilizados.....	33
2. Reagentes Utilizados.....	34
3. Caracterização dos Fármacos.....	38
3.1. Espectrofotometria nas regiões do Ultravioleta-Visível e do Infravermelho.....	38
3.2. Análises Térmicas.....	38
3.2.1. Análise Termogravimétrica.....	38
3.2.2. Calorimetria Diferencial de Varredura.....	38
4. Nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados.	39
4.1. Considerações iniciais.....	39
4.2. Planejamentos experimentais.....	39
4.2.1. Planejamentos fatoriais 2^3	40
4.2.2. Planejamentos fatoriais 2^2 com ponto central e deslocamentos ao longo do caminho de máxima inclinação.....	41
4.3. Método final de preparação das nanopartículas de Valerato de Betametasona e Dexametasona.....	42
4.4. Desenvolvimento das formulações e ajuste do método de preparação das nanopartículas de Valerato de Betametasona e Dexametasona.....	43
4.4.1. Testes de preparação utilizando elemento dispersor metálico (S75N-25F) para Ultra-Turrax [®] T25.....	43
4.4.2. Testes de preparação utilizando elemento dispersor de policarbonato (PC/PEEK – S25D – 10G – KS) para Ultra-Turrax [®] T25.....	47
4.4.3. Testes de preparação utilizando os dois elementos dispersores para Ultra-Turrax [®] T25.....	49
4.4.4. Testes de preparação utilizando ultrassom de ponteira.....	54
4.5. Caracterização das formulações de NP de BTM e DXM.....	55
4.5.1. Determinação da eficiência de encapsulação e do percentual de	

carregamento.....	55
a) Curva analítica.....	55
b) Metodologia.....	56
c) Microscopia eletrônica de varredura.....	58
4.5.2. Análises Térmicas.....	58
a) Análise Termogravimétrica.....	59
b) Calorimetria Diferencial de Varredura.....	59
4.5.3. Difratomia de Raios-X.....	59
4.5.4. Determinação do perfil de liberação dos fármacos a partir das NP.....	59
a) Cinética de ordem zero.....	61
b) Cinética de Primeira Ordem.....	61
c) Modelo de Higuchi.....	62
d) Modelo de Peppas-Korsmeyer.....	62
e) Modelo de Baker-Lonsdale.....	63
5. Gel termo sensível de pectina cítrica oxidada.....	65
5.1. Oxidação da pectina cítrica.....	65
5.2. Caracterização dos produtos de reação.....	65
5.2.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	65
5.2.2. Espectroscopia na região do Infravermelho.....	65
5.2.3. Análises térmicas.....	66
a) Análise Termogravimétrica.....	66
b) Calorimetria Diferencial de Varredura.....	66
5.2.4. Determinação do percentual de oxidação.....	66
5.3. Gelificação.....	67
5.4. Estudo de Intumescimento.....	68
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
1. Caracterização dos fármacos.....	69
1.1. Espectrofotometria nas regiões do Ultravioleta-Visível e do Infravermelho.....	69
1.2. Análises Térmicas.....	72
1.2.1. Análise Termogravimétrica.....	72

1.2.2. Calorimetria diferencial de varredura.....	73
2. Nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados.	74
2.1. Desenvolvimento das formulações e do método de preparação das nanopartículas de Valerato de Betametasona e Dexametasona.....	74
2.1.1. Planejamentos experimentais preliminares para a preparação de NP utilizando elemento dispersor metálico (S75N-25F) para Ultra-Turrax®T25....	74
2.1.2. Testes de preparação utilizando elemento dispersor de policarbonato (PC/PEEK – S25D – 10G – KS) para Ultra-Turrax®T25.....	78
2.1.3. Testes de preparação utilizando os dois elementos dispersores para Ultra-Turrax® T25.....	81
2.1.4. Testes de preparação utilizando sonicador de ponteira.....	85
2.2 Caracterização das formulações de nanopartículas de valerato de betametasona e dexametasona.....	87
2.2.1 Determinação da eficiência de encapsulação e do percentual de carregamento.....	87
a) Microscopia Eletrônica de Varredura.....	91
2.2.2. Análises Térmicas.....	97
a) Análise Termogravimétrica.....	97
b) Calorimetria Diferencial de Varredura.....	99
2.2.3. Difractometria de Raios-X.....	103
2.2.4. Determinação do perfil de liberação dos fármacos a partir das nanopartículas.....	104
3. Gel termo sensível de pectina cítrica oxidada.....	111
3.1. Caracterização do produto de reação.....	111
3.1.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	111
3.1.2. Espectroscopia na região do Infravermelho.....	112
3.1.3. Análises Térmicas.....	114
a) Análise Termogravimétrica.....	114
b) Calorimetria Diferencial de Varredura.....	116
3.1.4. Determinação do percentual de oxidação.....	117
3.2. Gelificação.....	117

3.3. Estudo de intumescimento.....	120
V. CONCLUSÕES.....	123
VI. TRABALHOS FUTUROS.....	125
VII. REFERÊNCIAS.....	127
VIII. ANEXOS.....	137

Lista de Abreviaturas

ξ	Potencial Zeta
φ	Diâmetro médio de partícula
$\Phi_{\text{experimental}}$	Diâmetro médio de partícula experimental
$\Phi_{\text{teórico}}$	Diâmetro médio de partícula teórico
BTM	Valerato de betametasona
CLN	Carreadores lipídicos nanoestruturados
CLN-BTM	Carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com valerato de betametasona
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
DXM	Dexametasona
EE	Eficiência de encapsulação
IV	Espectrofotometria na região do Infravermelho
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
NLS-DXM	Nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com dexametasona
NP	Nanopartículas
NP-BTM	Nanopartículas carregadas com valerato de betametasona
NP-DXM	Nanopartículas carregadas com dexametasona
PC	Pectina cítrica
PCO	Pectina cítrica oxidada
PDI	Índice de polidispersidade
RMN	Ressonância magnética nuclear
TGA	Análise termogravimétrica
UPLC	Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência
UV-Vis	Espectrofotometria na região do Ultravioleta-Visível

Lista de tabelas

Tabela 1. Coeficientes de contraste para um planejamento fatorial 2^3	40
Tabela 2. Quantidades fixas dos componentes da formulação de NP de BTM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F) para o planejamento fatorial 2^3	44
Tabela 3. Níveis do planejamento fatorial 2^3 para NP de BTM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F).....	44
Tabela 4. Quantidades fixas dos componentes da formulação de NP de BTM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F) para o planejamento fatorial 2^2 com ponto central.....	45
Tabela 5. Níveis do planejamento fatorial 2^2 com ponto central para NP de BTM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F).....	45
Tabela 6. Caminho de máxima inclinação para o planejamento fatorial 2^2 com ponto central para NP de BTM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F).....	46
Tabela 7. Níveis do planejamento fatorial 2^2 com ponto central para NP de DXM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F).....	46
Tabela 8. Caminho de máxima inclinação para o planejamento fatorial 2^2 com ponto central para NP de DXM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F).....	47
Tabela 9. Formulações de NP de BTM e DXM eleitas para testar o elemento dispersor de policarbonato (S25D-10G).....	48
Tabela 10. Níveis do planejamento fatorial 2^2 com ponto central para NP de BTM e DXM preparadas somente com elemento dispersor de policarbonato (S25D-10G).....	48
Tabela 11. Esquema de agitação 1 para o teste de preparação de NP de BTM e DXM com os dois elementos dispersores.....	49

Tabela 12. Componentes da formulação de NP de DXM mantidos fixos para o planejamento fatorial 2^2 com ponto central utilizando os dois tipos de elemento dispersor.....	50
Tabela 13. Níveis do planejamento fatorial 2^2 com ponto central para NP de DXM preparadas utilizando-se o esquema de agitação 1.....	50
Tabela 14. Caminho de máxima inclinação para o planejamento fatorial 2^2 com ponto central para NP de DXM preparadas utilizando-se o esquema de agitação 1.....	51
Tabela 15. Esquema de agitação 2 para o teste de preparação de NP de BTM e DXM com os dois elementos dispersores.....	51
Tabela 16. Teste para comparação entre os esquemas de agitação 1 e 2 para o preparo de NP de BTM e DXM.....	52
Tabela 17. Quantidades fixas dos componentes da formulação de NP de BTM e DXM para o teste com ácido oleico preparadas utilizando-se o esquema de agitação 2.....	52
Tabela 18. Proporções de ácido oleico utilizadas para o preparo de NP de BTM e DXM utilizando-se o esquema de agitação 2.....	53
Tabela 19. Formulações finais para as NP de BTM e DXM.....	53
Tabela 20. Teste para avaliar a eficiência do processo de sonicação na diminuição dos valores de ϕ e PDI das NP de BTM e DXM.....	54
Tabela 21. Resumo do método de preparação das NP de BTM e DXM.....	55
Tabela 22. Correlação ente os valores do expoente de liberação, n , da equação de Peppas-Korsmeyer com a geometria do sistema e com o mecanismo de liberação proposto (Siepman & Siepman, 2008).....	63
Tabela 23. Atribuições das bandas vibracionais do espectro IV de BTM em pastilhas de KBr.....	70
Tabela 24. Atribuições das bandas vibracionais do espectro IV de DXM em pastilhas de KBr.....	71
Tabela 25. Resultados do planejamento fatorial 2^3 para NP de BTM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F).....	74

Tabela 26. Coeficientes de contraste para o planejamento fatorial 2 ³ para NP de BTM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F).....	75
Tabela 27. Resultados do planejamento 2 ² com ponto central para NP de BTM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F).....	76
Tabela 28. Resultados dos deslocamentos ao longo do caminho de máxima inclinação para o planejamento fatorial 2 ² com ponto central para NP de BTM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F).....	77
Tabela 29. Resultado do planejamento fatorial 2 ² com ponto central para NP de DXM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F).....	77
Tabela 30. Resultados dos deslocamentos ao longo do caminho de máxima inclinação para o planejamento fatorial 2 ² com ponto central para NP de DXM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F).....	78
Tabela 31. Comparação entre os valores de ϕ , PDI e ξ de NP de BTM e DXM preparadas com diferentes elementos dispersores para Ultra-Turrax [®] T25.....	79
Tabela 32. Resultados do planejamento fatorial 2 ² com ponto central para NP de BTM e DXM preparadas somente com elemento dispersor de policarbonato (S25D-10G).....	80
Tabela 33. Resultados do planejamento fatorial 2 ² com ponto central para NP de DXM preparadas utilizando-se o esquema de agitação 1.....	82
Tabela 34. Resultados do deslocamento através do caminho de máxima inclinação para o planejamento fatorial 2 ² com ponto central para NP de DXM preparadas utilizando-se o esquema de agitação 1.....	83
Tabela 35. Resultados do teste para comparação entre os esquemas de agitação utilizados para a preparação das NP.....	83
Tabela 36. Avaliação da influência da adição de ácido oleico às	

formulações de NP de BTM e DXM preparadas utilizando-se esquema de agitação 2.....	84
Tabela 37. Resultados do teste preliminar para avaliar a eficiência do processo de sonicação na diminuição dos valores de ϕ e PDI das NP de BTM e DXM.....	86
Tabela 38. Comparação entre os valores obtidos para eficiência de encapsulação das amostras de NP de BTM e DXM utilizando dois tipos de membranas diferentes para preparar as amostras.....	88
Tabela 39. Eficiência de encapsulação e caracterização de tamanho de partícula das amostras de NP de BTM e DXM.....	89
Tabela 40. Resultados obtidos para o percentual de carregamento das formulações de NP e comparação com o valor teórico para o percentual de carregamento.....	90
Tabela 41. Ajuste do modelo de Baker-Londdale para liberação <i>in vitro</i> da formulação CLN-BTM.....	108
Tabela 42. Ajuste do modelo de Peppas-Korsmeyer para liberação <i>in vitro</i> da formulação NLS-DXM.	110
Tabela 43. Faixas de deslocamento químico de ^{13}C em alguns compostos carbonílicos (Constantino, 2006).	112
Tabela 44. Região de absorção de alguns compostos carbonílicos (Gunzler & Gremlich, 2002; Lopes & Fascio, 2004).	113
Tabela 45. Resultados da análise termogravimétrica para pectina cítrica (PC) e pectina cítrica oxidada (PCO).	115
Tabela 46. Resultados da análise por calorimetria diferencial de varredura pectina cítrica (PC) e pectina cítrica oxidada (PCO).	117

Lista de Figuras

Figura 1. Ilustração da formação de gel. (A) cadeias poliméricas "livres" e (B) rede tridimensional formada mediante reticulação (Ganjia & Abdekhodaiea, 2010).....	1
Figura 2. Estruturas químicas (A) N-isopropilacrilamida; (B) poli(hidroxietil metacrialto); (C) alginato de sódio; (D) pectina cítrica; (E) quitosana.....	3
Figura 3. Estrutura química das moléculas de (A) policaprolactona; (B) poli-ácido láctico e (C) polietilenoglicol.....	5
Figura 4. Estrutura química do alginato de sódio (A) e representação da estrutura de um gel de alginato reticulado com íons Ca^{2+} . As setas indicam interações eletrostáticas entre a molécula de alginato e o cátion (El-Ghaffar et al., 2012).....	8
Figura 5. Estruturas químicas das moléculas de (A) ácido galacturônico e (B) pectina cítrica.....	11
Figura 6. Representação da oxidação da molécula de pectina cítrica (A), gerando pectina cítrica oxidada (B).....	12
Figura 7. Representação de ligações dos tipos (A) imina e (B) hidrazona.....	13
Figura 8. Estrutura química da molécula de di-hidrazida adípica.....	13
Figura 9. Reticulação do hidrogel de pectina cítrica oxidada com di-hidrazida adípica (Takei et al., 2010).....	14
Figura 10. Esquema da estrutura proposta para NLS. Na interface entre a fase lipídica e o ambiente externo aquoso localizam-se as moléculas de tensoativo, conferindo estabilidade ao sistema.....	15
Figura 11. Representação estrutural de nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados (Puri et al., 2009).....	17
Figura 12. Estrutura química do ciclopentanofenantreno. A; B; C; D representam os anéis que compõem a estrutura.....	23
Figura 13. Estrutura química do colesterol.....	24

Figura 14. Estruturas químicas das moléculas de (A) cortisona; (B) hidrocortisona e (C) prednisona.....	25
Figura 15. Estrutura química da molécula de aldosterona.....	26
Figura 16. Estruturas químicas das moléculas de (A) 17-Valerato de Betametasona e (B) Dexametasona.....	28
Figura 17. Ilustração do método final de preparação para NP de BTM e DXM.....	43
Figura 18. Esquema de preparação das amostras de NP para determinação da EE via UPLC.....	57
Figura 19. Representação do experimento para determinação do perfil de liberação dos fármacos a partir das NP.....	59
Figura 20. Espectros UV-Vis de solução de valerato de betametasona em metanol $4,16 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (a); de solução de dexametasona em metanol $4,37 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (b).....	69
Figura 21. Espectro IV de valerato de betametasona em pastilha de KBr.....	70
Figura 22. Espectro IV de dexametasona em pastilha de KBr.....	71
Figura 23. Curvas termogravimétricas para valerato de betametasona(A) e dexametasona (B).....	72
Figura 24. Curvas DSC para valerato de betametasona (A) e dexametasona (B).....	73
Figura 25. Curvas de distribuição de tamanhos para as NP de BTM (vermelho) e DXM (verde).....	87
Figura 26. Micrografias dos cristais de fármaco depositados sobre fita de carbono: (A) BTM com aumento de 5000vezes; (B) BTM com aumento de 10000 vezes; (C) DXM com aumento de 5000 vezes e (C) DXM com aumento de 10000 vezes.....	92
Figura 27. Micrografias de membranas, com poros de diferentes tamanhos, vazias. Membrana de $5\mu\text{m}$ com aumento de 1000 vezes (A) e de 200 vezes (B); membrana de $1,2\mu\text{m}$ com aumento de 1000 vezes (C); 200 vezes (D) e 5000 vezes (E).....	93

Figura 28. Micrografias das membranas utilizadas para filtrar suspensões dos fármacos com aumento de 200 vezes. Membranas de 5 μ m (A) e de 1,2 μ m (B) utilizadas para filtrar suspensão de BTM. Membranas de 5 μ m (C) e de 1,2 μ m (D) utilizadas para filtrar suspensão de DXM.....	94
Figura 29. Micrografias das membranas utilizadas para filtrar as amostras de CLN de BTM. Membrana de 5 μ m com aumento de 200vezes (A) e 2000 vezes (B). Membrana de 1,2 μ m com aumento de 200 vezes (C) e 2000 vezes (D).....	95
Figura 30. Micrografias das membranas utilizadas para filtrar as amostras de NLS de DXM. Membrana de 5 μ m com aumento de 200vezes (A) e 2000 vezes (B). Membrana de 1,2 μ m com aumento de 200 vezes (C) e 2000 vezes (D).....	96
Figura 31. Curvas termogravimétricas para polisorbato 80, taurocolato de sódio, estearato de glicerila e fosfatidilcolina de soja.....	97
Figura 32. Curvas termogravimétricas para amostras de carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com valerato de betametasona (CLN-BTM), nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com dexametasona (NLS-DXM) e fármacos BTM e DXM.....	99
Figura 33. Curvas DSC para polisorbato 80 (em preto), taurocolato de sódio (em vermelho) e para fosfatidilcolina de soja (em azul).....	100
Figura 34. Curvas DSC para a amostra de carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com valerato de betametasona (CLN-BTM) e para o fármaco puro (BTM).....	101
Figura 35. Curvas DSC para a amostra de nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com dexametasona (NLS-DXM) e para o fármaco puro (DXM).....	102
Figura 36. Difrátogramas de raios-X para valerato de betametasona (BTM), em vermelho, e carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com valerato de betametasona (CLN-BTM), em preto.....	103
Figura 37. Difrátogramas de raios-X para dexametasona (DXM), em vermelho, e nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com dexametasona	

(NLS-DXM), em preto.....	104
Figura 38. Perfil de liberação do fármaco BTM a partir das NP ao longo de 144h de ensaio.....	105
Figura 39. Perfil de liberação do fármaco DXM a partir das NP ao longo de 144h de ensaio.....	105
Figura 40. Ajuste dos dados experimentais obtidos para CLN-BTM ao modelo de Baker-Londsdale.....	107
Figura 41. Ajuste dos dados experimentais obtidos para NLS-DXM ao modelo de Peppas-Korsmeyer para (A) 6 horas iniciais e (B) 97 horas finais de ensaio.....	109
Figura 42. Espectros de RMN de ¹³ C para pectina cítrica (PC) e pectina cítrica oxidada (PCO) em água deuterada a 80°C.....	111
Figura 43. Espectros IV para pectina cítrica, em preto, e para pectina cítrica oxidada, em vermelho.....	113
Figura 44. Curvas termogravimétricas para pectina cítrica (PC) e pectina cítrica oxidada (PCO).....	115
Figura 45. Curvas DSC para pectina cítrica (PC) e pectina cítrica oxidada (PCO).....	116
Figura 46. Representação da estrutura química proposta para o gel de pectina cítrica oxidada, destacando em vermelho a ligação hidrazona formada entre os grupos aldeído da pectina cítrica oxidada e as moléculas de di-hidrazida adípica.....	118
Figura 47. Resultados do teste de gelificação na ausência de fármaco (A), na presença de BTM (B), na presença de DXM (C), na presença de CLN-BTM e na presença de NLS-DXM (D e E).....	119
Figura 48. Experimento para estudo de intumescimento do gel de pectina cítrica oxidada.....	120

I. INTRODUÇÃO

1. Géis

Géis são materiais semissólidos compostos por moléculas gelificantes em baixa concentração (<15%) que, na presença de agentes apropriados (solventes ou agentes reticulantes), se organizam através de interações físicas e/ou químicas formando redes tridimensionais entrelaçadas que impedem a saída do solvente, conforme ilustra a Figura 1. O tipo de processo que leva à formação da matriz depende das propriedades físico-químicas dos componentes do gel e das interações resultantes (Vintilou & Leroux, 2008).

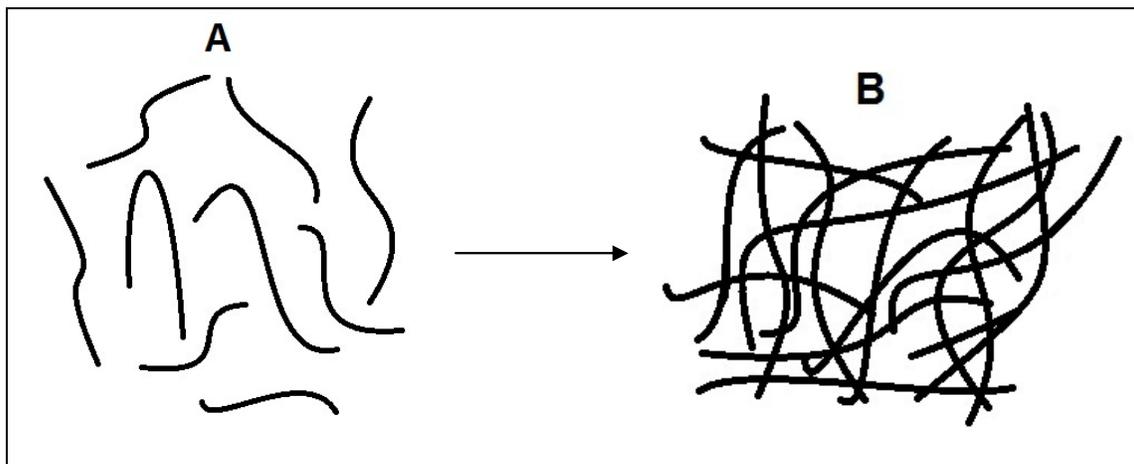


Figura 1. Ilustração da formação de gel. (A) cadeias poliméricas "livres" e (B) rede tridimensional formada mediante reticulação (adaptado de F. Ganji, M.J. Abdekhodaiea. The effects of reaction conditions on block copolymerization of chitosan and poly(ethylene glycol). *Carbohydrate Pol.* 81, 799 (2010)).

Há duas classes de géis: *hidrogéis*, formados a partir de polímeros hidrofílicos (Peppas et al., 2006) e *organogéis*, que podem ser distinguidos dos anteriores pela presença de uma fase orgânica contínua (Vintilou & Leroux, 2008).

Ambos apresentam baixa viscosidade, podem ser injetados e, uma vez no corpo humano, solidificam formando depósitos semissólidos (Hatefi & Amsden, 2008; Motulsky et al., 2005) constituindo os chamados *Sistemas Depot*.

Um dos alvos deste projeto foi o desenvolvimento de um hidrogel que pudesse ser utilizado como sistema Depot, de modo que esta classe de géis receberá maior enfoque neste trabalho.

1.1. Hidrogéis

Hidrogéis podem ser definidos como redes poliméricas tridimensionais que apresentam grande afinidade por água, mas não sofrem dissolução devido à sua estrutura ser química/fisicamente reticulada (Peppas et al., 2006). São preparados com macromoléculas que contêm grupos hidrofílicos em sua estrutura, como por exemplo -OH, -COOH, -SO₃H, -CONH e -CONH₂. Estes grupos podem tanto estar distribuídos ao longo das cadeias poliméricas quanto formar domínios. É graças à presença destes grupos hidrofílicos que os hidrogéis são capazes de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos (Hoffman, 2002).

Quando completamente hidratados, algumas das propriedades físicas apresentadas pelos hidrogéis são similares àquelas apresentadas por tecidos vivos, são macios e flexíveis e podem retornar rapidamente à sua forma original quando deformados. Além disso, hidrogéis apresentam baixa energia superficial, o que facilita sua biocompatibilidade e minimiza a adesão proteica ou celular após sua implantação (Liu et al., 2012). Graças a isso surgiu grande interesse em estudar este tipo de sistema visando possíveis aplicações biomédicas como carreadores formados *in situ*.

Hidrogéis podem ser preparados com polímeros sintéticos, como poli(N-isopropilacrilamida) e poli(hidroxietil metacrilato), ou com polímeros naturais, como alginato, pectina e quitosana (Stile et al., 1999; Lee & Mooney, 2001; Peppas et al., 2006; Klouda & Mikos, 2008; Takei et al., 2010; Kim et al., 2012), cujas estruturas químicas estão na Figura 2.

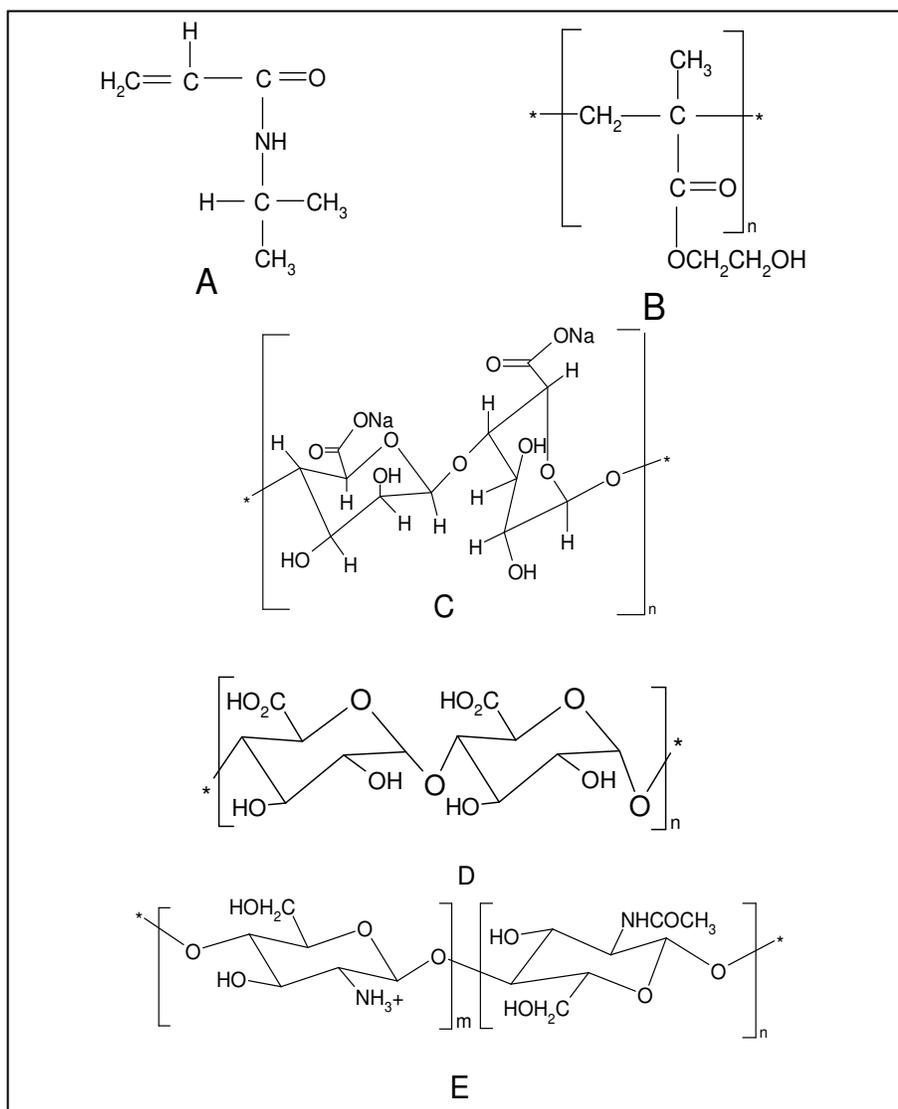


Figura 2. Estruturas químicas (A) N-isopropilacrilamida; (B) poli(hidroxietyl metacrialto); (C) alginato de sódio; (D) pectina cítrica; (E) quitosana.

Hidrogéis feitos com polímeros sintéticos são mais atrativos porque apresentam estrutura química conhecida de forma precisa e podem ser projetados em nível molecular. Porém, muitos hidrogéis sintéticos não são biodegradáveis, podendo causar inflamação local e toxicidade. Bio-hidrogéis derivados de macromoléculas de origem animal ou vegetal são, em geral, biodegradáveis porque são suscetíveis às enzimas do organismo humano e grandes esforços tem

sido feitos visando maximizar a utilização de biopolímeros para preparar hidrogéis (Liu et al., 2012).

2. Sistemas Depot

O desenvolvimento de sistemas de formação *in situ* para entrega de ativos surgiu a partir da necessidade de prolongar a liberação de fármacos durante sua administração (Hatefi & Amsden, 2002). Dentro desta realidade os hidrogéis passaram a ser extremamente interessantes.

Devido ao fato de sistemas Depot desempenharem ação em local específico, a dosagem de ativo pode ser diminuída, reduzindo a ocorrência de possíveis efeitos adversos, bastante comuns para as formas de entrega sistêmica e aumentando a qualidade de vida dos pacientes. Além disso, este tipo de aplicação é menos invasiva e dolorosa quando comparada a implantes, que requerem anestesia local e intervenção cirúrgica. Um sistema Depot ideal deve apresentar boa injetabilidade e formar depósito semissólido o mais rápido possível a partir do momento de sua injeção (Chitkara et al., 2006).

De acordo com o mecanismo de solidificação *in vivo* sistemas Depot baseados em hidrogéis podem ser classificados em: (1) pastas termoplásticas, (2) sistemas de reticulação *in situ*, (3) sistemas de precipitação *in situ* e (4) sistemas de gelificação termicamente induzida (Hatefi & Amsden, 2002; Chitkara et al., 2006). Estes sistemas serão brevemente tratados a seguir.

2.1. Pastas termoplásticas

São constituídas por polímeros semissólidos que são injetados fundidos e formam o depósito após resfriamento à temperatura corpórea. Os pré-requisitos necessários para sistema incluem ponto de fusão ou temperatura de transição vítrea entre 25 e 65°C e viscosidade intrínseca entre 0,05 e 0,8dL/g. Sistemas que apresentem valores de viscosidade intrínseca abaixo de 0,05dL/g podem liberar o ativo de forma muito rápida e aqueles que apresentem valores superiores a

0,8dL/g ocasionam problemas na aplicação devido à dificuldade de injeção (Dordunoo et al., 1997; Amsden et al., 2004).

Fármacos são incorporados à matriz polimérica sem o uso de solventes. Pastas termoplásticas permitem a entrega de fármacos anti-inflamatórios e citotóxicos em regiões que sofreram intervenções cirúrgicas. Alternativamente podem ser utilizadas para gerar um reservatório subcutâneo de fármaco que passará para a circulação sistêmica através de difusão (Packhaueser et al., 2004).

Originalmente as pastas termoplásticas foram preparadas a partir de polímeros como policaprolactona (PCL), poli-ácido lático (PLA) e seus copolímeros triboloco com polietilenoglicol (PEG), por exemplo PLA-PEG-PLA (Figura 3). Devido ao fato destes polímeros apresentarem altos pontos de fusão a temperatura necessária para sua injeção é próxima de 60°C, tornando a aplicação extramente dolorosa para o paciente e aumentando a possibilidade de necrose e formação de cicatriz no local (Kempe & Mäder, 2012). Uma alternativa seria utilizar depósitos semissólidos de poli(orto ésteres) de pequena massa molar, que apresentam menor ponto de fusão, como matrizes para a entrega de fármacos (Heller et al., 2000).

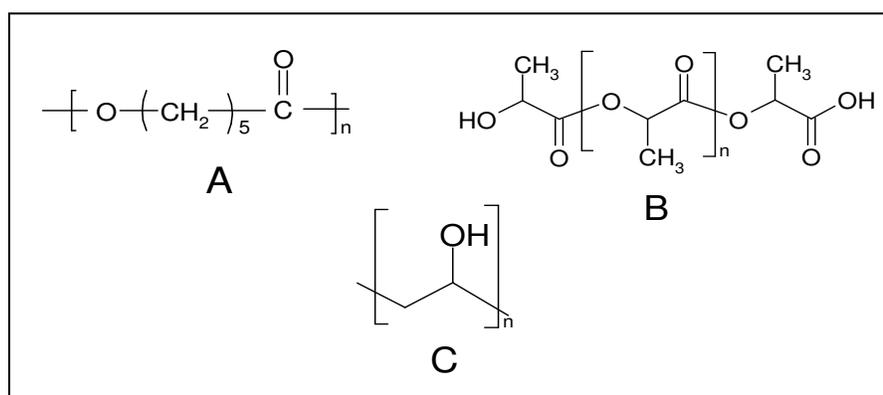


Figura 3. Estrutura química das moléculas de (A) policaprolactona; (B) poli-ácido lático e (C) polietilenoglicol.

Este tipo de sistema foi estudado para realizar a entrega do fármaco antineoplásico Paclitaxel no tratamento de câncer de próstata em ratos, sendo obtidos resultados promissores (Jackson et al., 2000).

2.2. Sistemas de reticulação *in situ*

Estes sistemas sofrem reticulação *in situ* através de reações radicalares iniciadas por calor (géis termofixos), absorção de fótons (géis foto reticulados) ou através de interação iônica entre pequenos cátions e ânions poliméricos (gelificação mediada por íons) (Chitkara et al., 2006).

2.2.1. Géis termofixos

São moldáveis e alcançam forma definitiva após aquecidos. Este processo, conhecido como cura, é iniciado através de calor e envolve formação de ligações covalentes entre as cadeias poliméricas, formando uma rede macromolecular. Caso seja reaquecido o polímero sofre degradação (Chitkara et al., 2006).

A facilidade de injeção constitui uma vantagem deste tipo de sistema. Obviamente há também algumas desvantagens que podem limitar sua aplicação: um ativo incorporado pode ser liberado de forma bastante rápida (*burst*) durante a primeira hora de aplicação, devido ao intervalo de tempo entre a injeção e a cura. Enquanto ocorre reticulação do gel dentro do organismo o polímero está em sua forma líquida. Assim o ativo pode difundir rapidamente para fora do sistema (Hatefi & Amsden, 2002).

A ocorrência de efeitos adversos também limita a utilização de géis termofixos para entrega de agentes farmacêuticos, além do que as condições necessárias para aplicação *in vivo* são bastante restritas, incluindo temperaturas fisiologicamente aceitas, necessidade de utilizar monômeros e/ou solventes não tóxicos, ambiente rico em oxigênio, taxas de polimerização clinicamente aceitas (Anseth et al., 1995; Peter et al., 1997; Burkoth & Anseth, 2000). Por isso as publicações nesta área são bastante escassas (Hatefi & Amsden, 2002).

2.2.2. Géis foto reticulados

O material de partida é líquido, pode ser facilmente injetado, sofrendo polimerização rápida. De forma geral estes sistemas necessitam de monômeros com, no mínimo, duas regiões polimerizáveis através de radicais livres, iniciadores fotossensíveis e luz ultravioleta ou visível. No caso da utilização de luz ultravioleta, a luz é colocada no local da injeção via fibra óptica (Hatefi & Amsden, 2002; Kempe & Mäder, 2012).

Sistemas foto polimerizados são utilizados para várias aplicações biomédicas; dentistas polimerizam monômeros de dimetacrilato em combinação com partículas de sílica em restauração dentária, como alternativa à utilização de amálgamas (Anseth et al., 1995).

Um gel foto reticulado à base de quitosana foi obtido introduzindo lactose e grupos azida foto-reativos à cadeia de polissacarídeos. Quando o sistema foi exposto à luz ultravioleta houve formação de hidrogel em 60s (Ono et al., 2000).

2.2.3. Géis de reticulação mediada por íons

A maioria dos agentes reticulantes que formam ligações covalentes pode induzir toxicidade caso permaneça em quantidades traço após administração. Um método para solucionar este problema envolve a preparação de hidrogéis mediante reticulação iônica reversível (Berger et al., 2004).

Neste caso a estrutura reticulada forma-se devido a interações intra e inter cadeias através de ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas entre pequenos cátions e ânions poliméricos e interações hidrofóbicas (Chenite et al., 2000).

Os principais exemplos deste tipo de gel são aqueles à base de quitosana reticulada com glicerofosfato e sais fosfatados e também géis de alginato reticulado com sais de cálcio (Chenite et al., 2000; Berger et al., 2004; Ganji et al., 2007; Abd El-Ghaffar et al., 2012). A estrutura proposta para alginato reticulado por íons Ca^{2+} esta na Figura 4.

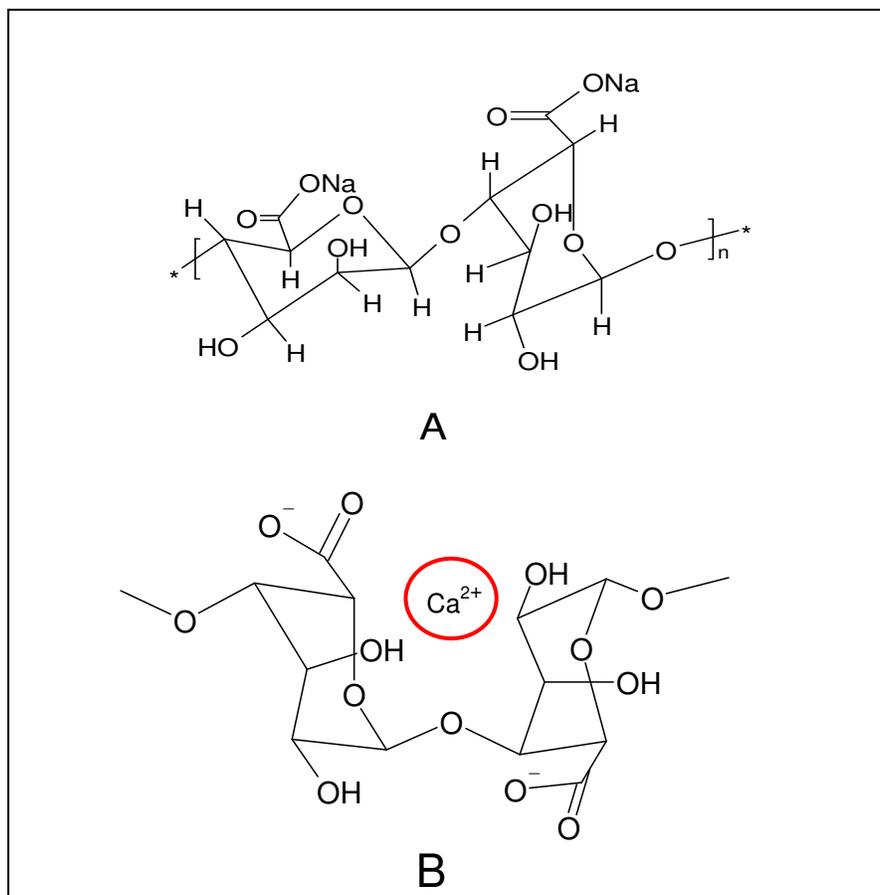


Figura 4. Estrutura química do alginato de sódio (A) e representação da estrutura de um gel de alginato reticulado com íons Ca^{2+} , através de interação eletrostática (adaptado de M.A.A. El-Ghaffar et al. pH-sensitive sodium alginate hydrogels for riboflavin controlled release. *Carbohydrate Pol.* 89, 667 (2012)).

2.3. Sistemas de precipitação *in situ*

Depósitos semissólidos também podem ser formados via precipitação do polímero a partir da solução, mediante remoção do solvente, mudanças no pH e na temperatura.

No método de remoção do solvente, um polímero biodegradável e insolúvel em água é dissolvido em solvente miscível em água e fisiologicamente compatível.

Após injeção a precipitação do polímero ocorre porque o solvente difunde para o ambiente aquoso externo e a água difunde para o interior da matriz polimérica, resultando em um implante polimérico sólido. A ocorrência de rápida liberação durante a primeira hora, devido ao tempo entre a injeção e a precipitação, constitui uma desvantagem deste sistema (Chitkara et al., 2006).

2.4. Sistemas de gelificação termicamente induzida

Sistemas termogelificantes sofrem transição sol/gel em condições fisiológicas, através de mudanças termicamente induzidas em sua conformação molecular. Fármacos ou células são adicionados ao sistema no estado sol sob baixa temperatura e a mistura é injetada no local desejado, tipicamente a camada subcutânea. A formação do hidrogel ocorre *in situ* a 37°C. Este é um dos melhores métodos, pois a gelificação ocorre devido a pequenas mudanças de temperatura, sem envolver reações químicas ou enzimáticas. Mudanças de temperatura ocasionam alterações nas forças intermoleculares entre o polímero e a água, formando o gel. Para que um polímero sofra a transição sol/gel sensível à temperatura é preciso que sua estrutura apresente um balanço entre hidrofiliabilidade e hidrofobicidade. Conforme a temperatura do sistema aumenta a associação polimérica ocorre devido ao aumento das interações hidrofóbicas. O gel é distinguível do precipitado (sistemas de precipitação *in situ*) através da presença de grandes quantidades de água (Ko et al., 2013)

Controlar a gelificação através de mudanças na temperatura do sistema é o desejo de muitos pesquisadores, pois a temperatura pode ser facilmente controlada para aplicações *in vitro* e *in vivo* (Peppas et al., 2000; Packhaeuser et al., 2004).

Copolímeros tribloco entre poli(óxido etileno) e poli(óxido propileno) do tipo POE-POP-POE (conhecidos como poloxamers ou pluronics[®]) sofrem gelificação à temperatura corpórea. Algumas desvantagens para utilização de géis de poloxamers incluem fraca resistência mecânica, rápida erosão e sua não biodegradabilidade, que representa uma barreira à utilização de polímeros de alta

massa molar pois não são excretados via renal (Packhaeuser et al., 2004; Ruel-Gariépy & Leroux, 2004; Chitkara et al., 2006).

O polímero poli(N-isopropilacrilamida) é um dos mais estudados pois apresenta transição sol/gel sensível à temperatura (Akas et al., 2010).

3. Pectina cítrica

A matriz escolhida para o desenvolvimento de um sistema Depot neste projeto foi a pectina cítrica, devido ao crescente interesse nesta classe de compostos para desenvolvimento de sistemas para entrega de ativos.

Pectinas são substâncias compostas por misturas complexas de polissacarídeos, encontradas em paredes celulares de tecidos vegetais e desempenham papel importante em diversos processos, como crescimento e diferenciação celular. Também estão relacionadas à integridade e à rigidez do tecido vegetal, além de estarem envolvidas em mecanismos de defesa de células vegetais (Voragen et al., 2009).

O principal constituinte das cadeias polissacarídeas das pectinas é o ácido D-galacturônico (Figura 5); suas unidades estão unidas através de ligações glicosídicas α -(1,4) e determinadas proporções destas unidades podem estar na forma metoxilada. Inseridas ao longo da cadeia há, também, unidades de ramnose, ligadas à extremidade redutora através de ligações do tipo (1,2) e à extremidade não redutora através de ligação do tipo (1,4). Açúcares neutros podem estar presentes em cadeias laterais (Buren, 1991; Voragen et al., 2009).

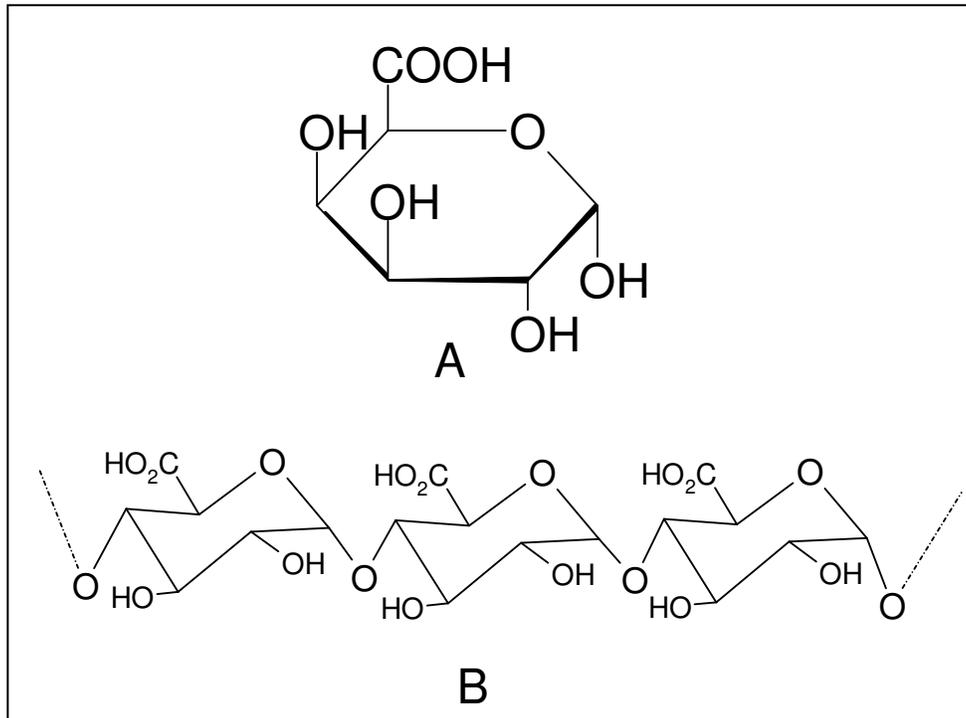


Figura 5. Estruturas químicas das moléculas de (A) ácido α -D-galacturônico e (B) pectina cítrica.

Pectinas são utilizadas na indústria alimentícia como agentes gelificantes, estabilizantes e espessantes na fabricação de geleias, iogurtes, sorvetes, entre outros. A maior parte da pectina utilizada pela indústria alimentícia é extraída a partir de cascas de frutas cítricas ou de maçã, em solução ácida e altas temperaturas (Pilgrim et al., 1991); por isso é chamada pectina cítrica (PC).

Devido ao fato das pectinas apresentarem estrutura similar às de polissacarídeos encontrados em matrizes extracelulares de mamíferos, tem aumentado o interesse em sua utilização como biomateriais para entrega de sequências específicas de aminoácidos, agentes anti-inflamatórios, anticoagulantes e genes (Liu et al., 2004; Opanasopit et al., 2008).

Além disso, pectinas são potenciais agentes carreadores cólon-específicos, graças à sua retenção prolongada no sistema gastrointestinal. A utilização de um hidrogel de pectina reticulado com íons Ca^{2+} para entrega oral de indometacina ao cólon foi recentemente reportada (Jung et al., 2013).

Um obstáculo para a utilização da pectina cítrica como biomaterial é que implantes feitos a partir deste polissacarídeo permanecem no corpo humano durante longos períodos devido à ausência de enzimas que os degradem. Sua degradação ocorre somente através da ação de bactérias presentes no cólon. Desta forma, a utilização de um sistema Depot à base de pectina cítrica para aplicação subcutânea poderia acarretar respostas biológicas desfavoráveis.

Uma saída seria oxidar a molécula de pectina cítrica, gerando pectina cítrica oxidada (PCO) que apresenta fragmentos com menor massa molar que seriam, portanto, eliminados mais facilmente (Figura 6). A pectina cítrica oxidada pode ser obtida pela oxidação da pectina cítrica através de reação com periodato de sódio (Duan et al., 2003; Kong et al., 2008; Yu et al., 2009; Takei et al., 2010; Jung et al., 2013).

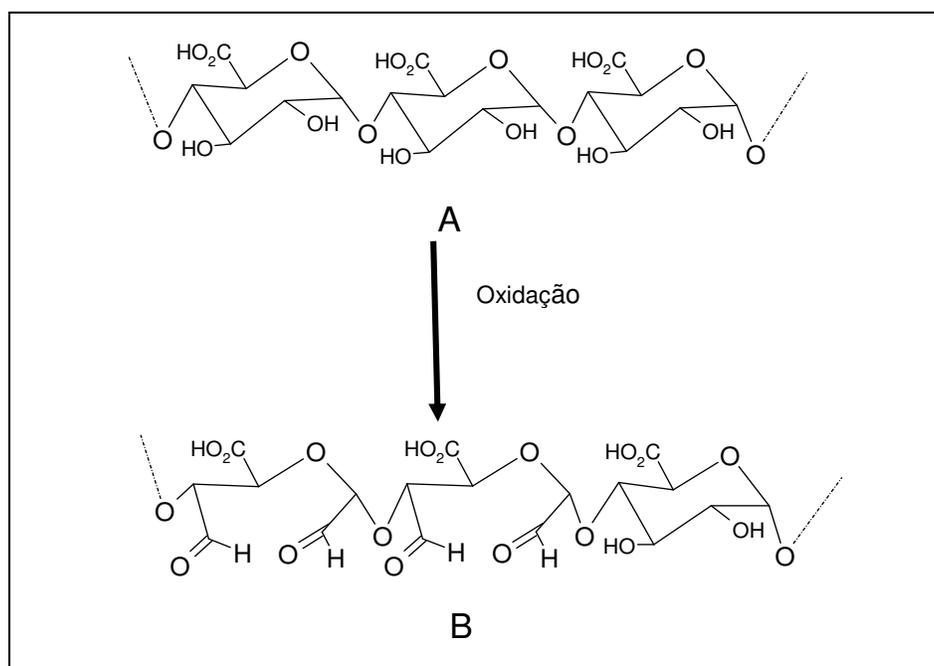


Figura 6. Representação da oxidação da molécula de pectina cítrica (A), gerando pectina cítrica oxidada (B).

Oxidação com periodato é bastante utilizada como método para elucidação de estruturas em carboidratos complexos. O íon periodato, IO_4^- ataca dióis vicinais, clivando a ligação carbono-carbono através de oxidação, formando dialdeídos (Vold & Christensen, 2005).

Os grupos aldeído gerados pela reação de oxidação da pectina cítrica podem ser utilizados tanto para imobilizar fármacos que possuam grupos amino em sua estrutura química quanto para reticular hidrogel utilizando agentes reticulantes que possuam grupos amino ou hidrazida, através da formação de ligações imina ou hidrazona, apresentadas na Figura 7 (Hudson et al., 2010).

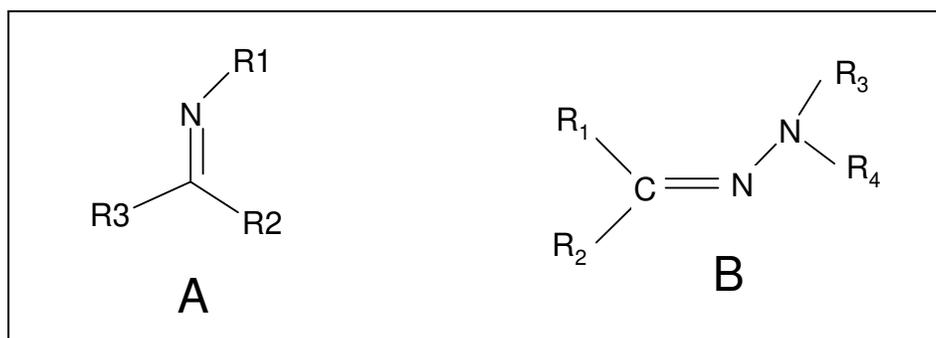


Figura 7. Representação de ligações dos tipos (A) imina e (B) hidrazona.

Para reticulação do hidrogel neste projeto utilizou-se di-hidrazida adípica como agente reticulante, cuja estrutura química é apresentada na Figura 8.

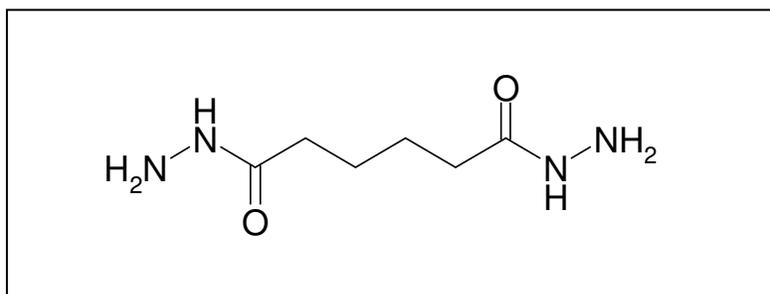


Figura 8. Estrutura química da molécula de di-hidrazida adípica.

A reticulação do hidrogel de pectina cítrica oxidada com di-hidrazida adípica ocorre via formação de ligações do tipo hidrazona. A Figura 9 mostra a estrutura proposta para este hidrogel:

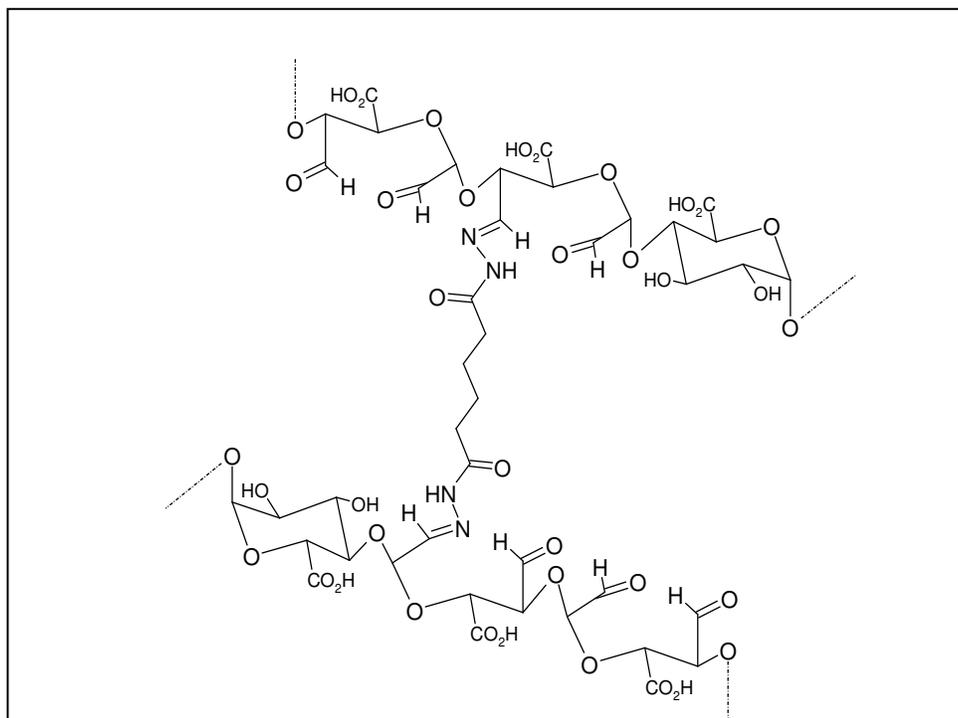


Figura 9. Reticulação do hidrogel de pectina cítrica oxidada com di-hidrazida adípica. (Adaptado de T. Takei et al. *In situ* gellable oxidized citrus pectin for localized delivery of anticancer drugs and prevention of homotypic cancer cell aggregation. *Biomacromolecules* 11, 3525 (2010))

4. Nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados

Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são sistemas carreadores de ativos que foram desenvolvidos recentemente, quando comparados a outros sistemas carreadores como lipossomas (Puri et al., 2009; Allen, 1997).

Nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados tem gerado grande interesse por utilizarem componentes naturais, terem método de preparação facilmente escalonável e evitarem a utilização de solventes em sua preparação, através da homogeneização a alta pressão. Além disso, seu cerne hidrofóbico proporciona ambiente favorável para encapsulação de fármacos hidrofóbicos, fato de extrema importância pois aproximadamente 40% dos fármacos desenvolvidos recentemente apresentam natureza hidrofóbica (Martins et al., 2007; Zhang et al., 2008).

Nanopartículas lipídicas sólidas são formadas por um cerne lipídico sólido, que pode conter triglicerídeos, glicerídeos, misturas entre estas duas classes de lipídios, ou ceras; sendo que todos são sólidos tanto em temperatura ambiente quanto em temperatura corporal (Wissing & Müller, 2003; Wissing et al., 2004). Sua estabilidade é garantida graças à adição de tensoativos que se localizam na interface entre o ambiente externo aquoso e as partículas formadas, conforme ilustra a Figura 10.

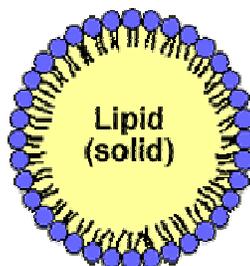


Figura 10. Esquema da estrutura proposta para NLS. Na interface entre a fase lipídica e o ambiente externo aquoso localizam-se as moléculas de tensoativo, conferindo estabilidade ao sistema.

(Ekambaram, P. et al. Solid lipid nanoparticles: a review. *Scientific Reviews and Chemical Communications*. **2**, 80 (2012))

Nanopartículas lipídicas sólidas são carreadores interessantes pois: i) o tamanho de partícula é na escala nano-submicro (50–1000 nm); ii) seus componentes são biocompatíveis e biodegradáveis e não requerem utilização de solventes orgânicos para sua preparação; iii) a síntese de partículas pode ser feita com baixo custo e em larga escala, além de agregar aspectos positivos de outros tipos de carreadores lipídicos, evitando algumas de suas desvantagens. Por exemplo, estes carreadores apresentam natureza similar à de nanoemulsões, mas as características de seu cerne lipídico sólido são exatamente opostas às da versão líquida. Uma consequência direta deste fato é que a mobilidade de um ativo encapsulado em um ambiente sólido será menor que em ambiente líquido; assim, a velocidade de liberação deste ativo a partir do cerne destas nanopartículas será menor (Martins et al., 2007; Puri et al., 2009).

É importante mencionar que a utilização de formulações de NLS pode ser limitada devido ao crescimento indesejado de partículas através de aglomeração ou coagulação, acarretando rápida liberação do fármaco. NLS apresentam matrizes lipídicas cristalinas que acomodam moléculas de fármaco incorporado entre as cadeias dos ácidos graxos. A modificação da estrutura cristalina durante a produção e armazenamento das NLS frequentemente resulta na expulsão do fármaco encapsulado para a solução, sendo esta a maior desvantagem desses carreadores. A matriz lipídica sólida também pode modular a liberação do fármaco e, desta forma, controlar sua concentração no local de ação. Além disso, estas partículas podem oferecer proteção contra degradação química dos ativos incorporados ao lipídio (Wissing et al., 2004; Martins et al., 2007).

A encapsulação de ativos pode ocorrer em vários locais destas nanopartículas, dependendo de suas propriedades químicas. Fármacos lipofílicos dispersam-se na matriz lipídica, enquanto os hidrofílicos ficarão fora dela. Tipicamente o processo de formação destas nanopartículas envolve dispersão do fármaco na fase lipídica fundida (precursora da emulsão), utilização de solventes apropriados ou através da aplicação de força mecânica. Para obter sucesso nesta encapsulação de fármaco é preciso que ocorra partição adequada do mesmo nas

gotículas de lipídio. Durante a síntese destas partículas o rápido resfriamento do sistema cria um ambiente instável e um arranjo cristalino desordenado (estrutura α -cristalina) que permite armazenar o fármaco nos defeitos da matriz. Durante estocagem a estrutura α -cristalina converte-se em sua forma termodinamicamente mais estável, β -cristalina. Como as moléculas do fármaco são incorporadas entre as cadeias dos ácidos graxos, nas camadas lipídicas e nas imperfeições dos cristais, uma estrutura cristalina altamente organizada não é vantajosa para alta capacidade de incorporação do fármaco. Esta mudança estrutural (α para β -cristalina) pode ocasionar rápida liberação do ativo, o que constitui desvantagem significativa para utilização clínica destes carreadores (Puri et al., 2009).

Na tentativa de evitar algumas destas desvantagens, no final da década de 1990, foram desenvolvidos carreadores lipídicos nano estruturados que são também chamados de nanopartículas lipídicas sólidas de segunda geração (Padtake & Müller, 2002). O objetivo foi desenvolver um carreador que apresentasse nanoestrutura (Figura 11) que aumentasse a quantidade de ativo encapsulado e evitasse sua expulsão prematura. Isto pode ser realizado de três maneiras (Wissing et al., 2004):

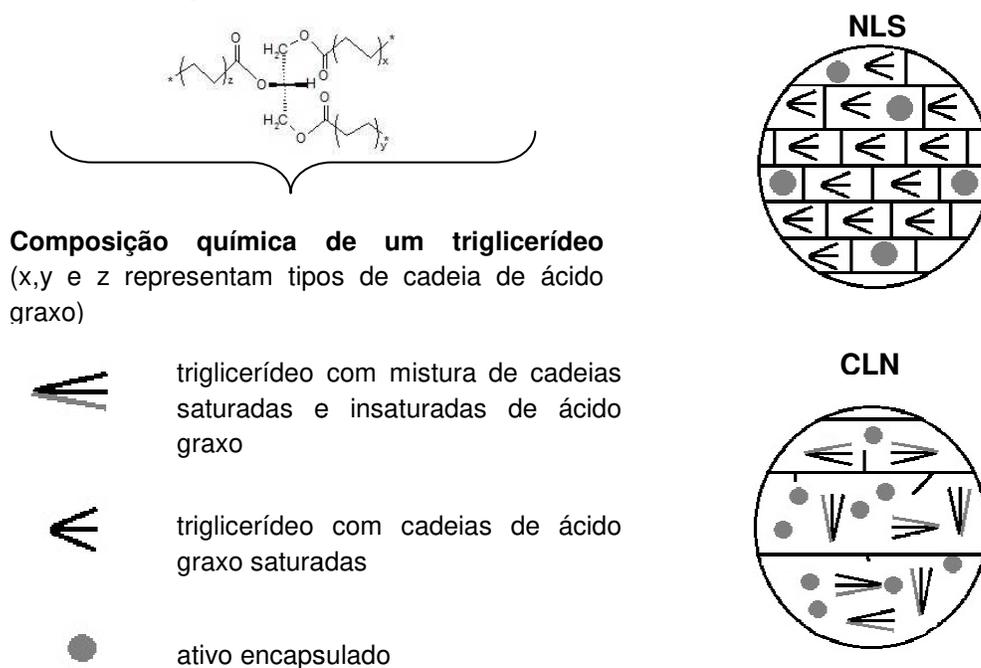


Figura 11. Representação estrutural de nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados. (Adaptado de A. Puri et al. Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* 26, 523 (2009))

No primeiro modelo são misturados lipídios espacialmente diferentes, por exemplo glicerídeos compostos por cadeias de diferentes tamanhos. A utilização de lipídios estruturalmente diferentes leva a uma matriz com maiores distâncias entre as cadeias de ácido graxo dos glicerídeos, gerando maior número de imperfeições nos cristais e, conseqüentemente, maior número de sítios onde o ativo pode se acomodar. Um grande aumento da capacidade de carregamento pode ser alcançado utilizando pequenas quantidades de lipídios líquidos (óleos). Este modelo é chamado "Carreador Lipídico Nanoestruturado do tipo imperfeito".

Se grandes quantidades de óleo são misturadas ao lipídio sólido, um tipo diferente de nanoestrutura será gerado. Neste modelo a solubilidade das moléculas de óleo no lipídio sólido é excedida, levando à separação de fases e à formação de nanocompartimentos oleosos no interior na matriz lipídica sólida. Muitos fármacos apresentam maior solubilidade em óleos que em lipídios sólidos; então, eles podem ser dissolvidos em óleo e continuar sendo protegidos da degradação pelos lipídios sólidos que envolvem estes nanocompartimentos. Este tipo de carreador lipídico nanoestruturado é chamado "Carreador Lipídico Nanoestruturado do tipo múltiplo" (Jenning et al., 2000; Jennings & Gohla, 2001; Wissing et al., 2004).

Como a expulsão do fármaco encapsulado é causada pela cristalização ou mudança de estrutura cristalina do lipídio sólido, é possível evitar que isto aconteça através da formação de um terceiro tipo de carreador lipídico nanoestruturado, o chamado "Carreador Lipídico Nanoestruturado do tipo amorfo". Neste tipo de carreador as partículas são sólidas, mas a cristalização após resfriamento do sistema é evitada pela adição de determinados tipos de lipídios, por exemplo isopropilmiristato (Jenning et al., 2000a; Jennings et al., 2000b; Wissing et al., 2004).

4.1. Métodos de preparação

Existem diversos métodos para preparação de nanopartículas lipídicas sólidas e de carreadores lipídicos nanoestruturados. A seguir serão apresentados

alguns deles: homogeneização a alta pressão, ultrassonicação, homogeneização a alta velocidade e método baseado em dupla emulsão.

4.1.1. Homogeneização a alta pressão

Neste caso a amostra líquida é empurrada sob alta pressão (100-2000 bar) em um caminho estreito, adquirindo alta velocidade (em torno de 100 km/h), produzindo alta taxa de cisalhamento e fragmentando as partículas grandes. (Yadav et al., 2013)

a) Homogeneização a quente

Neste método a homogeneização é realizada em temperaturas acima da temperatura de fusão do lipídio e pode ser compreendida como uma homogeneização de uma emulsão. É preparada uma pré-emulsão da fase lipídica contendo o fármaco em uma solução contendo os tensoativos, através de agitação sob alto cisalhamento. A qualidade do produto final depende da qualidade desta pré-emulsão. De forma geral, altas temperaturas resultam em partículas menores devido à diminuição da viscosidade do líquido que está sendo homogeneizado. Entretanto, altas temperaturas também podem acelerar a degradação do ativo e do carreador.

O ciclo de homogeneização pode ser repetido diversas vezes, mas é preciso considerar que o processo aumenta a temperatura da amostra (aproximadamente 10°C a cada 500 bar). Na maioria dos casos 3-5 ciclos de homogeneização a 500-1500 bar são suficientes. O aumento do número de ciclos frequentemente resulta em aumento do tamanho das partículas devido à sua coalescência. O produto primário é uma nanoemulsão, pois a fase lipídica encontra-se fundida e após resfriamento ocorre formação de partículas sólidas. (Müller et al., 2000; Mehnert & Mader, 2001; Mishra et al., 2010; Ekambaram et al., 2012).

b) Homogeneização a frio

A homogeneização a frio é realizada com lipídio sólido e pode ser interpretada como uma homogeneização através da moagem da suspensão. É necessário que haja controle efetivo da temperatura do sistema, evitando a fusão do lipídio devido ao aquecimento da amostra durante a homogeneização.

Na primeira etapa deste processo o ativo é solubilizado ou disperso na fase lipídica fundida, que é resfriada rapidamente, favorecendo a distribuição homogênea do ativo na matriz sólida. A fase lipídica sólida é dispersa em uma solução fria contendo os tensoativos. Esta pré-suspensão é submetida à homogeneização a alta pressão em temperatura igual ou inferior à ambiente (Müller et al., 2000; Mehnert & Mader, 2001; Mishra et al., 2010; Ekambaram et al., 2012).

4.1.2. Ultrassonicação e homogeneização a alta velocidade

É possível preparar nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados utilizando ultrassom ou agitação a altas velocidades. Para obter partículas menores a combinação destes dois métodos precisa ser utilizada. Este método reduz a taxa de cisalhamento, mas apresenta algumas desvantagens como a possível contaminação com metal do sonicador e instabilidade física, que aumenta o tamanho de partícula, após estocagem (Venkateswarly & Manjunath, 2004; Ekambaram et al., 2012).

4.1.3. Dupla emulsão

A dupla microemulsão água/óleo/água (a/o/a) pode ser preparada em duas etapas. Primeiramente a microemulsão água/óleo (a/o) é preparada adicionando uma solução aquosa contendo o ativo a uma mistura entre a fase lipídica fundida e os tensoativos. Na segunda etapa a microemulsão água/óleo (a/o) formada é adicionada a uma solução aquosa contendo mais tensoativos, obtendo uma microemulsão água/óleo/água (a/o/a) (Müller et al., 2000; Qingzhi et al., 2009).

4.2. Técnicas de caracterização

Diversas técnicas podem ser utilizadas para caracterizar os carreadores preparados neste trabalho.

4.2.1. Espectroscopia de correlação de fótons e potencial Zeta

A espectroscopia de correlação de fótons (*Photon Correlation Spectroscopy* - PCS), também conhecida como espalhamento dinâmico de luz, é uma técnica bastante utilizada e de grande importância para caracterizar sistemas nano estruturados.

A PCS mede flutuações na intensidade da luz espalhada, que são causadas pelo movimento Browniano das partículas em suspensão. Desta forma as determinações do diâmetro médio de partícula (ϕ) são influenciadas pelas camadas de tensoativo adsorvidas nas partículas e pela camada de hidratação. Este método abrange um intervalo de valores de ϕ que vai de alguns nanômetros até, aproximadamente, 3 μm . PCS é uma ótima ferramenta determinar ϕ em dispersões coloidais diluídas, mas não é adequada para detectar partículas maiores (Jores et al., 2004; Gaumet et al., 2008; Yadav et al., 2013).

Determinar o potencial Zeta (ξ) das partículas preparadas também é de grande importância, pois este potencial indica a estabilidade do sistema. Em geral, devido à repulsão eletrostática, partículas carregadas agregam menos durante a estocagem; assim, quanto maior (em módulo) o valor de ξ , maior será a repulsão eletrostática e, conseqüentemente, maior a estabilidade do sistema. Mas é preciso levar em consideração, também, a possibilidade de estabilização estérica, que ocorre devido à adsorção de moléculas grandes de tensoativo à superfície das partículas, impedindo a agregação do sistema. É preciso ressaltar que a adsorção destes estabilizadores (tensoativos) pode diminuir o valor de ξ (Üner et al., 2007; Marcato et al., 2009). Assim, nem sempre pequenos valores de ξ significam necessariamente que o sistema seja instável.

4.2.2. Difractometria de raios-X

Esta técnica pode ser utilizada para caracterizar a estrutura cristalina da matriz lipídica das nanopartículas lipídicas e dos carreadores lipídicos nanoestruturados. Esta caracterização é necessária pois o tipo de estrutura cristalina apresentada pela matriz lipídica influenciará diretamente na encapsulação do ativo. Lipídios sólidos apresentam polimorfismo, devido à organização de suas moléculas nos empacotamentos α (hexagonal), β' (ortorrômbico) e β (triclínica), respectivamente mais desordenado, menos desordenado e organizado (Marcato et al., 2009).

Através da difratometria de raios-X é possível determinar a distância dos espaçamentos longos e curtos do retículo lipídico além de diferenciar um material cristalino de um amorfo.

4.2.3. Calorimetria diferencial de varredura

Unindo os dados obtidos com difratometria de raios-X aos obtidos com calorimetria diferencial de varredura (DSC) podem ser inferidas informações sobre a cristalinidade do sistema.

O grau de cristalinidade da amostra é extremamente importante, porque influencia diretamente na eficiência de encapsulação, na velocidade de liberação do ativo e em sua expulsão durante estocagem.

As curvas de DSC fornecem temperatura e entalpia de fusão da amostra. Altos valores de entalpia de fusão indicam alta organização do retículo cristalino, pois a fusão de um cristal altamente organizado requer mais energia para romper as forças de coesão do retículo cristalino que um cristal pouco ordenado ou amorfo.

5. Esteroides (Gringauz, 1997)

Esteroides são hidrocarbonetos policíclicos, análogos saturados do ciclopentanofenantreno (Figura 12):

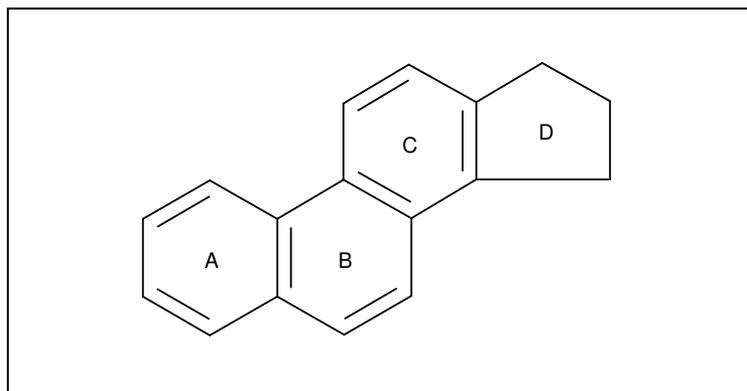


Figura 12. Estrutura química do ciclopentanofenantreno. A; B; C; D representam os anéis que compõem a estrutura.

O interesse nesta classe de compostos surgiu a partir do fato de derivados oxigenados da estrutura básica (Figura 12) serem extensivamente encontrados em plantas e animais e exibirem diversos efeitos em humanos. Derivados alcoólicos (3-OH) são encontrados em plantas, mamíferos (colesterol) e em micro-organismos. Outros esteroides envolvidos na fisiologia de mamíferos incluem os ácidos biliares, os hormônios corticosteroides produzidos pelas glândulas adrenais e os hormônios masculinos e femininos, estrógeno e progesterona, respectivamente. Todos estes hormônios e a maioria de seus derivados sintéticos possuem aplicações médicas.

O córtex adrenal produz, pelo menos, 50 hormônios adrenocorticais, sendo que o colesterol (estrutura mostrada na Figura 13) é o precursor destas sínteses.

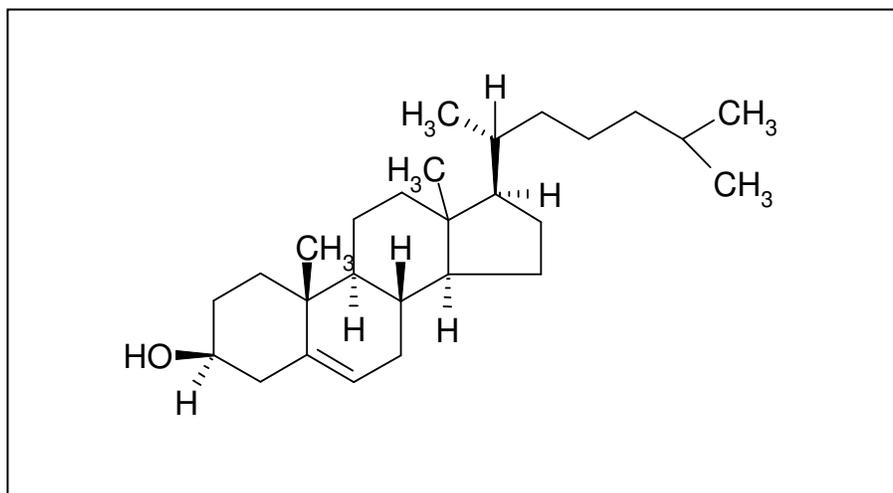


Figura 13. Estrutura química do colesterol.

O colesterol pode ser obtido de fontes exógenas (alimentação) sendo também sintetizado pelo organismo, mas a alimentação representa a maior fonte para a biossíntese de diversos esteroides. A maioria das reações sofridas pelo colesterol são oxidações catalisadas por oxidases de função mista.

Os hormônios adrenocorticais são controlados pelo hipotálamo, que secreta o hormônio liberador de corticotrofina (*Corticotropin-Releasing Hormone – CRH*) em resposta a situações de estresse. O CRH leva a glândula pituitária a liberar corticotrofina na circulação, estimulando os receptores adrenocorticais a produzir e liberar os corticosteroides.

Corticosteroides são tradicionalmente classificados em glicocorticoides (GC) e mineralocorticoides (MC). Os primeiros são hormônios envolvidos no controle da glicose. Do ponto de vista terapêutico as propriedades anti-inflamatórias e antialérgicas por eles apresentadas podem ser dramáticas. O membro mais significativo deste grupo é o cortisol (hidrocortisona), cuja estrutura é apresentada pela Figura 14.

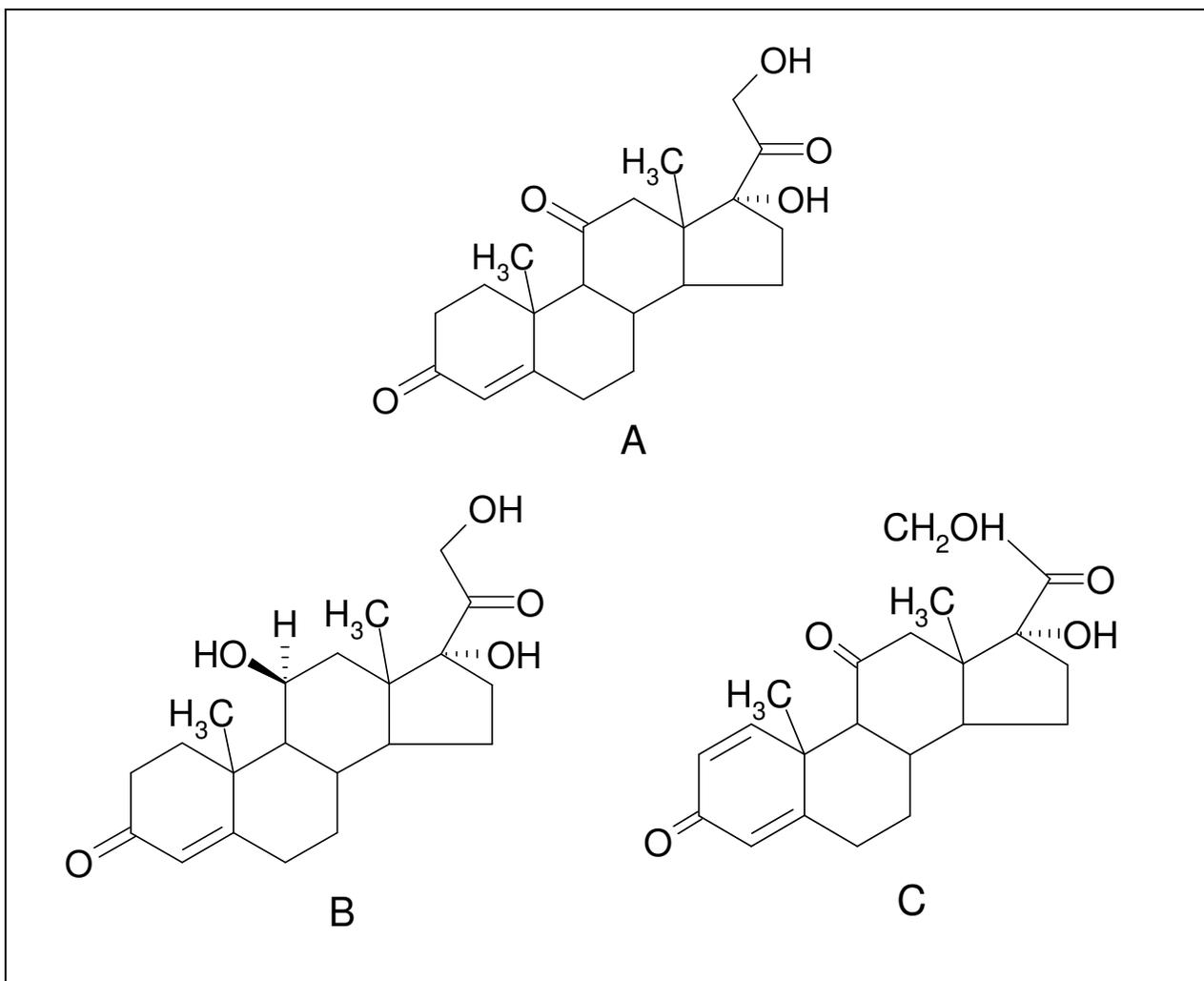


Figura 14. Estruturas químicas das moléculas de (A) cortisona; (B) hidrocortisona e (C) prednisona.

Corticosteroides como cortisona e a semissintética prednisona são inativos até que a função 11-cetona seja hepaticamente reduzida ao grupo 11-hidroxila.

A condição de produção excessiva de glicocorticoides é conhecida como Síndrome de Cushing, caracterizada pelo inchaço do rosto (face de lua), resultante da perda de massa muscular e de mudanças na distribuição de gordura corporal.

Mineralocorticoides tem como principal função o controle do balanço eletrolítico. Estes compostos causam retenção de íons Na^+ e excreção renal de íons K^+ . O principal hormônio mineralocorticoide é a aldosterona (Figura 15).

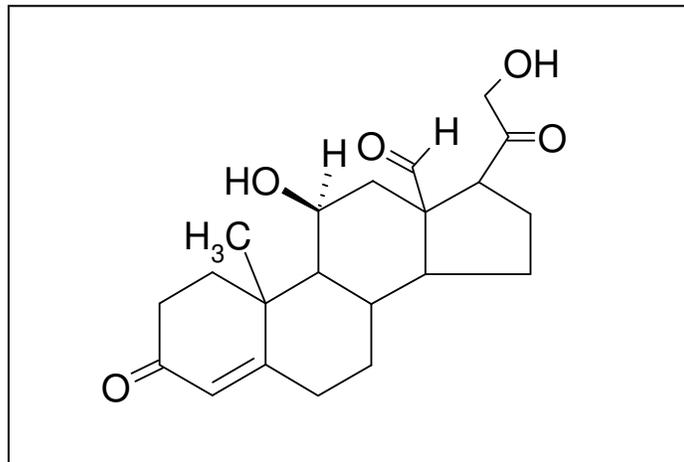


Figura 15. Estrutura química da molécula de aldosterona.

Sabe-se que a aldosterona apresenta efeitos glicocorticoides e que a cortisona exibe efeitos mineralocorticoides, ocorrendo balanço entre estes dois efeitos.

As propriedades anti-inflamatórias dos corticosteroides parecem estar ligadas à atividade glicocorticoide. Quando análogos sintéticos da cortisona são utilizados clinicamente efeitos adversos como retenção de Na^+ e edema podem estar relacionados à atividade mineralocorticoide que estes compostos possuem. Diante disto, o objetivo de modificações estruturais realizadas nos esteroides sintéticos é maximizar a atividade glicocorticoide e minimizar a mineralocorticoide. Isto pode ser alcançado aumentando o grau de insaturação do anel A (Figura 12) adicionando uma segunda dupla ligação, cuja presença reduz a ocorrência de retenção de água e está relacionada ao aumento da potência dos corticosteroides, ou seja, ao aumento da efetividade em dosagens menores.

5.1. Corticosteroides

A partir de modificações na molécula de cortisona foi sintetizado acetato de hidrocortisona, o primeiro corticosteroide de uso tópico, desenvolvido para

tratamento de doenças de pele, introduzido no mercado em 1952, revolucionando o campo da Dermatologia (Rosso & Friedlander, 2005).

Pouco tempo depois fluorohidrocortisona, prednisona (1955), triancinolona acetona (1958) e fluorometolona (1959) entraram no mercado. Todas estas moléculas compartilham uma estrutura básica de 4 anéis, característica do colesterol. Muitos outros corticosteroides tem sido desenvolvidos, via modificações nas cadeias laterais da estrutura básica (Hughes & Rustin, 1997; Fieldman, 1998).

O mecanismo de ação de fármacos glicocorticoides ainda não foi completamente elucidado, mas avanços nesta área mostram evidências de que existem receptores específicos para esta classe de compostos. A estrutura apresentada por estes fármacos gera um perfil de resposta transcricional único em células e tecidos através da interação dos glicocorticoides com seus receptores. Presume-se que este perfil leve a respostas farmacológicas específicas para cada glicocorticoide, o que está relacionado à sua relevância terapêutica (Edelman, 2010).

De acordo com a capacidade de induzir vasoconstrição, corticosteroides são classificados em 7 grupos, em ordem decrescente de potência. Os corticosteroides utilizados neste projeto, Valerato de Betametasona (BTM) e Dexametasona (DXM), pertencem, respectivamente, às classes III (moderadamente potente) e VII (menos potente/leve) (Fieldman, 1998). Suas estruturas estão na Figura 16.

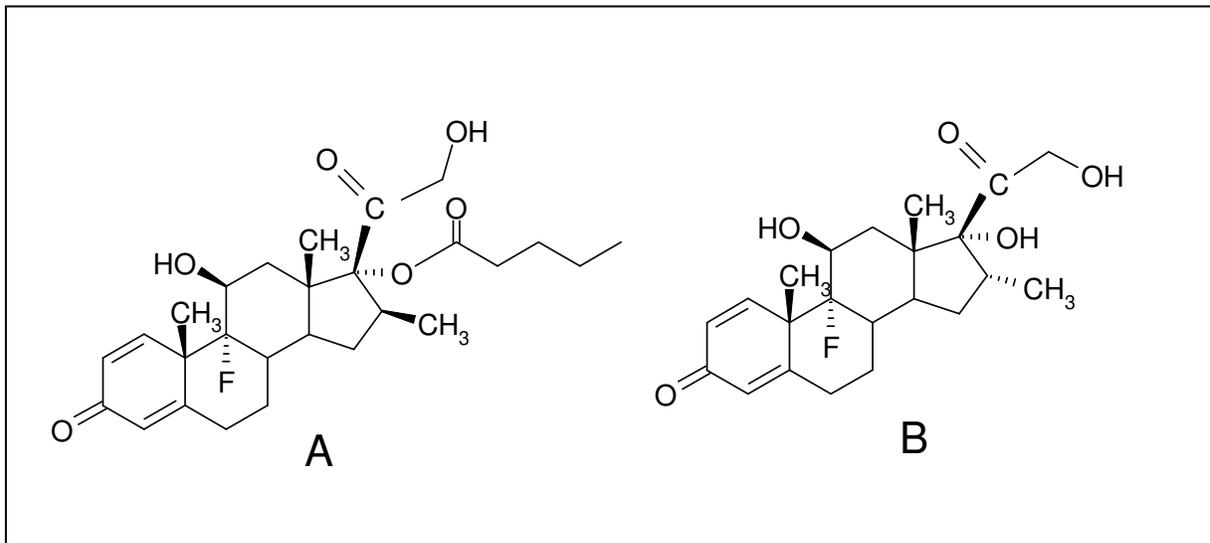


Figura 16. Estruturas químicas das moléculas de (A) 17-Valerato de Betametasona e (B) Dexametasona.

Estes corticosteroides/glicocorticoides são amplamente utilizados em tratamentos de doenças de pele, como eczema, psoríase, dermatites de contato, entre outras. (Zhang & Smith, 2010).

A entrega local de glicocorticoides no tratamento de edema macular associado a uveítes, oclusão vascular retinal e diabetes tem crescido significativamente e mostra grandes benefícios. Dexametasona destaca-se entre os glicocorticoides usados para injeção intravítrea mais utilizados para tratamento de edema macular (Edelman, 2010).

Apesar da eficácia comprovada, muitos efeitos adversos são associados aos corticosteroides, limitando sua utilização. Efeitos adversos locais incluem, mas não se limitam a, atrofia e estrias e efeitos adversos sistêmicos incluem, entre outros, Síndrome de Cushing, supressão adrenal e catarata (Rosso & Friedlander, 2005).

Formulações farmacêuticas de sucesso devem entregar as substâncias ativas aos organismos-alvo em níveis terapêuticos relevantes, com desconforto e efeitos adversos mínimos (Zhang & Smith, 2010). Uma alternativa para diminuir a

ocorrência/intensidade dos efeitos adversos relacionados à utilização de corticosteroides seria modificar sua forma de administração, por exemplo, através de sua encapsulação em estruturas que garantam a entrega do fármaco no local de ação e na dose correta.

Recentemente foi relatada uma possível utilização de sistemas carreadores contendo Dexametasona para tratamento de doenças inflamatórias intestinais, visando diminuir efeitos adversos, através de sua entrega específica e exclusiva às regiões inflamadas por períodos prolongados depois de administração oral (Hanauer, 2006).

A incorporação de Valerato de Betametasona em sistemas carreadores também foi reportada, objetivando reduzir riscos de atrofia dérmica durante tratamento de eczema atópico (Sivaramakrishnan et al., 2004).

II. OBJETIVOS

1. Gerais

- Utilizando técnicas de planejamento e otimização de experimentos desenvolver duas formulações de nanopartículas para encapsular, separadamente, os fármacos 17-valerato de betametasona e dexametasona;
- Desenvolver uma formulação Depot para liberar as nanopartículas diretamente no local de ação.

2. Específicos

- Caracterizar os fármacos 17-valerato de betametasona e dexametasona através de espectroscopia nas regiões do Ultravioleta-Visível e do Infravermelho e através de análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varredura;
- Caracterizar as nanopartículas através de medidas de espalhamento dinâmico de luz;
- Determinar a eficiência de encapsulação das nanopartículas;
- Determinar o percentual de carregamento de fármaco das nanopartículas;
- Determinar o perfil de liberação dos fármacos a partir das nanopartículas;
- Oxidar a amostra de pectina cítrica;
- Caracterizar o produto de reação através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear; de espectroscopia na região do Infravermelho, de análise termogravimétrica e de calorimetria diferencial de varredura;
- Determinar a porcentagem de oxidação do produto obtido em relação ao material de partida;

- Obter a gelificação do produto oxidado a 37°C e monitorar a estabilidade do gel;

III. PARTE EXPERIMENTAL

1. Equipamentos utilizados

Agitadores magnéticos - Topolino IKA®

Analizador termogravimétrico TGA TA *Instruments* - Modelo 2050

Calorímetro diferencial DSC TA *Instruments* - Modelo 2910

Centrífuga Excelsa®II Fanem® - Modelo 206 BL

Cromatógrafo Líquido de Ultra Performance Acquity® – Waters

Difratômetro de Raios-X Shimadzu XRD7000

Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker - Avance 500

Espectrofotômetro Infravermelho Bomem-Hartmann - Modelo MB 102

Espectrofotômetro UV-Visível Cary Probe Varian/Agilent

Microscópio eletrônico de varredura JEOL - Modelo JSM 6360 LV

Ultrassom de ponteira Sonifier® B12 - Frequência 20kHz/ Potência 1000W - Branson Sonic Power Company

Ultra-Turrax® T25 – IKA® com elemento dispersor S75N-25F e elemento dispersor PC/PEEK – S25D-10G-KS

ZetaSizer 300HS Malvern Instruments.

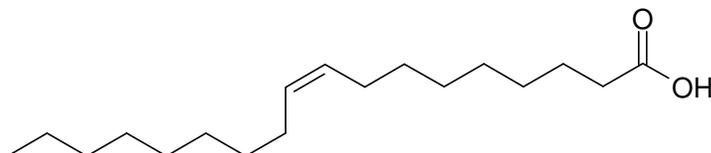
2. Reagentes Utilizados

Ácido Oleico USP/NF Lote 126365 - Synth

CAS: 112-80-1

MM = 282,46 g mol⁻¹

Estrutura química:

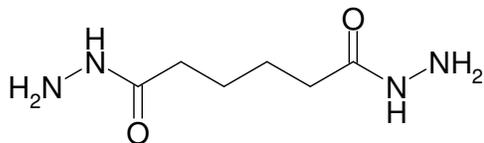


Di-hidrazida do ácido adípico - Sigma - Lote 051M1895V

CAS: 1071-93-8

MM = 174,20 g mol⁻¹

Estrutura química:

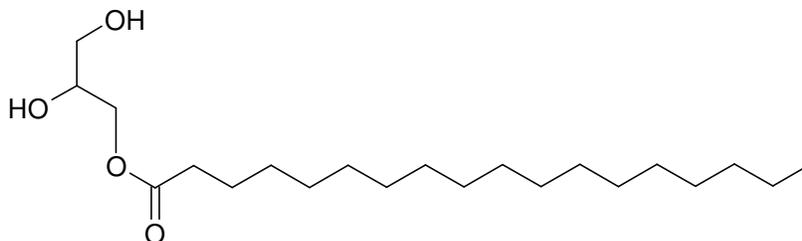


Estearato de glicerila Cithrol GMS Lote 0000270756 - Croda do Brasil Ltda

CAS: 123-94-4

MM = 358,56 g mol⁻¹

Estrutura química:

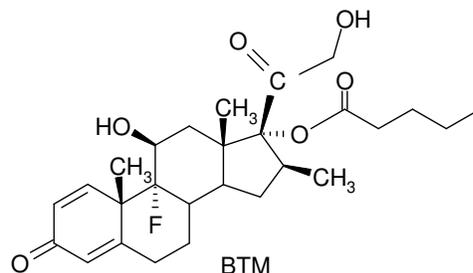


Fármaco 17-Valerato de Betametasona micro EP - Lote101003#3

CAS: 2152-44-5

MM = 476,60 g mol⁻¹

Estrutura química:

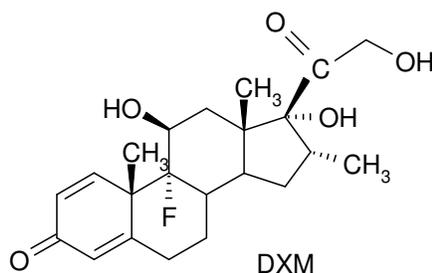


Fármaco Dexametasona micro BP - Lote 101103#2 - Tajin Harmony Tech

CAS: 50-02-2

MM = 392,50 g mol⁻¹

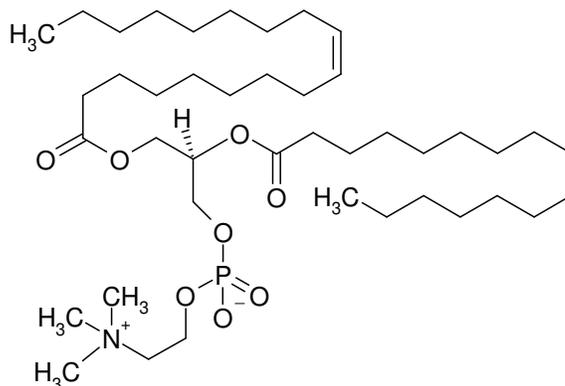
Estrutura química:



Fosfatidilcolina de soja S100-3 Lote 254092-6 - Lipoid

CAS: 68513-95-1

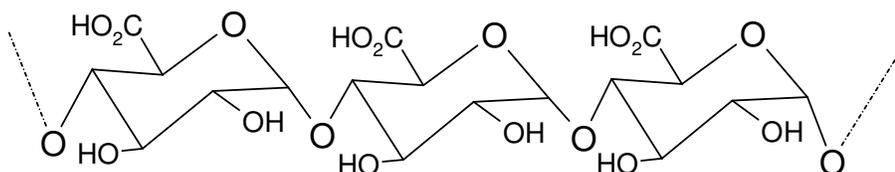
Estrutura química:



Pectina Cítrica GENU® tipo USP-B Lote LI12104 - CPKelco

CAS: 9000-69-5

Estrutura química:



Periodato de sódio META PA ACS Lote 1105024 - Vetec

CAS: 7790-28-5

MM = 213,89 g mol⁻¹

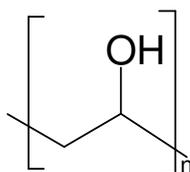
Fórmula molecular: NaIO₄

Polietilenoglicol - Kollisolv® PEG 400 - Basf - Lote 90967309T0

CAS: 25322-68-3

MM = 380-420 g mol⁻¹

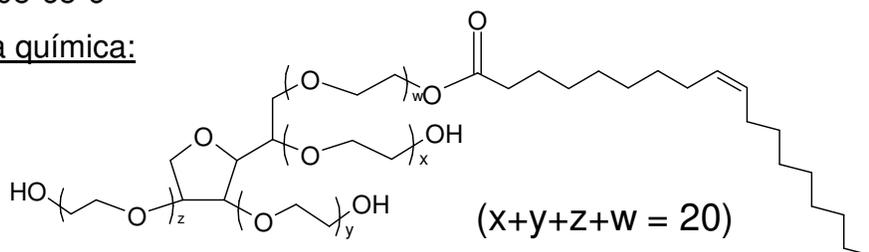
Estrutura química:



Polisorbato 80 TMAZ80 Lote G64737

CAS: 9005-65-6

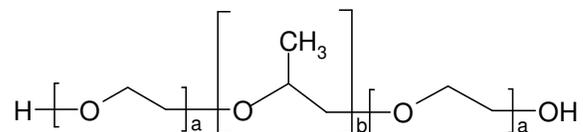
Estrutura química:



Poloxamer 188 - Pluronic[®] F-68 Lote 049K0044 - Sigma

CAS: 9003-11-6

Estrutura química:



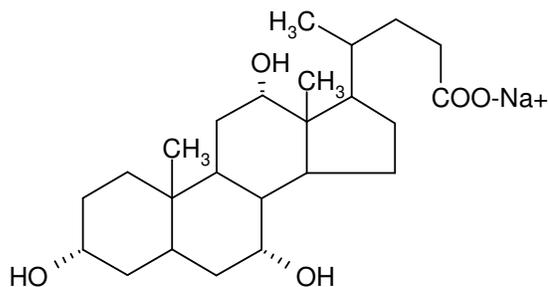
(a = 20; b = 27)

Taurocolato de sódio Lote 61659 - Himedia Laboratories PVT Ltda.

CAS: 145-42-6

MM = 537,68 g mol⁻¹

Estrutura química:



3. Caracterização dos Fármacos

A caracterização dos fármacos foi realizada através de Espectrofotometria nas regiões do Ultravioleta-Visível e do Infravermelho, Análise Termogravimétrica e Calorimetria Diferencial de Varredura.

3.1. Espectrofotometria nas regiões do Ultravioleta-Visível e do Infravermelho

Foram registrados espectros na região do UV-Vis de soluções de Valerato de Betametasona a $4,16 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ e de Dexametasona a $4,37 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ em metanol.

Para a obtenção dos espectros na região do infravermelho as amostras foram misturadas com brometo de potássio e, em seguida, prensadas a 5 toneladas. Os espectros foram registrados de 4000 a 400 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹.

3.2. Análises Térmicas

3.2.1. Análise Termogravimétrica

As curvas termogravimétricas foram obtidas sob as seguintes condições: fluxo de argônio, rampa de aquecimento de 10°C/min, faixa de aquecimento de 25-500°C e aproximadamente 7 mg de amostra.

3.2.2. Calorimetria Diferencial de Varredura

As curvas calorimétricas foram obtidas sob as seguintes condições: fluxo de argônio, rampa de aquecimento de 10°C/min, faixa de aquecimento de 25-300°C e aproximadamente 2 mg de amostra.

4. Nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados

4.1. Considerações iniciais

Para a obtenção das formulações de NLS e CLN preparados neste projeto técnicas de planejamento e otimização de experimentos foram utilizadas com o objetivo de encontrar formulações com valores de ϕ , PDI e ξ aceitáveis. Diversos planejamentos fatoriais foram propostos e utilizando a metodologia de deslocamento ao longo do caminho de máxima inclinação a partir do ponto central, as formulações finais foram encontradas. A metodologia utilizada nestes experimentos será detalhada no item 4.2.

Todas as amostras de NLS e CLN preparadas foram avaliadas de acordo com seus valores de ϕ , PDI e ξ , no aparelho ZetaSizer 300HS Malvern Instruments. Uma vez obtida uma formulação com NP que apresentassem valores aceitáveis para os parâmetros acima mencionados o trabalho de caracterização prosseguiria utilizando cromatografia líquida de ultra-alta eficiência, análise termogravimétrica, calorimetria diferencial de varredura e difratometria de Raios-x

O método de preparação utilizado para a obtenção das NP de BTM e DXM foi sendo ajustado durante o desenvolvimento deste projeto. O método final será apresentado no item 4.3 e seu desenvolvimento será detalhado no item 4.4.

4.2. Planejamentos experimentais (Neto et al., 2010)

A resposta analisada em todos os planejamentos experimentais realizados neste trabalho foi o diâmetro médio de partícula, que deveria ser inferior a 100nm, assim planejamentos fatoriais foram propostos de forma a estudar a influencia que as proporções de tensoativos exerciam sobre os valores de ϕ das NP e também diminuir os valores destes parâmetros.

4.2.1 Planejamentos fatoriais 2³

O primeiro tipo de planejamento fatorial utilizado neste trabalho foi o planejamento fatorial 2³, isto foi feito com o objetivo de entender como as proporções dos três tensoativos (fatores) utilizados no início do trabalho influenciavam o diâmetro médio das NP preparadas (resposta). Uma vez realizados todos os 8 experimentos previstos pelo planejamento, os efeitos foram calculados a partir dos coeficientes de contraste para o fatorial 2³, que estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Coeficientes de contraste para um planejamento fatorial 2³

Média	1	2	3	12	13	23	123
+	-	-	-	+	+	+	-
+	+	-	-	-	-	+	+
+	-	+	-	-	+	-	+
+	+	+	-	+	-	-	-
+	-	-	+	+	-	-	+
+	+	-	+	-	+	-	-
+	-	+	+	-	-	+	-
+	+	+	+	+	+	+	+

Para calcular os efeitos primeiro é preciso transformar a Tabela 1 em uma matriz X com elementos +1 ou -1 e calcular sua matriz transposta, X^t, ambas são apresentadas a seguir:

$$X = \begin{vmatrix} 1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 \\ 1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & -1 & 1 & -1 & -1 & -1 \\ 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & -1 & -1 & 1 \\ 1 & 1 & -1 & 1 & -1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \end{vmatrix} \quad X^t = \begin{vmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ -1 & 1 & -1 & 1 & -1 & 1 & -1 & 1 \\ -1 & -1 & 1 & 1 & -1 & -1 & 1 & 1 \\ -1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & -1 & -1 & 1 \\ 1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & 1 \\ 1 & 1 & -1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 \\ -1 & 1 & 1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 1 \end{vmatrix}$$

Calculando-se o produto $X^t y$, sendo y o vetor coluna contendo as respostas, é possível encontrar os efeitos de cada fator e da interação entre eles, dividindo o primeiro elemento por 8 e os demais por 4.

4.2.2. Planejamentos fatoriais 2^2 com ponto central e deslocamentos ao longo do caminho de máxima inclinação

Os planejamentos fatoriais do tipo 2^2 com ponto central realizados neste projeto tiveram como objetivo otimizar as formulações utilizadas para o preparo das NP, visando sempre a diminuição dos valores de φ .

A modelagem inicial foi realizada supondo-se que os dados experimentais fossem ajustáveis a um modelo linear para investigar a superfície de resposta em torno das condições experimentais estabelecidas. Para isso foi utilizado um modelo linear ajustado de acordo com a equação:

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^t \mathbf{y} \quad (1)$$

onde X é a matriz com elementos +1, -1 ou 0, correspondente aos coeficientes de contraste do planejamento experimental e y o vetor coluna contendo os diâmetros médios das amostras.

Uma vez calculada a equação correspondente ao modelo linear, o caminho de máxima inclinação a partir do ponto central foi determinado realizando deslocamentos com um fator (x_1 ou x_2) e calculando os deslocamentos correspondentes para o outro fator, usando a seguinte equação genérica para o modelo linear obtido:

$$\hat{y} = \mathbf{b}_0 + \mathbf{b}_1\mathbf{x}_1 + \mathbf{b}_2\mathbf{x}_2 \quad (2)$$

onde b_0 , b_1 e b_2 são estimadores dos parâmetros do modelo e x_1 e x_2 representam os fatores codificados.

Para realizar um deslocamento de uma unidade com o fator x_1 , por exemplo, tem-se:

$$\Delta\mathbf{x}_1 = 1 \quad \text{e} \quad \Delta\mathbf{x}_2 = \left(\frac{\mathbf{b}_2}{\mathbf{b}_1}\right) \Delta\mathbf{x}_1$$

realizando os cálculos pertinentes, chega-se aos valores dos novos níveis.

4.3. Método final de preparação das nanopartículas de Valerato de Betametasona e Dexametasona

O método de preparação das NP foi ajustado a partir do método de homogeneização a quente, no qual o ativo é dissolvido no lipídio fundido e a solução é dispersa em outra solução à quente contendo tensoativos, sob alta agitação, utilizando Ultra-Turrax® T25 – IKA®. A Figura 17 apresenta uma ilustração do método de preparação:

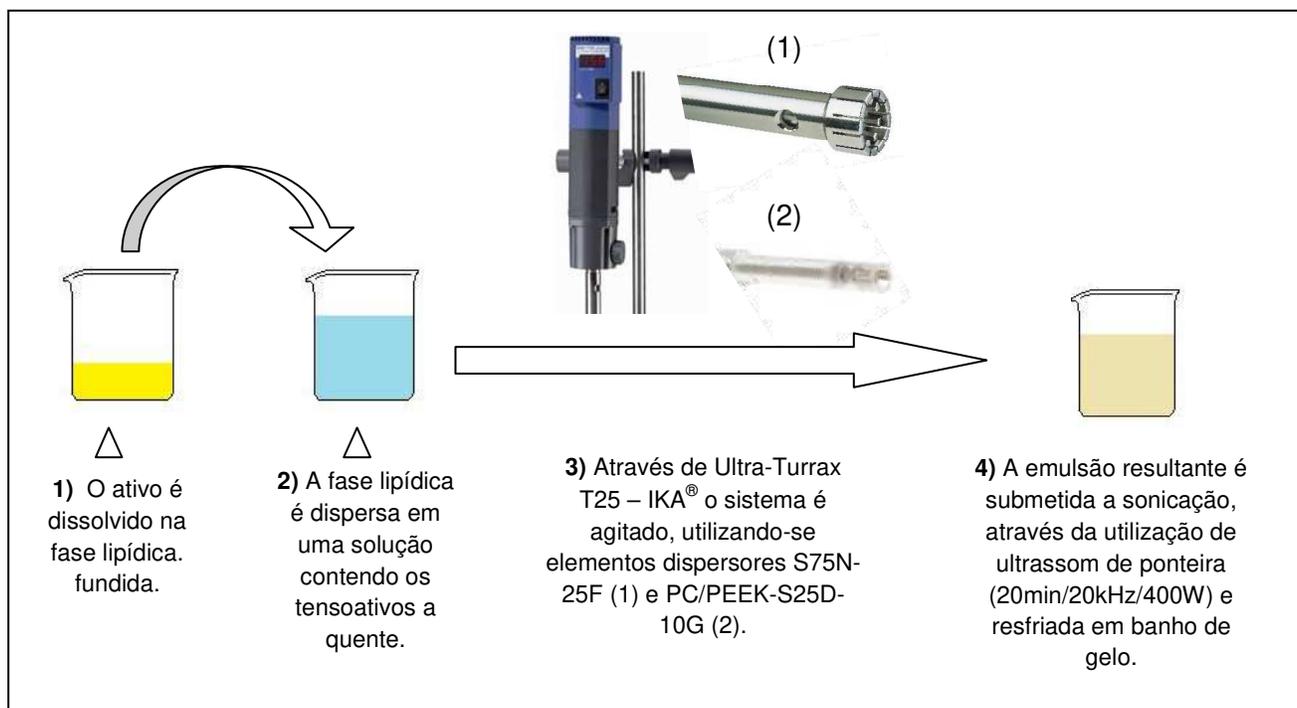


Figura 17. Ilustração do método final de preparação para NP de BTM e DXM.

4.4. Desenvolvimento das formulações e ajuste do método de preparação das nanopartículas de Valerato de Betametasona e Dexametasona

4.4.1 Testes de preparação utilizando elemento dispersor metálico (S75N-25F) para Ultra-Turrax® T25

Para o preparo de todas as NP mencionadas neste item utilizou-se velocidade de agitação de 18000 rpm durante 10 min, com intervalo de um 1 min a cada 5 min de agitação e a temperatura do sistema foi mantida na faixa entre 70-75°C.

Inicialmente realizou-se um planejamento fatorial 2^3 (Tabela 3) para avaliar a necessidade de utilizar os tensoativos fosfatidilcolina de soja, polisorbato 80 e

poloxamer 188, em uma mesma formulação contendo o fármaco BTM mantendo-se constantes as quantidades de lipídio e fármaco (Tabela 2).

Tabela 2. Quantidades fixas dos componentes da formulação de NP de BTM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F) para o planejamento fatorial 2^3

Componente	% em Massa
Estearato de glicerila	1,0*
Fármaco	3,0**

*em relação à fase aquosa **em relação à fase lipídica

Tabela 3. Níveis do planejamento fatorial 2^3 para NP de BTM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F)

Fatores	Níveis (% em Massa*)	
	(-)	(+)
(x_1) Poloxamer 188	0,02	0,10
(x_2) Polisorbato 80	0,30	0,60
(x_3) Fosfatidilcolina de soja	0,30	0,60

*em relação à fase aquosa

Uma vez avaliado o planejamento 2^3 anteriormente exposto (Tabela 3), realizou-se um novo planejamento fatorial para BTM mantendo-se constantes as quantidades de lipídio, de fármaco e do tensoativo Poloxamer 188, conforme apresentado na Tabela 4. Este novo planejamento está exposto na Tabela 5.

Tabela 4. Quantidades fixas dos componentes da formulação de NP de BTM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F) para o planejamento fatorial 2^2 com ponto central

Componente	% em Massa
Estearato de Glicerila	1,0*
Poloxamer 188	0,1*
Fármaco	3,0**

*em relação à fase aquosa **em relação à fase lipídica

Tabela 5. Níveis do planejamento fatorial 2^2 com ponto central para NP de BTM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F)

Fatores	Níveis (%*)		
	(-)	(0)	(+)
(x ₁)Polisorbato 80	0,30	0,50	0,70
(x ₂)Fosfatidilcolina de soja	0,20	0,30	0,40

*em massa e em relação à fase aquosa

A partir dos resultados deste planejamento experimental novos níveis através do caminho de máxima inclinação para a preparação de novas NP de BTM foram calculados (Tabela 6):

Tabela 6. Caminho de máxima inclinação para o planejamento fatorial 2^2 com ponto central para NP de BTM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F)

Amostra	Ensaio	x_1	x_2	Polisorbato 80 (%*)	Fosfatidilcolina de Soja (%*)
16	centro	0	0	0,50	0,30
17	centro + Δ	1	0,18	0,70	0,32
18	centro + 2 Δ	2	0,36	0,90	0,34
19	centro + 3 Δ	3	0,54	1,10	0,35
20	centro + 4 Δ	4	0,72	1,30	0,37

* em massa e em relação à fase aquosa

Tendo como base os resultados obtidos com os planejamentos experimentais realizados anteriormente, elaborou-se um planejamento fatorial 2^2 com ponto central para a obtenção de NP de DXM, mantendo-se constantes as proporções de lipídio, fármaco e poloxamer 188, conforme apresentado na Tabela 4. Os níveis utilizados neste planejamento estão expostos na Tabela 7.

Tabela 7. Níveis do planejamento fatorial 2^2 com ponto central para NP de DXM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F)

Fatores	Níveis (%*)		
	(-)	(0)	(+)
(x_1)Polisorbato 80	0,15	0,50	0,70
(x_2)Fosfatidilcolina de soja	0,20	0,30	0,40

*em massa e em relação à fase aquosa

A partir dos resultados obtidos com o planejamento acima citado novos níveis através do caminho de máxima inclinação para o preparo de novas NP de DXM foram calculados (Tabela 8):

Tabela 8. Caminho de máxima inclinação para o planejamento fatorial 2^2 com ponto central para NP de DXM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F)

Amostra	Ensaio	x_1	x_2	Polisorbato 80 (%*)	Fosfatidilcolina de soja (%*)
26	centro	0	0	0,50	0,30
27	centro + Δ	-1	0,47	0,56	0,20
28	centro + 2Δ	-2	0,94	0,69	0,10
29	centro + 3Δ	-3	1,41	0,78	0

*em massa e em relação à fase aquosa

4.4.2. Testes de preparação utilizando elemento dispersor de policarbonato (PC/PEEK – S25D – 10G – KS) para Ultra-Turrax®T25

Após a avaliação de todas as formulações apresentadas no item anterior percebeu-se que o elemento dispersor metálico (S75N-25F) contaminou as formulações com partículas metálicas que se desprenderam dele devido à alta temperatura de trabalho, por isso foi estudada a possibilidade de substituí-lo por um novo elemento dispersor feito de policarbonato. Desta forma as formulações que haviam sido eleitas para as próximas fases do projeto (Tabela 9) foram testadas com o novo elemento dispersor.

Tabela 9. Formulações de NP de BTM e DXM eleitas para testar o elemento dispersor de policarbonato (S25D-10G)

Formulação	Fármaco (%**)	Lipídio (%*)	Poloxamer 188 (%*)	Polisorbato 80 (%*)	Fosfatidilcolina de soja (%*)
NP de BTM	3,0	1,0	0,10	1,10	0,35
NP de DXM	3,0	1,0	0,10	0,50	0,30

*em massa e em relação à fase aquosa

** em massa e em relação à fase lipídica

Após analisar os resultados obtidos com o primeiro teste utilizando o elemento dispersor de policarbonato percebeu-se a necessidade de avaliar a influência da velocidade e do tempo de agitação utilizados com este novo elemento dispersor sobre os valores de ϕ , PDI e ξ das NP produzidas. Para que isto fosse feito de forma a utilizar o menor número de experimentos possível, elaborou-se mais um planejamento experimental, que está exposto na Tabela 10.

Tabela 10. Níveis do planejamento fatorial 2^2 com ponto central para NP de BTM e DXM preparadas somente com elemento dispersor de policarbonato (S25D-10G)

Fatores	Níveis (%*)		
	(-)	(0)	(+)
(x_1) Velocidade de agitação – rpm	10000	15000	18000
(x_2) Tempo de agitação – min	5	10	15

*em relação à fase aquosa

Diante dos resultados obtidos com o planejamento fatorial exposto na Tabela 9 a única saída encontrada para preparar NP de BTM e DXM com valores

aceitáveis de ϕ , PDI e ξ foi utilizar os dois tipos de elementos dispersores, sendo que o dispersor metálico seria utilizado pelo menor tempo possível para que as amostras não fossem contaminadas com metal.

4.4.3. Testes de preparação utilizando os dois elementos dispersores para Ultra-Turrax® T25

Foram iniciados os testes utilizando ambos os elementos dispersores para a preparação nas NP, segundo o esquema de agitação 1 apresentado pela Tabela 11, sendo que a cada 5 min de agitação era feita uma pausa de 1 minuto. É preciso ressaltar, também, que o tensoativo Taurocolato de Sódio passou a ser utilizado em substituição ao Poloxamer 188.

Tabela 11. Esquema de agitação 1 para o teste de preparação de NP de BTM e DXM com os dois elementos dispersores

Elemento dispersor	Tempo de Agitação (min)	Velocidade (rpm)
S25D-10G (policarbonato)	10	18000
S75N-25F (metálico)	1	18000

Elaborou-se, então, um planejamento fatorial 2^2 com ponto central para o fármaco DXM, a fim de avaliar a influência dos componentes da formulação sobre os valores de ϕ , PDI e ξ das NP produzidas. A Tabela 12 apresenta os componentes da formulação mantidos fixos e os fatores e níveis do planejamento fatorial proposto são apresentados na Tabela 13.

Tabela 12. Componentes da formulação de NP de DXM mantidos fixos para o planejamento fatorial 2^2 com ponto central utilizando os dois tipos de elemento dispersor

Componente	% em Massa
Estearato de Glicerila	1,0*
Taurocolato de Sódio	0,1*
Fármaco	3,0**

*em relação à fase aquosa **em relação à fase lipídica

Tabela 13. Níveis do planejamento fatorial 2^2 com ponto central para NP de DXM preparadas utilizando-se o esquema de agitação 1

Fatores	Níveis (%*)		
	(-)	(0)	(+)
(x ₁)Polisorbato 80	0,20	0,30	0,40
(x ₂)Fosfatidilcolina de soja	0,20	0,50	0,60

*em massa e em relação à fase aquosa

A partir dos resultados obtidos com o planejamento fatorial apresentado na Tabela 12, foram calculados novos níveis ao longo do caminho de máxima inclinação para o preparo das NP de DXM (Tabela 14).

Tabela 14. Caminho de máxima inclinação para o planejamento fatorial 2² com ponto central para NP de DXM preparadas utilizando-se o esquema de agitação 1

Amostra	Ensaio	x ₁	x ₂	Polisorbato 80 (%*)	Fosfatidilcolina de soja (%*)
45	centro + Δ	+1	-0,4	0,40	0,45
46	centro + 2Δ	+2	-0,9	0,50	0,41
47	centro + 3Δ	+3	-1,3	0,60	0,37
48	centro + 4Δ	+4	-1,7	0,70	0,32
49	centro + 5Δ	+5	-2,1	0,80	0,28
50	centro + 6Δ	+6	-2,6	0,90	0,24
51	centro + 7Δ	+7	-3,0	1,00	0,20

*em massa e em relação à fase aquosa

A partir dos resultados obtidos com as formulações apresentadas na Tabela 14, a **amostra 47** foi escolhida para realizar um novo teste de agitação, no qual a ordem de utilização dos elementos dispersores foi invertida, a fim de obter NP com φ e PDI menores. O esquema de agitação 2 é apresentado na Tabela 15 .

Tabela 15. Esquema de agitação 2 para o teste de preparação de NP de BTM e DXM com os dois elementos dispersores

Elemento dispersor utilizado	Tempo de Agitação (min)	Velocidade (rpm)
Metálico (S75N-25F)	2	18000
Policarbonato (S25D-10G)	10	18000

Foram preparadas duas replicatas da **amostra 47** com o fármaco DXM e outras duas replicatas com o fármaco BTM. Isto foi feito a fim de analisar se uma mesma formulação seria adequada para os dois fármacos. A Tabela 16 apresenta quais os esquemas de agitação utilizados para cada amostra.

Tabela 16. Teste para comparação entre os esquemas de agitação 1 e 2 para o preparo de NP de BTM e DXM

Amostra	Fármaco	Esquema de agitação utilizado
52	DXM	1
53		2
54	BTM	1
55		2

A partir da comparação entre os dois esquemas de agitação, escolheu-se o **esquema 2** para dar continuidade ao trabalho.

Neste ponto foi realizado um teste para avaliar a influência da adição de mais um componente (ácido oleico) à fase lipídica das formulações sobre o ϕ , o PDI e o ξ das NP. Isto foi feito com o objetivo de aumentar a capacidade de carregamento das NP que estavam sendo preparadas.

Como a formulação da **amostra 47** apresentou os melhores resultados, suas proporções de tensoativos e de fármaco foram mantidas fixas e variou-se somente a proporção entre estearato de glicerila e ácido oleico. A Tabela 17 apresenta os componentes fixos das formulações testadas e a Tabela 18 apresenta as formulações contendo ácido oleico.

Tabela 17. Quantidades fixas dos componentes da formulação de NP de BTM e DXM para o teste com ácido oleico preparadas utilizando-se o esquema de agitação 2

Componente	% em Massa
Fármaco	3,00**
Tauocolato de Sódio	0,10*
Fosfatidilcolina de Soja	0,60*
Polisorbato 80	0,37*

*em relação à fase aquosa **em relação à fase lipídica

Tabela 18. Proporções de ácido oleico utilizadas para o preparo de NP de BTM e DXM utilizando-se o esquema de agitação 2

Amostra	Ácido Oleico (%*)	Fármaco Utilizado
56	10,0	BTM
57	20,0	
58	30,0	
59	10,0	DXM
60	20,0	
61	30,0	

* em relação à fase lipídica

Após a realização dos testes com ácido oleico, uma formulação de NP de cada fármaco foi eleita para a continuação do trabalho. Para o fármaco BTM a formulação escolhida foi aquela que deu origem à **amostra 57** e para o fármaco DXM a que deu origem à **amostra 53**. As formulações eleitas são apresentadas na Tabela 19.

Tabela 19. Formulações finais para as NP de BTM e DXM

Componente	% em Massa - NLS	
	BTM	DXM
Fármaco	3,00**	3,00**
Ácido Oleico	20,00**	
Taurocolato de Sódio	0,10*	0,10*
Fosfatidilcolina de Soja	0,37*	0,37*
Polisorbato 80	0,60*	0,60*

*em relação à fase aquosa **em relação à fase lipídica

4.4.4. Testes de preparação utilizando ultrassom de ponteira

Com finalidade de diminuir os valores de ϕ e PDI apresentados pelas NP preparadas até então, foi inserida a utilização de ultrassom de ponteira no método de preparação. O primeiro teste realizado visava avaliar se a ultrassonicação das amostras seria capaz de diminuir os valores dos parâmetros mencionados.

As NP de BTM e DXM foram preparadas seguindo o esquema de agitação 2 e as formulações apresentadas na Tabela 19, em seguida uma alíquota de cada emulsão foi retirada e levada ao banho de gelo. O restante das emulsões foi submetido ao processo de ultrassonicação durante 20 min, sendo que a cada 5 min uma alíquota de cada amostra era retirada (Tabela 20). É preciso ressaltar que, a fim de evitar possíveis contaminações por partículas metálicas que poderiam se desprender da ponteira do ultrassom, todas as amostras foram centrifugadas a 11400 g durante 5 min e, após este procedimento, colocadas em banho de gelo.

Tabela 20. Teste para avaliar a eficiência do processo de sonicação na diminuição dos valores de ϕ e PDI das NP de BTM e DXM

Tempo de sonicação (min)	Amostra	
	BTM	DXM
0	B ₀	D ₀
5	B ₅	D ₅
10	B ₁₀	D ₁₀
15	B ₁₅	D ₁₅
20	B ₂₀	D ₂₀

Com os resultados obtidos com o sonificador de ponteira o método de preparação para as NP de BTM e DXM foi fixado e está apresentado na Tabela 21.

Tabela 21. Resumo do método de preparação das NP de BTM e DXM

	Elemento Dispersor		Ultrassom de Ponteira		
	Metálico	Policarbonato	Tempo (min)	Potência (W)	Frequência (kHz)
NP de BTM	2 min a 18000 rpm	10 min a 18000 rpm	20	400	20
NP de DXM					

4.5. Caracterização das formulações de NP de BTM e DXM

4.5.1 Determinação da eficiência de encapsulação e do percentual de carregamento

a) Curva analítica

Após a conclusão dos testes de preparação das NP iniciaram-se os teste para determinar a eficiência de encapsulação de fármaco através de Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência.

As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna Zorbax eclipse plus C18 - Agilent[®], com 150 mm de comprimento; 4,6 mm de diâmetro e tamanho de partícula de 5 µm; fase móvel em gradiente de acetonitrila e água, iniciando com 20% de acetonitrila e passando para 80% após 10 min de análise; fluxo de 1 mL/min

As curvas analíticas para os fármacos foram construídas com soluções de concentração entre 10 e 100 µM. As amostras dos fármacos foram preparadas através de diluição em acetonitrila.

b) Metodologia

Realizar a separação de fármacos lipofílicos presentes em uma fase lipídica é uma tarefa bastante inconveniente, devido a isso diversos métodos para a determinação da eficiência de encapsulação e do percentual de carregamento de NP foram propostos por diferentes autores e ainda não há um consenso em relação a isso (Souto et al., 2004; Xiang et al., 2007; Zhang & Smith, 2010).

De forma geral os métodos baseiam-se na determinação indireta da quantidade de fármaco encapsulado através da diferença entre a quantidade de fármaco livre e a quantidade de fármaco total presente na amostra em questão.

Para determinar a eficiência de encapsulação e o percentual de carregamento das formulações desenvolvidas neste projeto diversas amostras de NP de cada fármaco foram preparadas (segundo as formulações expostas na Tabela 19 e seguindo o método de preparação exposto na Tabela 21).

A eficiência de encapsulação foi determinada através da fórmula:

$$EE (\%) = \frac{f_{encaps} \times 100}{f_{total}} \quad (3)$$

onde EE é a eficiência de encapsulação, f_{encaps} é a quantidade de fármaco encapsulado e f_{total} a quantidade de fármaco total na amostra.

Para determinar f_{encaps} as suspensões foram filtradas para reter cristais de fármaco que pudessem estar livres. Esta filtração foi realizada através de membranas com poros de diâmetros diferentes para comparar qual diâmetro seria mais adequado para reter os cristais de fármacos, assim 1mL das suspensões foi filtrado através de membrana de polivinilpirrolidona (Millipore®) com poros de diâmetro 5 μm e membrana de éster de celulose (Millipore®) com poros de diâmetro de 1,2 μm ; então, uma alíquota de 200 μL do material filtrado foi diluída em acetonitrila completando o volume final 4 mL.

Para determinar f_{total} 200 μL das suspensões foram diluídos em acetonitrila completando volume final 4 mL.

Todas as amostras foram preparadas em triplicata e filtradas através de membranas com poros de diâmetro 0,45 µm (Millex®) e encaminhadas para análise, a Figura 18 ilustra o método de preparação das amostras para determinação da eficiência de encapsulação das NP.

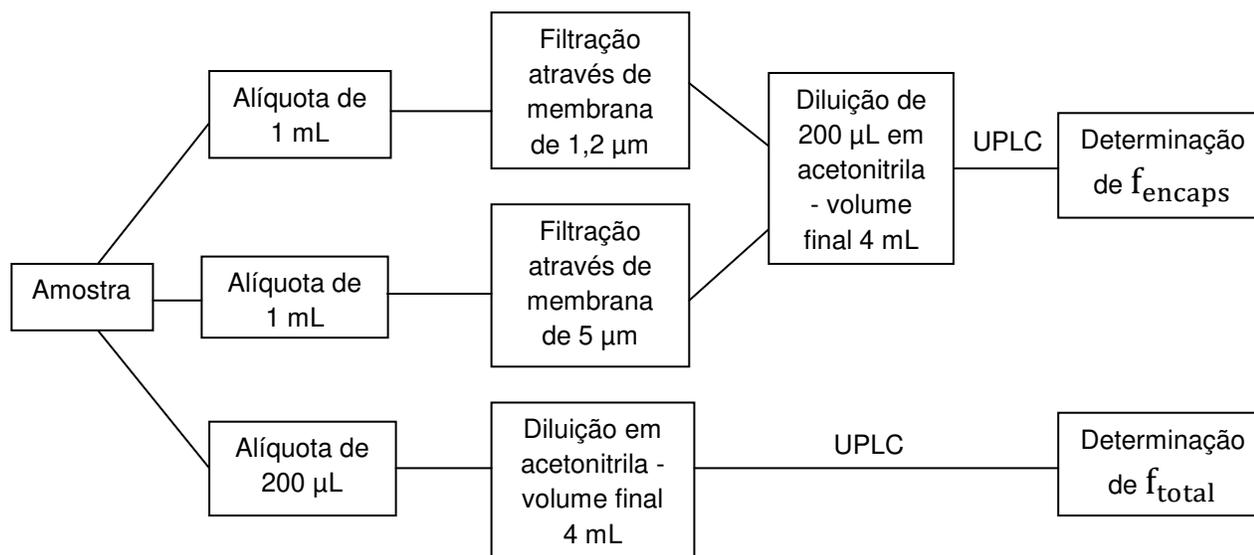


Figura 18. Esquema de preparação das amostras de NP para determinação da EE via UPLC.

Para determinar o percentual de carregamento das formulações, através de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência, a seguinte fórmula foi utilizada (Xiang et al., 2007; Kheradmandnia et al., 2010; Silpa et al., 2012):

$$C(\%) = \frac{(m_f \times 100)}{m_T} \quad (4)$$

onde $C(\%)$ é o percentual de carregamento, m_f é a massa de fármaco na amostra de NP e m_T é a massa total da amostra.

Para determinar m_f primeiramente uma alíquota das suspensões foi liofilizada, após este procedimento uma determinada quantidade do material liofilizado foi pesada e dissolvida em acetonitrila. Esta amostra foi então filtrada

através de membranas com poros de diâmetro 0,45 µm (Millex[®]) e encaminhada para análise. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

c) Microscopia eletrônica de varredura

Com objetivo de sanar dúvidas em relação à eficiência das membranas utilizadas para a filtração das amostras realizou-se microscopia eletrônica de varredura (MEV) destas membranas.

O teste procedeu da seguinte forma: soluções aquosas dos fármacos foram deixadas sob agitação durante 24 h, após este período alíquotas de cada solução foram filtradas com cada tipo de membrana (5 e 1,2 µm). As membranas utilizadas para filtrar as amostras de BTM e DXM e as membranas utilizadas para a determinação da EE das NP foram, após secagem, colocadas em porta-amostras, que foram revestidos com ouro utilizando metalizador MED 20 *Coating Systems* (Bal-Tec) sob as seguintes condições: 20 mA de corrente e 50 mTorr de pressão por 160 min.

Amostras dos fármacos secos também foram depositadas sobre fitas de carbono, que foram colocadas em porta-amostras e encaminhadas para análise, conforme mencionado acima.

4.5.2. Análises Térmicas

Os componentes das formulações foram submetidos a análise termogravimétrica e a calorimetria diferencial de varredura. Para realizar estas mesmas análises com as NP produzidas foi necessário realizar a liofilização do material para, então, encaminhá-lo para análise.

a) Análise Termogravimétrica

As curvas termogravimétricas foram obtidas sob as seguintes condições: fluxo de argônio, rampa de aquecimento de 10°C/min e faixa de aquecimento de 25-500°C.

b) Calorimetria Diferencial de Varredura

As curvas calorimétricas foram obtidas sob as seguintes condições: fluxo de argônio, rampa de aquecimento de 10°C/min e faixa de aquecimento de 25-300°C.

4.5.3. Difratomia de Raios-X

Foram obtidos os difratogramas das amostras de NP liofilizadas e também dos fármacos BTM e DXM. Utilizou-se Difrátômetro de Raios-X Shimadzu -XDR-modelo 7000, fonte de radiação $\text{CuK}\alpha$, variando 2θ de 5-50°, $\lambda=1,5406 \text{ \AA}$ operado a 40 kV e 30 mA.

4.5.4. Determinação do perfil de liberação dos fármacos a partir das nanopartículas

Os perfis de liberação dos fármacos a partir das NP foram determinados através de diálise utilizando sacos de diálise - InLab[®] de celulose regenerada, com corte molecular 12-16 kDa e porosidade de 25 Å. O meio receptor utilizado foi solução a 4% (m/v) de polisorbato 80, diversas alíquotas foram retiradas ao longo de seis dias, sendo que o volume retirado era repostado imediatamente de forma a não alterar o volume final do experimento (Figura 19). As amostras foram analisadas via UPLC seguindo as mesmas condições apresentadas no item 4.5.1 (a).

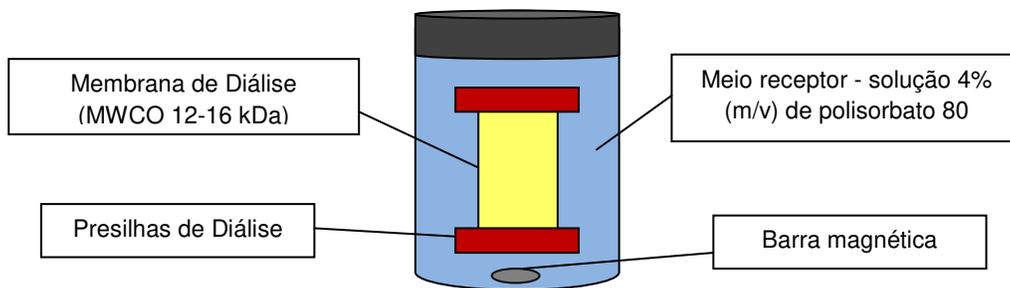


Figura 19. Representação do experimento para determinação do perfil de liberação dos fármacos a partir das NP.

Realizar a modelagem matemática do perfil de liberação de fármaco é bastante importante para que seja possível prever de que forma o fármaco será liberado a partir da estrutura que o contém.

Considerando o tipo de administração, a dosagem de fármaco incorporado e o perfil de liberação que se deseja obter, previsões matemáticas permitirão uma boa estimativa da composição, geometria, dimensões e métodos de preparação requeridos para que determinado objetivo seja alcançado. Diante disto as principais motivações para a utilização de modelagem matemática em sistemas de entrega de fármaco são a economia de tempo e a redução de custos, pois o número de estudos experimentais necessários para desenvolver/otimizar um novo produto pode ser significativamente reduzido. Além disso, a análise quantitativa dos fenômenos físicos, químicos e biológicos envolvidos no controle da liberação de fármaco oferece outra vantagem fundamental pois o mecanismo de liberação pode ser elucidado (Siepmann & Siepmann, 2008).

As teorias propostas para explicar o perfil de liberação de fármaco baseiam-se em fenômenos como difusão, dissolução, intumescimento, erosão, precipitação e/ou degradação da matriz carreadora.

Se a liberação do fármaco é controlada puramente pela sua difusão com coeficientes de difusão constantes, o tratamento matemático pode ser realizado de forma mais simplificada. A seguir serão apresentados alguns modelos matemáticos que foram utilizados na tentativa de realizar a modelagem

matemática dos dados obtidos experimentalmente (Costa & Lobo, 2001; Lopes et al., 2005; Siepmann & Siepmann, 2008; Calderini, 2011).

a) Cinética de ordem zero

Se a concentração inicial de fármaco excede sua solubilidade no reservatório, as moléculas liberadas são repostas através da dissolução (parcial) dos cristais de fármaco/agregados amorfos, resultando concentração constante de fármaco no interior da membrana. Se as propriedades da barreira que controla a taxa de liberação de fármaco (espessura e permeabilidade ao fármaco) permanecerem constantes e se a condição sink for garantida durante o período do ensaio, o resultado será uma cinética de liberação de ordem zero, que pode ser representada pela equação 5:

$$Q_t = Q_0 + k_0 t \quad (5)$$

onde Q_t é a quantidade de fármaco liberada no tempo t ; Q_0 é a quantidade inicial de fármaco na solução e k_0 o coeficiente de velocidade de liberação.

Os sistemas que seguem este perfil liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo e são considerados sistemas ideais para liberação de prolongada de ativos.

b) Cinética de Primeira Ordem

No caso de um sistema no qual a concentração de fármaco está abaixo de sua solubilidade, as moléculas de fármaco que foram liberadas não são repostas e a concentração de fármaco no interior da membrana diminui continuamente com o tempo. Se a membrana não sofre alterações, a condição sink é mantida ao longo de todo o experimento e a permeabilidade do fármaco através da barreira permanece constante, uma cinética de primeira ordem será observada e pode ser representada pela equação 6 (linearizada):

$$\ln Q_t = \ln Q_0 + k_1 t \quad (6)$$

onde Q_t é a quantidade de fármaco liberada no tempo t ; Q_0 é a quantidade inicial de fármaco na solução e k_1 o coeficiente de velocidade de liberação de primeira ordem.

c) Modelo de Higuchi

Estes modelos matemáticos foram desenvolvidos para estudar os perfis de liberação de fármacos solúveis e pouco solúveis em água, incorporados em matrizes sólidas e/ou semissólidas, que funcionam como o meio difusional. Diversas equações fazem parte deste modelo matemático, a seguir é apresentada a equação (7) simplificada deste modelo (conhecido como Modelo de Higuchi Simplificado):

$$Q_t = k_H t^{1/2} \quad (7)$$

onde Q_t é a quantidade de fármaco liberada no tempo t e k_H é a constante de dissolução de Higuchi.

Neste modelo o perfil de liberação do ativo é descrito como um processo baseado na Lei de Difusão de Fick *versus* a raiz quadrada do tempo ($t^{1/2}$) (Higuchi, 1961; Higuchi, 1963)

d) Modelo de Peppas-Korsmeyer

Este modelo, também chamado de Lei da Potência, é bastante utilizado para descrever a liberação de ativos a partir de estruturas poliméricas e segue a seguinte equação (Equação 8):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_p t^n \quad (8)$$

onde $\frac{M_t}{M_\infty}$ é quantidade de fármaco liberada no tempo t ; k_p é uma constante que leva em consideração as características estruturais e geométricas do sistema; e n é o expoente de liberação, que pode ser indicativo do tipo de mecanismo de liberação. Diferentes valores de n foram obtidos (Tabela 22) e correlacionados com o mecanismo de liberação/ geometria do sistema estudado. Quando o valor do expoente de liberação é igual a 0,5 a liberação é controlada por difusão, quando este expoente assume valores entre 0,5 e 1,0 pode-se dizer que a difusão segue um modelo não-Fickiano (Korsmeyer & Peppas, 1981; Korsmeyer et al., 1983; Siepmann & Siepmann, 2008).

Tabela 22. Correlação entre os valores do expoente de liberação, n , da equação de Peppas-Korsmeyer com a geometria do sistema e com o mecanismo de liberação proposto (Siepmann & Siepmann, 2008).

Expoente n		Mecanismo de liberação do ativo
Geometria cilíndrica	Geometria esférica	
0,45	0,43	Difusão Fickiana
$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Transporte anômalo
0,89	0,85	Intumescimento da matriz

e) Modelo de Baker-Lonsdale

Este modelo foi desenvolvido a partir do modelo de Higuchi e descreve a liberação do fármaco a partir de uma matriz esférica (Equação 9):

$$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = k_{BL} t \quad (9)$$

onde $\frac{M_t}{M_\infty}$ é a quantidade de fármaco liberada no tempo t e k_{BL} é a constante de difusão. Desta forma, um gráfico que relacione a parte esquerda da equação com o tempo será linear e a inclinação da reta será a constante de difusão (Baker & Lonsdale, 1974).

5. Gel termo sensível de pectina cítrica oxidada

5.1. Oxidação da pectina cítrica

A pectina cítrica (PC) foi oxidada à pectina cítrica oxidada (PCO) através da adição de solução aquosa de periodato de sódio à solução aquosa de PC. A reação foi realizada em temperatura ambiente, sob agitação constante, no escuro, durante 2 h. Então adicionou-se polietilenoglicol para interromper a reação e o sistema foi mantido sob agitação por mais 1 h. A concentração final de PC foi 2% (m/v) e a concentração de NaIO_4 foi 12,5 mM. O produto de reação foi purificado através de diálise contra água deionizada em temperatura ambiente durante 3 dias, com diversas trocas de água. A ausência de NaIO_4 foi garantida através de medidas de condutividade da água utilizada. A solução final foi congelada e liofilizada, obtendo-se um produto final esbranquiçado com aparência de algodão (Bouhadir et al., 2000; Dawlee et al., 2005; Hudson et al., 2010; Takei et al., 2010).

5.2. Caracterização dos produtos de reação

5.2.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Foram registrados espectros de RMN de amostras de PC e PCO em água deuterada a 80°C. A análise foi realizada em um Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker - Avance 500, operando em 500 MHz para RMN de ^{13}C .

5.2.1. Espectroscopia na região do Infravermelho

Foram pesados 2,7 mg de cada amostra (pectina cítrica e pectina cítrica oxidada), que foram misturados com KBr e, em seguida, prensados. Os espectros foram registrados de 4000 a 400 cm^{-1} em espectrofotômetro de Infravermelho Bomem-Hartmann modelo MB 102.

5.2.2. Análises térmicas

a) Análise Termogravimétrica

As curvas termogravimétricas foram obtidas sob as seguintes condições: fluxo de argônio, rampa de aquecimento de 10°C/min e faixa de aquecimento de 25-500°C.

b) Calorimetria Diferencial de Varredura

As curvas calorimétricas foram obtidas sob as seguintes condições: fluxo de argônio, rampa de aquecimento de 10°C/min e faixa de aquecimento de 25-300°C.

5.2.4. Determinação do percentual de oxidação

A porcentagem de oxidação da PCO em relação à PC foi determinada através de titulação com cloridrato de hidroxilamina. Neste ensaio 0,05 g de pectina cítrica (oxidada e não oxidada) foram dissolvidos em 12,5 mL de solução 0,25 mol L⁻¹ de H₂NOH·HCl contendo alaranjado de metila. A mistura foi mantida sob agitação durante 2 horas e, após este período, foi titulada com NaOH 1 mol L⁻¹ até o ponto de viragem do indicador (Zhao & Heindel, 1991; Takey et al., 2010).

Quando H₂NOH·HCl reage com grupos aldeído presentes no polissacarídeo, ocorre formação de polioximas e liberação de HCl, de acordo com a equação química genérica (Zhao & Heindel, 1991):

Desta forma, titulando-se a mistura com NaOH determina-se o número de mols de HCl liberados e, através desta quantidade, pode-se determinar a porcentagem de oxidação (grupos aldeído) do produto de reação (PCO) em relação à amostra padrão (PC). Sabendo que:



$$\mathbf{nHCl_{PC} = nCHO_{PC} \quad (9)}$$

$$\mathbf{nHCl_{PCO} = nCHO_{PCO} \quad (10)}$$

onde $\mathbf{nHCl_{pc}}$ é o número de mols de HCl na amostra de pectina cítrica, $\mathbf{nCHO_{pc}}$ é o número de mols de grupos aldeído na amostra de pectina cítrica, $\mathbf{nHCl_{pco}}$ é o número de mols de HCl na amostra de pectina cítrica oxidada e $\mathbf{nCHO_{pco}}$ é o número de mols de grupos aldeído na amostra de pectina cítrica oxidada.

Temos que:

$$\mathbf{nCHO_{pco} - nCHO_{pc} = nCHO_{real} \quad (11)}$$

onde $\mathbf{nCHO_{real}}$ é o número de mols de grupos aldeídos gerados através da reação de oxidação.

Portanto:

$$\mathbf{\%Ox = \frac{nCHO_{real} \times 100}{nCHO_{pco}} \quad (12)}$$

onde $\mathbf{\%Ox}$ é a porcentagem de oxidação da PCO.

5.3. Gelificação

Os testes de gelificação foram realizados mediante adição de solução de PCO à solução de di-hidrazida adípica, em diferentes proporções. A gelificação foi monitorada a 37°C através do teste de inversão de tubo (Gupta et al., 2006; Takey et al., 2010).

Foram testadas amostras na ausência e presença dos fármacos e na presença de NP de cada fármaco. Para avaliar a ocorrência de gelificação na presença dos fármacos foi necessário realizar suas dissoluções prévias em uma

solução de polisorbato 80 e esta solução foi adicionada à solução de PCO. Todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato (pH 7,4) livre de íons cálcio e magnésio.

5.4. Estudo de Intumescimento

Analisar o intumescimento de hidrogéis permite entender como ativos inseridos na matriz gelificada podem ser liberados.

Neste estudo amostras do hidrogel de pectina cítrica oxidada foram pesadas e imersas em tampão fosfato, pH 7,4. A massa das amostras foi registrada após 7 e 24 h de análise. A razão de intumescimento, em massa, e a porcentagem de água em equilíbrio foram determinadas de acordo com as equações 13 e 14, respectivamente (Berger et al., 2003; Dawlee et al., 2005):

$$q = m_I / m_S \quad (13)$$

onde q é a razão de intumescimento, m_I é a massa do gel intumescido e m_S é a massa do gel não intumescido.

$$A (\%) = \left[1 - \left(\frac{1}{q} \right) \right] \times 100 \quad (14)$$

onde A é a porcentagem de água em equilíbrio e q é a razão de intumescimento.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Caracterização dos fármacos

Antes de iniciar os trabalhos foi necessário caracterizar os fármacos utilizados de forma a garantir sua qualidade e atestar sua procedência.

1.1. Espectrofotometria nas regiões do Ultravioleta-Visível e do Infravermelho

A Figura 20 apresenta os espectros UV-Vis para valerato de betametasona (BTM) de dexametasona (DXM), as Figuras 21 e 22 apresentam os espectros IV e as Tabelas 23 e 24 apresentam as atribuições das bandas vibracionais. Tanto os máximos de absorção observados nos espectros UV-Vis (239 nm para BTM e 240 nm para DXM) quanto as bandas vibracionais observadas nos espectros IV mostraram-se de acordo com a literatura (Cohen, 1973; Ferrante & Rudy, 1977).

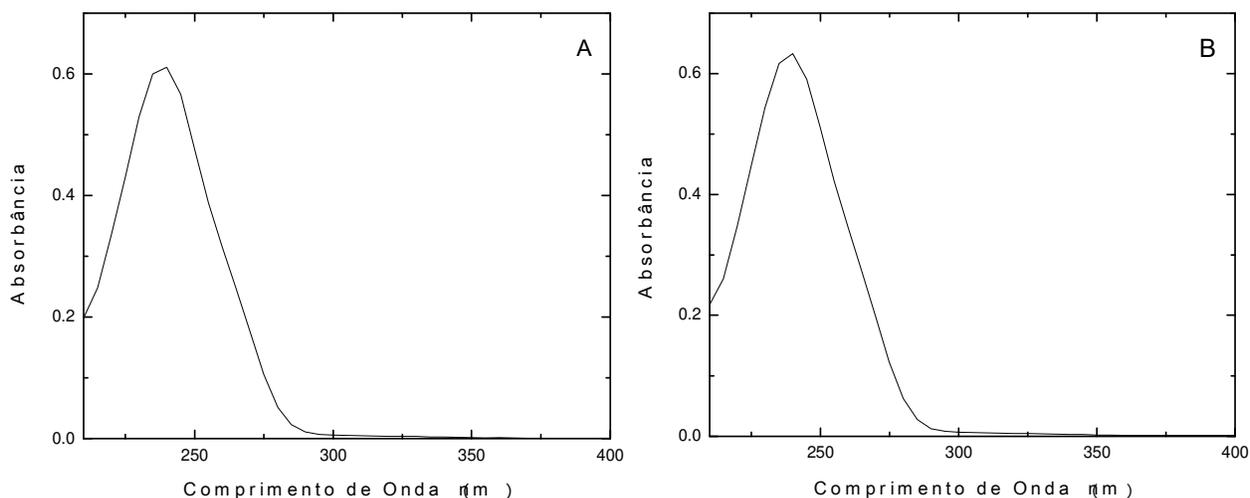


Figura 20. Espectros UV-Vis de solução de valerato de betametasona em metanol $4,16 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (a); de solução de dexametasona em metanol $4,37 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (b).

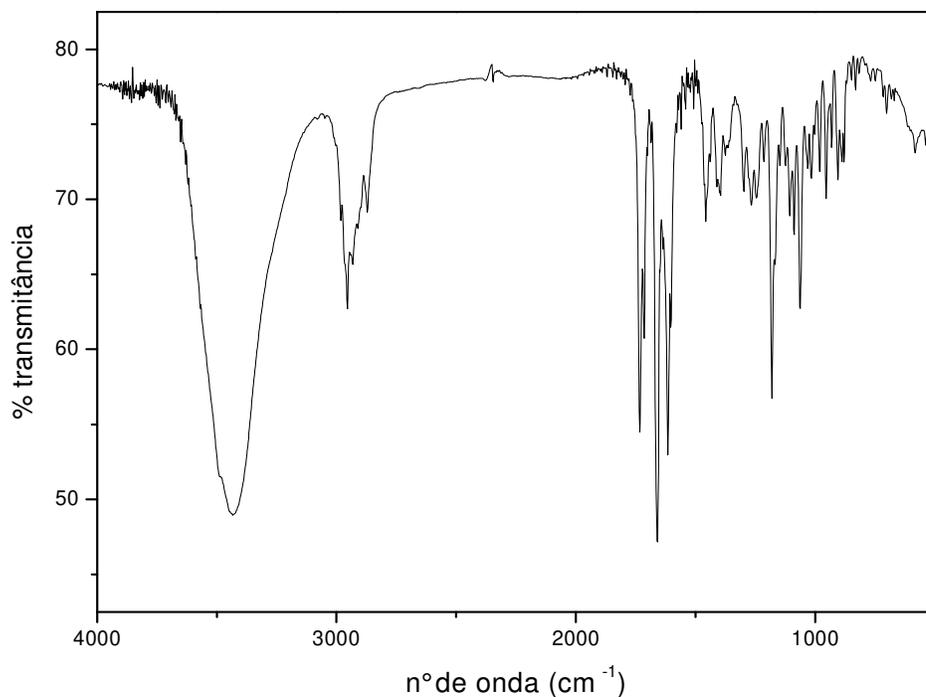


Figura 21. Espectro IV de valerato de betametasona em pastilha de KBr.

Tabela 23. Atribuições das bandas vibracionais do espectro IV de BTM em pastilhas de KBr

Banda (cm⁻¹)	Intensidade	Característica de
3433	forte	estiramento O-H
2981, 2954	fraca	estiramento C-H ($\Delta^{1,4}$ dieno)
1733, 1715	média	estiramento C=O (C20 e C22)
1659	forte	estiramento C=O (C3)
1616, 1602	forte	estiramento C=C ($\Delta^{1,4}$ dieno)
1180	média	estiramento C-O (C17)
entre 1130 e 1040	fraca	estiramento C-O (grupos hidroxil)

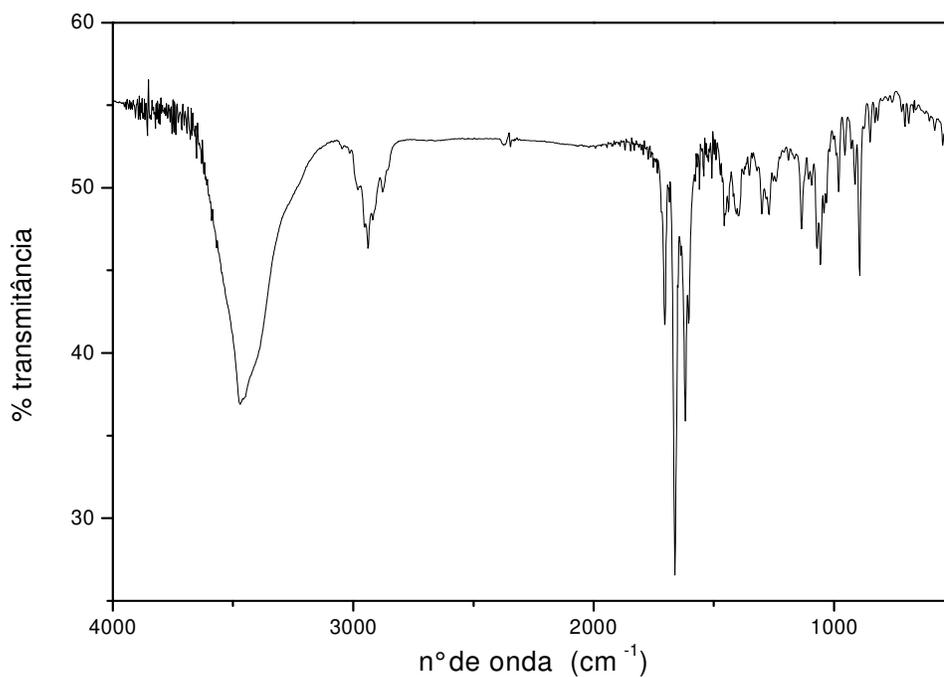


Figura 22. Espectro IV de dexametasona em pastilha de KBr.

Tabela 24. Atribuições das bandas vibracionais do espectro IV de DXM em pastilhas de KBr

Banda (cm ⁻¹)	Intensidade	Característica de
3470	Forte	estiramento O-H
2953, 2938	Fraca	estiramento C-H ($\Delta^{1,4}$ dieno)
1704	Média	estiramento C=O (C20)
1662	Forte	estiramento C=O (C3)
1618, 1604	Forte	estiramento C=C ($\Delta^{1,4}$ dieno)
entre 1130 e 1040	Fraca	estiramento C-O (grupos hidroxil)

1.2. Análises Térmicas

1.2.1. Análise termogravimétrica

As curvas termogravimétricas estão na Figura 23. Percebe-se que o fármaco BTM sofre perda de massa somente em $\approx 196^{\circ}\text{C}$ e o fármaco DXM em $\approx 250^{\circ}\text{C}$ diante disto é possível afirmar que a temperatura de trabalho (em torno de 75°C) não causa degradação dos fármacos.

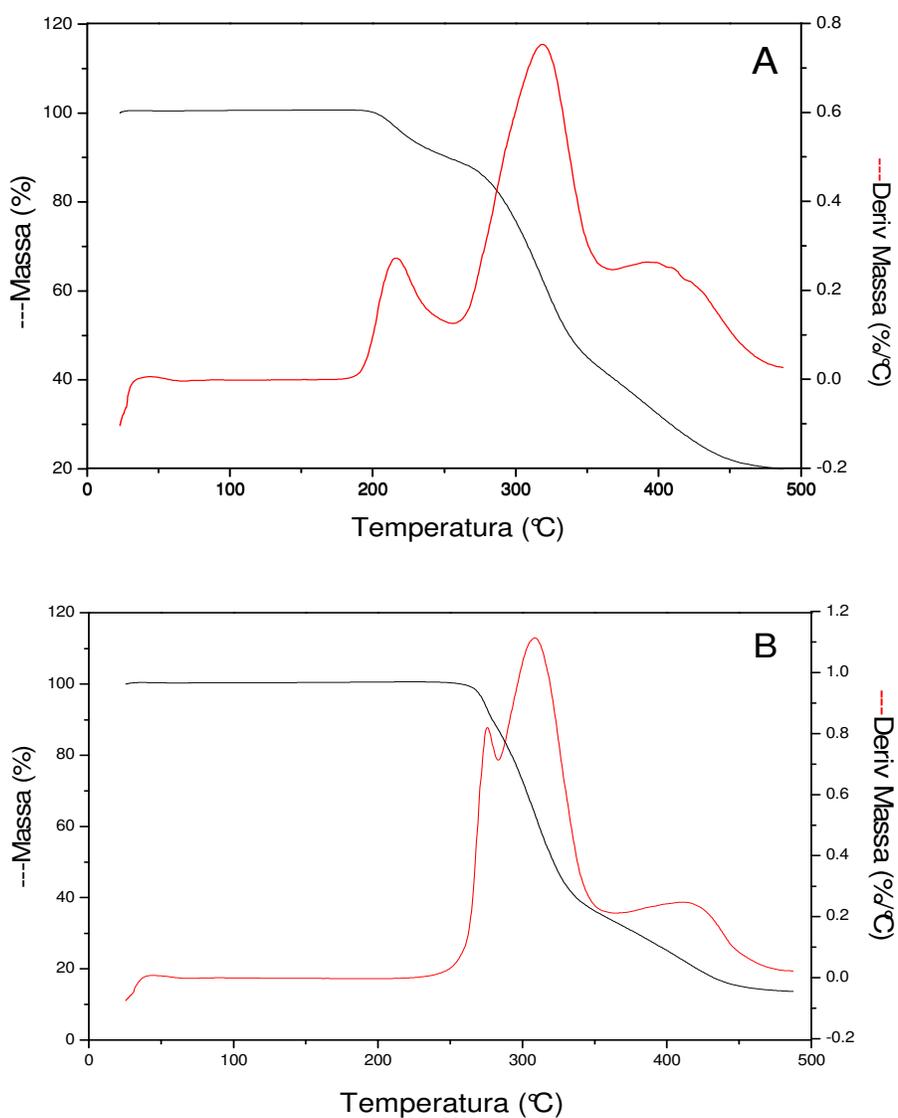


Figura 23. - Curvas termogravimétricas para valerato de betametasona(A) e dexametasona (B).

1.2.2. Calorimetria diferencial de varredura

As curvas DSC para os fármacos BTM e DXM são apresentadas na Figura 24. O perfil de ambas as curvas mostra que os fármacos são cristalinos e apresentam transições em temperaturas bem definidas. O fármaco BTM sofre transição endotérmica com início em 195,22°C, pico em 197,19°C e entalpia de transição 71,07 J/g. Já o fármaco DXM apresenta um evento endotérmico com início em 258,56°C, pico em 253,59°C e entalpia de transição 152,10 J/g.

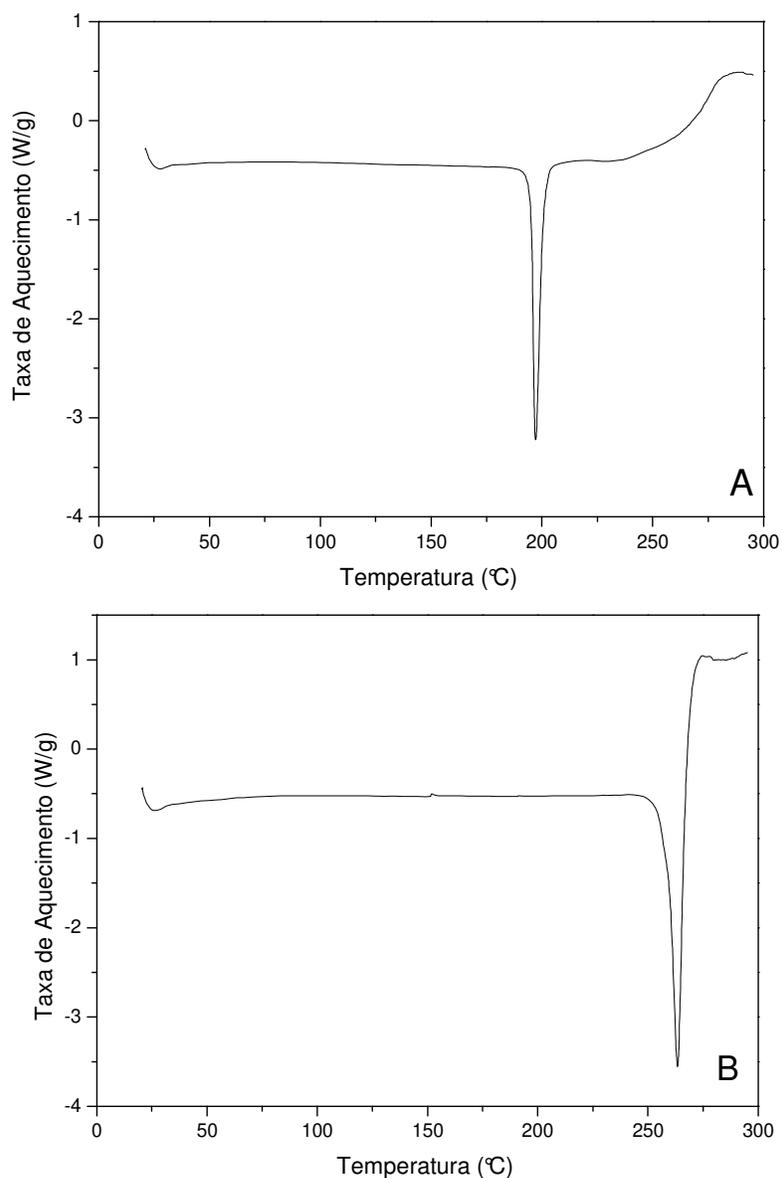


Figura 24. - Curvas DSC para valerato de betametasona (A) e dexametasona (B).

2. Nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados

2.1. Desenvolvimento das formulações e do método de preparação das nanopartículas de Valerato de Betametasona e Dexametasona

2.1.1. Planejamentos experimentais preliminares para a preparação de NP utilizando elemento dispersor metálico (S75N-25F) para Ultra-Turrax®T25

Na Tabela 25 estão os resultados para o primeiro planejamento experimental elaborado para BTM.

Tabela 25. Resultados do planejamento fatorial 2^3 para NP de BTM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F)

Amostra	Poloxamer 188 (x_1)	Fosfatidilcolina de soja (x_2)	Polisorbato 80 (x_3)	ξ (mV)	ϕ (nm)	PDI
1	-	-	-	-21,6	108,4	0,302
2	+	-	-	-21,0	101,5	0,417
3	-	+	-	-39,5	113,5	0,295
4	+	+	-	-35,3	109,3	0,370
5	-	-	+	-32,6	99,64	0,395
6	+	-	+	-32,4	95,88	0,386
7	-	+	+	-38,0	115,8	0,394
8	+	+	+	-30,4	110,7	0,291

A resposta avaliada neste planejamento foi o ϕ , objetivando encontrar uma direção que proporcionasse uma diminuição desse parâmetro. Foram calculados os valores dos efeitos de cada fator e da interação entre eles sobre o diâmetro. A Tabela 26 apresenta os coeficientes de contraste para o fatorial 2^3 utilizados para os cálculos.

Tabela 26. Coeficientes de contraste para o planejamento fatorial 2^3 para NP de BTM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F)

Média	1	2	3	12	13	23	123	Resposta (y)
+	-	-	-	+	+	+	-	108,4
+	+	-	-	-	-	+	+	101,5
+	-	+	-	-	+	-	+	113,5
+	+	+	-	+	-	-	-	109,3
+	-	-	+	+	-	-	+	99,64
+	+	-	+	-	+	-	-	95,88
+	-	+	+	-	-	+	-	115,8
+	+	+	+	+	+	+	+	110,7

Analisando o efeito do fator 1, quantidade de Poloxamer adicionada ao sistema, percebe-se que um aumento do nível deste fator acarretou diminuição do diâmetro médio de partícula. Da mesma forma, com aumento de nível do fator 3, quantidade de Polisorbato 80 adicionada ao sistema, também ocorreu diminuição do diâmetro médio. Já o fator 2, quantidade de fosfatidilcolina de soja, causou aumento desta resposta quando seu nível aumentou.

Conforme mencionado anteriormente, este planejamento foi realizado para avaliar a necessidade de utilizar Poloxamer 188 na preparação das NP. Diante da

análise do planejamento fatorial 2³ optou-se por fixar a quantidade de Poloxamer 188 em 0,10%.

O trabalho seguiu com um planejamento fatorial 2² com ponto central (Tabela 5). A seguir são apresentados os resultados obtidos para este planejamento experimental (Tabela 27).

Tabela 27. Resultados do planejamento 2² com ponto central para NP de BTM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F)

Amostra	Polisorbato 80 (x₁)	Fosfatidilcolina de soja (x₂)	ξ (mV)	φ (nm)	PDI (nm)
9	-	-	-33,7	106,7	0,413
10	+	-	-32,8	102,6	0,451
11	-	+	-36,1	107,3	0,294
12	+	+	-33,0	99,93	0,292
13	0	0	-33,0	101,3	0,417
14	0	0	-25,6	91,07	0,389
15	0	0	-21,1	97,64	0,417

Com estes resultados a modelagem inicial foi realizada e a equação para o modelo linear ajustado obtida foi:

$$\hat{y} = 100,93 - 2,87x_1 - 0,52x_2 \quad (13)$$

Em seguida determinou-se o caminho de máxima inclinação a partir do ponto central realizando deslocamentos com o fator x₁ e calculando os deslocamentos correspondentes para o fator x₂, na Tabela 28 estão os resultados obtidos para estes deslocamentos.

Tabela 28. Resultados dos deslocamentos ao longo do caminho de máxima inclinação para o planejamento fatorial 2^2 com ponto central para NP de BTM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F)

Amostra	Ensaio	ξ (mV)	φ (nm)	PDI (nm)
16	Centro	-24,6	97,87	0,290
17	Centro + Δ	-27,7	94,48	0,288
18	Centro + 2 Δ	-31,7	89,59	0,289
19	Centro + 3 Δ	-330	88,37	0,293
20	Centro + 4 Δ	-28,5	82,22	0,299

A formulação que deu origem à **amostra 19** foi eleita para continuar o projeto, pois esta amostra apresentou o melhor conjunto de valores para os parâmetros analisados (ξ , φ , PDI).

Para DXM o primeiro planejamento experimental proposto foi 2^2 com ponto central, os resultados obtidos com este planejamento estão expostos na Tabela 29.

Tabela 29. Resultado do planejamento fatorial 2^2 com ponto central para NP de DXM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F)

Amostra	Polisorbato 80 (x_1)	Fosfatidilcolina de soja (x_2)	ξ (mV)	φ (nm)	PDI
21	-	-	-29,8	97,27	0,406
22	+	-	-29,8	104,8	0,408
23	-	+	-34,2	109,8	0,294
24	+	+	-32,5	99,09	0,277
25	0	0	-25,4	102,4	0,287

A resposta analisada foi o φ , a equação do modelo linear ajustado foi obtida e, a partir dela, foram calculados os novos pontos do planejamento através do caminho de máxima inclinação (Tabela 30).

$$\hat{y} = 102,67 - 0,80x_1 + 1,70x_2 \quad (14)$$

Tabela 30. Resultados dos deslocamentos ao longo do caminho de máxima inclinação para o planejamento fatorial 2^2 com ponto central para NP de DXM preparadas utilizando-se somente o elemento dispersor metálico (S75N-25F)

Amostra	Ensaio	ξ (mV)	φ (nm)	PDI (nm)
26	Centro	-25,4	102,6	0,272
27	centro + Δ	-25,5	91,86	0,356
28	centro + 2Δ	-21,1	80,99	0,362
29	centro + 3Δ	-15,1	74,93	0,357

A **amostra 26** foi eleita para dar continuidade ao projeto, pois mesmo o valor de φ de suas partículas sendo pouco maior que o das outras amostras, os valores de PDI e de ξ são melhores.

2.1.2. Testes de preparação utilizando elemento dispersor de policarbonato (PC/PEEK – S25D – 10G – KS) para Ultra-Turrax® T25

Na Tabela 31 são apresentados os resultados obtidos com o primeiro teste utilizando o elemento dispersor de policarbonato, bem como uma comparação entre as amostras preparadas com cada tipo de elemento dispersor.

Tabela 31. Comparação entre os valores de ϕ , PDI e ξ de NP de BTM e DXM preparadas com diferentes elementos dispersores para Ultra-Turrax®T25

NP	ELEMENTO DISPERSOR METÁLICO			ELEMENTO DISPERSOR DE POLICARBONATO		
	ξ (mV)	ϕ (nm)	PDI (nm)	ξ (mV)	ϕ (nm)	PDI (nm)
BTM	-31,7	89,59	0,289	-29,9	525,7	0,468
DXM	-25,4	102,6	0,272	-30,6	402,7	0,420

Diante dos resultados obtidos foi necessário abandonar as formulações que haviam sido eleitas para dar continuidade ao trabalho, pois os valores de ϕ , PDI e ξ aumentaram muito para ambas as formulações: de 89,59 nm para 525,7 nm para NP de BTM e de 102,6 nm para 402,7 nm para NP de DXM.

Esse aumento tão pronunciado ocorreu devido à grande diferença entre as taxas de cisalhamento de cada tipo de elemento dispersor, sendo que o elemento dispersor metálico produz uma taxa de cisalhamento muito superior à produzida pelo elemento dispersor de polycarbonato, gerando partículas menores e mais homogêneas.

Como foi necessário trocar o tipo de elemento dispersor a saída encontrada foi realizar novo planejamento experimental para cada fármaco, desta vez variando a velocidade e o tempo de agitação para verificar a necessidade de alteração das proporções dos componentes das formulações. Os níveis deste novo planejamento foram apresentados na Tabela 10.

Na Tabela 32 estão os resultados obtidos com as formulações de NP de cada fármaco para este novo planejamento experimental 2² com ponto central.

Tabela 32. Resultados do planejamento fatorial 2² com ponto central para NP de BTM e DXM preparadas somente com elemento dispersor de policarbonato (S25D-10G)

NP	Amostra	Velocidade de Agitação – x ₁ (rpm)	Tempo de agitação – x ₂ (min)	ξ (mV)	φ (nm)	PDI (nm)
BTM	30	-	-	-26,0	519,1	0,533
	31	+	-	-32,6	881,8	0,745
	32	-	+	-25,8	516,2	0,463
	33	+	+	-28,1	141,3	0,567
	34	0	0	-29,9	525,7	0,468
DXM	35	-	-	-20,1	502,2	0,512
	36	+	-	-28,4	173,6	0,602
	37	-	+	-26,6	148,7	0,417
	38	+	+	-32,9	225,9	0,497
	39	0	0	-30,6	402,7	0,420

Conforme realizado anteriormente a resposta analisada foi o diâmetro médio de partícula e a modelagem inicial foi feita supondo que os dados experimentais obtidos fossem ajustáveis a um modelo linear. As equações obtidas foram:

$$\text{NP – BTM: } \hat{y} = 516,8 - 3,05 x_1 - 185,8 x_2 \quad (15)$$

$$\text{NP – DXM: } \hat{y} = 290,6 - 62,8 x_1 - 75,3 x_2 \quad (16)$$

Como não foram realizadas replicatas no ponto central não é possível afirmar se os dados experimentais são, de fato, ajustáveis a um modelo linear. Mas pode-se comparar o valor obtido para a média dos efeitos com o valor experimental obtido com o ensaio realizado no ponto central. Percebe-se que para

as NP de BTM estes valores são próximos, 516,8 nm para o $\Phi_{\text{teórico}}$ e 525,7 nm para o $\Phi_{\text{experimental}}$. Já para as NP de DXM esta comparação não é válida pois os valores são muito discrepantes, 290,6 nm para o $\Phi_{\text{teórico}}$ e 402,7 nm para o $\Phi_{\text{experimental}}$. Pensando primeiro nas NP de BTM percebe-se que o fator x_2 , tempo de agitação, exerce influência muito mais pronunciada sobre a resposta analisada, o que pode ser confirmado quando as amostras 31 e 33, que diferem somente pelo tempo de agitação empregado, são comparadas. Desta forma, uma solução seria realizar novos deslocamentos com o fator x_2 ao longo do caminho de máxima inclinação até que fosse obtida uma amostra com valores de Φ aceitáveis. Já para as NP de DXM não se pode realizar nenhuma suposição pois seria necessário realizar mais experimentos para saber a qual tipo de modelo matemático os dados são ajustáveis.

Também é preciso levar em consideração que os valores de PDI apresentados pelas amostras são extremamente elevados, desta forma levantou-se um questionamento quanto à utilidade de prosseguir com a otimização deste planejamento experimental sendo que o sistema, provavelmente, continuaria a apresentar valores inadequados de PDI, uma vez que o grande problema deste novo método de preparação é a taxa de cisalhamento produzida pelo elemento dispersor de policarbonato ser baixa em relação à produzida pelo elemento dispersor metálico.

Diante de todos estes questionamentos optou-se por reajustar o método de preparação de forma a utilizar o elemento dispersor metálico pelo menor tempo possível, garantindo a não contaminação do sistema, complementando o tempo de agitação com a utilização do elemento dispersor de policarbonato.

2.1.3. Testes de preparação utilizando os dois elementos dispersores para Ultra-Turrax® T25

Os resultados obtidos com o planejamento fatorial 2^2 com ponto central para preparação de NP de DXM, apresentado na Tabela 13, são apresentados na Tabela 33.

Tabela 33. Resultados do planejamento fatorial 2² com ponto central para NP de DXM preparadas utilizando-se o esquema de agitação 1

Amostra	(x₁)	(x₂)	φ (nm)	PDI (nm)	ξ (mV)
40	-	-	671,9	0,567	-44,6
41	+	-	157,4	0,429	-29,4
42	-	+	755,9	0,625	-47,7
43	+	+	432,4	0,453	-40,1
44	0	0	184,3	0,461	-36,0

A equação para o modelo linear ajustado obida a partir dos dados experimentais acima foi:

$$\hat{y} = 440,4 - 209,5x_1 + 89,8x_2 \quad (17)$$

A partir da equação 17 o caminho de máxima inclinação a partir do ponto central foi determinado realizando deslocamentos com o fator x₁ e calculando os níveis correspondentes a esse deslocamento sobre o fator x₂, desta forma foram obtidos os novos níveis apresentados na Tabela 14. Na Tabela 34 são apresentados os resultados obtidos com os deslocamentos realizados.

Tabela 34. Resultados do deslocamento através do caminho de máxima inclinação para o planejamento fatorial 2^2 com ponto central para NP de DXM preparadas utilizando-se o esquema de agitação 1

Amostra	φ (nm)	PDI (nm)	ξ (mV)
45	488,4	0,503	-35,4
46	510,7	0,526	-32,1
47	144,6	0,417	-27,9
48	157,6	0,423	-27,0
49	165,3	0,455	-25,8
50	598,5	0,622	-24,1
51	121,9	0,429	-23,0

Analisando-se os resultados acima percebe-se que a **amostra 51** apresentou o menor valor de φ , mas como seus valores de PDI e ξ são maiores que aqueles apresentados pela **amostra 47**, esta última foi escolhida para a realização do teste com o esquema de agitação 2 (Tabela 15). A Tabela 35 apresenta os resultados do teste para comparação entre os esquemas de agitação, descrito na Tabela 16.

Tabela 35. Resultados do teste para comparação entre os esquemas de agitação utilizados para a preparação das NP

Amostra	Esquema de agitação utilizado	φ (nm)	PDI (nm)	ξ (mV)
52	1	126,2	0,403	-23,7
53	2	116,0	0,390	-23,6
54	1	142,4	0,386	-27,0
55	2	128,3	0,372	-23,0

Comparando-se as amostras 52 e 53 (DXM) e 54 e 55 (BTM) percebe-se que a alteração do esquema de agitação causou diminuição nos valores de ϕ e PDI. As amostras preparadas segundo o esquema de agitação 2 apresentaram diminuição de aproximadamente 10 nm nos valores de diâmetro médio e diminuição de aproximadamente 0,013 nm nos valores de PDI. Já os valores de ξ para as amostras contendo DXM permaneceram aproximadamente iguais e houve um pequeno aumento (4 mV) nesses valores para as mostras com BTM.

A partir destes resultados o esquema de **agitação 2** foi adotado para a continuação do trabalho, mesmo com o aumento do ξ para as amostras com BTM, pois a estabilidade das NP pode ser alcançada através de efeitos estéricos, além dos de repulsão eletrostática. Afinal, a superfície da NP esta revestida por uma camada composta pelas moléculas de tensoativo. Quando duas partículas se aproximam a interação entre as cadeias de tensoativo adsorvidas causa repulsão, que pode ser suficiente para estabilizar o sistema (Hunter, 1993).

Com as proporções de tensoativos e fármaco na formulação definidas e o esquema de agitação escolhido realizou-se um teste para avaliar a influência da adição de mais um componente (ácido oleico) à fase lipídica sobre ϕ , o PDI, e o ξ das NP (Tabela 18). A Tabela 36 apresenta os resultados obtidos através deste teste.

Tabela 36. Avaliação da influência da adição de ácido oleico às formulações de NP de BTM e DXM preparadas utilizando-se esquema de agitação 2

Amostra	Ácido Oleico (%)	ϕ (nm)	PDI (nm)	ξ (mV)	
BTM	55		128,3	0,372	-23,0
	56	10	114,2	0,430	-16,7
	57	20	114,8	0,386	-16,2
	58	30	132,9	0,454	-28,9
DXM	52		116,0	0,390	-23,6
	59	10	115,8	0,431	-27,2
	60	20	123,7	0,420	-19,7
	61	30	113,9	0,398	-35,1

Percebe-se que o aumento da quantidade de ácido oleico nas formulações com BTM causou um aumento significativo nos valores de PDI e a amostra 58 teve aumento significativo em seu valor de diâmetro médio. Já para as formulações com DXM o aumento da quantidade de ácido oleico diminuiu os valores de PDI.

O primeiro critério estabelecido para a escolha das formulações que seriam utilizadas para dar continuidade ao trabalho foi a exclusão daquelas que apresentaram valores de PDI iguais ou superiores a 0,400. Sendo assim as amostras 56, 58, 59 e 60 foram excluídas.

Para as NP contendo BTM a formulação escolhida para dar continuidade ao trabalho foi aquela que gerou a **amostra 57**, pois quando comparada à amostra 55, que não contém ácido oleico em sua formulação, o valor φ é 13,5nm inferior. Já para as NP contendo DXM, a formulação escolhida para dar continuidade ao trabalho foi a que gerou a **amostra 52**, que apresentou valor de PDI inferior ao da amostra 61. É preciso ressaltar também que a estabilidade das amostras 57 e 52 foi fundamental para que as formulações fossem fixadas, uma vez que as demais amostras coalesceram rapidamente e somente estas amostras permaneceram estáveis durante 10 dias.

2.1.4. Testes de preparação utilizando sonicador de ponteira

Como os valores de φ e de PDI apresentados pelas NP preparadas estavam bastante elevados, estudou-se a influencia que a sonicação das amostras exerceria sobre os valores de PDI das NP, a Tabela 37 apresenta os resultados deste teste com ultrassom de ponteira exposto na Tabela 20.

Tabela 37. Resultados do teste preliminar para avaliar a eficiência do processo de sonicação na diminuição dos valores de ϕ e PDI das NP de BTM e DXM

Amostra	ϕ (nm)	PDI (nm)	ξ (mV)
B₀	122,6	0,439	-18,3
B₅	96,95	0,437	-18,9
B₁₀	82,97	0,425	-31,9
B₁₅	79,27	0,395	-3,57
B₂₀	85,15	0,432	-30,2
D₀	108,5	0,289	-11,8
D₅	89,32	0,358	-17,7
D₁₀	99,34	0,431	-19,3
D₁₅	77,38	0,280	-11,1
D₂₀	73,6	0,285	-18,6

Através deste teste verificou-se que a sonicação das amostras seria uma método eficiente para diminuir os valores de ϕ das NP, mas não foi eficiente para diminuir significativamente os valores de PDI das suspensões.

Foram preparadas replicatas das amostras B₂₀ e D₂₀ utilizando-se um volume de amostra maior para que a ponteira do ultrassom ficasse imersa em um volume maior de suspensão. Percebeu-se que os valores de ϕ e PDI das NP diminuíram ainda mais, na Figura 25 são apresentadas as curvas de distribuição de tamanhos para estas NP.

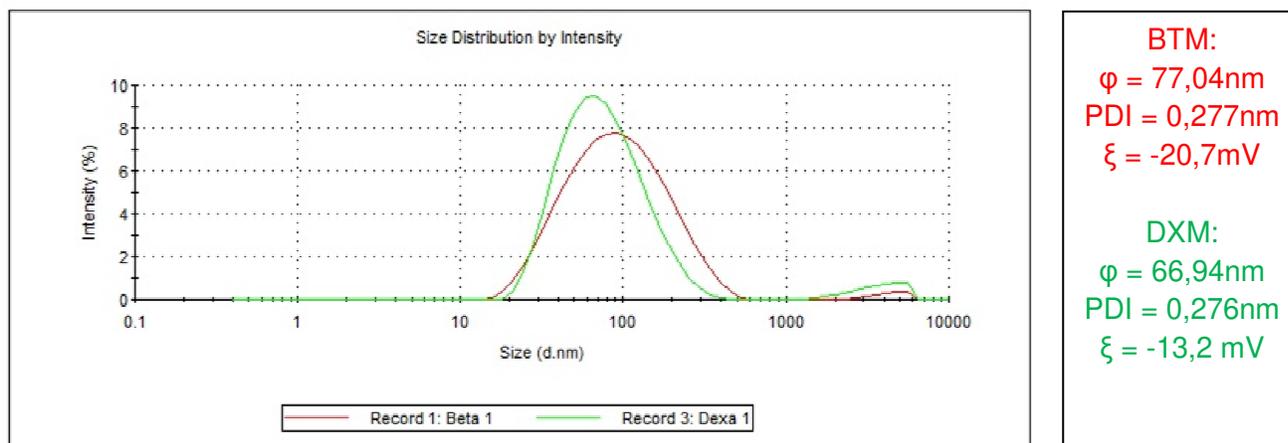


Figura 25. Curvas de distribuição de tamanhos para as NP de BTM (vermelho) e DXM (verde).

As amostras submetidas à sonicação apresentaram valores de ϕ bastante interessantes, mesmo que os valores de PDI ainda sejam elevados (acima de 0,270). Nas curvas acima nota-se a presença de regiões de diâmetro bastante elevado (em torno de 3000nm), mas estas regiões representam cerca de 5% da distribuição total de tamanhos. Além disso, se as suspensões forem filtradas estas partículas maiores serão removidas facilmente, por isso estas formulações foram consideradas as formulações finais deste trabalho.

2.2. Caracterização das formulações de nanopartículas de valerato de betametasona e dexametasona

2.2.1. Determinação da eficiência de encapsulação e do percentual de carregamento

As primeiras amostras analisadas para determinação da eficiência de encapsulação foram preparadas utilizando-se os dois tipos de membrana (1,2 μ m

e 5 µm) a fim de avaliar qual seria o tamanho de poro ideal para esta análise, todas as amostras foram injetadas em triplicata e os resultados são apresentados na Tabela 38.

Tabela 38. Comparação entre os valores obtidos para eficiência de encapsulação das amostras de NP de BTM e DXM utilizando dois tipos de membranas diferentes para preparar as amostras

Amostra		EE média com membrana 5 µm (%)	Desvio-padrão (%)	EE média com membrana 1,2 µm (%)	Desvio-padrão (%)
BTM	62	96,2	1,5	97,6	0
	63	100,6	0,3	88,1	15,2
	64	96,9	2,6	97,3	1,6
DXM	65	96,4	7,7	**	**
	66	85,7	3,7	**	**
	67	99,4	5,2	97,7	0,8

** ensaio descartado

Ocorreram grandes distorções nos picos cromatográficos das amostras 65 e 66 preparadas com as membranas de 1,2 µm, por este motivo estas amostras foram desconsideradas. O ensaio não foi repetido uma vez que todas as amostras foram preparadas em triplicata, então os resultados obtidos com a amostra 67 já seriam suficientes para avaliar qual dos dois tipos de membrana deveria ser utilizado para preparar as amostras de NP de DXM.

Analisando os resultados optou-se por utilizar a membrana de 5 µm na preparação das amostras para análise via UPLC, pois os valores de EE obtidos com esta membrana estão dentro do desvio dos valores obtidos com a membrana

de 1,2 μm . Além disso, é experimentalmente conveniente evitar trabalhar com a membrana de poro menor, pois ela é muito mais suscetível a rachaduras, que muitas vezes não são perceptíveis e isso poderia ocasionar superestimação dos valores de EE.

Definido o tipo de membrana que seria utilizado para a preparação das amostras para UPLC, novas NP foram preparadas e a EE foi determinada. Estes resultados são apresentados na Tabela 39, juntamente com os valores obtidos para o ϕ e o PDI destas nanopartículas.

Tabela 39. Eficiência de encapsulação e caracterização de tamanho de partícula das amostras de NP de BTM e DXM

Amostra		ϕ (nm)	PDI (nm)	EE média (%)	Desvio-padrão (%)
BTM	68	70,36	0,386	102,0	2,6
	69	67,66	0,353	99,9	0,4
	70	77,04	0,277	97,6	1,3
DXM	71	71,19	0,265	100,7	1,6
	72	63,41	0,253	100,1	1,7
	73	66,94	0,276	97,1	0,4

As amostras apresentaram alta EE, isto significa que a maior parte das moléculas de fármaco presentes (leia-se mais de 96%) esta interagindo com a fase lipídica, estas moléculas podem estar interagindo com a superfície das NP e podem, também, estar dispersas no interior da matriz lipídica. Para que seja possível inferir qual destes dois tipos de interação esta ocorrendo é necessário unir estes resultados com os obtidos através dos ensaios para determinação do perfil de liberação dos fármacos a partir das NP, afinal espera-se que fármacos presentes em regiões distintas das NP apresentem perfis de liberação diferentes.

A eficiência de encapsulação de NLS preparadas com monoestearato de triglicerila, carregadas com BTM foi recentemente reportada. Foram obtidos valores de 90,58% a 93,75% (Zhang & Smith, 2010). Os valores de eficiência de encapsulação obtidos neste projeto para o fármaco BTM são superiores aos reportados, corroborando com o fato de que CLN apresentam eficiência de encapsulação superior, quando comparados com NLS.

Para NLS com DXM somente foi reportada a concentração total de fármaco na suspensão, tornando inválida a comparação entre os valores aqui obtidos e os reportados (Serpe et al., 2010).

Em relação ao percentual de carregamento, faz-se necessário realizar uma breve discussão. Baseando-se nos dados apresentados pela Tabela 19, sabe-se que o percentual de carregamento teórico em relação à fase lipídica das formulações desenvolvidas é **3%**. Mas quando se leva em consideração a massa total dos tensoativos mais a massa de fase lipídica utilizada, ou seja, **2,07%**, este percentual de carregamento teórico seria **1,45%**, desta forma este último valor foi considerado como o valor teórico para as comparações com os valores experimentais obtidos. Afinal quando as suspensões foram liofilizadas para que as amostras para UPLC fossem preparadas os tensoativos presentes não foram removidos, sendo assim foi preciso considerar sua presença para evitar erros nos cálculos.

A Tabela 40 a seguir apresenta os resultados obtidos para o percentual de carregamento das formulações e sua comparação com o valor teórico.

Tabela 40. Resultados obtidos para o percentual de carregamento das formulações de NP e comparação com o valor teórico para o percentual de carregamento

Formulação	Carregamento médio (%)	Desvio-padrão (%)	Carregamento Teórico (%)
NP - BTM	1,08	0,05	1,45
NP - DXM	0,62	0,02	

Para a formulação com BTM o valor obtido experimentalmente representa, aproximadamente, 74% do valor teórico. Já o valor obtido para a formulação com DXM representa, aproximadamente, 43% do valor teórico. Diante disto percebe-se que há grande perda de massa durante o processo de preparação, sendo que para a formulação com DXM esta perda é bem mais acentuada do que para a formulação com BTM.

É preciso levar em consideração, também, que diversos fatores limitam a capacidade de carregamento das NP, por exemplo, a solubilidade do fármaco na matriz lipídica e a estrutura polimórfica desta matriz. Por isso os valores do percentual de carregamento obtidos não são necessariamente negativos, uma vez que baixa capacidade de carregamento é uma característica do sistema. Mas é preciso ressaltar que as formulações desenvolvidas apresentam alta eficiência de encapsulação, fato bastante interessante para possíveis aplicações farmacêuticas.

a) Microscopia Eletrônica de Varredura

As micrografias dos cristais de BTM e DXM são apresentadas na Figura 26:

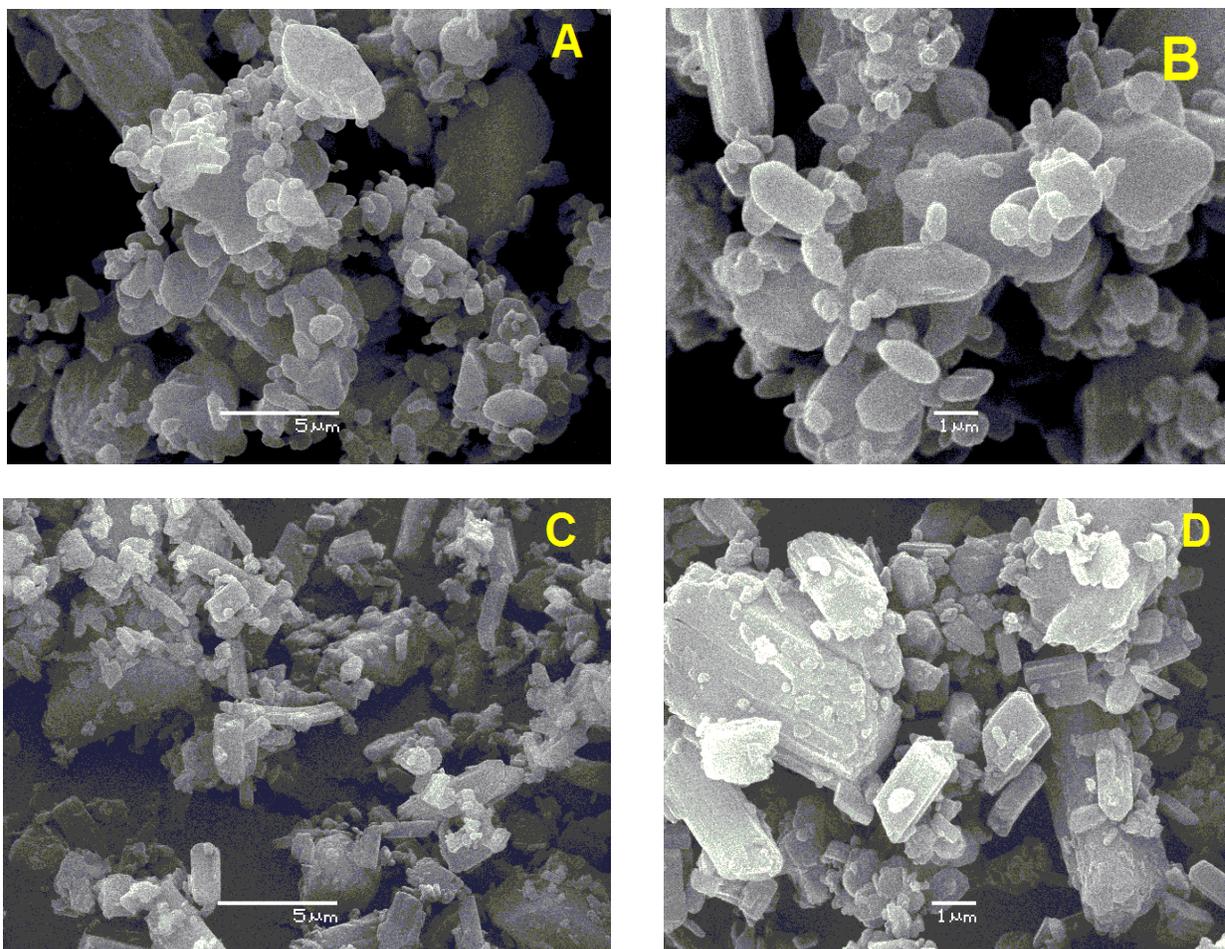


Figura 26. Micrografias dos cristais de fármaco depositados sobre fita de carbono: (A) BTM com aumento de 5000 vezes; (B) BTM com aumento de 10000 vezes; (C) DXM com aumento de 5000 vezes e (C) DXM com aumento de 10000 vezes.

Os cristais de BTM tem forma arredondada e apresentam populações de tamanhos diferentes, percebe-se a presença de um grande número de cristais de tamanho superior $5\ \mu\text{m}$, rodeados por cristais de tamanho menores. Já os cristais de DXM apresentam formas mais retangulares, da mesma forma percebe-se a presença de um grande número de cristais de tamanho superior a $5\ \mu\text{m}$, também rodeados por cristais menores.

A Figura 27 apresenta as micrografias das membranas com poros de $1.2\ \mu\text{m}$ e $5\ \mu\text{m}$ vazias:

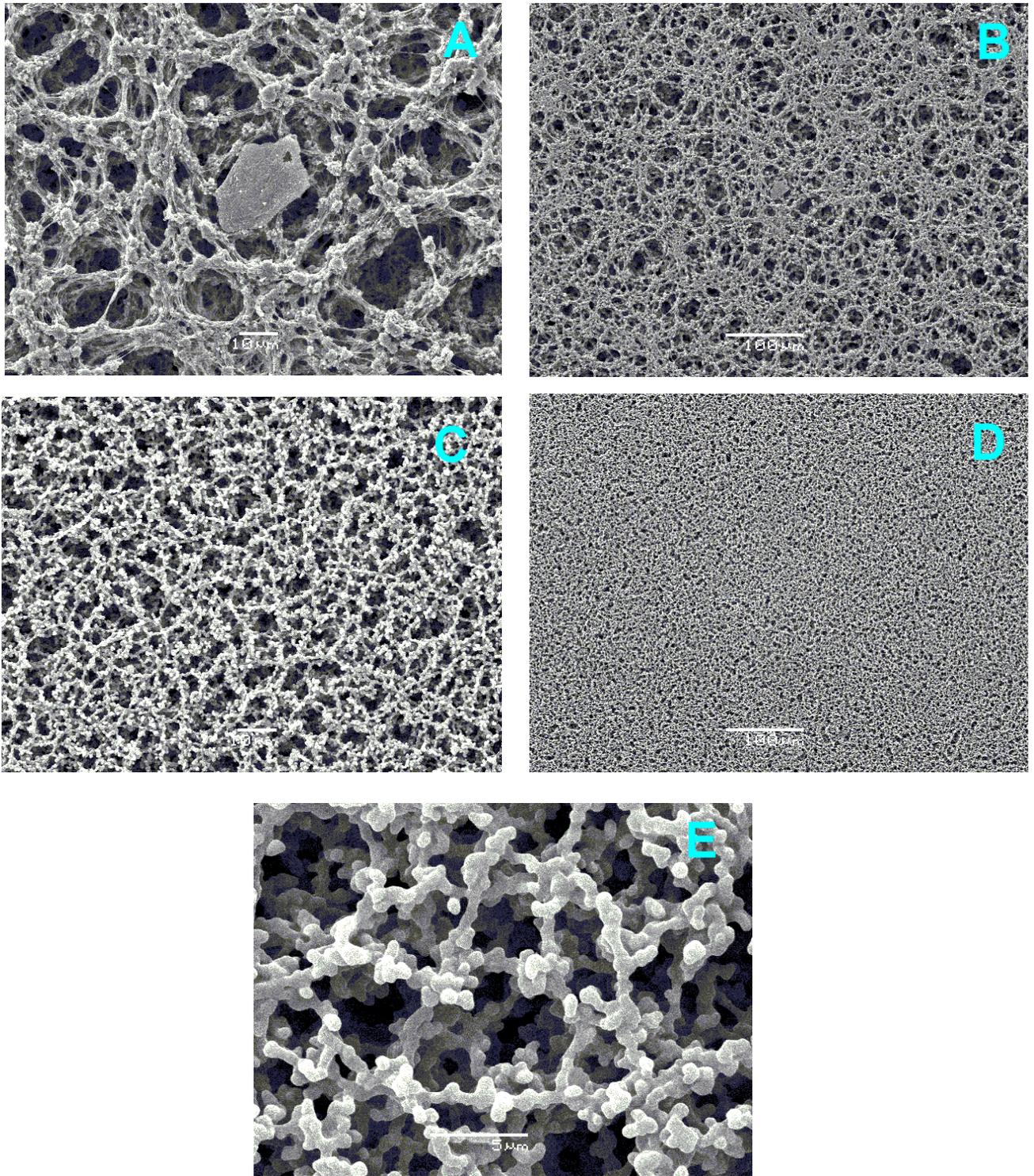


Figura 27. Micrografias de membranas, com poros de diferentes tamanhos, vazias. Membrana de 5 μm com aumento de 1000 vezes (A) e de 200 vezes (B); membrana de 1,2 μm com aumento de 1000 vezes (C); 200 vezes (D) e 5000 vezes (E).

Na imagem (A) percebe-se a presença de uma placa de material desconhecido, isto se deve a alguma contaminação da amostra ou a algum defeito de fabricação, uma vez que estas membranas não foram utilizadas em nenhum ensaio. Estas imagens foram, então, comparadas com aquelas obtidas para as membranas utilizadas para filtrar as suspensões dos fármacos livres e as amostras de NP, visando comprovar sua eficácia para a separação de possíveis cristais de fármaco que pudessem estar presentes nas amostras de NP, evitando superestimação dos valores de EE.

A Figura 28 apresenta as micrografias das membranas utilizadas para filtrar as suspensões de fármaco livre.

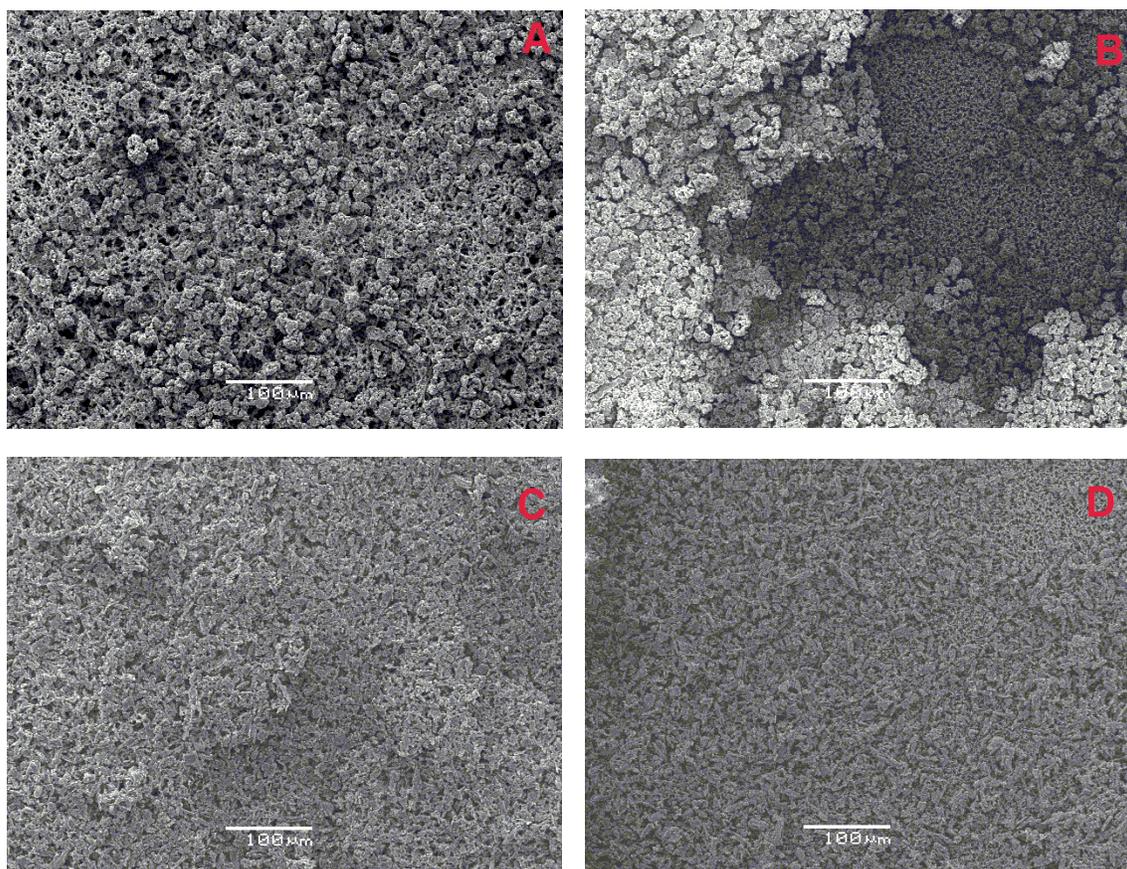


Figura 28. Micrografias das membranas utilizadas para filtrar suspensões dos fármacos com aumento de 200 vezes. Membranas de 5 µm (A) e de 1,2 µm (B) utilizadas para filtrar suspensão de BTM. Membranas de 5 µm (C) e de 1,2 µm (D) utilizadas para filtrar suspensão de DXM.

Na Figura 28 vemos um grande acúmulo de cristais de fármaco sobre os dois tipos de membrana. Na imagem B, inclusive, é possível notar a presença de camadas de fármaco retido. Diante disto é possível afirmar que os dois tipos de membranas (poros de 1,2 μm e 5 μm) são eficazes para reter cristais dos fármacos BTM e DXM.

As Figuras 29 e 30 apresentam as micrografias das membranas utilizadas para filtrar as amostras nos ensaios para a determinação da EE dos CLN de BTM e das NLS de DXM, respectivamente.

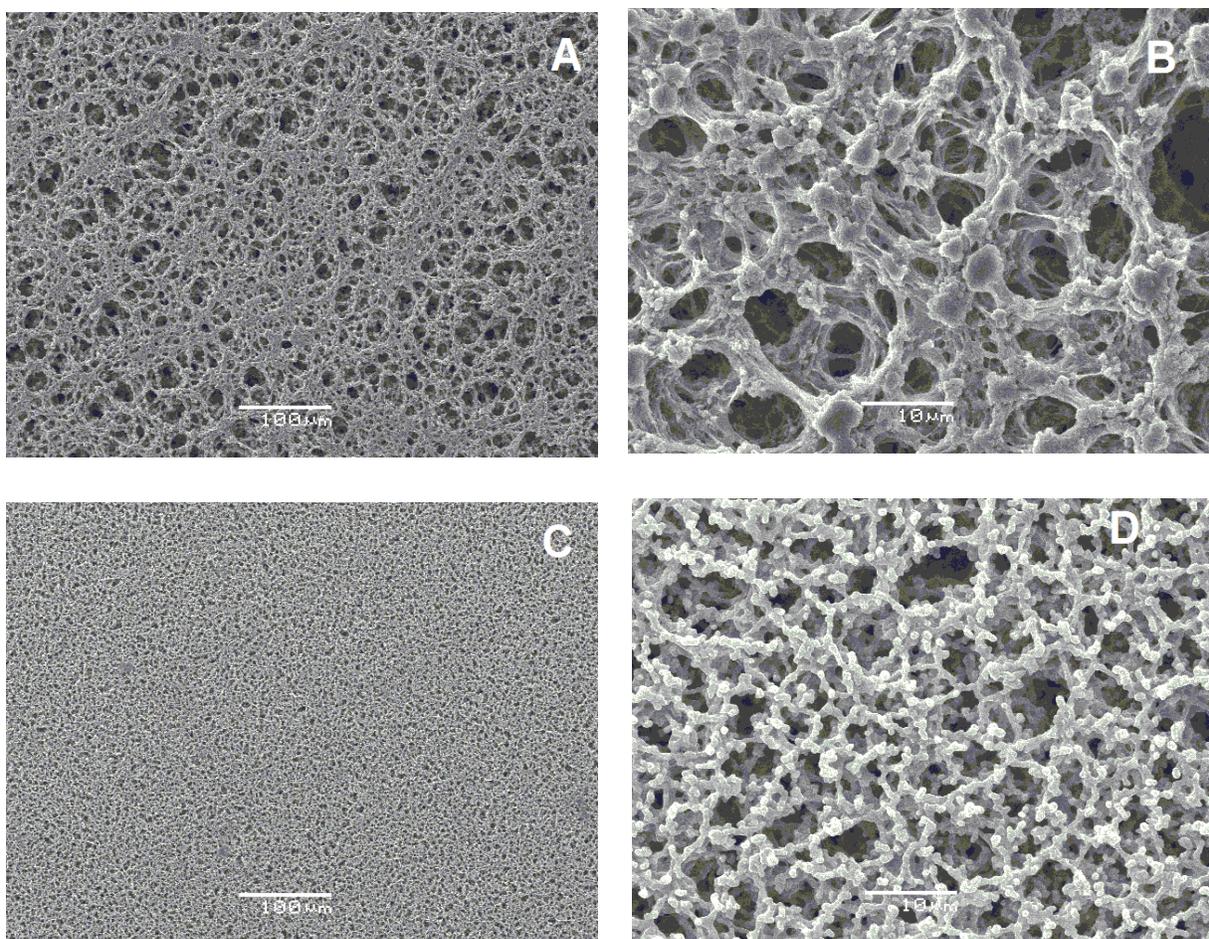


Figura 29. Micrografias das membranas utilizadas para filtrar as amostras de CLN de BTM. Membrana de 5 μm com aumento de 200 vezes (A) e 2000 vezes (B). Membrana de 1,2 μm com aumento de 200 vezes (C) e 2000 vezes (D).

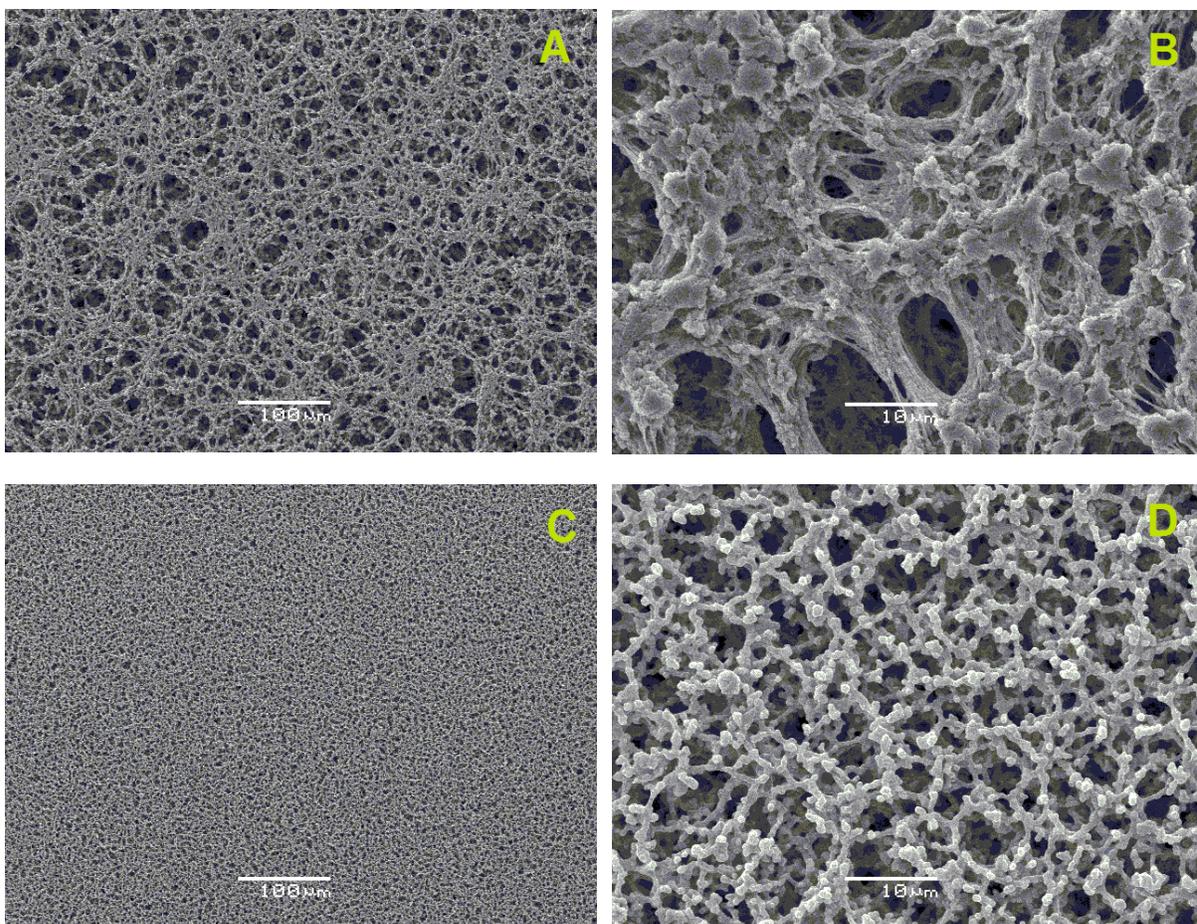


Figura 30. Micrografias das membranas utilizadas para filtrar as amostras de NLS de DXM. Membrana de 5 μm com aumento de 200 vezes (A) e 2000 vezes (B). Membrana de 1,2 μm com aumento de 200 vezes (C) e 2000 vezes (D).

Nas Figuras 29 e 30 não foi detectada a presença de nenhum cristal de fármaco que pudesse estar livre nas formulações de NLS e/ou CLN. Conforme já mencionado anteriormente, as membranas são eficazes para reter cristais de fármaco livre, assim a ausência de material retido pelas duas membranas indica que todo o fármaco presente nas formulações está encapsulado, seja no interior das NP ou no interior de micelas que podem se formar e não são retidas pelas membranas. Estes resultados confirmam àqueles obtidos nos ensaios para determinação da eficiência de encapsulação das NP através de UPLC.

2.2.2. Análises Térmicas

a) Análise termogravimétrica

A Figura 31 apresenta as curvas termogravimétricas obtidas para os tensoativos e para o estearato de glicerila.

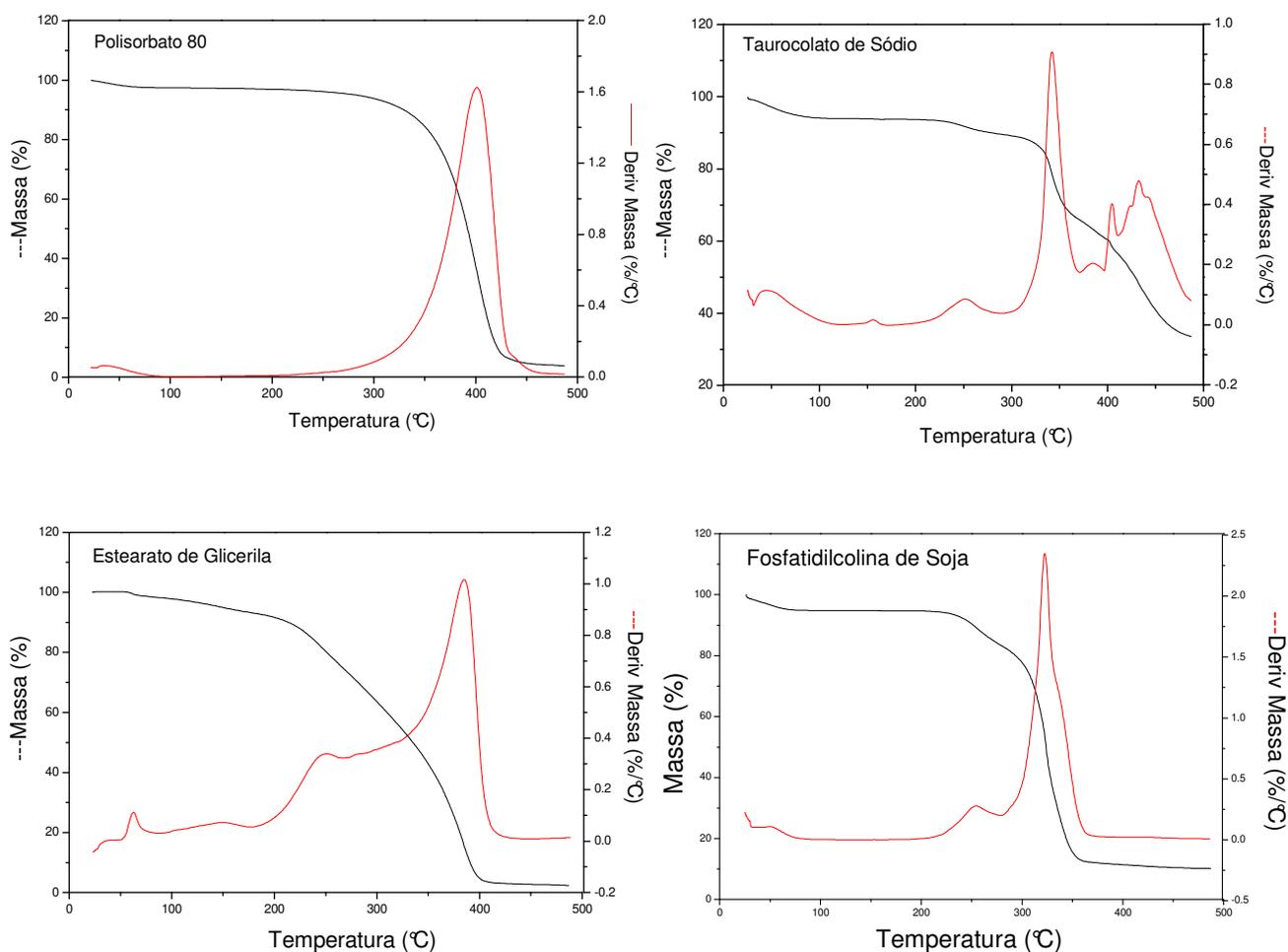


Figura 31. Curvas termogravimétricas para polisorbato 80, taurocolato de sódio, estearato de glicerila e fosfatidilcolina de soja.

O tensoativo polisorbato 80 apresenta somente um evento térmico 400°C, já o tensoativo taurocolato de sódio sofre mais eventos térmicos, sua primeira perda de massa tem início em 79°C, seguida por eventos em 250°C, 350°C e

423°C. Para o tensoativo fosfatidilcolina de soja, em 234°C começa a ocorrer perda expressiva de massa, seguida por um evento térmico em 323°C. O lipídio estearato de glicerila funde-se a 61°C e começa a perder massa em 220°C, sendo que a perda mais expressiva ocorre em 383°C. A partir destes dados pode-se afirmar que a temperatura de trabalho (~70°C) não causa degradação dos excipientes da formulação.

A Figura 32 apresenta as curvas termogravimétricas obtidas para as amostras de carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com valerato betametasona (CLN-BTM) e de nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com dexametasona (NLS-DXM) juntamente com as curvas termogravimétricas obtidas para os fármacos puros.

Para a amostra de CLN-BTM o evento térmico que ocorre em 192°C deve-se à presença de BTM na amostra, pois na curva termogravimétrica do fármaco puro ocorre um evento térmico na mesma temperatura. Já o evento em 371°C deve-se à presença dos excipientes.

Para a amostra de NLS-DXM o evento térmico que ocorre em 273°C esta na mesma região do primeiro evento térmico que ocorre para a amostra DXM, já o evento térmico que ocorre em 366°C deve-se à presença dos excipientes.

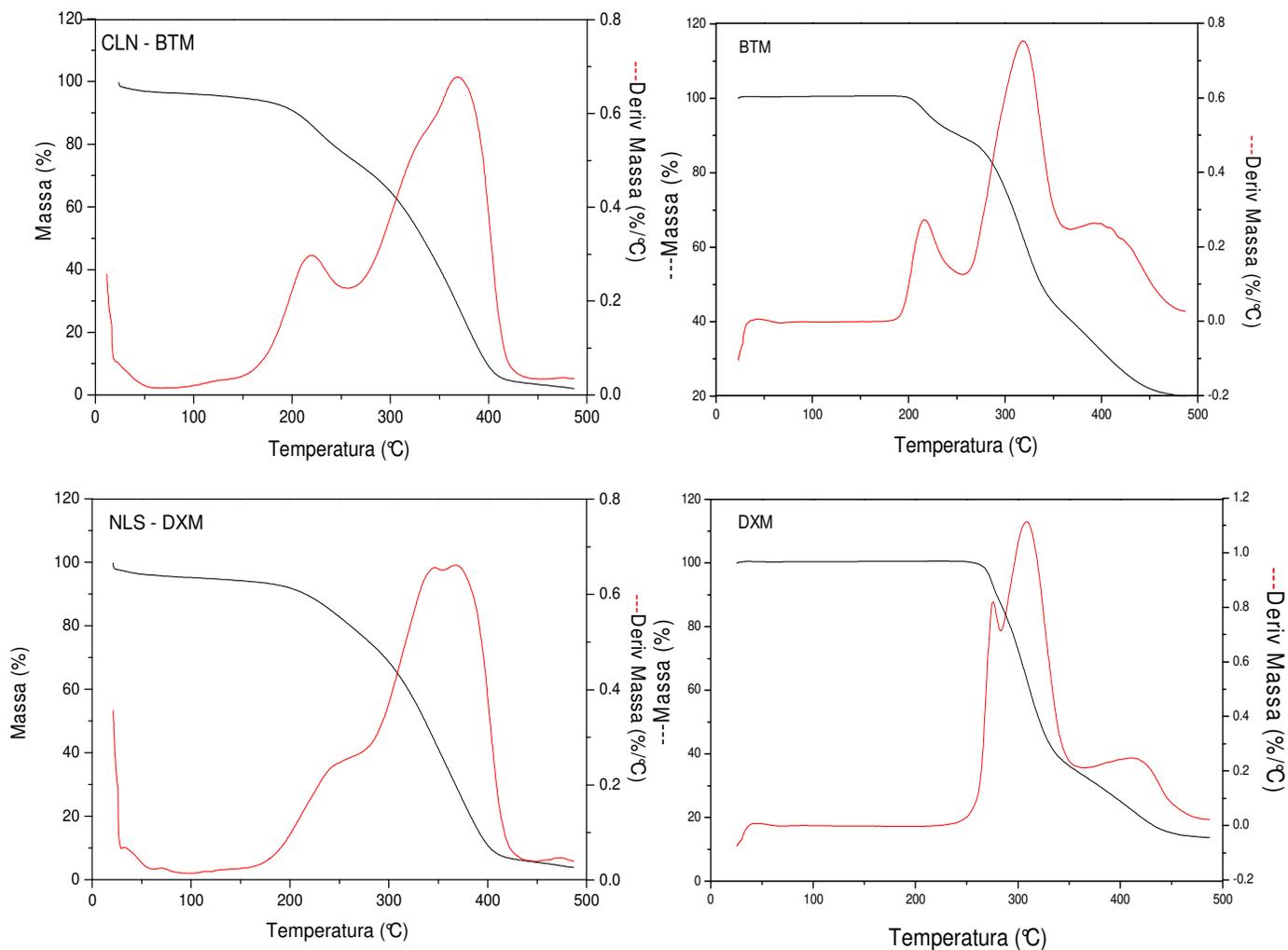


Figura 32. Curvas termogravimétricas para amostras de carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com valerato de betametasona (CLN-BTM), nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com dexametasona (NLS-DXM) e fármacos BTM e DXM.

b) Calorimetria diferencial de varredura

A Figura 33 apresenta as curvas DSC para os três tensoativos utilizados nas formulações.

Polisorbato 80 e taurocolato de sódio, conforme esperado, apresentam curvas características de substâncias amorfas, sem picos definidos. Já o

tensoativo fosfatidilcolina de soja apresenta um evento endotérmico em 77°C, com entalpia de transição de 52 J/g.

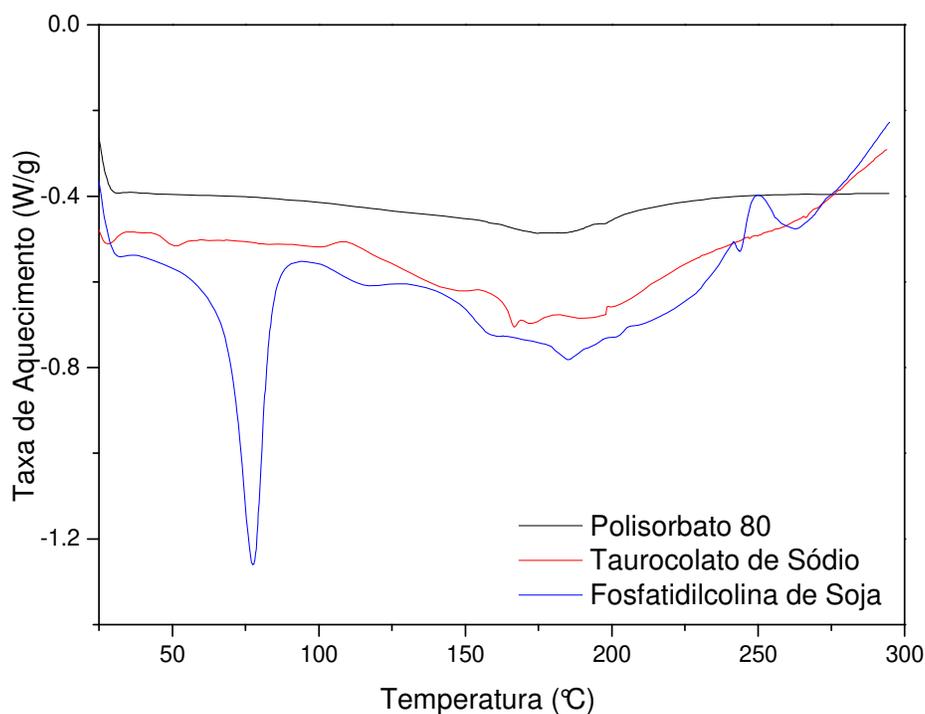


Figura 33. Curvas DSC para polisorbato 80 (em preto), taurocolato de sódio (em vermelho) e para fosfatidilcolina de soja (em azul).

As Figuras 34 e 35 apresentam, respectivamente, as curvas DSC obtidas para as amostras de carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com valerato de betametasona (CLN-BTM) e nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com dexametasona (NLS-DXM). As curvas DSC obtidas para os fármacos puros foram inseridas aqui para facilitar a comparação dos dados.

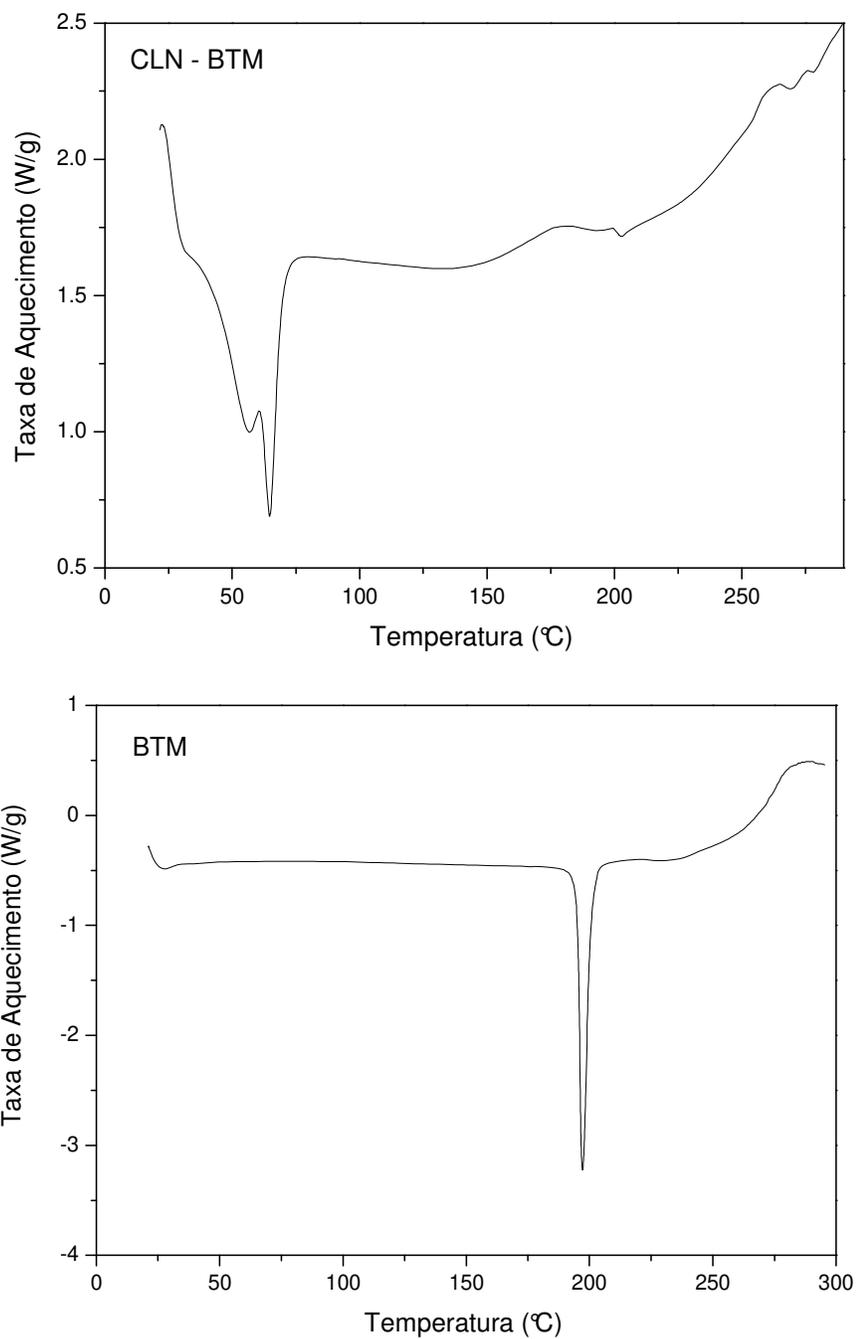


Figura 34. Curvas DSC para a amostra de carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com valerato de betametasona (CLN-BTM) e para o fármaco puro (BTM).

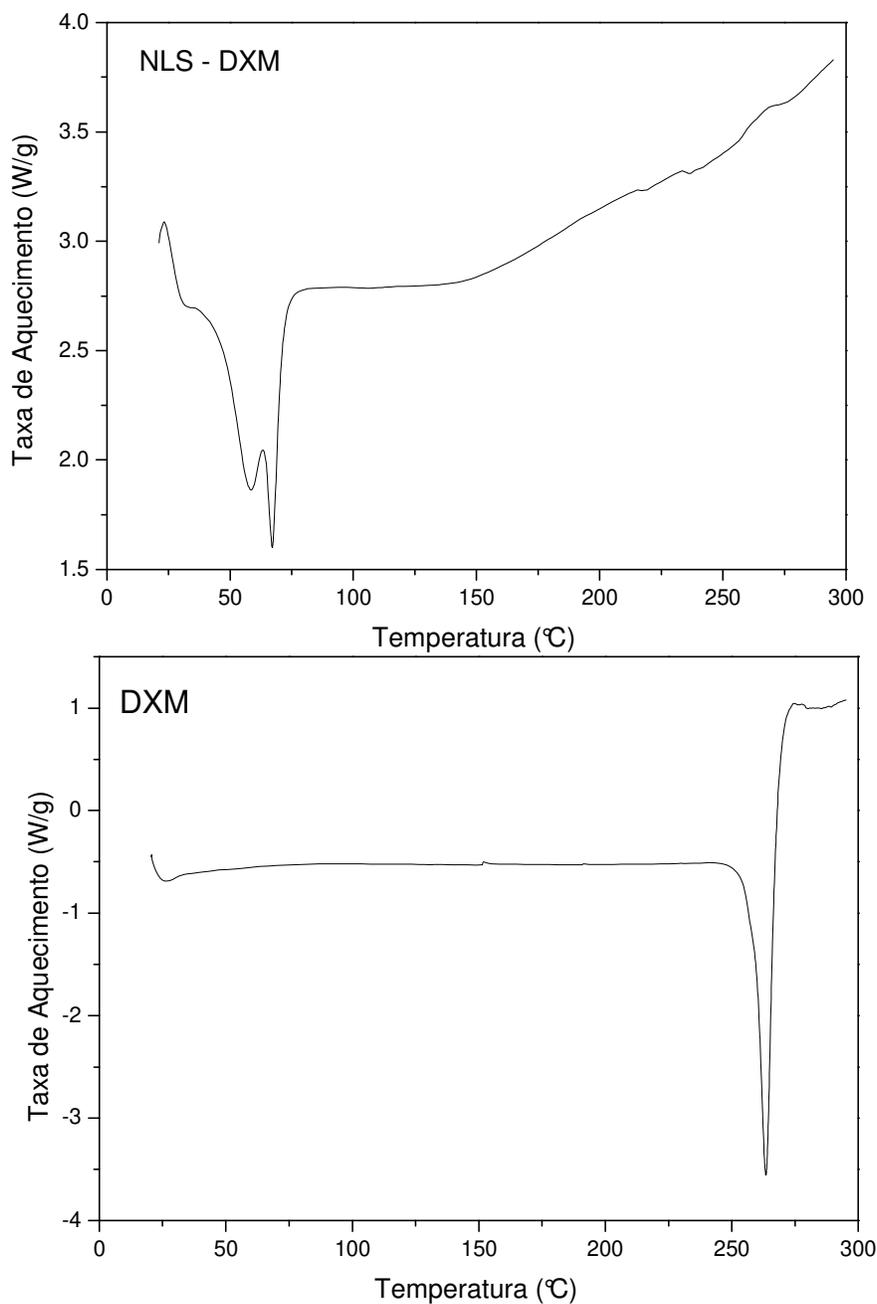


Figura 35. Curvas DSC para a amostra de nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com dexametasona (NLS-DXM) e para o fármaco puro (DXM).

Comparando as curvas apresentadas nas Figuras 34 e 35 nota-se a ausência dos picos correspondentes aos fármacos puros nas curvas referentes às amostras de nanopartículas de BTM e DXM, isto indica que ocorreu perda de cristalinidade dos fármacos e que eles estão dispersos na matriz lipídica. Estes

resultados confirmam os obtidos nos ensaios para a determinação da eficiência de encapsulação, nos quais se observou que os fármacos foram encapsulados pela matriz lipídica com sucesso.

2.2.3. Difratometria de Raios-X

De forma geral, nos difratogramas de raios-X (Figuras 36 e 37) observa-se que as amostras de nanopartículas são amorfas. Os fármacos BTM e DXM apresentam diversos picos característicos de substâncias cristalinas e nenhum destes picos é observável com clareza nos difratogramas das amostras de nanopartículas, indicando que os fármacos estão dispersos na matriz lipídica.

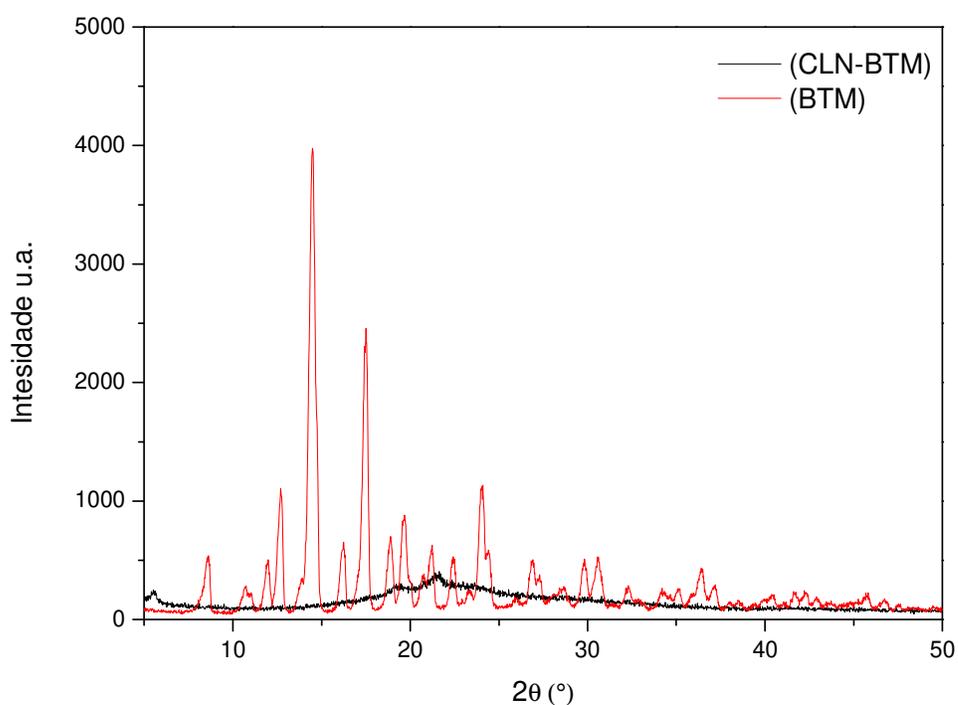


Figura 36. Difratogramas de raios-X para valerato de betametasona (BTM), em vermelho, e carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com valerato de betametasona (CLN-BTM), em preto.

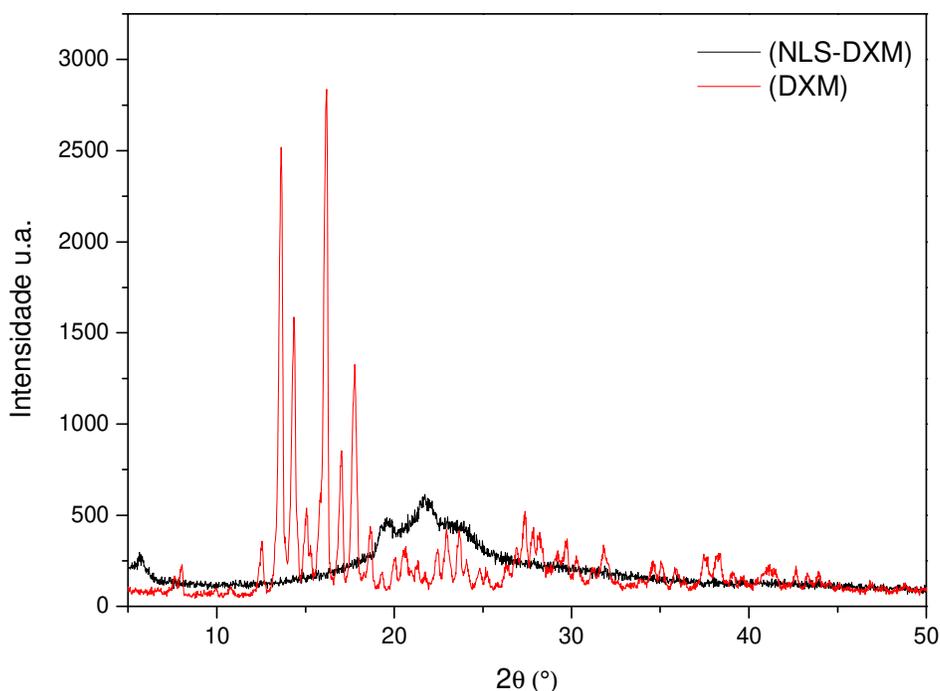


Figura 37. Difratoformas de raios-X para dexametasona (DXM), em vermelho, e nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com dexametasona (NLS-DXM), em preto.

No difratograma da amostra NLS-DXM, apresentado na Figura 36, percebe-se que na região entre 20 e 25° aparecem pequenos picos, bastante alargados em relação aos picos apresentados pelo fármaco puro, isto é um indicativo da presença de fármaco adsorvido na superfície das nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com dexametasona.

2.2.4. Determinação do perfil de liberação dos fármacos a partir das nanopartículas

A seguir, Figuras 38 e 39, são apresentadas as curvas dos perfis de liberação dos fármacos BTM e DXM a partir das nanopartículas, respectivamente.

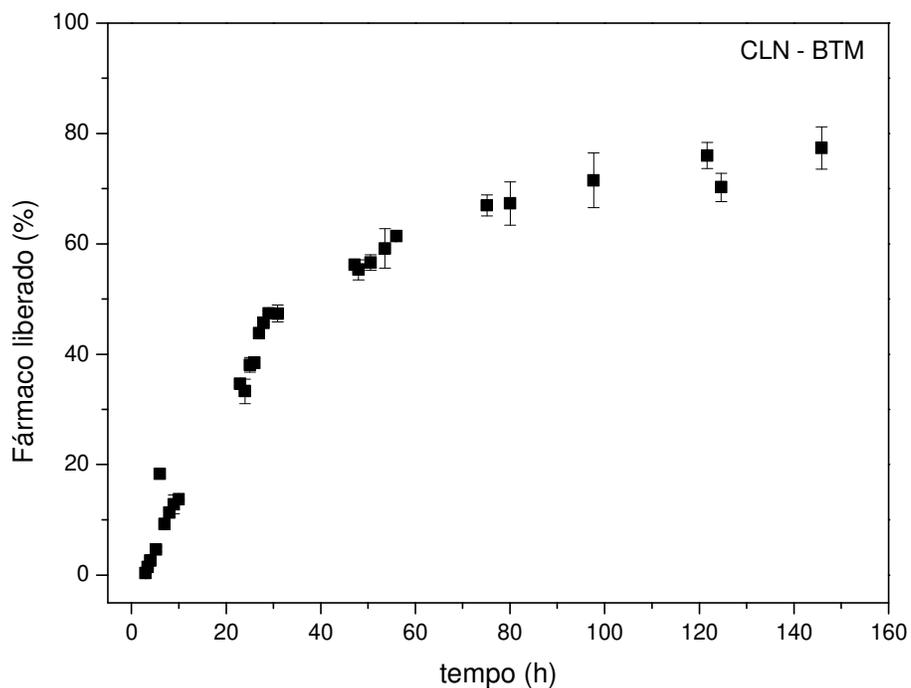


Figura 38. Perfil de liberação do fármaco BTM a partir das NP ao longo de 144 h de ensaio.

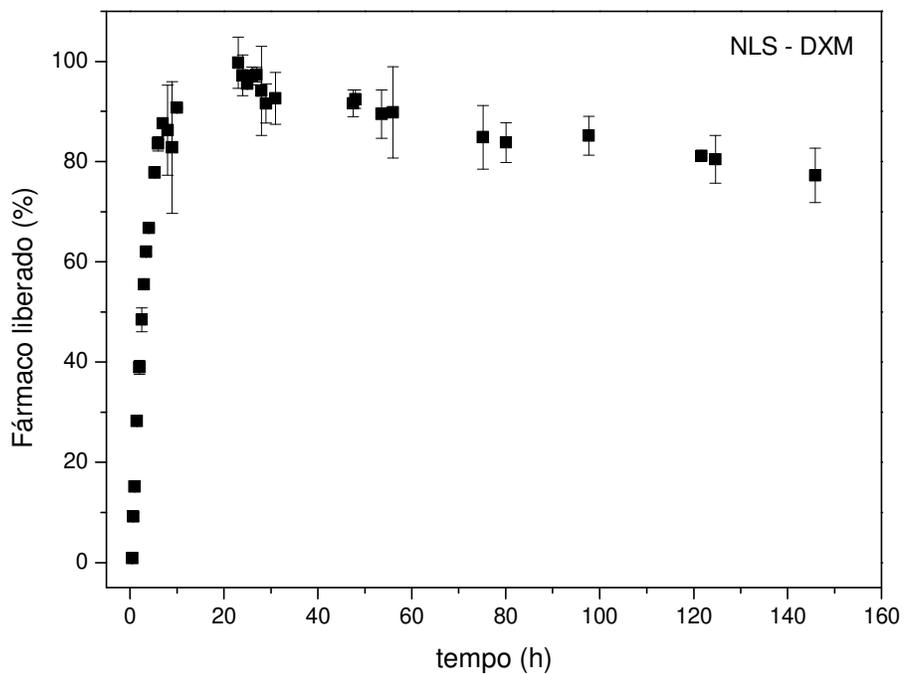


Figura 39. Perfil de liberação do fármaco DXM a partir das NP ao longo de 144 h de ensaio.

Para os CLN carregados com BTM o perfil de liberação foi mais lento, sendo que ao longo das 144 h de ensaio 80% da quantidade de fármaco total foram liberados. É importante ressaltar que nas primeiras 24 h de análise houve liberação de pouco mais de 20% da quantidade de fármaco total. Isto mostra que esta formulação seria útil para o tratamento de processos inflamatórios crônicos.

Para as NLS carregadas com DXM o perfil de liberação mostrou-se bastante diferenciado daquele obtido para os CLN de BTM. Nas primeiras 24 h de ensaio aproximadamente 90% da quantidade total de fármaco foram liberados para o meio externo. Fato bastante interessante para possíveis aplicações em processos inflamatórios agudos.

Comparando-se os dois perfis de liberação pode-se inferir que as moléculas de BTM estão dispersas ao longo da matriz lipídica do carreador, por isso sua liberação é mais lenta. É preciso ressaltar que a adição de ácido oleico à formulação com BTM alterou a forma como o fármaco interage com a matriz lipídica. Já as moléculas de DXM parecem estar adsorvidas na superfície das NLS, fazendo com que sua liberação seja muito mais rápida. Estes resultados confirmam as discussões realizadas acerca dos resultados obtidos através de calorimetria diferencial de varredura e difratometria de raios-X.

Para elucidar o tipo de mecanismo envolvido na liberação dos fármacos, a modelagem matemática dos dados apresentados foi realizada. Foram utilizados os modelos cinéticos apresentados no item 4.5.4 do Capítulo III.

Para a curva obtida no ensaio de liberação *in vitro* dos CLN contendo BTM o modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais foi o de Baker-Lonsdale, indicando que a liberação do fármaco ocorre a partir de uma matriz esférica e é governada por difusão. A Figura 40 mostra o ajuste do modelo à curva:

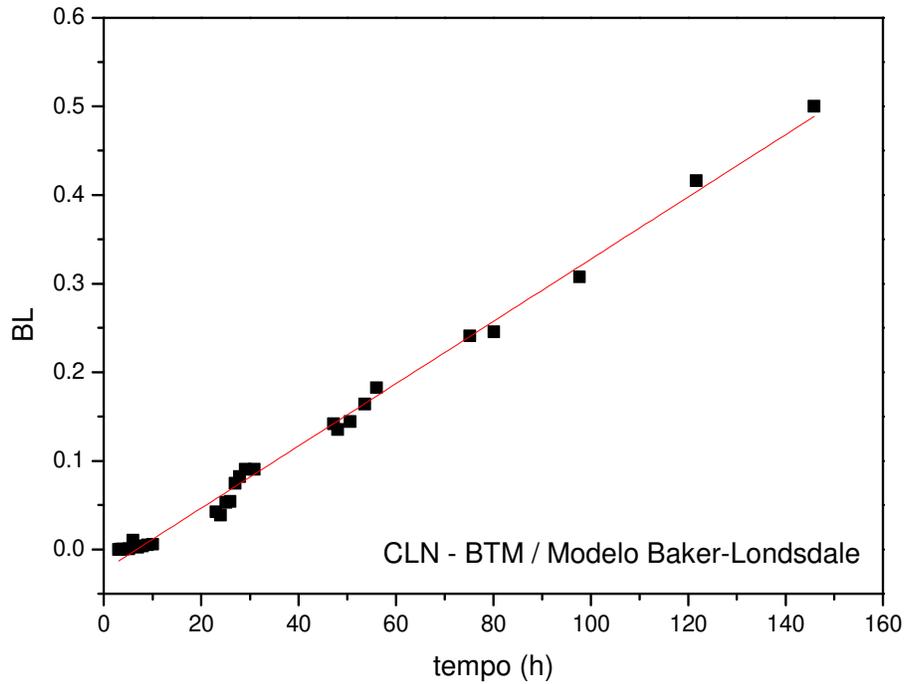


Figura 40. Ajuste dos dados experimentais obtidos para CLN-BTM ao modelo de Baker-Londsdale.

A variável BL, apresentada no eixo das ordenadas, corresponde à parte esquerda da equação de Baker-Londsdale, previamente apresentada (equação 9):

$$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = k_{BL} t \quad (9)$$

$$BL = \frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_T}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_T}{M_\infty}$$

onde $\frac{M_t}{M_\infty}$ é a quantidade de fármaco liberada no tempo t e k_{BL} é a constante de difusão.

A Tabela 41 apresenta os valores obtidos através do ajuste dos dados experimentais ao modelo de Baker-Lonsdale para soma quadrática dos erros (χ^2), o coeficiente de correlação (R) e o coeficiente angular (k_{BL}).

Tabela 41. Ajuste do modelo de Baker-Lonsdale para liberação *in vitro* da formulação CLN-BTM

χ^2	R	k_{BL}
0,003	0,997	0,004 ± (5,488x10 ⁻⁵)

Após diversas tentativas de ajuste para a curva obtida no ensaio de liberação *in vitro* das NLS contendo DXM, percebeu-se que o perfil da curva de liberação do fármaco parecia apresentar mais de uma cinética de liberação, por isso a curva foi dividida. A primeira parte cobrindo as primeiras 6h de ensaio e a última parte começando em quarenta e sete horas e indo até o final do experimento. O trecho entre seis e quarenta e sete horas não foi ajustável a nenhum dos modelos matemáticos propostos, indicando a ocorrência de outros mecanismos de liberação.

A Figura 41 apresenta o ajuste dos trechos inicial e final da curva de liberação ao modelo de Peppas-Korsmeyer (equação 8):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_p t^n \quad (8)$$

onde $\frac{M_t}{M_\infty}$ é quantidade de fármaco liberada no tempo t; k_p é uma constante que leva em consideração as características estruturais e geométricas do sistema; e n é o expoente de liberação.

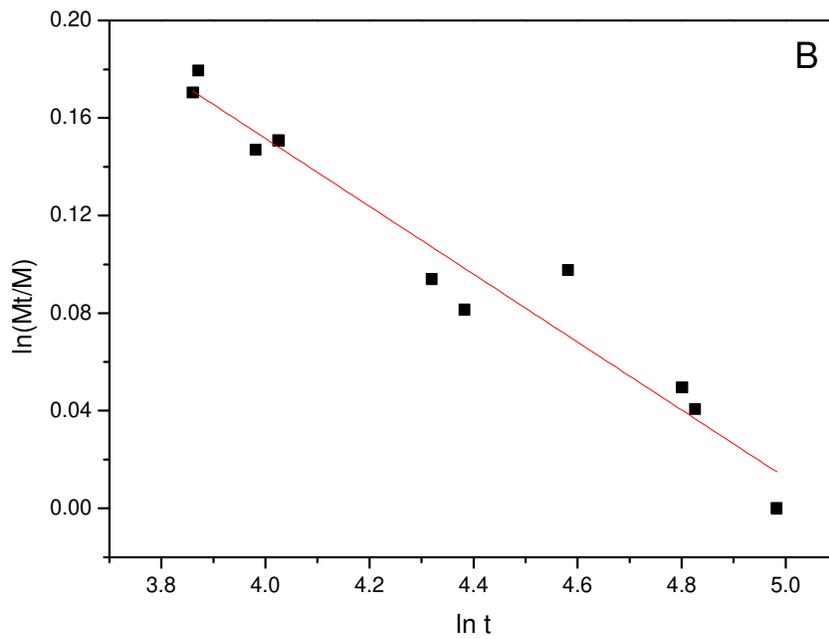
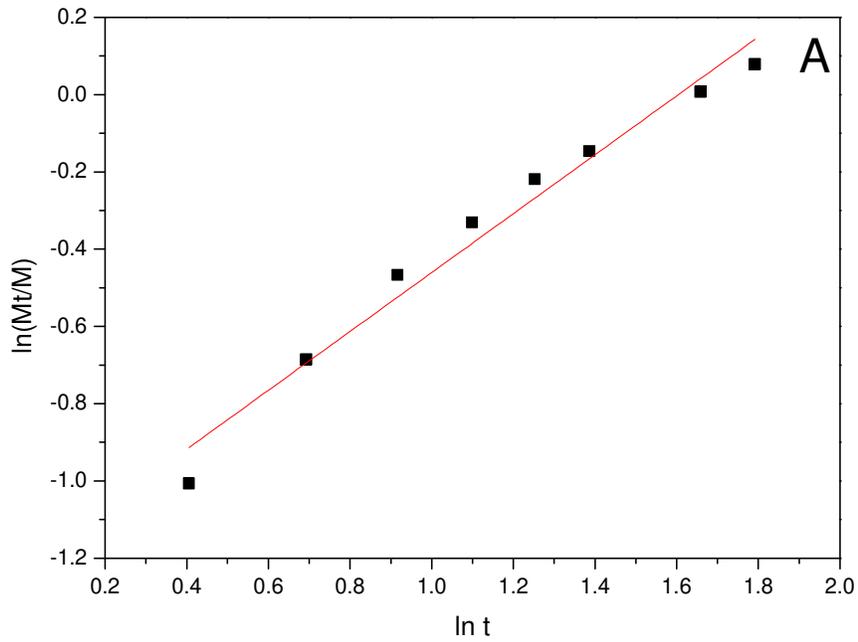


Figura 42. Ajuste dos dados experimentais obtidos para NLS-DXM ao modelo de Peppas-Korsmeyer para (A) 6 h iniciais e (B) 97 h finais de ensaio.

A Tabela 42 apresenta os valores obtidos através destes ajustes para soma quadrática dos erros (χ^2), o coeficiente de correlação (R) e o coeficiente angular (k_{BL}).

Tabela 42. Ajuste do modelo de Peppas-Korsmeyer para liberação *in vitro* da formulação NLS-DXM

Gráfico	χ^2	R	n
A	0,023	0,987	0,762 ± 0,050
B	0,002	-0,974	-0,139 ± 0,011

O valor obtido para o coeficiente n no gráfico A (0,762) indica que nesta etapa da liberação ocorre a difusão do fármaco e o intumescimento da matriz. Não é possível afirmar qual o tipo de mecanismo que esta ocorrendo na última etapa da liberação (gráfico B) pois o valor obtido para n não foi definido pelo modelo. Talvez ocorra uma mistura entre os mecanismos propostos pelo modelo utilizado.

3. Gel termo sensível de pectina cítrica oxidada

3.1. Caracterização do produto de reação

3.1.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Diversos esforços foram realizados para obter espectros de RMN da pectina cítrica e da pectina cítrica oxidada. Devido à alta viscosidade das soluções resultantes, os espectros de RMN obtidos apresentaram baixa qualidade. As amostras foram submetidas, então, a RMN de sólidos, mas novamente os resultados obtidos foram desapontadores.

A fim de superar esta dificuldade, foram registrados espectros de RMN de líquidos a 80°C na tentativa de diminuir a viscosidade do sistema, gerando espectros de melhor qualidade. Infelizmente, a qualidade dos sinais obtidos não foi a esperada. Na Figura 43 são apresentados os espectros de RMN de ^{13}C para as duas amostras, os espectros originais estão em Anexo.

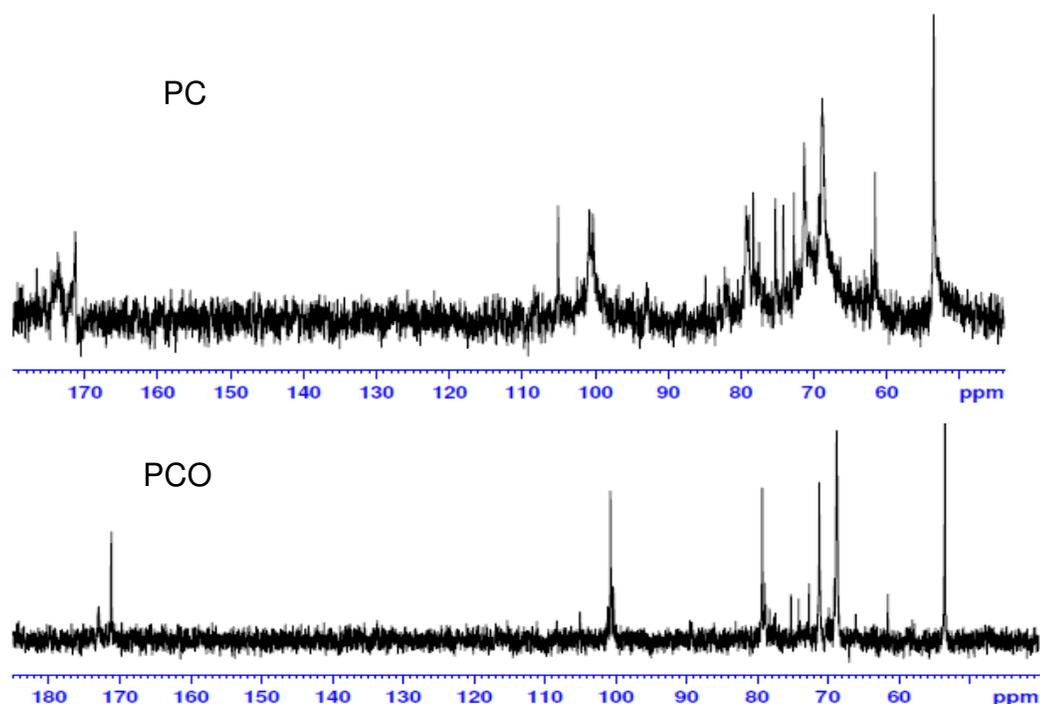


Figura 43. Espectros de RMN de ^{13}C para pectina cítrica (PC) e pectina cítrica oxidada (PCO) em água deuterada a 80°C.

Os valores característicos de deslocamento químico de ^{13}C de grupos éster, aldeído e ácido carboxílico são apresentados na Tabela 43 a seguir:

Tabela 43. Faixas de deslocamento químico de ^{13}C em alguns compostos carbonílicos (Constantino, 2006)

Tipo de carbono		δ (ppm)
-COOH	ácidos carboxílicos	160 a 185
-COOR	ésteres	155 a 175
-CHO	aldeídos	175 a 205

No espectro da PCO é possível identificar dois picos na região entre 170 e 175 ppm, que podem ser de ^{13}C de ésteres e aldeídos, porém não é possível realizar a comparação desta região com aquela do espectro obtido para PC, pois os picos apresentados neste espectro são alargados e, em alguns casos, confundem-se com o ruído. Por isso não é possível realizar afirmações a respeito do sucesso ou não da reação realizada com base nestes dados, porém como foi identificado um pico referente a ^{13}C de aldeídos no espectro da PCO há indícios do sucesso da reação de oxidação.

3.1.2. Espectroscopia na região do Infravermelho

Os espectros de IV obtidos para pectina cítrica e pectina cítrica oxidada são apresentados na Figura 43 e na Tabela 44 são apresentadas as regiões características de absorção de compostos carbonílicos.

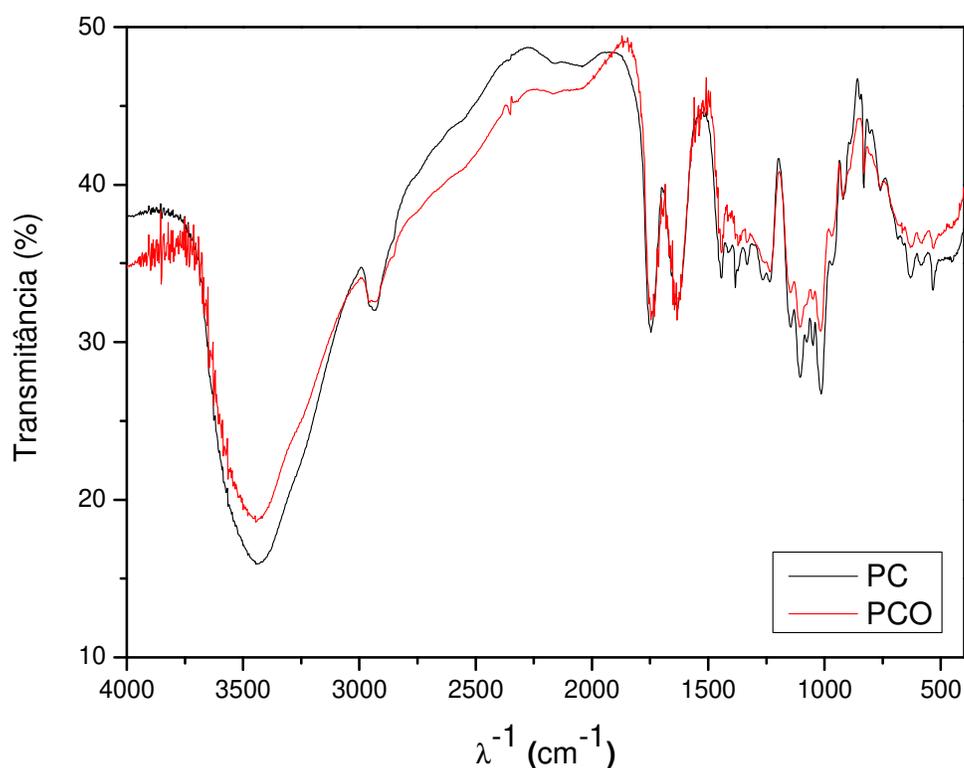


Figura 43. Espectros IV para pectina cítrica, em preto, e para pectina cítrica oxidada, em vermelho.

Tabela 44. Região de absorção de alguns compostos carbonílicos (Gunzler & Gremlich, 2002; Lopes & Fascio, 2004)

Composto	Banda da carbonila (cm ⁻¹)	Observação
Ácido carboxílico	1700-1680	Banda forte de estiramento O–H entre 3200-2500 cm ⁻¹
Aldeído	1740-1720	Banda de estiramento em 2850 cm ⁻¹ e 2750 cm ⁻¹ devido à ressonância de Fermi (pode ser dubleto)
Éster	1730-1715	Banda referente a estiramento C–O na região de 1300-1000 cm ⁻¹

Os espectros obtidos são muito similares entre si, ambos apresentam bandas nas mesmas regiões tornando difícil confirmar o sucesso da reação de oxidação.

As duas espécies apresentam bandas na região característica da banda de estiramento da ligação C–O de ésteres, isto se deve ao fato de a pectina cítrica utilizada ter grupos O–CH₃ em substituição à hidroxila do ácido carboxílico; portanto, o produto de reação também apresenta esta banda.

As bandas características de carbonila de grupos aldeído, ácido carboxílico e éster estão em regiões muito próximas, conforme apresentado pela Tabela 44. Nos espectros há indícios de que as bandas em ~1740 cm⁻¹ sejam geradas pela carbonila de aldeídos/ésteres e as bandas ~1630 cm⁻¹ sejam de carbonila de ácidos carboxílicos. Como os espectros foram obtidos utilizando a mesma massa dos compostos pode-se realizar uma comparação entre as áreas relativas às bandas de interesse. A área relativa à banda de estiramento da carbonila de aldeídos no espectro da pectina cítrica oxidada é 10% maior que a do espectro da pectina cítrica. Assim, estes dados sugerem o sucesso da reação de oxidação.

3.1.3. Análises Térmicas

a) Análise termogravimétrica

A Figura 44 apresenta as curvas termogravimétricas obtidas para pectina cítrica e pectina cítrica oxidada. Os dados obtidos são apresentados na Tabela 45, de forma a tornar comparação mais clara.

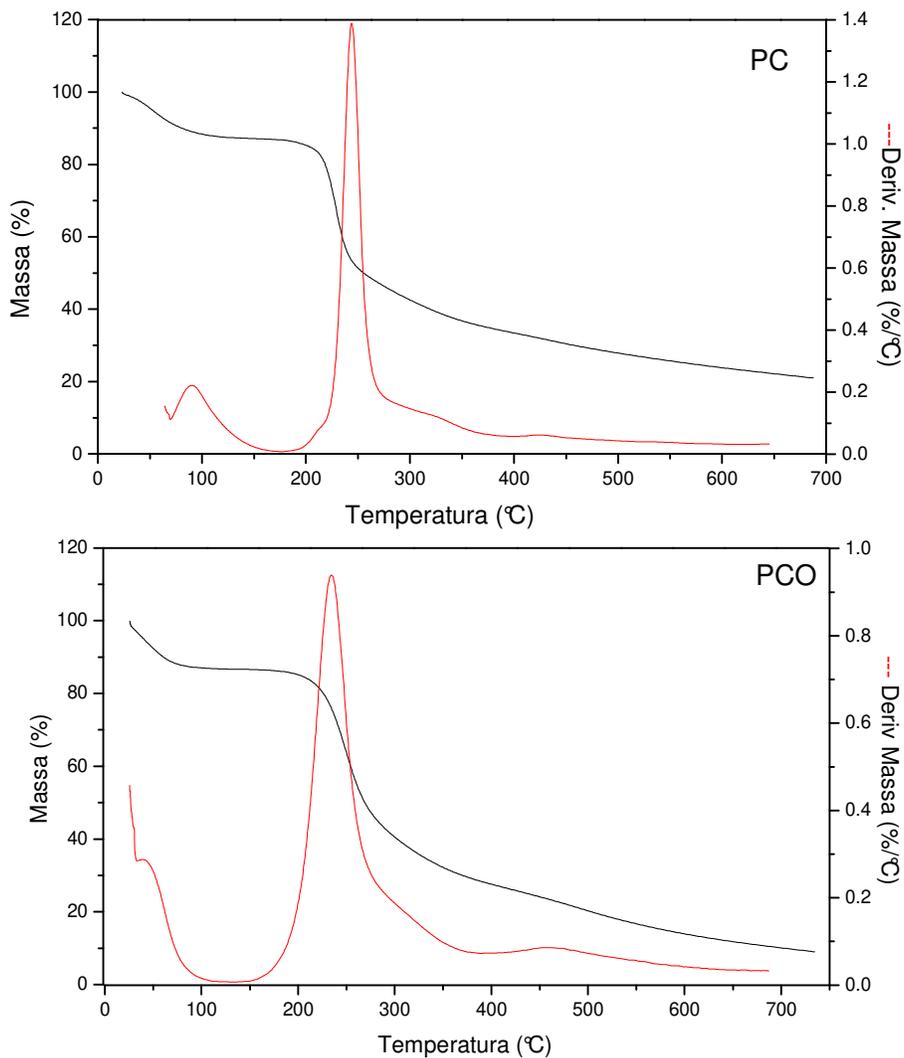


Figura 44. Curvas termogravimétricas para pectina cítrica (PC) e pectina cítrica oxidada (PCO).

Tabela 45. Resultados da análise termogravimétrica para pectina cítrica (PC) e pectina cítrica oxidada (PCO)

	Temperatura (°C)	% massa perdida
PC	52,89	12,61
	229,27	52,74
	434,55	13,48
PCO	40,94	12,57
	234,32	61,01
	457,49	16,71

As curvas obtidas tem perfil bastante similar, mas como os valores dos eventos térmicos são diferentes, há indícios de que as estruturas das amostras sejam diferentes também.

b) Calorimetria diferencial de varredura

A Figura 45 apresenta as curvas DSC obtidas para pectina cítrica e pectina cítrica oxidada. Os dados obtidos são apresentados na Tabela 46, de forma a tornar comparação mais clara.

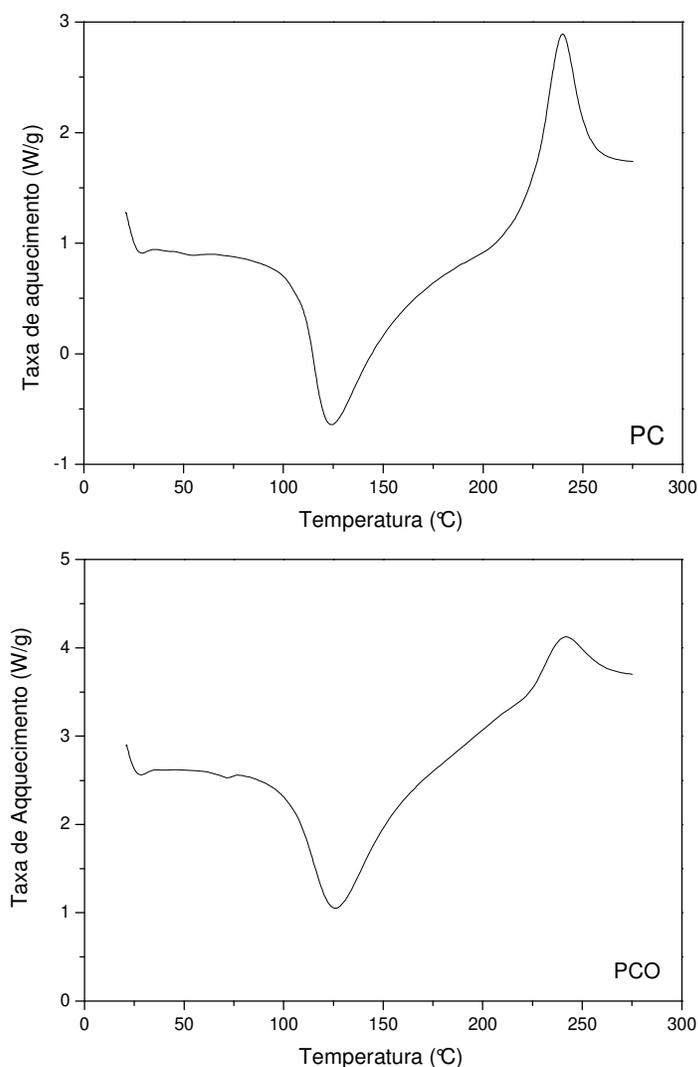


Figura 45. Curvas DSC para pectina cítrica (PC) e pectina cítrica oxidada (PCO).

Tabela 46. Resultados da análise por calorimetria diferencial de varredura pectina cítrica (PC) e pectina cítrica oxidada (PCO)

	Tipo de transição	Início da transição (°C)	Pico (°C)	Entalpia da transição (J/g)
PC	Endotérmica	43,79	52,66	1,44
		106,79	123,90	392,30
	Exotérmica	222,08	238,79	199,30
PCO	Endotérmica	62,47	71,18	2,17
		101,92	127,28	486,20
	Exotérmica	217,22	238,47	123,80

Os valores das entalpias das transições sofridas pelas amostras são diferentes, indicando, novamente, que as estruturas das amostras PC e PCO são diferentes.

3.1.4. Determinação do percentual de oxidação

Os cálculos pertinentes foram realizados e a porcentagem de oxidação da pectina cítrica oxidada foi 42%. Diante disto, pode-se afirmar que a metodologia utilizada para realizar a oxidação da pectina cítrica foi eficaz.

3.2. Gelificação

A gelificação das amostras ocorreu em menos de 1 minuto após a adição da solução de pectina cítrica oxidada sobre a solução de di-hidrazida adípica. Sua estabilidade foi monitorada a 37 °C e após 72 h os géis com e sem fármaco colapsaram. As amostras que continham CLN de BTM e NLS de DXM colapsaram após 48 h de gelificação.

O mesmo teste foi realizado com solução de pectina cítrica e não foi observada a ocorrência de gelificação. Unindo este resultado com aqueles obtidos

através das análises espectroscópicas e térmicas realizadas, é possível afirmar que a reação de oxidação ocorreu com sucesso, gerando grupos aldeídos que formaram ligações do tipo hidrazona quando entraram em contato com as moléculas de di-hidrazida adípica, conforme ilustra a Figura 46 a seguir.

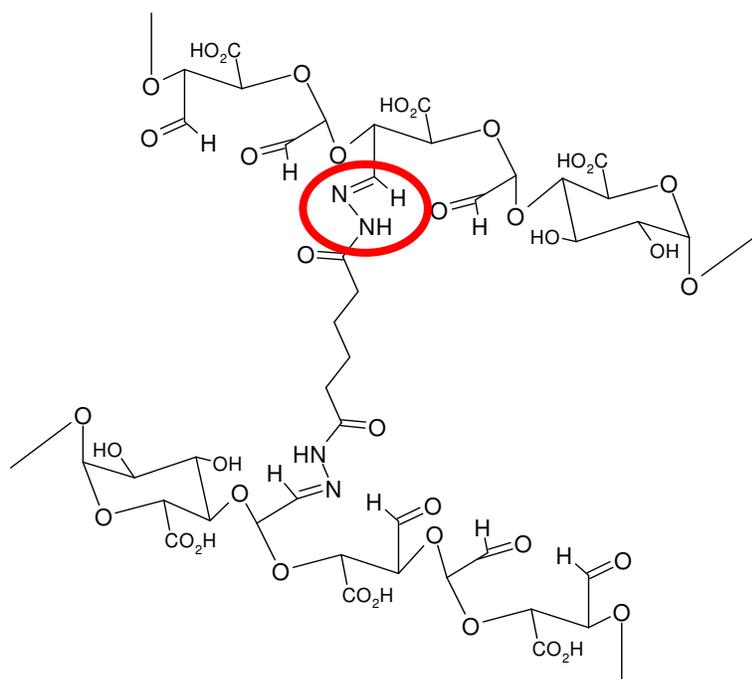


Figura 46. Representação da estrutura química proposta para o gel de pectina cítrica oxidada, destacando em vermelho a ligação hidrazona formada entre os grupos aldeído da pectina cítrica oxidada e as moléculas de di-hidrazida adípica.

A Figura 47 apresenta as fotos do teste de gelificação sem fármaco, na presença de valerato de betametasona, de dexametasona, de CLN-BTM e de NLS-DXM.

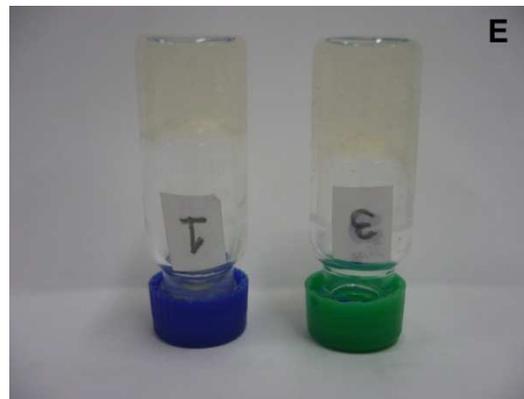
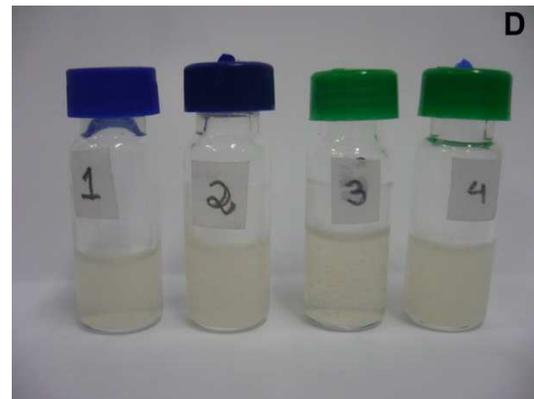


Figura 47. Resultados do teste de gelificação na ausência de fármaco (A), na presença de BTM (B), na presença de DXM (C), na presença de CLN-BTM e na presença de NLS-DXM (D e E).

(vials 1 e 2 contêm CLN-BTM e vials 3 e 4 contêm NLS-DXM)

3.3. Estudo de intumescimento

A Figura 48 apresenta a foto do teste para determinação da razão de intumescimento e da porcentagem de água em equilíbrio.

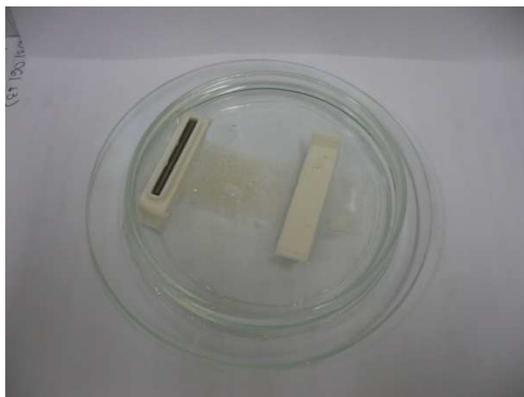


Figura 48. Experimento para estudo de intumescimento do gel de pectina cítrica oxidada.

O valor obtido para a razão de intumescimento, q , foi **1,2614** e a porcentagem de água em equilíbrio, A , calculada foi **20,7%**. Estes valores foram calculados após 24 h de ensaio, pois os géis colapsaram após este período.

Como as amostras de gel ficaram em contato direto com o tampão fosfato a rede colapsou antes do previsto (72 h). Os valores obtidos para a razão de intumescimento e para a porcentagem de água em equilíbrio foram baixos, mostrando que o gel preparado não é capaz de absorver grandes quantidades de água.

Este resultado não é, necessariamente, negativo pois a ideia seria realizar a entrega das NP preparadas através da utilização deste hidrogel. Como as NP apresentaram perfil de liberação dos fármacos controlado, o colapso da rede polimérica do hidrogel não seria inconveniente pois a liberação dos fármacos ainda seria modificada.

Como a rede colapsou após 24 h de ensaio de intumescimento, talvez este hidrogel seja o mais adequado para realizar a entrega de NLS de dexametasona, pois a liberação de fármaco a partir destas NP ocorre em 24 h.

V. CONCLUSÕES

A utilização de planejamentos experimentais foi de extrema importância para que as formulações de nanopartículas pudessem ser otimizadas, obtendo-se nanopartículas com diâmetro em torno de 80 nm para as formulações com valerato de betametasona e 70 nm para aquelas com dexametasona. A inserção de ácido oleico à fase lipídica das nanopartículas lipídicas sólidas, tornando-as carreadores lipídicos nanoestruturados, aumentou a eficiência de encapsulação do sistema e também modificou completamente o perfil de liberação *in vitro* apresentado pela formulação. Confirmando ser muito mais vantajoso trabalhar com carreadores lipídicos nanoestruturados ao invés de nanopartículas lipídicas sólidas. Certamente a utilização desta última classe de sistemas nanoestruturados deverá ser substituída pelos carreadores lipídicos nanoestruturados, que apresentam grandes vantagens em relação às nanopartículas lipídicas sólidas.

As análises realizadas com amostras de nanopartículas mostraram que ambos os fármacos estão dispersos ao longo da matriz lipídica. As análises térmicas e a difratometria de raios-X indicaram que o fármaco dexametasona está localizado mais próximo à superfície das nanopartículas, quando comparado ao fármaco valerato de betametasona. Os perfis de liberação dos fármacos a partir das nanopartículas sustentam esta hipótese.

Para formulação de carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com valerato de betametasona o fármaco foi liberado ao longo de 144 h de análise. A curva resultante se ajustou ao modelo matemático de Baker-Lonsdale, mostrando que para esta formulação a liberação do fármaco ocorre através de sua difusão ao longo da matriz lipídica.

Já para a formulação de nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com dexametasona o fármaco foi liberado durante as primeiras 24 horas de análise e sua curva de liberação não se ajustou completamente a nenhum dos modelos matemáticos propostos. Foi necessário dividir a curva e ajustar os fragmentos ao modelo de Peppas-Korsmeyer, os resultados mostraram que durante as primeiras

6 horas a liberação do fármaco ocorre através de sua difusão e também pelo intumescimento da matriz lipídica.

De acordo com os perfis de liberação de fármaco apresentados pelas formulações de nanopartículas é possível afirmar que a formulação de carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com valerato de betametasona poderia ser utilizada para o tratamento de processos inflamatórios crônicos, já a formulação de nanopartículas lipídicas sólidas carregadas com dexametasona poderia ser utilizada para o tratamento de processos inflamatórios agudos.

A reação de oxidação da pectina cítrica foi realizada com sucesso, as informações obtidas através de todas as análises realizadas sustentam esta afirmação, que foi confirmada pela ocorrência da gelificação do gel de pectina cítrica oxidada.

Conclui-se portanto que seria possível utilizar o hidrogel de pectina cítrica oxidada em uma aplicação Depot subcutânea para realizar a entrega das nanopartículas carregadas com fármaco diretamente no local de ação. Obviamente mais testes precisam ser realizados de forma a confirmar a eficácia das formulações *in vivo*, mas este trabalho demonstra que o sistema proposto é viável para maiores estudos.

VI. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os seguintes trabalhos são propostos para dar continuidade ao tema abordado:

- Estudar formas de aumentar a estabilidade das nanopartículas preparadas;
- Estudo para utilização do hidrogel de pectina cítrica para entrega de fármacos nitrogenados, que poderiam estabelecer ligações do tipo hidrazona com as cadeias de pectina cítrica oxidada;
- Realização dos ensaios para determinação da eficiência *in vivo* das formulações de nanopartículas desenvolvidas;

VII. REFERÊNCIAS

Akas, B. et al. Thermoresponsive surfaces for cell culture and enzyme-free cell detachment. *Progress in Polymer Science* **35**, 1311 (2010).

Allen, T.M. Liposomes, opportunities in drug delivery. *Drugs* **54**, 8 (1997).

Amsdem, B. et al. Development of biodegradable injectable thermoplastic oligomers. *Biomacromolecules* **5**, 637 (2004).

Anseth, K.S. et al. Polymeric dental composites: properties and reaction behavior of multimethacrylate dental restorations. *Biopolymers* **122**, 177 (1995).

Baker, R.W.; Lonsdale, H.S. Controlled release: mechanisms and rates. In: *Controlled release of biologically active agents*. Ed. A.C. Taquary, R.E. Lacey. New York: Plenum Press, 1974.

Berger, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **57**, 19 (2004).

Bouhadir, K. et al. Sustained and controlled release of daunomycin from cross-linked poly(aldehyde guluronate) hydrogels. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **89**, 910 (2000).

Buren, J.P.V. Function of pectin in plant tissue structure and firmness. In: *The chemistry and technology of pectin*. Ed. R.H. Walter. New York: Academic Press, 1991. p. 1-22.

Burkoth, A.K.; Anseth, K.S. A review of photocrosslinked polyanhydrides: *in situ* forming degradable networks. *Biomaterials* **21**, 2395 (2000).

Calderini, A. Preparação e caracterização de nanoesferas de PLGA contendo 5-fluoracil e estudo do acoplamento de quitosana e ácido fólico em sua superfície. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas (2011).

Chenite, A. et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels *in situ*. *Biomaterials* **21**, 2155 (2000).

Chitkara, D. et al. Biodegradable injectable *in situ* Depot-forming drug delivery systems. *Macromolecular Bioscience* **6**, 977 (2006).

Cohen, E. Dexamethasone. *Analytical Profile of Drug Substances* **2**, 163 (1973).

Constantino, M.G. Química Orgânica - Curso básico universitário. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos S.A., 2008.

Costa, P.; Lobo, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profile. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **13**, 123 (2001).

Dawlee, S. et al. Oxidized chondroitin sulfate-cross-linked gelatin matrixes: a new class of hydrogels. *Biomacromolecules* **6**, 2040 (2005).

Del Rosso J.; Friedlander, S.F. Corticosteroids: options in the era of steroid-sparing therapy. *Journal of the American Academy Dermatology* **53**, 50 (2005).

Dordunoo, S.K. et al. Release of taxol from poly(ϵ -caprolactone) pastes: effect of water-soluble additives. *Journal of Controlled Release* **44**, 87 (1997).

Duan, J. et al. Structural features of a pectic arabinogalactan with immunological activity from leaves of *Diospyros kaki*. *Carbohydrate Research* **338**, 1291 (2003).

Ekambaram, P. et al. Solid lipid nanoparticles: a review. *Scientific Reviews and Chemical Communications* **2**, 80 (2012).

Eldman J.L. Differentiating intraocular glucocorticoids. *Ophthalmologica* **224**, 25 (2010).

El-Ghaffar, M.A.A. et al. pH-sensitive sodium alginate hydrogels for riboflavin controlled release. *Carbohydrate Polymers* **89**, 667 (2012).

Feldman, S.R. Psoriasis treatment. *Current Problems in Dermatology* **10**, 1011 (1998).

Ferrante, M.; Rudy, B.C. Betamethasone dipropionate. *Analytical Profile of Drug Substances* **6**, 43 (1977).

Ganji, F. et al. Gelation time and degradation rate of chitosan-based injectable hydrogel. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **42**, 47 (2007)

Ganji, F.; Abdekhodaiea, M.J. The effects of reaction conditions on block copolymerization of chitosan and poly(ethylene glycol). *Carbohydrate Polymers* **81**, 799 (2010).

Gaumet, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **69**, 1 (2008).

Gringauz, A. Introduction to medicinal chemistry: How drugs act and why. New York: Wiley-VCH, 1997.

Gunzler, H.; Gremlich, H. IR Spectroscopy: an introduction. Germany: Wiley-VCH, 2002.

Gupta, D. et al. Fast-gelling injectable blend of hyaluronan and methylcellulose for intrathecal, localized delivery to the injured spinal cord. *Biomaterials* **27**, 2370 (2006).

Hanauer, S. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis and therapeutic opportunities. *Inflammatory Bowel Diseases* **12**, 3 (2006).

Hatefi, A.; Amsdem, B. Biodegradable injectable *in situ* forming drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* **80**, 9 (2002).

Heller, J et al. Poly(ortho esters) - their development and some recent applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **50**, 121 (2000).

Higuchi, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **52**, 1145 (1963).

Higuchi, T. Rate release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **50**, 874 (1961).

Hoffman, A.S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **64**, 18 (2012).

Hudson, S.P. et al. Injectable in situ crosslinking hydrogels for local antifungal therapy. *Biomaterials* **31**, 1444 (2010).

Hughes J.; Rustin, M. Corticosteroids. *Clinics in Dermatology* **15**, 715 (1997).

Hunter, R.J. Introduction to modern colloid science. New York: Oxford University Press, 1993.

Jackson J.K. et al. The suppression of human prostate tumor growth in mice by intratumoral injection of a slow-release polymeric paste formulation of Paclitaxel. *Cancer Research* **60**, 416 (2000).

Jenning, V. et al. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *International Journal of Pharmaceutics* **199**, 167 (2000)a.

Jenning, V. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) based on binary mixtures of liquid and solids lipids: a ¹H-NMR study. *International Journal of Pharmaceutics* **205**, 15 (2000)b.

Jenning, V.; Gohla, S.H. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). *Journal of Microencapsulation* **18**, 149 (2001).

Jores, K. et al. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. *Journal of Controlled Release* **95**, 217 (2004).

Jung J. et al. Pectin and charge modified pectin hydrogel as a colon-targeted drug delivery carrier. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **104**, 116 (2013).

Kempe, S.; Mäder, K. *In situ* forming implants - an attractive formulation principles for parenteral Depot formulations. *Journal of Controlled Release* **161**, 668 (2012).

Kheradmandnia, S. et al. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **6**, 753 (2010).

Kim, G.O. et al. An electrostatically crosslinked chitosan hydrogel as a drug carrier. *Molecules* **17**, 13704 (2012).

Klouda L.; Mikos, A.G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **68**, 34 (2008).

Ko, D.Y. et al. Recent progress of *in situ* formed gels for biomedical applications. *Progress in Polymer Science* **38**, 672 (2013).

Kong, J. et al. Polysaccharide template silver nanowire for ultrasensitive electrical detection of nucleic acids. *Analytical Chemistry* **80**, 7213 (2008).

Korsmeyer, R.W. et al. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics* **15**, 25 (1983).

Korsmeyer, R.W.; Peppas, N.A. Macromolecular and modeling aspects of swelling-controlled systems. In: Controlled release delivery systems. Ed. T.J. Roseman, S.Z. Mansdorf. New York: Marcel Dekker, Inc., 1981.

Lee, K.Y.; Mooney, D. Hydrogels for tissue engineering. *Chemical Reviews* **101**, 1869 (2001).

Liu, L. et al. Pectin/poly(lactide-co-glycolide) composite matrices for biomedical applications. *Biomaterials* **25**, 3201 (2004).

Liu, L.S. et al. Hydrogels from biopolymer hybrid for biomedical, food, and functional food applications. *Polymers* **4**, 997 (2012).

Lopes, C.M. et al. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **41**, 143 (2005).

Lopes, W.A.; Fascio, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Química Nova* **27**, 670 (2004).

Marcato, P.D. et al. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Eletrônica de Farmácia* **6**, 1 (2009).

Martins S. et al. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery-liposomes versus lipid nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* **2**, 595 (2007).

Mehnert, W.; Mäder, K. Solid lipid nanoparticles - production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **47**, 165 (2001).

Mishra, B. et al. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine* **6**, 9 (2010).

Motulsky, A. et al. Characterization and biocompatibility of organogels based on L-alanine for parenteral drug delivery implants. *Biomaterials* **26**, 6242 (2005).

Müller, R.H. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **50**, 161 (2000).

Müller, R.H. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **242**, 121 (2002).

Neto, B.B. et al. Como Fazer Experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Porto Alegre: Bookman, 2010.

Ono, K. et al. Photocrosslinkable chitosans as a biological adhesive. *Journal of Biomedical Materials Research* **49**, 289 (2000).

Opanasopit, P. et al. Development and characterization of pectinate micro/nanoparticles for gene delivery. *AAPS PharmSciTech.* **9**, 67 (2008).

Packhaeuser, C.B. et al. *In situ* forming parenteral drug delivery systems: an overview. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **58**, 445 (2004).

Peppas, N.A. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* **60**, 110 (1985).

Peppas, N.A. et al. Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology. *Advanced Materials* **18**, 1345 (2006).

Peppas, N.A. et al. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **50**, 27 (2000).

Peter, S.J. et al. *In-vitro* degradation of a poly(propylene fumarate)/ β -tricalcium phosphate composite orthopedic scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research* **41**, 1 (1998).

Pilgrim, G.W. et al. Jams, Jellies and preserves. In: The chemistry and technology of pectin. Ed. R.H. Walter. New York: Academic Press, 1991. p. 23-50.

Puri, A. et al. Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **26**, 523 (2009).

Qingzhi, L. et al. Development and evaluation of penciclovir-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **372**, 191 (2009).

Ruel-Gariépy, E.; Leroux, J.C. *In situ*-forming hydrogels - review of temperature-sensitive systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **58**, 409 (2004).

Serpe, L. et al. Solid lipid nanoparticles as anti-inflammatory drug delivery systems in a human inflammatory bowel disease whole-blood model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **39**, 428 (2010).

Siepmann J.; Siepmann, F. Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **364**, 328 (2008).

Silpa, N. et al. Moxifloxacin loaded solid lipid nanoparticles (slns): preparation and characterization. *Asian Journal of Pharmaceutical Research* **2**, 105 (2012).

Sivaramakrishnan, R. et al. Glucocorticoid entrapment into lipid carriers – characterization by plectric spectroscopy and influence on dermal uptake. *Journal of Controlled Release* **97**, 493 (2004).

Souto, E.B. et al. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **278**, 71 (2004).

Stile, R.A. et al. Synthesis and characterization of injectable poly(N-isopropylacrylamide)-based hydrogels that support tissue formation *in vitro*. *Macromolecules* **32**, 7370 (1999).

Takei, T. et al. *In situ* gellable oxidized citrus pectin for localized delivery of anticancer drugs and prevention of homotypic cancer cell aggregation. *Biomacromolecules* **11**, 3525 (2010).

Üner, M. et al. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* **10**, 43 (2007).

Venkateswarlu, V.; Manjunath, K. Preparation, characterization and *in vitro* release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **95**, 627 (2004).

Vintilou, A.; Leroux, J. Organogels and their use in drug delivery - a review. *Journal of Controlled Release* **125**, 179 (2008).

Vold, I.M.N.; Christensen, B.E. Periodate oxidation of chitosans with different chemicals compositions. *Carbohydrate Research* **340**, 679 (2005).

Voragen, A.G.J. et al. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structure Chemistry* **20**, 287 (2009).

Wissing S.A.; Müller, R.H. The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity – *in vivo* study. *European Journal of Pharmaceutics and Bipharmaceutics* **56**, 67 (2003).

Wissing, S.A. et al. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **56**, 1257 (2004).

Xiang, Q. et al. Lung-targeting delivery of dexamethasone acetate loaded solid lipid nanoparticles. *Archives of Pharmaceutical Research* **30**, 519 (2007).

Yadav, N. et al. Solid lipid nanoparticles - a review. *International Journal of Applied Pharmaceutics* **5**, 8 (2013).

Yu, C. et al. Composite microparticle drug delivery system based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive drug release property. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **68**, 245 (2009).

Zhang, J.; Smith, E. Percutaneous permeation of betamethasone 17-valerate incorporated in lipid nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **100**, 896 (2010).

Zhang, X.G. et al. Reversal activity of nanostructured lipid carriers loading cytotoxic drug in multi-drug resistant cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics* **361**, 239 (2008).

Zhao, H.; Heindel, N.D. Determination of degree of substitution of formyl groups in polyaldehyde dextran by the hydroxylamine hydrochloride method. *Pharmaceutical Research* **8**, 400 (1991).

VIII. ANEXOS

1. Método para análise de glicocorticoides desenvolvido por *Agilent Technologies*[®]

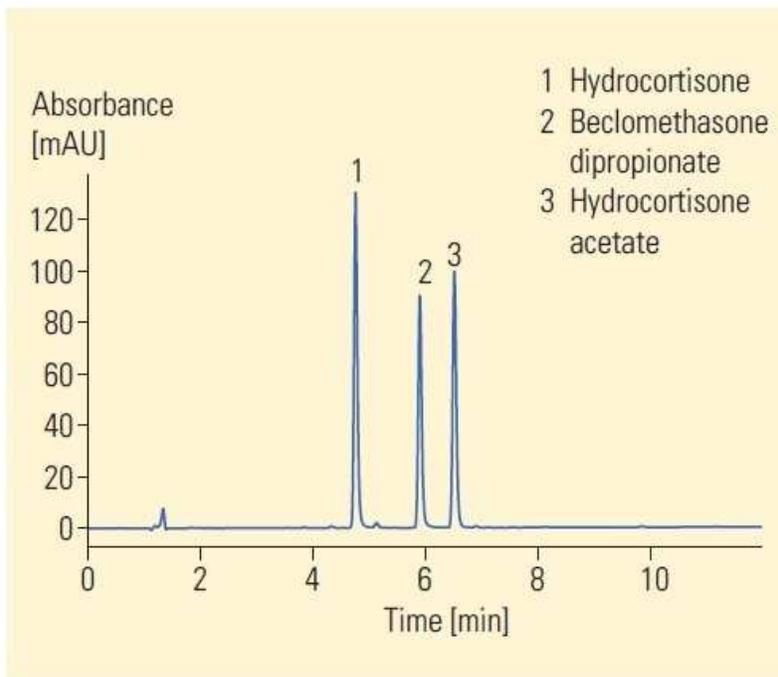


Figure 1
Analysis of three glucocorticoids

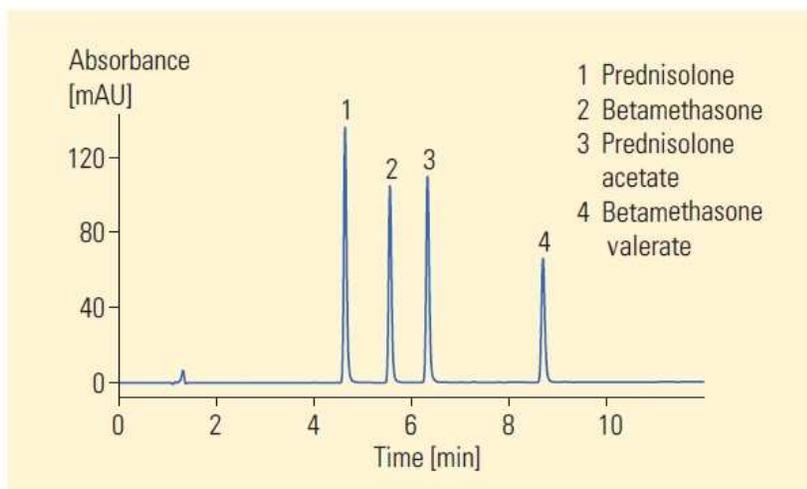


Figure 2
Analysis of four glucocorticoids

Conditions

Column

4 x 125 mm Hypersil ODS, 5 μ m

Mobile phase

A = water, B = acetonitrile

Flow rate

1.0 ml/min

Gradient

at 0 min 20 % B

at 10 min 80 % B

Column wash

at 12 min 20 % B

UV detector

variable wavelength detector

254 nm, standard cell

Column compartment temperature

25 $^{\circ}$ C

Stop time

12 min

Post time

5 min

Injection volume

5 μ l

2. Espectros de RMN de ^{13}C obtidos para pectina cítrica e pectina cítrica oxidada

A seguir são apresentados os espectros obtidos e os parâmetros de aquisição utilizados.



Current Data Parameters
NAME jun101pmh1
EXPNO 3
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130610
Time 10.25
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB/
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT D2O
NS 4132
DS 0
SWH 32894.738 Hz
FIDRES 1.003868 Hz
AQ 0.4980736 sec
RG 2056
EW 15.200 usec
DZ 6.50 usec
TE 303.2 K
B1 2.0000000 sec
B11 0.03000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL F1 =====
STO1 125.7062372 MHz
NUC1 13C
P1 10.00 usec
PLW1 01.00000000 W

==== CHANNEL F2 =====
STO2 499.8719995 MHz
NUC2 1H
CPCPRG12 waltz16
PCPD2 80.00 usec
PLW2 26.85300064 W
PLW12 0.57926002 W
PLW13 0.37074000 W

F2 - Processing parameters
S1 32768
S2 125.6924110 MHz
NUW 0
SSB 0
LB 2.00 Hz
GB 0
PC 1.40

