UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Quantificação de fármacos antituberculose em nanofibras por
eletroforese capilar

Lourdes Marcela Yataco Lazaro

Dissertação para obtenção do Título de
Mestre

Orientador: Profa. Dra. María Segunda Aurora Prado

São Paulo
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Quantificação de fármacos antituberculose em nanofibras por
eletroforese capilar

Lourdes Marcela Yataco Lazaro

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do Título de
Mestre

Orientador: Profa. Dra. María Segunda Aurora Prado

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Y31q Yataco Lazaro, Lourdes Marcela
 Quantificação de fármacos antituberculose em
 nanofibras por eletroforese capilar / Lourdes
 Marcela Yataco Lazaro. - São Paulo, 2017.
 222 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.
Orientador: Aurora Prado, Maria Segunda

1. Controle Físico-Químico de Qualidade dos
Fármacos. 2. Nanotecnologia. I. T. II. Aurora
Prado, Maria Segunda, orientador.

Lourdes Marcela Yataco Lazaro

Quantificação de fármacos antituberculose em nanofibras por
eletroforese capilar

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profª. Dra. María Segunda Aurora Prado
orientador

Prof. Dr. Pedro López García
1o. examinador

Prof. Dr. Francisco Rolando Valenzuela Diaz
2o. examinador

Prof. Dr. Eperidiana Augusta Barretos de Moura
3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, 20 de Outubro de 2017.

***A mis padres, Victor y Lourdes, que amo mucho, por
siempre creer en mí.***

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar minha vida.

Aos meus pais, que estão em meu querido Perú, Victor Yataco Pachas, Lourdes Nancy Lazaro Quispe e a minha família por sempre acreditar em mim e pelo amor incondicional.

A minha orientadora, María Segunda Aurora Prado, pela amizade, orientação, confiança e pelo suporte no desenvolvimento neste trabalho.

Aos professores Jesús Santamaria, Manuel Arruebo e Victor Sebastian pela grande colaboração que tornaram possível a realização deste trabalho. Aos professores Rosario Hirata, Mario Hirata, Henrique Toma, Felipe Rebello, Paulo Moreno, Marina Tavares, Alexander Henning, Humberto Ferraz, Jorge Sampaio, pelo suporte técnico e material e aos seus alunos.

Ao Eugenio Vispe, Nuria Navascues, Alceu Totti, Wilson Maya, Charles Brito, Eremita Santos e Inés Genovese pelo auxílio na realização das técnicas de caracterização. A Claudineia Pinto e ao Edgar Machado pelo suporte em materiais.

Aos colegas do Laboratório de Controle Físico e Químico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos da Universidade de São Paulo e os colegas do Instituto de Nanociência da Espanha, pelo apoio em todos os dias de trabalho. Aos amigos dos laboratórios de Síntese, do laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia e do Instituto de Química pelo apoio.

A meus colegas de trabalho Javier, Marzia, Justyna, Laura, Maciej, Diego, Marta, Airama, Hellen, Priscila, Aline, Claudia, Andrea, Elenice, Antônio, Adriana, Fernando, Larissa C., Isabel, Carol, Giovanni, Bruno, Livia, Karina, Enio, Lidiane, Andressa, Priscila, Otavio, Carol, Ricardo, Lucas, Frank, Roberto, Lourenço e Larissa H. pelo companheirismo.

Aos meus amigos da universidade Perla, Brayan, Yuli, Diego, Joyce, Andrés, Jhon, Octavio, Kethyllin, Lais, Laisse, Carolina, Luan, Sair, Martín e o grupo Hamutay pela amizade.

À Fundação para o Remédio Popular (FURP) pela doação de padrões e amostras para a realização desta pesquisa.

À banca examinadora, pelas contribuições e tempo dedicado à avaliação do trabalho.

Aos funcionários da pós-graduação David Filho, Irineu e Sueli e aos senhores vigias pela presteza e cordialidade, especialmente ao Januario.

Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo, pela oportunidade.

A todos que contribuíram de alguma maneira, para a execução deste projeto, tornando possível sua realização.

RESUMO

YATACO LAZARO, L.M. **Quantificação de fármacos antituberculose em nanofibras por eletroforese capilar**. 2017. 222 f. (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Apesar de ser uma das doenças infecciosas mais antigas e bem conhecidas, a tuberculose (TB) permanece como a segunda maior causa de morte após a síndrome da imunodeficiência adquirida. A TB é uma doença infecciosa e transmissível, causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), que afeta prioritariamente os pulmões, embora possa acometer outros órgãos e sistemas. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver nanofibras e nanoesferas de poli (D,L-láctico co-glicólico) (PLGA) contendo os Insumos Farmacêuticos Ativos (IFAs), rifampicina e isoniazida; caracterizá-las físico quimicamente e determinar a eficiência de encapsulação destes IFAs pelos métodos de eletroforese capilar (CE) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O método de CE para a determinação simultânea dos IFAs antituberculose (isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol) foi otimizado por meio de um delineamento de experimentos de mistura com uma abordagem de vértices extremos usando o *Software* estatístico Minitab 17.

Para o desenvolvimento das nanofibras se utilizou a técnica de *electrospinning* e para as nanoesferas se utilizou a técnica de emulsão/evaporação de solvente. As nanofibras foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria/termogravimetria derivada (TGA) e as nanoesferas foram caracterizadas pelas técnicas de espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta, índice de polidispersão, pH, SEM, TEM, FTIR e DSC. A eficiência de encapsulação dos IFAs nas nanofibras e nas nanoesferas foram realizadas através de duas técnicas analíticas, HPLC e CE, previamente validadas. A eficiência de encapsulação de isoniazida e rifampicina nas nanofibras foi 12,16 % e 5,90 %, respectivamente usando a técnica de HPLC e através da técnica de CE a eficiência de encapsulação foi de 12,30 % e 6,36 %, para isoniazida e

rifampicina, respectivamente. A eficiência de encapsulação para a melhor formulação das nanoesferas foi de 2,33 % e 14,75 % para a isoniazida e rifampicina, respectivamente através da técnica de HPLC e uma eficiência de encapsulação de 2,26 % para a isoniazida e 14,22 % para a rifampicina através da técnica de CE. O método por CE teve a vantagem de apresentar um menor tempo de análise, menos de 6 min, com uma adequada resolução entre os picos dos IFAs. O tempo de análise por HPLC foi de 10 min. O método de CE foi menos lesivo ao meio ambiente, devido à pouca quantidade de solventes orgânicos, tornando assim a CE em um método alternativo à HPLC.

Palavras-chave: nanofibras, nanoesferas, poli(D,L-lático co-glicólico), fármacos antituberculose, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar.

YATACO LAZARO, L.M. **Determination of anti-tuberculosis drugs in nanofibers by capillary electrophoresis**. 2017. 222 f. (Master). Faculty Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2017.

Despite being one of the oldest and most well-known infectious diseases, tuberculosis (TB) remains the second leading cause of death after acquired immunodeficiency syndrome. TB is an infectious and transmissible disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) bacteria, which primarily affects the lungs, although it can affect other organs and systems. The present work aimed to develop nanofibers and nanospheres of poly (D, L-lactic co-glycolic) (PLGA) containing Active Pharmaceutical Ingredients (IPAs), rifampicin and isoniazid; to characterize them physical-chemically and to determine the encapsulation efficiency of these drugs by capillary electrophoresis (CE) and high-performance liquid chromatography (HPLC) methods. A CE method for determination of IPAs (isoniazid, rifampicin, pyrazinamide and ethambutol) was optimized through a design of mixing experiments with an extreme vertex approach using the Minitab 17 statistical Software. For the development of nanofibers and nanospheres the *electrospinning* and the emulsion/solvent evaporation techniques, respectively were used. Nanofibers were characterized by scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry (TGA). Nanospheres were characterized by dynamic light scattering (DLS), zeta potential, polydispersity index, pH, SEM, TEM, FTIR and DSC. The encapsulation efficiency of the IPAs in nanofibres and nanospheres was performed using two analytical techniques, HPLC and EC, previously validated. For nanofibers, the encapsulation efficiency were 12.16 % and 5.90 % for isoniazid and rifampicin, respectively by using HPLC method and 12,30 % for isoniazid and 6,36 % for rifampicin by CE method. The encapsulation efficiency for the best formulation of nanospheres was 2,33 % and 14,75 % for rifampicin and isoniazid, respectively by using HPLC method and 2,26 % for isoniazid and 14,22 % for rifampicin by CE method. It was shown that CE method presented a shorter analysis time (less than 6min) and also and adequate resolution between

the IPAs peaks. The time of analysis for the HPLC method was 10 min. CE method was less aggressive to the environment because it uses smaller amount of organic solvents. Therefore the CE is an alternative method to HPLC.

Key words: nanofibers, nanospheres, poly (D, L-lactic co-glycolic), antituberculosis drugs, high-performance liquid chromatography, capillary electrophoresis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número de casos novos de TB no Brasil (esquerda) e número de óbitos por TB no Brasil (direita) no período 2009-2013 (Fonte: Ministério da Saúde do Brasil) (PORTAL DA SAÚDE, 2017).

Figura 2: Percentual de cura entre os casos de TB no Brasil no período 2009-2013 (Fonte: Ministério da Saúde do Brasil) (PORTAL DA SAÚDE, 2017).

Figura 3: Representação esquemática da formula estrutural da RIFA ($C_{43}H_{58}N_4O_{12}$; PM 822,94) (CHEMICALIZE, 2017).

Figura 4: Representação esquemática da formula estrutural da ISO ($C_6H_7N_3O$; PM 137,14) (CHEMICALIZE, 2017).

Figura 5: Representação esquemática do processo de *electrospinning*.

Figura 6: Esquema ilustrativo da preparação de nanopartículas através do método de emulsificação/evaporação do solvente (ESPAÑOL MARIÑO adaptado de REIS, 2015).

Figura 7: Estrutura e hidrólise do copolímero de PLGA (FÉLIX LANAO *et al.*, 2007).

Figura 8: Via metabólica de bio-reabsorção dos poli (α -hidroxi ácidos) de PLA e PGA (FÉLIX LANAO *et al.*, 2007).

Figura 9: Representação de um equipamento de HPLC (CZAPLICKI, 2013).

Figura 10: Diagrama esquemático do sistema de CE (GERVASIO *et al.*, 2003).

Figura 11: Representação da elaboração das nanoesferas pelo método de emulsão simples (o/w).

Figura 12: Representação da elaboração das nanoesferas pelo método de emulsão doble (w/o/w).

Figura 13: Representação do preparo da amostra para sua determinação da eficiência de encapsulação através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Figura 14: Representação do preparo da amostra para sua determinação da eficiência de encapsulação através de eletroforese capilar.

Figura 15: Representação do preparo da amostra para sua determinação da carga dos Insumos Farmacêuticos Ativos através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Figura 16: Espectro de absorção do padrão de RIFA na região do infravermelho.

Figura 17: Espectro de absorção do padrão de ISO na região do infravermelho.

Figura 18: Curva de DSC do padrão de RIFA obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio a 50 mL min⁻¹ com uma razão de aquecimento de 10°C min⁻¹ no intervalo de temperatura entre 25 e 400°C.

Figura 19: Curva de DSC do padrão de ISO obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio a 50 mL min⁻¹ com uma razão de aquecimento de 10°C min⁻¹ no intervalo de temperatura entre 25 e 400°C.

Figura 20: Curva de TGA/DTA do padrão de RIFA obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio a 50 mL min⁻¹ com uma razão de aquecimento de 10°C min⁻¹ no intervalo de temperatura entre 25 e 900°C.

Figura 21: Curva de TGA/DTA do padrão de ISO obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio a 50 mL min⁻¹ com uma razão de aquecimento de 10°C min⁻¹ no intervalo de temperatura entre 25 e 900°C.

Figura 22: Espectros de absorção obtidos na região do UV-Vis do padrão de RIFA, na concentração de 50,0 µg mL⁻¹ em etanol.

Figura 23: Espectros de absorção obtidos na região do UV-Vis do padrão de ISO, na concentração de 50,0 µg mL⁻¹ em etanol.

Figura 24: Micrografia SEM A da nanofibra vazia.

Figura 25: Micrografia SEM B da nanofibra contendo RIFA e ISO (8,6 % de cada IFA).

Figura 26: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das partículas na micrografia SEM A.

Figura 27: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das partículas na micrografia SEM B.

Figura 28: Micrografia SEM C da nanofibra vazia.

Figura 29: Micrografia SEM D da nanofibra contendo RIFA e ISO (8,6% de cada IFA).

Figura 30: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das partículas na micrografia SEM C.

Figura 31: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das partículas na micrografia SEM D.

Figura 32: Micrografia TEM A da nanofibra vazia.

Figura 33: Micrografia TEM B da nanofibra contendo RIFA e ISO (8,6 % de cada IFA).

Figura 34: Micrografia TEM C da nanofibra vazia.

Figura 35: Micrografia TEM D da nanofibra contendo RIFA e ISO (8,6 % de cada IFA).

Figura 36: Micrografia TEM E da nanofibra vazia.

Figura 37: Micrografia TEM F da nanofibra contendo RIFA e ISO (8,6 % de cada IFA).

Figura 38: Micrografia TEM G da nanofibra vazia.

Figura 39: Micrografia TEM H da nanofibra contendo RIFA e ISO (8,6 % de cada IFA).

Figura 40: Micrografia TEM I da nanofibra vazia.

Figura 41: Micrografia TEM J da nanofibra contendo RIFA e ISO (8,6 % de cada IFA).

Figura 42: Micrografia TEM K da nanofibra vazia.

Figura 43: Micrografia TEM L da nanofibra contendo RIFA e ISO (8,6 % de cada IFA).

Figura 44: Micrografia TEM M da nanofibra vazia.

Figura 45: Micrografia TEM N da nanofibra vazia.

Figura 46: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanofibras vazias.

Figura 47: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanofibras contendo RIFA e ISO (8,6 % de cada IFA)

Figura 48: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das partículas na formulação de nanofibras vazias.

Figura 49: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das partículas na formulação de nanofibras contendo RIFA e ISO (8,6 % de cada IFA).

Figura 50: Espectros de absorção da RIFA, ISO, PLGA, nanofibras de PLGA vazia e nanofibra de PLGA com RIFA e ISO na região do infravermelho.

Figura 51: Curvas de DSC de RIFA, ISO, PLGA, nanofibras de PLGA vazia e nanofibra de PLGA contendo RIFA e ISO.

Figura 52: Curva de TGA de PLGA puro.

Figura 53: Curva de TGA da mistura física de PLGA, RIFA e ISO (1:1:1).

Figura 54: Curva de TGA de nanofibras de PLGA vazia.

Figura 55: Curva de TGA de nanofibras de PLGA contendo RIFA e ISO.

Figura 56: Micrografia SEM da formulação F02.

Figura 57: Micrografia SEM da formulação F03.

Figura 58: Micrografia SEM da formulação F05.

Figura 59: Micrografia SEM da formulação F08.

Figura 60: Micrografia SEM da formulação F09.

Figura 61: Micrografia SEM da formulação F11.

Figura 62: Micrografia SEM da formulação F12.

Figura 63: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas

da formulação F02.

Figura 64: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas

da formulação F03.

Figura 65: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F05.

Figura 66: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F08.

Figura 67: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F09.

Figura 68: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas

da formulação F11.

Figura 69: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F12.

Figura 70: Micrografia SEM da formulação F02.

Figura 71: Micrografia SEM da formulação F03.

Figura 72: Micrografia SEM da formulação F05.

Figura 73: Micrografia SEM da formulação F08.

Figura 74: Micrografia SEM da formulação F09.

Figura 75: Micrografia SEM da formulação F11.

Figura 76: Micrografia SEM da formulação F12.

Figura 77: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F02.

Figura 78: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F03.

Figura 79: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F05.

Figura 80: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F08.

Figura 81: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F09.

Figura 82: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F11.

Figura 83: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F12.

Figura 84: Micrografia TEM A da nanoesfera da formulação F03 contendo RIFA e ISO.

Figura 85: Micrografia TEM B da nanoesfera da formulação F03 contendo RIFA.

Figura 86: Micrografia TEM C da nanoesfera da formulação F03 contendo RIFA e ISO.

Figura 87: Micrografia TEM D da nanoesfera da formulação F03 contendo RIFA.

Figura 88: Micrografia TEM E da nanoesfera da formulação F03 contendo RIFA e ISO.

Figura 89: Micrografia TEM F da nanoesfera da formulação F03 contendo RIFA.

Figura 90: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F03 contendo RIFA e ISO.

Figura 91: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F03 contendo RIFA.

Figura 92: Espectros de absorção na região do infravermelho da RIFA, ISO, PLGA, mistura física de RIFA, ISO e PLGA (1:1:1), nanoesferas de PLGA vazia (formulação F03), nanoesferas de PLGA com RIFA (formulação F03) e nanoesferas de PLGA com RIFA e ISO (formulação F03).

Figura 93: Curva de DSC da RIFA, ISO, PLGA, mistura física de RIFA, ISO e PLGA (1:1:1), nanoesferas de PLGA vazia (formulação F03), nanoesferas de PLGA com RIFA (formulação F03) e nanoesferas de PLGA com RIFA e ISO (formulação F03).

Figura 94: Cromatograma da RIFA ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), ISO ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), e a dexametasona ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Fase móvel: ACN:água Milli-Q com 0,1 % de ácido fórmico (pH 3) em eluição por gradiente: de 0 a 4 minutos= 20:80, v/v; de 4,1 a 10 minutos= 70:30, v/v e de 10,1 a 20 minutos= 20:80, v/v; fluxo: $0,8 \text{ mL min}^{-1}$; coluna: Synergi™ Fusion-RP 80 Å (4,6 mm de D.I. x 25 cm, 4 μm); temperatura: 30 °C; detecção: 260 nm.

Figura 95: Curva analítica da ISO na faixa de concentrações de $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 96: Curva analítica da RIFA na faixa de concentrações de $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 97: Cromatograma das nanoesferas vazias. Fase móvel: ACN:água Milli-Q com 0,1 % de ácido fórmico (pH 3) em eluição por gradiente: de 0 a 4 minutos= 20:80, v/v; de 4,1 a 10 minutos= 70:30, v/v e de 10,1 a 20 minutos= 20:80, v/v; fluxo: $0,8 \text{ mL min}^{-1}$; coluna: Synergi™ Fusion-RP 80 Å (4,6 mm de D.I. x 25 cm, 4 μm); temperatura: 30 °C; detecção: 260 nm.

Figura 98: Cromatograma das nanopartículas contendo os IFAs, RIFA e ISO, e o padrão interno, dexametasona ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Fase móvel: ACN:água Milli-Q com 0,1 % de ácido fórmico (pH 3) em eluição por gradiente: de 0 a 4 minutos= 20:80, v/v; de 4,1 a 10 minutos= 70:30, v/v e de 10,1 a 20 minutos= 20:80, v/v; fluxo: $0,8 \text{ mL min}^{-1}$; coluna: Synergi™ Fusion-RP 80 Å (4,6 mm de D.I. x 25 cm, 4 μm); temperatura: 30 °C; detecção: 260 nm.

Figura 99: Cromatograma das nanofibras vazias. Fase móvel: ACN:água Milli-Q com 0,1 % de ácido fórmico (pH 3) em eluição por gradiente: de 0 a 4 minutos= 20:80, v/v; de 4,1 a 10 minutos= 70:30, v/v e de 10,1 a 20 minutos= 20:80, v/v;

fluxo: 0,8 mL min⁻¹; coluna: Synergi™ Fusion-RP 80 Å (4,6 mm de D.I. x 25 cm, 4 µm); temperatura: 30 °C; detecção: 260 nm.

Figura 100: Cromatograma das nanofibras contendo os IFAs, RIFA e ISO, e o padrão interno, dexametasona (100,0 µg mL⁻¹). Fase móvel: ACN:água Milli-Q com 0,1 % de ácido fórmico (pH 3) em eluição por gradiente: de 0 a 4 minutos= 20:80, v/v; de 4,1 a 10 minutos= 70:30, v/v e de 10,1 a 20 minutos= 20:80, v/v; coluna: Synergi™ Fusion-RP 80 Å (4,6 mm de D.I. x 25 cm, 4 µm); temperatura: 30 °C; detecção: 260 nm.

Figura 101: Sistema de microemulsão o/w adaptado de ALTRIA, CLARK, MAHUZIER,2000 e DA SILVA, 2007.

Figura 102: Eletroferograma da análise de cloridrato de etambutol (E), pirazinamida (P), clozapina (padrão interno) (C), isoniazida (I) e rifampicina (R). Concentrações de 200,0 µg mL⁻¹ de R, I e de E; concentração de 150,0 µg mL⁻¹ de P e concentração de 100,0 µg mL⁻¹ de C. Condições: Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50 µm D.I.; injeção hidrodinâmica por pressão de 0,5 psi/5s; injeção normal; voltagem aplicada: +30 kV (corrente: 24,4 µA); temperatura do capilar: 15°C; temperatura do amostrador: 10°C; detecção UV em 207 nm; eletrólito: 0,5 % (w/w) de acetato de etila, 1,2 % (w/w) de butan-1-ol, 0,6 % (w/w) de dodecilsulfato sódico, 5,5 % (v/v) de 2-propanol, 37,7 % (v/v) de acetona e 54,5 % (w/w) de 10 mmol L⁻¹ de tampão aquoso de tetraborato de sódio a pH 9,2.

Figura 103: Eletroferograma da análise de cloridrato de etambutol (E), pirazinamida (P), diazepam (padrão interno) (D), isoniazida (I) e rifampicina (R). Concentrações de 800,0 µg mL⁻¹ de E; 190,0 µg mL⁻¹ de P; 200 µg mL⁻¹ de I; 260 µg mL⁻¹ de R de 60,0 µg mL⁻¹ de D. Condições: Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50 µm D.I.; injeção hidrodinâmica por pressão de 0,5 psi/5s; injeção normal; voltagem aplicada: +30 kV (corrente: 18,9 µA); temperatura do capilar: 15°C; temperatura do amostrador: 10°C; detecção UV em 207 nm; eletrólito: 0,5 % (w/w) de acetato de etila, 1,2 % (w/w) de butan-1-ol, 0,6 % (w/w) de dodecilsulfato sódico, 5,5 % (v/v) de 2-propanol, 37,7 % (v/v) de acetona e 54,5 % (w/w) de 10 mmol L⁻¹ de tampão aquoso de tetraborato de sódio a pH 9,2.

Figura 104: Gráfico do espaço experimental empregando um delineamento de misturas usando uma abordagem de vértices extremos para o efeito de diferentes combinações dos componentes: acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C).

Figura 105: Gráfico de contorno de mistura para o efeito de diferentes combinações dos componentes: acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) sobre o tempo de retenção do ETA.

Figura 106: Gráfico de contorno de mistura para o efeito de diferentes combinações dos componentes: acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) sobre o tempo de retenção do PZA.

Figura 107: Gráfico de contorno de mistura para o efeito de diferentes combinações dos componentes: acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) sobre o tempo de retenção do DZP.

Figura 108: Gráfico de traço de resposta de Cox adaptado para o tempo de retenção de ETA versus as proporções de desvios dos componentes de acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) da melhor mistura encontrada com a ferramenta de otimizador de resposta (37,7 % de A; 5,5 % de B; 54,5 % de C) para A (linha azul), B (linha vermelha) e C (linha verde).

Figura 109: Gráfico de traço de resposta de Cox adaptado para o tempo de retenção de PZA versus as proporções de desvios dos componentes de acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) da melhor mistura encontrada com a ferramenta de otimizador de resposta (37,7 % de A; 5,5 % de B; 54,5 % de C) para A (linha azul), B (linha vermelha) e C (linha verde).

Figura 110: Gráfico de traço de resposta de Cox adaptado para o tempo de retenção de DZP versus as proporções de desvios dos componentes de acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) da melhor mistura encontrada com a ferramenta de otimizador de resposta (37,7 %

de A; 5,5 % de B; 54,5 % de C) para A (linha azul), B (linha vermelha) e C (linha verde).

Figura 111: Gráfico de contorno de mistura para o efeito de diferentes combinações dos componentes: acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) sobre o tempo de retenção da ISO.

Figura 112: Gráfico de traço de resposta de Cox adaptado para o tempo de retenção de ISO versus as proporções de desvios dos componentes de acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) da melhor mistura encontrada com a ferramenta de otimizador de resposta (37,7 % de A; 5,5 % de B; 54,5 % de C) para A (linha azul), B (linha vermelha) e C (linha verde).

Figura 113: Gráfico de contorno de mistura para o efeito de diferentes combinações dos componentes: acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) sobre o tempo de retenção da RIFA.

Figura 114: Gráfico de traço de resposta de Cox adaptado para o tempo de retenção de RIFA versus as proporções de desvios dos componentes de acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) da melhor mistura encontrada com a ferramenta de otimizador de resposta (37,7 % de A; 5,5 % de B; 54,5 % de C) para A (linha azul), B (linha vermelha) e C (linha verde).

Figura 115: Gráficos de otimização para o efeito de diferentes combinações dos componentes: acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) sobre o tempo de retenção e resolução dos IFAs.

Figura 116: Eletroferograma da análise de cloridrato de etambutol (E), pirazinamida (P), padrão interno de diazepam (D), isoniazida (I) e rifampicina (R). Concentrações de 800,0 µg mL⁻¹ de E; 190,0 µg mL⁻¹ de P; 200 µg mL⁻¹ de I; 240 µg mL⁻¹ de R e 60,0 µg mL⁻¹ de D. Condições: Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50 µm D.I.; injeção hidrodinâmica por pressão de 0,5 psi/5s; voltagem aplicada: -30,0 kV (corrente: -25,0 µA); temperatura: 15°C na coluna e 10°C no

amostrador. Detecção UV em 207 nm. Eletrólito: 0,5 % (w/w) de acetato de etila, 1,2 % (w/w) de butan-1-ol, 0,6 % (w/w) de dodecilsulfato sódico, 5,5 % (v/v) de 2-propanol, 37,7 % (v/v) de acetona e 54,5 % (w/w) de 10 mmol L⁻¹ de tampão aquoso de tetraborato de sódio a pH 9,2.

Figura 117: Princípio de separação por MEEKC adaptado de MAHUZIER *et al.*, 2003 e DA SILVA, 2007.

Figura 118: Curva analítica da ISO na faixa de concentrações de 160,00 µg mL⁻¹ a 240 µg mL⁻¹.

Figura 119: Curva analítica da RIFA na faixa de concentrações de 192,00 µg mL⁻¹ a 288 µg mL⁻¹.

Figura 120: (a) Eletroferograma das nanofibras; (b) eletroferograma das nanoesferas (formulação F03); (c) eletroferograma da ISO e a RIFA a uma concentração de 200 µg mL⁻¹ e 240 µg mL⁻¹, respectivamente; (d) eletroferograma do placebo da nanoestrutura de PLGA e (e) eletroferograma do eletrólito. Condições: Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50 µm D.I.; injeção hidrodinâmica por pressão de 0,5 psi/5 s; injeção pelo *outlet*; voltagem aplicada: -30,0 kV (corrente: -25,0 µA); temperatura: 15°C na coluna e 10°C no amostrador. Detecção UV em 207 nm. Eletrólito: 0,5 % (w/w) de acetato de etila, 1,2 % (w/w) de butan-1-ol, 0,6 % (w/w) de dodecilsulfato sódico, 5,5 % (v/v) de 2-propanol, 37,7 % (v/v) de acetona e 54,5 % (w/w) de 10 mmol L⁻¹ de tampão aquoso de tetraborato de sódio a pH 9,2.

Figura 121: Eficiência de encapsulação vs. média dos diâmetros das nanoesferas contendo RIFA e ISO encontradas na literatura.

Figura 122: Eficiência de encapsulação através de HPLC vs. média dos diâmetros através do DLS das nanoesferas de PLGA contendo RIFA e ISO (formulações: F01 até F12).

Figura 123: Eficiência de encapsulação vs. média dos diâmetros das nanofibras contendo RIFA e ISO encontradas na literatura.

Figura 124: Eficiência de encapsulação das nanoesferas da formulação F03 empregando as técnicas de CE e HPLC.

Figura 125: Eficiência de encapsulação das nanofibras empregando as técnicas de CE e HPLC.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados obtidos para determinação do ponto fusão dos padrões de RIFA e ISO.

Tabela 2: Bandas do espectro de absorção na região infravermelho de RIFA encontradas na literatura (ALVES, 2007; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009; NERDY, DE LUX PUTRA, HADI TIAHONO, 2014).

Tabela 3: Bandas do espectro de absorção na região do infravermelho de ISO encontradas na literatura (BORBA, GÓMEZ- ZAVAGLIA, FAUSTO, 2009; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009; NERDY, DE LUX PUTRA, HADI TIAHONO, 2014).

Tabela 4: Eventos térmicos na curva DSC do padrão de RIFA.

Tabela 5: Eventos térmicos na curva DSC do padrão de ISO.

Tabela 6: Eventos térmicos na curva TGA/DTA do padrão de RIFA.

Tabela 7: Eventos térmicos na curva TGA/DTA do padrão de ISO.

Tabela 8: Comprimento de absorção máxima na região do UV-Vis para a os padrões de RIFA e ISO.

Tabela 9: Caracterização das nanoesferas de PLGA. Tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH.

Tabela 10: Caracterização das nanoesferas de PLGA da formulação com maior eficiência de encapsulação (F03): vazia, com RIFA, com RIFA e ISO. Tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH.

Tabela 11: Resultados experimentais obtidos na determinação da curva analítica da ISO através do método de HPLC.

Tabela 12: Resultados experimentais obtidos na determinação da curva analítica da RIFA através do método de HPLC.

Tabela 13: Resultados experimentais obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação da RIFA e ISO através de HPLC.

Tabela 14: Precisão do método através de HPLC para determinação da RIFA e ISO em nanoesferas.

Tabela 15: Precisão do método através de HPLC para determinação da RIFA e ISO em nanofibras.

Tabela 16: Concentração teórica, concentração obtida e percentagem de recuperação do teste de exatidão do método de determinação de RIFA e ISO nas nanoesferas vazias através de HPLC.

Tabela 17: Concentração teórica, concentração obtida e percentagem de recuperação do teste de exatidão do método de determinação de RIFA e ISO nas nanofibras vazias através de HPLC.

Tabela 18: Ensaios empregando injeção pelo *inlet* e voltagem de +30kV para a escolha da melhor proporção de acetona, 2-propanol e 10 mmol L⁻¹ de TBS a pH 9.

Tabela 19: Ensaios empregando injeção pelo *outlet* e voltagem de +30 kV para a escolha da melhor proporção de acetona (A), 2-propanol (B) e 10mM de TBS a pH 9 (C), voltagem +30 kV.

Tabela 20: Análise de variância para as respostas ajustadas dos diferentes modelos para todos os fármacos (ETA, PZA, DZP, ISO e RIFA)

Tabela 21: Modelo previsto para o tempo de retenção e resolução das fórmulas contendo diferentes concentrações de acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C).

Tabela 22: Resultados experimentais obtidos na determinação da curva analítica da ISO através do método de CE..

Tabela 23: Resultados experimentais obtidos na determinação da curva analítica da RIFA através do método de CE.

Tabela 24: Resultados experimentais obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação da RIFA e ISO através de CE.

Tabela 25: Precisão do método através de CE para quantificação da RIFA e ISO em nanoesferas.

Tabela 26: Precisão do método através de CE para quantificação da RIFA e ISO em nanofibras.

Tabela 27: Concentração teórica, concentração obtida e percentagem de recuperação do teste de exatidão do método de quantificação de RIFA e ISO nas nanopartículas vazias através de CE.

Tabela 28: Concentração teórica, concentração obtida e percentagem de recuperação do teste de exatidão do método de quantificação de RIFA e ISO nas nanofibras vazias através de HPLC.

Tabela 29: Eficiência de encapsulação das nanoesferas de PLGA através de HPLC.

Tabela 30: Eficiência de encapsulação das nanoesferas da formulação F03 empregando as técnicas de CE e HPLC.

Tabela 31: Eficiência de encapsulação das nanofibras empregando as técnicas de CE e HPLC.

Tabela 32: Cálculo da massa real das nanoesferas liofilizadas.

Tabela 33: Carga dos fármacos das nanoesferas de PLGA das formulações F03 e F12 em relação à massa final e à massa inicial através de HPLC das nanoesferas

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Cobertura de serviços contra a TB no Brasil no período 2009-2013 (Fonte: Ministério da Saúde do Brasil) (PORTAL DA SAÚDE, 2016).

Quadro 2: Método de electrospinning para a elaboração das fibras contendo IFAs encapsulados (2006-2016).

Quadro 3: Técnicas analíticas de quantificação empregadas na avaliação das fibras contendo IFAs encapsulados preparadas através do método de electrospinning (2006-2016).

Quadro 4: Condições de trabalho utilizadas para a determinação e quantificação simultânea de RIFA e ISO através da HPLC em apresentações farmacêuticas.

Quadro 5: Condições de trabalho utilizadas para a determinação e quantificação simultânea de RIFA e ISO através da CE em apresentações farmacêuticas.

Quadro 6: Denominação das amostras das nanoesferas elaboradas empregando a técnica de emulsão simples (o/w).

Quadro 7: Formulações desenvolvidas empregando a técnica de emulsão doble (w/o/w).

Quadro 8: Condições cromatográficas para a avaliação da eficiência de encapsulação de RIFA e ISO em nanoestruturas através de HPLC.

Quadro 9: Variantes no método de *electrospinning* para a elaboração das nanofibras contendo a RIFA e ISO.

Quadro 10: Condições eletroforeticas para a avaliação da eficiência de encapsulação de RIFA e ISO em nanoestruturas através de CE.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% CF, % DL: Carga dos IFAs

% EE: Eficiência de encapsulação

%_{DCM}: Proporção de diclorometano

%_{DMF}: Proporção de dimetilformamida

λ : Comprimento de onda

(A/A)**: Relação das áreas dos picos (analito/padrão interno)

*: Média de três valores

[P (3HB-co-95 mol % 4HB)]: Polihidroxialcanoato (poli (3- hidroxibutirato-co-4- hidroxibutirato)

[Poli (VBA-co-VBTAC)]: Poli (4- ácido vinilbenzoico-co- (ar-vinilbenzil) cloreto de trimetilamônio)

ΔH : Entalpia

3D: Três dimensões

A: acetona

a: Intercepto

ACN: Acetonitrila

AFM: Microscopia de força atômica

ANOVA: Análise de variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATPases: ATPasas

B: 2-propanol

b: Inclinação

BK: *Bacilo de Koch*

BSA: Albumina de soro bovino

C: 10 mmol L⁻¹ de TBS a pH 9

C: Clozapina

C18, ODS octadecil, C₁₈ column, R18 column, ODS column: Coluna C₁₈

C₂H₆O: Etanol

C₃H₆O: Acetona

CA: Acetato de celulosa

Ca²⁺: Calcio²⁺

CAF Cafeína

CE: Eletroforese capilar

CH₂O₂: Ácido fórmico

CH₃OH, MeOH: Metanol

CHI: Quitosana

C_{IFA1 ou 2}: Concentração desejada para o IFA 1 ou 2 em relação a mistura de solventes

CMD: Concentração média determinada em porcentagem

CMI: Concentração mínima inibitória

CN: Cianopropil

CO₂: Dióxido de carbono

C_{PLGA}: Concentração desejada para o PLGA em relação a mistura de solventes

CQ: Cloroquina

C_{Teórica do Fco1 ou 2}: Concentração teórica de cada IFA considerando o tempo do processo de *electrospinning*

Cu⁺²: Cobre ⁺²

CuSO₄. 5H₂O: Sulfato de cobre pentahidratado

CYP450: Citocromo P450

CZE: Eletroforese capilar em zona

D.I.: Diâmetro interno

D: Desejabilidade parcial

D: Função de desejabilidade de Derringer

DCM: Diclorometano

Ddp: Diferença de potencial

df: Graus de liberdade total

DFCs: Comprimidos de dose fixa combinada

DLS: Espalhamento de luz dinâmico

DMF: Dimetil formamida

DMSO: Dimetilsulfoxido

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DoE: Desenho de experimentos
DP: Desvio padrão
DPM: Desvio padrão médio
DSC: Calorimetria exploratória diferencial
DZP: Diazepam
EC: Etilcelulose
EOF: Fluxo eletrosmótico
ETA: Cloridrato de etambutol
F.A: Fase aquosa
F.O: Fase orgânica
FA: Ácido fusídico
FDA: Administração de alimentos e medicamentos
FURP: Fundação para o Remédio Popular “Chopin Tavares de Lima”
G: Gauge
GA: Glutaraldeído
GC: Cromatografia gasosa
H⁺: Hidrogênio
H₂O: Água
H₂O: Água deionizada
HCl: Ácido clorídrico.
HFP: 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
HIV: Vírus de imunodeficiência humana
HPC: Hidroxipropilcelulose
HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-MS: Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de massas.
HPMCAS: Acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulose
ICH: Comitê internacional de harmonização
ICP-MS: Espectrometria de massas indutivamente acoplado ao plasma
IFAs: Insumos Farmacêuticos Ativos
in: Inch
ISO: Isoniazida
IUPAC: União Internacional da Química Pura e Aplicada

IV: Infravermelho

KatG: Enzima catalasa/peroxidase

KH_2PO_4 : Fósforo de potássio monobásico

LD: Limite de detecção

Log D: Coeficiente de distribuição

Log P: Coeficiente de partição óleo-água

Log S: Solubilidade em água

LQ: Limite de quantificação

MDR-TB: Bacilos multirresistentes

MEEKC: Cromatografia capilar eletrocinética em microemulsão

MEKC: Cromatografia eletrocinética micelar

mIFA 1 ou 2: Gramas de IFA 1 ou 2

$m_{\text{mistura de solventes}}$: Gramas de mistura de solventes

$m_{\text{mistura de solventes}}$: Gramas de mistura de dissolventes

$m_{\text{na agulha externa}}$: Gramas totais na agulha externa considerando o tempo do processo de *electrospinning*

$m_{\text{na agulha interna}}$: Gramas totais na agulha interna considerando o tempo do processo de *electrospinning*

m_{PLGA} : Gramas de PLGA

Mtb Mycobacterium tuberculosis

MWCNTs: Nanotubos de carbono multiparedes

NaAlg: Alginato de sódio

NaCl: Cloreto de sódio

NaH_2PO_4 : Fósforo de sódio monobásico

NaHCO_3 : Bicarbonato de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

NAP Naproxen

NH_2 : Amina

n-HA: Nano-hidroxipatita

NPs: Nanopartículas

o/w: óleo/água

P': Índice de polaridade

p: Valor de p

PAA: Poli (ácido acrílico)
PACA: Poli alquil cianoacrilato
PBCA: Poli (n-Butil cianoacrilato)
PBS: Buffer salino fosfato
PCL: Poli (ϵ -caprolactona)
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PDA: Detector de arranjo de fotodiodos
PDLLA: Poli (D,L-lactídeo)
PE-b-PEO: Poli (etileno)-b-poli (óxido de etileno)
PEG diacrylate: Polietilenoglicol diacrilato
PEIC: Isocianato de fenetilo
PEO: Grupos oxietilenicos
PEO: Poli (óxido de etileno)
PGA: Ácido poliglicólico
PGC-C18: Poli (glicerol monostearato-co- ϵ - caprolactona)
pH: Potencial de hidrogênio
PLA: Copolímero de ácido poliláctico
PLA: Poliacido láctico
PLCL: Poli (láctico- ϵ -caprolactone)
PLDLA: Poli (L-lactideo-co-D/L-lactideo)
PLGA: Poli (D, L-láctico co-glicólico)
PLGA: Poli (D, L-láctico co-glicólico)
PLGA: Poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico)
PLL: Poli (ácido láctico-co-lisina)
PLLA: Poli (L-ácido láctico)
PMMA: Polimetacrilato de metila
PncA: Gene que codifica pirazinamidase em espécies de *Mycobacterium*
PNIPAAm: Poli (N-isopropilacrilamida)
PNIPAM: Poli (N-isopropilacrilamida)
PPO: Grupos oxipropilenicos
PU: Poliuretano
PVA: Álcool polivinílico
PVA: Álcool polivinílico

PVP K60: Polivinilpirrolidona K60

PVP: Polivinilpirrolidona

PZA: Pirazinamida

R: Resolução

R² ajustado: Coeficiente de determinação múltipla ajustada

R² previsto: Coeficiente de determinação de predição

R²: Coeficiente de determinação múltipla

Retin-A: Vitamina A

RHOD Rodamina B

RIFA: Rifampicina

RNAm: RNA mensageiro

ROI: Intermediários reativos de oxigênio

RP-18, ODS: Coluna C₁₈ para fase reversa

RP8 octil, C₈: Coluna C₈

RTR-TB: Rede de Teste Rápido para TB

S: Inclinação

Sa: Desvio padrão do intercepto

SAS: Secretaria de Atenção à Saúde

SDS: Dodecilsulfato de sódio

SEM: Microscopia eletrônica de varredura

Seq SS: Soma dos quadrados sequencial

SF: Sal de sodio de ácido fusídico

SINAN Sistema de informação de enfermidades de notificação

SPM: Microscópios de varredura por sonda

SUM: Succinato de sumatriptan

TB: Tuberculose

tBAH: Hidróxido de tetrabutylamônio

TB-HIV Tuberculosis-vírus de imunodeficiência humana

TBS: Tampão tetraborato de sódio

TBS: Tetraborato de sódio

TEA: Trietilamina

TEM: Microscopia eletrônica de transmissão

TGA/DTA: Termogravimetria/termogravimetria derivada

THF: Tetrahidrofurano

Tr: tempo de retenção

TRM-TB: Teste rápido molecular para TB

UV: Ultravioleta

UV-Vis: Ultravioleta- visível

UV-Vis: UV-visível

UV-Vis: UV-visível

ν : Frequência vibracional

V: Mililitros de solução eletrofiável considerando o tempo de processo de *electrospinning* e a velocidade de ejeção da agulha interna

Vit-E: Vitamina E

$V_{\text{mistura de solventes}}$: Mililitros de mistura de solventes

w/o/w: água/óleo/água

XDR-TB: Bacilos extremamente resistentes

Λ_{ex} : comprimento de onda de máxima fluorescência

ρ_{DCM} : Densidade de diclorometano

ρ_{DMF} : Densidade de dimetilformamida

$\rho_{\text{IFA1 ou 2}}$: Densidade do IFA 1 ou 2

ρ_{PLGA} : Densidade de PLGA

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Cálculo da massa para o polímero (PLGA) para obtenção da concentração desejada para o polímero em relação à mistura de solventes.

Equação 2: Cálculo da massa de cada IFA para obtenção da concentração desejada para cada IFA em relação à mistura de solventes.

Equação 3: Cálculo da massa total na agulha interna considerando o tempo do processo de *electrospinning*.

Equação 4: Cálculo da massa total na agulha externa considerando o tempo do processo de *electrospinning*.

Equação 5: Cálculo da concentração teórica de cada IFA considerando o tempo do processo de *electrospinning*.

Equação 6: Cálculo do limite de detecção.

Equação 7: Cálculo do limite de quantificação.

Equação 8: Cálculo do desvio padrão relativo.

Equação 9: Cálculo da eficiência de encapsulação para as nanoestruturas.

Equação 10: Cálculo da carga do IFA para as nanoesferas.

Equação 11: Cálculo do valor da desejabilidade de Derringer.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	40
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	45
2.1. Tuberculose	45
2.1.1. Agente etiológico.....	46
2.1.2. Patogenia	47
2.1.3. Diagnóstico laboratorial	48
2.1.4. Fármacos antituberculose	49
2.1.5. Fármacos de primeira escolha	50
2.1.5.1. Rifampicina	50
2.1.5.2. Isoniazida	51
2.1.6. Resistência micobacteriana	52
2.2. Nanotecnologia na saúde	53
2.2.1. Nanofibras	53
2.2.1.1. Técnica de <i>electrospinning</i>	66
2.2.2. Nanopartículas poliméricas	68
2.2.2.1. Técnica de emulsão/evaporação de solvente.....	69
2.2.3. Copolímero de PLGA	69
2.2.4. Caracterizações físico-químicas	71
A. Avaliação morfológica	71
B. Potencial zeta	71
C. Determinação do pH	72
D. Distribuição do tamanho de partícula	73
E. Calorimetria exploratória diferencial	74
F. Termogravimetria/termogravimetria derivada	75
G. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho	75
2.2.5. Determinação da eficiência de encapsulação dos Insumos Farmacêuticos Ativos	75
2.2.5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência	76
2.2.5.2. Eletroforese capilar	77
2.2.5.3. Comparação de eletroforese capilar com outras técnicas	79
2.2.5.4. Validação de métodos analíticos	79

A. Linearidade	80
B. Limites de detecção e quantificação	80
C. Precisão	80
D. Especificidade e seletividade	81
E. Exatidão	81
F. Robustez	81
2.2.6. Referências para determinação dos Insumos Farmacêuticos Ativos por cromatografia líquida de alta eficiência	82
2.2.7. Referências para determinação dos Insumos Farmacêuticos Ativos por eletroforese capilar	83
3. OBJETIVOS	84
3.1. Objetivo geral	84
3.2. Objetivos específicos.....	84
4. MATERIAIS E MÉTODOS	85
4.1. Materiais	85
4.1.1. Solventes e reagentes	85
4.1.2. Substâncias ativas	86
4.1.3. Equipamentos	86
4.2. Métodos	88
4.2.1. Caracterização dos padrões	88
4.2.1.1. Ponto de fusão dos padrões	88
4.2.1.2. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho dos padrões.....	88
4.2.1.3. Análise térmica dos padrões	89
A. Calorimetria exploratória diferencial dos padrões	89
B. Termogravimetria/termogravimetria derivada dos padrões	89
4.2.1.4. Determinação do espectro de absorção por espectrofotometria ultravioleta-visível dos padrões	89
4.2.2. Desenvolvimento das nanofibras pela técnica de <i>electrospinning</i>	89
4.2.3. Caracterização físico-química das nanofibras	93
A. Microscopia eletrônica de varredura.....	93

B. Microscopia eletrônica de transmissão.....	93
C. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho	93
D. Análise termoanalítico	93
D.1. Calorimetria exploratória diferencial	93
D.2. Termogravimetria	94
4.2.4. Desenvolvimento das nanoesferas pelo método de emulsão simples (o/w)	94
4.2.5. Desenvolvimento das nanoesferas pelo método de doble emulsão (w/o/w)	96
4.2.6. Liofilização	97
4.2.7. Caracterização físico-química das nanoesferas	98
A. Distribuição de tamanho de partícula	98
B. Potencial zeta	98
C. Microscopia eletrônica de varredura	98
D. Microscopia eletrônica de transmissão	99
E. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho	99
F. Calorimetria exploratória diferencial	99
4.2.8. Método de determinação dos Insumos Farmacêuticos Ativos através de cromatografia líquida de alta eficiência	99
4.2.9. Método de determinação dos Insumos Farmacêuticos Ativos através de eletroforese capilar	100
4.2.10. Otimização do método eletroforético para determinação dos Insumos Farmacêuticos Ativos empregando um delineamento de misturas	100
4.2.11. Validação dos métodos analíticos para a determinação da eficiência de encapsulação dos os Insumos Farmacêuticos Ativos dentro das nanoestruturas de PLGA através de cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar	101
A. Linearidade	101
B. Especificidade	101
C. Limite de detecção e limite de quantificação	101
D. Precisão do método	102

4.2.12. Determinação da eficiência de incorporação dos Insumos Farmacêuticos Ativos	102
A. Eficiência de encapsulação dos Insumos Farmacêuticos Ativos	102
A.1. Determinação da eficiência de encapsulação através de cromatografia líquida de alta eficiência	102
A.2. Determinação da eficiência de encapsulação através de eletroforese capilar.....	104
B. Determinação da carga dos dos Insumos Farmacêuticos Ativos. através de cromatografia líquida de alta eficiência.....	105
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
5.1. Caracterização dos padrões	107
5.1.1. Ponto de fusão dos padrões	107
5.1.2. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho dos padrões	107
5.1.3. Análise térmica dos padrões	109
5.1.3.1. Calorimetria exploratória diferencial dos padrões	109
5.1.3.2. Termogravimetria/termogravimetria derivada dos padrões	111
5.1.4. Determinação do espectro de absorção por espectrofotometria ultravioleta- visível dos padrões	112
5.2. Desenvolvimento das nanofibras pelo método de <i>electrospinning</i>	114
5.3. Caracterização físico-química das nanofibras	114
A. Microscopia eletrônica de varredura	114
B. Microscopia eletrônica de transmissão	116
C. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho	120
D. Análise térmica	121
D.1. Calorimetria exploratória diferencial	121
D.2. Termogravimetria	124
5.4. Desenvolvimento das nanoesferas pelo método de emulsão simples (o/w) e emulsão doble (w/o/w)	127
5.5. Caracterizações físico-química das nanoesferas	128

A. Distribuição de tamanho de partícula.....	128
B. Potencial zeta	134
C. Índice da polidispersão	135
D. Determinação de pH	136
E. Microscopia eletrônica de varredura	136
F. Microscopia eletrônica de transmissão	139
G. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho	141
H. Calorimetria exploratória diferencial	144
5.6.Método de determinação dos Insumos Farmacêuticos Ativos através de cromatografia líquida de alta eficiência	146
5.7.Validação dos métodos analíticos para a determinação da eficiência de incorporação dos Insumos Farmacêuticos Ativos dentro das nanoestruturas através de cromatografia líquida de alta eficiência	147
A. Linearidade	147
B. Especificidade	149
C. Limite de detecção e limite de quantificação	151
D. Precisão (repetibilidade)	151
E. Exatidão	152
5.8. Método de quantificação dos Insumos Farmacêuticos Ativos através de eletroforese capilar	153
5.9. Otimização do método eletroforético de quantificação dos Insumos Farmacêuticos Ativos empregando um delineamento de experimentos de mistura	160
5.10. Validação dos métodos analíticos para a determinação da eficiência de incorporação dos Insumos Farmacêuticos Ativos dentro das nanoestruturas através de eletroforese capilar	177
A. Linearidade	178
B. Especificidade	179
C. Limite de detecção e limite de quantificação	181

D. Precisão (repetibilidade)	181
E. Exatidão	182
5.11. Determinação da eficiência de incorporação dos Insumos Farmacêuticos Ativos nas nanoestruturas	183
A. Eficiência de encapsulação através de cromatografia líquida de alta eficiência	183
B. Eficiência de encapsulação através de eletroforese capilar	187
C. Determinação da carga através de cromatografia líquida de alta eficiência.....	189
6. CONCLUSÃO	192
7. REFERÊNCIAS	195
8. ANEXO.....	221

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada por uma bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) ou *Bacilo de Koch*, que afeta principalmente os pulmões, mas, também podendo-se desenvolver e ocorrer em outros órgãos do corpo, como ossos, rins e meninges. A TB é transmitida por via aérea em praticamente a totalidade dos casos de infecção, e ocorre a partir da inalação de gotículas contendo bacilos expelidos pela tosse, fala ou espirro do doente com TB ativa de vias respiratórias (PORTAL DA SAÚDE, 2017).

Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com o bacilo causador da doença. Em 2013, 9,0 milhões de pessoas se infectaram com TB e 1,5 milhões morreram por causa da infecção (PORTAL DA SAÚDE, 2017).

No Brasil, a TB constitui um sério problema da saúde pública, com profundas raízes sociais. A cada ano, são notificados aproximadamente 70 mil novos casos de TB e ocorrem 4,6 mil mortes em decorrência da doença. O Brasil ocupa o 17º lugar entre os 22 países responsáveis por 80 % do total de casos de TB no mundo (WHO, 2017).

No Brasil, o tratamento de todas as formas de TB preconizados pelo Ministério da Saúde para criança, adulto e gestante era o mesmo: o Esquema I para o paciente virgem de tratamento (2 meses com rifampicina, isoniazida, pirazinamida e 4 meses de rifampicina e isoniazida); o Esquema IR caso aconteça recidiva após abandono ou após a cura (2 meses com rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol e 4 meses de rifampicina, isoniazida e etambutol); o Esquema III caso falência do Esquema I e/ou IR (3 meses com estreptomicina, etionamida, etambutol e pirazinamida e 9 meses de etionamida e etambutol); Esquema II caso aconteça a tuberculose no sistema nervoso central (2 meses de rifampicina, isoniazida e pirazinamida e 7 meses de rifampicina e isoniazida) e Esquema para a Tuberculose Multi-droga Resistente (TB-MDR) caso aconteça uma falência ao esquema III ou caso haja resistência à isoniazida e rifampicina (amicacina, terizidon, ofloxacina, etambutol e clofazimine) (HOSPITAL DAS CLÍNICAS, 2006).

A necessidade de tratamentos mais eficazes para a TB tem motivado um novo sistema de tratamento desta doença proposto pelo Ministério da Saúde no

Brasil a partir de 2009. Basicamente, as mudanças ocorridas promovem: (1) a alteração das dosagens de pirazinamida e hidrazida; (2) a introdução de um quarto insumo farmacêutico ativo (IFA), o etambutol, nos dois primeiros meses de tratamento; e (3) o uso de comprimidos de dose fixa combinada (DFCs). Assim, os esquemas I, II e de retratamento foram substituídos pelo esquema básico, enquanto o esquema III deixou de ser utilizado. O esquema básico emprega DFCs. Um DFC é uma formulação com os quatro IFAs tuberculostáticos de primeira linha num único comprimido. Para indivíduos com 10 anos ou mais o tratamento vigente inclui o uso dos quatro IFAs antituberculose de primeira linha: isoniazida (ISO), rifampicina (RIFA), pirazinamida (PZA) e etambutol (ETA) por um período mínimo de 6 meses. Os dois primeiros meses o tratamento consiste na administração com DFCs (150/75/400/275 mg de RIFA/ISO/PZA/ETA) e nos seguintes quatro meses o tratamento consiste na administração de RIFA/ISO (300/200 mg ou 150/100 mg) (SES, 2017), sendo a RIFA e a ISO os IFAs de primeira linha que cumprem o rol mais importante no esquema terapêutico da TB.

No entanto, esta terapia atual provoca problemas associados com a biodisponibilidade de RIFA (HUI ZHU *et al.*, 2015; INA JEONG *et al.*, 2015; VAMSHI KRISHNA *et al.*, 2013).

Sendo assim, em vista da necessidade de terapias mais eficazes contra a TB, uma das novas ferramentas para o desenvolvimento de novos tratamentos é a nanotecnologia. Para a obtenção de nanoestruturas com potencial para o tratamento da TB, foram usadas técnicas que permitiram a encapsulação de IFAs hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma nanoestrutura, neste caso a ISO e a RIFA respectivamente.

No presente trabalho foram encapsulados dois IFAs antituberculose em nanofibras de poli (D, L-láctico co-glicólico) (PLGA) empregando a técnica de *electrospinning*. Segundo a literatura o uso de nanofibras eletrofiadas, como nanotransportadores de IFAs, tem mostrado um futuro amplo em aplicações biomédicas, pois os IFAs podem ser convenientemente incorporados aos polímeros formando uma estrutura tridimensional com uma alta área de superfície e o perfil de liberação dos IFAs pode ser projetado por uma modulação da morfologia, da porosidade e da composição das nanofibras eletrofiadas (JING

QUAN *et al.*, 2013; ZIMING YUAN *et al.*, 2014; FUYIN ZHENG *et al.*, 2013; MENG *et al.*, 2011; YUEQI ZHU *et al.*, 2013; SHAN ZONG *et al.*, 2015; XIAOQIANG LI *et al.*, 2013. KATARIA *et al.*, 2014; ADUBA, 2012; PATTAMA TAEPAIBOON, URACHA RUNGSARDTHONG, PITT SUPAPHOL, 2007; BALL, WOODROW, 2014; SHARMA *et al.*, 2013; WEBBER *et al.*, 2012; VRBATA *et al.*, 2013; JUMI YUN *et al.*, 2011; HUA ZHANG *et al.*, 2012; MODGILL *et al.*, 2015). Pela revisão da literatura encontramos estudos da encapsulação da RIFA (ZENG, KANG, SU, 2012; RUCKH *et al.*, 2012; SHAIKH *et al.*, 2012) e da ISO (SHAIKH *et al.*, 2012) empregando a técnica de *electrospinning*. Da mesma forma encontramos um estudo da encapsulação simultâneo da RIFA e ácido fusídico utilizando a técnica de *electrospinning* (GILCHRIST *et al.*, 2013).

Por outro lado, os mesmos dois IFAs, RIFA e ISO, foram encapsulados em nanoesferas de PLGA empregando a técnica de emulsão/evaporação de solvente. As nanoesferas têm a capacidade de carregar uma ampla gama de compostos para as diferentes vias de administração por períodos de tempo prolongado, melhorar a eficácia dos IFAs com liberação progressiva do IFA, direcionar a alvos específicos, aumentar a estabilidade e reduzir os efeitos secundários pela diminuição de número de doses (SAMARASINGHE, KANWAR and KANWAR, 2012). Pela revisão da literatura encontramos estudos da encapsulação em nanoesferas da RIFA (CALLEJA AVELLANAL *et al.*, 2003; AKANSHA TRIPATHI, RANJANA GUPTA, SHUBHINI SARAF, 2010; TERRY *et al.*, 2014) e da ISO (KADARE *et al.*, 2014) empregando a técnica de emulsão/evaporação de solvente.

Apesar do amplo uso de esta associação de IFAs, RIFA e ISO, não foram encontrados estudos de encapsulação dos dois IFAs em simultâneo empregando a técnica de *electrospinning* nem empregando a técnica de emulsão/evaporação de solvente.

No presente trabalho, para a elaboração das nanoestruturas, foi utilizado o biopolímero PLGA, este é um dos mais utilizados por sua biodegradação, biocompatibilidade. A biodegradabilidade do PLGA permite sua hidrólise nas ligações éster, sendo metabolizado a ácidos monoméricos que são eliminados através do ciclo de Krebs (SCOTT, 2003).

A Pharmacopéia dos Estados Unidos apresenta um ensaio para a determinação simultânea de RIFA, ISO e PZA e outro ensaio para o ETA (USP40-NF35, 2017) através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Por sua vez, a Pharmacopéia Internacional apresenta um ensaio para a determinação simultânea de ISO, PZA e ETA e outro ensaio para a RIFA, também através de HPLC, sendo que, neste método, o acetato de cobre (II) é adicionado na fase móvel para formar grupos cromóforos com o ETA (THE INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA, 2011).

Pela revisão da literatura, observamos estudos para a determinação de RIFA em plasma através de HPLC (MORENO-EXEBIO, GRANDE-ORTIZ, 2014) e de cromatografia líquida de alta eficiência-espectrometria de massa (HPLC-MS/MS) (PATIL *et al.*, 2011); determinação simultânea de RIFA e ISO em formulações farmacêuticas através de HPLC (YATEEN SHAH *et al.*, 2015); estudos para a determinação simultânea de RIFA, ISO e PZA em formulações farmacêuticas através de HPLC (DHAL e SHARMA, 2009; JONGRUNGRUANGCHOK e SONGSAK, 2015; GLASS *et al.*, 2007), em soro através de HPLC (KAYHAN, AKGÜNEŞ, 2011) e em comprimidos através de eletroforese capilar (CE) (PONTAROLO *et al.*, 2010; GRAEFF, 2007); estudos para a determinação simultânea de RIFA, ISO, PZA e ETA em formulações farmacêuticas através de HPLC (KHOIRIA, MARTONO e ROHMAN, 2015; CHELLINI *et al.*, 2015) e através de CE (FARIA *et al.*, 2010; MARCELLOS *et al.*, 2012) e em plasma através de HPLC-MS/MS (MUKHERJEE *et al.*, 2015; HUAN WANG *et al.*, 2012; CONDÉ DE LIMA, 2014).

Dentre as principais técnicas para quantificação dos IFAs nas nanopartículas (NPs) encontram-se a espectrofotometria de absorção no ultravioleta, HPLC e CE (ARNEDO *et al.*, 2000). A CE apresenta-se como uma técnica analítica alternativa a HPLC; de baixo custo, rápida e de utilização de pequenos volumes de amostra e solventes orgânicos, dessa forma, diminuindo seu impacto ambiental.

Apesar do uso de comprimidos de DFC desta associação de IFAs no tratamento atual desde 2009, (SES, 2017), a determinação simultânea por eletroforese capilar (CE) destes quatro IFAs é pouco reportada na literatura (FARIA *et al.*, 2010; MARCELLOS *et al.*, 2012). Para o nosso conhecimento, a

determinação simultânea dos IFAs antituberculose através do MEEKC não foi demonstrada anteriormente, e não foram encontrados referências para a determinação dos dois IFAs, RIFA e ISO, encapsulados em nanofibras e em nanoesferas através de CE. Além do mais, não foi reportada a determinação de algum IFA encapsulado em nanofibras preparados pela técnica de *electrospinning* empregando a técnica de CE. Por essa razão, o projeto também visa o desenvolvimento e validação de um método capaz de determinar a eficiência de encapsulação dos fármacos antituberculose (RIFA e ISO) nas nanoestruturas através da técnica de CE; considerando que este método pode ser aproveitado para as análises dos comprimidos de dose fixa combinada. A validação foi realizada segundo as diretrizes da *International Conference on Harmonization* e Pharmacopéia dos Estados Unidos (ICH, 2005; USP40-NF 35, 2017).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Tuberculose.

A TB é uma doença infecciosa e transmissível, causada pelo *Mtb*, que afeta prioritariamente os pulmões, embora possa acometer outros órgãos e sistemas. A apresentação pulmonar, além de ser mais frequente, é também a mais relevante para a saúde pública, pois é a principal responsável pela transmissão da doença. Em 2013, no Brasil, foram registrados 73.692 casos novos de TB. No Sistema de Informação de Enfermedades de Notificação (SINAN), a taxa de incidência foi de 36,6/100 mil habitantes para todas as formas de TB, do total de casos novos, 10,1 % eram coinfetados de tuberculose-vírus de imunodeficiência humana (TB-HIV), além disso, foram diagnosticados 503 casos novos de tuberculose multidrogarresistente, e 4.577 óbitos por TB com uma taxa de mortalidade de 2,3 óbitos/100 mil habitantes (Figura 1). Em 2012, o sexo masculino apresentou uma taxa de mortalidade de 3,5 óbitos/100 mil habitantes, o que significa um risco de morrer 3,2 vezes maior do que o feminino (1,1 óbito/100 mil habitantes). Em 2013, o percentual de realização de cultura de escarro entre os casos novos de TB foi de 23,4 %, enquanto que os casos de retratamento foi de 40,3 %. Do total de casos novos, 70 % tiveram testagem realizada para o vírus de imunodeficiência humana (HIV), sendo que o percentual de positividade foi de 14,5 %. Já a cura entre os casos novos e a de casos de retratamento da TB foram de 67,7 % e de 46,6 %, respectivamente (Figura 2). Conforme o Quadro 1, a cobertura de atenção básica aumentou em relação aos anos anteriores (PORTAL DA SAÚDE, 2017).

Figura 1: Número de casos novos de TB no Brasil (esquerda) e número de óbitos por TB no Brasil (direita) no período 2009-2013 (Fonte: Ministério da Saúde do Brasil) (PORTAL DA SAÚDE, 2017).

Figura 2: Percentual de cura entre os casos de TB no Brasil no período 2009-2013 (Fonte: Ministério da Saúde do Brasil) (PORTAL DA SAÚDE, 2017).

Ano	2009	2010	2011	2012	2013
Cobertura da atenção básica (%) ¹	65,7	66,2	65,7	66,6	67,4
Número de laboratórios que realizam					
Baciloscopia (100.000 hab. ²)	2,1	2,0	2,0	2,0	1,5
Cultura de escarro (500.000 hab. ²)	0,6	0,6	0,8	0,6	0,9
TSA ³ (1.000.000 hab. ²)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Quadro 1: Cobertura de serviços contra a TB no Brasil no período 2009-2013 (Fonte: Ministério da Saúde do Brasil) (PORTAL DA SAÚDE, 2016).

Onde: ¹Departamento de Atenção Básica/Sistema de Informação da Atenção Básica/SAS; ²Laboratórios Centrais de Saúde Pública; ³Teste de sensibilidade antimicrobiana.

2.1.1. Agente etiológico.

A TB pode ser causada por qualquer uma das sete espécies que integram o complexo *Mtb*: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi* e *M. caprae*. Entretanto, do ponto de vista sanitário, a espécie mais importante é a *M. tuberculosis* (PORTAL DA SAÚDE, 2017).

Os mecanismos de virulência do *Mtb* são extraordinariamente complexos e multifacetados. O bacilo aparentemente não produz toxinas, no entanto, desenvolveu um repertório de características estruturais e fisiológicas que contribuem para a sua virulência e para a patologia da TB. Os fatores de virulência do *Mtb* podem ser definidos como genes/proteínas cuja inativação leva a uma redução de patogenicidade ou virulência num modelo de TB validado mas não tem efeito no crescimento da bactéria em condições *in vitro* (excluindo

estresse e privação de nutrientes) nas quais as estirpes selvagens se replicam normalmente (FORRELLAD *et al.*, 2013).

2.1.2. Patogenia.

O principal reservatório da TB é o ser humano. Outros possíveis reservatórios são gado bovino, primatas, aves e outros mamíferos. No Brasil, não existem estimativas sobre a proporção de pacientes com TB causada pelo *M. bovis*, no entanto, é importante que o sistema de saúde esteja atento à possibilidade de ocorrência desse evento. A TB é uma doença de transmissão aérea, ou seja, que ocorre a partir da inalação de aerossóis. Ao falar, espirrar e, principalmente, ao tossir, as pessoas com TB ativa lançam no ar partículas em forma de aerossóis que contêm bacilos, sendo denominadas de bacilíferas. As formas bacilíferas são, em geral, a TB pulmonar e a laríngea. Calcula-se que, durante um ano, dentro de uma comunidade, um indivíduo que tenha baciloscopia positiva pode infectar, em média, de 10 a 15 pessoas. Bacilos que se depositam em roupas, lençóis, copos e outros objetos dificilmente se dispersam em aerossóis e, por isso, não desempenham papel importante na transmissão da doença. Embora, o risco de adoecimento seja maior nos primeiros dois anos após a primeira infecção, uma vez infectada a pessoa pode adoecer em qualquer momento de sua vida (PORTAL DA SAÚDE, 2017).

Os bacilos *Mtb*, contidos numa gotícula de aerossol, geralmente entra a través das passagens alveolares nos seres, onde o seu primeiro contato são os macrófagos residentes, mas também é possível que as bactérias possam ser inicialmente ingeridas por pneumócitos epiteliais alveolares tipo II, devido ao maior número de células encontradas nos alvéolos. Além disso, as células dendríticas desempenham um papel muito importante nas fases iniciais da infecção e, presumivelmente, desempenham um papel chave na ativação de células T com antígenos específicos contra o *Mtb*. Como as células dendríticas são migratórias, elas podem desempenhar um papel importante na disseminação de *Mtb*. As bactérias são fagocitadas em um processo que é iniciado por contato entre os receptores de complemento e/ou receptores de manosa dos macrófagos com a bactéria. A glicoproteína surfactante A encontrada na superfície alveolar, pode aumentar a absorção e captação de *Mtb*

por um mecanismo de retroalimentação positivo (*upregulation*). Ao ocorrer o ciclo normal da maturação de fagossoma, ou seja, a fusão fagossoma-lisossoma, essas bactérias podem encontrar um ambiente hostil que inclui pH ácido, intermediários reativos de oxigênio (ROI), enzimas lisossomais e peptídeos tóxicos.

Por conta disso, as bactérias de *Mtb* evoluíram para apresentar muitas formas de evitar esse microambiente vacuolar hostil, inibindo a fusão do fagossoma-lisossoma, presumivelmente devido à exclusão dos protões de ATPasas do fagossoma micobacteriano. Níveis elevados de Ca^{2+} foram associados com formação de fagolisossomas. Logo, lesões granulomatosas focais de células gigantes compostas de macrófagos e linfócitos são formadas. Este processo é geralmente um meio eficaz para contenção da propagação das bactérias. A medida que a imunidade celular se desenvolve, os macrófagos carregados com bacilos sofrem apoptose, e isto resulta na formação do centro caseoso do granuloma, rodeada por uma zona celular de fibroblastos, linfócitos, e monócitos derivados do sangue. Apesar de que *Mtb* derivados deste processo imunológico são incapazes de se multiplicar dentro deste tecido caseoso, devido ao seu pH ácido, a partir da disponibilidade de oxigênio, e na presença de ácidos graxos tóxicos, alguns *Mtb* podem permanecer latentes por décadas. A intensidade da resposta imune celular do hospedeiro determina se uma infecção é extinta ou progride para as etapas seguintes, TB latente ou persistente, pode permanecer por toda a vida numa pessoa no estado granulomatoso. *Mtb* pode sair do granuloma e espalhar dentro dos pulmões (TB pulmonar ativa) e até mesmo para outros tecidos através do sistema linfático e sangue (TB miliar ou extrapulmonar). Se acontecer, o indivíduo requerirá terapia com antibióticos para sobreviver (SMITH, 2003; GARETH GRIFFITHS *et al.*, 2010).

2.1.3. Diagnóstico laboratorial.

Os métodos laboratoriais preconizados pelo Ministério da Saúde são a baciloscopia e a cultura do bacilo para confirmar o diagnóstico associado ao exame radiológico pulmonar em indivíduos que apresentam a sintomatologia já citada (BRASIL, 2002).

A baciloscopia identifica microscopicamente o bacilo em um esfregaço da amostra (escarro) fixado em lâmina e corado pela coloração de Ziehl-Neelsen, onde posteriormente é realizada a leitura e interpretação do exame. Para diminuir a possibilidade de falsos-negativos recomenda-se a coleta de 2 a 3 amostras em dias diferentes pela manhã em jejum (LEITE; KANUFRE, 2013).

A cultura do bacilo permite a multiplicação e isolamento do bacilo em meios de cultura específicos. O crescimento micobacteriano é lento e pode variar de 15 a 30 dias, e por isso este método é utilizado para confirmação da TB não sendo útil na tomada de decisão no tratamento inicial. A cultura é mais indicada para indivíduos sintomáticos que apresentam baciloscopia negativa e para o diagnóstico de formas extrapulmonares. A cultura, acompanhada de testes de sensibilidade a antibióticos, tem relevância também nos casos de suspeita de resistência micobacteriana ao tratamento básico (BRASIL, 2002).

Em 2008 a Organização Mundial de Saúde recomendou os testes moleculares para o diagnóstico de TB resistente ao tratamento básico. Estes testes moleculares consistem na amplificação e identificação das sequências de ácidos nucleicos do *Mtb* pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR). Dentre os testes moleculares, existem aqueles que detectam simultaneamente o *M. tuberculosis* e a resistência a RIFA, fornecendo resultados mais rápidos que na cultura do bacilo (FIND, 2011).

No Brasil, 92 municípios foram selecionados para receber equipamentos para testes moleculares nomeados de teste rápido molecular para TB (TRM-TB), compondo a Rede de Teste Rápido para TB (RTR-TB). Em dezembro de 2014 o Ministério da Saúde publicou nota recomendando o TRM-TB para adultos e crianças menores de 10 anos (BRASIL, 2015).

2.1.4. Fármacos antituberculose.

A descoberta dos fármacos no combate à TB pode ser associada ao primeiro antibiótico a que o homem teve acesso, a penicilina, descoberta inesperadamente em 1928 por Alexander Fleming numa cultura do fungo *Penicillium*, sendo considerado um dos maiores acontecimentos científicos do século XX. No entanto, foram necessários 13 anos para aparecer no mercado a primeira forma injetável para uso terapêutico, em 1941. Apesar da penicilina ser

um fármaco extremamente eficaz contra diversas doenças, e a primeira defesa real contra infecções causadas por bactérias, mostrou-se curiosamente ineficaz contra a TB. Foram necessários quinze anos após a importante descoberta de Fleming para que Selman Waksman descobrisse, em 1944, a estreptomicina, produzida também por um microorganismo, a bactéria *Streptomyces griseus*, que foi o primeiro antibiótico capaz de atuar de maneira eficaz no combate à TB. Após a descoberta da estreptomicina, novos fármacos foram utilizados com sucesso, destacando-se a ISO, em 1952; a RIFA, em 1965; o ETA, sintetizado em 1960, empregado somente em 1968 e a PZA, sintetizada em 1936, e sendo utilizada em 1970 (DE SOUZA e VASCONCELOS, 2005).

2.1.5. Fármacos de primeira escolha.

Os fármacos comumente chamados de primeira escolha são a primeira opção no tratamento, podendo ser empregados com sucesso na grande maioria dos pacientes e incluem a ISO, RIFA, PZA e ETA. É importante ressaltar que o isômero utilizado em clínica é o (S,S)-etambutol, uma vez que o (R,R)-etambutol causa cegueira (DE SOUZA e VASCONCELOS, 2005).

2.1.5.1. Rifampicina.

A RIFA, representada na Figura 3, apresenta-se como um pó cristalino vermelho-castanho, pouco solúvel em água, solúvel em metanol, pouco solúvel em acetona e etanol (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Figura 3: Representação esquemática da fórmula estrutural da RIFA (C₄₃H₅₈N₄O₁₂; PM 822,94) (CHEMICALIZE, 2017).

A RIFA é o fármaco mais importante no tratamento da TB. É utilizada desde 1966 e a concentração mínima inibitória (CMI) para o *Mtb* é de 0,05-0,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. É um fármaco bactericida que atua tanto no bacilo em crescimento e metabolicamente ativo quanto na fase estacionária. A RIFA inibe o processo de transcrição gênica por bloqueio da RNA polimerasa DNA dependente, o que impede a síntese de RNA mensageiro (RNAm) e de consequentes proteínas no bacilo, produzindo morte celular. Após a ingestão oral de uma dose de 600 mg, o pico sérico plasmático de 5-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ é atingido entre 2 e 4 h. Aproximadamente 85 % do medicamento é metabolizado no fígado através de enzimas microsossomais integrantes do sistema CYP450. A excreção se faz por via biliar (60-65 %). Parte da RIFA é excretada (6-15 %), não metabolizada e reabsorvida no intestino, aumentando progressivamente o nível sérico do fármaco. Ao final de aproximadamente 14 dias, ocorre a produção de enzimas que aumentam o metabolismo do fármaco (autoindução metabólica), com redução da meia-vida de 3-5 h para 2-3 h. Uma menor parte do fármaco é excretada pela urina (ABDO ARBEX *et al.*, 2010).

2.1.5.2. Isoniazida.

A ISO, representada na Figura 4, apresenta-se como um pó cristalino branco ou incolor, facilmente solúvel em água, ligeiramente solúvel em etanol, pouco solúvel em clorofórmio, praticamente insolúvel em benzeno e éter etílico (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Figura 4: Representação esquemática da formula estrutural da ISO ($\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$; PM 137,14) (CHEMICALIZE, 2017).

A ISO é um dos mais importantes fármacos no tratamento da TB. É utilizada desde 1952. Tem estrutura simples, constituída de um anel piridina e um grupo hidrazida, e sua concentração CMI para o *Mtb* varia de 0,02-0,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Tem

função bactericida sobre os bacilos de multiplicação rápida, mas tem ação restrita sobre os bacilos de crescimento lento (geralmente intracelulares) e aqueles de multiplicação intermitente (geralmente extracelulares).

A ISO é uma pré-droga que necessita ser ativada pela enzima catalasa/peroxidase (KatG), consequentemente produzindo radicais reativos de oxigênio (superóxido, peróxido de hidrogênio e peroxinitrato) e radicais orgânicos que inibem a formação de ácido micólico da parede celular, causando dano ao DNA e subsequente morte do bacilo. A metabolização é hepática, por acetilação pela N-acetiltransferase, que produz acetilisoniazida e ácido isonicotínico. A velocidade de acetilação é influenciada pelo fator genético de cada paciente. Há pacientes com fenótipo para a acetilação rápida ou lenta, sendo controverso se esses últimos são mais propensos a manifestações de hepatotoxicidade, apesar de não haver diferença na atividade antimicrobiana. A ISO é excretada por via renal (70-96 %), gerando, na sua maior parte, metabólitos inativos; 7 % da ISO excretada na urina pode aparecer de forma livre nos pacientes com acetilação rápida, e 37 % dessa pode aparecer de forma conjugada nos pacientes com acetilação lenta. Uma pequena proporção é eliminada pelas fezes. A meia-vida fica em torno de 1 h nos pacientes com fenótipo de acetilação rápida (variação: 0,5-1,6 h) e de 2-5 h naqueles com fenótipo de acetilação lenta, elevando-se ainda mais na presença de hepatopatias e de insuficiência renal (ABDO ARBEX *et al.*, 2010).

2.1.6. Resistência micobacteriana.

Outro fator preocupante com relação ao tratamento da TB é o desenvolvimento de cepas resistentes aos fármacos que compõem a terapia antimicobacteriana. Existem dois níveis de resistência micobacteriana: os bacilos multirresistentes (MDR-TB) são resistentes a ISO e RIFA e extremamente resistentes (XDR-TB) que além de resistentes a ISO e RIFA, são também resistentes a ofloxacina e a canamicina ou amicacina (LIMA *et al.*, 2011; SOFO, 2015).

Tendo em vista que a resistência micobacteriana a fármacos é um fenômeno relativamente frequente e progressivo e que nos últimos 40 anos nenhum fármaco foi desenvolvido especificamente para micobactérias resistentes. Por

tanto, há a necessidade de desenvolvimento de novas formas farmacêutica aumentando, assim, as alternativas terapêuticas (MA *et al.*, 2010; SOFO, 2015).

2.2. Nanotecnologia na saúde.

A Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) define nanotecnologia como o processo para a obtenção, o controle, a fabricação e/ou a manipulação intencional de materiais que têm pelo menos uma dimensão entre 1 a 100 nm. Apesar desta restrição de tamanho, comumente refere-se a estruturas de até várias centenas de nanômetros. Além disso, o material na escala nanométrica tem que demonstrar propriedades físicas, químicas e biológicas que permitam aplicação inovadora desse material. Essas propriedades inovadoras devem ser atribuídas exclusivamente a sua dimensão nanométrica. No caso de material constituído por partículas maiores que 100 e menores que 1000 nm, porém com característica inovadora, esse será considerado material obtido por nanotecnologia (FDA, 2017).

2.2.1. Nanofibras.

Quando o diâmetro de materiais de fibras poliméricas é reduzido a partir do micrômetro (por exemplo de 10 a 100 μm) para submicrons ou nanômetros (por exemplo de 10×10^{-3} a 100×10^{-3} μm), surgem diversas características a ressaltar, como a grande área de superfície em relação ao volume, flexibilidade nas funcionalidades de superfície, e desempenho mecânico superior (por exemplo, rigidez e resistência à tração). Estas propriedades fazem às nanofibras poliméricas candidatas ideais para muitas aplicações importantes (Quadro 2). Por outro lado, dentre as principais técnicas para quantificação dos IFAs nas nanofibras encontram-se a espectrofotometria de absorção no ultravioleta, HPLC e CE (Quadro 3). Existem muitas pesquisas sobre métodos de produção das nanofibras (*electrospinning*, *electrospraying*, *rotary jet spinning*, *self-assembly*, métodos sol-gel, separação de fases, *melt-blown* e *template synthesis*), sendo que o método mais simples, econômico e capaz de produzir nanofibras contínuas de diversos materiais a partir de polímeros utilizados em aplicações industriais é o *electrospinning*, também chamado e eletrofiação (HUANG *et al.*, 2003).

Começo do Quadro 2: Método de *electrospinning* para a elaboração das fibras contendo IFAs encapsulados (2006-2016).

Propósito terapêutico	Parâmetros de processo	Diâmetro	Autor
Fibras eletrofiadas de gelatina e polietilen-glicol diacrilato carregadas com nistatina para administração desse IFA através da mucosa oral.	Voltagem aplicada: 25 kV. Agulha: seringa de 10 mL com agulha de 8 G x 1½ in. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 125 mm. Taxa de fluxo: 5 mL/h.	-3,22 ± 1,53 Dia μ m (não reticulada). -2,45 ± 0,720 μ m (em C ₂ H ₆ O).	ADUBA,D.Jr., 2012.
Fibras eletrofiadas de Eudragit RS e PCL com pectina e carregadas com celecoxib para administração no cólon por via oral.	Voltagem aplicada: 10 a 18 kV. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 15 cm. Taxa de fluxo: 2 mL/h.	-0,29 a 1,49 μ m.	AKHAGARI e ROTUBATI, 2016.
Fibras eletrofiadas de PVA e PNIPAM carregadas com levotiroxina para sua administração tópica sustentada.	Voltagem aplicada: 25 kV. Agulha: 27 G. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 13 cm. Taxa de fluxo: 2 mL/h.	-100 a 1000 nm.	AZARBAYJANI <i>et al.</i> , 2010.
Fibras eletrofiadas de gelatina e PU e HPC carregadas com donepezil para a administração desse IFA.	Voltagem aplicada: 15 kV. Agulha: 0,8 x 38 mm. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 15 cm. Taxa de fluxo: 5,5 μ L/h a 400 mL/h.	-600 a 1200 nm.	GENCTURK e SARAC, 2016.
Fibras eletrofiadas de PVP e fibras eletrofiadas de PEO carregadas com maraviroc para uma rápida pré-exposição intravaginal do IFA para a profilaxia do HIV.	-Para soluções de PVP: Voltagem aplicada: 15 kV. Agulha: 2,54 cm de comprimento x 25 G. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 20 cm. Taxa de fluxo: 25, 50 e 100 μ L/min. -Para soluções de PEO: Voltagem aplicada: 15 kV. Agulha: 2,54 cm de comprimento x 25 G. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 25 cm. Taxa de fluxo: 10, 25 e 50 μ L/min.	-400 a 2000 nm.	BALL e WOODROW, 2014.
Fibras eletrofiadas de PCL carregadas com naproxeno para liberação sustentada desse IFA.	Voltagem aplicada: 15 kV. Agulha: 0,6 mm de D.I. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 10 cm. Taxa de fluxo: 1 mL/h.	-389 ± 167 nm.	CANBOLAT, CELEBIOGLUA e UYAR, 2014.

Fibras eletrofiadas de EC usando <i>electrospinning</i> triaxial carregadas com cetoprofeno para criar um novo tipo de fibras medicamentosas com distribuições de gradientes desse IFA.	Fieira: Concêntrica tripla camada. Bombas de seringa: três. Voltagem aplicada: 12 kV. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 15 cm. Taxa de fluxo: Camada externa: 2 mL/h. Camada média: 0,5 mL/h. Camada interna: 0,2 mL/h.	-0,74 ± 0,06 µm.	YU <i>et al.</i> , 2015.
A melhoria das propriedades físico-químicas (como a solubilidade e a taxa de dissolução) do irbesartan utilizando a preparação de dispersão sólida à base de fibras eletrofiadas.	Voltagem aplicada: 14 kV. Agulha: seringa de 10 mL com agulha de 0,25 mm de D.I. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 10 cm. Taxa de fluxo: 1,5 mL/h.	-903 a 907 nm.	ADELI, 2015.
Fibras eletrofiadas de Eudragit L-100 com PE-b-PEO carregadas com nifedipina para sua administração entérica para a liberação controlada desse IFA carregado.	Voltagem aplicada: 15 kV. Agulha: seringa de 6 mL. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 10 cm. Taxa de fluxo: 166 µL/min.	-500 nm (Eudragit < 220 gr/L). -1,7 µm (Eudragit > 230 gr/L).	DA COSTA <i>et al.</i> , 2015.
Fibras eletrofiadas de n-HA e PLGA carregadas com doxorrubicina como um sistema de administração desse IFA para sua atividade anticancerígena.	Voltagem aplicada: 20 kV. Agulha: seringa de 10 mL com 0,8 mm de D.I. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 15 cm. Taxa de fluxo: 0,8 mL/h.	-577 ± 133 nm.	ZHENG <i>et al.</i> , 2013.
Fibras eletrofiadas de PLGA carregadas com rifampicina e ácido fusídico (ou seu sal de sódio SF) para prevenir a aderência de <i>Staphylococcus epidermidis</i> e duas cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilicina para um implante de titânio em um modelo <i>in vivo</i> de infecção associada a um implante subcutâneo com roedores.	Voltagem aplicada: 15 kV. Agulha: seringa de 10 mL x 18G. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 10 cm. Taxa de fluxo: 1 mL/h.	-612,9 ± 32,2 nm (fibra com 10 % de FA e 5 % de RIFA). -259,2 ± 30,6 nm (fibra com 10 % de SF e 5 % de RIFA).	GILCHRIST <i>et al.</i> , 2013.
Fibras eletrofiadas de PLLA, PLGA e PLCL carregadas com captopril para liberação desse IFA.	Voltagem aplicada: 10 a 17 kV. Agulha: seringa de 5 mL com 0,5 mm de D.I. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 15 cm. Taxa de fluxo: 1 mL/h.	-1093 ± 113nm (fibra com IFA/PLGA, 1:10). -836 ± 152nm (fibra com IFA/PLCL, 1:10).	ZANG <i>et al.</i> , 2012.

Fibras eletrofiadas de PVA e PU carregadas com gentamicina para liberação desse IFA.	-Fibra de PVA: Voltagem aplicada: 45 a 55 kV/cm. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 13 cm. -Fibra de PUR: Voltagem aplicada: 5 kV/cm. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 15 cm.	-185 ± 70 nm (fibra de PVA). -420 ± 150 nm (fibra de PUR).	SIRC <i>et al.</i> , 2012.
Nanotubos de halosite foram carregados de metronidazol e incorporados em fibras de PCL/gelatina para o desenvolvimento de uma membrana de fibras com liberação prolongada desse IFA como uma membrana anti-infecciosa para regeneração óssea e de tecido guiada.	Voltagem aplicada: 8 a 12 kV. Agulha: seringa de 20 mL. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 20 cm. Taxa de fluxo: 2 mL/h.	-50 nm (diâmetro de nanotubos). -600 nm (comprimento de nanotubos). -400 nm (diâmetro de fibras com nanotubos dentro).	XUE <i>et al.</i> , 2015.
O PNIPAAm e o EC foram utilizados para a elaboração de sistemas de fibras sensíveis à temperatura carregadas com ketoprofeno para a liberação sustentada desse IFA.	Voltagem aplicada: 20 kV. Agulha: seringa de 30 mL x 18 G com 1,27 mm de D.I. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 15 cm. Taxa de fluxo: 1,5 mL/h.	-392 ± 63 nm (fibras de PNIPAAm/EC/IFA).	HU <i>et al.</i> , 2016.
Fibras eletrofiadas de PVA/PAA/MWCNTs carregadas com cetoprofen para a melhora da eletro-sensibilidade do hidrogel em um sistema de administração transdérmico desse IFA.	Voltagem aplicada: 13 kV. Agulha: seringa de 5 mL com 0,5 mm de D.I. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 10 cm. Taxa de fluxo: 0,5 mL/h.	-30 a 50 nm (diâmetro de MWCNTs). -262 ± 14,7 nm (MWCNT em fibras).	JUMI YUN <i>et al.</i> , 2011.
Fibras eletrofiadas alinhadas coaxialmente e uniaxialmente de PLLA, modificado com PLL, carregadas com bacitracina como sistema de administração desse IFA.	-PLLA/PLL/IFA Voltagem aplicada: 18 kV. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 13 cm. Taxa de fluxo: 0,02 mL/min. -(PLLA/IFA)-(PLLA/PLL) e (PLLA/PLL/IFA)-PLL Voltagem aplicada: 24 kV. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 15 cm. Taxa de fluxo: 0,01 mL/min (camada do núcleo) e 0,02 mL/min (camada do manto).	-1826 ± 208,5 nm (fibras de (PLLA/IFA)-(PLLA/PLL)). -1852 ± 201,4 nm (fibra de (PLLA/PLL/IFA)-PLLA).	JUNYAN YAO <i>et al.</i> , 2016.
Fibras eletrofiadas de PVA e NaAlg carregadas com ciprofloxacina para administração local desse IFA (adesivo transdérmico).	Voltagem aplicada: 15 kV. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 15 cm. Taxa de fluxo: 0,1 mL/h.	-300-400 nm (fibras de PVA). -200-300 nm (fibras de PVA/NaAlg).	KATARIA <i>et al.</i> , 2014.

Continuação do Quadro 2: Método de *electrospinning* para a elaboração das fibras contendo IFAs encapsulados (2006-2016).

Fibras eletrofiadas de PLGA carregadas com vancomicina para revestimento na superfície de próteses vasculares.	Voltagem aplicada: 35 kV (aplicada à agulha) e 17 kV (aplicado à solução de polímero). Agulha: seringa de 0,42 mm de D.I. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 10 cm. Taxa de fluxo: 3,6 mL/h.	-70 a 1,200 nm (fibras de PLGA/IFA). -5 a 10 μ m (o tamanho dos poros da superfície da fibra).	KUO-SHENG LIU <i>et al.</i> , 2015.
Fibras eletrofiadas de PLA carregadas com metronidazol para tratamento local de periodontite.	Voltagem aplicada: 20 kV. Agulha: seringa de 5 mL com 0,4 mm de D.I. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 16 a 18,5 cm. Taxa de fluxo: 1,5 mL/h.	-0,64 a 1,20 μ m (diâmetros de fibras). -25 cm ² (área total das fibras). -70 a 100 μ m (espessura das fibras).	REISE <i>et al.</i> , 2012.
Fibras eletrofiadas de PLGA e PLGA/gelatina carregadas com fenbufen como um sistema de administração desse IFA.	Voltagem aplicada: 10 kV. Agulha: seringa de 5 mL com 0,5 mm de D.I. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 10 cm. Taxa de fluxo: 0,5 mL/h	-335 $\pm$ 52 nm (diâmetros de fibras de PLGA). -310 $\pm$ 24 nm (diâmetros de fibra de PLGA/gelatina).	MENG <i>et al.</i> , 2011.
Fibras eletrofiadas de CA carregadas com ácido de vitamina A e vitamina E como um agentes terapêuticos transdérmicos e dérmicos.	Voltagem aplicada: 17,5 kV. Agulha: seringa de 50 mL com 0,91 mm de D.I. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 15 cm. Taxa de fluxo: 1,0 mL/h.	-20 a 30 μ m (espessuras de fibras de CE eletrofiadas e <i>casted</i>). -253 $\pm$ 41 nm (diâmetro de fibras de vitamina E/CA). -247 $\pm$ 31 nm (diâmetro de fibras de ácido de vitamina A/CA).	PATTAMA TAEPAIBOON, URACHA RUNGSARDTHONG e PITT SUPAPHOL, 2007
Fibras eletrofiadas de PLLA carregadas com partículas de nanogel sintetizadas a partir de BSA carregada com cloroquina (CQ) como um sistema de administração desse IFA solúvel em água.	Voltagem aplicada: 12 kV. Agulha: seringa com 9,0 mm de D.I. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 15 cm. Taxa de fluxo: 0,8 mL/min.	- < 120 nm (partículas de nanogel). -1,17 $\pm$ 0,46 a 1,36 $\pm$ 0,13 mm (diâmetro de fibras).	PINGHUI ZHOU <i>et al.</i> , 2016.
Fibras eletrofiadas de PVPK-90 e HPMCAS como um sistema de liberação controlado de paracetamol.	-Fieira de <i>electrospinning</i> feitos sob medida única (SS- <i>electrospinning</i>) Voltagem aplicada: 15 kV. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 15 cm. Taxa de fluxo: 1,5 mL e 0,5 mL/h (agulha coaxial).	-90 $\pm$ 5 μ m espessuras de PVP/HPMCAS <i>casted</i>). -5 $\pm$ 1,5 μ m (espessuras de PVP/HPMCAS <i>spin-coated</i>). -0,41 $\pm$ 0,22 μ m (diâmetros de fibras SS-eletrofiadas). -1,38 $\pm$ 0,47 μ m (diâmetros de fibras CS-eletrofiadas).	PRATCHAYA TIPDUANGTA <i>et al.</i> , 2016.
Fibras eletrofiadas funcionais de PVPK-60 carregada com pró-fármacos poliméricos de cetoprofeno (éster de poli-cetoprofeno vinílico) e poli (éster de ketoprofeno vinílico -co-derivativo de	Voltagem aplicada: 10 kV. Agulha: seringa de 10 mL com 0,5 mm de D.I. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 15 cm.	-196 a 370 nm.	JING QUAN <i>et al.</i> , 2013.

glucosa) como um sistema de liberação sustentada desses IFAs.	Taxa de fluxo: 0,8 mL/h.		
Fibras eletrofiadas de PCL carregadas com rifampicina como uma estratégia preventiva contra a infecção periprotética ortopédica.	Taxa de fluxo: 18 a 21 kV. Agulha: seringa de 20 G agulha de ponta romba. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 10 a 11,5 cm. Taxa de fluxo: 2,3 a 2,6 mL/h.	-402 ± 225 nm (diâmetros de fibras com 10 % de IFA). -665 ± 402 nm (diâmetros de fibras com 20 % de IFA).	RUCKH <i>et al.</i> , 2012.
Fibras eletrofiadas de PVA e fibras eletrofiadas de PCL como sistema de liberação de cafeína para uma melhora na sua cristalização.	-Fibra de cafeína-PVA: Voltagem aplicada: 26 kV. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 16 cm. Taxa de fluxo: 1,0 mL/h. -Fibra de cafeína-PCL: Voltagem aplicada: 6,48 a 12,3kV. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 13 a 18 cm. Taxa de fluxo: 0,3 a 3 mL/h.	-Faixa de poucos micrómetros (diâmetros de fibras de PVA/cafeína e fibras de PCL/cafeína).	SEIF, FRANZEN e WINDBERGS, 2015.
Fibras eletrofiadas de [poli(VBA-co-VBTAC)] para o desenvolvimento de nanofibras resposinvas ao pH com propriedades de liberação controlada de ciprofloxacino.	Voltagem aplicada: 15 kV. Agulha: seringa de 3 mL com 0,6 mm de D.I. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 10 cm Taxa de fluxo: 1 mL/h.	-445 ± 120 nm (diâmetros de fibras de poli(VBA-co-VBTAC)/IFA).	SERKAN DEMIRCI <i>et al.</i> , 2014.
Fibras eletrofiadas de PVA que empregaram <i>crosslinking</i> para a liberação prolongada de rifampicina e isoniazida.	-Fibra de PVA/rifampicina Voltagem aplicada: 20 kV. Tamanho do capilar: 1,2 mm. Ângulo do capilar: 11,5. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 28 cm. -Fibras de PVA/isoniazida Voltagem aplicada: 20 kV. Tamanho do capilar: 1,2 mm. Ângulo do capilar: 10,0. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 21 a 24 cm.	-372,5 ± 28,61 nm (diâmetros de fibras de PVA/isoniazida). -631 ± 57,78 nm (diâmetros de fibras de PVA/rifampicina).	SHAIKH <i>et al.</i> , 2012.
Fibras eletrofiadas mucoadesivas de PEO/PLA carregadas com cisplatina para quimioterapia de câncer cervical em ratos.	Voltagem aplicada: 1,8 a 2,0 kV/cm. Agulha: seringa com 0,4 mm de D.I. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 15 cm.	-0,2 a 0,5 µm.	SHAN ZONG <i>et al.</i> , 2015.

Continuação do Quadro 2: Método de *electrospinning* para a elaboração das fibras contendo IFAs encapsulados (2006-2016).

	Taxa de fluxo: 1 a 2 mL/h.		
Fibras eletrofiadas de PVA e NaAlg carregadas com insulina baseado num adesivo transmucosal para liberação desse IFA antidiabético.	Voltagem aplicada: 15 kV. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 15 cm. Taxa de fluxo: 0,5 mL/min.	-500 a 700 nm.	SHARMA <i>et al.</i> , 2013.
Fibras eletrofiadas de PCL e PGC-C18 carregadas com o pró-fármaco CPT-11 e o metabolito ativo quimioterápico SN-38 para liberação local sustentada desses IFAs contra as células de câncer colorretal.	Voltagem aplicada: 12 a 18 kV. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 12 a 25 cm. Taxa de fluxo: 10 mL/min.	-300 μ m (espessura das fibras). -7,7 $\pm$ 1,2 μ m (tamanho das fibras de PCL não dopadas). -7,2 $\pm$ 1,4 μ m ((tamanho das fibras de PCL dopadas).	YOHE <i>et al.</i> , 2012.
Fibras eletrofiadas de CHI arregadas com succinato de sumatriptano, naproxeno e naproxeno sódico para sua ação anti-migranosa.	Patente de Jirsak <i>et al.</i> , 2005.	-Os diâmetros de todas as fibras (CHI/5 % de sumatriptano, CHI/5 % de naproxeno, PVA/5 % de sumatriptano, PVA/5 % de naproxeno, PVA/CHI/PAA/5 % de naproxeno) estiveram dentro da escala nanométrica com boa forma e uniformidade dos diâmetros.	VRBATA <i>et al.</i> , 2013.
Fibras eletrofiadas de PVA carregadas com cafeína e riboflavina como um sistema de liberação desse IFA por dissolução rápida via oral.	Voltagem aplicada: 15 kV. Agulha: seringa de 5 mL com 0,5 mm de D.I. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 10 a 12 cm. Taxa de fluxo: 20 μ L/min.	-260 a 370 nm.	XIAOQIANG LI <i>et al.</i> , 2013.
Fibras eletrofiadas de [P (3HB-co-95 mol % 4HB)] carregadas com pralitinaxel para o desenvolvimento de uma cobertura direta de uma camada homogênea das fibras eletrofiadas para <i>stent</i> metálico.	Voltagem aplicada: 25 kV. Agulha: seringa de 1 mL. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 20 cm. Taxa de fluxo: 40 μ L/min.	-954 $\pm$ 230 nm (diâmetro de fibras carregadas com 1 % de IFA).	YAN-FEN LEE <i>et al.</i> , 2015.
Fibras eletrofiadas de PCL carregadas com nanopartículas de quitosana carregadas com naproxeno e rodamina B para a liberação programada de cada IFA.	Voltagem aplicada: 16 kV. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 12 cm. Taxa de fluxo: 1,5 mL/h.	-Fibras em escala nanométrica.	YAZHOU WANG <i>et al.</i> , 2011.
Fibras eletrofiadas de PCL carregada com pralitinaxel para aplicações potenciais, como <i>stent</i> coberto com uma membrana fibrosa para estenose benigna de cárdia.	CUY <i>et al.</i> , 2009: Agulha: seringa de 2 mL. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 15 cm.	-1,51 $\pm$ 0,67 μ m. Os diâmetros das fibras foram 1,51 $\pm$ 0,67, 1,34 $\pm$ 0,62, 1,26 $\pm$ 0,54 e 1,15 $\pm$ 0,36 para as fibras	YUEQI ZHU <i>et al.</i> , 2013.

	Taxa de fluxo: 0,5 mL/h.	de PCL com diferentes concentrações de IFA de 0 % (PCL), 0,5 % (PCL-0,5 %), 1,0 % (PCL-1,0 %) e 2,0 % (PCL-2,0 %), respectivamente.	
Fibras eletrofiadas de PLLA e PLGA carregado com rifampicina e paclitaxel como sistema de liberação controlada destes IFAs.	Voltagem aplicada: 30 a 45 kV. Agulha: seringa de 5 mL com 0,4 mm de D.I. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 20 cm.	-Fibras submicrométricas (PLLA/rifampicina, PLGA (80/20)/ rifampicina e PLLA/paclitaxel).	ZENG, KANG e SU, 2012.
Fibras eletrofiadas, responsivas ao ácido, de PLLA com bicarbonato de sódio dopado e carregadas com ibuprofeno para evitar uma resposta inflamatória excessiva e promover a regeneração.	CUY <i>et al.</i> , 2006: Voltagem aplicada: 15 a 30 kV. Agulha: seringa de 5 mL com 0,6 mm de D.I. Distância entre a ponta capilar e a superfície do coletor: 3,6 a 5,4 mL/	-1,13 ± 0,42 µm.	ZIMING YUAN <i>et al.</i> , 2014.

Quadro 2: Método de *electrospinning* para a elaboração das fibras contendo IFAs encapsulados (2006-2016).

Começo do Quadro 3: Técnicas analíticas de quantificação empregadas na avaliação das fibras contendo IFAs encapsulados preparadas através do método de *electrospinning* (2006-2016).

IFAs	Técnicas analíticas	Condições	Autor
-Nistatina.	-Espectroscopia no ultravioleta visível.	-Solvente: PBS (pH 7,4). -Detecção: 305 nm.	ADUBA, D. Jr., 2012.
-Celecoxib.	-Espectroscopia no ultravioleta visível.	-Solvente: Solução de HCl (pH 1,2), PBS (pH 6,8), PBS (pH 6,8 com 0,6 mg/mL de enzima pectinolítica). -Detecção: 251 nm.	AKHAGARI e ROTUBATI, 2016.
-Levotiroxina.	-HPLC.	-Fase móvel: ACN/0,05 mol L ⁻¹ de tampão fosfato (70:30) (ajustado para pH 3 usando ácido fosfórico). -Fase estacionária: Coluna X-bridge (3,5 µm, 4,6 mm x 100 mm). -Detecção: 220 nm. -Tempo de retenção: 9 min.	AZARBAYJANI <i>et al.</i> , 2010
-Donepezil.	-Espectroscopia de impedância eletroquímica. -Espectroscopia no ultravioleta visível.	-Solvente: PBS (pH 6,5). -Detecção: 229 nm.	GENCTURK e SARAC, 2016.
-Maraviroc.	-HPLC.	-Fase móvel: ACN/10 mol L ⁻¹ de tampão de KH ₂ PO ₄ (40:60). -Fase estacionária: Coluna Phenomenex Luna C ₁₈ (5 µm, 4,6 mm x 250 mm). -Detecção: 220 nm.	BALL e WOODROW, 2014.
-Naproxeno.	-HPLC.	-Fase móvel: ACN (100 %). -Fase estacionária: Coluna Zorbax Eclipse XDB-C ₁₈ (5 µm, 4,6 mm x 150 mm). -Detecção: 230 nm.	CANBOLAT, CELEBIOGLUA e UYAR, 2014.
-Cetoprofeno.	-Espectroscopia no ultravioleta visível.	-Solvente: PBS. -Detecção: 260 nm.	YU <i>et al.</i> , 2015.
-Irbesartan.	-Espectroscopia no ultravioleta visível. -HPLC*	-Solvente: 0,1 N de HCl. -Detecção: 244 nm. *Fase móvel: ACN/tampão de 0,01 mol L ⁻¹ de NaH ₂ PO ₄ com 0,07 % de trietilamina (34:66) (ajustado para pH 3 usando ácido fosfórico). *Fase estacionária: Coluna C ₁₈ LichrospherVR (5 µm, 4,6 mm x 250 mm). *Detecção: 244 nm.	ADELI, 2015.
-Nifedipina.	-Espectroscopia no ultravioleta visível.	-Solvente: Solução aquosa de NaOH (pH 6,8). -Detecção: 238 nm.	DA COSTA <i>et al.</i> , 2015.
-Doxorrubicina.	-Espectroscopia no ultravioleta visível.	-Solvente: Água. -Detecção: 490 nm. *Solvente: PBS (pH 7,4). *Detecção: 540 nm.	ZHENG <i>et al.</i> , 2013.

Continuação do Quadro 3: Técnicas analíticas de quantificação empregadas na avaliação das fibras contendo IFAs encapsulados preparadas através do método de *electrospinning* (2006-2016).

-Rifampicina e ácido fusídico (ou seu sal sódica; SF).	-HPLC. -Espectroscopia no ultravioleta visível.*	-Fase móvel: ACN/MeOH/0,01 mol L ⁻¹ de solução de ácido fosfórico (50:30:20). -Fase estacionária: Coluna C ₁₈ Phenomenex Luna (5µm, 4,6 mm x 250 mm). -Detecção: 235 nm. *Solvente: DMSO a 1 mg/mL e diluições usando PBS. *Detecção: 475 nm.	GILCHRIST <i>et al.</i> , 2013.
-Captopril.	-Espectroscopia no ultravioleta visível.	-Solvente: Solução tampão (a pH 7,4; 6,8; 1,2) -Detecção: 207 nm.	ZANG <i>et al.</i> , 2012.
-Gentamicina.	-HPLC-MS com triplo quadrupolo.	-Não disponível.	SIRC <i>et al.</i> , 2012.
-Metronidazol.	-HPLC.	-Solvente: trifluoroetanol. -Detecção: 310 nm.	XUE <i>et al.</i> , 2015.
-Cetoprofeno.	-Espectroscopia no ultravioleta visível.	-Solvente: PBS (pH 7,4). -Detecção: 260 nm.	HU <i>et al.</i> , 2016.
-Cetoprofeno.	-Espectroscopia no ultravioleta visível.	-Solvente: PBS (pH 7,4). -Detecção: 290 nm.	JUMI YUN <i>et al.</i> , 2011.
-Bacitracina.	-Espectroscopia no ultravioleta visível.	-Solvente: PBS (pH 7,4). -Detecção: 254 nm.	JUNYAN YAO <i>et al.</i> , 2016.
-Ciprofloxacina.	-Espectroscopia no ultravioleta visível.	-Solvente: PBS (pH 7,4). -Detecção: 272 nm. -Solvente: Tampão. -Detecção: 550 nm*	KATARIA <i>et al.</i> , 2014.
-Vancomicina.	-HPLC.	-Fase móvel: 0,01 mol L ⁻¹ de ácido heptanosulfônico/ACN (85:15). -Fase estacionária: Coluna C ₈ Symmetry (3,9 cm x 150 mm). -Detecção: 280 nm.	KUO-SHENG LIU <i>et al.</i> , 2015.
-Metronidazol.	-HPLC.	-Fase móvel: Água destilada/ACN (95:5). -Fase estacionária: Coluna R18 LiChrosorb (5 µm, 25 mm x 4 mm). -Detecção: 254 e 320 nm.	REISE <i>et al.</i> , 2012.
-Fenbufen.	-Espectroscopia no ultravioleta visível.	-Solvente: 2,2,2-trifluoroetanol. -Detecção: 280 nm.	MENG <i>et al.</i> , 2011.
-Ácido de vitamina A e vitamina E.	-HPLC.	-Fase móvel: ACN/metanol/água destilada (25:25:1) (Vit-E), ACN/metanol/água destilada (45:45:10) (Retin-A). -Fase estacionária: Coluna C ₈ Water symmetry® (5 µm, 3,9 mm x 150 mm). -Detecção: 295 (Vit-E) e 325 nm (Retin-A).	PATTAMA TAEPAIBOON, URACHA RUNGSARDTHONG e PITT SUPAPHOL, 2007.
-Partículas de nanogel sintetizadas a partir de cloroquina (CQ) Carregado em BSA.	-Espectroscopia no ultravioleta visível.	-Solvente: Albumina de soro bovino (BSA). -Detecção: 330 nm (CQ), 343 nm (mistura de BSA e genipina carregando CQ).	PINGHUI ZHOU <i>et al.</i> , 2016.

Continuação do Quadro 3: Técnicas analíticas de quantificação empregadas na avaliação das fibras contendo IFAs encapsulados preparadas através do método de *electrospinning* (2006-2016).

-Paracetamol.	-Espectroscopia no ultravioleta visível.	-Solvente: Meio de dissolução de HCl (pH 1,2). -Detecção: 243 nm.	PRATCHAYA TIPDUANGTA <i>et al.</i> , 2015.
-Pró-fármacos poliméricos de cetoprofeno: éster de poli-cetoprofeno vinílico) e poli (éster de ketoprofeno vinílico - co-derivativo de glucose.	-HPLC.	-Fase móvel: Metanol/água (80:20). -Fase estacionária: Coluna Shim-Pack VP-ODS (4,6 mm x 150 mm). -Detecção: 254 nm.	JING QUAN <i>et al.</i> , 2013.
-Rifampicina.	-Espectroscopia no ultravioleta visível.	-Solvente: Metanol. -Detecção: 357 nm. -Solvente: PBS*. -Detecção: 475 nm*.	RUCKH <i>et al.</i> , 2012.
-Cafeína.	-HPLC.	-Fase móvel: buffer de pH 2,6 (1 L de água purificada contendo 1,6 mL de ácido ortofosfórico e 2,04 gr. de KH_2PO_4)/ACN (90:10). -Fase estacionária: Coluna RP-18 LiChrospher1 100 (5 μm). -Detecção: 273 nm.	SEIF, FRANZEN e WINDBERGS, 2015.
-Ciprofloxacina.	-HPLC.	-Fase móvel: ACN (100 %). -Fase estacionária: Coluna C ₁₈ Agilent (5 μm , 150 mm x 4,6 mm). -Detecção: 217 nm.	SERKAN DEMIRCI <i>et al.</i> , 2014.
-Rifampicina (RIF). -Isoniazida (ISO).	-Espectroscopia no ultravioleta visível.	-Solvente: PBS (pH 1,2) (isoniazida), PBS (pH 6,8) (rifampicina). -Detecção: 237 nm (RIF), 263 nm (isoniazida).	SHAIKH <i>et al.</i> , 2012.
-Cisplatina.	-ICP-MS.	Solvente: Tampão de acetato de sódio (pH 5,0).	SHAN ZONG <i>et al.</i> , 2015.
-Insulina.	-Espectroscopia no ultravioleta visível.	-Solvente: Solução de saliva simulada (pH 6,5). -Detecção: 562 nm.	SHARMA <i>et al.</i> , 2013.
-Pró-fármaco CPT-11 e metabolito activo quimioterapêutico SN-38.	-HPLC com detector de fluorescência.	-Fase móvel: ACN/0,075 mol L ⁻¹ de tampão de acetato de amônio (40:60) (SN-38), ACN/ 0,075 mol L ⁻¹ de tampão de acetato de amônio (60:40) (CPT-11). -Fase estacionária: Coluna ODS para fase reversa Phenomenex Prodigy 5 (5 μm , 150 mm x 4,6 mm). -Detecção: λ_{ex} =380 nm, λ_{em} =550 nm (SN-38), λ_{ex} =380 nm, λ_{em} =460 nm (CPT-11).	YOHE <i>et al.</i> , 2012.
-Succinato de sumatriptana (SUM). -Naproxeno (NAP). -Naproxeno sódico.	-HPLC.	-Fase móvel: 0,05 mol L ⁻¹ de fosfato de amônio/ACN (84:16) (SUM). -Fase estacionária: Coluna C ₁₈ Zorbax Eclipse XDB (5 μm , 4,6 mm x 250 mm) (SUM). -Detecção: 282,7 nm (SUM). -Fase móvel: 0,01 mol L ⁻¹ de tampão di-hidrogeno fosfato de potássio (pH ajustado para 2,5 com adição de 0,1 mol L ⁻¹ de ácido fosfórico/ACN (55:45) (NAP). -Fase estacionária: Coluna C ₁₈ Zorbax Eclipse XDB (5 μm , 4,6 mm x	VRBATA <i>et al.</i> , 2013.

		250 mm) (NAP). -Detecção: 230 nm (NAP).	
-Cafeína (CAF). -Riboflavina.	-Espectroscopia no ultravioleta visível.	-Solvente: Água destilada. -Detecção: 276 nm (CAF).	XIAOQIANG LI <i>et al.</i> , 2013.
-Praclitaxel.	-HPLC.	-Fase móvel: ACN/metanol/água deionizada (65:5:30). -Detecção: 227 nm.	YAN-FEN LEE <i>et al.</i> , 2015.
-Nanopartículas de quitosano carregadas com naproxeno. -Rodamina B (RHOD).	-Espectrofotometria de duplo comprimento de onda.	-Solvent: PBS (pH 7,4). -Detecção: 554 nm (RHOD), 330 nm (NAP) e 369 nm (RHOD e NAP).	YAZHOU WANG <i>et al.</i> , 2011.
-Praclitaxel.	-HPLC.	-Fase móvel: ACN/água destilada/metanol (58:37:5). -Fase estacionária: Coluna C ₁₈ (5 µm, 4,6 mm x 150 mm). -Detecção: 230 nm.	YUEQI ZHU <i>et al.</i> , 2013.
-Ibuprofeno.	-Espectroscopia no ultravioleta visível.	-Solvente: PBS (pH 7,4). -Detecção: 224 nm.	ZIMING YUAN <i>et al.</i> , 2014.
-Paracetamol.	-Espectroscopia no ultravioleta visível. -HPLC*.	-Solvente: PBS (pH 7,4). -Detecção: 243 nm. *Fase móvel: 0,1 mol L ⁻¹ de tampão fosfato (pH 4,5)/metanol (80:20). *Fase estacionária: Coluna C ₁₈ (5 µm, 4,6 mm x 150 mm).	CUI <i>et al.</i> , 2006.

Quadro 3: Técnicas analíticas de quantificação empregadas na avaliação das fibras contendo IFAs encapsulados preparadas através do método de *electrospinning* (2006-2016).

2.2.1.1. Técnica de *electrospinning*.

As nanofibras eletrofiadas tem diversas aplicações e tem a capacidade de conter diferentes tipos de substâncias, tais como: fármacos, biomoléculas, materiais genéticos e até nanopartículas (BALAJI *et al.*, 2015).

Conforme a Figura 5, para o desenvolvimento das nanofibras, um campo elétrico elevado (geralmente de 5 a 50 kV) é aplicado entre a agulha de metal da seringa e do coletor. A solução de polímero na seringa é ejetada a partir da agulha de injeção a uma taxa constante, formando uma gota na ponta devido à tensão superficial. Pela ação do campo elétrico, uma certa quantidade de carga de superfície é induzida na superfície do líquido. Ao atingir o valor crítico de campo elétrico, a força elétrica vence a tensão superficial do líquido e, em seguida, uma solução de jato carregado é ejetado a partir da ponta da agulha, sendo que o jato carregado sofre forte deformação (em geral, a taxa de deformação axial é cerca de 10000 s^{-1}). Este jato move-se para o coletor e durante o voo, o solvente é evaporado ou parcialmente evaporado durante um tempo curto (geralmente, 200 nL s^{-1}), diminuindo gradualmente o diâmetro da fibra de polímero formado. Este processo envolve a formação de fibras de comprimento longo e uma elevada relação superfície/volume com um certo grau de alinhamento molecular, causada principalmente pelo estiramento brusco e à rápida evaporação do solvente (BAPTISTA, FERREIRA, BORGES, 2013; BHARDWAJ e KUNDU, 2010; COSTA *et al.*, 2012; LI e XIA, 2004; DA SILVA, 2013).

Durante o processo de injeção, após a formação de gotas, é formada na ponta da agulha uma espécie de cone, conhecido como o cone de Taylor. De acordo com a literatura, a formação do cone de Taylor durante a deposição das fibras é um requerimento básico para a formação de fibras contínuas e homogêneas, onde as flutuações ou malformação do cone representam mudanças estruturais diretamente nas fibras (DA SILVA, 2013).

Figura 5: Representação esquemática do processo de *electrospinning*.

2.2.2. Nanopartículas poliméricas.

As nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais compostos por polímeros naturais, sintéticos ou semissintéticos. Estes sistemas poliméricos são amplamente utilizados para a liberação controlada de fármacos em sítios específicos (RAWAT *et al.*, 2006).

Os principais polímeros naturais e sintéticos utilizados são: gelatina, quitosana, poli (D, L-láctico co-glicólico) (PLGA), copolímero de ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), poli alquil cianoacrilato (PACA), polimetacrilato de metila (PMMA), e poli (n-Butil cianoacrilato) (PBCA) (FARAJI; WIPF, 2009).

O uso de nanopartículas poliméricas biodegradáveis como carreadores para sistemas de liberação modificada de fármacos têm se destacado devido ao aumento da biodisponibilidade e, mais importante, a diminuição de efeitos secundários no organismo (FARAJI; WIPF, 2009).

O termo “nanopartícula” polimérica engloba dois tipos de estruturas diferentes, denominadas nanocápsulas e nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a sua composição e organização. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido nesse núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas que não apresentam óleo em sua composição são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (REZENDE SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

São vários os métodos desenvolvidos para a preparação de nanopartículas poliméricas que se encontram descritos na literatura. De uma maneira geral estes podem ser classificados em duas grandes categorias, técnicas *top-down* e *bottom-up*. Os métodos *top-down*, como a *electrospinning*, utilizam a redução do tamanho para obter nanopartículas de tamanho controlado. A redução do tamanho está baseada na aplicação de uma forte tensão de cisalhamento por onda de emissão de som (sonicação), alta pressão (microfluidização), e agitação de alta velocidade (homogeneização). Os métodos *bottom-up* começam a partir de moléculas individuais para formar nanopartículas, por polimerização. Os

métodos de polimerização comumente utilizados são a polimerização em emulsão (água em óleo, óleo em água, e a polimerização em estruturas bicontínuas), polimerização em dispersão, e polimerização interfacial (BRIGGER; DUBERNET e COUVREUR, 2002).

2.2.2.1. Técnica de emulsão/evaporação de solvente.

Este método envolve dois passos principais: o primeiro engloba a emulsificação, sobre elevada agitação do polímero dissolvido numa solução orgânica numa fase aquosa. O segundo envolve a evaporação do solvente do polímero por aumento de temperatura sob pressão reduzida ou agitação contínua. Finalmente, o solvente é eliminado e o polímero precipita, formando as nanopartículas, tal como mostra a Figura 6 (ESPAÑOL MARIÑO adaptado de REIS, 2015).

Figura 6: Esquema ilustrativo da preparação de nanopartículas através do método de emulsificação/evaporação do solvente (ESPAÑOL MARIÑO adaptado de REIS, 2015).

2.2.3. Copolímero de PLGA.

Um dos polímeros mais utilizado pela sua degradação e as suas propriedades é o copolímero de PLGA, ver a Figura 7. Este biopolímero está comercialmente disponível para uso médico e tem sido aprovado para sua utilização pela FDA para o desenvolvimento de sistemas para a administração de substâncias ativas por injeção. (RAO *et al.*, 2010). O copolímero de PLGA sofre degradação hidrolítica, como mostrado na Figura 7 apresenta hidrólise nas ligações éster, sendo metabolizado para ácidos monoméricos e é removido através do ciclo de Krebs, como mostrado na Figura 8, a possível via de biopolímero-reabsorção

(SCOTT, 2003). As nanopartículas PLGA sofrem degradação hidrolítica como mostrado na Figura 7, a qual é modulada variando as características do polímero como a sua composição química, porosidade, caráter hidrofílico/hidrofóbico, morfologia (cristalino/amorfo), o peso molecular e a distribuição de peso molecular. Os polímeros PLGA apresentam hidrólises nas ligações éster, metabolizado a ácidos monoméricos e se submete a eliminação através do ciclo de Krebs, como se pode observar na Figura 8, a possível rota de bio-reabsorção do polímero (SCOTT, 2003).

Figura 7: Estrutura e hidrólise do copolímero de PLGA (FÉLIX LANAO *et al.*, 2007).

Figura 8: Via metabólica de bio-reabsorção dos poli (α-hidroxi ácidos) de PLA e PGA (FÉLIX LANAO *et al.*, 2007).

2.2.4. Caracterizações físico-químicas.

A natureza coloidal faz com que seja necessário o uso de diferentes técnicas para a caracterização físico-química das NPs, onde se possam mostrar modelos descritivos da organização quali-quantitativa das formulações e métodos de preparação empregados. A caracterização das NPs envolve a avaliação morfológica, potencial zeta, pH, distribuição de tamanho de partícula, determinação da eficiência de encapsulação do fármaco e a determinação cinética de liberação (POHLMANN *et al.*, 2007).

Conforme foi citado anteriormente por Kuempel (2007) um composto em nanoescala tem que revelar características diferentes das outras escalas. Isso intensifica a necessidade e a importância da sua caracterização (SOANE; OFFORD e WARE, 2005) (KUEMPEL; GERACI e SCHULTE, 2007).

A. Avaliação morfológica.

Para avaliar a morfologia das NPs são utilizadas técnicas como a microscopia eletrônica de varredura (SEM) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (REZENDE SCHAFFAZICK e STANISÇUASKI GUTERRES, 2003).

Outra técnica que tem sido utilizada para caracterizar a morfologia de superfície das nanopartículas é a microscopia de força atômica (AFM) que pertence à família dos microscópios de varredura por sonda (SPM). Esse tipo de varredura oferece vantagens com relação ao SEM e TEM, por reproduzir imagens em três dimensões (3D) em escalas menores que os eletrônicos sem danificar as amostras (REZENDE SCHAFFAZICK e STANISÇUASKI GUTERRES, 2003).

B. Potencial zeta.

Potencial zeta é a medida do potencial elétrico entre a superfície externa da camada compacta que se desenvolve ao redor da partícula e o meio líquido em que ela está inserida. O potencial zeta é um parâmetro importante para avaliação da estabilidade de sistema coloidal, o qual é influenciado pela maioria das partículas dispersas em um sistema aquoso que irá adquirir uma carga elétrica

em sua superfície, tornando-a eletricamente carregada (MAINARDES; GREMIÃO e EVANGELISTA, 2006).

Convencionalmente, um potencial zeta pode ser elevado em um sentido positivo ou negativo. Os principais componentes presentes nas nanopartículas poliméricas capazes de influenciar a variação do potencial zeta são os polímeros constituintes das nanopartículas. Um potencial relativamente alto confere uma boa estabilidade físico-química, ou seja, o sistema coloidal vai resistir aglomeração. Já um potencial baixo dificulta a manutenção da estabilidade do sistema (DE MELO et al., 2011).

Uma das técnicas mais aceitas para medir o potencial zeta é determinada pela mobilidade eletroforética que corresponde à velocidade das partículas em suspensão coloidal diluída em uma cuba com dois eletrodos, as quais são submetidas a um campo elétrico. Quanto maior a carga superficial, maior será a velocidade com que as partículas deslocam em direção aos eletrodos de carga oposta, sendo esta velocidade medida através da técnica de espalhamento de luz (DE ASSIS, 2007).

C. Determinação do pH.

A medição do pH possibilita a caracterização da nanoestrutura em um sistema coloidal, por meio do seu monitoramento, em função do tempo. Geralmente, é viabilizado por um critério padrão físico-químico que pode ser utilizado para garantir a estabilidade das suspensões coloidais poliméricas (REZENDE SCHAFFAZICK e STANISÇUASKI GUTERRES, 2003).

O pH é influenciado pela ionização do grupo funcional carboxílico presente no polímero, ou ainda pela hidrólise parcial do polímero, que depende da hidrofobicidade do poliéster. Isso ficou evidenciado em experimento realizado por Raffin e colaboradores (2003), com nanocápsulas poliméricas secas contendo indometacina, onde o fármaco foi armazenado em condições apropriadas. Após dois meses de monitoramento houve um decréscimo na escala do pH, em média 11 % (RAFFIN *et al.*, 2003).

D. Distribuição do tamanho de partícula.

A distribuição do tamanho das partículas caracteriza a tendência à sedimentação e à agregação das mesmas, avaliando-se a estabilidade do sistema. O diâmetro da nanocápsula é influenciado por vários fatores: natureza e concentração dos polímeros e do fármaco, concentração de tensoativos, natureza do óleo utilizado como núcleo, proporção entre o solvente orgânico e água, além da velocidade difusa da fase orgânica na aquosa (MAINARDES; GREMIÃO e EVANGELISTA, 2006).

As técnicas utilizadas para a determinação da distribuição de tamanho das partículas em dispersões coloidais baseiam-se em espalhamento de luz dinâmico (DLS) e nas microscopias por SEM e TEM (utilizando programas como ImageJ se podem medir os diâmetros das nanopartículas). O método por microscopia fornece uma imagem das partículas isoladas no meio, enquanto o DLS especifica o diâmetro hidrodinâmico que difunde em fluido (REZENDE SCHAFFAZICK e STANISÇUASKI GUTERRES, 2003).

O princípio do DLS é determinado pela análise do movimento browniano. As partículas são iluminadas com um laser e a intensidade da luz difusa oscila de acordo com o tamanho da partícula. Partículas menores se movimentam mais rapidamente que as maiores, de forma que a taxa de flutuação da luz espalhada por elas também seja mais rápida. A análise dessas flutuações determina a velocidade do movimento browniano e, portanto, o tamanho da partícula (ASSIS, 2007).

Para avaliar a morfologia das nanofibras poliméricas são utilizadas técnicas como o SEM e o TEM. O objetivo dessas análises microscópicas é caracterização das nanopartículas quanto à forma, ao tamanho e à espessura (REZENDE SCHAFFAZICK e STANISÇUASKI GUTERRES, 2003).

O TEM provê informação do tamanho. Devido a seu tamanho pequeno, as nanoestruturas são irresolúveis pelo microscópio óptico, por isso a microscopia eletrônica é empregada para a caracterização de seu tamanho e sua forma. A SEM é empregada para obter informação de tamanho, distribuição de tamanho

e forma das nanoestruturas. A TEM emprega feixes de elétrons de maior potência a diferença do SEM, por isso tem mais resolução e fornece grande detalhe na escala atômica como por exemplo informação da estrutura cristalina e granularidade da amostra. Além disso, a TEM exige alto vácuo e seções de amostra finas para penetração por feixe de elétrons. A preparação de amostras e secagem pode alterar o estado físico-químico das nanoestruturas. A utilização de várias técnicas tais como a caracterização de tamanho complementar por TEM e SEM, pode ser útil para resolver ambiguidades associadas com qualquer técnica de medição sozinhas (HALL *et al.*, 2007).

E. Calorimetria exploratória diferencial.

Outras técnicas empregadas para a determinação da forma de associação do fármaco a nanopartículas incluem a calorimetria exploratória diferencial, a difração de raios X e/ou a espectroscopia no infravermelho.

Os métodos termo analíticos, tais como calorimetria exploratória diferencial (DSC), são de grande utilidade para a análise de polímeros, e têm sido utilizados também para investigar interações entre os polímeros e os fármacos em diversas formulações de microesferas e nanopartículas. Deste modo, informações úteis podem ser obtidas a respeito da morfologia do polímero cristalino e sobre o estado de dispersão sólida ou molecular do fármaco associado a estes sistemas poliméricos (GAMISANS *et al.*, 1999).

Análises através de DSC têm sido utilizadas também para estudar as interações intermoleculares entre fármacos e adjuvantes, sendo de grande utilidade em estudos de pré-formulação, na medida em que podem ser obtidas informações sobre potenciais incompatibilidades físicas ou químicas entre o fármaco e os adjuvantes. Também é possível investigar reações químicas, como polimerização, depolimerização e degradação (SHAHWAL, 2012).

Além do emprego de DSC na elucidação da forma de associação dos fármacos às nanoestruturas, esta técnica também pode ser aplicada na obtenção de informações a respeito da organização de outros componentes das formulações nestes sistemas (MÜLLER *et al.*, 2001).

F. Termogravimetria/ termogravimetria derivada.

Os métodos termo-analíticos, tais como termogravimetria/ termogravimetria derivada (TGA/DTA) são de grande utilidade para a análise de polímeros, e têm sido utilizados para investigar as perdas de massa em função da temperatura dos polímeros e dos fármacos em diversas formulações de nanoestruturas. A amostra começa a perder quantidades significativas de massa de forma espontânea pelo calor fornecido, a temperatura relacionada ao início deste processo chama-se de temperatura de degradação. A degradação abrange um intervalo onde se tem uma diminuição expressiva na massa, que em caso quando não é na sua totalidade, fica uma massa residual remanente, confirmando-se desta maneira a degradação do material (CUNHA, 2011).

G. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho.

A análise através da espectrofotometria de absorção na região do infravermelho mede a absorção seletiva da luz pelos modos de vibração de uniões química específicas na amostra. A observação dos espectros de vibração dos fármacos encapsulados permite a avaliação dos tipos de interações que ocorrem entre os fármacos e o polímero, porque as vibrações dos átomos envolvidos nesta interação podem sofrer alterações em frequência e intensidade (MAINARDES, GREMIÃO e EVANGELISTA, 2006; TERRY *et al.*, 2014)

2.2.5. Determinação da eficiência de encapsulação dos Insumos Farmacêuticos Ativos.

A determinação da quantidade de fármaco associada às nanoestruturas é especialmente complexa devido ao tamanho reduzido destas o que dificulta a separação da fração de fármaco livre da fração associada. Uma técnica de separação bastante utilizada é a ultracentrifugação. De acordo com os estudos publicados, diversos fatores são capazes de influenciar a quantidade de fármaco associada aos sistemas nanoestruturados, dentre os quais destacam-se as características físico-químicas do fármaco: as características da superfície das nanoestruturas ou a natureza do polímero, a quantidade de fármaco adicionada

à formulação e a ordem de adição do fármaco na formulação nas nanoestruturas (REZENDE SCHAFFAZIC e STANISÇUASKI GUTERRES, 2003).

2.2.5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica analítica para separação de substâncias em mistura, com base nas diferentes velocidades de eluição dessas substâncias em razão das afinidades relativas pelas duas fases: a fase móvel e a fase estacionária (MEYER, 2013).

O equipamento de HPLC (Figura 9) basicamente está constituído de seis componentes. O reservatório de solventes é o local onde se encontram os solventes da fase móvel que é impulsionada até a coluna cromatográfica por um sistema de bomba composto de uma ou mais bombas de alta pressão (CZAPLICKI, 2013).

Figura 9: Representação de um equipamento de HPLC (CZAPLICKI, 2013).

A principal característica é que a fase móvel dissolve a amostra sem qualquer interação química entre ambas. Esta fase deve ter alto grau de pureza ou ser de fácil purificação, para que se possam fazer análises de alta sensibilidade, pois as impurezas podem interferir na detecção do analito por ultravioleta (UV). A fase móvel deve possuir polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra. Embora existam vários solventes três deles são mais utilizados: água, metanol e acetonitrila (SISMOTTO, PASCHOAL, REYES, 2013).

2.2.5.2. Eletroforese capilar.

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica de separação em fase líquida que se baseia na migração diferencial de espécies iônicas ou ionizáveis quando as mesmas são submetidas a um campo elétrico (TAVARES, 1997).

A CE consiste de dois reservatórios que contêm uma solução tampão idêntica e que são conectados entre si por meio de um tubo capilar de sílica fundida, preenchido com a mesma solução tampão, a qual é denominada eletrólito. Em cada reservatório é mantido um eletrodo de platina que o conecta a uma fonte de alta tensão que fornece a diferença de potencial requerida para a separação dos analitos. A mobilidade eletroforética dos íons é determinada por carga/tamanho (GERVASIO *et al.*, 2003). A Figura 10 representa uma montagem típica em CE.

Figura 10: Diagrama esquemático do sistema de CE (GERVASIO *et al.*, 2003).

A injeção de amostra, na CE, pode ser feita por: injeção hidrodinâmica e eletrocínética. Na injeção hidrodinâmica utiliza-se um gradiente de pressão, é feita aplicando-se pressão pela introdução de um gás inerte no reservatório contendo a amostra ou pela aplicação de vácuo no reservatório que contém a solução tampão na outra extremidade do capilar. A injeção por sifonagem é feita pelo deslocamento de líquido provocado pela diferença de altura dos reservatórios de amostra e tampão. Na injeção eletrocínética um gradiente de alta tensão é aplicado na amostra durante um curto período de injeção, é feita

pela aplicação de um potencial, geralmente entre 5 e 15 kV, por alguns segundos (SANTOS, TAVARES e RUBIM, 2000).

A CE é realizada em tubos com dimensões capilares, tipicamente de 25 a 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo. A alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados (10 a 30 kV), resultando em separações de alta eficiência e baixo risco para o operador, uma vez que as correntes são de no máximo de 100 μA (TAVARES, 1997).

A utilização de capilares como canais de migração em eletroforese capilar permite uma diferença da separação eletroforética. Além da vantagem da utilização de pequenos volumes (1 a 10 μL), este sistema é compatível com vários sistemas de detecção como absorção no UV-Vis, fluorescência, métodos eletroquímicos, condutividade, espectrometria de massas, entre outras. Por possuir mecanismo de separação distinto, a CE é uma boa alternativa para quantificar fármacos com precisão (TAVARES, 1996; VEUTHEY, 2005).

A separação dos compostos ocorre pela aplicação de voltagem, de modo que os cátions migram para o polo negativo (cátodo) e os ânions migram para o polo positivo (ânodo). Esta mobilidade eletroforética das partículas é determinada pelo tamanho e número de cargas dos íons: na separação, quanto menor o íon e maior a sua carga mais rapidamente será a saída deste íon. A velocidade em que ocorre esta separação depende da diferença de potencial (ddp) aplicada. Outro fator importante na mobilidade dos íons é o pH das soluções, a mobilidade pode ser influenciada pelo valor do pKa, portanto quanto mais ionizada a partícula maior será sua mobilidade. Partículas neutras não são atraídas aos polos e seguem o fluxo eletrosmótico (ALTRIA, 1996; SILVA *et al.*, 2007).

O fluxo eletrosmótico é a força responsável pelo transporte dos solutos, independente da carga, ao longo do capilar e ocorre pela ionização dos grupos silanóis presentes na sílica no interior do capilar. O fluxo é gerado quando cátions presentes no eletrólito de corrida são atraídos pelos grupos silanóis formando uma camada fixa próxima à parede interna do capilar, uma segunda camada móvel de cátions é formada migrando no sentido do cátodo, na aplicação de um campo elétrico, e deslocando o volume da solução contida no capilar. Os

principais modos de separação em CE são: a eletroforese capilar em zona (CZE) e cromatografia eletrocínética capilar (MEKC) (SANTOS, TAVARES e RUBIM, 2000).

2.2.5.3. Comparação de CE com outras técnicas.

A CE apresenta-se como técnica analítica complementar HPLC e à cromatografia gasosa (GC). Deve-se ressaltar que a CE pode oferecer vantagens significativas sobre as técnicas cromatográficas: requer pequeno volume de amostra (apenas alguns μL), além de permitir a análise de uma vasta gama de compostos desde íons até macromoléculas utilizando a mesma coluna capilar. Os instrumentos de CE e HPLC convencionais (utilizando detectores ópticos) possuem custo equivalente, mas o custo operacional é significativamente menor na CE, principalmente pelo baixo consumo de solventes e com o baixo custo das colunas capilares (ANASTOS, BARNETT, LEWIS, 2005).

2.2.5.4. Validação de métodos analíticos.

O processo de validação de um método analítico abrange o planejamento, o desenvolvimento e os estudos estatísticos que garantirão que o método desenvolvido é adequado para a análise proposta fornecendo uma evidência documentada de sua finalidade (ICH, 2005).

A validação de métodos analíticos deve seguir as diretrizes estabelecidas por órgãos reguladores. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução Anvisa RDC 166/ 2017 estabelece os procedimentos para validação de métodos analíticos (ANVISA, 2017).

Os parâmetros fundamentais que atendam as exigências de uma validação de ensaio analítico são: linearidade, especificidade, exatidão, precisão (repetibilidade), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez (GIL, 2010).

A. Linearidade.

Linearidade é definida como a capacidade de um método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de um intervalo de atuação (ANVISA, 2017).

B. Limites de detecção e quantificação.

Estes dois parâmetros estão associados à sensibilidade do método diferindo entre eles apenas pelo peso atribuído a cada parâmetro: 3 para limite de detecção e 10 para limite de quantificação. O limite de detecção (LD) é a menor concentração detectável do analito sob condições experimentais estabelecidas, enquanto que o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito determinada quantitativamente com precisão e exatidão (ANVISA, 2017; ICH, 2005).

C. Precisão.

A precisão de um método analítico é definida pelo grau de repetibilidade e reprodutividade entre os resultados obtidos em medições idênticas e sequenciais de uma mesma amostra. A precisão intermediária é definida pelo grau concordância de resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias, analistas ou equipamentos diferentes. Recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes, com analistas ou equipamentos diferentes. O desvio padrão relativo expresso em porcentagem (%) está associado a este parâmetro (ANVISA, 2017; ICH, 2005).

D. Especificidade e seletividade.

Especificidade é a capacidade de um método analítico avaliar, inequivocamente, um analito na presença de outros componentes presentes na amostra (impurezas, produtos de degradação). O termo seletividade também é aceito pelo ICH e sugerido como único pela União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC). A seletividade/especificidade de um método está relacionada à detecção. Se o método apresenta resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que apresenta respostas para vários analitos,

mas que pode distinguir a resposta de um analito frente aos demais é chamado seletivo (ANVISA, 2017; RIBANI, 2004).

E. Exatidão.

A exatidão de um método está relacionada ao grau de concordância entre os resultados obtidos pelo método em estudo e um valor referência. É expressa em percentual de recuperação analítica (valor obtido/valor referência) (ANVISA, 2017; ICH, 2005).

F. Robustez.

A capacidade de um método analítico permanecer inalterado sob pequenas e deliberadas variações de condições de ensaio confere robustez ao método. Entre os fatores investigados na avaliação de robustez de um método estão pequenas mudanças no pH, composição da fase móvel, tipo de coluna cromatográfica, fluxo da fase móvel, temperatura. A ANVISA não determina quanto cada fator investigado pode ser variado, entretanto as variações não devem influenciar significativamente as determinações e quantificações do analito (ANVISA, 2017; ICH, 2005).

2.2.6. Referências para determinação dos Insumos Farmacêuticos Ativos por cromatografia líquida de alta eficiência.

Foi realizada uma pesquisa dos métodos de quantificação em simultâneo da RIFA e ISO através de HPLC (Quadro 4).

Começo do Quadro 4: Condições de trabalho utilizadas para a determinação e quantificação simultânea de RIFA e ISO através da HPLC em apresentações farmacêuticas.

IFAs	Coluna	Condições	Referência
RIFA, ISO e PZA	L1 base desativada (4,6 mm de D.I. x 25 cm, 5 µm).	-Tampão: 0,14 % de fosfato de sódio dibásico anidro (ajustado a pH 6,8). -Solução A: Buffer: ACN (96:4, v/v). -Solução B: Buffer: ACN (45:55, v/v). 0 min: 100 % de solução A; 0 a 5 min: 100 % de solução A; 5,1 a 6 min: 100 a 0 % de solução A e de 0 a 100 % de solução B; 6,1 a 15 min de 100 % de solução B. -Fluxo: 1,5 mL min ⁻¹ . -λ: 238 nm.	USP40-NF 35, 2015.
RIFA, ISO, PZA e ETA	Purospher STAR RP18e (4,6 mm de D.I. x 25 cm, 5 µm).	20 mmol L ⁻¹ de tampão fosfato de sódio monobásico com 0,2 % de trietilamina (ajustado a pH 7,0):ACN (96:4, v/v). 0 a 5 min: 100 % de tampão; 5,1 a 7 min: 0 a 52 % de ACN; 7,1 a 12 min: 52 % de ACN; 12,1 a 17 min: 100 % de tampão. -Fluxo: 1,5 mL min ⁻¹ . -Temperatura da coluna: 40°C. -λ: 238 nm e 210 nm (só para o ETA).	CHELLINI <i>et al.</i> , 2015.
RIFA e ISO	Novapak C18 (3.9 mm de D.I. x 15 cm).	Metanol: 20 mmol L ⁻¹ de tampão hidrogênio ortofosfato dissódico (ajustado a pH 4,5) (75:25, v/v). -Fluxo: 1,0 mL min ⁻¹ . -Temperatura da coluna: 25°C. -λ: 254 nm.	YATEEN SHAH <i>et al.</i> , 2015.
RIFA, ISO, PZA e cloridrato de piridoxina	Phenomenex Luna C18 (4,6 mm de D.I. x 25 cm, 5 µm).	-Tampão: 15 mmol L ⁻¹ de dihidrogênio fosfato de potássio (ajustado a pH 4). 0 a 4,5 min: ACN: tampão (11:89, v/v); 4,6 min a 20 min: ACN:tampão (50:50, v/v). -Fluxo: 1,0 mL min ⁻¹ . -Temperatura da coluna: 25°C. -λ: 235 nm.	DHAL e SHARMA, 2009.
RIFA, ISO, PZA e ETA derivatizados com PEIC	Waters Symmetry C8 (4,6 mm de D.I. x 25 cm, 5 µm).	-Tampão: 20 mmol L ⁻¹ de fosfato com 1,5 mL L ⁻¹ de TEA (ajustado a pH 6,8) 0 a 12 min: ACN:tampão (22:78, v/v); 12,1 a 22 min: ACN:tampão (60:40, v/v); 22,1 minutos a 23 minutos: ACN:tampão (22:78, v/v). -Fluxo: 1,5 mL min ⁻¹ . -Temperatura da coluna: 30°C. -λ: 210 nm.	KHOIRI, MARTONO e ROHMAN, 2015.
RIFA, ISO e PZA	C18 Inertsil ODS-3 (4,6 mm de D.I. x 15 cm, 5 µm).	-Tampão: 3 % ACN em 10 mmol L ⁻¹ de fosfato de potássio monobásico (ajustado a pH 6.8). 0 a 5 min: ACN:tampão (0:100, v/v); 5,1 a 20 min: ACN:tampão (50:50, v/v); 20,1 a 21 min: ACN:tampão (0:100, v/v). -Fluxo: 1,5 mL min ⁻¹ . -Temperatura da coluna: 30°C. -λ: 254 nm.	JONGRUNGRU ANGCHOK e SONGSAK, 2015.
RIFA, ISO e PZA	µ-bondapak C18 (4,6 mm de D.I. x 25 cm, 10 µm).	ACN:tBAH (0,0002 mol L ⁻¹) (42,5:57,5, v/v) (ajustado a pH 3,1). -Fluxo: 1,0 mL min ⁻¹ . -Temperatura da coluna: 25°C. -λ: 260 nm.	GLAS <i>et al.</i> , 2007.

RIFA, ISO, PZA e ETA	Phenomenex Luna C18 (4,6 mm de D.I. x 25 cm, 5 µm).	<p>-Pré-coluna foi derivatizado com PEIC.</p> <p>-Tampão: 8 mmol L⁻¹ de fosfato (ajustado a pH 6,8).</p> <p>0 min até: ACN:tampão (10:90, v/v); por 18 min: ACN:tampão (60:40, v/v); por 6 min: ACN:tampão (60:40, v/v); por 2 min: ACN:tampão (10:90, v/v); equilibrado por mais 2 min.</p> <p>-Fluxo: 1,0 mL min⁻¹.</p> <p>-Temperatura da coluna: 25°C.</p> <p>-λ: 210 nm.</p>	HUAN WANG <i>et al.</i> , 2012.
RIFA, ISO, PZA e ETA	Octadecilsilano (4,6 mm de D.I. x 25 cm, 5 µm).	<p>F.A: 85 % de 0,3 mol L⁻¹ formiato de amônio (ajustado a pH 5), 15 % de metanol e 0,005 mol L⁻¹ de Cu⁺² (ou 250 mg L⁻¹ de CuSO₄ .5H₂O).</p> <p>F.O: metanol, 0,1 % de TEA e 0,2 % de ácido fórmico.</p> <p>0 a 10 min: 100 % F.A; 10 a 20 min: 100 % F.O; 20 ,1 a 35 min: 100 % F.A.</p> <p>-Fluxo: 1,0 mLmin⁻¹.</p> <p>-Temperatura da coluna: 25°C.</p> <p>-λ: 265 nm e 335 nm (só para a RIFA).</p>	CONDE DE LIMA, 2014.

Quadro 4: Condições de trabalho utilizadas para a determinação e quantificação simultânea de RIFA e ISO através da HPLC em apresentações farmacêuticas.

2.2.7. Referências para determinação por eletroforese capilar dos Insumos Farmacêuticos Ativos.

Foi realizada uma pesquisa dos métodos de quantificação em simultâneo da RIFA e ISO através de CE (Quadro 5).

Começo do Quadro 5: Condições de trabalho utilizadas para a determinação e quantificação simultânea de RIFA e ISO através da CE em apresentações farmacêuticas.

Fármaco	Modo de separação por CE	Capilar	Eletrólito	Voltagem (kV)	λ (nm)	Referência
RIFA, ISO e PZA	ECZ	64,5 cm (56 cm efetivo) x 50 μ m de D.I.	40 mmol L ⁻¹ de tampão fosfato (pH 9).	20	269,5	GRAEF, 2007
RIFA, ISO e PZA	ECZ	64,5 cm (56 cm efetivo) x 50 μ m de D.I.	40 mmol L ⁻¹ de tampão tetraborato de sódio (pH 9).	20	269,5	PONTAROLO <i>et al.</i> , 2010
RIFA, ISO, PZA e ETA	ECZ empregando complexação	48,5 cm (40 cm efetivo) x 75 μ m de D.I.	40 mmol L ⁻¹ de tampão tetraborato de sódio (pH 9).	22 e 25	262	FARIA <i>et al.</i> , 2010

Quadro 5: Condições de trabalho utilizadas para a determinação e quantificação simultânea de RIFA e ISO através da CE em apresentações farmacêuticas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver nanofibras e nanoesferas de PLGA contendo rifampicina e isoniazida; caracterizá-las físicoquimicamente e determinar a eficiência de encapsulação dos fármacos por eletroforese capilar como alternativa a cromatografia líquida de alta eficiência.

3.2. Objetivos específicos

1. Caracterização físico-química dos padrões de rifampicina e isoniazida.
2. Desenvolvimento das nanofibras pelo método de *electrospinning*.
3. Caracterização físico-química das nanofibras (SEM, TEM, DSC, TGA, FTIR).
4. Desenvolvimento das nanoesferas pelo método de emulsão/evaporação de solvente.
5. Caracterização físico-química das nanoesferas (potencial zeta, índice de polidispersão, pH, SEM, TEM, DSC, FTIR).
6. Desenvolvimento e validação dos métodos de eletroforese capilar e cromatografia líquida de alta eficiência segundo as diretrizes ICH e USP, para determinar a eficiência de encapsulação de rifampicina e isoniazida nas nanofibras e nas nanoesferas de PLGA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais.

4.1.1. Solventes, reagentes e soluções.

Além dos solventes reagentes comumente utilizados no laboratório foram utilizados os seguintes:

- 2-propanol grau HPLC (Merck);
- Acetato de etila grau HPLC (Merck);
- Acetona grau HPLC (J.T.Baker);
- Acetonitrila grau HPLC (Merck);
- Ácido acético glacial grau HPLC (Q.M. Reagentes);
- Água ultrapura (Milli-Q, Millipore);
- Alcohol polivinílico (PM 49000) Mowiol® (Aldrich);
- Butan-1-ol grau HPLC (Merck);
- Butilhidroxitolueno (SigmaAldrich);
- Colato de sódio (SigmaAldrich);
- Diclorometano grau HPLC (Merck);
- Dodecilsulfato sódico (Sigma-Aldrich);
- Hidróxido de sódio (Synth);
- Membrana filtrante com poros de 0,45 µm (Millipore);
- Metanol grau HPLC (Merck);
- N,N- dimetilformamida grau HPLC (Merck);
- O agente de contraste para a microscopia de ácido fosfotúngstico hidratado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);
- Poli-(D,L-láctico-co-glicólico) PLGA 50:50 Resomer® RG 504 (PM: 30-38kDa) (Boehringer Ingelheim);

- Solução tampão (buffer) pH: $4,0 \pm 0,05/25^{\circ}\text{C}$ (Synth);
- Solução tampão (buffer) pH: $7,0 \pm 0,05/25^{\circ}\text{C}$ (Synth);
- Surfactante Pluronic® F68 (PM: 8350 Da) (SigmaAldrich);
- Tetraborato de sódio decahidratado (Sigma-Aldrich);

4.1.2 Substâncias ativas.

- Padrão analítico de isoniazida fornecido por Sigma-Aldrich, lote 037K0776, teor $\geq 99,0\%$.
- Padrão analítico de rifampicina fornecido por Sigma-Aldrich, lote 011M1159V, teor $\geq 97,0\%$.
- Padrão secundário de cloridrato de etambutol fornecido por FURP (Fundação para o Remédio Popular “Chopin Tavares de Lima”), lote 2357511, teor $99,8\%$ declarado pelo fabricante.
- Padrão secundário de diazepam fornecido por FURP (Fundação para o Remédio Popular “Chopin Tavares de Lima”), lote 2143278, teor $100,1\%$, utilizado como padrão interno.
- Padrão secundário de pirazinamida fornecido por FURP (Fundação para o Remédio Popular “Chopin Tavares de Lima”), lote 2219661, teor $100,4\%$.

4.1.3 Equipamentos.

- Analisador de tamanho de partícula (Brookhaven, modelo 90Plus);
- Aparelho de ponto de fusão (Marconi, modelo MA-381);
- Balanças analíticas (Mettler Toledo, modelo AL204 e AB204);
- Banho de ultrassom (Quimis®, modelo 03350);
- Colunas capilares de sílica fundida (Polymicro Technologies, USA) com diâmetro interno de 50 ou 75 μm e comprimento efetivo de 20 à 60 cm;
- Cromatógrafo líquido (Waters Instrument, modelo 2690 Alliance);
- Electrospinner (Yflow S.D., modelo 2.2.D-500);

- Equipamento de Calorimetria Exploratória Diferencial (Shimadzu, modelo DSC-60);
- Equipamento de Eletroforese Capilar Beckman and Coulter P/ACE MDQ equipado com detector UV-VIS com arranjo de diodos, que permite a obtenção de espectros UV-VIS em tempo real de cada pico, controlador de temperatura e *Software* 32 Karat® V.8. para aquisição e tratamento dos dados;
- Espectrofotômetro de infravermelho (Series FT-IR Spectrometers, modelo VERTEX 70);
- Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (Shimadzu, modelo IRPrestige-21);
- Espectrofotômetro UV (Shimadzu Corporation, modelo UV-1203);
- Espectrofotômetro UV-Visível (Agilent Technologies, modelo Hewlett Packard 8453 spectrophotometer) munido de cubas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e acoplado ao computador e impressora;
- Liofilizador (LyoQuest-55, Telstar Life Science Solutions);
- Microcentrífuga digital (Labnet, modelo Spectrafuge™ 24D);
- Microscópio eletrônico de varredura (FEI, modelo Inspect™ F50);
- pHmetros digital (Mettler Toledo, modelo LE409 e Gehaka, modelo PG1800);
- Sistema de calorimetria exploratória diferencial (Mettler Toledo, modelo DSC 822 E);
- Sonicador (Branson, modelo S-150D);
- Termobalança (Mettler Toledo, modelo TGA/SDTA 851);
- Termobalança (Shimadzu, modelo DTG-60).

4.2. Métodos.

4.2.1. Caracterização dos padrões.

Os padrões de RIFA e ISO foram submetidos a testes preliminares de identificação através de testes físico-químicos, com a finalidade de avaliar as condições de trabalho para uso com segurança nos procedimentos experimentais.

4.2.1.1. Ponto de fusão dos padrões.

Foi utilizado o método do bloco metálico aquecido. As amostras foram colocadas em um tubo capilar de vidro com uma das extremidades seladas até cerca de 3,0 mm de altura no aparelho. Começou-se a aquecer a uma razão de 5°C/min; quando a temperatura chegou a 10°C abaixo do início de fusão teórico da amostra, reduziu-se a velocidade de aquecimento a cerca de 1°C/min. A temperatura na qual a amostra funde sobre a parede do tubo é definida como o início da fusão e a temperatura na qual amostra torna-se completamente líquida e definida como o final de fusão ou o ponto de fusão (USP40-NF35, 2017).

4.2.1.2. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho dos padrões.

Os padrões (RIFA e ISO) foram dispersos em pastilhas de brometo de potássio individualmente (USP40-NF35, 2017). Misturaram-se aproximadamente 1 % de amostra para 99 % de brometo de potássio e as pastilhas formadas foram confeccionadas submetendo-se à pressão hidráulica de 150 kg/cm². O espectro foi traçado em resolução de 4 cm⁻¹, na faixa de 2000-400 cm⁻¹ e no modo transmitância.

4.2.1.3. Análise térmica dos padrões.

A. Calorimetria exploratória diferencial dos padrões.

Empregou-se uma célula calorimétrica, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min, no intervalo de temperatura entre 25 e 400°C, em cadinhos de alumínio parcialmente fechados e massas de amostra em torno de 2 mg. Previa à realização dos ensaios foram obtidas curvas em branco para avaliar a linha base do sistema.

B. Termogravimetria/termogravimetria derivada dos padrões.

Foi empregada uma termobalança na faixa de temperatura entre 25 e 900°C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min), numa razão de aquecimento de 10°C min⁻¹, utilizando cadinho de platino e massas de amostra em torno de 2 e 5 mg. Previa à realização dos ensaios foram obtidas curvas em branco para avaliar a linha base do sistema.

4.2.1.4. Determinação do espectro de absorção por espectrofotometria UV-Vis dos padrões.

Preparou-se uma solução dos padrões (RIFA e ISO) na concentração de 50,0 µg mL⁻¹ em etanol empregando-se uma cubeta de quartzo de 1 cm para a leitura. O espectro foi traçado na faixa de 200 a 500 nm (USP40-NF35, 2017).

4.2.2. Desenvolvimento das nanofibras pelo método de *electrospinning*.

As nanofibras electrofiadas foram sintetizadas utilizando o equipamento Electrospinner 2.2.D-500 (Yflow S.D.). A solução de PLGA 50:50 (MW: 30-38kDa) em diclorometano/N,N-dimetilformamida, foi preparada com uma concentração de 10,215 % w/w em relação à mistura de solventes. A quantidade de diclorometano e N,N-dimetilformamida foi 50 % diclorometano e 50 % N,N-dimetilformamida. A essa solução polimérica se adicionaram ambos fármacos, RIFA e ISO, com uma concentração de 10,0 % w/w de cada fármaco em relação ao polímero. A solução resultante foi colocada na agulha interna de 0,9 mm de diâmetro a uma velocidade de 1,0 mL/h, logo depois, uma solução de PLGA 50:50 com uma concentração de 10 % w/w em relação ao solvente foi

colocada na agulha externa de 0,9 mm de diâmetro a uma velocidade de 0,2 mL/h. Tensão de +10,41 kV foi aplicada sobre a agulha através de uma fonte de alta tensão, e um jato da solução foi projetado e depositado sobre uma folha de alumínio em um coletor com tensão de -2,86 kV. A distância da agulha para o coletor foi de 15 cm. A temperatura e a umidade foram de 22-24°C e 37-41 %, respectivamente. Depois de três horas de *electrospinning* foram recolhidas as nanofibras. A massa do polímero (PLGA) que tinha que ser adicionado para obter a concentração desejada em relação a mistura dos dissolventes (10,215 % w/w); a massa de cada fármaco para obter a concentração desejada de cada um em relação a mistura de dissolventes (10,0 % w/w) foram calculadas empregando as Equações 1 e 2, respectivamente. Para o cálculo da concentração teórica de cada fármaco considerando o tempo do processo de *electrospinning* (8,6 % w/w) (Equação 5), foi preciso, calcular previamente a massa total na agulha interna e externa (Equações 3 e 4, respectivamente).

$$C_{PLGA} = \frac{m_{PLGA}}{m_{PLGA} + m_{mistura\ de\ dissolventes}}$$

$$m_{PLGA} = C_{PLGA} \times m_{PLGA} + m_{mistura\ de\ dissolventes}$$

$$m_{mistura\ de\ dissolventes} = m_{PLGA} (1 - C_{PLGA})$$

$$m_{PLGA} = \frac{C_{PLGA} \times m_{mistura\ de\ dissolventes}}{(1 - C_{PLGA})}$$

$$m_{PLGA} = \frac{C_{PLGA} \times m_{mistura\ de\ dissolventes}}{(1 - C_{PLGA})}$$

$$m_{PLGA} = \frac{C_{PLGA} \times V_{mistura\ de\ dissolventes} (\rho_{DCM} \times \%DCM + \rho_{DMF} \times \%DMF)}{(1 - C_{PLGA})}$$

Equação 1: Cálculo da massa para o polímero (PLGA) para obter a concentração desejada para o polímero (PLGA) em relação a mistura de dissolventes.

Onde: C_{PLGA} : concentração desejada para o PLGA em relação a mistura de dissolventes; m_{PLGA} : gramas de PLGA; $m_{mistura de dissolventes}$: gramas de mistura de dissolventes; $V_{mistura de dissolventes}$: mililitros de mistura de dissolventes; ρ_{DCM} : densidade de diclorometano; $\%_{DCM}$: proporção de diclorometano; ρ_{DMF} : densidade de dimetilformamida; $\%_{DMF}$: proporção de dimetilformamida.

$$C_{IFA\ 1\ ou\ 2} = \frac{m_{IFA\ 1\ ou\ 2}}{m_{IFA\ 1\ ou\ 2} + m_{mistura\ de\ dissolventes}}$$

$$m_{IFA\ 1\ ou\ 2} = \frac{C_{IFA\ 1\ ou\ 2} \times V_{mistura\ de\ dissolventes} \times (\rho_{DCM} \times \%_{DCM} + \rho_{DMF} \times \%_{DMF})}{(1 - C_{IFA\ 1} - C_{IFA\ 2})}$$

Equação 2: Cálculo da massa de cada IFA para obter a concentração desejada para cada IFA em relação a mistura de dissolventes.

Onde: $C_{IFA\ 1\ ou\ 2}$: concentração desejada para o IFA 1 ou 2 em relação a mistura de dissolventes; $m_{IFA\ 1\ ou\ 2}$: gramas de IFA 1 ou 2; $m_{mistura de dissolventes}$: gramas de mistura de dissolventes; $V_{mistura de dissolventes}$: mililitros de mistura de dissolventes; ρ_{DCM} : densidade de diclorometano; $\%_{DCM}$: proporção de diclorometano; ρ_{DMF} : densidade de dimetilformamida; $\%_{DMF}$: proporção de dimetilformamida.

$$\begin{aligned} m_{na\ agulha\ interna} &= \frac{V \times (m_{PLGA} + m_{IFA1} + m_{IFA2})}{V_{mistura\ de\ dissolventes} + V_{PLGA} + V_{IFA1} + V_{IFA2}} \\ &= \frac{V \times (m_{PLGA} + m_{IFA1} + m_{IFA2})}{V_{mistura\ de\ dissolventes} + m_{PLGA}/\rho_{PLGA} + m_{IFA1}/\rho_{IFA1} + m_{IFA2}/\rho_{IFA2}} \end{aligned}$$

Equação 3: Cálculo da massa total na agulha interna considerando o tempo do processo de *electrospinning*.

Onde: $m_{na\ agulha\ interna}$: gramas totais na agulha interna considerando o tempo do processo de *electrospinning*; V : mililitros de solução eletrofiável

considerando o tempo de processo de *electrospinning* e a velocidade de ejeção da agulha interna; m_{PLGA} : gramas de PLGA; $m_{IFA\ 1\ ou\ 2}$: gramas de IFA 1 ou 2; $V_{mistura\ de\ solventes}$: mililitros de mistura de dissolventes; ρ_{PLGA} : densidade de PLGA; $\rho_{IFA\ 1\ ou\ 2}$: densidade de IFA 1 ou 2.

$$m_{na\ agulha\ externa} = \frac{V \times (m_{PLGA})}{V_{mistura\ de\ dissolventes} + V_{PLGA}}$$

$$m_{na\ agulha\ externa} = \frac{V \times (m_{PLGA})}{V_{mistura\ de\ dissolventes} + m_{PLGA} / \rho_{PLGA}}$$

Equação 4: Cálculo da massa total na agulha externa considerando o tempo do processo de *electrospinning*.

Onde: $m_{na\ agulha\ externa}$: gramas totais na agulha externa considerando o tempo do processo de *electrospinning*; V : mililitros de solução eletrofiável considerando o tempo de processo de *electrospinning* e a velocidade de ejeção da agulha interna; $V_{mistura\ de\ dissolventes}$: mililitros de mistura de dissolventes; m_{PLGA} : gramas de PLGA; ρ_{PLGA} : densidade de PLGA.

$$C_{Teórica\ do\ IFA\ 1\ ou\ 2\ (\%)} = \frac{m_{IFA\ 1\ ou\ 2} \times 100}{(m_{na\ agulha\ interna} + m_{na\ agulha\ externa})}$$

Equação 5: Cálculo da concentração teórica de cada IFA considerando o tempo do processo de *electrospinning*.

Onde: $C_{Teórica\ do\ IFA\ 1\ ou\ 2}$: concentração teórica de cada IFA considerando o tempo do processo de *electrospinning*; $m_{IFA\ 1\ ou\ 2}$: gramas de IFA 1 ou 2; $m_{na\ agulha\ interna}$: gramas totais na agulha interna considerando o tempo do processo de *electrospinning*; $m_{na\ agulha\ externa}$: gramas totais na agulha externa considerando o tempo do processo de *electrospinning*.

4.2.3. Caracterização físico-química das nanofibras.

A. Microscopia eletrônica de varredura.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas num equipamento InspectTM F50 Scanning Electron Microscope (FEI, USA) operando numa voltagem de aceleração de 200V-30kV equipado com uma fonte Schottky Field Emission. A fixação da amostra foi realizada diretamente sobre a mesa dentro da câmara do SEM, utilizando-se fita de carbono.

B. Microscopia eletrônica de transmissão.

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas num TENAI FEI T20 (FEI, Hillsboro, OR, USA) operado em modo de campo luminoso com uma voltagem de aceleração de 200 V. As amostras foram usadas diretamente sem prévia preparação, e colocadas numa grade de apoio para análise no microscópio.

C. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho.

Os espectros de absorção foram obtidos utilizando-se o equipamento VERTEX 70 Series FT-IR Spectrometers. Foram avaliados os fármacos RIFA e ISO, o polímero (PLGA), a nanofibra vazia e as nanofibras carregadas com os fármacos. O espectro foi traçado em resolução de 4 cm^{-1} , na faixa de $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ e no modo transmitância.

D. Análise termoanalítico.

D.1. Calorimetria exploratória diferencial.

Os espectros de calorimetria exploratória diferencial foram obtidos utilizando-se o sistema de calorimetria exploratória diferencial Mettler Toledo, modelo 822 E. Empregou-se uma célula calorimétrica, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min^{-1}) e razão de aquecimento de 10°C/min , no intervalo de temperatura entre 35 e 550°C , em cadinhos de alumínio parcialmente fechados e massas de amostra em torno de 2 mg . Pevia à realização dos ensaios foram obtidas curvas em branco para avaliar a linha base do sistema. Foram avaliados os fármacos RIFA e ISO, o polímero (PLGA), a nanofibra vazia e as nanofibras carregadas com os fármacos.

D.2. Termogravimetria.

Os espectros de termogravimetria foram obtidos utilizando-se uma termobalança Mettler Toledo, modelo TGA/SDTA 851. Foi usada uma termobalança na faixa de temperatura entre 35 e 1000°C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min⁻¹), numa razão de aquecimento de 10°C min⁻¹, utilizando cadinho de platino e massas de amostra em torno de 1 e 2 mg. Previa à realização dos ensaios foram obtidas curvas em branco para avaliar a linha base do sistema. Foram avaliados os fármacos RIFA e ISO, o polímero (PLGA), a mistura física de PLGA, RIFA e ISO (1:1:1), a nanofibra vazia e as nanofibras carregadas com os fármacos.

4.2.4. Desenvolvimento das nanoesferas pelo método de emulsão simples (o/w).

O Quadro 6 resume a preparação de nanoesferas pelo método de emulsão simples (o/w). Devido a que RIFA é facilmente oxidada pelo ar, a fase orgânica foi realizada em um frasco âmbar, contendo polímero PLGA (100 mg) e o tensoativo (Pluronic® F68), os quais dissolveram-se em acetato de etila (2 mL e 4 mL) por agitação magnética durante 60 minutos. Nas formulações onde foi utilizada PVA como tensoativo, se adicionou 250 mg de PVA na fase aquosa com ISO, enquanto a RIFA foi adicionada na fase orgânica. Os fármacos se dissolveram em solventes adequados: acetato de etila: metanol (9:1, v/v); DMSO: acetato de etila (1:9, v/v); DMSO: acetato de etila (1:1, v/v); metanol:acetato de etila (2:3, v/v); DMSO:metanol (1:1, v/v). Para cada formulação, uma alíquota de 1 mL de cada solução dos fármacos foram misturadas e submetidas a agitação magnética em fase orgânica durante 60 minutos. Depois se adicionou água Milli-Q (10 mL e 6 mL para RIFA e ISO, respectivamente) no mesmo recipiente da fase orgânica e a mistura final foi sonicada em banho de gelo durante 25 segundos em amplitude de 40 % em todas as formulações apresentadas (Digital Sonifier 450, Branson, EUA.). Para a eliminação do solvente foi empregada agitação magnética a 600 rpm durante o período de uma noite (*overnight*); e rotavapor a 60 rpm durante 2 horas a temperatura ambiente (Figura 11). Foram feitas três replicatas para cada formulação.

Figura 11: Representação da elaboração das nanoesferas pelo método de emulsão simples (o/w).

Começo do Quadro 6: : Formulações desenvolvidas empregando a técnica de emulsão simples (o/w).

N°	IFA (mg)	Solvente de fármacos	Tensoativo (mg)	F.O:F.A (mL:mL)	Evaporação
F01	10	DMSO:acetato de etila (1:9)	250 mg de Pluronic F-68	5:10	<i>Overnight</i>
F02	10	DMSO:acetato de etila (1:9)	250 mg de Pluronic F-68	5:10	Rotavapor (60 rpm, a temperatura ambiente por 15 minutos)
F03	10	DMSO:acetato de etila (1:1)	250 mg de Pluronic F-68	5:10	<i>Overnight</i>
F04	10	DMSO: acetato de etila (1:1)	250 mg de Pluronic F-68	5:10	Rotavapor (60 rpm, a temperatura ambiente por 30 minutos)
F05	10	Metanol: acetato de etila (2:3)	250 mg de Pluronic F-68	5:10	<i>Overnight</i>
F06	10	Metanol:acetato de etila (2:3)	250 mg de Pluronic F-68	5:10	Rotavapor (60 rpm, a temperatura ambiente por 2 horas)
F07	10	-RIFA em DMSO. -ISO em metanol a 40°C em agitação por 2 h. -DMSO:metanol (1:1).	250 mg de Pluronic F-68	5:10	<i>Overnight</i>
F08	20	-RIFA em DMSO. -ISO em metanol a 40°C em agitação por 2 h. -DMSO:metanol (1:1).	250 mg de Pluronic F-68	5:10	<i>Overnight</i>
F09	10	-RIFA em DMSO. -ISO em metanol a 40°C em agitação por 2 h. -DMSO:metanol (1:1).	250 mg de Pluronic F-68	3:6	<i>Overnight</i>
F10	20	-RIFA em DMSO. -ISO em metanol a 40°C em agitación por 2 h. -DMSO:Metanol (1:1).	250 mg de Pluronic F-68	3:6	<i>Overnight</i>
F11	10	-RIFA em DMSO:acetato de etila (1:9) em fase orgânica. -ISO em fase aquosa.	250 mg de PVA (hidrolizado ao 86-89 %)	5:10	<i>Overnight</i>
F12	20	-RIFA em DMSO:acetato de etila (1:9) em fase orgânica. -ISO em fase aquosa.	250 mg de PVA (hidrolizado ao 86-89 %)	5:10	<i>Overnight</i>

Quadro 6: Denominação das amostras das nanoesferas elaboradas empregando a técnica de emulsão simples (o/w).

Onde:

F.O:F.A: Fase orgânica:Fase aquosa.

*Foram adicionados mesma quantidade para os IFAs, RIFA e ISO.

*Todas as formulações tiveram 100 mg de PLGA.

*Todas as formulações foram sonicados ao 40 % de amplitude por 25 segundos.

4.2.5. Desenvolvimento das nanoesferas pelo método de doble emulsão (w/o/w).

A preparação das nanopartículas poliméricas pelo método de doble emulsão (w/o/w) foram feitas conforme o Quadro 7 e Figura 12. Por a RIFA ser facilmente oxidada pelo ar, a fase orgânica foi realizada em um frasco âmbar, contendo 100 mg polímero PLGA (100 mg) e 20 mg de RIFA, os quais se dissolveram em 2 mL de acetato de etila por agitação magnética até completar dissolução. Em outro frasco âmbar, se colocou a solução do frasco anterior e foi adicionado 1 mL de solução aquosa de ISO correspondente a 20 mg desse fármaco. Depois, foi sonificado em banho de gelo durante 20 segundos em amplitude de 40 % (Digital Sonifier 450, Branson, EUA.), esta solução corresponde a primeira emulsão (o/w). Foram adicionados 8 mL de colato de sódio (1 %, w/v) para primeira emulsão e, em seguida em banho de gelo durante 40 segundos em amplitude de 40 % (Digital Sonifier 450, Branson, EUA.). Esta solução corresponde a segunda emulsão (w/o/w). A emulsão final foi agitada por 60 rpm durante 2 horas a temperatura ambiente. Foram feitas três replicatas para cada formulação.

Figura 12: Representação da elaboração das nanoesferas pelo método de emulsão doble (w/o/w).

Nº	IFA(mg)	PLGA (mg)	Evaporação
F13	20	100	<i>Overnight</i>
F14	20	100	Rotavapor (60 rpm, a temperatura ambiente durante 2 horas)

Quadro 7: Formulações desenvolvidas empregando a técnica de emulsão doble (w/o/w)

*Foram adicionadas a mesma quantidade de IFAs, RIFA e ISO.

4.2.6. Liofilização.

Depois da evaporação da fase orgânica, a suspensão final foi distribuída em eppendorfs de 2 mL e, em seguida, centrifugados a 7500 rpm por 12 minutos. Depois é eliminado o sobrenadante e uma quantidade de lioprotector (solução aquosa de manitol ao 5 %, w/v) foi adicionado homogeneamente em eppendorfs nas proporções de 1:1 para as formulações F03 e 1:3,75 para a formulação F12 (masa teórica de PLGA nas nanoesferas: lioprotector, w/v). Logo se deixou em banho ultrassom até a homogeneização completa das soluções, e se juntaram todas as soluções num frasco, previamente pesado. O frasco com a solução final, foi congelado a -18°C durante 1 hora, em seguida, congelado o frasco em nitrogênio líquido, para logo depois submeter o frasco a liofilização a 0,065 bares durante 24 horas (LyoQuest-55, Telstar Life Science Solutions).

4.2.7. Caracterização físico-química das nanoesferas.

A. Distribuição de tamanho de partícula.

A determinação do diâmetro das partículas e a sua distribuição (índice de Polidispersão, IP) foram realizadas pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons ou Dynamic Light scattering (DLS). A fim de se obter o perfil de distribuição de cada formulação produzida, uma alíquota da emulsão das nanoesferas foram diluídas em água purificada (1:13) e analisadas com ângulo de espalhamento de 90° e temperatura de 25 °C no equipamento 90 Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven, USA).

B. Potencial zeta.

O potencial zeta foi medido empregando equipamento 90 Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven, USA). Uma alíquota da emulsão das nanoesferas de 100 µL foi diluída em 1,3 mL da solução eletrólito de KCl 1 mmol L⁻¹ no pH 7,4. Foram efetuadas seis corridas e 30 ciclos.

C. Microscopia eletrônica de varredura.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas num equipamento InspectTM F50 Scanning Electron Microscope (FEI, USA) operando numa voltagem de aceleração de 200 V-30 kV equipado com uma fonte Schottky Field Emission.

Uma alíquota de 200 µL da emulsão das nanoesferas foram misturadas com 200 µL de agente de tingimento (ácido fosfotúngstico, 7 % w/v), e em seguida homogeneizado durante 60 minutos, depois foi lavado duas vezes, até completar com água destilada e centrifugando a 4500 rpm durante 8 minutos. Uma gota da alíquota das nanoesferas é depositada sobre placas de silício e posteriormente recoberta com uma camada de platina em um sistema de deposição de alto vácuo (LEICA EM SCD 500, USA), logo para depois sua morfologia ser examinada no microscópio eletrônico de varredura (InspectTM F50).

D. Microscopia eletrônica de transmissão

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas num TENAI FEI T20 (FEI, Hillsboro, OR, USA) operado em modo de campo luminoso com uma voltagem de aceleração de 200 kV. Uma alíquota da emulsão das nanoesferas foram misturadas com o agente de tingimento (ácido fosfotúngstico 7 % w/v), seguido de lavagem com água destilada para ser analisadas no microscópio.

E. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho.

A técnica de infravermelho foi utilizada para observar possível interação dos IFAs com o polímero. Os espectros de absorção foram obtidos utilizando-se o equipamento VERTEX 70 Series FT-IR Spectrometers. Foram avaliados os IFAs, RIFA e ISO, o polímero PLGA, as nanoesferas vazias e as nanoesferas carregadas com os fármacos. O espectro foi traçado em resolução de 4 cm^{-1} , na faixa de $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ e no modo transmitância.

F. Calorimetria exploratória diferencial.

Foi usada uma célula calorimétrica, sob uma corrente de ar e razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, no intervalo de temperatura entre 35 e 400°C , em cadinhos de alumínio parcialmente fechados e massas de amostra em torno de 1 mg . Previa à realização dos ensaios foram obtidas curvas em branco para avaliar a linha base do sistema. Foram avaliados os IFAs, RIFA e ISO, o polímero PLGA, a mistura física de RIFA, ISO e PLGA (1:1:1), as nanoesferas vazias e as nanoesferas carregadas com os fármacos.]

4.2.8. Método de determinação dos Insumos Farmacêuticos Ativos através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Para a determinação da eficiência de encapsulação dos fármacos nas nanoestruturas foi utilizado um cromatógrafo líquido (Waters Instrument 2690 Alliance, USA) com detetor PDA (Waters Instrument 2995 Alliance, USA).

Para o desenvolvimento do método através de HPLC foram realizadas pesquisas bibliográficas e testes de bancada para definir as condições mais adequadas para avaliação dos fármacos. As condições cromatográficas do método implementado para a quantificação dos fármacos nas nanoestruturas foram resumidas no Quadro 8.

Padrão interno	Dexametasona
Fase móvel	-Eluição em gradiente. -Acetonitrila:água Milli-Q com 0,1 % de ácido fórmico (pH 3). 0 a 4 min (20:80, v/v) 4,1 a 10 min (70:30, v/v) 10,1 a 20 min (20:80, v/v)
Coluna	Synergi™ Fusion-RP 80 Å (4,6 mm de D.I. x 25 cm, 4 µm).
Fluxo	0,8 mL/min
Temperatura	30°C
Volume de injeção	10 µL
Comprimento de onda	260 nm

Quadro 8: Condições cromatográficas para a avaliação da eficiência de encapsulação de RIFA e ISO em nanoestruturas através de HPLC.

4.2.9. Método de determinação dos Insumos Farmacêuticos Ativos através de eletroforese capilar

No caso do desenvolvimento do método por eletroforese capilar foram realizadas pesquisas bibliográficas e testes de bancada com o objetivo de definir quais as condições mais adequadas para avaliação dos fármacos através de CE.

4.2.10. Otimização do método eletroforético para determinação dos Insumos Farmacêuticos Ativos empregando um delineamento de misturas.

O desenho de experimentos (DoE), um método sistemático multivariado, pode ser usado para criar um espaço de desenho com o objetivo de alcançar um nível profundo de conhecimento e compreensão de uma formulação (PATIL e PETHE, 2013; REBELLO LOURENÇO *et al.*, 2015). O delineamento de misturas usando uma abordagem de vértices extremos foi utilizado para analisar o tempo de retenção e a resolução dos quatro IFAs com respeito as diferentes proporções empregadas das variáveis (acetona, 2-propanol e 10 mmol L⁻¹ de TBS a pH 9) assim como suas interações (sinergismo ou antagonismo). A ferramenta de otimização de resposta do *Software* estatística Minitab 17 foi usada para

identificar a combinação das variáveis que proporcionam um menor tempo de retenção com uma adequada resolução entre todos os picos dos IFAs.

4.2.11. Validação dos métodos analíticos para a determinação da eficiência de encapsulação dos Insumos Farmacêuticos Ativos dentro das nanoestruturas através de cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar.

Os parâmetros de validação do método analítico por HPLC e CE são apresentados a continuação:

A. Linearidade.

No cálculo de linearidade foram utilizadas soluções dos padrões na faixa de 50 % a 150 % da concentração nominal (para a RIFA e ISO) a partir das soluções estoque dos padrões. As curvas analíticas foram construídas a partir dos resultados das áreas dos picos obtidos dessas injeções vs concentrações para o método por HPLC e da relação das áreas dos picos (área do analito/área do padrão interno) vs concentrações para o método por CE. Foram realizadas 3 curvas analíticas.

B. Especificidade.

A especificidade para ambos métodos por HPLC e CE, foi avaliada injetando as soluções de amostra e placebo. Foram avaliadas as interferências das matérias-primas utilizadas na preparação das nanoestruturas de PLGA. A análise foi realizada por meio de observação visual dos cromatogramas e eletroferogramas obtidos.

C. Limite de detecção e limite de quantificação.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os métodos de quantificação foram determinados baseando-se nos parâmetros das curvas analíticas obtidas no parâmetro da linearidade, através das Equações 6 e 7, sendo que a razão sinal/ruído deve ser no mínimo de 10:1 e 3:1, para o LQ e LD,

respectivamente, conforme na ANVISA e na AOAC (ANVISA, 2017; ICH, 2005). Foram efetuadas três leituras para cada concentração.

$$LD = \frac{3 \times DPm}{S}$$

Equação 6: Cálculo de LD.

$$LQ = \frac{10 \times DPm}{S}$$

Equação 7: Cálculo de LQ.

D. Precisão do método.

A precisão por repetibilidade foi determinada para avaliar a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas. Foram utilizadas amostras em replicata de 9, e o desvio padrão relativo (DPR) foi calculado, conforme a Equação 8.

$$DPR (\%) = \frac{DP \times 100}{CMD}$$

Equação 8: Cálculo de desvio padrão relativo.

Onde: DPR = Desvio padrão relativo,

DP = Desvio padrão,

CMD = Concentração média determinada em porcentagem.

4.2.12. Determinação da eficiência de incorporação dos Insumos Farmacêuticos Ativos.

A eficiência de incorporação de RIFA e ISO, foi expressada pela eficiência de encapsulação e pela carga dos IFAs. A quantificação dos fármacos foi realizada utilizando as técnicas de HPLC e CE.

A. Eficiência de encapsulação dos Insumos Farmacêuticos Ativos.

A.1. Determinação da eficiência de encapsulação através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Conforme a representação do preparo da amostra na Figura 13, primeiramente foi tomada uma alíquota das nanoestruturas (0,5 mL para a

emulsão de nanoesferas e 0,5 mg para as nanofibras) em um eppendorf e centrifugado a 11000 rpm durante 12 minutos, em seguida, foi eliminado o sobrenadante e adicionado 1,15 mL de solução de acetonitrila com 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de butilhidroxitolueno. A continuação, se agitou a mistura durante 5 minutos em um banho de ultrassom, e se adicionou 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de padrão interno (dexametasona), a nova mistura foi agitada durante 5 minutos em banho ultrassom, e completada até 1,5 mL com metanol para novamente ser agitada durante 5 minutos em banho ultrassom. A mistura foi centrifugada a 12000 rpm durante 20 minutos, logo depois, a solução final foi filtrada em membrana de poro 0,22 μm transferida para um vial e finalmente analisada por HPLC segundo o método validado. As análises foram realizadas em triplicata. A eficiência de encapsulação (%EE) foi determinada a partir da Equação 9.

Figura 13: Representação do preparo da amostra para sua determinação da eficiência de encapsulação através de cromatografia líquida de alta eficiência.

$$\%EE = \frac{\text{massa do IFA nas nanoestruturas}}{\text{Total da massa do IFA}} \times 100$$

Equação 9: Cálculo da eficiência de encapsulação para as nanoestruturas.

A.2. Determinação da eficiência de encapsulação através de eletroforese capilar.

Conforme a representação do preparo da amostra na Figura 14, primeiramente foi transferida uma alíquota das nanoestruturas (2,5 mL para a emulsão de nanoesferas e 2,5 mg para as nanofibras) para um eppendorf e adicionou-se 0,5 mL da solução eletrólito (microemulsão), logo agitou-se durante 5 minutos num banho de ultrassom, e em seguida, se adicionou $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ de padrão interno (diazepam) e a mistura foi agitada durante 5 minutos em banho ultrassom. Depois, completou-se até 1,0 mL com a solução eletrólito e mantido sob agitação durante 10 minutos em banho ultrassom para assim ser centrifugado a 12000 rpm durante 5 minutos. A solução final foi filtrada em membrana de poro $0,22 \mu\text{m}$, transferida para um vial e finalmente analisada por CE segundo o método validado. As análises foram realizadas em triplicata. A eficiência de encapsulação (%EE) foi determinada a partir da Equação 9.

Figura 14: Representação do preparo da amostra para sua determinação da eficiência de encapsulação através de eletroforese capilar.

B. Determinação da carga dos Insumos Farmacêuticos Ativos através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Conforme a representação do preparo da amostra na Figura 15, primeramente foi transferida uma alíquota das nanoesferas liofilizadas (5,0 mg) para um eppendorf e adicionados 0,5 mL de água Milli-Q, logo, colocou-se a agitar a solução em banho de ultrassom até dissolução total, seguidamente, adicionou-se 0,6 mL de solução de acetonitrila com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de butilhidroxitolueno, e procedeu-se a agitar durante 5 minutos em banho de ultrassom. Depois, foi adicionado $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de padrão interno (dexametasona) e mantido sob agitação durante 5 minutos em banho de ultrassom, logo completou-se até 1,5 mL com metanol e agitado durante 5 minutos em banho de ultrassom e centrifugado novamente a 12000 rpm durante 20 minutos. A solução final foi filtrada em membrana de poro 0,22 μm , transferida para um vial e finalmente analisada através de HPLC segundo o método validado. As análises foram realizadas em triplicata. A carga do fármaco (%CF) foi determinada a partir da Equação 10.

Figura 15: Representação do preparo da amostra para sua determinação da carga dos Insumos Farmacêuticos Ativos através de cromatografia líquida de alta eficiência.

$$\%CF = \frac{\text{Massa do IFA nas nanoesferas} \times 100}{\text{Massa das nanoesferas}}$$

Equação 10: Cálculo da carga do IFA para as nanoesferas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterizações dos padrões.

5.1.1. Ponto de fusão dos padrões.

A literatura descreve que a faixa de fusão de RIFA e ISO é de 138,0-188,0°C e 171,4°C, respectivamente. Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que as faixas de temperatura se encontram dentro dos limites estipulados pela literatura (IPCS INCHEM, 2017; DRUGBANK, 2017).

Tabela 1: Resultados obtidos para determinação do ponto fusão dos padrões de RIFA e ISO.

IFA	Faixa de fusão (°C)	Ponto de fusão (°C)
RIFA	180,0-185,0	186,0
ISO	170,0-175,0	172,0

5.1.2. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho dos padrões.

As Figuras 16 e 17 apresentam os espectros obtidos para RIFA e ISO, respectivamente. As bandas obtidas para RIFA na Figura 16, se encontram conforme aos valores referenciais das atribuições das bandas do espectro de absorção na região do infravermelho para a forma polimórfica I da RIFA, apresentadas na Tabela 2 (ALVES, 2007; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009; NERDY, DE LUX PUTRA, HADI TJAHONO, 2014)

Figura 16: Espectro de absorção do padrão de RIFA na região do infravermelho.

Tabela 2: Bandas do espectro de absorção na região infravermelho de RIFA encontradas na literatura (ALVES, 2007; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009; NERDY, DE LUX PUTRA, HADI TIAHONO, 2014).

ν (cm ⁻¹)	Atribuição
974,05; 1062,78 e 1566,20	<i>Fingerprint</i>
1020,34 e 1251,8	C-N
1097,50	C-O
1502,55 e 1649,11	Benzeno
1571,99	C=C
1654,92	C=N
1710,86	C=O
2881,65; 2937,59 e 2970,38	C-H Alifático
3037,89	C-H aromático
3456,44	O-H
3475,73	N-H

As bandas obtidas para ISO na Figura 17, se encontram conforme aos valores referenciais das atribuições das bandas do espectro de absorção na região do infravermelho para a ISO, apresentadas na Tabela 3 (BORBA, GÓMEZ- ZAVAGLIA, FAUSTO, 2009; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009; NERDY, DE LUX PUTRA, HADI TIAHONO, 2014).

Figura 17: Espectro de absorção do padrão de ISO na região do infravermelho.

Tabela 3: Bandas do espectro de absorção na região do infravermelho de ISO encontradas na literatura (BORBA, GÓMEZ- ZAVAGLIA, FAUSTO,2009; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009; NERDY, DE LUX PUTRA, HADI TJAHONO, 2014).

ν (cm ⁻¹)	Atribuição
677,01; 844,82 e 1543,05	<i>Fingerprint</i>
995,27 e 1220,94	C-N
1600,92	C=C
1633,71	C=N
1666,50	C-H aromático
3111,18	N-H

5.1.3. Análise térmica dos padrões.

5.1.3.1. Calorimetria exploratória diferencial dos padrões.

As Figuras 18 e 19 apresentam os espectros de calorimetria exploratória diferenciais (DSC) obtidos para RIFA e ISO, respectivamente.

A Tabela 4 mostra os eventos térmicos para a RIFA os quais concordam com a literatura (LAVOR *et al.*, 2012).

Figura 18: Curva de DSC do padrão de RIFA obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio a 50 mL min⁻¹ com uma razão de aquecimento de 10°C min⁻¹ no intervalo de temperatura entre 25 e 400°C.

Tabela 4: Eventos térmicos na curva DSC do padrão de RIFA.

Evento térmico	T° de transição na literatura (onset–endset, °C) (entalpia, ΔH = J/g)	T° de transição experimental (onset–endset, °C) (entalpia, ΔH = J/g)
Exoterma 1 (decomposição).	242,0–269,0 (ΔH = -11)	252,10-269,63 (ΔH = -165,76)

A Tabela 5 mostra os eventos térmicos para a ISO, conforme na literatura (ALVES, 2007; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009; NERDY, DE LUX PUTRA, HADI TIAHONO, 2014).

Figura 19: Curva de DSC do padrão de ISO obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio a 50 mL min⁻¹ com uma razão de aquecimento de 10°C min⁻¹ no intervalo de temperatura entre 25 e 400°C.

Tabela 5: Eventos térmicos na curva DSC do padrão de ISO.

Evento térmico	T° de transição na literatura (onset–endset, °C) (entalpia, ΔH = J/g)	T° de transição experimental (onset–endset, °C) (entalpia, ΔH = J/g)
Endoterma 1 (fusão).	170,0–176,0 (ΔH = -256,0)	170,7-176,9 (ΔH = -294,7)
Endoterma 2 (decomposição)	227,0-236,0 (ΔH = -31,0)	244,2-257,9 (ΔH = -216,4)
Endoterma 3 (decomposição).	244,0-251,0 (ΔH = -26,0)	

5.1.3.2. Termogravimetria/termogravimetria derivada dos padrões.

As Figuras 20 e 21 apresentam os espectros de termogravimetria/termogravimetria derivada (TGA/DTA) obtidos para RIFA e ISO, respectivamente. A Tabela 6 mostra os eventos térmicos para a RIFA e os resultados obtidos são coerentes com os valores encontrados na literatura (LAVOR *et al.*, 2012).

Figura 20: Curva de TGA/DTA do padrão de RIFA obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio a 50 mL min^{-1} com uma razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ no intervalo de temperatura entre 25 e 900°C .

Tabela 6: Eventos térmicos na curva TGA/DTA do padrão de RIFA.

T° de transição experimental (onset–endset, °C)	Perda da massa (%)	Produto final (%)
252,9-263,2	20,4	3,0
263,2-750,3	76,6	

A Tabela 7 mostra os eventos térmicos para a ISO conforme na literatura e os resultados obtidos se mostram coerentes respeito aos valores encontrados na literatura (LAVOR *et al.*, 2012).

Figura 21: Curva de TGA/DTA do padrão de ISO obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio a 50 mL min^{-1} com uma razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ no intervalo de temperatura entre 25 e 900°C .

Tabela 7: Eventos térmicos na curva TGA/DTA do padrão de ISO.

T° de transição experimental (onset–endset, °C)	Perda da massa (%)	Produto final (%)
169,9-239,7	89,6	5,4
239,7-300,0	5,0	

5.1.4. Determinação do espectro de absorção por espectrofotometria ultravioleta-visível dos padrões.

As Figuras 22 e 23 apresentam os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível para a os padrões (RIFA e ISO), respectivamente.

A Tabela 8 mostra os comprimentos de absorção máxima na região do ultravioleta-visível para a os padrões (RIFA e ISO) obtidos na varredura de 200 a 500 nm os quais concordam com a literatura (ARIFA BEGUN, BASAVA RAJU e RAMA RAO, 2013).

Tabela 8: Comprimento de absorção máxima na região do UV-Vis para a os padrões de RIFA e ISO.

IFAs	$\lambda_{\text{máx}}$ literatura	$\lambda_{\text{máx}}$ experimental
Rifampicina	337nm (em etanol)	338,6 nm
Isoniazida	263 nm (em etanol)	265,0 nm

Figura 22: Espectros de absorção obtidos na região do UV-Vis do padrão de RIFA, na concentração de $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em etanol.

Figura 23: Espectros de absorção obtidos na região do UV-Vis do padrão de ISO, na concentração de $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em etanol.

5.2. Desenvolvimento das nanofibras pelo método de *electrospinning*.

Para a obtenção das nanofibras, foram testadas três variantes previamente, segundo descrito no Quadro 9.

Variantes	Agulha interna	Agulha externa	Voltagem	Observação
1	10 % w/w dos fármacos numa solução de diclorometano: N,N-dimetilformamida (1:1).	10 % w/w de solução de PLGA em diclorometano: N,N-dimetilformamida (1:1).	Tensão sobre a agulha foi de +8,20 kV e tensão de coletor de - 2,80 kV.	Não se formou o cone de Taylor.
2	10 % w/w de solução de PLGA em diclorometano: N,N-dimetilformamida (1:1) numa agulha de 0,9 mm de diâmetro e uma velocidade de 0,5 mL/h.	Não se empregou.	Tensão sobre a agulha foi de +8,20 kV e tensão de coletor de - 2,80 kV.	Se formou cone de Taylor.
3	10 % w/w de solução de PLGA em diclorometano: N,N-dimetilformamida (1:1) + 10 % w/w dos fármacos numa agulha de 0,9 mm de diâmetro e uma velocidade de 1,0 mL/h.	10 % w/w de solução de PLGA em diclorometano: N,N-dimetilformamida (1:1) numa agulha de 0,9 mm de diâmetro e uma velocidade de 0,2 mL/h.	Tensão sobre a agulha foi de +10,41 kV e tensão de coletor de - 2,86 kV.	Melhorou-se a o cone de Taylor. Caracterizaram-se as nanofibras obtidas por este método.

Quadro 9: Variantes no método de *electrospinning* para a elaboração das nanofibras contendo a RIFA e ISO.

5.3. Caracterização físico-química das nanofibras.

A. Microscopia eletrônica de varredura.

As micrografias (Figuras 24, 25, 28 e 29), apresentam a avaliação por SEM e revelam a formação de fibras sólidas, cilíndricas, com orientação randomizada, finas e da ordem de nanômetros e apresenta partículas da ordem de nanômetros até micrômetros com ampla distribuição de tamanho. As medições foram efetuadas através do *Software* ImageJ para cada micrografia. Foram efetuadas as medições dos diâmetros das partículas, posteriormente, na avaliação por TEM, foram medidos os diâmetros das fibras. Nas micrografias das nanofibras vazias, A (Figura 24) e C (Figura 28) o diâmetro das partículas foram da ordem de 205,2 a 2047,5 nm (Figuras 26 e 30). Nas micrografias das nanofibras

contendo RIFA e ISO, B (Figura 25) e D (Figura 29), o diâmetro das partículas foram da ordem de 277,0 a 3114,0 nm (Figuras 27 e 31). Os valores baixos da massa molecular e da concentração do polímero empregado (PLGA 50:50, PM: 30-38kDa), favoreceria a tensão superficial no processo, promovendo a conversão do jato em gotas esféricas, dessa forma, provocando a aparição das partículas nas fibras elaboradas (DA SILVA, 2013).

Figura 24: Micrografia SEM A da nanofibra vazia.

Figura 25: Micrografia SEM B da nanofibra contendo RIFA e ISO (8,6 % de cada IFA).

Figura 26: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das partículas na micrografia SEM A.

Figura 27: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das partículas na micrografia SEM B.

Figura 28: Micrografia SEM C da nanofibra vazia.

Figura 29: Micrografia SEM D da nanofibra contendo RIFA e ISO (8,6% de cada IFA).

Figura 30: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das partículas na micrografia SEM C.

Figura 31: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das partículas na micrografia SEM D.

B. Microscopia eletrônica de transmissão.

As micrografias, nas Figuras 32 ao 45, apresentaram a avaliação por TEM confirmando a formação de fibras sólidas, cilíndricas, lisas e finas da ordem de nanômetros com estreita distribuição de tamanho e presença de partícula da ordem de nanômetros até micrômetros.

As medições, foram efetuadas através do *Software* ImageJ para cada micrografia. Nas micrografias das nanofibras vazias, A (Figura 32), C (Figura 34), E (Figura 36), G (Figura 38), I (Figura 40), K (Figura 42), M (Figura 44) e N (Figura 45), o diâmetro das fibras foram na ordem de 22,9 a 90,2 nm (Figura 46) e das partículas foram na ordem de 804,1 nm a 3,2 μ m (Figura 48). Nas micrografias das nanofibras contendo RIFA e ISO, B (Figura 33), D (Figura 35), F (Figura 37), H (Figura 39), J (Figura 41) e L (Figura 43) o diâmetro das fibras foram na ordem de 6,0 a 78,1 nm (Figura 47) e das partículas foram na ordem de 116,9 a 811,3 nm (Figura 49).

A adição dos IFAs nas fibras, ocasiona uma leve diferença na morfologia da fibra e no diâmetro da fibra. Uma diminuição no diâmetro de 22,9 a 90,2 nm a 6,0 a 78,1 nm foi observado, provavelmente por uma diminuição na viscosidade na solução de PLGA carregado com os IFAs. A literatura indica tamanhos de nanofibras de PVA: vazias de $297,5 \pm 29,47$ nm (8 % w/v de PVA) a $345,00 \pm 30,41$ nm (10 % w/v de PVA); carregada com 10 % ISO de $372,5 \pm 28,61$ nm e

carregada com 8 % de RIFA de $631,0 \pm 57,78$ nm (SHAIKH *et al.*, 2012); nanofibras de PLGA 50:50: vazias de $993,9 \pm 178,7$ nm (25 % w/v de PLGA 50:50); carregadas com 5 % de RIFA de $618,7 \pm 28,8$ nm (GILCHRIST *et al.*, 2013); nanofibras de PCL: vazias de 557 ± 399 nm (12 % w/v de PCL); e carregada com 20 % de RIFA de 665 ± 407 nm (RUCKH *et al.*, 2012). As fibras obtidas apresentam diâmetros substancialmente menores que o reportado na literatura, porém, houve presença de partículas esféricas na ordem de nanômetros até micrômetros como é observado nas Figuras 39, 40, 41, 42, 43 e 45.

A literatura reporta a RIFA como a responsável do aumento da viscosidade numa solução próxima a ser eletrofiada devido a seu grande tamanho molecular e sua baixa solubilidade em água, solvente empregado nesse estudo no processo de *electrospinning* da RIFA e da ISO. Nesse estudo a ISO seria altamente penetrável nas fibras, devido a seu tamanho molecular menor e a sua boa solubilidade em água, incluso se deduz que as partículas de RIFA, fracamente solúveis, poderiam atuar como partículas parcialmente penetráveis resultando numa concentração elevada localizada na zona compartilhada inter-partícula, fazendo a dissipação da viscosidade menos predominante nessa área e isso aumentaria o diâmetro das fibras. Neste caso, a RIFA por encontrar-se dissolvida num solvente orgânico, pode-se deduzir que se encontra altamente permeável na fibra, ocasionando que o diâmetro entre as nanofibras vazias não mude muito e incluso diminua (SHAIKH *et al.*, 2012).

Figura 32: Micrografia TEM A da nanofibra vazia.

Figura 33: Micrografia TEM B da nanofibra contendo RIFA e ISO (8,6 % de cada IFA).

Figura 34: Micrografia TEM C da nanofibra vazia.

Figura 35: Micrografia TEM D da nanofibra contendo RIFA e ISO (8,6 % de cada IFA).

Figura 36: Micrografia TEM E da nanofibra vazia.

Figura 37: Micrografia TEM F da nanofibra contendo RIFA e ISO (8,6 % de cada IFA).

Figura 38: Micrografia TEM G da nanofibra vazia.

Figura 39: Micrografia TEM H da nanofibra contendo RIFA e ISO (8,6 % de cada IFA).

Figura 40: Micrografia TEM I da nanofibra vazia.

Figura 41: Micrografia TEM J da nanofibra contendo RIFA e ISO (8,6 % de cada IFA).

Figura 42: Micrografia TEM K da nanofibra vazia.

Figura 43: Micrografia TEM L da nanofibra contendo RIFA e ISO (8,6 % de cada IFA).

Figura 44: Micrografia TEM M da nanofibra vazia.

Figura 45: Micrografia TEM N da nanofibra vazia.

Figura 46: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanofibras vazias.

Figura 47: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanofibras contendo RIFA e ISO (8,6 % de cada IFA)

Figura 48: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das partículas na formulação de nanofibras vazias.

Figura 49: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das partículas na formulação de nanofibras contendo RIFA e ISO (8,6 % de cada IFA).

C. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho.

Na Figura 50, os espectros de absorção na região do infravermelho dos IFAs puros (espectros a e b) e do PLGA (espectro c) mostram os picos principais atribuídos aos grupos funcionais de sua molécula tais como para a RIFA, observados a 1731 cm^{-1} (C=O de acetil), 1649 cm^{-1} (C=O da furanona) e 1561 cm^{-1} (C=O da amida); para a ISO observados a 1665 , 1633 e 1601 cm^{-1} (banda de transmitância do grupo amina) e para o PLGA observados a 1747 cm^{-1} (C=O de carbonila, vibração de alongamento) e 1084 cm^{-1} (C-O vibração de alongamento).

Figura 50: Espectros de absorção da RIFA, ISO, PLGA, nanofibras de PLGA vazia e nanofibra de PLGA com RIFA e ISO na região do infravermelho.

A avaliação dos espectros de absorção na região do infravermelho gerada para a nanofibras de PLGA não carregadas com os IFAs (espectro d) demonstraram que o procedimento de *electrospinning* teve um impacto mínimo sobre a atribuição de arranjos inter ou intramoleculares, sem mudanças de banda observadas quando comparado com PLGA puro (espectro c), portanto os grupos funcionais específicos do material polimérico na superfície das nanofibras têm quase as mesmas características do polímero puro. Os picos dos fármacos nas nanofibras carregadas com RIFA e ISO (espectro e) praticamente não foram observados devido à baixa concentração dos IFAs nas nanofibras. A avaliação dos espectros de absorção na região do infravermelho sugere que não ocorrem interações moleculares que possa alterar a estrutura química dos IFAs no tempo de estudo (TERRY *et al.*, 2014).

D. Análise térmica

D.1. Calorimetria exploratória diferencial.

As curvas de DSC forneceram informações sobre as transformações térmicas nas nanofibras e o estado do IFA após o processo de encapsulação (TERRY *et al.*, 2014). A temperatura de transição vítrea do PLGA é acima da temperatura fisiológica (37°C) e, portanto, é de natureza vítrea; assim, o PLGA tem uma estrutura de cadeia bastante rígida, que confere resistência mecânica significativa, sendo útil como veículo de IFAs (MAINARDES, GREMIÃO e EVANGELISTA, 2006).

Conforme a Figura 51, as curvas de DSC do PLGA puro (espectro c), das nanofibras de PLGA vazia (espectro e) e das nanofibras carregadas com a RIFA e ISO (espectro f) mostram picos a cerca de 45°C e de 50°C, correspondente ao ciclo de aquecimento do PLGA depois de um esfriamento súbito e a sua transição vítrea, respectivamente, conforme relatado na literatura (TERRY *et al.*, 2014; ISSA, MOHAMMAD e MOTAHARE-SADAT, 2013; MAINARDES, GREMIÃO e EVANGELISTA, 2006; GILCHRIST *et al.*, 2013). A curva de DSC de PLGA puro, não apresenta nenhum ponto de fusão, pois PLGA aparece em estado amorfo na natureza (MAINARDES, GREMIÃO e EVANGELISTA, 2006),

o pico que se forma próximo aos 350°C é característico também no PLGA puro segundo a literatura (MAINARDES, GREMIÃO e EVANGELISTA, 2006).

Segundo LAVOR *et al.*, a RIFA apresenta uma exoterma por processo de decomposição em 242,0–269,0°C e a ISO apresenta uma endoterma por evento de fusão em 170,0–176,0°C, dando evidência das estruturas cristalinas desses fármacos (LAVOR *et al.*, 2012), observados nos espectros a e b, respectivamente e na mistura física dos IFAs com PLGA (espectro d). Assim, nenhuma interação poderia ser atribuída ao processo de aquecimento, porém, é observado a ausência do pico endotérmico na curva de DSC de PLGA puro cerca de 50°C.

A ausência de picos dos pontos de fusão dos IFAs na curva DSC da nanofibra contendo RIFA e ISO (espectro f) indicaria que o processo de *electrospinning* altera os cristais nativos dos IFAs, o que indicaria que houve um processo de encapsulamento. Segundo a literatura, os IFAs encapsulados nas nanoestruturas se encontrariam incorporados numa fase amorfa ou num estado de solução sólida na matriz polimérica ou num estado cristalino desordenado de dispersão molecular (TERRY *et al.*, 2014; MAINARDES, GREMIÃO e EVANGELISTA, 2006; ISSA MOHAMMAD e MOTAHARE-SADAT, 2013; LAVOR *et al.*, 2012).

A curva de DSC das nanofibras contendo RIFA e ISO (espectro f), mostra o evento correspondente ao relaxamento da entalpia de polímero (60°C), portanto pode-se deduzir que o processo de encapsulação não afetou a estrutura do polímero porque o polímero puro apresenta o mesmo valor para o relaxamento da entalpia (TERRY *et al.*, 2014).

Figura 51: Curvas de DSC de RIFA, ISO, PLGA, nanofibras de PLGA vazia e nanofibra de PLGA contendo RIFA e ISO.

D.2. Termogravimetria.

As curvas TGA de PLGA puro na Figura 52 mostra que o polímero mostra a estabilidade térmica até 250°C, perdendo 96,6 % de seu peso a 390°C, atribuído à decomposição térmica, confirmado na referência (MAINARDES, GREMIÃO e EVANGELISTA, 2006).

O pico de relaxação de nanofibras vazias (Figura 54) era o mesmo do PLGA puro (cerca de 50°C) (Figura 52). A decomposição térmica da mistura física do PLGA com RIFA e ISO (1:1:1), mostrado na Figura 53 começou numa temperatura baixa (150°C); seguido das nanofibras vazias, mostrado na Figura 54 (220°C) e das nanofibras contendo RIFA e ISO, mostrado na Figura 55 (245°C), por ultimo o polímero puro, mostrado na Figura 52 começou sua decomposição térmica a 250°C, isto poderia acontecer porque as nanofibras estão mais expostas à degradação térmica devido ao seu tamanho sub-micrométrico, e área superficial maior. Em relação ao polímero, uma vez que as nanofibras mostram área superficial mais ampla se degradando mais rapidamente (MAINARDES, GREMIÃO e EVANGELISTA, 2006).

A estabilidade térmica foi avaliada uma vez que todos os materiais não sofreram decomposição apreciável abaixo de 245°C nas condições analíticas utilizadas, isso pode sugerir que as nanofibras poderiam ser processadas de forma segura usando algum tratamento térmico. A curva de TGA das nanofibras contendo RIFA e ISO, Figura 55, não mostrou algum evento térmico em relação ao ponto de fusão dos IFAs. Tal fato foi confirmado pela curva DSC, reforçando a ideia de que os IFAs se encontram retidos nas nanofibras num estado amorfo.

Figura 52: Curva de TGA de PLGA puro.

Figura 53: Curva de TGA da mistura física de PLGA, RIFA e ISO (1:1:1).

Figura 54: Curva de TGA de nanofibras de PLGA vazia.

Figura 55: Curva de TGA de nanofibras de PLGA contendo RIFA e ISO.

5.4. Desenvolvimento das nanoesferas pelo método de emulsão simples (o/w) e emulsão doble (w/o/w).

Pela técnica de emulsão simples (w/o) as nanoesferas foram sintetizadas com os tensoativos Pluronic F-68 e álcool polivinílico (PVA). O tensoativo Pluronic F68 foi adicionado para a fase orgânica, enquanto que o PVA foi adicionado para a fase aquosa. Pela técnica de emulsão doble (w/o/w) as nanoesferas foram sintetizadas com o estabilizador colato de sódio.

O PVA é um tensoativo de tipo o/w que apresenta massa molar elevada. O tamanho das nanoesferas diminui com o aumento da concentração de PVA até chegar a sua concentração micelar crítica (CMC). Quanto maior for a concentração de PVA, maior será o número de moléculas que se insere na superfície das gotículas emulsificadas (SOUTO, SEVERINO e SANTANA, 2012). Os grupos hidroxila das moléculas de PVA são fixados aos grupos acetil de PLGA, via ligação de grupos hidrofóbicos (DE AZEVEDO, 2016).

As micelas de Pluronic estão conformadas por grupos oxipropilenicos (PPO) na parte interna mais hidrofóbica e oxietilenicos (PEO) nas extremidades mais hidrofílicas. Essas micelas são amplamente aplicadas na solubilização de moléculas lipofílicas através de interações hidrofóbicas e de *van der Waals* ao bloqueio hidrofóbico das micelas. O balance de hidrofobicidade das micelas poliméricas é controlado pela mistura da quantidade de monômeros hidrofílicos e hidrofóbicos, resultando numa grande versatilidade desses compostos. Os sistemas micelares de tensoativos poliméricos são frequentemente usados como carregadores para direcionar o IFA para a região alvo, de maneira mais eficiente e rápida. Esses sistemas apresentam maior solubilização, prevenção de agregação e manutenção das propriedades fotofísicas dos compostos hidrofóbicos. Há especial interesse no uso dos tensoativos da classe dos Pluronicos, devido a sua baixa toxicidade em comparação com os tensoativos convencionais (GEROLA *et al.*, 2013).

Os IFAs hidrossolúveis, para poder ser incorporados por dispersão em fase orgânica, podem, alternativamente, ser dissolvidos numa fase aquosa, que, posteriormente, irá constituir a fase interna da emulsão multipla w/o/w. Neste

caso, como a fase aquosa interna tem tendência para coalescer durante a agitação, a presença de um tensoativo na fase orgânica é essencial para aumentar a estabilidade da emulsão primária w/o e em consequência, da emulsão múltipla w/o/w (SOUTO, SEVERINO e SANTANA, 2012).

O colato de sódio é um sal biliar empregado como tensoativo, apresenta uma baixa massa molar. As moléculas localizam-se, preferencialmente, na superfície das gotículas emulsificadas, pelo que um aumento de sua concentração aumenta a proteção das nanoesferas contra a coalescência, resultando numa emulsificação mais eficaz e em nanoesferas de menores dimensões (SOUTO, SEVERINO e SANTANA, 2012).

Conforme as micrografias obtidas por SEM (Figuras 56 a 62) pode-se observar que em todos os casos foram obtidas partículas esféricas de ordem de nanômetros, além disso utilizando Pluronic como estabilizador foram obtidos tamanhos menores, mais homogêneas e com menos aglomeração.

5.5. Caracterizações físico-química das nanoesferas.

A. Distribuição de tamanho de partícula.

Os diâmetros das partículas foram determinados no equipamento de esparsamento de luz dinâmico (DLS) 90Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven, USA). Os tamanhos dos diâmetros das nanopartículas (Tabela 9) foram em geral, considerados como aceitáveis porque em todas as formulações encontraram-se um tamanho inferior a 1000 nm, sendo a formulação 11, 172,6 nm, o valor máximo encontrado dos diâmetros de todas as formulações das nanopartículas elaboradas.

Os tamanhos dos diâmetros das partículas das micrografias de SEM foram também medidos utilizando o *Software ImageJ*®, assim mesmo foi realizado uma média dos valores e elaborou-se histogramas para cada micrografia (Figuras 63 a 69).

Figura 56: Micrografia SEM da formulação F02.

Figura 57: Micrografia SEM da formulação F03.

Figura 58: Micrografia SEM da formulação F05.

Figura 59: Micrografia SEM da formulação F08.

Figura 60: Micrografia SEM da formulação F09.

Figura 61: Micrografia SEM da formulação F11.

Figura 62: Micrografia SEM da formulação F12.

Figura 63: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F02.

Figura 64: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F03.

Figura 65: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F05.

Figura 66: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F08.

Figura 67: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F09.

Figura 68: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F11.

Figura 69: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F12.

O tensoativo determina a formação das nanopartículas e afeta a distribuição de tamanho de partículas. Utilizando PVA ao 2,5 % para as formulações F11 e F12, a média dos diâmetros das nanoesferas maiores foram obtidos através de DLS, 172,6 e 170,4 nm, enquanto que, quando foi utilizado Pluronic F-68 ao 2,5 % para as formulações F01 ao F08 e 4,2 % para as formulações F09 e F10, as nanoesferas apresentam uma média de seus diâmetros de 113,5 nm (F07) até 141,9 nm (F02) e 98,2 nm (F09), 131,7 nm (F10), respectivamente e quando o colato de sódio ao 1,0 % foi empregado como tensoativo pela técnica de emulsão doble (w/o/w) para as formulacoes F13 e F14, a média de seus diâmetros das nanoesferas através de DLS foram 141,9 e 138,4 nm, respectivamente.

Foram testadas três misturas de solventes, o acetato de etila: metanol (2:3 em F05 e F06), DMSO: acetato de etila (1:9 em F01, F02 e 1:1 em F03, F04) e DMSO: metanol (1:1, esquentando o metanol, em F07, F08, F09 e F10). Para ser utilizados nas dissoluções dos IFAs na fase orgânica na síntese das nanopartículas por emulsão simples empregando Pluronic F-68. Quando foi utilizado a mistura DMSO: metanol (1:1), realizou-se esquentando o metanol a 40°C com a finalidade de melhorar a solubilidade da ISO na fase orgânica conforme a literatura (HERYANTO, HASAN e ABDULLAH, 2008). Com acetato de etila: metanol as nanoesferas apresentaram uma média de seus diâmetros através de DLS de 124,0 e 122,7 nm sendo o menor valor para a formulação que empregou o rotavapor como médio de evaporação de solvente; com DMSO:acetato de etila (1:9), 131,0 e 141,9 nm, sendo o menor para a formulação que deixou-se evaporando o solvente com um agitador magnético durante toda

a noite (*overnight*); com DMSO:acetato de etila (1:1), 129,0 e 134,5 nm, sendo menor a formulação que deixou-se em *overnight*; com DMSO:metanol (1:1), 113,5, 117,5, 98,2 e 131,7nm, sendo menor para a formulação contendo menor concentração dos fármacos (10,0 mg) e que deixou-se em *overnight*.

As formulações F03 e F12 foram as que apresentaram maior eficiência de encapsulação, aliás, F03 mostrou melhores características físico-químicas, principalmente porque as nanoesferas apresentam diâmetros menores, são mais homogêneas e não se aglomeraram, por essas razões, elaborou-se nanoesferas vazias, nanoesferas contendo só RIFA e nanoesferas contendo RIFA e ISO, segundo a formulação F03 e os tamanhos dos diâmetros obtidos através de DLS, foram de 144,4, 132,9 e 129,0nm, respectivamente, mostrados na Tabela 10.

Na literatura encontrou-se o efeito dos tensoativos empregados sobre o tamanho médio dos diâmetros das nanoesferas de PLGA elaboradas pela técnica de emulsão-evaporação de solvente. Para PVA ao 2,5 % w/v usando o diclorometano como solvente de polímero, foi obtido um diâmetro médio de 440nm para as nanoesferas de RIFA (AKANSKA, RANJANA e SHUBHINI, 2010); para PVA ao 0,5 %wt usando acetato de etila como solvente do polímero, foi obtido um diâmetro médio de 378 ± 87 nm para nanoesferas de RIFA, usando acetona como solvente do polímero, foi obtido um diâmetro médio de 710 ± 75 nm para nanoesferas de RIFA, usando diclorometano como solvente do polímero (TERRY *et al.*, 2014); para PVA ao 1,2 % usando acetato de etila como solvente do polímero, foi obtido diâmetros de 266-348 nm para nanoesferas de RIFA (CALLEJA *et al.*, 2003); para PVA ao 1 % w/v usando acetato de etila como solvente do polímero, um diâmetrosde 220 ± 19 e 410 ± 23 nm para nanoesferas de RIFA (MARDIYANTO, 2015); para PVA ao 1,0 % usando acetato de etila como solvente do polímero, foi obtido um diâmetro de $1,08 \pm 0,69$ μ m para nanoesferas de ISO (KADARE *et al.*, 2014). Pela técnica de emulsão *doble-spray drying*, foi obtido nanoesferas de PLGA contendo RIFA e outras contendo ISO, empregando Pluronic F-127 ao 1,0 % w/v, foi obtido uma média de seus diâmetros perde 260,1 nm para nanoesferas de RIFA e 319,5 nm para nanoesferas de ISO (BOOYSEN *et al.*, 2010).

O tamanho da partícula é uma característica física importante porque está relacionado diretamente com a área de superfície das partículas e consequentemente com a velocidade de difusão do fármaco desde a matriz polimérica, alterando desta maneira, diretamente a velocidade de liberação do IFA desde o sistema nanoparticulado (JÚNIOR, 2008).

Tabela 9: Caracterização das nanoesferas de PLGA. Tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH.

Nº de formulação	DLS (nm)*	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)	pH
F01	131,0	0,109	-0,84	6,70
F02	141,9	0,129	-1,60	6,69
F03	129,0	0,105	-0,96	6,70
F04	134,5	0,112	-0,89	6,67
F05	124,0	0,120	-0,90	6,65
F06	122,7	0,137	-1,11	6,63
F07	113,5	0,120	-10,51	6,65
F08	117,5	0,121	-13,58	6,80
F09	98,2	0,125	-6,77	6,82
F10	131,7	0,127	-10,8	6,58
F11	172,6	0,022	-3,69	6,48
F12	170,4	0,068	-1,79	6,67
F13	141,9	0,115	-2,42	6,50
F14	138,4	0,087	-2,83	6,70

Onde: DLS (nm)*: Diâmetro obtido através de DLS

Tabela 10: Caracterização das nanoesferas de PLGA da formulação com maior eficiência de encapsulação (F03): vazia, com RIFA, com RIFA e ISO. Tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH.

Nº de formulação	DLS (nm)*	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)	pH
F03 (nanopartículas vazia)	144,4	0,123	-15,96	6,65
F03 (RIFA)	132,9	0,095	-11,74	6,80
F03 (RIFA e ISO)	129,0	0,105	-0,96	6,70

Onde: DLS (nm)*: Diâmetro obtido através de DLS.

B. Potencial zeta.

A Tabela 9 descreve os valores referentes ao potencial zeta apresentado pelas nanoesferas, os valores encontrados para as nanoesferas contendo os IFAs (RIFA e ISO) encontram-se na faixa de -0,84 a -13,58 mV.

A formulações F03 mostraram valores referentes ao potencial zeta de -15,96, -11,74 e -0,96 mV, mostrados na Tabela 10.

Esses valores foram similares aos obtidos por AKANSHA, RAJANA e SHUBHINI (2010) com valores referentes ao potencial zeta de -11,6 mV para nanoesferas de PLGA contendo RIFA; por CALLEJA *et al.* (2003) com valores referentes ao potencial zeta a pH7,0 de $-18,41 \pm 0,87$ mV para nanoesferas de PLGA (RG 502) contendo RIFA, $-19,62 \pm 0,44$ mV para nanoesferas de PLGA (RG502 H) contendo RIFA, $-17,64 \pm 1,88$ mV para nanoesferas de PLGA (R 202) contendo RIFA, $-22,41 \pm 1,48$ mV para nanoesferas de PLGA (R202 H) contendo RIFA, $-22,66 \pm 0,52$ mV para nanoesferas de PLGA (RG 504) contendo RIFA, $-20,48 \pm 0,52$ mV para nanoesferas de PLGA (RG 503) contendo RIFA; por MARDIYANTO (2015) com valores referentes ao potencial zeta de $14 \pm 1,05$ mV até $21 \pm 1,03$ mV para nanoesferas de PLGA contendo RIFA; por KADARE *et al.* (2014) com valores referentes ao potencial zeta de $-12,6 \pm 2,9$ mV para nanoesferas de PLGA contendo ISO; por BOOYSEN *et al.* (2010) com valores referentes ao potencial zeta de 16,0 mV para nanoesferas de PLGA contendo RIFA e 1,37 mV para nanoesferas de PLGA contendo ISO.

O potencial zeta é a carga em partículas da sua superfície e é usada para determinar o nível de floculação ou defloculação em nanosistemas. Os valores de potencial zeta mais pronunciados, sendo positivo ou negativo tem a tendência a estabilizar a suspensão das partículas. Dispersões com um baixo valor de potencial zeta acabará por ser agregados devido a atrações interparticulares de *Van der Waal*. As partículas de PLGA-PVA também foram carregadas negativamente devido aos grupos terminais COO- presentes no esqueleto do polímero de PLGA (KADARE *et al.*, 2014).

Nanopartículas neutras apresentam potencial zeta entre -30 mV e +30 mV, enquanto que nanopartículas que apresentam valores superiores a + 30mV ou inferiores à -30mV (catiônicas e aniônicas, respectivamente) (CLOGSTON, PATRI, 2011). Desta forma, todas as formulações (F01 a F14) poderiam ser consideradas como nanopartículas neutras.

Tem se demonstrado a vantagem da superfície neutra e aniônicas de micelas poliméricas para uma longa circulação e também se mostra que as nanopartículas carregadas negativamente resultam em menor acúmulo no fígado e baço (BLANCO *et al.*, 2015).

Desta forma, foram observados valores negativos referente ao potencial zeta em todas as formulações, sendo os maiores valores de potencial zeta apresentados, nas formulações F01, F03, F04 e F05 como se mostra na Tabela 9. Na formulação F03 foi realizada a avaliação pelo SEM, observando-se nanoesferas em suspensão praticamente sem evidências de aglomeração havendo uma correlação com seu valor de potencial zeta.

C. Índice da polidispersão.

A Tabela 9 descreve os valores referentes ao índice de polidispersão apresentados pelas nanoesferas, o valor encontrado para as nanoesferas contendo os fármacos (RIFA e ISO) encontra-se na faixa de 0,022 a 0,137.

A formulações F03 mostraram melhores características físico-químicas, seus valores referentes ao índice de polidispersão foram de 0,123, 0,095 e 0,105, mostrados na Tabela 10.

Esses valores foram algo similar aos obtidos por AKANSHA, RANJANA e SHUBHINI (2010) com valores de índice de polidispersão de 0,467 para nanoesferas de PLGA contendo RIFA; por MARDIYANTO (2015) com valores de índice de polidispersão de $0,12 \pm 0,05$ e $0,22 \pm 0,08$ para nanoesferas de PLGA contendo RIFA; por BOOYSEN *et al.* (2010) com valores de índice de polidispersão de 0,355 para nanoesferas de PLGA contendo RIFA e 0,347 para nanoesferas de PLGA contendo ISO.

Os autores concluíram que esses valores indicaram variabilidade de tamanho médio das partículas. Dessa maneira, os valores baixos de índice de polidispersão obtidos foram considerados adequados, devido a que isso indicaria homogeneidade dos diâmetros das partículas em suspensão.

D. Determinação de pH.

Os pH encontrados nas formulações elaboradas obtiveram-se valores numa faixa de 6,63 a 6,82 (Tabela 9). Os valores de pH desejado dos medicamentos injetáveis encontram-se numa faixa de 5,0 a 8,0 (STRICKLEY, 2004).

E. Microscopia eletrônica de varredura.

Através das micrografias SEM, nas figuras 70, 71, 72, 73, 74, 75 e 76, pode-se observar as nanoesferas obtidas para as formulações que apresentaram maior eficiência de encapsulação (F02, F03, F05, F08, F09, F11, F12). Todas essas formulações apresentam nanopartículas com forma esférica (nanoesferas), alguns com formação de aglomerados (F05, F08, F09, F11 e F12). A vetorização passiva das nanopartículas ocorre naturalmente devido ao reduzido diâmetro e sua morfologia esférica, que proporcionam melhor permeabilidade nas membranas biológicas (JAIN e KUMAR, 2010), razão pela qual a forma das nanopartículas obtidas se mostram favoráveis. Na análise por SEM empregando o *Software ImageJ* todas as formulações apresentaram tamanho nanométrico, exceto a formulação F08, pode-se observar nanopartículas com tamanhos que variam numa faixa de 197,4 a 4817,2 nm, aproximadamente, obtendo uma média de 1187,6 nm. Na análise de tamanho o diâmetro médio obtido para as nanoesferas foram: para a formulação F02 através de SEM 117,2 nm e através de DLS 141,9 nm; para a formulação F03 através de SEM 131,7 nm e através de DLS 129,0 nm; para a formulação F05 através de SEM 100,7 nm e através de DLS 124,0 nm; para a formulação F08 1187,6 nm e um diâmetro médio mínimo de 197,4 nm e através de DLS 117,5 nm; para a formulação F09 641,4 nm e um diâmetro médio mínimo de 99,42 nm e através de DLS 98,2 nm; para a formulação F11 128,5 nm e através de DLS 172,6 nm; para a formulação F12 150,3 nm e através de DLS 170,4 nm (Figuras 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 e Tabela 9). Portanto, houve uma correlação entre os

tamanhos obtidos nessas duas técnicas (DLS e SEM) na maioria das formulações, no entanto as formulações F08 e F09, ajudaram a ter um conhecimento da presença de partículas muito maiores que os valores da média de tamanho dos diâmetros das nanopartículas através de DLS, portanto é recomendável usar diversas técnicas, como DLS, SEM e TEM, entre outras, para uma melhor determinação dos tamanhos dos diâmetros nas nanopartículas (BOOTZ *et al.*, 2004)

Figura 70: Micrografia SEM da formulação F02.

Figura 71: Micrografia SEM da formulação F03.

Figura 72: Micrografia SEM da formulação F05.

Figura 73: Micrografia SEM da formulação F08.

Figura 74: Micrografia SEM da formulação F09.

Figura 75: Micrografia SEM da formulação F11.

Figura 76: Micrografia SEM da formulação F12.

Figura 77: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F02.

Figura 78: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F03.

Figura 79: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F05.

Figura 80: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F08.

Figura 81: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F09.

Figura 82: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F11.

Figura 83: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F12.

F. Microscopia eletrônica de transmissão.

As formulações F03 das nanoesferas contendo só RIFA e contendo RIFA e ISO, mostraram melhores características físico-químicas, os valores dos tamanhos dos seus diâmetros obtidos através de DLS, foram de 132,9 e 129,0 nm, respectivamente (Tabela 10) e através de TEM empregado com o *Software* ImageJ, mostrado nas Figuras 91 e 90, respectivamente, os tamanhos dos diâmetros obtidos através de DLS, foram de 128,7 e 75,2 nm, respectivamente. Portanto, houve uma correlação entre os tamanhos dos diâmetros obtidos empregando ambas técnicas (DLS e TEM).

As micrografias obtidas através de TEM foram empregados para proporcionar provas de que os fármacos, RIFA e ISO, estavam contidos dentro das estruturas das nanoesferas. Como pode ser observado nas Figuras 84, 85, 86, 87, 88 e 89, todas as micrografias das nanoesferas contendo os fármacos apresentam formas ovaladas tipo grânulos, que corresponderia aos fármacos, dispersos em todas a matriz polimérica, sendo possível ser observados pelo contraste de cores entre o polímero e os fármacos, especialmente na micrografia E (Figura 88), pode-se observar notavelmente aos fármacos, morfologicamente granulares, contenidos dentro das nanoesferas

Figura 84: Micrografia TEM A da nanoesfera da formulação F03 contendo RIFA e ISO.

Figura 85: Micrografia TEM B da nanoesfera da formulação F03 contendo RIFA.

Figura 86: Micrografia TEM C da nanoesfera da formulação F03 contendo RIFA e ISO.

Figura 87: Micrografia TEM D da nanoesfera da formulação F03 contendo RIFA.

Figura 88: Micrografia TEM E da nanoesfera da formulação F03 contendo RIFA e ISO.

Figura 89: Micrografia TEM F da nanoesfera da formulação F03 contendo RIFA.

Figura 90: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F03 contendo RIFA e ISO.

Figura 91: Histograma de distribuição de tamanho dos diâmetros das nanoesferas da formulação F03 contendo RIFA.

G. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho.

A análise através da espectrofotometria de absorção na região do infravermelho mede a absorção seletiva da luz pelos modos de vibração das uniões químicas específicas na amostra. A observação dos espectros de vibração dos fármacos encapsulados permite a avaliação dos tipos de interações que ocorre entre os fármacos e o polímero, devido as vibrações dos átomos envolvidos nessa interação, podendo sofrer alterações em frequência e intensidade (MAINARDES, GREMIÃO e EVANGELISTA, 2006; TERRY *et al.*, 2014). Na Figura 92, os espectros de absorção na região do infravermelho dos

fármacos puros (espectros a e b) e do PLGA (espectro c) apresentam os picos principais atribuídos aos grupos funcionais da molécula tais como para a RIFA, observados a 1731 cm^{-1} (C=O de acetil), 1649 cm^{-1} (C=O da furanona) e 1561 cm^{-1} (C=O da amida); para a ISO observados a 1665 , 1633 e 1601 cm^{-1} (banda de transmitância do grupo amina) e para o PLGA observados a 1747 cm^{-1} (C=O de carbonila, vibração de estiramento) e 1084 cm^{-1} (C-O, vibração de estiramento). A avaliação dos espectros de absorção na região do infravermelho das nanopartículas de PLGA não carregadas com os fármacos (espectro d) demonstraram que o procedimento de emulsão- evaporação de solvente tem um impacto mínimo sobre a atribuição de disposições inter ou intramoleculares, sem mudanças de banda observadas quando comparado com PLGA puro (espectro c), portanto os grupos funcionais específicos do material polimérico na superfície das nanopartículas tem quase as mesmas características do polímero puro. Os picos dos fármacos nas nanoesferas carregadas com RIFA e ISO (espectro f), praticamente não foram observados devido a baixa concentração dos fármacos nas nanopartículas, porém o pico próximo a $1502,5\text{ cm}^{-1}$, tanto no espectro da RIFA pura (espectro a) e das nanoesferas carregadas com RIFA e ISO (espectros e e f), seria atribuído ao benzeno da molécula da RIFA, segundo a literatura (ALVES, 2007; BRITISH PHARMACOPEIA, 2009; NERDY, DE LUZ PUTRA, HADU TJAHONO, 2014) e o pico próximo a $1220,9\text{ cm}^{-1}$, tanto no espectro da ISO pura (espectro b) e das nanoesferas carregadas com RIFA e ISO (espectro f), seria atribuído a ligação C-N na molécula da ISO, segundo a literatura (BORBA, GÓMEZ-ZAVAGLIA, FAUSTO, 2009; BRITISH PHARMACOPEIA, 2009; NERDY, DE LUX PUTRA, HADI TJAHONO, 2014), portanto a análise dos espectros de absorção na região do infravermelho sugere que não ocorreram interações moleculares que poderiam ter alterado a estrutura química dos IFAs durante o tempo de estudo.

Figura 92: Espectros de absorção na região do infravermelho da RIFA, ISO, PLGA, mistura física de RIFA, ISO e PLGA (1:1:1), nanoesferas de PLGA vazia

(formulação F03), nanoesferas de PLGA com RIFA (formulação F03) e nanoesferas de PLGA com RIFA e ISO (formulação F03).

H. Calorimetria exploratória diferencial.

Conforme a Figura 93, as curvas de DSC fornecem informações sobre as transformações térmicas das nanoesferas e do estado dos IFAs depois do processo da encapsulação (TERRY *et al.*, 2014). A temperatura de transição vítrea de PLGA encontra-se acima da temperatura fisiológica (37°C) e, portanto, é de natureza vítrea; assim o PLGA (espectros c e e) tem uma estrutura de cadeia bastante rígido, que confere resistência mecânica significativa, sendo útil como veículo de IFAs (MAINARDES, GERMIÃO e EVANGELISTA, 2006). Conforme a referência a RIFA apresentou um exoterma devido ao processo de decomposição (242-269°C). Nas curvas DSC da RIFA pura (espectro a) e das nanoesferas contendo RIFA e a ISO (espectro g) apresenta uma endoterma devido a um evento de fusão de 170-176°C, dando evidência das estruturas cristalinas desses IFAs (LAVOR *et al.*, 2012), esse pico foi observado nas curvas DSC da ISO (espectro b) e da mistura física de PLGA, RIFA e ISO (1:1:1) (espectro d). Assim, nenhuma interação poderia ser atribuída ao processo de aquecimento.

A ausência de picos dos pontos de fusão dos IFAs nas curvas DSC das nanoesferas contendo RIFA e ISO (espectros f e g) indicaria que a técnica emulsão/evaporação de solvente altera os cristais nativos dos IFAs, o que indicaria que houve um processo de encapsulamento. Segundo a literatura, os IFAs encapsulados nas nanoestruturas se encontrariam incorporados numa fase amorfa ou num estado de solução sólida na matriz polimérica ou num estado cristalino desordenado de dispersão molecular (TERRY *et al.*, 2014; MAINARDES, GREMIÃO e EVANGELISTA, 2006; ISSA MOHAMMAD e MOTAHARE-SADAT, 2013; LAVOR *et al.*, 2012).

Figura 93: Curva de DSC da RIFA, ISO, PLGA, mistura física de RIFA, ISO e PLGA (1:1:1), nanoesferas de PLGA vazia (formulação F03), nanoesferas de PLGA com RIFA (formulação F03) e nanoesferas de PLGA com RIFA e ISO (formulação F03).

5.6. Método de quantificação dos Insumos Farmacêuticos Ativos através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Para o método desenvolvido através de HPLC, conforme a Tabela 8, foi utilizado uma coluna Synergi™ Fusion-RP 80 Å (4,6 mm de D.I. x 25 cm, 4 µm) e uma fase móvel conformado por ACN:água Milli-Q com 0,1 % de ácido fórmico (pH 3) em eluição por gradiente: de 0 a 4 minutos= 20:80, v/v; de 4,1 a 10 minutos= 70:30, v/v e de 10,1 a 20 minutos= 20:80, v/v, obtendo-se uma boa resolução dos fármacos (RIFA e ISO) com seu padrão interno (dexametasona) (Figura 94). Foi escolhido o emprego de uma eluição por gradiente devido a diferença de polaridade dos analitos, especialmente dos analitos hidrofóbicos (RIFA e dexametasona) os quais em eluição isocrática mostram tempos de retenção longos. O pico menor que elue antes do pico da RIFA corresponderia a umas das substâncias relacionadas da RIFA, que segundo a farmacopeia americana seriam: rifampicina quinona, rifamicina sv, rifampicina N-óxido e 3-formilrifampicina (USP40-NF35). As substâncias relacionadas da RIFA não foram identificadas pois não se tinha padrão para identifica-las e não era o foco deste estudo.

Figura 94: Cromatograma da RIFA (100,0 µg mL⁻¹), ISO (100,0 µg mL⁻¹), e a dexametasona (100,0µg mL⁻¹). Fase móvel: ACN:água Milli-Q com 0,1 % de ácido fórmico (pH 3) em eluição por gradiente: de 0 a 4 minutos= 20:80, v/v; de 4,1 a 10 minutos= 70:30, v/v e de 10,1 a 20 minutos= 20:80, v/v; fluxo: 0,8mL min⁻¹; coluna: Synergi™ Fusion-RP 80 Å (4,6 mm de D.I. x 25 cm, 4 µm); temperatura: 30 °C; detecção: 260 nm.

5.7. Validação dos métodos analíticos para a determinação da eficiência de incorporação dos Insumos Farmacêuticos Ativos dentro das nanoestruturas através de cromatografia líquida de alta eficiência.

A. Linearidade.

Foram construídas as curvas analíticas para cada fármaco (RIFA e ISO), obtivendo-se um coeficiente de correlação acima de 0,99. Segundo a ANVISA o coeficiente de correlação de linearidade acima de 0,99 é satisfatório (ANVISA, 2017). As Figuras 95 e 96, apresenta as curvas analíticas da ISO e RIFA, respectivamente obtida a 260 nm e os valores experimentais obtidos na construção das curvas são mostrados nas tabelas 11 e 12 para a ISO e RIFA, respectivamente.

Figura 95: Curva analítica da ISO na faixa de concentrações de $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 11: Resultados experimentais obtidos na determinação da curva analítica da ISO através do método de HPLC.

Concentração de leitura ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área do pico*
1,0	24786
5,0	131486
10,0	259635
20,0	418235
40,0	896387
60,0	1381384
80,0	2041687

Continuação da Tabela 11: Resultados experimentais obtidos na determinação da curva analítica da ISO através do método de HPLC.

100,0	2514087
150,0	3847846
200,0	5021901
Inclinação (b)	25460,128
Desvio padrão da inclinação	324,0152
Intercepto (a)	-41901,08
Desvio padrão do intercepto (Sa)	29806,93307
Coefficiente de correlação	0,99854
Equação da recta	Y= 25460,128 X - 41901,08

Onde: *: Média de três leituras.

Figura 96: Curva analítica da RIFA na faixa de concentrações de 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 12: Resultados experimentais obtidos na determinação da curva analítica da RIFA através do método de HPLC.

Concentração de leitura ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área do pico*
1,0	9472
5,0	66925
10,0	167339
20,0	359843
40,0	758075
60,0	1227417
80,0	1724948
100,0	2140163
150,0	3319289
200,0	4428076
Inclinação (b)	22420,43
Desvio padrão da inclinação	202,4804
Intercepto (a)	-73046,5
Desvio padrão do intercepto (Sa)	18626,66
Coefficiente de correlação	0,9992
Equação da recta	Y= 22420,4 X - 73046,5

Onde: *Média de três leituras.

B. Especificidade.

A especificidade é a capacidade que um método tem para analisar, de forma inequívoca, a substância em análise em presença de componentes que poderiam interferir em sua determinação numa mistura complexa (USP40-NF35, 2017). Nas Figuras 97, 98, 99 e 100 pode-se observar os cromatogramas das nanoesferas vazias, das nanoesferas carregadas com os IFAs, das nanofibras vazias e das nanofibras carregadas com os fármacos, respectivamente, não se observa nenhum pico no tempo de retenção dos IFAs (1,93 e 5,17 minutos, para a ISO e RIFA, respectivamente), pelo qual o método pode ser considerado específico para detectar os fármacos nas nanoestruturas.

Figura 97: Cromatograma das nanoesferas vazias. Fase móvel: ACN:água Milli-Q com 0,1 % de ácido fórmico (pH 3) em eluição por gradiente: de 0 a 4 minutos= 20:80, v/v; de 4,1 a 10 minutos= 70:30, v/v e de 10,1 a 20 minutos= 20:80, v/v; fluxo: 0,8 mL min⁻¹; coluna: Synergi™ Fusion-RP 80 Å (4,6 mm de D.I. x 25 cm, 4 µm); temperatura: 30 °C; detecção: 260 nm.

Figura 98: Cromatograma das nanopartículas contendo os IFAs, RIFA e ISO, e o padrão interno, dexametasona (100,0 µg mL⁻¹). Fase móvel: ACN:água Milli-Q com 0,1 % de ácido fórmico (pH 3) em eluição por gradiente: de 0 a 4 minutos=

20:80, v/v; de 4,1 a 10 minutos= 70:30, v/v e de 10,1 a 20 minutos= 20:80, v/v; fluxo: 0,8 mL min⁻¹; coluna: Synergi™ Fusion-RP 80 Å (4,6 mm de D.I. x 25 cm, 4 µm); temperatura: 30 °C; detecção: 260 nm.

Figura 99: Cromatograma das nanofibras vazias. Fase móvel: ACN:água Milli-Q com 0,1 % de ácido fórmico (pH 3) em eluição por gradiente: de 0 a 4 minutos= 20:80, v/v; de 4,1 a 10 minutos= 70:30, v/v e de 10,1 a 20 minutos= 20:80, v/v; fluxo: 0,8 mL min⁻¹; coluna: Synergi™ Fusion-RP 80 Å (4,6 mm de D.I. x 25 cm, 4 µm); temperatura: 30 °C; detecção: 260 nm.

Figura 100: Cromatograma das nanofibras contendo os IFAs, RIFA e ISO, e o padrão interno, dexametasona (100,0 µg mL⁻¹). Fase móvel: ACN:água Milli-Q com 0,1 % de ácido fórmico (pH 3) em eluição por gradiente: de 0 a 4 minutos= 20:80, v/v; de 4,1 a 10 minutos= 70:30, v/v e de 10,1 a 20 minutos= 20:80, v/v; coluna: Synergi™ Fusion-RP 80 Å (4,6 mm de D.I. x 25 cm, 4 µm); temperatura: 30 °C; detecção: 260 nm.

C. Limite de detecção e limite de quantificação.

A Tabela 13 apresenta os resultados para os limites de detecção e quantificação da RIFA e ISO.

Tabela 13: Resultados experimentais obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação da RIFA e ISO através de HPLC.

Parâmetro	RIFA	ISO
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	8,4	5,9
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	25,5	18,1

Onde: LOQ: Limite de quantificação e LOD: Limite de detecção

D. Precisão (repetibilidade).

A precisão foi determinada para avaliar a proximidade dos resultados obtidos numa série de medições de amostragem múltipla. Foram utilizadas amostras em replicata de seis. As Tabelas 14 e 15 apresentam os resultados obtidos. Os desvios padrões relativos (%DPR) nas medições foram menores que 2 %, portanto a precisão do método foi considerada satisfatória.

Tabela 14: Precisão do método através de HPLC para determinação da RIFA e ISO em nanoesferas.

	RIFA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	ISO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Média*	100,48	99,88
SD	0,89	1,37
%DPR	0,88	1,37

Onde: *Média de seis leituras da mesma concentração ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Tabela 15: Precisão do método através de HPLC para determinação da RIFA e ISO em nanofibras.

	RIFA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	ISO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Média*	100,45	99,55
SD	1,33	1,77
%DPR	1,33	1,77

Onde: *Média de seis leituras da mesma concentração ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Os testes para os fármacos, tanto em nanopartículas e nas nanofibras, apresentaram DPR igual a 0,88 %, 1,37 % e 1,33 %, 1,77 % para a RIFA e ISO em nanoesferas e em nanofibras, respectivamente (Tabelas 14 e 15). Esses resultados foram menores que 2%, portanto a precisão do método foi considerada satisfatória.

E. Exatidão.

O teste de recuperação está relacionado com a exatidão do método, isto é, o grau de concordância entre os resultados obtidos pelo método e um valor aceitado como referência (USP40-NF35, 2017).

A exatidão do método foi calculada considerando a diferença entre a média e o valor verdadeiro aceitado. Foram utilizadas as concentrações de 16,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (16,67 %), 50,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (50,00 %) e 100,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (100,00 %) simuladas (solução do fármaco + nanoestruturas placebo liofilizadas) em triplicata, para cada concentração e para cada IFA tanto em nanoesferas e em nanofibras. A exatidão foi calculada e os resultados estão apresentados nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16: Concentração teórica, concentração obtida e percentagem de recuperação do teste de exatidão do método de determinação de RIFA e ISO nas nanoesferas vazias através de HPLC.

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RIFA		ISO	
	Concentração obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Concentração obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)
16,67	Média*	95,54	Média*	96,54
	SD	1,19	SD	1,99
50,00	Média*	109,62	Média*	101,71
	SD	1,15	SD	1,94
100,00	Média*	91,30	Média*	98,83
	SD	0,77	SD	0,75

Onde: *Média de três leituras da mesma concentração.

Tabela 17: Concentração teórica, concentração obtida e percentagem de recuperação do teste de exatidão do método de determinação de RIFA e ISO nas nanofibras vazias através de HPLC.

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RIFA		ISO	
	Concentração obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Concentração obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)
80,00	Média*	100,07	Média*	101,78
	SD	1,73	SD	1,93
100,00	Média*	99,97	Média*	100,77
	SD	1,00	SD	1,39
120,00	Média*	99,49	Média*	100,93
	SD	1,37	SD	1,18

Onde: *Média de três leituras da mesma concentração.

Os resultados da exatidão apresentada nas tabelas para os dois fármacos, tanto em nanopartículas e em nanofibras, mostraram que a recuperação é próxima de 100 %, por tanto a exatidão foi considerada satisfatória.

O desempenho indicou que o método de determinação desenvolvido é capaz de proporcionar resultados próximos do valor real para a quantificação dos fármacos nas nanoestruturas.

5.8. Método de determinação dos Insumos Farmacêuticos Ativos através de eletroforese capilar.

Apesar do uso de comprimidos de dose fixa combinada (DFC) da associação de IFAs de primeira linha (RIFA, ISO, PZA e ETA) no tratamento atual desde 2009, (SES,2017), a determinação simultânea por CE destes quatro IFAs é pouco reportada na literatura (FARIA *et al.*, 2010; MARCELLOS *et al.*, 2012). Com a finalidade de encontrar uma metodologia eficiente para determinar a taxa de encapsulamento dos fármacos nas nanoestruturas por CE, alguns testes preliminares foram realizados para encontrar um método adequado para a quantificação dos fármacos. Trabalhou-se primeiramente com CZE, foi utilizada como eletrólito uma solução de tetraborato de sódio (TBS) 25 mmol L⁻¹ e pH 9,2 com tensão aplicada de 25 kV, observando-se que com a técnica de CZE não é possível a separação dos fármacos, já que a ISO sai como o fluxo eletrosmótico. Isto se dá, porque neste pH a ISO se encontra neutra e não irá se separar do

fluxo. Por este motivo foram realizados outros testes, com outro modo de separação de CE. Dentre os modos de separação em CE, sem processos de derivatização para geração de carga, os mais recomendados são a base da separação do cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC) e a cromatografia capilar eletrocinética em microemulsão (MEEKC). A base da separação do MEEKC é similar à MEKC onde os monômeros de tensoativos iônicos se agrupam para formar micelas. As micelas são estruturas firmemente ligadas às quais são de difícil penetração, as microemulsões têm uma estrutura frouxa facilitando a penetração de solutos. Portanto, solutos não polares têm afinidade mais forte pela microemulsão do que pelas micelas de SDS e, portanto, fatores de capacidade mais altos. Esta habilidade permite a MEEKC ser aplicada a uma maior gama de solutos do que a MEKC (ALTRIA, 1999; DA SILVA, 2007).

Do nosso conhecimento, a determinação simultânea dos IFAs antituberculose através do MEEKC não foi demonstrada anteriormente, além do mais, não encontraram-se referências para a determinação dos dois fármacos, RIFA e ISO, encapsulados em nanofibras e em nanoesferas através de CE. Por essa razão, o projeto também visa o desenvolvimento e validação de um método capaz de determinar a eficiência de encapsulação dos dois IFAs antituberculose nas nanoestruturas através da técnica de CE; considerando que este método pode ser aproveitado para as análises dos comprimidos de DFC, razão pelo qual se desenvolveu um método por CE para a determinação simultânea dos quatro IFAs antituberculose de primeira linha (ETA, PZA, ISO e RIFA).

MEEKC é uma técnica que realiza separações eletrocinéticas usando tampões contendo gotas de óleo revestidas com surfactante (MAHUZIER *et al.*, 2003; ALTRIA, 1996). A técnica separa os solutos baseados tanto na hidrofobicidade como nas diferenças de mobilidade eletroforética (Figura 101).

Figura 101: Sistema de microemulsão o/w adaptado de ALTRIA, CLARK, MAHUZIER, 2000 e DA SILVA, 2007.

Durante os ensaios preliminares foram testados diferentes: óleos imiscíveis (octano e acetato de etila); concentrações de SDS (3,31 e 0,6 %); solventes (acetonitrila, metanol, etanol, dimetilformamida, dimetilsulfoxido, 2-propanol e acetona); pHs (9 e 10) e concentrações de tampão de tetraborato de sódio (5 e 10 mmol L⁻¹); temperaturas na coluna (15 e 25 °C); temperaturas no amostrador (10 e 25 °C); padrões internos (clozapina e diazepam); pressão e tempo de injeção (0,3psi por 3s e 0,5psi por 5s). Os padrões internos podem melhorar substancialmente a precisão das determinações de área de pico, especialmente se o erro de injeção é a fonte dominante (ALTRIA, 1996).

Uma vez escolhidas as melhores condições eletroforéticas para a determinação simultânea dos fármacos antituberculosos de primeira linha (capilar: 20 cm efetivo x 50 D.I.; temperatura: 10°C no amostrador e 15°C no capilar; voltagem: 30kV; injeção pelo *inlet*: 3s, 0,3psi; comprimento de onda: 207 nm; componentes fixos do eletrólito: 0,5 % w/w acetato de etila, 1,2 % w/w de butanol, 0,6 % w/w de dodecilsulfato sódico, mistura de acetona e propanol e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9) foram realizados ensaios utilizando injeção normal da amostra, injeção pelo *inlet* (comprimento efetivo:

20cm) mudando as percentagens de acetona, 2-propanol e tetraborato de sódio, conforme a Tabela 18.

Tabela 18: Ensaios empregando injeção pelo *inlet* e voltagem de +30kV para a escolha da melhor proporção de acetona, 2-propanol e 10 mmol L⁻¹ de TBS a pH 9.

Injeção pelo <i>inlet</i> (comprimento efetivo: 20,0 cm) e voltagem de +30 kV						
Acetona (% v/v)	2-propanol (% v/v)	TBS (% v/v)	Tr de ETA (min)*	Tr de PZA (min)*	Tr de ISO (min)*	Tr de RIFA (min)*
13,75	5,50	78,45	1,54	1,54	1,62	2,35
17,50	6,00	74,20	1,71	1,78	1,85	2,70
17,50	11,00	69,20	1,98	2,12	2,28	2,37
18,87	2,75	76,08	2,80	3,00	3,60	5,40
25,75	5,50	66,45	2,25	2,45	2,70	3,70
37,70	5,50	54,50	3,60	3,80	5,80	9,50

Onde: TBS: 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9; Tr: tempo de retenção e *: Média de três valores.

Neste estudo empregou-se modificadores orgânicos que são 100,0 % w/v solúveis em água, acetona e 2-propanol, os quais foram considerados necessários para conseguir uma boa separação com um aumento significativo da resolução de partes do sistema de separação. A acetona foi empregada numa proporção maior (37,7 % v/v) para aumentar a solubilidade e ampliar a janela de separação.

Quando se passou os 4 IFAs empregando injeção normal (injeção pelo *inlet*), com a adição só de 12,0 % v/v de 2-propanol na solução eletrólito, só apareceram 3 picos, num tempo de análises menor a 5 minutos e com a adição só de 35,0 % v/v de acetona na solução eletrólito, só apareceram 3 picos num tempo de análises menor a 3 minutos. A diferença no tempo de análise poderia ser explicado pela diferença de viscosidade entre ambos solventes, sendo 2,30 e 0,32 Cp para 2-propanol e acetona, respectivamente. A mistura destes dois solventes orgânicos nessas proporções permitiu a observação dos 4 picos, melhorando a separação dos IFAs, porém, o tempo de análise foi 12,2 minutos. O aumento do tempo de análise da mistura de ambos solventes poderia ser devido a que o incremento da concentração dos solventes orgânicos a um buffer poderia conduzir uma redução na mobilidade electroosmótica, em presença de

um pH elevado, onde todos os grupos silanol da superfície estão dissociados. Isto pode ser causado por uma mudança na viscosidade do eletrólito. A segunda causa poderia ser a deslocação do pKa dos grupos silanóis em direção a valores mais elevados quando uma quantidade crescente de solvente orgânico é adicionada (LEE, PRICE e SHEIL, 1995).

Apesar de usar grandes quantidades de solventes da mistura de solvente orgânico, não se observou uma resistência a passagem de carga, portanto, não houve uma tensão aumentada como é acostumado a acontecer quando se emprega grandes quantidades de modificadores orgânicos (LEE, PRICE e SHEIL, 1995), obtivendo-se uma corrente elétrica estável de +25 μ A e -25 μ A quando se empregou +30 kV, empregando injeção pelo *inlet* e -30 kV empregando injeção pelo *outlet*, respectivamente, evitando-se desta maneira uma quantidade excessiva de aquecimento de Joule (LEE, PRICE e SHEIL, 1995).

Dos ensaios realizados, conforme a Tabela 18, obteve-se uma melhor resolução empregando a última condição: 37,70 % v/v de acetona; 5,50 % v/v de 2-propanol e 54,50 % v/v de 10 mmol L⁻¹ de tampão TBS a pH 9; no entanto o tempo de análise foi longo (Figuras 102 e 103) o que levou a otimizar as condições eletroforéticas estabelecendo uma modelagem experimental por delineamento de misturas usando uma abordagem de vértices extremos.

Figura 102: Eletroferograma da análise de cloridrato de etambutol (E), pirazinamida (P), clozapina (padrão interno) (C), isoniazida (I) e rifampicina (R). Concentrações de $200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de R, I e de E; concentração de $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de P e concentração de $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de C. Condições: Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50 μm D.I.; injeção hidrodinâmica por pressão de 0,5 psi/ 5s; injeção normal; voltagem aplicada: +30 kV (corrente: 24,4 μA); temperatura do capilar: 15°C; temperatura do amostrador: 10°C; detecção UV em 207 nm; eletrólito: 0,5 % (w/w) de acetato de etila, 1,2 % (w/w) de butan-1-ol, 0,6 % (w/w) de dodecilsulfato sódico, 5,5 % (v/v) de 2-propanol, 37,7 % (v/v) de acetona e 54,5 % (w/w) de 10 mmol L^{-1} de tampão aquoso de tetraborato de sódio a pH 9,2.

Figura 103: Eletroferograma da análise de cloridrato de etambutol (E), pirazinamida (P), diazepam (padrão interno) (D), isoniazida (I) e rifampicina (R). Concentrações de $800,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de E; $190,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de P; $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de I; $260 \mu\text{g mL}^{-1}$ de R de $60,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de D. Condições: Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50 μm D.I.; injeção hidrodinâmica por pressão de 0,5 psi/5s; injeção normal; voltagem aplicada: +30 kV (corrente: 18,9 μA); temperatura do capilar: 15°C ; temperatura do amostrador: 10°C ; detecção UV em 207 nm; eletrólito: 0,5 % (w/w) de acetato de etila, 1,2 % (w/w) de butan-1-ol, 0,6 % (w/w) de dodecilsulfato sódico, 5,5 % (v/v) de 2-propanol, 37,7 % (v/v) de acetona e 54,5 % (w/w) de 10 mmol L^{-1} de tampão aquoso de tetraborato de sódio a pH 9,2.

5.9. Otimização do método eletroforético de quantificação dos Insumos Farmacêuticos Ativos empregando um delineamento de experimentos de mistura.

O desenho de experimentos (DoE), um método sistemático multivariado, pode ser usado para criar um espaço de desenho com o objetivo de alcançar um nível profundo de conhecimento e compreensão de uma formulação (PATIL e PETHE, 2013; REBELLO *et al.*, 2015). Por outro lado, os aspectos mais importantes do desenho experimental estatístico, incluem menos ensaios, detecção de interações entre fatores, detecção da ótima formulação e modelagem dos resultados (FURLANETTO, 2006; GOUPY, 1992 e LUNDSTEDT *et al.*, 1998). As experiências de mistura são uma classe especial de experimentos de superfície de resposta em que o produto sob investigação é composto de vários componentes ou ingredientes. As quantidades de componentes, medidas em pesos, volumes ou algumas outras unidades, somam-se a um total comum, e os ingredientes da mistura não podem ser variados independentemente. A resposta (a qualidade ou o desempenho do produto com base em algum critério) é função das proporções dos diferentes ingredientes na mistura e não da sua quantidade absoluta. Em contraste de um planejamento fatorial, a resposta depende da quantidade de cada fator (FURLANETTO *et al.*, 2006; BRERETON. 2003; LEWIS, MATHIEU e PHAN-TAN-LUU, 1999; CORNELL, 1990).

Em MEEKC, as respostas significativas são geralmente restritas a uma parte limitada do espaço fatorial (o espaço de desenho ou a região viável), portanto, não foram usados os componentes puros e sim as misturas deles para manter a estabilidade do sistema e assim evitar o risco de quebra da emulsão, empregando-se um delineamento de misturas usando uma abordagem de vértices extremos onde os componentes da mistura foram restritos, criando-se um espaço de desenho de estudo. Cada canto do espaço experimental corresponde aos pontos que representam os limites superiores de cada componente, nesse sentido, o afastamento dos limites superiores em cada componente representa a diminuição do percentual relativo do componente.

As composições das misturas são mostradas na Tabela 19 junto aos seus respectivos resultados experimentais. A realização dos experimentos seguindo um projeto experimental envolvendo experimentos de mistura, foi usado para obter uma boa descrição e previsão do problema considerado. Através do estudo de um mapa (ou seja, superfície de resposta), representando fielmente o problema, é possível identificar as condições que produzem os melhores resultados (FURLANETTO *et al.*, 2006).

Tabela 19: Ensaios empregando injeção pelo *outlet* e voltagem de +30 kV para a escolha da melhor proporção de acetona (A), 2-propanol (B) e 10mM de TBS a pH 9 (C), voltagem +30 kV.

% A	% B	% C	ETA	PZA	DZP	ISO	RIFA
			Tr (min)*	Tr (min)*	Tr (min)*	Tr (min)*	Tr (min)*
27,70	1,00	69,00	0,60	0,60	0,85	0,85	1,38
27,70	10,00	60,00	1,30	1,35	1,65	2,20	2,90
32,70	7,75	57,25	1,56	1,69	2,03	2,22	3,64
32,70	3,25	61,75	0,43	0,43	0,72	0,89	1,19
37,70	5,50	54,50	1,91	2,02	2,42	3,08	5,65
42,70	3,25	51,75	1,11	1,11	1,24	1,60	2,12
42,70	7,75	47,25	2,34	2,44	2,75	4,05	6,16
47,70	1,00	49,00	1,69	1,83	2,17	2,90	7,01
47,70	10,00	40,00	3,22	3,43	3,90	3,90	7,30

Onde: TBS: 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9; Tr: tempo de retenção; DZP: diazepam e *: Média de três valores.

Com o intuito de diminuir o tempo de retenção para a determinação simultânea dos IFAs foi utilizada a injeção pelo *outlet*.

O primeiro passo de uma otimização multivariada concerne à escolha dos fatores influentes e das respostas. Os experimentos foram planejados para cobrir homogêaneamente o espaço experimental para o qual os limites foram definidos, empregando um delineamento de misturas usando uma abordagem de vértices extremos (Figura 104).

Figura 104: Gráfico do espaço experimental empregando um delineamento de misturas usando uma abordagem de vértices extremos para o efeito de diferentes combinações dos componentes: acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C).

Com base nos resultados anteriores apresentadas na Tabela 18, o dodecilsulfato sódico (0,6 %, w/w) foi escolhido como agente tensoativo, o butanol-1-ol (0,6 %, w/w) como co-tensoativo, o acetato de etila (1,2 %, w/w) como fase oleosa, o tampão aquoso de tetraborato de sódio a pH 9,2 como fase aquosa e os solventes acetona e 2-propanol como modificadores orgânicos. Assim, a otimização da mistura foi composta por um sistema de alguns dos componentes, correspondente ao 97,6 % do total, conforme a Tabela 19: acetona, 2-propanol e 10 mmol L⁻¹ de TBS a pH 9. As restrições dos componentes foram impostas de acordo aos resultados anteriores (Tabela 18), o tampão aquoso de tetraborato de sódio a pH 9,2 (C) variou de um limite inferior a superior de 40,0 e 69,0 %, respectivamente; a acetona (A) de 27,7 e 47,7 %, respectivamente e o 2-propanol (B) de 1,0 a 10,0 %, respectivamente. As misturas preparadas foram posteriormente testadas como eletrólito em MEEKC.

Foram realizadas 9 misturas por triplicata empregando o *Software* Minitab 17 (State College PA, EUA) com o objetivo de estimar os coeficientes do modelo postulado que, para um problema de otimização: como este, deve ser preditivo, a fim de simular o comportamento das propriedades estudadas dentro do domínio experimental de interesse (FURLANETTO *et al.*, 2006).

A observação da influência total de todos os componentes e a influência total das interações entre os componentes em cada formulação, foi analisado usando uma análise de variância (ANOVA) para as respostas ajustadas dos diferentes modelos para todos os fármacos (Tabela 20).

Tabela 20: Análise de variância para as respostas ajustadas dos diferentes modelos para todos os fármacos (ETA, PZA, DZP, ISO e RIFA)

Resposta: Tempo de retenção															
Fonte	ETA			PZA			DZP			ISO			RIFA		
	df	Seq SS	p	df	Seq SS	p	df	Seq SS	p	df	Seq SS	p	df	Seq SS	p
Regressão	5	17,1	0,0	5	19,8	0,0	5	22,5	0,0	2	25,9	0,0	3	102,0	0,0
Linear	2	15,5	0,0	2	17,7	0,0	2	19,9	0,0	2	25,9	0,0	2	98,2	0,4
Quadrático							1	0,7	0,0						
Cúbico completo	1	0,0	0,0	1	0,0	0,0							1	3,8	0,1
Quártico especial															
Quártico completo	2	1,7	0,0	2	2,1	0,0	2	2,0	0,0						
Erro residual	21	0,8		21	1,0		21	1,6		24	7,3		23	38,2	

Onde: df: graus de liberdade total; Seq SS: Soma dos quadrados sequencial; p: Valor de p.

A influência dos componentes em relação aos tempos de retenção de cada fármaco foi estimada a partir da soma dos quadrados de cada componente. A análise de regressão mostra que a mistura é determinada apenas por seus componentes lineares ou se existe a influência significativa da interação entre os componentes e suas quantidades nas formulações. Dos coeficientes obtidos para as variáveis, equações para cada fármaco foi gerada, conforme apresentado na Tabela 21. Os modelos matemáticos de melhor ajuste foram selecionados com base nas comparações de parâmetros estatísticos, incluindo a falta de ajuste (valor p), o coeficiente de determinação múltipla (R^2), o coeficiente de determinação múltipla ajustada (R^2 ajustado) e o coeficiente de

determinação de predição (R^2 previsto). Este último coeficiente representa a capacidade do modelo para prever os dados, e quanto maior seja o seu valor, maior a capacidade. Os modelos selecionados foram escolhidos considerando os coeficientes de correlação mais altos, bem como a avaliação para desvio não significativo (valor p por falta de ajuste).

Tabela 21: Modelo previsto para o tempo de retenção e resolução das fórmulas contendo diferentes concentrações de acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C).

Resposta: Tempo de retenção				
IFA	Modelo preditivo	R^2	R^2 aj.	R^2 pr.
ETA	$y=0,313593A+1,07369B-0,264052C-0,000141142AC(A-C)-0,0000114325AB(A-B)^2-0,00000593441BC(B-C)^2$	95,36	93,92	94,26
PZA	$y=0,365883A+1,23296B-0,311061C-0,000165996AC(A-C)-0,0000134172AB(A-B)^2-0,00000682109BC(B-C)^2$	95,08	93,53	93,91
DZP	$y=0,0681056A-0,785673B-0,00633151C+0,0484937AB-0,0000200255 AB(A-B)^2-0,00000249545 BC(B-C)^2$	93,53	91,53	91,99
ISO	$y=0,0757170A+0,163761B-0,0246830C$	77,95	73,92	76,11
RIFA	$y=-0,123775A+0,0690395B+0,254124C+0,000168413AC(A-C)$	72,74	66,00	69,19

Onde: R^2 aj.: R^2 ajustado; R^2 pr.: R^2 previsto.

R^2 deve estar perto de um, o que significaria que o modelo é mais preciso, porém, considerou-se como parâmetro de escolha o modelo que apresentasse um fator de correlação próximo e maior a 0,80, por ser um ajuste de uma regressão múltipla. Dentro dos modelos, considera-se nas equações que o “y” corresponde a variável de resposta (tempo de retenção de cada fármaco), A, B e C, correspondem à composição do sistema e os coeficientes são representados pelos parâmetros de cada equação, enquanto que a validade do modelo foi avaliada por meio da análise residual. A indicação de aceitabilidade dos pontos de teste também foi confirmada pela verificação do erro residual (FURLANETTO *et al.*, 2006). Esses resultados são apresentados na Tabela 20. Os gráficos de contorno são úteis para observar as tendências dentro do sistema assim como para fornecer uma escolha das formulações alternativas para um determinado valor de resposta (ANIK e SUKUMAR, 1981).

Todos os valores de p são menores a 0,05, conforme a Tabela 20, para todos os termos nos modelos matemáticos em cada fármaco, isto indicaria que esses termos mostram um efeito significativo alto em relação à resposta, no caso, tempo de retenção (YOLMEH, KHOMEIRI e AHMADI, 2017). A análise do projeto de mistura mostrou que os modelos de regressão foram significativamente ajustados ($p < 0,05$) para todos os fármacos estudados, conforme a Tabela 20. Com valores R^2 relativamente elevados, variando entre 0,7274 a 0,9536, o que indicava que as equações de regressão poderiam explicar adequadamente a relação entre os fatores dependentes e as variáveis de resposta observadas.

No que diz respeito à resposta: tempo de retenção de ETA, as áreas de isoresposta obtidas são relatadas na Figura 105. Neste caso, conforme as tabelas 20 e 21, se observa que o componente B apresenta um efeito sinérgico devido ao maior valor positivo dos coeficientes da equação do modelo preditivo e o componente que apresenta um efeito antagônico é o C, dado pelo valor negativo dos coeficientes da equação do modelo preditivo. Isto pode significar que o tempo de retenção do ETA aumenta usando altos percentagens de B e diminui usando altos percentagens de C. A interação mais importante é antagônica, -AC (A-C), e apresentou-se para dois componentes, A e C.

Figura 105: Gráfico de contorno de mistura para o efeito de diferentes combinações dos componentes: acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) sobre o tempo de retenção do ETA.

No que diz respeito à resposta: tempo de retenção de PZA, as áreas de iso-resposta obtidas são relatadas na Figura 106. Neste caso, conforme as tabelas 20 e 21, se observa um efeito sinérgico por parte do componente B e um efeito antagônico no componente C. A interação mais importante é antagônica, -AC (A-C), e se apresentou para dois componentes (A e C).

**Mixture Contour Plot of T_m de PZA
(component amounts)**

Figura 106: Gráfico de contorno de mistura para o efeito de diferentes combinações dos componentes: acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) sobre o tempo de retenção do PZA.

No que diz respeito à resposta: tempo de retenção de DZP, as áreas de iso-resposta obtidas são relatadas na Figura 107. Neste caso, conforme as tabelas 20 e 21, se observa que o componente B apresenta um efeito antagônico, enquanto que o componente que apresenta um efeito sinérgico é o A. A interação mais importante é sinérgica, AB, e apresentou-se para dois componentes (A e B).

Mixture Contour Plot of T_m de DZP
(component amounts)

Figura 107: Gráfico de contorno de mistura para o efeito de diferentes combinações dos componentes: acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) sobre o tempo de retenção do DZP.

No gráfico de traço de resposta de Cox em relação a melhor mistura encontrada com a ferramenta de otimizador de resposta, (37,7 % de A; 5,5 % de B; 54,5 % de C) para o tempo de retenção de ETA, conforme a Figura 108, a medida que a proporção de B na mistura aumenta (e os outros componentes da mistura diminuem), o tempo de retenção aumenta rapidamente. A medida que a proporção de B diminui em pouca proporção (e os outros componentes aumentam), o tempo de retenção diminui moderadamente, e, quando B diminui em proporção maior (e os outros componentes aumentam), o tempo de retenção aumenta rapidamente. A medida que a proporção de A na mistura aumenta (e os outros componentes da mistura diminuem), o tempo de retenção diminui rapidamente. A medida que a proporção de A diminui (e os outros componentes aumentam), o tempo de retenção diminui rapidamente. A medida que a proporção de C na mistura aumenta (e os outros componentes da mistura diminuem), o tempo de retenção diminui rapidamente. A medida que a proporção de C diminui em pouca proporção (e os outros componentes aumentam), o tempo de retenção aumenta moderadamente e quando C diminui em maior proporção (e os outros componentes aumentam), o tempo de retenção diminui.

A PZA e o DZP, Figuras 109 e 110, respectivamente, se comportaram de maneira semelhante à do ETA.

Figura 108: Gráfico de traço de resposta de Cox adaptado para o tempo de retenção de ETA versus as proporções de desvios dos componentes de acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) da melhor mistura encontrada com a ferramenta de otimizador de resposta (37,7 % de A; 5,5 % de B; 54,5 % de C) para A (linha azul), B (linha vermelha) e C (linha verde).

Figura 109: Gráfico de traço de resposta de Cox adaptado para o tempo de retenção de PZA versus as proporções de desvios dos componentes de acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) da melhor mistura encontrada com a ferramenta de otimizador de resposta (37,7 % de A; 5,5 % de B; 54,5 % de C) para A (linha azul), B (linha vermelha) e C (linha verde).

Figura 110: Gráfico de traço de resposta de Cox adaptado para o tempo de retenção de DZP versus as proporções de desvios dos componentes de acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) da melhor mistura encontrada com a ferramenta de otimizador de resposta (37,7 % de A; 5,5 % de B; 54,5 % de C) para A (linha azul), B (linha vermelha) e C (linha verde).

No que diz respeito à resposta: tempo de retenção de ISO, as áreas de isoresposta obtidas são relatadas na Figura 111. Neste caso, conforme as tabelas 20 e 21, é importante ressaltar o efeito sinérgico do componente B e o efeito antagônico do componente C.

**Mixture Contour Plot of Tm de ISO
(component amounts)**

Figura 111: Gráfico de contorno de mistura para o efeito de diferentes combinações dos componentes: acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) sobre o tempo de retenção da ISO.

No gráfico de traço de resposta de Cox em relação a melhor mistura encontrada com a ferramenta de otimizador de resposta, (37,7 % de A; 5,5 % de B; 54,5 % de C) para o tempo de retenção de ISO, conforme a Figura 112, à medida que a proporção de B na mistura aumenta (e os outros componentes da mistura diminuem), o tempo de retenção aumenta rapidamente. A medida que a proporção de B diminui numa pouca proporção (e os outros componentes aumentam), o tempo de retenção aumenta rapidamente. A medida que a proporção de A na mistura aumenta (e os outros componentes da mistura diminuem), o tempo de retenção aumenta rapidamente. A medida que a proporção de A diminui (e os outros componentes aumentam), o tempo de retenção diminui rapidamente. A medida que a proporção de C na mistura aumenta (e os outros componentes da mistura diminuem), o tempo de retenção diminui rapidamente. A medida que a proporção de C diminui (e os outros componentes aumentam), o tempo de retenção aumenta rapidamente.

Figura 112: Gráfico de traço de resposta de Cox adaptado para o tempo de retenção de ISO versus as proporções de desvios dos componentes de acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) da melhor mistura encontrada com a ferramenta de otimizador de resposta (37,7 % de A; 5,5 % de B; 54,5 % de C) para A (linha azul), B (linha vermelha) e C (linha verde).

No que diz respeito à resposta: tempo de retenção de RIFA, as áreas de isoresposta obtidas são relatadas na Figura 113. Neste caso, conforme as tabelas 20 e 21, se observa o efeito sinérgico do componente C, enquanto que

o componente que apresenta um efeito antagônico é o A. A interação AC (A-C) é sinérgica, e se apresentou para dois componentes (A e C).

Figura 113: Gráfico de contorno de mistura para o efeito de diferentes combinações dos componentes: acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) sobre o tempo de retenção da RIFA.

No gráfico de traço de resposta de Cox em relação a melhor mistura encontrada com a ferramenta de otimizador de resposta, (37,7 % de A; 5,5 % de B; 54,5 % de C) para o tempo de retenção de RIFA, conforme a Figura 114, à medida que a proporção de A na mistura aumenta (e os outros componentes da mistura diminuem), o tempo de retenção aumenta rapidamente. À medida que a proporção de A diminui (e os outros componentes aumentam), o tempo de retenção diminui. À medida que a proporção de B na mistura aumenta (e os outros componentes da mistura diminuem), o tempo de retenção aumenta. À medida que a proporção de A diminui (e os outros componentes aumentam), o tempo de retenção diminui. À medida que a proporção de C na mistura aumenta (e os outros componentes da mistura diminuem), o tempo de retenção diminui. À medida que a proporção de C diminui (e os outros componentes aumentam), o tempo de retenção aumenta rapidamente.

Figura 114: Gráfico de traço de resposta de Cox adaptado para o tempo de retenção de RIFA versus as proporções de desvios dos componentes de acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) da melhor mistura encontrada com a ferramenta de otimizador de resposta (37,7 % de A; 5,5 % de B; 54,5 % de C) para A (linha azul), B (linha vermelha) e C (linha verde).

Os valores para R^2 , R^2 ajustado e R^2 previsto revelaram os modelos mais adequados para os tempos de retenção para cada fármaco, sendo o modelo quártico completo para os tempos de retenção para os fármacos: ETA, PZA e DZP, o modelo linear para a ISO, e o modelo cúbico completo para a RIFA (Tabela 21). O uso dos modelos de forma preditiva para revelar a microemulsão ideal foi suportado pelas tramas de contorno (Figuras 105, 106, 107, 111, 113). A partir dos resultados acima, parece claramente que as condições necessárias para otimizar o tempo de retenção na determinação simultânea dos fármacos, não são as mesmas para todos os fármacos. Uma maneira simples de resolver esse problema foi usar a função de desejabilidade de Derringer (D) (GOTTI *et al.*, 2000; FURNALETTO *et al.*, 2001; ORLANDINI *et al.*, 2004; LEWIS, MATHIEU e PHAN-TAN-LUU, 1999). Esta função é uma medida de qualidade geral e fornece meios convenientes para comparar várias respostas e selecionar o melhor com as propriedades mais desejáveis. As respostas medidas são transformadas em uma escala de desejabilidade parcial (d) sem dimensões que

varia entre $d = 0$, para uma resposta completamente indesejável, e $d = 1$ para uma resposta totalmente desejável. Em seguida, a qualidade geral D é calculada por meio da média geométrica (Equação 11).

$$D = (d_1 \times d_1 \times d_1 \dots d_m)^{1/m}$$

Equação 11: Cálculo do valor da desejabilidade de Derringer.

Neste estudo, as funções de d e D foram calculadas por meio do *Software* Minitab 17, conforme a Figura 115, e isto fez possível a obtenção da melhor condição para o tempo de análise (para ser minimizada, evitando a sobreposição dos picos) e a resolução (para ser maximizada). Em particular, para o tempo de migração, foi definido um valor desejado de 1 minuto para o ETA, 2 minutos para a PZA, 3 minutos para o DZP, 4 minutos para a ISO e 5 minutos para a RIFA. Para a resolução, foi definido como valor mínimo de 1,8 e como valor desejado o valor máximo. Conforme a gráfica 115, os requisitos desejados foram cumpridos pela microemulsão que foi predita e confirmada experimentalmente, correspondente a 0,5 % (w/w) de acetato de etila, 1,2 % (w/w) de butan-1-ol, 0,6 % (w/w) de dodecilsulfato sódico, 5,5 % (v/v) de 2-propanol, 37,7 % (v/v) de acetona e 54,5 % (w/w) de 10 mmol L⁻¹ de tampão aquoso de tetraborato de sódio a pH 9,2.

Figura 115: Gráficos de otimização para o efeito de diferentes combinações dos componentes: acetona (A), 2-propanol (B) e 10 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio a pH 9 (C) sobre o tempo de retenção e resolução dos IFAs.

Exceto para o ETA, com esta condição foram obtidas boas resoluções com curto tempo de análise para a determinação simultânea dos cinco IFAs através da análise por MEEKC, pelo qual a abordagem do espaço de desenho proposto

foi empregada com sucesso e com base nos resultados da otimização multivariada, tornando-se evidente que a abordagem de vértices extremos é uma abordagem poderosa para caracterizar uma formulação com um número mínimo de experimentos. A nova fórmula foi utilizada para o desenvolvimento do método de validação através do CE. Foi obtida a separação dos fármacos em um tempo de análise inferior a 6 minutos (Figura 116).

Figura 116: Eletroferograma da análise de cloridrato de etambutol (E), pirazinamida (P), diazepam (padrão interno) (D), isoniazida (I) e rifampicina (R). Concentrações de $800,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de E; $190,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de P; $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de I; $240 \mu\text{g mL}^{-1}$ de R e $60,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de D. Condições: Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$ D.I.; injeção hidrodinâmica por pressão de $0,5 \text{ psi/5s}$; voltagem aplicada: $-30,0 \text{ kV}$ (corrente: $-25,0 \mu\text{A}$); temperatura: 15°C na coluna e 10°C no amostrador. Detecção UV em 207 nm . Eletrólito: $0,5 \%$ (w/w) de acetato de etila, $1,2 \%$ (w/w) de butan-1-ol, $0,6 \%$ (w/w) de dodecilsulfato sódico, $5,5 \%$ (v/v) de 2-propanol, $37,7 \%$ (v/v) de acetona e $54,5 \%$ (w/w) de 10 mmol L^{-1} de tampão aquoso de tetraborato de sódio a pH 9,2.

Sob estas condições, no método otimizado, esquematizado na Figura 117, as gotas da emulsão estão carregadas negativamente devido a seu revestimento com as moléculas do SDS aniônico. Quando é aplicada uma tensão, o fluxo eletrosmótico (EOF) gerado em pH alto (pH 9,1) flui na direção do detector (catodo), enquanto as gotas da microemulsão tendem a migrar na direção ao

ânodo. Contudo, o EOF é suficientemente forte para arrastar as gotas na direção do catodo (ALTRIA, CLARK, MAHUZIER,2000; DA SILVA,2007; WATARAI,1991). Os solutos solúveis em água (ETA, PZA e a ISO) residirão na fase aquosa e serão arrastados rapidamente na direção do detector pelo EOF. A apresentação do menor tempo de retenção do ETA em relação a PZA, poderia dever-se a que a pH 9,2 apresentam uma carga positiva e uma carga de 0, respectivamente para o ETA e PZA, favorecendo a migração em sentido ao detector. Com respeito ao menor tempo de retenção do DZP em relação a ISO, segundo a literatura, a solubilidade da ISO em solventes segue a regra empírica que "igual dissolve igual", portanto, a ISO como composto polar será mais solúvel em solventes polares. Assim, avaliando os componentes do eletrólito final, a ISO seria mais solúvel em solventes com maior índice de polaridade (P'), seguindo a seguinte ordem: acetona ($P' = 5,1$), acetato de etila ($P' = 4,3$), 2-propanol e butan-1-ol ($P' = 1,9$). Além disso, na literatura se descreve que o comportamento de solubilidade da ISO na acetona pode ser atribuído à possibilidade de formar um complexo molecular em solução, como um solvato. Outro ponto importante que pode justificar o comportamento da ISO seria que a solubilidade da ISO incrementa quando se incrementa a temperatura (HERYANTO, HASAN e CHAN ABDULLAH, 2008), neste estudo tanto o capilar e o amostrador se mantiveram a uma temperatura de 15°C e 10°C, respectivamente. Inversamente, os solutos insolúveis em água (RIFA e DZP) favorecerão a partição na gota de emulsão negativamente carregada sendo fortemente retido com um fator de capacidade alto. A partição dos solutos neutros é devida à interação cromatográfica somente e, portanto, os solutos hidrofóbicos têm tempos de retenção maior que os analitos solúveis em água. Como se esperou a RIFA, apresentou o maior tempo de migração, isto se deveria a sua hidrofobicidade apresentando um Log P de 2,95 e também a seu tamanho consideravelmente maior que os outros analitos.

Figura 117: Princípio de separação por MEEKC adaptado de MAHUZIER *et al.*, 2003 e DA SILVA, 2007.

5.10. Validação dos métodos analíticos para a determinação da eficiência de encapsulação dos Insumos Farmacêuticos Ativos dentro das nanoestruturas através de eletroforese capilar.

Na validação do método foi utilizado a cromatografia capilar eletrocinética em microemulsão (MEEKC), uma resolução dos picos por pares adjacentes dos IFAs (RIFA, ISO, PZA e ETA) com seu padrão interno (diazepam) foi conseguida (Figura 116).

Modo de separação de CE	Cromatografia capilar eletrocinética em microemulsão (MEEKC) com injeção pelo <i>outlet</i> .
Padrão interno	Diazepam.
Coluna capilar	Sílica fundida de 30,2 cm de comprimento total (20 cm até o detector), 50µm D.I.
Temperatura da coluna	15°C.
Temperatura do amostrador	10°C.
Injeção hidrodinâmica	5 segundos a 0,5 psi.
Voltagem	-30 kV (injeção pelo <i>outlet</i>).
Detecção	207 nm.
Eletrolito	0,5 % (w/w) de acetato de etila, 1,2 % (w/w) de butan-1-ol, 0,6 % (w/w) de dodecilsulfato sódico, 5,5 % (v/v) de 2-propanol, 37,7 % (v/v) de acetona e 54,5 % (w/w) de 10 mmolL ⁻¹ de tampão aquoso de tetraborato de sódio a pH 9,2.

Quadro 10: Condições eletroforeticas para a avaliação da eficiência de encapsulação de RIFA e ISO em nanoestruturas através de CE.

A. Linearidade.

As Figuras 118 e 119, apresentam as curvas analíticas, obtidas a 207 nm e os valores experimentais obtidos na construção da curva analítica são mostrados nas Tabelas 22 e 23, para a ISO e RIFA, respectivamente, se obtendo um coeficiente de correlação acima de 0,99. Segundo a ANVISA o coeficiente de correlação de linearidade acima de 0,99 é satisfatório (ANVISA, 2017).

Figura 118: Curva analítica da ISO na faixa de concentrações de 160,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 22: Resultados experimentais obtidos na determinação da curva analítica da ISO através do método de CE.

Concentração de leitura ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Relação das áreas* (A/A)**
160,0	2,79206979
180,0	3,07326212
200,0	3,41999888
220,0	3,81494642
240,0	4,07525458
Inclinação (b)	0,01641
Desvio padrão da inclinação	0,000468886
Intercepto (a)	0,1512
Desvio padrão do intercepto (Sa)	0,09791
Coeficiente de correlação	0,99593
Equação da recta	$Y = 0,01641 X + 0,1512$

Onde: *Média de três leituras.

** Relação das áreas dos picos (isoniazida/ diazepam).

Figura 119: Curva analítica da RIFA na faixa de concentrações de 192,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 288 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 23: Resultados experimentais obtidos na determinação da curva analítica da RIFA através do método de CE.

Concentração de leitura ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Relação das áreas* (A/A)**
192,0	1,98121827
216,0	2,15974983
240,0	2,39294894
264,0	2,62250213
288,0	2,81118006
Inclinação (b)	0,00884
Desvio padrão da inclinação	0,000233108
Intercepto (a)	0,27084
Desvio padrão do intercepto (Sa)	0,0565
Coeficiente de correlação	0,99723
Equação da recta	$Y = 0,00884X - 0,27084$

Onde: *Média de três leituras.

** Relação das áreas dos picos (rifampicina/diazepam).

B. Especificidade.

Nos eletroferogramas do placebo da nanoestrutura de PLGA e do eletrólito não se observam picos no tempo de retenção dos fármacos (3,1 e 5,7 minutos, para a ISO e RIFA, respectivamente), de forma que o método pode ser considerado específico para detectar os fármacos nas nanoestruturas (Figura 120).

Figura 120: (a) Eletroferograma das nanofibras; (b) eletroferograma das nanoesferas (formulação F03); (c) eletroferograma da ISO e a RIFA a uma concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $240 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente; (d) eletroferograma do placebo da nanoestrutura de PLGA e (e) eletroferograma do eletrólito. Condições: Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$ D.I.; injeção hidrodinâmica por pressão de $0,5 \text{ psi/5 s}$; injeção pelo *outlet*; voltagem aplicada: $-30,0 \text{ kV}$; temperatura: 15°C na coluna e 10°C no amostrador. Detecção UV em 207 nm . Eletrólito: $0,5 \%$ (w/w) de acetato de etila, $1,2 \%$ (w/w) de butan-1-ol, $0,6 \%$ (w/w) de dodecilsulfato sódico, $5,5 \%$ (v/v) de 2-propanol, $37,7 \%$ (v/v) de acetona e $54,5 \%$ (w/w) de 10 mmol L^{-1} de tampão aquoso de tetraborato de sódio a pH 9,2.

C. Limite de detecção e limite de quantificação.

A Tabela 24 apresenta os resultados para os limites de detecção e quantificação da RIFA e ISO.

Tabela 24: Resultados experimentais obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação da RIFA e ISO através de CE.

Parâmetro	ISO	RIFA
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	7,70	6,60
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	23,34	20,01

Onde: LOD: Limite de detecção e LOQ: Limite de quantificação

D. Precisão (repetibilidade).

A precisão foi determinada para avaliar a proximidade dos resultados obtidos numa série de medições de amostragem múltipla ao 100 %. Foram utilizadas amostras em replicata de seis a uma concentração de $200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $240,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ISO e RIFA, respectivamente. As tabelas 25 e 26, apresentam os resultados obtidos. O DPR nas medições foram menores que 5 %, portanto a precisão do método foi considerada satisfatória segundo os critérios de aceitação (ANVISA, 2017).

Tabela 25: Precisão do método através de CE para quantificação da RIFA e ISO em nanoesferas.

	Relação das áreas dos picos ISO/DZP	Relação das áreas dos picos RIFA/DZP
Média*	3,419	2,393
SD	0,044	0,033
%DPR	1,300	1,368

Onde: *Média de seis leituras da mesma concentração ($200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Tabela 26: Precisão do método através de CE para quantificação da RIFA e ISO em nanofibras.

	Relação das áreas dos picos ISO/ DZP	Relação das áreas dos picos RIFA/ DZP
Média*	3,388	2,385
SD	0,055	0,033
%DPR	1,638	1,404

Onde: *Média de seis leituras da mesma concentração (200,0 µg mL⁻¹)

Os testes para os fármacos, tanto em nanopartículas e nas nanofibras, apresentaram DPR igual a 1,30 %, 1,37 % e 1,64 %, 1,40 % para a RIFA e ISO em nanopartículas e em nanofibras, respectivamente (Tabelas 25 e 26). Esses resultados podem ser considerados adequados segundo a exigência da regulamentação vigente que define como valor máximo 2 % para a validação do método (ANVISA, 2017).

E. Exatidão.

A exatidão do método foi calculada considerando a diferença entre a média e o valor verdadeiro aceitado. Foram utilizadas as concentrações de 0,160 mg mL⁻¹ (80 %), 0,200 mg mL⁻¹ (100 %) e 0,240 mg mL⁻¹ (120 %) simuladas (solução do fármaco + nanoestruturas placebo liofilizadas) em triplicata, para cada concentração e para cada fármaco tanto em nanopartículas e em nanofibras. A exatidão foi calculada e os resultados estão apresentados nas Tabelas 27 e 28.

Tabela 27: Concentração teórica, concentração obtida e percentagem de recuperação do teste de exatidão do método de quantificação de RIFA e ISO nas nanopartículas vazias através de CE.

Concentração teórica (µg mL ⁻¹)	RIFA		ISO	
	Concentração obtida (µg mL ⁻¹)	Recuperação(%)	Concentração obtida (µg mL ⁻¹)	Recuperação (%)
160,00	Média*	99,93	Média*	99,58
	SD	1,99	SD	1,29
200,00	Média*	100,69	Média*	99,83
	SD	1,31	SD	1,13
240,00	Média*	100,35	Média*	100,34
	SD	1,11	SD	1,01

Onde: *Média de três leituras da mesma concentração.

Tabela 28: Concentração teórica, concentração obtida e percentagem de recuperação do teste de exatidão do método de quantificação de RIFA e ISO nas nanofibras vazias através de HPLC.

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RIFA		ISO	
	Concentração obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação(%)	Concentração obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)
160,00	Média*	98,84	Média*	101,77
	SD	1,12	SD	1,06
200,00	Média*	100,19	Média*	100,08
	SD	1,58	SD	1,97
240,00	Média*	100,07	Média*	100,26
	SD	1,06	SD	1,99

Onde: *Média de três leituras da mesma concentração.

Os resultados da exatidão apresentada nas tabelas para os dois IFAs, tanto em nanoesferas e em nanofibras, mostraram que a recuperação é próxima de 100 % e dentro da faixa estabelecida de recuperação (80-115 %) (ANVISA, 2017).

Os resultados dos parâmetros validados indicaram que o método de quantificação desenvolvido é capaz de proporcionar resultados próximos do valor real para a quantificação dos fármacos nas nanoestruturas.

5.11. Determinação da eficiência de incorporação dos Insumos Farmacêuticos Ativos nas nanoestruturas.

A. Eficiência de encapsulação através de cromatografia líquida de alta eficiência.

A quantificação dos fármacos RIFA e ISO, encapsulados nas nanoesferas foi realizada através das técnicas de HPLC e CE. A literatura (Figura 121) mostrou valores semelhantes de %EE aos obtidos na formulação com maior eficiência de encapsulação (F12: 86,5 % e 6,22 % para a RIFA e a ISO, respectivamente através de HPLC) para o fármaco de RIFA (Figura 122 e Tabela 29). Na literatura há relatos da determinação de eficiência de encapsulação das nanoesferas preparadas pela técnica de emulsão-evaporação do solvente:

(1) 69,4 % de %EE para a RIFA usando 2,5 % w/v de PVA como tensioativo e diclorometano como solvente para o polímero (AKANSHA, RANJANA e SHUBHINI, 2010);

(2) $87,5 \pm 7,8$ % de %EE para a RIFA usando 0,5 % w/v de PVA como tensioativo e diclorometano como solvente para o polímero (TERRY *et al.*, 2014);

(3) $59,0 \pm 20,8$ % de %EE para a RIFA usando 0,5 % w/v de PVA como tensioativo e acetona como solvente para o polímero (TERRY *et al.*, 2014);

(4) $57,47 \pm 21,8$ % de %EE para a RIFA usando 0,5 % w/v de PVA como tensioativo e acetato de etila como solvente para o polímero (TERRY *et al.*, 2014);

(5) $57,47 \pm 21,8$ % de %EE para a RIFA usando 0,5 % w/v de PVA como tensioativo e acetato de etila como solvente para o polímero (TERRY *et al.*, 2014);

(6) 35,90 % de %EE para a RIFA usando 1,2 % w/v de PVA (RG 502H) como tensioativo e acetato de etila como solvente para o polímero (CALLEJA *et al.*, 2003);

(7) 35,90 % de %EE para a RIFA usando 1,2 % w/v de PVA (RG 502H) como tensioativo e acetato de etila como solvente para o polímero (CALLEJA *et al.*, 2003);

(8) 37 a 40 % de %EE para a RIFA usando 1,0 % w/v de PVA como tensioativo e acetato de etila como solvente para o polímero (MARDIYANTO, 2015);

(9) 87 % de %EE para a ISO usando 1,0 % w/v de PVA como tensioativo e acetato de etila como solvente para o polímero (KADARE *et al.*, 2014);

(10) 67,34 % e 69 % de %EE para a RIFA e ISO, respectivamente, usando 1,0 % w/v de pluronic F-127 como tensioativo e acetato de etila como solvente para o polímero (BOOYSEN *et al.*, 2010).

Figura 121: Eficiência de encapsulação vs. média dos diâmetros das nanoesferas contendo RIFA e ISO encontradas na literatura.

Onde: (1): AKANSHA; RANJANA e SHUBHINI, 2010; (2) TERRY *et al.*, 2014; (3) CALLEJA *et al.*, 2003; (4) MARDIYANTO, 2015; (5) KADARE *et al.*, 2014; (6) BOOYSEN *et al.*, 2010.

Tabela 29: Eficiência de encapsulação das nanoesferas de PLGA através de HPLC.

N° de formulação	% Eficiência de encapsulação da RIFA	% Eficiência de encapsulação da ISO
F01	4,29	1,06
F02	11,1	2,16
F03	14,7	2,33
F04	4,32	1,88
F05	20,2	1,32
F06	7,22	1,24
F07	1,68	0,55
F08	5,32	1,69
F09	1,89	0,98
F10	1,87	1,25
F11	3,60	2,33
F12	86,5	6,22
F13	2,19	1,42
F14	1,53	1,07

Figura 122: Eficiência de encapsulação através de HPLC vs. média dos diâmetros através do DLS das nanoesferas de PLGA contendo RIFA e ISO (formulações: F01 até F12).

A quantificação dos fármacos RIFA e ISO, encapsulados nas nanofibras foi realizada através das técnicas de HPLC e CE. A literatura (Figura 123) mostrou valores maiores de %EE aos obtidos (5,90 % e 12,16 % para a RIFA e a ISO, respectivamente através de HPLC) (Figura 125 e Tabela 31). Na literatura há relatos da determinação de eficiência de encapsulação de nanofibras preparadas pela técnica de *electrospinning*:

(1) 98,77 % de %EE para a ISO usando 8,0 % w/v de PVA como polímero, água como solvente e vapores de glutaraldeído ao como agente crosslinking (SHAIKH et al.,2012);

(2) 95,07 % de %EE para a RIFA usando 10,0 % w/v de PVA como polímero, água como solvente e vapores de glutaraldeído como agente crosslinking (SHAIKH et al.,2012);

(3) 100,6 % de %EE para a RIFA usando PLGA 50:50 como polímero e THF/DMF (75:25, v/v) como solvente (GILCHRIST et al., 2013);

(4) 94,0 a 110,0 % de %EE para a RIFA usando 12,0 % w/v de PCL como polímero e cloroformo: metanol (3:1, v/v) (RUCKH et al., 2012).

Figura 123: Eficiência de encapsulação vs. média dos diâmetros das nanofibras contendo RIFA e ISO encontradas na literatura.

Onde (1) RUBINA SHAIKH *et al.*, 2012; (2) GILCHRIST *et al.*, 2013; (3) RUCKH *et al.*, 2012.

B. Eficiência de encapsulação através de eletroforese capilar.

Foram determinadas a eficiência de encapsulação da formulação F03, que apresentou as melhores características físico-químicas, das nanoesferas e das nanofibras a através da técnica de CE, respectivamente (Tabela 30 e 31).

Com respeito à menor % EE da ISO nas nanoesferas em relação a RIFA, poderia ser devido a sua solubilidade, segundo a literatura, a solubilidade da ISO em solventes segue a regra empírica que "igual dissolve igual", portanto, a ISO como composto polar será mais solúvel em solventes polares. Assim, avaliando os componentes da formulação, a ISO seria mais solúvel em solventes com maior índice de polaridade (P'), seguindo a seguinte ordem: a água da fase aquosa ($P' = 9,0$), dimetilsulfóxido ($P' = 7,2$) e acetato de etila ($P' = 3,9$) da fase orgânica, então acreditasse que a maior perda da massa inicial da ISO se perdeu durante a evaporação da fase aquosa. Também poderia ter influenciado os

monômeros hidrofóbicos dentro da estrutura do tensoativo não iônico empregado na formulação F03, Pluronic F-68, com um número médio de 30 monômeros em blocos de poli (óxido de propileno) (PPO) hidrófobos e 153 de poli (óxido de etileno) hidrofílico (PEO) (BOGDANOVA e DOLZHIKOVA, 2008).

Com respeito à maior % EE da ISO nas nanofibras em relação a RIFA, poderia ser devido a que a ISO é mais solúvel em solventes polares, no caso seria mais solúvel em dimetilformamida ($P' = 6,4$) que em diclorometano ($P' = 3,1$), que foram os solventes empregados durante o processo de *electrospinning*; a solubilidade poderia ter sido favorecida pela aplicação de uma alta voltagem de +10,41 kV, aumentando a temperatura do sistema, que pode justificar uma melhor solubilidade da ISO, segundo a literatura (HERYANTO, HASAN e CHAN ABDULLAH, 2008).

Houve uma similaridade entre os valores obtidos da eficiência de encapsulação dos fármacos nas nanoesferas e nas nanofibras (Figuras 124 e 125, respectivamente), empregando ambas técnicas de quantificação, por tanto, a CE é um método alternativo à HPLC.

Tabela 30: Eficiência de encapsulação das nanoesferas da formulação F03 empregando as técnicas de CE e HPLC.

Técnica analítica	% Eficiência de encapsulação da RIFA	% Eficiência de encapsulação da ISO
CE	14,22	2,26
CLAE	14,75	2,33

Figura 124: Eficiência de encapsulação das nanoesferas da formulação F03 empregando as técnicas de CE e HPLC.

Tabela 31: Eficiência de encapsulação das nanofibras empregando as técnicas de CE e HPLC.

Técnica analítica	% Eficiência de encapsulação da RIFA	% Eficiência de encapsulação da ISO
CE	6,36	12,30
HPLC	5,90	12,16

Figura 125: Eficiência de encapsulação das nanofibras empregando as técnicas de CE e HPLC.

C. Determinação da carga através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Devido às já citadas características físicoquímicas adequadas da formulação F03, foram produzidas nanoesferas contendo unicamente RIFA, e RIFA e ISO. Subsequentemente, estas formulações foram liofilizadas e, em seguida, foi determinado a carga dos fármacos através de HPLC.

A literatura mostrou valores semelhantes de %DL aos obtidos pela formulação com maior eficiência de encapsulação (F12 10,6 % de RIFA e ISO 0,14 %, em relação à massa final) (Tabelas 32 e 33). A determinação da carga dos fármacos das nanoesferas de PLGA preparadas pela técnica de emulsão-evaporação do solvente foi de 18,95 % $\pm$ 1,65 % de % DL para a RIFA, empregando PVA ao 2,5 % w/v como tensioativo e diclorometano como solvente para o polímero (AKANSHA, RANJANA e SHUBHINI, 2010); 0,089 % (0,89 mg mL⁻¹) de %DL para a ISO usando 1,0 % w/v de PVA e utilizando acetato de etila como solvente de polímero (KADARE *et al*, 2014.); 8,53 % de %DL para a RIFA usando Pluronic

F-127 ao 1,0 % w/v e 27,6 % de % DL para a ISO usando Pluronic F-127 ao 1,0 % w/v (BOOYSEN *et al.*, 2010).

A determinação da carga dos fármacos presentes nas nanoesferas foi determinada em relação à massa final (0,714 mg) e em relação à massa inicial (5,0 mg) (Tabelas 32 e 33). empregando a Equação 10

Finalmente, as formulações F03 e F12 das nanoesferas apresentaram maior eficiência de encapsulação, e destes, a F03 apresentou melhores características físico-químicas. Em consequência, ambas formulações foram liofilizadas, para a determinação de carga dos fármacos. Em relação a carga dos fármacos, a formulação F12 apresentou o maior valor.

Tabela 32: Calculo da massa real das nanoesferas liofilizadas.

Descrição	Peso (mg)	Porcentagem (%)
Nanoesferas + manitol	140	100
Manitol	120	85,7
Nanoesferas	20	14,3
Cálculo da massa real das nanoesferas liofilizadas para uma amostra de 5,0 mg		
Amostra de 5,0 mg de nanoesferas liofilizadas para análise através de HPLC	5	100
Massa real das nanoesferas	0,714	14,3

Tabela 33: Carga dos fármacos das nanoesferas de PLGA das formulações F03 e F12. em relação à massa final e à massa inicial através de HPLC. das nanoesferas

Nº de formulação	Em relação à massa final		Em relação à massa inicial	
	% DL RIFA	% DL ISO	% DL RIFA	% DL ISO
F03 (RIFA)	0,11	-	0,75	-
F03 (RIFA + ISO)	0,10	0,06	0,67	0,43
F12	1,51	0,02	10,58	0,14

Assim, a formulação F03 mostrou uma boa correlação nos seus parâmetros físico-químicos por meio de técnicas diferentes (DLS, SEM, TEM), distribuição uniforme e sem presença de aglomeração. Na formulação F12 e em

todas as formulações encontradas nas referências houve aglomeração (AKANSHA; RANJANA e SHUBHINI, 2010; TERRY *et al.*, 2014; CALLEJA *et al.*, 2003; MARDIYANTO, 2015; KADARE *et al.*, 2014; BOOYSEN *et al.*, 2010).

Nas referências mencionadas, só foram encapsulados os fármacos individualmente e ainda assim foi obtido tamanhos dos diâmetros bastante maiores, quanto comparado com a formulação F03 e até com a formulação F12. Apesar de que a eficiência de encapsulação descrita no presente trabalho é menor que os encontrados nas referências, isso pode ter sido causado principalmente pela natureza diferente dos fármacos, ISO que é hidrofílica e RIFA que é hidrofóbica, que não permitiu uma maior encapsulação de ambos fármacos. Contudo, se espera que este estudo sirva como precedente e guia para novos estudos que encapsulem ambos fármacos em simultâneo. No que concerne às nanofibras, a eficiência de encapsulação ainda continua sendo menor, porém, não há relatos de produção de nanofibras contendo RIFA e ISO em conjunto.

6. CONCLUSÃO

As micrografias obtidas por SEM e TEM revelaram a formação de fibras finas sólidas, cilíndricas, com orientação randomizada, da ordem de nanômetros e com presença de partícula da ordem de nanômetros até micrometros (205,2 a 2047,5 nm em nanofibras vazias e de 277,0 a 3114,0 nm em nanofibras contendo RIFA e ISO). A avaliação dos espectros FTIR gerada para a nanofibras de PLGA não carregadas com fármacos demonstraram que o procedimento de *electrospinning* teve um impacto mínimo sobre a atribuição de arranjos inter ou intramoleculares, e é sugestivo de que não ocorreram interações moleculares que alteraram a estrutura química dos IFAs no tempo de estudo. Pode se esperar pelas curvas obtidas por DSC que o PLGA confere resistência mecânica significativa, sendo útil como veículo de IFAs. As curvas obtidas por TGA mostra que a temperatura de decomposição térmica das nanofibras é menor que do que a do PLGA puro, devido a que as nanofibras estariam mais expostas à degradação por causa de seu tamanho sub-micrométrico e área superficial maior. Não se observou algum evento térmico em relação ao ponto de fusão dos fármacos nas curvas de TGA das nanofibras contendo RIFA e ISO, reforçando-se a ideia de que os IFAs se encontram retidos nas nanofibras num estado amorfo. A eficiência de encapsulação dos fármacos nas nanofibras foram realizadas através de duas técnicas analíticas, HPLC e CE, previamente validadas, obtivendo-se uma eficiência de encapsulação de 12,16 % para a ISO e 5,90 % para a RIFA através da técnica de HPLC e uma eficiência de encapsulação de 12,30 % para a ISO e 6,36 % para a RIFA através da técnica de CE.

Adicionalmente, no presente trabalho foram desenvolvidos nanoesferas de PLGA contendo RIFA e ISO; caracterizados físico quimicamente e foram determinadas as eficiências de encapsulação dos IFAs por CE e HPLC. Para o desenvolvimento das nanoesferas se utilizou a técnica de emulsão/evaporação do solvente.

As nanoesferas foram caracterizadas através das seguintes técnicas: DLS, determinação do potencial zeta, determinação do índice de polidispersão, determinação de pH, SEM, TEM, FTIR e DSC. A melhor formulação (F03)

apresentaram diâmetros de 144,4, 132,9 e 129,0 nm para as nanoesferas vazias, nanoesferas contendo só RIFA e nanoesferas contendo RIFA e ISO, respectivamente, através da técnica de DLS apresentaram uma distribuição uniforme dos tamanhos dos diâmetros das nanoesferas; valores referentes ao potencial zeta de -15,96, -11,74 e -0,96 mV, para as nanoesferas vazias, nanoesferas contendo só RIFA e nanoesferas contendo RIFA e ISO, respectivamente, demonstraram que as nanoesferas são estáveis em suspensão; valores referentes ao índice de polidispersão foram de 0,123, 0,095 e 0,105, para as nanoesferas vazias, nanoesferas contendo só RIFA e nanoesferas contendo RIFA e ISO, respectivamente, indicando uma variabilidade adequada do tamanho médio das partículas; os valores referentes ao pH de 6,65, 6,80 e 6,70 para as nanoesferas vazias, nanoesferas contendo só RIFA e nanoesferas contendo RIFA e ISO, respectivamente, mantiveram-se constante durante dias indicando uma adequada estabilidade pelo período avaliado; as micrografias obtidas por SEM revelaram a formação de esferas com tamanho e formas similares e sem formação de aglomerados da ordem de nanômetros, as análises do tamanho dos diâmetros das nanoesferas empregando o *Software ImageJ* indicaram um valor de 131,7 nm para as nanoesferas contendo RIFA e ISO, encontrando-se em correlação com o valor obtido através da técnica de DLS; nas micrografias obtidas por TEM pode-se apreciar as nanoesferas contendo os IFAs, tipo grânulos encapsulados; a avaliação dos espectros FTIR sugeriram que não ocorreram interações moleculares que poderiam ter alterado a estrutura química dos IFAs durante o tempo de estudo; a avaliação das curvas de DSC sugere que os IFAs nas nanoesferas alteraram os cristais nativos dos fármacos, em outras palavras, houve processo de encapsulamento empregando a técnica de emulsão- evaporação de solvente. A eficiência de encapsulação dos fármacos nas nanoesferas foram realizadas através de duas técnicas analíticas, HPLC e CE, previamente validadas, obtivendo-se uma eficiência de encapsulação para a melhor formulação de 2,33 % para a ISO e 14,75 % para a RIFA através da técnica de HPLC e uma eficiência de encapsulação de 2,26 % para a ISO e 14,22 % para a RIFA através da técnica de CE.

Para a otimização do método para a determinação simultânea dos fármacos antituberculose através do MEEKC, um modo de separação em CE,

empregou-se um delineamento de experimentos de mistura com uma abordagem de vértices extremos usando o *Software* estatístico Minitab 17. A mistura composta de 0,5 % (w/w) de acetato de etila, 1,2 % (w/w) de butan-1-ol, 0,6 % (w/w) de dodecilsulfato sódico, 5,5 % (v/v) de 2-propanol, 37,7 % (v/v) de acetona e 54,5 % (w/w) de 10 mmolL⁻¹ de tampão aquoso de tetraborato de sódio a pH 9,2 teve a vantagem de apresentar um menor tempo de retenção com uma adequada resolução entre os picos dos IFAs apresentando um tempo de análise inferior a 6 minutos. O método através de CE foi muito rápido e menos agressivo ao meio ambiente, pela pouca quantidade empregada de solventes orgânicos, por tanto, a CE é um método alternativo à HPLC.

7. REFERÊNCIAS

ABDO ARBEX, M.; DE CASTRO LIMA VARELLA, M.; RIBEIRO DE SIQUEIRA, H. FIÚZA DE MELLO, F.A. Drogas antituberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 1: Fármacos de primeira linha. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.36, n.5, p.626-640, 2010.

ADELI, E. Irbesartan-loaded electrospun nanofibers-based PVP K90 for the drug dissolution improvement: Fabrication, in vitro performance assessment, and in vivo evaluation. **Journal of Applied Polymer Science**, v.132, iss.27, p.1-10, 2015.

ADUBA, D.Jr. **Semi-interpenetrating nanofiber scaffolds for transbuccal drug delivery**. Richmond, 2012. 115 f. Thesis of Master of Science in Biomedical Engineering- Virginia Commonwealth University.

AKANSHA TRIPATHI; RANJANA GUPTA; SHUBHINI SARAF. PLGA Nanoparticles of Anti Tubercular Drug: Drug Loading and Release Studies of a Water In-Soluble Drug. **International Journal of PharmTech Research**, v.2, n.3, p.2116-2123, 2010.

AKHGARI, A.; ROTUBATI, M.H. Preparation and evaluation of electrospun nanofibers containing pectin and time-dependent polymers aimed for colonic drug delivery of celecoxib. **Nanomedicine Journal**, v.3, n.1, p.43-48, 2016.

ALTRIA, K.D. **Capillary electrophoresis Guidebook: Principles, operation and applications**, v.52, Towota: Human Press, 1996.

ALTRIA, K.D. Highly efficient and selective separations of a wide range of analytes obtained by an optimised microemulsion electrokinetic chromatography method. **Chromatographia**, v.49, n.7-8, p.457-464, 1999.

ALTRIA, K.D. Application of microemulsion electrokinetic chromatography to the analysis of a wide range of pharmaceuticals and excipients. **Journal of Chromatography A**, v.844, n. 1-2, p.371-386, 1999.

ALTRIA, K.D.; CLARK, B.J.; MAHUZIER, P.E. The effect of operating variables in microemulsion electrokinetic capillary chromatography. **Chromatographia**, v.52, n.11-12, p.758-768, 2000.

ALVES, R. **Estudo termoanalítico e de compatibilidade fármaco-excipiente fármaco-excipiente de rifampicina e alguns medicamentos utilizados na terapêutica da tuberculose**. São Paulo, 2007.90 f. Teses de mestrado-Universidade de São Paulo.

ANAMARIJA ROGINA. Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery. **Applied Surface Science**. v. 296, p. 221-230, 2014.

ANASTOS, N.; BARNETT, N.; LEWIS, S. Capillary electrophoresis for forensic drug analysis: a review. **Talanta**, v. 67, n. 2, p. 269–279, 2005.

ANIK, S.T.; SUKUMAR, L. Extreme vertices design in formulation development: solubility of butoconazole nitrate in a multicomponent system. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.70, p.897-900, 1981.

ANVISA, **Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017**. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2017.

ARIFA BEGUM, S.K.; BASAVA RAJU.,D.; RAMA RAO. Simultaneous estimation of rifampicin and isoniazid in combined dosage form by a simple UV spectrophotometric method. **Der Pharmacie Lettre**, v.5, n.3, p.419-426, 2013.

ARNEDO, A.; CAMPANERO, M.A.; ESPUELAS, S.; RENEDO, M.J.; IRACHEA, J.M. Determination of oligonucleotide ISIS 2922 in nanoparticulate delivery systems by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 871, n. 1-2, p. 311–320, 2000.

AZARBAYJANI, A.F.; VENUGOPAL, J.R.; RAMAKRISHNA, S.; LIM, P.F.C.; CHAN, Y.W.; CHAN, S.Y. Smart polymeric nanofibers for topical delivery of levothyroxine. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.13, n.3, p. 400-410, 2010.

BALAJI, A.; VELLAYAPPAN, M.V.; JOHN, A.A.J.; SUBRAMANIAN, A.P.; JAGANATHAN, S.K.; SUPRIYANTO; RAZAK, S.I.A. An insight on electrospun-nanofibers-inspired modern drug delivery system in the treatment of deadly cancers.**RSC Advances**, v.5, p.57984-58004, 2015.

BALL, C.; WOODROW, K.A. Electrospun solid dispersions of maraviroc for rapid intravaginal pre-exposure 2 prophylaxis of HIV. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.58, n.8, p.4855-4865, 2014.

BAPTISTA, A.C.; FERREIRA, I.; BORGES, J.P. Electrospun Fibers in Composite Materials for Medical Applications. **Journal of Composites and Biodegradable Polymers**, v.1, p.56-65, 2013.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S.C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v.28, p.325-347, 2010.

BLANCO, E.; SHEN, H.; FERRARI, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nature Biotechnology**, v.33, n.9, p.941-951, 2015.

BOGDANOVA, Y.G.; DOLZHIKOVA, V.D. Surface and bulk properties of aqueous binary mixtures of Pluronic F68 and low-molecular-weight cationic surfactants: 1. Surface tension and association in aqueous solutions. **Colloid Journal**, v.70, n.2, p.138-143, 2008.

BOOTZ, A.; VOGEL, V.; SCHUBERT, D.; KREUTER, J. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 2, p. 369–375, 2004.

BOOYSEN, L.; SEMETE-MAKOKOTLELA, B.; KALOMBO, L.; SWAI, H.; AFKOTZE. In vitro characterisation of PLGA nanoparticles encapsulating rifampicin and isoniazid- Towards IVIVC. In: PROCEEDINGS OF THE CSIR 3rd BIENNIAL CONFERENCE. **Science CSIR International Convention Centre**. Pretoria: South Africa, 2010.

BORBA, A.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A.; FAUSTO, R. Molecular structure, infrared spectra, and photochemistry of isoniazid under cryogenic conditions. **The journal of Physical Chemistry A**, v.113, n.32, p. 9220-9230, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. Tuberculose. **Guia de vigilância epidemiológica/ elaborado pelo Comitê Técnico- Científico de assessoramento à tuberculose e Comitê Assesor para co-infecção HIV-Tuberculose**. Brasília: **Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde**, 2002. Disponível em: www.saude.mt.gov.br/arquivo/2963. Acesso em: 22 ago. 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. **O controle da tuberculose no Brasil**. **Boletim epidemiológico**, v.44, n.2, 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/boletim-epidemiologico#numerosanteriores>. Acesso em: 22 ago. 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Tuberculose, população indígena e determinantes sociais**. **Boletim Epidemiológico**, v.45, n.18, 2014. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/agosto/13/BE-2014-45--18---Tuberculose.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Detectar, tratar e curar: desafios e estratégias brasileiras frente à tuberculose. Boletim Epidemiológico, v.46, n.9, 2015.** Disponível em:

<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/marco/27/2015-007---BE-Tuberculose---para-substitui----o-no-site.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2017.

BRERETON, R. G. **Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant**, John Wiley & Sons, Chichester 2003.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in câncer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, n.5, p.631-651, 2002.

BRITISH PHARMACOPOEIA 2009. London, 2008 (Infrared Reference Spectra, v.4).

CALLEJA AVELLANAL, I.; DIOS VIÉITEZ, M.C.; RUZ EXPÓSITO, N.; RENEDO OMAECHEVARRÍA, M.J.; BLANCO PRIETO, M.J. Desarrollo y caracterización de nanopartículas de rifampicina para su aplicación en el tratamiento de la tuberculosis. In: CONGRESO SEFIG Y JORNADAS TF,6, Alcalá, 2003. **Memorias del VI Congreso y 3^{as} Jornadas TF**. Alcalá: Universidad de Alcalá, 2003. p.57-59.

CAMILLIERI, P. **Capillary electrophoresis: theory and practice**, CRC Press, 1998, 563p.

CANBOLAT, M.F.; CELEBIOGLUA, A.; UYAR, T. Drug delivery system based on cyclodextrin-naproxen inclusion complex incorporated in electrospun polycaprolactone nanofibers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 115, p.15-31, 2014.

CHELLINI, P.R.; LAGES, E.B.; FRANCO, P.H.C.; NOGUEIRA, F.H.A.; CÉSAR, I.C.; PIANETTI, G.A. Development and Validation of an HPLC Method for Simultaneous Determination of Rifampicin, Isoniazid, Pyrazinamide, and

Ethambutol Hydrochloride in Pharmaceutical Formulations. **Journal of AOAC International**, v.98, n.5, p.1234- 1239, 2015.

CHEMICALIZE. Calculation. Enter a molecule name, SMILES, InChI, or CAS number (e.g.niacin). **Isoniazida**. Disponível em:
<http://www.chemicalize.org/structure/#!/mol=isoniazid&source=fp>. Acesso em: 22 ago.2017.

CHEMICALIZE. Calculation. Enter a molecule name, SMILES, InChI, or CAS number (e.g.niacin). **Rifampicina**. Disponível em:
<http://www.chemicalize.org/structure/#!/mol=rifampicine&source=fp>. Acesso em: 22 ago. 2017.

CLOGSTON, J.D.; PATRI, A.K. **Zeta Potential Measurement**. In: Characterization of nanoparticles intended for drug delivery. McNeil, S.E., ed. New York: Human Press. P. 63-70, 2011.

CONDÉ DE LIMA, P. **Desenvolvimento de um método de análise para a determinação simultânea do teor de rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol em comprimidos 4 em 1 utilizados no tratamento da tuberculose**. Rio de Janeiro, 2014.109 f. Tese de mestrado em Vigilância Sanitária-Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz.

CORNELL, J. A. **Experiments and mixtures. designs, models and the analysis of mixture data** (2nd Edn.), John Wiley & Sons, New York 1990

COSTA, R. G. F.; OLIVEIRA, J. E.; PAULA, G. F.; PICCIANI, P. H. S.; MEDEIROS, E. S.; RIBEIRO, C.; MATTOSO, L. H. C. Eletrofiação de polímeros em solução. parte I: fundamentação teórica. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 12-20, 2012.

CUNHA, B.B. **Propriedades estruturais e morfológicas de nanoestruturas de peptídeos**. Santo André, 2011. 67 f. Tese de mestrado em Nanociências- Universidade Federal do ABC.

CZAPLICKI, S. Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. In: MARTIN, D. (Ed.). **Column Chromatography**. [s.l.] InTech, 2013.

DA COSTA, F.F.P; ARAÚJO, E.S.; NASCIMENTO, M.L.F.; DE OLIVEIRA, H.P. Electrospun Fibers of Enteric Polymer for Controlled Drug Delivery. **International Journal of Polymer Science**, v.2015, p.1-8, 2015.

DA SILVA, C.R.C. **Obtenção e caracterização de fibras poliméricas e cerâmicas pela técnica de “Blow-spinning”**. Ilha Solteira, 2013. 131 f. Tese de doutorado em Ciências de Materiais-Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”.

DA SILVA. C.A. **Estudos fundamentais e aplicações envolvendo hormônios esteroides por meio de eletroforese capilar**. São Paulo, 2007. 171 f. Tese de doutorado em Química- Universidade de São Paulo.

DE ASSIS, D.N. **Biodistribuição do fluconazol marcado com ^{99m}tecnécio, livre e encapsulado em nanocápsulas, em um modelo experimental de infecção com Candida albicans**. Belo Horizonte, 2007. 92 f. Tese de mestrado em Ciências Farmacêuticas- Universidade Federal de Minas Gerais.

DE AZEVEDO, M.M.M. **Nanoesferas e liberação controlada de fármacos**. Disponível em: http://lqes.iqm.unicamp.br/images/vivencia_lqes_monografias_marcelo_nanoesferas.pdf. Acesso em: 01 fev.2016.

DE SOUZA, M.V.N.; VASCONCELOS, T.R.A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química nova**, v.28, n.4, p.678-682, 2005.

DHAL; SHARMA. Development and Validation of RPHPLC Method for simultaneous determination of pyridoxine hydrochloride, isoniazid, pyrazinamide and rifampicin in pharmaceutical formulation. **Chemia analityczna (Warsaw)**, v. 54, p. 1487- 1500, 2009.

DRUGBANK. Search. **Rifampicin**. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01045>. Acesso em: 22 ago. 2017.

ESPAÑOL MARIÑO, L.V. **Aplicação da eletroforese capilar e cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação da dexametasona e diclofenaco em nanosuspensão**. São Paulo, 2015. 130 f. Tese de mestrado – Universidade de São Paulo.

FARAJI, A.H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, n.8, p.2950-2962, 2009.

FARIA, A.F.; DE SOUZA, M.V.N.; BRUNS, R.E.; DE OLIVEIRA, M.A.L. Simultaneous determination of first-line anti-tuberculosis drugs by capillary zone electrophoresis using direct UV detection. **Talanta**, v.82, p.333-339, 2010.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5.ed. Brasília: Atheneu, 2010. vol.2, p.1257.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5.ed. Brasília: Atheneu, 2010. vol.2, p.1072.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. Drugs. Search FDA. Nanotechnology definition. **Considering Whether and FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology**. Disponível em:

<http://www.fda.gov/downloads/regulatoryinformation/guidances/ucm401695.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2017.

FÉLIX LANAO, R.P.; JONKER, A.M.; WOLKE, J.G.C.; JANSEN, J.A.; VAN HEST, J.C.M.; LEEUWENBURGH, S.C.G. Physicochemical Properties and Applications of Poly (lactic-co-glycolic acid) for Use in Bone Regeneration. **Tissue Engineering: Part B**, v.19, n.4, p.380-390, 2013.

FIND. **Foundation for innovative new diagnostics. Xperte MTB/ RIF- Automated nucleica cid amplification test (NAAT).** Disponível em: http://www.who.int/tb/laboratory/xpert_faqs.pdf. Acesso em: 22 ago. 2017

FORRELLAD, M.A.; KLEPP, L.I.; GIOFFRÉ, A.; SABIO Y GARCÍA, J.; MORBIDONI, H.R.; DE LA PAZ SANTANGELO, M.; CATALDI, A.A.; BIGI, F. Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. **Virulence**, v.4, n.1., p.3-66, 2013.

FURLANETTO, S.; ORLANDINI, S.; MARRAS, A.M.; MURA, P.; PINZAUTI, S. Mixture design in the optimization of a microemulsion system for the electrokinetic chromatographic determination of ketorolac and its impurities: Method development and validation. **Electrophoresis**, v.27, p.805-818, 2006.

FUYIN ZHENG; SHIGE WANG; MINGWU SHEN; MEIFANG ZHU; XIANGYANG SHI. Antitumor efficacy of doxorubicin-loaded electrospun nano-hydroxyapatite–poly (lactic-co-glycolic acid) composite nanofibers. **Polymer Chemistry**, v.4, p.933-941, 2013.

GAMISANS, F.; LACOUOLONCHE, F.; CHAUVET, A.; ESPINA, M.; GARCÍ, M.L.; EGEEA, M.A. Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v.179, n.1, p.37-48, 1999.

GARETH GRIFFITHS; BO NYSTRÖM; SURAJ SABLE; GOPAL K. KHULLER. Nanobead-based interventions for the treatment and prevention of tuberculosis. **Nature reviews Microbiology**, v.8, p.827-834, 2010.

GENCTURK, A.; SARAC, A.S. Determination of Donepezil HCl Release from Electrospun Fiber by Electrochemical Impedance Spectroscopy. **International Journal of Electrochemical Science**, v.11, p.111-125, 2016.

GEROLA, A.P.; ESTEVÃO, B.M.; CAETANO W.; HIOKA, N.; TESSARO, A.L. Estudos quimiométricos da pheo formulada em pluronics®: ação fotodinâmica Sobre Artemia salina. **Química Nova**, v.36, n.1, p. 97-101, 2013.

GERVASIO, A.P.G.; LAVORANTEI, A.F.; MORAESI, M.C.B.; GINÉI, M.F.; MIRANDA, C.E.S.; CARRILHO, E. Capillary electrophoresis coupled to plasma spectrometry: an efficient tool for speciation. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 65–74, 2003.

GIL, E.S. **Controle físico químico de qualidade de medicamentos e cosméticos**. 3ª ed. Pharmabooks, São Paulo, 2010.

GILCHRIST, S.E.; LANGE, D.; LETCHFORD, K.; BACH, H.; FAZLI, L.; BURT, H.M. Fusidic acid and rifampicin co-loaded PLGA nanofibers for the prevention of orthopedic implant associated infections. **Journal of Controlled Release**, v.170, p.64-73, 2013.

GOTTI, R.; FURLANETTO, S.; ANDRISANO, V.; CAVRINI, V.; PINZAUTI, S. Design experiments for capillary electrophoretic enantioresolution of salbutamol using dermatan sulfate. **Journal of Chromatography A**, v.875, p.411–422, 2000.

GRAEFF, L.E. **Desenvolvimento e validação de um método analítico quantitativo por eletroforese capilar para tuberculostáticos e primeira escolha**. Curitiba, 2007. 108 f. Tese de mestrado em Ciências Farmacêuticas- Universidade Federal do Paraná.

GLAS, B.D.; AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; CHEN, Y.J.; WISCH, M.H. Optimization of a Stability-Indicating HPLC Method for the Simultaneous Determination of Rifampicin, Isoniazid, and Pyrazinamide in a Fixed-Dose Combination using Artificial Neural Networks, **Journal of Chromatographic Science**, v.45, p. 38-44, 2007.

HALL, J.B.; DOBROVOLSKAIA, M.A.; PATRI, A.K.; MCNEIL, S.E. Characterization of nanoparticles for therapeutics. **Nanomedicine**, v.2, n.6, p.789-803, 2007.

HERYANTO, R.; HASAN M.; ABDULLAH, E.C. Solubility of Isoniazid in Various Organic Solvents from (301 to 313) K. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v.53, n.8, p. 1962-1964, 2008.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS. Guia para o diagnóstico, tratamento e prevenção da tuberculose. Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_tuberculose_2006.pdf.
Acesso em: 06/01/17.

HU, J.; LI, H.; WILLIAMS, G.R.; YANG, H.; TAO, L.; ZHU, L. Electrospun poly(N-isopropylacrylamide)/ethyl cellulose nanofibers as thermoresponsive drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n.3, p. 1104-112, 2016.

HUA ZHANG; SHAOFENG LOU; WILLIAMS, G.R.; BRANFORD-WHITEB, C.; HUALI NIE; JING QUAN; LI-MIN, Z. A systematic study of captopril-loaded polyester fiber mats prepared by Electrospinning. **International Journal of Pharmaceutics**, v.439, p.100-108, 2012.

HUAN WANG; CUIFANG CAI; CHUNXIA CHU; JING LIU; YING KONG; MENG ZHU; TIANHONG ZHANG. A simple and rapid HPLC/UV method for simultaneous quantification of four constituents in anti-tuberculosis 4-FDC tablets by pre-column derivatization. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.7, n.4, p.303-309, 2012.

HUANG, Z-M.; ZHANG, Y-Z.; KOTAKI, M.; RAMAKRISHNA, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. **Composites Sciences and Technology**, v.63, p.2223-2253, 2003.

HUI ZHU; SHAO-CHEN, G.; LAN-HU, H.; CHENG-CHENG, L.; BIN WANG; LEI FU; MING-TING, CH.; LIN ZHOU; JUN-YING, CH.; WEN YANG; WEN-JUAN, N.; YU LU. Relative bioavailability of rifampicin in four chinese fixed-dose combinations compared with rifampicin in free combinations. **Chinese Medical Journal**. v.128, n.4, iss.4, p.433-437, 2015.

ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human use: Guideline on Validation of Analytical Procedures Q2 (R1), Text and methodology, 2005.

INA JEONG; JONG-SUN, P.; YOUNG-JAE, CH.; HO IL, Y.; JUNGHAN SONG; CHOON-TAEK, L.; JAE-HO, L. Drug-induced hepatotoxicity of anti-tuberculosis drugs and their serum levels. **Journal of Korean Medical Science**, v.30, p.167-172, 2015.

IPCS INCHEM. IPCS International Programme on Chemical Safety. Chemical Name or Synonym. Rifampicin. Search. **Rifampicin (PIM 472)**. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/rifam.htm>. Acesso em: 22 ago. 2017.

ISSA, A.; MOHAMMAD, R.; MOTAHARE-SADAT, H. Anticancer Activity of Nanoparticles Based on PLGA and its Co-polymer: In-vitro Evaluation. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.12, n.4, p.623-634, 2013.

JAIN, J. P., KUMAR, N. Development of amphotericin B loaded polymersomes based on (PEG)3-PLA co-polymers: Factors affecting size and in vitro evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, p.456-465, 2010.

JING QUAN; CHENGYAO WU; WILLIAMS, G.R.; BRANFORD-WHITE, C.J.; HUALI NIE; LIMIN ZHU. Novel Electrospun Nanofibers Incorporating Polymeric Prodrugs of Ketoprofen: Preparation, Characterization, and In Vitro Sustained Release. **Journal of Applied Polymer Science**, v.130, p. 1570-1577, 2013.

JONGRUNGRUANGCHOK, S.; SONGSAK, T. Validation of HPLC methods for determination of isoniazid, rifampicin, pyrazinamide, and ethambutol in a fixed-dose combination antituberculosis, **Bulletin of Health, Science and Technology**, v.13, n.1, p. 17-28, 2015.

JUMI YUN; JI SUN IM; YOUNG-SEAK LEE; HYUNG-IL KIM. Electro-responsive transdermal drug delivery behavior of PVA/PAA/MWCNT nanofibers. **European Polymer Journal**, v.47, p.1893-1902, 2011.

JÚNIOR, A.A.D.S. **Micropartículas de ácido poli láctico-co-glicólico obtidas por Spray Drying para liberação prolongada intra-ocular de fármacos. Aleph**. Araraquara,2008. 172 f. Tese de doutorado em Ciências Farmacêuticas- Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

JUNYAN YAO; SHIJIE ZHANG; WUDAN LI; ZHI DU; YUJIE LI. In vitro drug controlled-release behavior of an electrospun modified poly (lactic acid) /bacitracin drug delivery system. **RSC Advances**, v.6, p.515-521, 2016.

KADARE, P.; MAPOSA, P.; DUBE, A.; MAPONGA, C.C. Encapsulation of Isoniazid in Chitosan-Gum Arabic and Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) PVA Particles to Provide a Sustained Release Formulation. **Journal of Pharmaceutics & Pharmacology**, sp. iss., p.1-6, 2014.

KATARIA, K.; GUPTA, A.; RATH, G.; MATHUR, R.B.; DHAKATE, S.R. In vivo wound healing performance of drug loaded electrospun composite nanofibers transdermal patch. **International Journal of Pharmaceutics**, v.469, p.102-110, 2014.

KAYHAN, S.; AKGÜNEŞ, A. Therapeutic monitoring of isoniazid, rifampicin, ethambutol and pyrazinamide serum levels in the treatment of active pulmonary tuberculosis and determinants of their serum concentrations. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.5, n.17, p.2035-2041, 2011.

KHOIRI, S.; B, MARTONO, S.; ROHMAN, a. Optimisation and validation of hplc method for simultaneous quantification of rifampicin, isoniazid, pyrazinamide, and ethambutol hydrochloride in anti-tuberculosis 4- FDC tablet, **Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)**, v.77, n.1, p. 171-176, 2015.

KUEMPEL, E.D.; GERACI, C.L.; SCHULTE, P.A. Risk assessment approaches and research needs for nanomaterials: an examination of data and information from current studies. In: SIMEONOVA, P.P.; OPOPOL, N.; LUSTER, M.I. (Eds.). Nanotechnology- Toxicological Issues and Environmental Safety and Environmental Safety. NATO Science for Peace and Security Series. [s.l.]. Springer Netherlands, 2007. p.119-145.

KULKARNI, A.R.; SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M. Urea-formaldehyde nanocapsules for the controlled release of diclofenac sodium. **Journal of Microencapsulation**, v.17, n.4, p.449-458, 2000.

KUO-SHENG LIU; CHENG-HUNG LEE; YI-CHUAN WANG; SHIH-JUNG LIU. Sustained release of vancomycin from novel biodegradable nanofiber-loaded vascular prosthetic grafts: in vitro and in vivo study. **International Journal of Nanomedicine**, v.10, p.885-891, 2015.

LANDERS, J.P. **Handbook of capillary electrophoresis**. Boca Raton: CRC Press, 1994, 649 p.

LAVOR, E.P.; DUARTE FREIRE, F.; ARAGÃO, C.F.; RAFFIN, F.N.; DE LIMA E MOURA, T.F.A. Application of thermal analysis to the study of anti-tuberculosis drug compatibility. Part 1. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.108, p.207-212, 2012.

LEE, Y.L.; PRICE, W.E.; SHEIL, M. Effect of organic solvents on the separation of benzoic acids by capillary electrophoresis. **Analyst**, v.120, p.2689-2694, 1995.

LEITE, E.A.; VITELA, J.M.C.; MOSQUEIRA, V.C.F.; SPANGLER-ANDRADE, M. Poly-caprolactone nanocapsules morphological features by atomic force microscopy. **Mycroscopy and Microanalysis**, v.11, n.3, p.48-51, 2005.

LEWIS, G.; MATHIEU, D.; PHAN-TAN-LUU, R. **Pharmaceutical experimental design**, Marcel Dekker, New York 1999.

LI, D.; XIA, Y. Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel. **Advanced Materials**, v.16, n. 14, p. 1151-1170, 2004.

LIMA, C.H.S.; BISPO, M.L.F.; DE SOUZA, M.V.N. Pirazinamida: um fármaco essencial no tratamento da tuberculose. **Revista Virtual Química**, v.3, n.3, p.159-180, 2011.

MA, Z.; LIENHARDT, C.; MCLLERON, H.; NUNN, A.J.; WANG, X. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. **Lancet**, v.5, p. 1-10, 2010.

MAHUZIER, P.E.; AURORA-PRADO, M.S.; CLARK, B.J.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; ALTRIA, K.D. An introduction to the theory and application of microemulsion electrokinetic chromatography. **LC-GC Europe**, p.1-7, 2003.

MAINARDES, R.M.; GREMIÃO, M.P.D.; EVANGELISTA, R.C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v,42, n.4, 2006.

MARCELLOS, L.F.; FARIA, A.F.; DE SOUZA, M.V.N.; ALMEIDA, M.R.; SABIN, G.P.; POPPI, R.J.; DE OLIVEIRA, M.A.L. Simultaneous analysis of first-line anti-tuberculosis drugs in tablets by UV spectrophotometry compared to capillary zone electrophoresis. **Central European Journal of Chemistry**, v.10, n.6, p.1808-1816, 2012.

MARDIYANTO. Preparation and Characterization of Submicron Particles of PLGA Incorporating Rifampin Using Emulsion Solvent Diffusion Method. In: ICB

PHARMA II, Indonesia, 2015. **Programme and abstract book**. Indonesia: Universitas Muhammadiyah Surakarta, 2015. p.1-44.

MENG, Z.X.; XUA, X.X.; ZHENG, W.; ZHOU, H.M.; LI, L.; ZHENG, Y.F.; LOU, X. Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system. **Colloids and SurfacesB: Biointerfaces**, v.84, p.97-102, 2011.

MEYER, V. R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2013.

DE MELO, N.F.S.; GRILLO, R.; GUILHERME, V.A.; DE ARAUJO, D.R.; DE PAULA, E.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Poly(lactide-co-glycolide) nanocapsules containing benzocaine: influence of the composition of the oily nucleus on physico-chemical properties and anesthetic activity. **Pharmaceutical Research**, v.28, n.8, p.1984-1994, 2011.

MODGILL, V.; GARG, T.; GOYAL, A.K.; RATH, G. Transmucosal Delivery of Linagliptin for the Treatment of Type- 2 Diabetes Mellitus by Ultra-Thin Nanofibers. **Current Drug Delivery**, v.12, p.323-332, 2015.

MORENO-EXEBIO, L.; GRANDE-ORTIZ, M. Validation of a liquid chromatography method for rifampicin determination in human plasma. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v.31, n.1, p.56-61, 2014.

MUKHERJEE, A.; VELPANDIAN, T.; SINGLA, M.; KANHIYA, K.; KABRA, S.K.; LODHA, R. Pharmacokinetics of isoniazid, rifampicin, pyrazinamide and ethambutol in Indian children. **BMC Infectious Diseases**, v.15, n.126, p.1-11, 2015.

MULLER, C. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DE LUCCA FREITAS, L.; PESCE DA SILVEIRA, N.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Spray-dried diclofenac-loaded poly (epsilon-caprolactone) nanocapsules and

nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. **Pharmazie**, v.56, n.11, p.864-867, 2001.

NERDY; DE LUX PUTRA, E.; HADI TJAHONO, D. Development and Validation of High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry Method for Determination of Rifampicin, Isoniazid and Pyrazinamide from Tablet Preparation. **International Journal of PharmTech Research**, v.6, n.5, p.1647-1664, 2014.

ORLANDINI, S.; FANALI, S.; FURLANETTO, S.; MARRAS, A. M.; PINZAUTI, S. Micellar electrokinetic chromatography for the simultaneous determination of ketorolac tromethamine and its impurities: Multivariate optimization and validation. **Journal of Chromatography A**, v.1032, n.1-2, p.253–263, 2004.

PATIL, J.S.; SARASIJA SURESH; SURESHBABU, A.R.; RAJESH, M.S. Development and Validation of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method for the Estimation of Rifampicin in Plasma. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.73, n.5, p.558-563, 2011.

PATIL, A.S.; PETHE, A.M. Quality by Design (bD): a new concept for development of quality pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance**, v.4, n.2, p.13-19, 2013.

PATTAMA TAEPAIBOON; URACHA RUNGSARDTHONG; PITT SUPAPHOL. Vitamin-loaded electrospun cellulose acetate nanofiber mats as transdermal and dermal therapeutic agents of vitamin A acid and vitamin E. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.67, p.387-397, 2007.

PINGHUI ZHOU; LI ZHOU; CAIHONG ZHU; QIANPING GUO; GUOQING PAN; HUILIN YANG; WENGUO CUI; BIN LI. Nanogel-electrospinning for controlling the release of water-soluble drugs. **Journal of Materials Chemistry B**, v.4, p. 2171-2178, 2016.

POHLMANN, A.R.; MEZZALIRA, L.C.; MEZZALIRA, G.; DA SILVEIRA, L.U.S.; DA SILVEIRA, N.P.; GUTERRES, S.S. Structural model of polymeric nanospheres containing indomethacin ethyl ester and in vivo antiedematogenic activity. **International Journal of Nanotechnology**, v.4, n.5, p.454- 467, 2007.

PONTAROLO, R.; GRAEF, L.E.; CAMPOS, F.R.; FONTANA, J.D. Simultaneous Determination of the Tuberculostatic Drugs Rifampicin, Isoniazid, and Pyrazinamide by CZE. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.29, n.8, p.1311-1318, 2010.

PORTAL DA SAÚDE. O Ministério. SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. **Boletim Epidemiológico - Volume 46 - nº 09 - 2015 - Tuberculose - 2015: Detectar, tratar e curar: desafios e estratégias brasileiras frente à tuberculose**. Disponível em:
<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/marco/25/Boletim-tuberculose-2015.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2017.

PORTAL DA SAÚDE. O Ministério. SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância de A a Z. **Tuberculose. Descrição da Doença**. Disponível em:
<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/741-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/tuberculose/11481-descricao-da-doenca>. Acesso em: 22 ago.2017.

PORTAL DA SAÚDE. O Ministério. SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância de A a Z. **Tuberculose. Situação epidemiológica–Dados**. Situação epidemiológica da tuberculose nos estados partes e associados do Mercosul 2009 a 2013. Disponível em:
<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/outubro/07/tuberculose-mercosul-6out15-web.pdf>. Acesso em: 22 ago.2017.

PRATCHAYA TIPDUANGTA; PETER BELTON; LÁSZLÓ FÁBIÁN; LI YING WANG; HUIRU TANG; MARK EDDLESTON; SHENG QI. Electrospun polymer blend nanofibers for tunable drug delivery: the role of transformative phase

separation on controlling the release rate. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n.1, p. 25-39, 2016.

RAFFIN, R.P.; OBACH, E.S.; MEZZALIRA, G.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Nanocápsulas poliméricas secas contendo indometacina: estudo de formulação e de tolerância gastrintestinal em ratos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.22, n.2, p.163-172, 2003.

RAO, D.A.; FORREST, M.L.; ALANI, A.W.; KWON, G.S.; ROBINSON, J.R. Biodegradable PLGA based nanoparticles for sustained regional lymphatic drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 4, p. 2018–2031, 2010.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S.; SARAF, S. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n.9, p. 1790-1798, 2006.

REBELLO LOURENÇO, F.; LACERDA FRANCISCO, F.; SPURI FERREIRA, M.R.; ANDREOLI PINTO, T.D.J.; LÖBENBERG, R.; BOU-CHACRA, N. Design space approach for preservative system optimization of an anti-aging eye fluid emulsion. **The Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.18, n.3, p.551-561, 2015.

REIS, A.C.B.P. **Encapsulação de fármacos peptídicos pelo método de emulsificação/gelificação interna**. Coimbra, 2007. 577 f. Tese de doutorado- Universidade de Coimbra.

REISE, M.; WYRWA, R.; MÜLLER, U.; ZYLINSKI, M.; VÖLPEL, A.; SCHNABELRAUCH, M.; BERGB, A.; JANDT, K.D.; WATTS, D.C.; SIGUSCH, B.W. Release of metronidazole from electrospun poly(l-lactide-co-d/l-lactide) fibers for local periodontitis treatment. **Dental materials**, v. 28, p.179-188, 2012.

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

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RUCKH, T.T.; OLDINSKI, R.A.; CARROLL, D.A.; MIKHOVA, K.; BRYERS, J.D.; POPAT, K.C. Antimicrobial effects of nanofiber poly (caprolactone) tissue scaffolds releasing rifampicin. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.23, p.1411-1420, 2012.

SAMARASINGHE, M.R.; KANWAR, K.R.; KANWAR, R.J. The Role of Nanomedicine in Cell Based Therapeutics in Cancer and Inflammation. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v. 1, n. 3, p. 133–144, 2012.

SANTOS, M. R.; TAVARES, M. F. M.; RUBIM, J. C. Development of a laser induced fluorescence detection scheme for capillary electrophoresis. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p.585– 589, 2000.

SCOTT, G. **Degradable Polymers: Principles and Applications**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2003.

SEIF, S.; FRANZEN, L.; WINDBERGS, M. Overcoming drug crystallization in electrospun fibers – Elucidating key parameters and developing strategies for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.478, n.1, p. 390-397, 2015.

SERKAN DEMIRCI; ASLI CELEBIOGLU; ZEYNEP AYTAC; TAMER UYAR. pH-responsive nanofibers with controlled drug release properties. **Polymer Chemistry**, v.5, p. 2050- 2056, 2014.

SES. Secretaria de Estado de Saúde de MS. Programas de Saúde. Tuberculose e Hanseníase. Vigilância Epidemiológica - Tuberculose e Hanseníase. Dados epidemiológicos e operacionais de Tuberculose. **Nota Técnica sobre as**

mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes-Versão 2. Disponível em:

[http://www1.saude.rs.gov.br/dados/1293729099101Nota %20T %E9cnica %20-%202 %AA %20vers %E3o %20 %28corrigida %20em %2022-10 %29.pdf](http://www1.saude.rs.gov.br/dados/1293729099101Nota%20T%E9cnica%20-%202%AA%20vers%E3o%20%28corrigida%20em%2022-10%29.pdf). Acesso em: 22 ago. 2017.

SHAHWAL, V.K. Preformulation studies and preperation of dithranol loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Biomedical Research**, v.3, n.7, p. 343-350, 2012.

SHAIKH, R.P; KUMAR, P.; CHOONARA, Y.E.; DU TOIT, L.C.; PILLAY, V. Crosslinked electrospun PVA nanofibrous membranes: elucidation of their physicochemical, physicomechanical and molecular disposition. **Biofabrication**, v.4, n.2, p.025002, 2012.

SHAN ZONG; XUE WANG; YONGPING YANG; WENBIN WU; HONGJUN LI ; YUE MA; WENHAI LIN;TINGTING SUN; YUBIN HUANG; ZHIGANG XIE ;YING YUE ; SHI LIU; XIABIN JING.The use of cisplatin-loaded mucoadhesive nanofibers for local chemotherapy of cervical cancers in mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.93, 127-135, 2015.

SHARMA, A.; GUPTA, A.; RATH, G.; GOYAL, A.; MATHUR, R.B.; DHAKATE, S.R. Electrospun composite nanofiber-based transmucosal patch for anti-diabetic drug delivery. **Journal of Materials Chemistry B**, v.1, p.3410-3418, 2013.

SILVA, J.A.F.; COLTRO, W.K.T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M.F.M. T. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 740–744, 2007.

SIRC, J.; KUBINOVA, S.; HOBZOVA, R.; STRANSKA, D.; KOZLIK, P.; BOSAKOVAZ.; MAREKOVA, D.; HOLAN, V.; SYKOVA, E.; MICHALEK, J. Controlled gentamicin release from multi-layered electrospun nanofibrous

structures of various thicknesses. **International Journal of Nanomedicine**, v.7, p.5315-5325, 2012.

SISMOTTO, M.; PASCHOAL, J. A. R.; REYES, F. G. R. Analytical and regulatory aspects for determination of macrolide residues in animal-derived foods by liquid chromatography associated with mass spectrometry. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 449–461, 2013.

SMITH, I. Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.3, p.463-496, 2003.

SOANE, D.; OFFORD, D.; WARE, W. Nanotechnology applications in textiles. In: SCHULTE J. (Ed.). Nanotechnology. [s.l.]. John Wiley & Sons, Ltd., 2005, p.149-161.

SOFO, A. **Desenvolvimento de método analítico por eletroforese capilar para quantificação de éster do ácido pirazinóico em nanosuspensão**. São Paulo, 2015. 106 f. Tese de mestrado—Universidade de São Paulo.

SOUTO, E.B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M.H. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados-Parte II. **Polímeros**, v.22, n.1, p.101-106, 2012.

STRICKLEY, R.G. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. **Pharmaceutical Research**, v.21, n.2, p.201-230, 2004.

TAVARES, M.F.M. Separation Mechanism in Capillary Electrophoresis. **Química nova**, v.20, n.5, p.493-511, 1997.

TAVARES, M.F.M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química nova**, v.19, n.2, p.173-181, 1996.

TERRY, A.B.; SALAAM, A.D.; NYAIRO, E.; THOMAS, V.; DEAN, D.R. PLGA Nanoparticles for the Sustained Release of Rifampicin. **Journal of Nanogenomics and Nanomedicine**, v.2, p.1-9, 2014.

The International Pharmacopoeia (2011) 4th Ed., 2nd Supplement, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

USP40-NF 35. United States Pharmacopeia-The National Formulary. 38th- 33th. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention. Rifampin, Isoniazid, Pyrazinamide, and Ethambutol Hydrochloride Tablets, 2015. p.3507.

USP40-NF 35. United States Pharmacopeia-The National Formulary. 38th- 33th. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention. General Chapter <1225>: Validation of Compendial Procedures, 2015. p.1451.

VAMSHI KRISHNA, T.; GIRISH PAI, K.; NAVEEN, D.; SREENIVASA REDDY, M. Formulation and evaluation of fixed dose combination products of rifampicin and isoniazid with improved rifampicin stability. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.5, suppl.3, p.431-433, 2013.

VEUTHEY, J.L. Capillary eletroforesis in pharmaceutical and biomedical analysis. **Analitical and bioanalytical chemistry**, v.381, n.1, p.93-95, 2005.

VRBATA, P.; BERKA, P.; STRÁNSKÁ, D.; DOLEZAL, P.; MUSILOVA, M.; CIZINSKA, L. Electrospun drug loaded membranes for sublingual administration of sumatriptan and naproxen. **International Journal of Pharmaceutics**, v.457, p.168-176, 2013.

WANNATONG, L.; SIRIVAT, A.; SUPAPHOL, P. Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: preliminary study on polystyrene. **Polymer International**, v.53, n.11, p.1851-1859, 2004.

WATARAI, H. Microemulsion capillary electrophoresis. **Chemistry Letters**, p. 391-394, 1991.

WEBBER, M.J.; MATSON, J.B.; STUPP S.I. Controlled Release of Dexamethasone from Peptide Nanofiber Gels to Modulate Inflammatory Response. **Biomaterials**, v.33, n.28, p.6823-6832, 2012.

WHO. World Health Organization. Programmes. Tuberculosis (TB). Highlighted documents. **Global tuberculosis report 2014. View the report. Download. Full report.** Disponível em:

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf?ua=
Acesso em: 22 ago.2017.

XIAOQIANG LI; KANJWA, M.A.; LIN LIN; CHRONAKIS, I.S. Electrospun polyvinyl-alcohol nanofibers as oral fast-dissolving delivery system of caffeine and riboflavin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.103, p.182-188, 2013.

XUE, J.; NIU, Y.; GONG, M.; SHI, R.; CHEN, D.; ZHANG, L.; LVOV, Y. Electrospun Microfiber Membranes Embedded with Drug-Loaded Clay Nanotubes for Sustained Antimicrobial Protection. **ACS Nano**, v.9, n.2, p.1600-1612, 2015.

YAN-FEN LEE; NANTHINI SRIDEWI; SURASH RAMANATHAN; KUMAR SUDESH. The influence of electrospinning parameters and drug loading on polyhydroxyalkanoate (PHA) nanofibers for drug delivery. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v.4, p.103-113, 2015.

YAZHOU WANG; WEILI QIAO; BOCHU WANG; YIQIONG ZHANG; PENGYU SHAO; TIEYING YIN. Electrospun composite nanofibers containing nanoparticles for the programmable release of dual drugs. **Polymer Journal**, v. 43, p. 478-483, 2011.

YATEEN SHAH; KHANNA, S; JINDA, K.C.; DIGHE, V.S. Determination of rifampicin and isoniazid in pharmaceutical formulations by HPLC. **Drug development and industrial pharmacy**, v.18, n.14, p. 1589-1596, 2015.

YOHE, S.T.; HERRERA, V.L.M.; COLSON, Y.L.; GRINSTAFF, M.W. 3D superhydrophobic electrospun meshes as reinforcement materials for sustained local drug delivery against colorectal cancer cells. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n.1, p. 1-26, 2012.

YOLMEH, M.; KHOMEIRI, M.; AHMADI, Z. Application of mixture design to introduce an optimum cell-free supernatant of multiple-strain mixture (MSM) for Lactobacillus against food-borne pathogens. **LWT-Food Science and Technology**, v.83, p. 298-304, 2017.

YU, D.; LI, X.; WANG, X.; YANG, J BLIGH, S.W.A.; WILLIAMS, G.R. Nanofibers Fabricated Using Triaxial Electrospinning as Zero Order Drug Delivery Systems. **Applied Materials & Interfaces**, v.7, p. 18891-18897, 2015.

YUEQI ZHU; CHANGMIN HU; BIN LI; HUILIN YANG; YINGSHENG CHENG; WENGUO CUI. A highly flexible paclitaxel-loaded poly(e-caprolactone) electrospun fibrous-membrane-covered stent for benign cardia stricture. **Acta Biomaterialia**, v.9, p.8328-8336, 2013.

ZHANG, H.; LOU, S.; WILLIAMS, G.R.; BRANFORD-WHITE, C.; NIE, H.; QUAN, J.; ZHU, L. A systematic study of captopril-loaded polyester fiber mats prepared by electrospinning. **International Journal of Pharmaceutics**, v.439, p. 100–108. 2012.

ZHENG, F.; WANG, S.; SHEN, M.; ZHU, M.; SHI, X. Antitumor efficacy of doxorubicin-loaded electrospun nano-hydroxyapatite–poly (lactic-co-glycolic acid) composite nanofibers. **Polymer Chemistry**, v.4, 933-941, 2013.

ZENG, Jing; KANG, YanHong; SU, GuiTian. Formation of drug-loaded electrospun twin fibers. **Chine Science Bulletin**, v. 57, p.1275-1279, 2012.

ZIMING YUAN; JINGWEN ZHAO; WANKUN ZHU; ZHILI YANG; BIN LI; HUILIN YANG; QI ZHENG; WENGUO CUI. Ibuprofen-loaded electrospun fibrous scaffold doped with sodium bicarbonate for responsively inhibiting inflammation and promoting muscle wound healing in vivo. **Journal of Biomaterials Science**, v.2, p.502-511, 2014.

8. ANEXOS

NUSP: 8873684

Nome: Lourdes Marcela Yataco Lazaro

Ficha do Aluno

Curso	Área	Nº Sequencial	Situação	Visualizar
→ Mestrado	Produção e Controle Farmacêuticos (9139)	1	Matrícula de Acompanhamento	

[Preparar para imprimir](#)

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 8873684/1 - Lourdes Marcela Yataco Lazaro

Email: myatacolazaro@gmail.com (favor indicar um email usp.br o mais rápido possível)
Data de Nascimento: 12/09/1992
Cédula de Identidade: RNE - V999923-N - SP
Local de Nascimento: Peru
Nacionalidade: Peruana
Graduação: Farmacia y Bioquímica - Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Peru - 2015

Curso: Mestrado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula: 09/03/2015
Início da Contagem de Prazo: 09/03/2015
Data Limite para o Depósito: 11/09/2017
Orientador Acadêmico: Prof(a). Dr(a). Humberto Gomes Ferraz - 09/03/2015 até 12/05/2015. Email: sferraz@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Maria Segunda Aurora Prado - 13/05/2015 até o presente. Email: msaprad06@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 21/03/2016
Português, Aprovado em 13/06/2016

Email: myatacolazaro@gmail.com (favor indicar um email usp.br o mais rápido possível)
Data de Nascimento: 12/09/1992
Cédula de Identidade: RNE - V999923-N - SP
Local de Nascimento: Peru
Nacionalidade: Peruana
Graduação: Farmacia y Bioquímica - Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Peru - 2015

Curso: Mestrado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula: 09/03/2015
Início da Contagem de Prazo: 09/03/2015
Data Limite para o Depósito: 11/09/2017
Orientador Acadêmico: Prof(a). Dr(a). Humberto Gomes Ferraz - 09/03/2015 até 12/05/2015. Email: sferraz@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Maria Segunda Aurora Prado - 13/05/2015 até o presente. Email: msaprad06@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 21/03/2016
Português, Aprovado em 13/06/2016

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 18/04/2016

Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 09/03/2015

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 10/08/2017 19:51:31

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 8873684/1 - Lourdes Marcela Yataco Lazaro

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5704-6/3	Análise Espectrométrica de Fármacos	09/03/2015	22/06/2015	150	10	100	A	N	Concluída
FBF5777-3/4	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	12/03/2015	24/06/2015	45	3	87	A	N	Concluída
FBF5816-1/1	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos (Controle de Contaminação Microbiológica: Carga Microbiológica, Biofilme, Desinfetantes e Saneates)	23/03/2015	29/03/2015	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5728-3/11	Aprimoramento Didático	14/04/2015	11/05/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBT5700-3/2	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	08/05/2015	09/07/2015	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBF5817-1/1	Tópicos Avançados em Fármacos e Medicamentos - Planejamento de Fármacos: As Bases para o Desenvolvimento de Candidatos a Antineoplásicos	11/05/2015	17/05/2015	30	2	100	A	N	Concluída
TNA5792-3/3	Compostos e Nanocompostos Poliméricos com Cargas Naturais e Nanotubos de Carbono (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	02/06/2015	24/08/2015	120	8	100	A	N	Concluída
FBF5819-1/1	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos (Tecnologia Analítica de Processo - PAT e Qualidade por Design - QbD)	22/06/2015	30/06/2015	30	2	100	A	N	Concluída
QBQ5744-6/1	Noções de Segurança em Laboratórios de Química e Bioquímica, Ética e Responsabilidade em Pesquisa (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	05/08/2015	11/08/2015	30	2	92	B	N	Concluída
FBF5805-2/2	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	10/03/2016	19/05/2016	90	6	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	39
Estágios:			
Total:	0	25	39

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 10/08/2017 19:51:31