UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Desenvolvimento de nanopartículas de
poli (*n*-butil-cianoacrilato) com zidovudina revestidas por
ácido hialurônico para veiculação em gel de uso transdérmico**

Marcelo Guimarães

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Co-orientadora:
Profa. Dra. Nádia Araci Bou Chacra

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Desenvolvimento de nanopartículas de
poli (*n*-butil-cianoacrilato) com zidovudina revestidas por
ácido hialurônico para veiculação em gel de uso transdérmico**

Marcelo Guimarães

Versão original

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Co-orientadora:
Profa. Dra. Nádia Araci Bou Chacra

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

<p>Guimarães, Marcelo</p> <p>G963d Desenvolvimento de nanopartículas de poli (<i>n</i>-butil-cianocrilato) com zidovudina revestidas por ácido hialurônico para veiculação em gel de uso transdérmico / Marcelo Guimarães. -- São Paulo, 2015. 149p.</p> <p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador: Consiglieri, Vladi Olga Co-orientador : Bou Chacra, Nádia Araci</p> <p>1. Medicamento : Tecnologia farmacêutica 2. Nanotecnologia I. T. II. Consiglieri, Vladi Olga, orientador. III. Bou Chacra, Nádia Araci, co-orientador.</p> <p>615.4 CDD</p>

Marcelo Guimarães

Desenvolvimento de nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) com
zidovudina revestidas por ácido hialurônico para veiculação em gel de uso
transdérmico

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Orientadora/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2015.

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem eu devo primeiramente tudo o que sou e conquistei. Obrigado pelo dom da vida e da docência!

À Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri, minha orientadora, pela amizade e orientação. Obrigado pela confiança, apoio, pelas valiosas idéias e pelo ombro amigo em situações difíceis.

À Profa. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra, pela co-orientação e valiosos conselhos e ensinamentos, pela amizade e por ter sido um exemplo de profissional.

À minha família, pelo amor eterno, carinho, confiança, dedicação e por sempre acreditarem em mim. Amo vocês!

Aos meus amigos Ana Cláudia, Vanessa, Fernanda, Marcelo, Nilva, Armando, Mônica, Sandra, Adriana, Andréa, José Luiz e Sandra pela amizade e pelo ombro amigo em todos os momentos.

Aos amigos da USP Guilherme, Michelle, Marina, Thalita, Thayane, Camila, Dani, Michelli, Juliana, Jéssica, Márcia, Talita, Paula, Eduardo, Marc e Rafael pela convivência, amizade, carinho e bons papos!

Aos amigos do Laboratório de Farmacotécnica Claudinéia, Edgar e Dora pela amizade, pelas várias ajudas e pelos momentos compartilhados.

Aos amigos do Mackenzie pela amizade, apoio, incentivo e compreensão. Vocês foram meus espelhos!

Aos professores da FMABC pela compreensão e apoio.

Aos Professores Maria Valéria, André, Telma, Cristina, Valentina, Eunice e Sílvia pelas conversas, amizade e incentivo.

Ao Prof. Humberto Gomes Ferraz, por disponibilizar o uso do equipamento DSC e pelo incentivo. Agradeço também à Amanda, Michele e Eremita pelo auxílio nas análises.

À Profa. Iolanda Midea Cuccovia, do Departamento de Bioquímica do IQ-USP pela disponibilização do equipamento Zetasizer[®].

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

À Coordenação, professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos

Às dificuldades e desafios, pois fazem parte da vida. E a vida é a arte de superá-los.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1. AIDS (SIDA) e HIV	7
2.1.1. Patologia	7
2.1.2. Epidemiologia	10
2.2. Fármacos antirretrovirais (ARV)	14
2.2.1. Zidovudina	18
2.3. Os medicamentos convencionais e suas limitações	20
2.4. Vias tópica e transdérmica na administração de medicamentos	24
2.4.1. Liberação e permeação cutânea	28
2.5. Carreadores nanoestruturados para a administração tópica e/ou transdérmica de fármacos	30
2.5.1. Vesículas lipídicas	31
2.5.2. Microemulsões ou nanoemulsões	34
2.5.3. Nanopartículas magnéticas	34
2.5.4. Nanopartículas poliméricas	36
2.6. Nanopartículas de poli (alquil- cianoacrilato) (PACA)	37
2.6.1. Propriedades e aplicações	37
2.6.2. Método de preparo	38
2.6.3. Incorporação de fármacos à nanopartículas de PACA	41
2.6.4. Ácido hialurônico como revestimento de sistemas nanoparticulados	41

2.7. Formas farmacêuticas semissólidas de administração tópica e/ou transdérmica	43
2.7.1. Géis	43
3. OBJETIVOS	46
3.1. Objetivo geral	47
3.2. Objetivos específicos	47
TRABALHO EXPERIMENTAL	48
CAPÍTULO I – Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanopartículas de zidovudina constituídas de poli (<i>n</i> -butil-cianoacrilato) revestidas por ácido hialurônico	49
1. INTRODUÇÃO	50
2. MATERIAL	52
2.1. Matérias-primas, solventes e reagentes	52
2.2. Equipamentos e dispositivos diversos	52
3. MÉTODOS	54
3.1. Síntese das nanopartículas	54
3.1.1. Nanopartículas de poli (<i>n</i> -butil-cianoacrilato) (nanoesferas PBCA)	54
3.1.2. Nanopartículas de poli (<i>n</i> -butil-cianoacrilato) contendo zidovudina (nanoesferas PBCA-AZT)	55
3.2. Revestimento com ácido hialurônico das nanopartículas de poli (<i>n</i> -butil-cianoacrilato) contendo zidovudina (nanoesferas PBCA-AZT-AH)	55
3.2.1. Planejamento estatístico	56
3.3. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e distribuição de tamanho de nanopartículas	58
3.4. Determinação do potencial zeta (ζ) das nanopartículas	59
3.5. Caracterização das nanopartículas por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	59

3.6. Caracterização das nanopartículas por Termogravimetria (TG)	60
3.7. Caracterização das nanopartículas por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5. CONCLUSÕES	90
 CAPÍTULO II – Desenvolvimento, validação e aplicação do método analítico por Espectrofotometria Derivada para quantificação da zidovudina associada às nanopartículas de poli (<i>n</i> -butil-cianoacrilato) revestidas com ácido hialurônico	92
1. INTRODUÇÃO	93
2. MATERIAL	97
2.1. Matérias-primas, solventes e reagentes	97
2.2. Equipamentos e utensílios	97
3. MÉTODOS	98
3.1. Condições analíticas	98
3.2. Preparo das soluções	98
3.2.1. Solução padrão de AZT	99
3.2.2. Soluções dos placebos	99
3.2.3. Soluções da amostra	100
3.3. Especificidade (pesquisa de interferentes)	102
3.4. Linearidade	102
3.5. Precisão e exatidão	102
3.6. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)	103
3.7. Determinação da eficácia de encapsulação do fármaco às nanopartículas de PBCA-AH	104
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
5. CONCLUSÕES	116

CAPÍTULO III – Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel contendo nanopartículas PBCA-AZT-AH	117
1. INTRODUÇÃO	118
2. MATERIAL	122
2.1. Matérias-primas, solventes e reagentes	122
2.2. Equipamentos e utensílios	122
3. MÉTODOS	123
3.1. Formulação estudada	123
3.1.1. Método de preparo	123
3.2. Estudo de estabilidade preliminar	124
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	126
4.1. Desenvolvimento da formulação	126
4.2. Estudo de estabilidade preliminar	128
5. CONCLUSÕES	134
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 135
 ANEXOS	 149

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem de microscopia eletrônica do vírus HIV atacando um linfócito.	8
Figura 2. Resumo do ciclo da replicação viral e etapas em que atuam os fármacos inibidores da protease e os inibidores da transcriptase reversa.	17
Figura 3. Representação da molécula de Zidovudina	18
Figura 4. Via transepidérmica de fármacos, dividida em rotas intercelular e transcelular.	28
Figura 5. Representação esquemática da estrutura de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.	36
Figura 6. Métodos para a preparação de nanopartículas de PACA. NS: nanoesferas, a-NC: nanocápsulas de núcleo aquoso, o-NC: nanocápsulas de núcleo oleoso.	39
Figura 7. Estrutura química do ácido hialurônico	42
Figura 8. Representação gráfica da matriz de ensaio para o revestimento das nanopartículas: concentração do ácido hialurônico (A), velocidade de agitação (B) e tempo de agitação (C)	58
Figura 9. Representação gráfica dos valores de diâmetro hidrodinâmico médio (DM) (nm) no revestimento das nanopartículas empregando AH.	66
Figura 10. Representação gráfica dos valores de índice de polidispersividade (IP) no revestimento das nanopartículas empregando AH.	67
Figura 11. Representação gráfica dos valores de potencial zeta (mV) no revestimento das nanopartículas empregando AH	69
Figura 12. Gráfico de série temporal para os valores de diâmetro hidrodinâmico médio (DM) (nm) no revestimento das nanopartículas empregando AH	70
Figura 13. Gráfico de série temporal para os valores de índice de polidispersão (IP) no revestimento das nanopartículas empregando AH	70
Figura 14. Gráfico de série temporal para os valores de potencial zeta (Pz) (mV) no revestimento das nanopartículas empregando AH.	71
Figura 15. Gráfico de resíduos no ensaio para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio (DM) das nanopartículas em função do tempo de agitação (min), concentração do AH% e velocidade de agitação (rpm).	76

- Figura 16.** Gráfico de resíduos no ensaio para avaliação do índice de polidispersividade (IP) das nanopartículas em função do tempo de agitação (min), concentração do AH% e velocidade de agitação (rpm). 76
- Figura 17.** Gráfico de resíduos no ensaio para avaliação do potencial zeta (Pz) das nanopartículas em função do tempo de agitação (min), concentração do AH% e velocidade de agitação (rpm). 77
- Figura 18.** Curvas de DSC de nanopartículas de PBCA, AH, nanopartículas revestidas (PBCA-AH) e mistura física (PBCA+AH) obtidas utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 2,0 mg, razão de aquecimento de 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/minuto 79
- Figura 19.** Curvas de TG de nanopartículas de PBCA, AH, nanopartículas revestidas (PBCA-AH) e mistura física (PBCA+AH) obtidas utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 2,0 mg, razão de aquecimento de 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL/minuto 81
- Figura 20.** Curvas de DSC de nanopartículas de PBCA, AZT, nanopartículas de AZT (PBCA-AZT) e mistura física (PBCA+AZT) obtidas utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 2,0 mg, razão de aquecimento de 10 °C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/minuto 82
- Figura 21.** Curvas de TG de nanopartículas de PBCA, AZT, nanopartículas de AZT (PBCA-AZT) e mistura física (PBCA+AZT) obtidas utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 2,0 mg, razão de aquecimento de 10 °C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL/minuto 84
- Figura 22.** Curvas de DSC de nanopartículas de PBCA, AH, AZT, nanopartículas de AZT revestidas (PBCA-AZT-AH) e mistura física (PBCA-AZT+AH) obtidas utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 2,0 mg, razão de aquecimento de 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/minuto 85
- Figura 23.** Curvas de TG de nanopartículas de PBCA, AZT, nanopartículas de AZT revestidas (PBCA-AZT-AH) e mistura física (PBCA-AZT+AH) obtidas utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 2,0 mg, razão de aquecimento de 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL/minuto 86
- Figura 24.** Espectros de infravermelho das amostras de AZT, nanopartículas de PBCA e nanopartículas de PBCA-AZT 87

Figura 25. Espectros de infravermelho das amostras de AH, nanopartículas de PBCA , nanopartículas de PBCA-AZT e nanopartículas de PBCA-AH	88
Figura 26. Espectros de infravermelho das amostras de AZT, AH, nanopartículas de PBCA-AZT e nanopartículas de PBCA-AZT-AH.	88
Figura 27. Espectro de ordem zero de: (a) PBCA em presença de AZT (20,0 µg/mL), (b) PBCA-AH em presença de AZT (20,0 µg/mL), (c) AZT (20,0 µg/mL), (d) PBCA, (e) PBCA-AH. Solvente: HCl 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v)	108
Figura 28. Espectros derivados de 1ª ordem de: (a) PBCA-AH, (b) PBCA, (c) PBCA-AH em presença de AZT (20,0 µg/mL), (d) AZT (20,0 µg/mL), (e) PBCA em presença de AZT (20,0 µg/mL). Solvente: HCl 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v)	109
Figura 29. Espectros sobrepostos de soluções de AZT nas concentrações de 1,25 a 40 µg/mL	112
Figura 30. Curva analítica obtida a partir da medida de absorbância em 266 nm. Solvente: HCl 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v).	113
Figura 31. – Representação gráfica da variação de valores de pH de amostras do gel base de Carbopol 940® (amostras de 1 a 4), submetidas a diferentes condições de temperatura e umidade.	130
Figura 32. – Representação gráfica da variação de valores de pH de amostras do gel contendo nanopartículas PBCA-AZT-AH (amostras de 5 a 8), submetidas a diferentes condições de temperatura e umidade.	130
Figura 33. – Representação gráfica da variação de viscosidade de amostras do gel base de Carbopol 940® (amostras de 1 a 4), submetidas a diferentes condições de temperatura e umidade.	132
Figura 34. – Representação gráfica da variação de viscosidade de amostras do gel contendo nanopartículas PBCA-AZT-AH (amostras de 5 a 8), submetidas a diferentes condições de temperatura e umidade.	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Planejamento fatorial 2^3 com ponto central adicional para o estudo de revestimento das nanopartículas	57
Tabela 2 – Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de PBCA*	64
Tabela 3 – Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de PBCA-AZT*	65
Tabela 4 – Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de PBCA-AZT-AH*	66
Tabela 5 – Teste para significância dos coeficientes de regressão e índices de ajuste do modelo no ensaio para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio em função da concentração do AH% (p/v), tempo de agitação (min) e velocidade de agitação (rpm).	72
Tabela 6 – Teste para significância dos coeficientes de regressão e índices de ajuste do modelo no ensaio para avaliação do índice de polidispersividade em função da concentração do AH% (p/v), tempo de agitação (min) e velocidade de agitação (rpm).	73
Tabela 7 – Teste para significância dos coeficientes de regressão e índices de ajuste do modelo no ensaio para avaliação do potencial zeta em função da concentração do AH% (p/v), tempo de agitação (min) e velocidade de agitação (rpm).	74
Tabela 8 – Ensaios intra e inter-dia para a determinação da precisão e exatidão do método de ED1 (290,0 nm) para o placebo 1	114
Tabela 9 – Ensaios intra e inter-dia para a determinação da precisão e exatidão do método de ED1 (290,0 nm) para o placebo 2	114
Tabela 10 – Resultados obtidos pela análise de determinação de pH para as amostras de gel base de Carbopol 940® (amostras de 1 a 4) e gel contendo nanopartículas PBCA-AZT-AH (amostras de 5 a 8) sob diferentes condições de temperatura e umidade relativa .	129
Tabela 11 – Resultados obtidos pela análise de viscosidade, em cP, para as amostras de gel base de Carbopol 940® (amostras de 1 a 4) e gel contendo nanopartículas PBCA-AZT-AH (amostras de 5 a 8) sob diferentes condições de temperatura e umidade relativa .	131

RESUMO

A zidovudina (AZT) ainda é o fármaco mais empregado no tratamento da AIDS, isoladamente ou em associação a outros antirretrovirais, porém é um fármaco administrado em altas doses e que apresenta efeitos adversos que comprometem a adesão do paciente ao tratamento. Assim, um novo sistema de liberação de zidovudina composto por nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) (PBCA) revestidas por ácido hialurônico (AH) foi desenvolvido e caracterizado com o objetivo de prolongar a liberação do fármaco e diminuir sua toxicidade. As nanopartículas têm sido amplamente estudadas como veículo para fármacos por permanecer na circulação por um tempo maior e, portanto, liberar o fármaco de forma prolongada. Para polimerização e, portanto, obtenção das nanopartículas, *n*-butil-cianoacrilato e Dextran® foram adicionados a HCl 0,1 M (pH 2,5), sob agitação a 800 rpm, por 1 h. O AZT foi adicionado e o processo foi neutralizado com adição de NaOH 0,1M após mais 3 h de agitação. Após filtração as partículas foram revestidas pela adição de uma dispersão aquosa de ácido hialurônico (AH) a baixa rotação. O diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas não revestidas foi de 152,3 nm, com um índice de polidispersividade médio igual a 0,055. O potencial zeta médio dessas partículas foi -0,678 mV. O diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas revestidas com AH obtido foi de 196,9 nm, com um índice de polidispersividade médio igual a 0,440. O potencial zeta médio dessas partículas foi de -25,6 mV. Os valores resultantes dessas análises são indicativos da estabilidade das nanopartículas obtidas e da boa reatividade dos monômeros dos cianoacrilatos. Ainda, pelos resultados é possível confirmar a ocorrência do revestimento. Assim, a eficiência do processo de revestimento das nanopartículas pode ser comprovada por meio dos resultados das análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e pelos resultados das análises de espectroscopia de absorção na região do infravermelho. Para quantificar o fármaco associado às nanopartículas, um método empregando espectrofotometria derivada (ED¹) no UV aplicando a técnica do ponto de anulação foi desenvolvido e validado. Tal método possibilitou a eliminação da interferência dos excipientes, o que permitiu a quantificação do AZT na suspensão de nanopartículas com precisão e exatidão adequadas. A porcentagem de fármaco associado às nanoestruturas obtidas pelo método foi de 64%, considerado satisfatório. As nanopartículas foram incorporadas a uma formulação base de gel de Carbopol® 940 que, apresentou estabilidade após ser submetida a diferentes condições de armazenamento, com incidência de luz e variação da temperatura.

Palavras-chave: zidovudina; nanopartículas poliméricas; liberação controlada; espectrofotometria derivada, análise térmica.

ABSTRACT

Zidovudine (AZT) is still the most widely used drug in the treatment of AIDS, alone or in combination with other antiretroviral drugs, however it is indicated in high doses and has adverse effects that compromise patient compliance to treatment. Thus, a new zidovudine delivery system made of poly (n-butyl-cyanoacrylate) nanoparticles coated with hyaluronic acid (HA) was developed and characterized in order to extend the drug release and reduce its toxicity. The nanoparticles have been widely studied as drug carriers once they remain in circulation for a longer period and, consequently, release the drug gradually. For the polymerization, and, therefore synthesis of nanoparticles, *n*-butyl-cyanoacrylate and Dextran® were added to 0.1 M HCl (pH 2.5) and stirred at 800 rpm for 1 hour. AZT was added and the reaction was neutralized by the addition of 0.1 M NaOH after 3 more hours of agitation. After filtration the particles were coated by addition of an aqueous dispersion of hyaluronic acid (HA) at low revs. The mean hydrodynamic diameter of non-coated nanoparticles was 152.3 nm with an average polydispersity index of 0.055. The average zeta potential of these particles was -0.678 mV. The average hydrodynamic diameter of the coated nanoparticles was 196.9 nm, presenting an average polydispersity index of 0.440. The average zeta potential of these particles was -25.6 mV. The resulting values of these tests are indicative not only of the stability of the obtained nanoparticles but also the good reactivity of the monomers of cyanoacrylates. Moreover, the results can confirm the occurrence of coating. Thus, the efficiency of the coating process of the nanoparticles can be demonstrated by the results of the analysis of differential scanning calorimetry (DSC) and the results of the absorption spectroscopy in the infrared region. In order to quantify the drug associated with the nanoparticles, a method employing derivative spectrophotometry (ED¹) UV applying the zero-crossing technique was developed and validated. This method allowed the elimination of interference of excipients, allowing the quantification of AZT nanoparticles in suspension with adequate accuracy and precision. The percentage of the drug associated with the obtained nanostructures by the method was 64%. The nanoparticles were incorporated into a Carbopol® 940 gel formulation, which was stable after being subjected to different storage conditions, with incidence of light and temperature variation.

Keywords: zidovudine; polymeric nanoparticles; controlled release; derivative spectrophotometry; thermal analysis.

1.INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Apesar do grande número de fármacos disponíveis atualmente no mercado para serem empregados na fabricação de medicamentos, a qualidade biofarmacêutica dos produtos tem sido aspecto limitante para sua eficácia terapêutica. Certos produtos contendo fármacos de baixa biodisponibilidade ou pouco solúveis estão no mercado há muito tempo, porém, muitas vezes, o resultado terapêutico obtido é insatisfatório (ALLEN, *et al.*, 2007; SALTÃO, VEIGA, 2001).

Com o intuito de melhorar as propriedades biofarmacêuticas e facilitar a permeabilidade desses fármacos em barreiras biológicas, sistemas inovadores de liberação vêm sendo desenvolvidos para minimizar esses inconvenientes, destacando-se os carreadores nanoestruturados (BAROLI, 2010; DEVALAPALLY *et al.*, 2007; STORPIRTIS, *et al.*, 2009).

A utilização de sistemas nanométricos para a administração tópica e transdérmica tem se mostrado adequada, uma vez que esses sistemas modificam a farmacocinética e facilitam a absorção cutânea da substância ativa. Os sistemas nanoparticulados atuam como carreadores de fármacos, modificando e controlando o perfil de liberação e permeação. Sendo assim, a liberação imediata permite melhorar a penetração do fármaco e a liberação sustentada mantém a ação terapêutica por período prolongado. Em função do tamanho reduzido das partículas, é possível promover uma aplicação confortável na pele, assim como aumentar a estabilidade de fármacos lábeis frente ao sistema gastro-intestinal. Dentre os sistemas nanométricos para a administração tópica e transdérmica, podem ser citadas as nanopartículas poliméricas (ALLEN *et al.*, 2007; BAROLI, 2010; CORRÊA, 1997;

DEVALAPALLY *et al.*, 2007; FLYNN, 1990; FLYNN, 1993), as vesículas lipídicas (BAROLI, 2010; CHORILLI, *et al.*, 2004), as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) (BAROLI, 2010; MARCATO, 2009; NEMEN, LEMOS-SENNA, 2011), os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) (BAROLI, 2010; DORA, *et al.*, 2012), as nanoemulsões (OLIVEIRA, *et al.*, 2004), as nanopartículas magnéticas, entre outros (SOUZA, MOHALLEN, 2001).

Dentre as nanopartículas poliméricas, especial atenção é dada às nanopartículas de poli (alquil-cianoacrilato) (PACA), pois esses sistemas vêm sendo intensamente empregados como ferramenta para a liberação controlada e/ou direcionada de inúmeros fármacos, tais como antirretrovirais, antineoplásicos, antibióticos, neuropeptídeos, entre outros (BEHAN, N., *et al.*, 2000; VAUTHIER, *et al.*, 2003; WILSON, *et al.*, 2008). Quando comparados com outros sistemas nanoestruturados, esses sistemas de liberação de fármacos apresentam algumas vantagens, tais como o uso de monômeros biocompatíveis e biodegradáveis, facilidade de preparo, facilidade de transposição da escala laboratorial para a industrial (*scale-up*) (BEHAN *et al.*, 2000; SOPPIMATH *et al.*, 2000; TAVARES *et al.*, 2013; VAUTHIER *et al.*, 2003). Além disso, VAUTHIER e seus colaboradores (2003) demonstraram a potencialidade dessas estruturas em atravessar a barreira hematoencefálica.

Com o objetivo de aumentar a sua estabilidade, essas estruturas são revestidas. Dessa forma, quando são revestidas por polímeros hidrofílicos, essas nanopartículas têm a sua permanência aumentada na corrente sanguínea. Nesse caso, os sistemas nanoestruturados têm a sua superfície externa modificada devido à criação de uma nuvem de cadeias que repelem as proteínas do plasma, ou seja, devido ao impedimento estérico. Como um dos

agentes de revestimento, emprega-se o ácido hialurônico, um polissacarídeo de estrutura linear carregado negativamente e que consiste em duas unidades alternadas de D- ácido glicurônico e N-acetil-D-glicosamina. Devido ao fato de ser biocompatível e apresentar as características citadas, o ácido hialurônico é considerado um bom agente de revestimento de nanopartículas, além de contribuir para a estabilidade desses nanocarreadores (HE, *et al.*, 2009; YENICE, *et al.*, 2008).

Nesses sistemas nanoestruturados, é possível a incorporação de várias substâncias ativas, dentre as quais, os antirretrovirais. A administração desses fármacos em formas farmacêuticas convencionais apresenta limitações, pois essas formas não permitem que fármacos atinjam o sistema nervoso central (SNC) em concentrações adequadas para destruir o HIV. Sendo assim, o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada para AZT permite o aumento na eficácia das terapias antirretrovirais, uma vez que é capaz de liberar o fármaco em níveis contínuos, evita o efeito de primeira-passagem e minimiza as flutuações das concentrações plasmáticas (MAINARDES *et al.*, 2009; NAYAK, *et al.*, 2009). De maneira especial, a incorporação do AZT em nanopartículas é justificada com o intuito de facilitar a chegada da zidovudina em reservatórios anatômicos do HIV, a saber: órgãos linfóides (particularmente o baço, linfonodos e GALT - *gut-associated lymphoid tissue*, ou seja, tecido linfóide ligado ao trato digestório) e o sistema nervoso central (NEVES *et al.*, 2010).

Frente ao exposto e considerando a inexistência de formulação similar na literatura, o objetivo deste trabalho é desenvolver e caracterizar nanopartículas de poli-butil-cianoacrilato contendo zidovudina revestidas com

ácido hialurônico, com o intuito de obter um novo carreador para a liberação modificada do fármaco, desenvolver uma formulação adequada, na forma de gel e avaliar a sua estabilidade físico-química.

2.REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *AIDS* (SIDA) e HIV

2.1.1. Patologia

A síndrome da imunodeficiência humana adquirida (SIDA) teve seu agente etiológico identificado entre 1983 e 1984 (PARSLOW, 2004), porém foi descrita pela primeira vez na década de 1980 (GRAHAME-SMITH, ARONSON, 2004).

A partir de então, pesquisas sobre a doença se intensificaram, buscando conhecer os mecanismos da infecção, a ação do vírus no organismo e as células alvo passíveis da invasão viral, assim como as vias pelas quais o vírus pode ser transmitido de homem para homem.

Além disso, tornou-se necessário identificar as principais populações que correm risco de contrair a infecção com o objetivo de alertá-las.

No ano de 1985, foram desenvolvidos *kits* para diagnosticar a presença do vírus no paciente, por meio da pesquisa pelo anticorpo anti-HIV, presente no sangue dos infectados (PARSLOW, 2004).

O HIV é um vírus que pertence à família dos retrovírus, o que significa que este é um vírus que apresenta o RNA como seu material genético e é capaz de induzir a produção de moléculas de DNA quando presente em célula hospedeira. Essa conversão de RNA em DNA ocorre graças à enzima transcriptase reversa, própria do vírus.

Dentro da classificação de retrovírus, o HIV pertence à família dos lentivírus, pois apresentam elevado período de latência ou de incubação (tempo entre o momento da infecção e o aparecimento de manifestações clínicas) e homologia genética (na sequência de nucleotídeos).

Figura 1 - Imagem de microscopia eletrônica do vírus HIV atacando um linfócito. (GOLDSMITH, 2014).

Dois tipos de HIV foram identificados: o HIV 1 e o HIV 2. Há ainda subdivisões dos dois grupos. O HIV 2 apresenta um maior período de latência (PARSLOW, 2004).

O vírus HIV, seja ele do tipo 1 ou 2, apresenta tropismo pela molécula de CD4 que está presente na superfície de células como os monócitos, macrófagos, linfócitos T auxiliares-indutores, células da micróglia, células de Langerhans, além de outras células que derivam da medula óssea, como no caso das células B imortalizadas (PARSLOW, 2004).

Clinicamente, observa-se em um portador do vírus HIV, uma perda da população de linfócitos T CD4, que pode ser decorrente de morte celular programada ou apoptose.

A queda de linfócitos T CD4, macrófagos e monócitos ocasiona supressão do sistema imune, particularmente com efeito na imunidade mediada por células. “Após a infecção inicial, a infecção permanece latente na maioria dos casos até o aparecimento de infecções oportunistas, algumas vezes dentro de muitos anos após a infecção inicial” (GRAHAME-SMITH, ARONSON, 2004).

Os sintomas mais comuns observados em adultos incluem febre, dor de garganta, perda de peso, fraqueza e perda de massa muscular, diarreia, náuseas e vômitos. Essas manifestações clínicas estão associadas à infecção primária pelo vírus HIV (WELLS, 2007).

De acordo com o Ministério da Saúde, a *AIDS* pode ser dividida em fases, sendo elas a infecção aguda, o período assintomático, a fase sintomática inicial e por fim, a fase da doença em si, a *AIDS*.

A fase de infecção aguda, em termos de sintomatologia, assemelha-se muito a uma gripe comum, onde o portador do vírus pode sentir mal estar e febre. Isto ocorre devido ao início do ataque viral ao sistema imunológico. Nesse período há a incubação do vírus HIV. Essa fase perdura por 3 a 6 semanas, sendo que a produção de anticorpos anti-HIV se inicia de 30 a 60 dias após o primeiro contato com o vírus.

A fase assintomática é “marcada pela forte interação entre as células de defesa e as constantes e rápidas mutações do vírus. Mas que não enfraquece o organismo o suficiente para permitir novas doenças, pois os vírus amadurecem e morrem de forma equilibrada” (BRASIL, 2013).

Com o ataque contínuo ao sistema imunológico, este vai ficando enfraquecido, ocasionando a queda do número de linfócitos T CD4. O valor de

referência para os linfócitos T CD4 em um indivíduo não infectado pelo vírus HIV e saudável compreende o intervalo de 800 a 1.200 unidades por mm³ de sangue. Esse valor, em indivíduos infectados, chega até valores baixíssimos como 200 unidades por mm³ de sangue.

A fase sintomática é consequência da diminuição da capacidade imune do organismo infectado. Tal diminuição propicia o surgimento de doenças oportunistas e, em indivíduos não tratados corretamente com o uso de medicamentos antirretrovirais, doenças como câncer, pneumonia, toxoplasmose e hepatites virais (WELLS, 2007; BRASIL, 2013).

2.1.2. Epidemiologia

O Boletim Epidemiológico HIV-DST publicado pelo Ministério da Saúde do Governo Federal traz informações atualizadas a cada ano sobre as doenças sexualmente transmissíveis (DST) e a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). O boletim apoia-se em dados obtidos pelos: Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), o Sistema de Controle de Exames Laboratoriais (SISCEL) e o Sistema de Controle Logístico de Medicamentos (SICLOM) (BRASIL, 2009; BRASIL, 2015).

Os primeiros casos de AIDS no Brasil foram identificados no início da década de 1980, sendo mais prevalente em homossexuais, usuários de drogas injetáveis e pacientes hemofílicos.

O perfil epidemiológico sofreu algumas alterações com o passar dos anos. A relação entre homossexuais e heterossexuais com SIDA em 1998 era

de 12 para 10, ou seja, para cada 12 casos de homossexuais com a doença, havia 10 heterossexuais portadores do vírus. E em 2010, a relação passou para 16 para cada 10.

De acordo com o boletim publicado no ano de 2014, há uma estimativa de 734.000 de pessoas vivendo com HIV/AIDS no Brasil. O número de casos na região Sudeste é o maior do país, chegando a 54,4% dos casos totais, porém, esta região é a única que apresentou queda na taxa de incidência nos últimos 10 anos (passou de 26,0 para 18,7 casos por 100 mil habitantes), no período considerado, entre 2004 e 2014.

A faixa etária onde há a maior incidência da doença é a de 25 a 39 anos de idade, em ambos os sexos; entre os homens, essa faixa etária corresponde a 54,0% e entre as mulheres 50,3% do total de casos desde 1980 a junho de 2014. A taxa de detecção entre os indivíduos com até nove anos de idade não apresenta diferença significativa segundo o sexo, enquanto que, nas demais faixas etárias, a taxa entre os homens é superior à das mulheres, sendo até 2,4 vezes maior, no último ano, para a faixa etária de 20 a 24 anos.

Entre os homens, observa-se um aumento estatisticamente significativo da taxa de detecção entre aqueles com 15 a 19 anos, 20 a 24 anos e 60 anos ou mais nos últimos dez anos; destaca-se o aumento da taxa em jovens de 15 a 24 anos, observando-se, entre aqueles com 15 a 19 anos, um aumento de 120,0% e entre os de 20 a 24, de 75,9%, no período de 2004 a 2013. Entre aqueles com 35 a 39 anos e 40 a 44 anos, observa-se uma tendência significativa de queda da taxa, representando 21,9% e 23,6% de redução de 2004 para 2013, respectivamente. Nas demais faixas etárias, exceto as de crianças com até nove anos, observa-se uma estabilização, sendo a maior taxa

observada entre aqueles com 30 a 34 anos (56,5 casos para cada 100 mil habitantes).

A taxa de detecção dos últimos dez anos segundo faixa etária, entre as mulheres, apresenta tendência significativa de aumento entre aquelas com 15 a 19 anos, 55 a 59 anos e 60 anos ou mais, sendo o aumento de 10,5%, 24,8% e 40,4% de 2004 para 2013, respectivamente. Em relação às faixas etárias de 20 a 24 anos até 40 a 44 anos, observa-se, de 2004 a 2013, uma tendência significativa de queda. Nas demais faixas etárias, exceto as de crianças até 9 anos, observa-se estabilização das taxas ao longo dos últimos dez anos.

A taxa de detecção de *AIDS* em menores de cinco anos tem sido utilizada como indicador *proxy* para avaliar a transmissão vertical (onde a mãe passa o vírus para o filho) do HIV. Tem-se observado uma tendência de queda estatisticamente significativa no Brasil como um todo: 35,7%, nos últimos dez anos. No entanto, constata-se diferenças importantes entre as regiões quanto a essa tendência; nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste há uma tendência de queda estatisticamente significativa, com percentuais de 59,2%, 34,3% e 67,3%, respectivamente, de 2004 a 2013. Para as regiões Norte e Nordeste, por outro lado, observa-se no mesmo período uma elevação nas taxas: 9,1% (de 3,3 para 3,6 por 1.000 nascidos vivos) e 13,0% (de 2,3 para 2,6 por 1.000 nascidos vivos), respectivamente. Esse aumento, no entanto, não é estatisticamente significativo.

Desde o início da epidemia de *AIDS* (1980) até dezembro de 2013, foram identificados 278.306 óbitos tendo como causa básica a *AIDS*, sendo a maioria na região Sudeste (61,8%), seguida do Sul (17,3%), Nordeste (11,9%), Centro-Oeste (5,0%) e Norte (4,0%).

Em 2013, a distribuição proporcional dos 12.431 óbitos foi de 44,0% no Sudeste, 21,2% no Sul, 20,0% no Nordeste, 9,1% no Norte e 5,8% no Centro-Oeste.

Avaliando o coeficiente de mortalidade padronizado, observa-se uma tendência significativa de queda nos últimos dez anos para o Brasil como um todo, o qual passou de 6,1 óbitos para cada 100 mil habitantes em 2004 para 5,7 em 2013, representando uma queda de 6,6%. No entanto, essa mesma tendência não se observa em todas as regiões do país; apenas as regiões Sudeste e Sul apresentam tendência significativa de queda, sendo esta mais acentuada no Sudeste (26,3%). Nas regiões Norte e Nordeste, a tendência é de crescimento nos últimos dez anos; no Norte, a taxa aumentou 75,0%, passando de 4,0 óbitos para cada 100 mil habitantes em 2004 para 7,0 em 2013, e no Nordeste, aumentou 41,9%, passando de 3,1 para 4,4 óbitos para cada 100 mil habitantes. A região Centro-Oeste apresentou redução no coeficiente de 4,7 em 2004 para 4,4 em 2013.

Por ser o sexo a forma de transmissão mais comum, campanhas com o intuito de proteger os jovens de contaminações são realizadas com frequência. Pelo Sistema Único de Saúde (SUS), são distribuídos preservativos, e, de acordo com o Boletim Epidemiológico HIV-DST, são os jovens os que mais procuram pelos preservativos, o que sugere uma mudança de postura do jovem e maior preocupação com as DST, AIDS e risco de gravidez indesejada. Em contrapartida, quanto menor o grau de escolaridade, maior a prevalência da doença.

Em 1996 foi publicada a Lei 9.313 que garante o direito gratuito do tratamento antirretroviral pelos portadores do vírus HIV. Desde então, o Ministério da Saúde disponibiliza o acesso aos medicamentos antirretrovirais conforme as recomendações terapêuticas vigentes no Brasil. Essas recomendações sofrem atualizações de acordo com a ocorrência de registro de novos medicamentos antirretrovirais no país e/ou sempre que houver necessidade evidenciada (BRASIL, 2015).

2.2. Fármacos antirretrovirais (ARV)

Desde a descoberta do HIV, um grande número de fármacos vem sendo identificado por apresentarem atividade antirretroviral *in vitro*. Até hoje, o maior número de informações sobre terapêutica específica contra o HIV concentrou-se na classe de fármacos, análogos a nucleosídeos, que inibem a transcriptase reversa, principalmente a zidovudina, a didanosina, a zalcitabina e a estavudina (ARAÚJO, 2003; GRAHAME-SMITH, ARONSON, 2004; GOODMAN et. al., 1996).

A procura por fármacos efetivos no combate à infecção pelo HIV fundamenta-se no entendimento do ciclo celular do vírus. É compreendendo cada passo da replicação viral que se podem direcionar novas estratégias para combater a infecção (TABORIANSKI, 2003).

Todos esses fármacos previnem a reprodução do vírus deixando o progresso da doença mais lento. O vírus do HIV frequentemente desenvolve resistência a todos estes medicamentos, quando empregados isoladamente,

após um período que varia de poucos dias a anos, dependendo do fármaco e do paciente (GRAHAME-SMITH, ARONSON, 2004; TABORIANSKI, 2003).

Para a replicação do vírus HIV, é necessária a atuação da enzima viral DNA-polimerase RNA-dependente, também conhecida por transcriptase reversa, que irá converter o RNA do vírus HIV em DNA pró-viral. Essa conversão é imprescindível para que o vírus HIV possa incorporar o seu material genético ao material genético do hospedeiro. Sendo assim, os fármacos inibidores de transcriptase reversa, atuam na tentativa de impedir a ação de enzima (FLEXNER, 2004; GOODMAN et. al., 1996; GRAHAME-SMITH, ARONSON, 2004).

Os fármacos utilizados com melhores resultados até o momento são os que inibem a ação da enzima transcriptase reversa. Apesar de exercerem ação parcial, são capazes de diminuir a carga viral, melhorar sintomas clínicos, retardar a progressão da doença e prolongar a sobrevida de pacientes com AIDS.

Apesar dos agentes inibidores da transcriptase reversa apresentarem um mecanismo de ação comum, os agentes antirretrovirais diferem substancialmente quanto às suas propriedades farmacológicas, inclusive quanto às vias de ativação intracelular e perfis toxicológicos (FLEXNER, 2004; GOODMAN *et al.*, 1996; GRAHAME-SMITH, ARONSON, 2004).

Os antirretrovirais são divididos em dois grupos: os análogos de nucleosídeos e os não-análogos de nucleosídeos. Os análogos de nucleosídeos foram a primeira classe de fármacos que demonstrou atividade antirretroviral em pacientes tratados. Atuam colocando-se como “falsos nucleosídeos” na formação da molécula de DNA pela transcriptase reversa.

Quando ocupam o lugar de um verdadeiro nucleosídeo na formação da molécula do DNA viral, impedem que um novo nucleosídeo se ligue, interrompendo o processo. Portanto, têm a característica de serem inibidores competitivos (BALINT, 2001; FLEXNER, 2004; GOODMAN *et al.*, 1996; GRAHAME-SMITH, ARONSON, 2004).

Também são chamados de inibidores nucleosídicos e nucleotídicos da transcriptase reversa e precisam ser fosforilados no interior da célula infectada para poderem adquirir atividade (TABORIANSKI, 2003).

Após a fosforilação, esses fármacos se tornam substratos ativos para a enzima transcriptase reversa, que os incorporará na síntese de uma nova molécula de DNA pró-viral. Após essa incorporação, a molécula de DNA não mais sofre alongamento, visto que para isso é necessária a presença de um grupo 3-hidroxila, que é ausente de substratos ativos. Esses fármacos apresentam meia-vida de 1 a 10 horas, sendo que o tenofovir excede esse tempo, alcançando de 14 a 17 horas. São eliminados por via renal, com exceção da zidovudina e do abacavir, que sofrem depuração hepática (BALINT, 2001; GOODMAN *et al.*, 1996; GRAHAME-SMITH, ARONSON, 2004). São exemplos de fármacos desse grupo a zidovudina, a didanosina, a zalcitabina, a estavudina, a lamivudina, e o abacavir (FLEXNER, 2004; GOODMAN *et al.*, 1996; GRAHAME-SMITH, ARONSON, 2004).

Os inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa são representados por moléculas químicas que são capazes de se ligar a uma bolsa hidrofóbica. A ocorrência desta ligação faz com que a estrutura tridimensional da enzima se modifique, assim, sua atividade se torna diminuída.

2.2.1. Zidovudina

A zidovudina (3'-azido- 2',3'-dideoximidina, azidotimidina ou AZT), apresentado na Figura 3, é um análogo sintético da timidina largamente empregado no tratamento da AIDS sozinho ou em associação com outros fármacos de ação antirretroviral. Foi sintetizado por HORWITZ e colaboradores em 1964. OSTERTAG e colaboradores, em 1974, relataram a sua atividade inibitória sobre o retrovírus da murina tipo C *in vitro*. Em 1985, MITSUYA e colaboradores iniciaram a aplicação clínica do AZT e relataram o efeito inibitório do fármaco sobre o HIV-1 (vírus da imunodeficiência humana tipo 1). Dois anos após, o AZT surgiu como primeiro fármaco a ser aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para pacientes adultos infectados pelo HIV com história citologicamente confirmada de *Pneumocystis carini* (ARAÚJO, 2003, OSTERTAG *et al.*, 1974).

Figura 3 - Representação da molécula de zidovudina. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010)

No Brasil, a zidovudina foi o primeiro antirretroviral distribuído pelo Ministério da Saúde. Em setembro de 1998, já estavam disponíveis na Rede Pública comprimidos ou cápsulas de didanosina (ddI), zalcitabina (ddC), lamivudina (3TC), estavudina (d4T), nevirapina, delavirdina, saquinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir e zidovudina injetável (ARAÚJO, 2003).

A zidovudina é amplamente empregada em casos de recém-infecção, atuando na contenção da infecção de novas células pelo vírus. Ao atingir o meio intracelular, a zidovudina é fosforilada pela enzima timidina cinase em 5'-monofosfato de zidovudina, que será então fosforilada pela mesma enzima em 5'-difosfato de zidovudina e, por fim, em 5'-trifosfato de zidovudina pela enzima nucleosídeo difosfato quinase e é a 5'-trifosfato de zidovudina que atua impedindo o prolongamento da molécula de DNA.

A zidovudina sofre rápido metabolismo de primeira passagem, o que resulta em uma biodisponibilidade sistêmica ao redor de 64%. É capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, assim como a barreira placentária, sendo encontradas concentrações do fármaco no recém-nascido semelhantes às das mães. Também pode ser encontrada no sêmen e no leite materno.

Em termos de toxicidade, a zidovudina não é capaz de inibir significativamente as enzimas DNA polimerase dos tipos α e β humanas, porém apresenta afinidade pela DNA polimerase do tipo γ (mitocondrial). A inibição dessa enzima pode causar no paciente quadro anêmico, miopatia, neuropatia periférica, pancreatite e granulocitopenia. Efeitos adversos de pequena gravidade como cefaléia e fadiga são bem comuns nos pacientes que fazem uso desse fármaco (FLEXNER, 2004; GOODMAN *et al.*, 1996; GRAHAME-SMITH, ARONSON, 2004).

As principais características físico-químicas da zidovudina (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; FARMACOPÉIA BRITÂNICA, 2009; THOMAS, PANCHAGNULA, 2003) estão relacionadas a seguir:

- Aspecto: pó cristalino, acastanhado e apresenta polimorfismo;
- Temperatura de fusão: em torno de 124 °C;
- Solubilidade: ligeiramente solúvel em água, solúvel em etanol;
- Poder rotatório específico: +60,5° a +63,0°, a 25°C, em relação à substância dessecada (aqui não tem que ter o solvente?);
- Principal método de análise para doseamento: cromatografia líquida de alta eficiência (C.L.A.E.);
- Coeficiente de partição (log P): -0,09;
- Constante de dissociação (pKa) : 9,51.

2.3. Os medicamentos convencionais e suas limitações

Atualmente existe um grande número de fármacos disponíveis no mercado para serem empregados na manipulação de medicamentos. Tais fármacos podem ser administrados por meio de várias formas farmacêuticas e por diferentes vias de administração, dentre elas a via oral, retal, vaginal, intramuscular, nasal, oral, tópica e transdérmica. Cada uma das vias apresenta finalidades, vantagens e desvantagens específicas. Sendo assim, a via de administração mais efetiva deve ser determinada e a dose recomendada deve ser estabelecida (ALLEN, *et al.*, 2007; STORPIRTIS, *et al.*, 2009).

Com objetivo de facilitar a veiculação do fármaco pelas diferentes vias de administração e permitir a obtenção do efeito terapêutico desejado, faz-se

necessário o emprego de diversos excipientes e também da seleção do método de preparação do medicamento, além da escolha da correta forma farmacêutica. Sendo assim, é desejável que haja coerência na disponibilidade biológica entre as formas farmacêuticas, o que nem sempre ocorre (ALLEN, *et al.*, 2007; SALTÃO, VEIGA, 2001).

Além disso, a qualidade biofarmacêutica de um medicamento tem sido reconhecida como um aspecto essencial para a sua comercialização. Certos produtos contendo fármacos de baixa biodisponibilidade ou pouco solúveis estão no mercado há muito tempo, porém, muitas vezes, o resultado terapêutico obtido é insatisfatório (ALLEN, *et al.*, 2007; SALTÃO, VEIGA, 2001). Visando a melhoria das propriedades biofarmacêuticas de fármacos e a facilitação de sua permeabilidade em barreiras biológicas, sistemas de liberação inovadores vêm sendo desenvolvidos para minimizar esses inconvenientes, destacando-se os carreadores nanoestruturados (BAROLI, 2010; DEVALAPALLY *et al.*, 2007; STORPIRTIS, *et al.*, 2009).

Vale ressaltar que vários fatores influenciam na possibilidade de o fármaco alcançar os sítios de ação. Estes incluem a liberação do fármaco a partir da formulação, a absorção, distribuição, metabolização e excreção (GOODMAN *et al.*, 1996; GRAHAME-SMITH, ARONSON, 2004).

Os fármacos podem ser administrados por meio de várias formas farmacêuticas e vias de administração. Uma das considerações fundamentais no delineamento de formas farmacêuticas está relacionada ao tipo de efeito que o fármaco deverá exercer, ou seja, local ou sistêmico (ALLEN, *et al.*, 2007).

Quando há necessidade de obtenção da ação local de vários fármacos a via tópica deve ser escolhida, uma vez que a substância ativa permanece na pele em região próxima ao local de aplicação (BARRY, 1983; GUZZO *et al.*, 1996; MAINARDES *et al.*, 2009; NAYAK, *et al.*, 2009; ORJALES, 1998; RIEGER, 1993).

Da mesma maneira, para que substâncias sejam liberadas na pele e possam chegar à corrente sanguínea e desencadear um efeito sistêmico, elas devem ser inicialmente dissolvidas e liberadas da formulação, sofrer partição e difundir na camada córnea. Nesses casos, essas substâncias deverão ultrapassar a principal barreira da pele, a camada córnea, definida como epiderme não-viável, que é uma barreira eficiente contra a entrada de substâncias hidrofóbicas na pele. A seguir, devem sofrer partição da camada córnea para a epiderme viável, seguida de difusão da epiderme viável para a camada mais externa da derme, sofrer captação pelos capilares sanguíneos próximos à junção dermoepidérmica, atingindo a circulação sistêmica e, finalmente, deve ocorrer o transporte para os tecidos-alvo para desencadear a ação terapêutica (BAROLI, 2010; BARRY, 1983; GUZZO *et al.*, 1996; MAINARDES *et al.*, 2009; NAYAK, *et al.*, 2009; ORJALES, 1998; RIEGER, 1993).

Já é sabido que a administração de fármacos antirretrovirais em formas farmacêuticas convencionais orais, apesar da sua rápida absorção pela mucosa intestinal, apresentam limitações (MAINARDES *et al.*, 2009; NAYAK, *et al.*, 2009; SEKI, *et al.*, 1990; SEKI, *et al.*, 1991) tais como:

- alta perda de fármaco após o efeito de primeira-passagem (cerca de 40%);

- altos índices de eliminação devido à baixa meia-vida, apesar da sua rápida absorção pela mucosa intestinal;
- concentrações plasmáticas elevadas;
- efeitos adversos;

A *AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome)* ou SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) tem como agente etiológico o vírus da imunodeficiência humana (HIV), um retrovírus com genoma RNA, da família *Retroviridae*. Desde a descoberta do HIV, vários fármacos foram identificados por apresentarem atividade antirretroviral. Até hoje, o maior número de informações sobre terapêutica específica contra o HIV concentra-se na classe de fármacos inibidores de transcriptase reversa e da enzima protease, responsáveis, respectivamente, pela replicação e encapsulação viral (AMATO NETO, 1996; GRIFFITH, *et al.*, 2007; GUNASEELAN, S. *et al.*, 2010; NEVES, *et al.*, 2010; STEVEN, *et al.*, 1997).

Devido aos efeitos tóxicos obtidos, meia-vida curta e baixa bioequivalência resultantes da administração oral de medicamentos contendo AZT, SUWANPIDOKKUL e colaboradores (2004) estudaram a permeabilidade cutânea do AZT em uma mistura de veículos, utilizando pele de porco. Os resultados indicaram boa permeabilidade do AZT nesses sistemas, tornando viável o desenvolvimento de formulações de aplicação transdérmica contendo essa substância. Dessa maneira, a administração tópica de formulações contendo AZT pode ser considerada um grande desafio uma vez que esse fármaco é hidrofílico o que naturalmente dificulta a sua permeabilidade (BAROLI *et al.*, 2010; BEHAN *et al.*, 2001; DEVALAPALY *et al.*, 2004; DOMINGUES *et al.*, 2008; HARIVARDHAN-REDDY, MURTHY, 2004;

MAINARDES *et al.*, 2009; NAYAK *et al.*, 2009; NEVES *et al.*, 2010; OJEWOLE *et al.*, 2008; RAO *et al.*, 2005; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SERRA *et al.*, 2008; WILSON *et al.*, 2008).

Vários estudos vêm se dedicando ao desenvolvimento de sistemas de liberação modificada para a zidovudina. Foram idealizados sistemas sob a forma de microesferas (ABBU-IZZA *et al.*, 1997; RAO *et al.*, 2005), lipossomas (GARG; JAIN, 2006; JIN *et al.*, 2005; KAUR *et al.*, 2008) e nanopartículas (DEMBRI *et al.*, 2001; 1997; HILLAIREAU *et al.*, 2006; HILLAIREAU *et al.*, 2007; LÖBENBERG *et al.*, MAINARDES *et al.*, 2009), sendo ressaltadas as vantagens das nanopartículas poliméricas em relação aos outros carreadores (REIS *et al.*, 2006, SCHAFFAZIK *et al.*, 2003).

2.4. Vias tópica e transdérmica na administração de medicamentos

Há uma gama de formas farmacêuticas e/ou sistemas de liberação de fármacos que podem ser aplicados sobre a pele. Alguns exemplos são: cremes, loções, unguentos, sistemas transdérmicos, pastas, pós e aerossóis.

No tratamento de doenças da pele, em geral, é desejável que, após a aplicação tópica, o fármaco atravesse o estrato córneo e difunda-se através da pele. No entanto, na maioria dos casos, não se pretende atingir a circulação geral, utilizando-se da via tópica. Normalmente a permeação cutânea de um fármaco presente em uma preparação dermatológica ou em um sistema terapêutico transdérmico não depende apenas das propriedades físico-químicas da substância ativa, mas também de seu comportamento quando em um veículo farmacêutico e da condição da pele (ALLEN *et al.*, 2007).

Segundo FLYNN (1990), três situações ou razões para fazer uso da pele como via de administração de medicamentos podem ser consideradas, a saber:

- a primeira envolve condições em que a função barreira natural foi de alguma forma alterada. É o caso do emprego de antibióticos quando a pele mostra um corte ou uma lesão, ou mesmo quando as condições atmosféricas ou o emprego de produtos químicos ou cosméticos alteram a emulsão epicutânea sobre a superfície da pele com consequente secura e aspereza da mesma;
- um segundo motivo envolve a necessidade de atuação do(s) fármaco(s) na epiderme viável e tecidos dérmicos;
- como terceira razão, um fármaco pode ser aplicado sobre a pele com o objetivo de conseguir efeito sistêmico. Isso é possível com fármacos potentes que apresentam características físico-químicas para permear a pele com facilidade.

Com o atendimento a esses requisitos, pode ser obtida a liberação transdérmica com adequada ação do fármaco.

As preparações para uso tópico e as preparações transdérmicas estão sendo cada vez mais empregadas para tratamento de diversas patologias. As preparações tópicas são utilizadas há séculos, entretanto, as preparações transdérmicas, onde a pele é utilizada como via alternativa para a terapia sistêmica, são consideradas relativamente novas.

Dessa forma, entende-se que o objetivo da terapia tópica é produzir um adequado nível de fármaco(s) acompanhado por baixas concentrações sanguíneas, evitando, dessa forma, os efeitos farmacológicos e toxicológicos

em outras regiões do organismo. Ao aplicar um fármaco topicamente é indesejável atingir a corrente sanguínea, não só porque não se pretende obter o efeito sistêmico, mas também porque uma rápida remoção do fármaco do local de ação pelo sistema sanguíneo pode limitar ou reduzir a concentração necessária ao efeito. Já o oposto é esperado quando um medicamento é aplicado transdermicamente (ALLEN *et al.*, 2007; CORRÊA, 1997; FLYNN, 1990; FLYNN 1993).

A pele funciona como uma barreira bilateral, evitando tanto a absorção quanto a perda de água e eletrólitos. Essa função é exercida fundamentalmente pela epiderme, mais especificamente pelo estrato córneo, a mais externa das camadas da pele. Os corneócitos, células da camada córnea, são não-viáveis, anucleados e destituídos de organelas. Apresentam-se achatados e seu citoplasma é preenchido por uma escleroproteína filamentosa, chamada de queratina, constituída por cadeias proteicas ricas em ligações dissulfeto. Os corneócitos funcionam como depósito dos produtos finais do metabolismo da epiderme, contendo, também, secreções de glândulas sebáceas e sudoríparas. Cada célula desenvolve um invólucro cornificado, resultante de ligações cruzadas entre involucrina e querato-hialina. Os espaços intercelulares são preenchidos por lipídeos lamelares fortemente hidrofóbicos. Assim, essa combinação de células queratinizadas hidrofílicas em material intercelular hidrofóbico, constitui-se em uma barreira a substâncias tanto hidrofílicas como hidrofóbicas (BARRY, 1983; GUZZO *et al.*, 1996; ORJALES, 1998; RIEGER, 1993).

No desenvolvimento de produtos dermatológicos, a função da pele que merece maior atenção é a função barreira uma vez que, na maioria das vezes,

várias substâncias medicamentosas são veiculadas topicamente. A pele e seus apêndices regulam a entrada de substâncias externas no organismo. Quando uma molécula em contato se move através da pele intacta, primeiramente ocorre o contato com o sebo, restos celulares, bactérias e outros materiais exógenos que cobrem a pele (BARRY, 1983; GUZZO *et al.*, 1996; ORJALES, 1998; RIEGER, 1993).

A penetração de fármacos na pele pode ocorrer por duas vias:

- Via transepidérmica: representada pelas vias intra e intercelular e visualizada na Figura 4;
- Via transanexal: representada pela passagem pelo folículo pilossebáceo e poros.

Na via transepidérmica, ou seja, através do estrato córneo propriamente dito, a substância pode penetrar de duas maneiras distintas que podem ser entre as células e através das células, recebendo o nome de penetração intercelular e penetração transcelular, respectivamente, conforme demonstrado na Figura 4 (BARRY, 1983; GUZZO *et al.*, 1996; ORJALES, 1998; RIEGER, 1993).

Figura 4 – Via transepidermica de fármacos, dividida em rotas intercelular e transcelular (Adaptada de BARRY, 1983).

2.4.1. Liberação e permeação cutânea

Nas últimas décadas, tem havido grande crescimento na aplicação de técnicas biofísicas sofisticadas para monitorizar a permeação através da pele. A compreensão dos mecanismos de absorção e de promoção de absorção tem avançado e diferentes mecanismos a nível molecular têm sido esclarecidos. Esses conhecimentos poderão ser utilizados no *design* de novas terapêuticas dérmicas e transdérmicas associadas aos promotores de permeação. Desse modo, será possível atingir biodisponibilidade comparável a que se obtém, em regra, por via oral. Com esta possibilidade o desenvolvimento de sistemas de liberação através da pele será mais seguro e eficaz (ALLEN *et al.*, 2007; BARRY, 1983; DEVALAPALLY *et al.*, 2007; SHAH, 1994).

Os métodos para promoção do aumento do transporte de fármacos através de barreiras biológicas podem ser divididos em duas categorias principais: meios químicos e meios físicos. Esses métodos tornam-se necessário, pois as características físico-químicas de muitos fármacos podem não permitir que os mesmos permeiem adequadamente através da pele (DEVALAPALLY *et al.*, 2007; HSIEH, 1994; SHAH, 1993).

Os principais fatores que podem, muitas vezes, dificultar a escolha da terapia tópica são:

- Muitos fármacos permeiam precariamente através do estrato córneo;
- Mesmo se os fármacos permeiam através do estrato córneo, podem ser facilmente retidos na pele;
- Muitos fármacos são extremamente irritantes para serem aplicados topicamente.

No entanto, uma estratégia para desenvolver métodos que promovam aumento da permeação de fármacos no tratamento tópico deve se basear no uso do estrato córneo e/ou epiderme como um reservatório de liberação lenta de fármacos para regiões com determinadas patologias. Sendo assim, esses métodos são usados não só para facilitar a permeação de fármacos através do estrato córneo, mas também aumentar o tempo de retenção de fármacos no estrato córneo e/ou epiderme (ALLEN *et al.*, 2007; BAROLI, 2010; BARRY, 1983; CORRÊA, 1997; DEVALAPALLY *et al.*, 2007; HSIEH, 1994; SHAH, 1993).

2.5. Carreadores nanoestruturados para a administração tópica e/ou transdérmica de fármacos

Segundo DEVALAPALLY e colaboradores (2007), o desenvolvimento de novos fármacos é dependente de várias áreas, ou seja, é uma questão multidisciplinar que deve atender aos vários requisitos para ser aceita na pesquisa científica. Essas substâncias são tratadas inicialmente como novas entidades moleculares e podem apresentar algumas características como alto peso molecular e alto coeficiente de partição (LogP), resultando em baixa solubilidade em água e baixa permeabilidade. Sendo assim, muitos não são empregados na terapêutica.

Com o objetivo de melhorar a permeabilidade cutânea de fármacos e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade, além das suas propriedades biofarmacêuticas e farmacocinéticas indesejáveis, a nanotecnologia pode ser uma ferramenta extremamente importante para viabilizar a veiculação desses fármacos topicamente e/ou transdermicamente (ALLEN *et al.*, 2007; CORRÊA, 1997; DEVALAPALLY *et al.*, 2007; FLYNN, 1990; FLYNN, 1993).

A pele tem sido amplamente utilizada como via de administração tópica ou transdérmica de fármacos. O tratamento de doenças tópicas geralmente é feito pela aplicação direta de diversas formulações, apresentadas em várias formas farmacêuticas, sendo que o sucesso terapêutico é geralmente alcançado. Da mesma forma, são obtidos ótimos resultados, quando o objetivo é promover a ação sistêmica, uma vez que o efeito de primeira passagem é evitado e as barreiras da pele são ultrapassadas. Sendo assim, é pertinente classificar os agentes nanométricos que podem ser transportados em nossa

pele, em dois grupos, as nanopartículas (< 999 nm) e os nanomateriais (< 100 nm). O potencial de penetração dessas nanoestruturas é variável e esses agentes diferenciam-se em tamanho, deformabilidade, cargas superficiais e composição (BAROLI, 2010).

Diversos sistemas de administração de fármacos têm surgido nos últimos anos com a finalidade de modelar a cinética de liberação, melhorar a absorção, aumentar a estabilidade do fármaco ou vetorizá-lo para uma determinada população celular. Esses novos sistemas terapêuticos surgiram da necessidade de minimizar os problemas relacionados à administração das formas farmacêuticas tradicionais. No caso da administração oral de medicamentos é comum acontecer perda de atividade, consequência de destruição parcial do princípio ativo através do trato gastrointestinal (por variações de pH ou devido a degradação enzimática) ou de má absorção (SALTÃO, VEIGA, 2001)

Com o objetivo de evitar tais efeitos indesejáveis e ultrapassar as dificuldades referidas anteriormente é que foram criados os novos sistemas de liberação, descritos a seguir (BAROLI, 2010).

2.5.1. Vesículas lipídicas

As vesículas lipídicas são representadas pelos lipossomas, niossomas, etossomas e transferossomas. Os lipossomas são vesículas formadas por uma ou várias bicamadas lipídicas. São geralmente formados por uma mistura de fosfolípídeos e colesterol e são carregados negativa ou positivamente, sendo que sua deformabilidade aumenta de acordo com a quantidade de colesterol

presente (BAROLI, 2010; CHORILLI, *et al.*, 2004). Os primeiros lipossomas estudados quanto à eficácia como sistema transdérmico eram constituídos por fosfolipídeos com ou sem a adição de colesterol. O colesterol se inclui na bicamada lipídica e pode aumentar a interação entre as cadeias carbônicas dos fosfolipídeos, a viscosidade da bicamada lipídica e a rigidez da membrana, diminuir a permeabilidade a moléculas hidrofílicas e aumentar a estabilidade do lipossoma. Nesse contexto, diferentes dispersões de lipossomas deformáveis de remifentanil, um analgésico opióide, foram desenvolvidas e caracterizadas quanto ao tamanho, eficiência de encapsulação, elasticidade de membrana e permeação e retenção cutânea *in vitro* (DEVALAPALLY *et al.*, 2007; NARDOTTO, 2009; SCHREIEF, BOUWSTRAB, 1994).

Os niossomas foram criados com o objetivo aumentar a estabilidade dos lipossomas. São produzidos pela mistura de agentes tensoativos não-iônicos, colesterol e, às vezes, pequenas quantidades de fosfolipídeos. São estruturas rígidas e podem ser carregados negativa ou positivamente (BAROLI, 2010; SCHREIEF, BOUWSTRAB, 1994). No estudo de Balakrishnan e colaboradores (2009), os autores investigaram o aumento significativo da permeação cutânea do minoxidil e, conseqüentemente, a dose acumulada do fármaco na pele, quando a substância foi administrada na forma de uma solução e incorporada em um niossoma. Segundo os autores, esse sistema desenvolvido é um veículo promissor para o minoxidil, podendo ser empregado em várias formulações usadas no tratamento de queda capilar.

Os etossomas foram produzidos com o objetivo de aumentar a penetração cutânea. Isso acontece devido ao aumento da elasticidade da vesícula lipídica, causado pela alta quantidade de álcool etílico em sua

composição (20-45%). São geralmente carregadas negativamente e suas bicamadas lipídicas são fluidas. Esses sistemas carreadores são não-invasivos e capazes de liberar os fármacos em camadas mais profundas da pele e/ou promover a liberação na circulação sistêmica (BAROLI, 2010; GODIN, TOUITOU, 2003).

Já os tranferossomas são consideradas vesículas ultra deformáveis, geralmente carregadas negativamente. São compostas por fosfolipídeos e tensoativos, responsáveis pela elasticidade e deformabilidade (BAROLI, 2010). No estudo de Cevc e colaboradores (1998), os pesquisadores verificaram a ultra flexibilidade dessas vesículas, quando desenvolveram sistemas com insulina. Além disso, os transferossomas desenvolvidos, quando aplicados em pele da região mamária de ratas e humanos, não causaram lesões ou danos à pele e foi considerado tão eficiente quanto à administração parenteral de insulina.

As nanopartículas lipídicas podem ser divididas em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). As NLS são produzidas com um único lipídeo que é sólido à temperatura ambiente e suas matrizes são cristalinas. Essas estruturas são recobertas por um tensoativo, o qual estabiliza a dispersão e podem ser carregadas negativa ou positivamente (BAROLI, 2010; MARCATO, 2009). NEMEN e LEMOS-SENNA (2011) promoveram a nanoencapsulação do resveratrol, por ser considerada uma alternativa promissora para a aplicação tópica. Nesse trabalho, nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e nanoemulsões (NE) foram preparadas pela técnica de difusão do solvente a quente e avaliadas quanto a sua capacidade de incorporar o fármaco, assim como de liberá-lo através da pele.

Visando uma forma farmacêutica para uso tópico, nanogéis foram preparados pela adição de hidroxietilcelulose às dispersões coloidais.

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são produzidos com lipídeos sólidos e líquidos, apresentando matriz amorfa ou cristalina. Também apresentam na sua superfície, um tensoativo que estabiliza a dispersão e podem ser carregadas negativa ou positivamente (BAROLI, 2010). Dora e colaboradores (2012) formularam nanocarreadores lipídicos, a partir do triestearato de glicerila e óleo de rícino em diferentes proporções, pela técnica de difusão do solvente a quente. Com o objetivo de avaliar as estruturas dos nanocarreadores obtidos, utilizou-se a técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (M.E.T.). Observou-se que as nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) e os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) apresentaram formas estruturais complexas, ou seja, as NLSs exibiram estrutura cristalina lamelar, enquanto os CLNs exibiram uma estrutura mista composta de fase cristalina lamelar em contato com compartimento oleoso. (DORA, C.L. *et al.*, 2012).

2.5.2. Microemulsões ou nanoemulsões

As microemulsões ou nanoemulsões são fluidos termodinamicamente estáveis, obtidas pela emulsificação de fases aquosa e oleosa e de tamanho frequentemente inferior a 150 nm (BAROLI, 2010). Segundo Oliveira e colaboradores (2004), esses sistemas foram introduzidos na literatura por Hoar e Shülman em 1943, ao descreverem sistemas transparentes formados espontaneamente quando óleo e água eram misturados com quantidades

relativamente grandes de tensoativo iônico misturado a um álcool de cadeia média.

Silva e colaboradores (2006) estudaram influência da adição de quantidades crescentes do lipídeo catiônico estearilamina (SA) e da presença do tensoativo não-iônico poloxâmero 188 sobre características físico-químicas de nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos.

2.5.3. Nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas são geralmente feitas de derivados de ferro. Apresentam tamanho variado, geralmente abaixo de 100 nm e algumas entre 10 e 2 nm. Apresentam empregos variados, a saber: promover a liberação do fármaco por mecanismo magnético, viabilizar imagens em exames, destruição de tumores por hipertermia, entre outros (BAROLI, 2010). Segundo Souza e Mohallen (2011), a idéia de liberação controlada de substâncias biologicamente ativas começou a ser utilizada na década de 50 com o advento dos materiais poliméricos. Nesse contexto, os nanocompósitos foram amplamente estudados para a incorporação de diversos antibióticos, analgésicos, antitérmicos, antineoplásicos, agentes de contraste em exames de ressonância magnética, entre outros.

E, finalmente, temos as nanopartículas poliméricas destacadas a seguir (BAROLI, 2010; DEVALAPALLY, *et al.*, 2007; SCHAFFAZIK *et al.*, 2003).

2.5.4. Nanopartículas poliméricas

Os sistemas poliméricos nanoparticulados são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . Podem ser classificados em nanocápsulas ou nanoesferas, de acordo com a Figura 5. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Já a nanoesferas, que não apresentam óleo na sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou inserido.

Figura 5 - Representação esquemática da estrutura de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas (Adaptado de SCHAFFAZIK *et al.*, 2003).

Vários são os métodos de preparo de nanopartículas poliméricas descritos na literatura. São geralmente métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (cianoacrilato de alquila) ou de precipitação de polímeros pré-formados, tais como poli (ácido lático-co-ácido glicólico) ou PLGA, poli (ϵ -caprolactona) ou PCL e os copolímeros do ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico (SCHAFFAZIK *et al.*, 2003; SOPPIMATH, *et al.*, 2001).

Sendo assim, as principais vantagens da utilização de nanopartículas poliméricas para encapsulação de fármacos são as seguintes (SANTOS, 2012, SCHAFFAZIK *et al.*, 2003; SOPPIMATH, *et al.*, 2001; YOO, 2001):

- biocompatibilidade e biodegradabilidade, o que leva a uma baixa toxicidade;
- proteção dos fármacos que sofrem degradação facilmente devido aos fatores extrínsecos;
- liberação controlada dos fármacos encapsulados e/ou adsorvidos;
- correto direcionamento dos fármacos para locais-alvo, minimizando a ocorrência da sua absorção sistêmica;
- utilização de métodos simples de produção laboratorial.

2.6. Nanopartículas de poli (alquil-cianoacrilato) (PACA)

2.6.1. Propriedades e aplicações

Os poli(alquil-cianoacrilatos), também chamados de PACA, inicialmente não eram utilizados como materiais constituintes de sistemas de liberação controlada de fármacos, mas sim os ACA, seus monômeros derivados de alquil-cianoacrilatos, devido às suas excelentes propriedades adesivas. Mais recentemente, os PACA foram introduzidos nessa área de vasta e promissora pesquisa e hoje essas nanopartículas poliméricas coloidais são consideradas as de maior potencial para servirem como sistemas de liberação de fármacos, como antineoplásicos, antirretrovirais e de outras classes de fármacos (ALYAUTDIN *et al.*, 1997; CUNHA, 2008; VAUTHIER *et al.*, 2003).

Quando comparados com outros sistemas nanoestruturados, esses sistemas de liberação de fármacos apresentam algumas vantagens, tais como (BEHAN, *et al.*, 2001; SOPPIMATH, *et al.*, 2001; TAVARES, 2013; VAUTHIER *et al.*, 2003):

- uso de monômeros biocompatíveis e biodegradáveis;
- facilidade de preparo;
- facilidade de transposição de escala laboratorial para escala industrial (*scale-up*).

O seu emprego também é justificado pela possibilidade de administração por várias vias, como: transdérmica (HE *et al.*, 2009; SIMEONOVA, *et al.*, 2003), oral (SULLIVAN; BIRKINSHAW, 2004), oftálmica (DESAI, BLANCHARD, 2000; YENICE *et al.*, 2008) e parenteral (XI-XAO *et al.*, 2006).

2.6.2. Métodos de preparo

Há alguns métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas de PACA e estão esquematizados na Figura 6. Dentre eles, os mais empregados são:

- Método de polimerização interfacial (para a obtenção de nanocápsulas);
- Método de polimerização em emulsão (para a obtenção de nanoeferas).

Esses métodos basicamente envolvem a polimerização do monômero correspondente. Além desses, há outros métodos para a obtenção desses sistemas, sendo baseados a partir da utilização do polímero pré-formado, com o emprego dos métodos de nanoprecipitação (com formação de nanoesferas ou nanocápsulas) ou emulsificação-evaporação do solvente, obtendo-se

nanoesferas, como demonstrado na Figura 6 (BEHAN, *et al.*, 2001; SOPPIMATH, *et al.*, 2000; TAVARES, 2013; VAUTHIER *et al.*, 2003).

Figura 6 – Métodos para a preparação de nanopartículas de PACA. NS: nanoesferas, a-NC: nanocápsulas de núcleo aquoso, o-NC: nanocápsulas de núcleo oleoso. (Adaptado de VAUTHIER *et al.*, 2007).

Segundo a literatura, é possível afirmar que o método mais utilizado para o preparo de nanoesferas é o método de polimerização em emulsão. A escolha desse método é justificada pelos seguintes motivos (ALYAUTDIN, *et al.*, 1997; BEHAN, *et al.*, 2001; LIU, CHEN, 2009; WILSON, *et al.*, 2008; XI-XIAO, *et al.*, 2006; ZHANG, *et al.*, 2001):

- Método simples;
- Não emprega solvente orgânico;
- Tempo relativamente curto;
- Número pequeno de etapas;
- Produção de nanopartículas estáveis;
- Bom rendimento;

- Geralmente apresenta satisfatória porcentagem de fármaco encapsulado.

Como principais fatores a serem controlados nesse método, podemos citar:

- pH do meio reacional;
- Tempo de agitação da polimerização;
- Velocidade de agitação da reação;
- Emprego dos diferentes estabilizantes.

Com o objetivo de rapidamente iniciar a polimerização, o pH do meio reacional é geralmente ajustado para 2,5, com o emprego de solução diluída de HCl. Essa polimerização inicia-se pelos íons hidroxila presentes na água ou pelos grupos nucleofílicos presentes nas cadeias dos tensoativos ou estabilizantes. Da mesma forma, sabe-se que alguns constituintes também podem contribuir para a iniciação desse processo (SCHAFFAZIK *et al.*, 2003; VAUTHIER *et al.*, 2003). Também é importante citar que alguns fármacos também são capazes de iniciar tal reação, o que pode levar a perda de sua atividade biológica (WEISS *et al.*, 2007).

A reação de polimerização ocorre usualmente em cerca de 3 a 4 horas, sob agitação vigorosa, sendo que o tempo de reação depende da natureza do monômero (TAVARES, 2013; VAUTHIER *et al.*, 2003).

O uso de diferentes estabilizantes pode influenciar no diâmetro hidrodinâmico e também no potencial zeta das nanoesferas formadas, sendo que os principais estabilizantes empregados são Pluronic[®], quitosana e Dextran[®] (LIMOUZIN *et al.*, 2003; TAVARES, 2013).

2.6.3. Incorporação de fármacos à nanopartículas de PACA

De acordo com a literatura, é possível incorporar uma gama de fármacos nessas estruturas, tais como antirretrovirais, antibióticos, citostáticos e fármacos que atuam no sistema nervoso central. Essa incorporação é possível devido à grande área superficial dessas estruturas e também devido à sua porosidade.

É possível verificar a adição do fármaco às nanopartículas, de três maneiras distintas, a saber (McCARRON, *et al.*, 1999; SIMEONOVA, *et al.*, 2009; TAVARES, 2013) :

- o fármaco pode estar presente no meio reacional anteriormente à adição do monômero (preferencialmente no caso de substâncias lipofílicas);
- o fármaco pode ser incorporado após a iniciação do processo de polimerização;
- o fármaco pode ser adicionado às partículas pré-formadas (preferencialmente para substâncias hidrofílicas), sendo que há basicamente adsorção do fármaco.

2.6.4. Ácido hialurônico como revestimento de sistemas nanoparticulados

O ácido hialurônico (Figura 7) é um polissacarídeo de estrutura linear carregado negativamente e consiste em duas unidades alternadas de D- ácido glicurônico e Nacetil-D-glicosamina (HE, *et al.*, 2009).

Figura 7 – Estrutura química do ácido hialurônico (Adaptado de HE, *et al.*, 2009).

É uma substância não-irritante com grande capacidade de ligar-se à água, apresenta-se viscosa e de comportamento pseudoplástico quando dispersa em água e é empregada como agente de adesividade em medicamentos, sendo essa última, uma característica muito importante para que seja utilizado como excipiente de um medicamento (YENICE, *et al.*, 2008). Além disso, é um componente relevante da matriz extracelular presente em tecidos de conexão, vítreo e fluídos sinoviais. Sendo assim, exerce efeito importante em eventos celulares, tais como crescimento, diferenciação, migração, cicatrização e até em processos metastáticos (HE, *et al.*, 2009).

Devido ao fato do ácido hialurônico ser biocompatível e apresentar as características citadas, é considerado um bom agente de revestimento de nanopartículas, além de contribuir para a estabilidade desses nanocarreadores.

2.7. Formas farmacêuticas semissólidas de administração tópica e/ou transdérmica

Os semissólidos apresentam-se disponíveis em uma grande variedade de formas farmacêuticas. Dentre elas, podemos citar:

- Pomadas;
- Cremes;
- Pastas;
- Ungüentos;
- Glicerados;
- Géis.

2.7.1. Géis

Gel é um sistema disperso e como tal é composto por uma fase dispersa que deve estar totalmente difundida como gotas ou partículas em outra fase que é denominada fase contínua. Considerados sistemas coloidais, são classificados em liófilos e liófilos. Os colóides liófilos apresentam afinidade pelo meio líquido, enquanto que os liófilos, não. Se o meio for a água, de acordo com a afinidade podemos classificá-los em hidrófilos e hidrófilos, respectivamente (ATTWOOD, 2005).

Os sistemas coloidais nos quais gomas são empregadas, assim como celulose e seus derivados fazem parte dos sistemas coloidais liófilos. Estes colóides são preparados por simples dispersão. Esses géis podem ser divididos em dois grupos, de acordo com a natureza das ligações entre as cadeias da rede (AULTON, 2005; ATTWOOD, 2005).

Géis do tipo I são sistemas constituídos por uma rede tridimensional onde as ligações covalentes prevalecem, sendo assim, sistemas irreversíveis. Exemplos típicos são redes intumescidas que foram formadas pela polimerização de monômeros de polímeros solúveis em água na presença de um agente reticulante.

Géis do tipo II são mantidos por ligações reversíveis, de natureza mais fraca, como as ligações de hidrogênio. São sensíveis às mudanças de temperatura, transformando-se em sóis com o aquecimento ou resfriamento dos géis. Em contato com a pele, géis do tipo II, como os formados a partir de álcool polivinílico, secam rapidamente, deixando um filme plástico com o fármaco em contato íntimo com a pele (AULTON, 2005; ATTWOOD, 2005).

Os géis são empregados como diferentes sistemas de transporte e têm evidenciado potencial terapêutico para uma grande variedade de princípios ativos, satisfazendo vários requisitos, como a prevenção da sua eliminação rápida do organismo, a redução da sua toxicidade sistêmica, a estabilização e a otimização do seu metabolismo e o direcionamento específico ao local alvo e os mecanismos de defesa. No entanto, têm sido reconhecidos vários outros desafios associados à liberação específica do fármaco ao local alvo, pelo que, para ultrapassar os obstáculos químicos e biológicos, a seleção do polímero utilizado para a preparação do sistema de transporte é de importância crucial. Dentre os principais polímeros empregados como agentes formadores de géis, podemos citar os poliacrilatos, que são formados a partir da polimerização do ácido acrílico, sendo que os mais utilizados são os carbômeros ou Carbopol[®] e os polimetacrilatos ou Eudragit[®] (SEVERINO *et al.*, 2011).

Os carbômeros ou Carbopol® são polímeros sintéticos do ácido acrílico, de elevado valor de massa molecular, reticulados com alil-sacarose ou ésteres alílicos de pentaeritritol. Apresentam-se como pó branco e leve, higroscópico com sabor ácido e de odor característico moderado. São extensamente utilizados em produtos destinados à aplicação não parenteral. Esses polímeros apresentam propriedades mucoadesivas e, por esta razão, são utilizados para prolongar o tempo de residência na via de administração de numerosos princípios ativos. Um importante fator para a bioadesão é o tamanho das partículas do sistema de transporte. As propriedades bioadesivas são otimizadas pela redução das dimensões das micropartículas, o que promove o aumento da força de adesão e/ou ao prolongamento do tempo na via de administração, resultando num aumento da biodisponibilidade do princípio ativo (BARRY, MEYER, 1979; KIM, *et al.*, 2003; SEVERINO *et al.*, 2011; VILLANOVA, *et al.*, 2010).

3.OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver um novo sistema de liberação transdérmica de zidovudina com nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) contendo zidovudina, revestidas com ácido hialurônico para ser aplicado na forma de gel.

3.2. Objetivos específicos

O presente trabalho tem como objetivos específicos:

- Desenvolver nanopartículas (nanoesferas) de poli (*n*-butil-cianoacrilato) contendo zidovudina revestidas com ácido hialurônico e caracterizar o sistema de liberação obtido com relação às suas propriedades físico-químicas e morfológicas;
- Desenvolver e validar um método analítico para quantificação do fármaco (AZT) nas nanopartículas desenvolvidas por espectrofotometria derivada no ultravioleta;
- Aplicar o método analítico desenvolvido para determinação da eficácia de encapsulação do fármaco (AZT) nas nanopartículas desenvolvidas por espectrofotometria derivada no ultravioleta;
- Desenvolver e estudar, de modo preliminar, a estabilidade de um gel contendo as naopartículas previamente desenvolvidas.

TRABALHO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO I

Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanopartículas de zidovudina constituídas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) revestidas por ácido hialurônico

1. INTRODUÇÃO

As pesquisas científicas buscam avanços tecnológicos que facilitem e melhorem a qualidade de vida das pessoas. Nesse sentido, a combinação da Biotecnologia com a Nanotecnologia origina a Nanobiotecnologia, que no desenvolvimento das formulações farmacêuticas e cosméticas permite a ação da substância ativa direcionada ao sítio alvo, demonstrando sua superioridade em relação à terapia convencional (DEVALAPALLY *et.al.*, 2007; SCHAFFAZIK *et al.*, 2003).

O desenvolvimento de sistemas carreadores nanoestruturados biodegradáveis para a liberação de fármacos vem despertando grande interesse. Esses sistemas coloidais apresentam diversas vantagens, tais como a possibilidade de proteção do ativo encapsulado frente a degradações *in vivo*, relativa estabilidade nos fluídos biológicos e capacidade de modulação da liberação do fármaco e, por isso, são considerados bastante promissores (DEVALAPALLY *et.al.*, 2007; SCHAFFAZIK *et al.*, 2003; TAVARES, 2013).

Vários estudos vêm se dedicando ao desenvolvimento de sistemas de liberação modificada para a zidovudina. Foram idealizados sistemas sob a forma de microesferas (ABBU-IZZA *et al.*, 1997; RAO *et al.*, 2005), lipossomas (JIN *et al.*, 2005; GARG; JAIN, 2006; KAUR *et al.*, 2008) e nanopartículas (DEMBRI *et al.*, 2001; HILLAREAU *et al.*, 2006; HILLAREAU *et al.*, 2007; LÖBENBERG *et al.*, 1997; MAINARDES *et al.*, 2009), sendo bem documentadas as vantagens das nanopartículas poliméricas em relação aos outros carreadores (REIS *et al.*, 2006; SCHAFFAZIK *et al.*, 2003). Apesar disso, atualmente, essas nanopartículas poliméricas coloidais são

consideradas as mais promissoras como sistemas de liberação de fármacos (CUNHA, 2008; VAUTHIER *et.al.*, 2003).

Com o objetivo de aumentar a estabilidade e potencializar a eficiência das nanopartículas nos fluídos biológicos, há relatos sobre modificação da superfície externa das mesmas. Tal modificação é usualmente realizada pelo revestimento com copolímeros anfifílicos ou polissacarídeos. Essa modificação pode ser alcançada por diferentes mecanismos, os quais envolvem interações eletrostáticas ou hidrofóbicas, bem como ligações covalentes entre o polímero de revestimento e a as nanoestruturas (DEVALAPALLY *et al.*, 2007; LEMARCHAND *et al.*, 2004; TAVARES, 2013).

O ácido hialurônico é uma substância viscosa e é empregada como agente de adesividade em medicamentos (YENICE *et al.*, 2008). Além disso, é um componente muito importante da matriz extracelular presente em tecidos de conexão, vítreo e fluídos sinoviais. Devido ao fato do ácido hialurônico ser biocompatível e apresentar as características citadas, é considerado um promissor agente de revestimento de nanopartículas, além de contribuir para a estabilidade desses nanocarreadores (HE *et.al.*, 2009).

Dessa maneira, o objetivo dessa etapa do trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar as potencialidades de um sistema inovador, baseado em nanopartículas (nanoesferas) de poli (*n*-butil-cianoacrilato) contendo zidovudina revestidas com ácido hialurônico, para administração transdérmica.

2. MATERIAL

2.1. Matérias-primas, solventes e reagentes

- Ácido clorídrico - Synth[®];
- Ácido hialurônico p.a.- Sigma[®];
- Água purificada - Milli-Q;
- Brometo de potássio - Neon[®];
- Dextran[®] – Sigma - Aldrich[®];
- Hidróxido de sódio - Synth[®];
- *n*-butil-2-cianoacrilato - Sichel Werk[®];
- Zidovudina, matéria-prima de grau farmacêutico de pureza (Farmanguinhos, Rio de Janeiro - RJ);
- Zidovudina, substância química de referência, grau de pureza > 99 % (Farmanguinhos, Rio de Janeiro - RJ);

2.2. Equipamentos e dispositivos diversos

- Agitador magnético IKA[®], modelo RCT B S 32;
- Balança analítica Mettler Toledo[®], modelo AB 204;
- Banho de ultrassom Thorton[®], modelo T14;
- Célula calorimétrica Exstar, modelo SII Nano[®], Technology Inc.;
- Centrífuga Quimis[®], modelo Q222T;
- Espectrofotômetro Vibracional Infravermelho Shimadzu[®], modelo IRAffinity-1;

- Liofilizador Terroni[®], modelo Enterprise I;
- Micropipeta monocanal 20 a 200 µL (*Pipetman*[®] P100);
- Potenciômetro Metrohm[®], modelo 827;
- *Zetasizer* 3000 HS Malvern[®].

3. MÉTODOS

3.1. Síntese das nanopartículas

3.1.1. Nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) (nanoesferas PBCA)

Para a preparação das nanopartículas, foi empregado o método de polimerização em emulsão, descrito na literatura (COUVREUR; VAUTHIER, 1991; CHAUVIERRE *et.al.*, 2003; LIU *et.al.*, 2009). Neste método, o monômero *n*-butil-cianoacrilato foi adicionado, por gotejamento, a uma solução de HCl 0,1 M contendo um estabilizante ou emulsionante, o Dextran[®]. Dessa forma, 100 µL do monômero *n*-butil-cianoacrilato, bem como 100 mg de Dextran[®] foram adicionados, sob agitação a 800 rpm, em uma solução aquosa de HCl 0,1 M (pH 2,5). Após um total de 4 horas de agitação, a polimerização foi finalizada por meio da adição de solução aquosa de NaOH 0,1 M, até ocorrer a neutralização da suspensão coloidal (pH = 7,0 ± 0,3) e, em seguida, filtrada com auxílio de membranas de acetato de celulose. Para purificação, as nanopartículas foram submetidas à centrifugação (20.000 rpm, 60 minutos, 25° C) (XI-XAO *et al.*, 2006) e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* obtido foi ressuspenso em água purificada, com auxílio de ultrassonificação por 15 min. e o pH foi ajustado para 7, com NaOH 0,1 M. (TAVARES, 2013; XI-XAO, *et.al.*, 2006).

3.1.2. Nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) contendo zidovudina (nanoesferas de PBCA-AZT)

Inicialmente, 100 µL do monômero *n*-butil-cianoacrilato, bem como 100 mg de Dextran[®] foram adicionados, sob agitação a 800 rpm, a uma solução aquosa de HCl 0,1 M (pH 2,5). Após 1 hora de agitação, 1 mL da suspensão de nanopartículas foi descartado e, em seguida, 1 mL de uma solução de AZT a 1% (10,0 mg/mL, em HCl 0,1 M, pH 2,5) foi adicionado ao meio reacional. Após um total de 4 h de agitação, a polimerização foi finalizada por meio da adição de solução aquosa de NaOH 0,1 M, até ocorrer a neutralização da suspensão coloidal (pH = 7,0 ± 0,3) que, em seguida, foi filtrada com auxílio de membranas de acetato de celulose. Para purificação, as nanopartículas foram submetidas à centrifugação (20.000 rpm, 60 minutos, 25° C) (XI-XAO *et.al.*, 2006) e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* obtido foi ressuspendido em água purificada, com auxílio de ultrassonificação por 15 min. o pH foi ajustado para 7, com NaOH 0,1M. (TAVARES, 2013; XI-XAO, *et.al.*, 2006).

3.2. Revestimento com ácido hialurônico das nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) contendo zidovudina (nanoesferas PBCA-AZT-AH)

O revestimento das nanopartículas foi realizado baseando-se no trabalho de HE e colaboradores (2009). Inicialmente, foi preparada dispersão de ácido hialurônico a 1% (p/v), empregando água purificada e essa dispersão foi submetida à agitação magnética em um erlenmeyer. Em seguida, a dispersão de nanopartículas foi adicionada sob gotejamento e agitação.

3.2.1. Planejamento estatístico

O planejamento estatístico para o estudo do revestimento das nanopartículas foi baseado em projeto fatorial 2^3 , (k=3, cada um com dois níveis) com oito combinações fator-nível. Foi adicionado ao planejamento um ponto central para a avaliação de estimativa da variabilidade do erro puro, ou seja, da variabilidade devida ao erro experimental. Os níveis máximo (+1) e mínimo (-1) para as variáveis independentes foram: 90 e 30 minutos, 0,5 e 0,1 % (p/v) e 200 e 100 rpm, respectivamente para tempo de agitação, concentração de AH e velocidade de agitação.

A matriz (Tabela 1) contemplou 11 experimentos sendo as variáveis independentes a concentração do ácido hialurônico (A), a velocidade de agitação (B) e o tempo de agitação (C). Em seguida, de acordo com a Tabela 1, a dispersão de nanopartículas foi adicionada sob gotejamento e agitação. As quantidades da dispersão de nanopartículas e de dispersão de ácido hialurônico variaram e o sistema foi submetido à agitação magnética por 30, 60 ou 90 min com velocidade de agitação de 100, 150 e 200 rpm, segundo planejamento estatístico.

Tabela 1 – Planejamento fatorial 2^3 com ponto central adicional para o estudo de revestimento das nanopartículas

EXPERIMENTO	TEMPO DE AGITAÇÃO (min)	CONCENTRAÇÃO DO REVESTIMENTO (%)	VELOCIDADE DE AGITAÇÃO (rpm)
1	30	0,1	100
2	90	0,1	100
3	30	0,5	100
4	90	0,5	100
5	30	0,1	200
6	90	0,1	200
7	30	0,5	200
8	90	0,5	200
9	60	0,3	150
10	60	0,3	150
11	60	0,3	150

Geometricamente, o planejamento consiste de cubo, conforme Figura 8. O planejamento permitiu a estimativa dos três efeitos principais (variáveis independentes: A, B, C) assim como as três interações de dois fatores (AB, AC e BC) e uma interação de três fatores (ABC). Dessa forma, o modelo fatorial completo pode ser apresentado da seguinte forma:

$$Y = \mu + A + B + C + AB + AC + BC + ABC + \varepsilon$$

Onde μ é a média geral, ε é o termo erro aleatório.

Figura 8 – Representação gráfica da matriz de ensaio para o revestimento das nanopartículas: concentração do ácido hialurônico (A), velocidade de agitação (B) e tempo de agitação (C).

3.3. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e distribuição de tamanho de nanopartículas

O diâmetro hidrodinâmico médio, a distribuição do tamanho e o índice de polidispersividade (IP) das nanopartículas foram avaliados pelo método de espalhamento de luz dinâmica (DLS). Foram utilizados 100 μL das suspensões de nanopartículas diluídos em 1,0 mL de água ultrapura Milli-Q, a fim de se obter a contagem adequada das partículas. As medidas foram executadas à temperatura de 25 °C e a um ângulo de 90°, utilizando-se o equipamento *Zetasizer 3000 HS* (Malvern Instruments, Malvern, UK). Os resultados foram obtidos a partir de 10 determinações, sendo as análises realizadas em triplicata.

3.4. Determinação do potencial zeta (ζ) das nanopartículas

O potencial zeta das nanopartículas foi avaliado por método de mobilidade eletroforética. A força do campo aplicado foi de 20 V/cm. A mobilidade electroforética da partícula foi em unidade de mV usando a equação Helmholtz- Smoluchowski. As amostras de nanopartículas (100 μ L) foram previamente diluídas em água e ajustadas a condutividade de 50 μ S/cm empregando 0,9% (v/v) de solução de NaCl, visando evitar flutuações nas medições decorrentes da variabilidade da condutividade e pH da água utilizada (água ultrapura Mill-Q®). As medidas foram executadas à temperatura de 25 °C e a um ângulo de 90°, utilizando-se o equipamento *Zetasizer* 3000 HS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Os resultados foram obtidos a partir de 10 determinações, sendo as análises realizadas em triplicata.

3.5. Caracterização das nanopartículas por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O objetivo dessas análises foi avaliar as interações entre as nanopartículas sintetizadas, o AZT e o ácido hialurônico (AH), empregado como o revestimento dessas partículas. Dessa maneira, foram analisadas amostras das nanopartículas de PBCA (nanopartículas brancas), das nanopartículas com AZT, das nanopartículas com AZT revestidas com AH, das nanopartículas brancas revestidas com AH, das misturas físicas, na proporção

1:1, das nanopartículas brancas e AZT, das nanopartículas com AZT e AH e das nanopartículas brancas e AH.

As análises foram realizadas em um Calorímetro de Varredura DSC 7020 (Exstar, SII Nano Technology Inc., Japão) no intervalo de temperatura de 25 a 400 °C, utilizando-se cápsulas de alumínio seladas hermeticamente, com massa de amostras de aproximadamente 2 mg, razão de aquecimento de 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min. Previamente às análises das amostras, o equipamento foi calibrado com índio metálico (ponto de fusão: 156,4 °C ($\Delta H_{\text{fusão}}$: 28,50 J.g⁻¹) no intervalo de temperatura compreendido entre 25 a 350 °C.

3.6. Caracterização das nanopartículas por Termogravimetria (TG)

Foram analisadas amostras das nanopartículas de PBCA (nanopartículas brancas), das nanopartículas com AZT, das nanopartículas com AZT revestidas com AH, das nanopartículas brancas revestidas com AH, das misturas físicas, na proporção 1:1, das nanopartículas brancas e AZT, das nanopartículas com AZT e AH e das nanopartículas brancas e AH.

As curvas de TG foram obtidas por meio TG/DTA 7200 (Exstar, SII Nano Technology Inc., Japão) no intervalo de temperatura de 25 a 600 °C, utilizando-se cápsulas de alumínio, com massa de amostras de aproximadamente 2,0 mg, razão de aquecimento de 10 °C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL/min. Previamente às análises das amostras, foi verificada a calibração do instrumento empregando-se um padrão de oxalato de cálcio.

3.7. Caracterização das nanopartículas por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho das amostras foram realizados região 4000-400 cm^{-1} , em um Espectrômetro Vibracional, modelo IRAffinity-1, à temperatura ambiente, em pastilhas contendo mistura de 1,0 mg de amostra e 200 mg de KBr. Os espectros foram adquiridos com resolução de 4 cm^{-1} e 64 scans/min.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características das nanopartículas são de fundamental importância para definição de seu comportamento *in vivo*, assim como para sua estabilidade durante o armazenamento. Dessa forma, variações no diâmetro de partícula e no mecanismo de associação do ativo nas nanopartículas influem no modo e perfil de liberação do fármaco. Modificações no valor de potencial zeta podem aumentar ou diminuir a estabilidade das partículas. Assim, esses diferentes parâmetros podem ser otimizados com intuito de obter uma formulação com características desejáveis (BAROLI, 2010; DEVALAPALLY *et.al.*, 2007; REIS *et al.*, 2006; SCHAFFAZIK *et al.*, 2003; STORPIRTIS, *et.al.*, 2009).

As condições de preparo das nanopartículas de PACA influem fortemente em suas características físico-químicas, tais como diâmetro hidrodinâmico médio, potencial zeta e porcentagem de incorporação do fármaco. Liu e Chen (2009) desenvolveram nanopartículas (nanoesferas) de poli(*n*-butil-cianoacrilato) contendo indometacina através do método de polimerização aniônica e os efeitos de diferentes variáveis do processo, como pH, concentração do tensoativo e quantidade do fármaco adicionado ao meio de polimerização, foram estudados. Além disso, nesse estudo, verificaram que a diminuição de pH leva ao decréscimo de potencial zeta para valores menos negativos, o que poderia prejudicar a estabilidade e a funcionalidade biológica desses nanossistemas.

Por outro lado, Vauthier e colaboradores (2007), em sua pesquisa afirmaram, que o meio reacional deve ser ajustado geralmente para pH 2,5

com solução diluída de HCl, pois a polimerização ocorre rapidamente nessa faixa de pH, sendo iniciada pelos íons hidroxila presentes na água ou pelos grupos nucleofílicos presentes nas cadeias dos tensoativos ou estabilizantes. Também foi observado que a polimerização é finalizada de 3 a 4 horas, sob agitação vigorosa, sendo o tempo de reação variado dependente do monômero empregado. Segundo HILLIAIREAU e colaboradores (2006), a polimerização é iniciada por meio de ataque nucleofílico.

As nanopartículas de PBCA foram sintetizadas a partir da polimerização do monômero *n*-butil cianoacrilato (BCA), o qual foi adicionado lentamente ao meio reacional contendo o agente estabilizante Dextran[®]. Como o monômero apresenta elevada reatividade, a reação foi conduzida em baixo valor de pH a fim de controlar a polimerização aniônica que ocorre espontânea e rapidamente, devido aos íons hidroxila presentes na água, bem como aos grupamentos alcoólicos (-OH) presentes na estrutura desse estabilizante. O Dextran[®] foi escolhido, uma vez que existem dados na literatura de que esse agente é capaz de gerar partículas com menor grau de agregação quando em comparação a outros tensoativos amplamente utilizados, como o Pluronic[®] F68 (REUKOV *et al.*, 2011; TAVARES, 2013).

Diante desse panorama, foi possível determinar que os parâmetros mais empregados e que permitem a obtenção de nanopartículas com características físico-químicas consideradas adequadas, são os listados a seguir:

- Concentração do monômero = 1%;
- Concentração do tensoativo/estabilizante (Dextran[®] 70.000) = 1%;
- pH do meio reacional = 2,5;

- Tempo de agitação do sistema para a obtenção das nanopartículas = 4 horas com posterior neutralização do meio reacional;
- Velocidade de agitação = 800 rpm;
- Temperatura = ambiente

Os resultados referentes ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas de PBCA sintetizadas nesse trabalho são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas de PBCA*

Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	Índice de polidispersividade	Potencial Zeta (mV)
151,6 ± 5,4	0,06 ± 0,02	- 1,46 ± 1,04

*Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 3).

De forma geral, os valores encontrados para tais características foram similares àqueles descritos na literatura quando da preparação dessas nanopartículas pelo método de polimerização em emulsão, na presença do Dextran[®] (BERTHOLON *et al.*, 2006). Além disso, os baixos valores de desvio padrão podem indicar uma boa reprodutibilidade do método utilizado.

Quanto aos resultados de índice de polidispersividade é possível constatar que as nanopartículas sintetizadas representam um sistema monodisperso, uma vez que a literatura aponta que amostras com valores próximos a 0,3 apresentam essa característica (KÜLKAMP *et al.*, 2009).

Segundo Reddy e Murthy (2004), os valores ligeiramente negativos de potencial zeta apresentados pelas amostras podem ser atribuídos ao baixo grau de dissociação dos grupamentos acrílicos presentes na estrutura das nanopartículas. Segundo Liu e Chen (2009), esses valores são explicados pela adsorção de ânions provenientes da fase aquosa.

Os resultados referentes ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas PBCA-AZT sintetizadas nesse trabalho são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 – Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas de PBCA-AZT*

Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	Índice de polidispersividade	Potencial Zeta (mV)
152,3 ± 5,9	0,055 ± 0,02	- 0,678 ± 0,08

*Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 3).

Os resultados relacionados ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas de PBCA-AZT são semelhantes aos das nanopartículas de PBCA (nanopartículas brancas). Sendo assim, quando resultados de índice de polidispersividade são avaliados, é possível constatar que as nanopartículas sintetizadas representam um sistema monodisperso.

Os resultados referentes ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade e potencial zeta referentes às nanopartículas de PBCA-AZT-AH sintetizadas nesse trabalho estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas de PBCA-AZT-AH*

Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	Índice de polidispersividade	Potencial Zeta (mV)
196,9 ± 4,1	0,440 ± 0,139	-25,6 ± 0,87

*Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 3).

A partir dos resultados obtidos foi observado aumento significativo no diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas de PBCA-AZT-AH, em comparação às nanopartículas não revestidas, conforme mostrado na Figura 9. Esse aumento constitui a primeira indicação da adsorção do polímero à superfície dos nanossistemas.

Gráfico de Cubo (médias ajustadas) para DM

Figura 9. Representação gráfica dos valores de diâmetro hidrodinâmico médio (DM) (nm) no revestimento das nanopartículas empregando AH.

Ampla distribuição normalmente apresenta IP entre 0,25 e 0,50. O $IP > 0,5$ indica ampla distribuição de tamanho de partícula, com forma desconhecida (DAS; NG; TAN, 2012).

No que diz respeito ao índice de polidispersividade, um ligeiro aumento desse valor em relação às nanopartículas de PBCA foi observado, conforme mostrado na Figura 10. Essa pequena variação sugere que as nanopartículas revestidas também apresentam tamanho homogêneo, sugerindo que houve revestimento de forma adequada. Vale ressaltar que tal valor encontra-se próximo a 0,3, indicando a obtenção de sistema com distribuição de tamanho de partículas adequada, ou seja, homogêneo.

Diversos autores na literatura apontam que a determinação do potencial zeta é uma das técnicas mais amplamente utilizadas para a comprovação do revestimento de nanoestruturas (CAMILO, 2007; LEMARCHAND *et al.*, 2004). Cabe ainda ressaltar que o maior valor, em módulo, do potencial zeta é capaz de aumentar a estabilidade das formulações, prevenindo a ocorrência de agregação. Nesse cenário, partículas apresentando valores positivos próximos a +30 mV e mais negativos próximos a -30 mV são consideradas mais estáveis (CAO *et al.*, 2009; TAVARES, 2013).

Gráfico de Cubo (médias ajustadas) para Pz

Figura 11. Representação gráfica dos valores de potencial zeta (mV) no revestimento das nanopartículas empregando ácido hialurônico (AH).

A Figura 11 apresenta os resultados obtidos para o potencial zeta em função das variáveis independentes: concentração de AH% (p/v), tempo de agitação (min) e velocidade de agitação (rpm). Foram observados valores entre -0,013 e - 26,8.

A partir dos resultados obtidos, pode-se perceber uma mudança significativa no potencial zeta das nanopartículas de PBCA-AZT-AH em comparação às nanopartículas não revestidas, conforme mostrado na Figura 11. Essa mudança sugere a adsorção do polímero à superfície dos nanossistemas.

Figura 12. Gráfico de série temporal para os valores de diâmetro hidrodinâmico médio (DM) (nm) no revestimento das nanopartículas empregando ácido hialurônico (AH).

Figura 13. Gráfico de série temporal para os valores de índice de polidispersividade (IP) no revestimento das nanopartículas empregando ácido hialurônico (AH).

Figura 14. Gráfico de série temporal para os valores de potencial zeta (Pz) (mV) no revestimento das nanopartículas empregando ácido hialurônico (AH).

As Figuras 12, 13 e 14 apresentam, respectivamente os valores diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade e potencial zeta obtidos no revestimento das nanopartículas empregando AH. No que se refere ao ponto central (nível 0 para as variáveis, $n=3$), adicionado ao planejamento fatorial, esse valor não representa o valor médio entre os valores mínimo e máximo obtidos no experimento, para as variáveis independentes. Dessa forma, esse resultado indica a presença de curvatura no modelo. Além disso, as réplicas, para cada variável, apresentaram valores idênticos permitindo estimativa independente do erro experimental (MONTGOMERY, 2004)

Tabela 5. Teste para significância dos coeficientes de regressão e índices de ajuste do modelo no ensaio para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio em função da concentração do AH% (p/v), tempo de agitação (min) e velocidade de agitação (rpm).

Termos	Efeito	Coeficiente	Coeficiente SE	Estatística T	Nível de significância (P)
Constante		174,125	0,318	548,35	0,000
Tempo agitação (min)	1,950	0,975	0,318	3,07	0,055
Concentração AH% (p/v)	42,150	21,075	0,318	66,37	0,000
Velocidade (rpm)	3,700	1,850	0,318	5,83	0,010
Tempo agitação (min) *	0,150	0,075	0,318	0,24	0,828
Concentração AH% (p/v)					
Tempo agitação (min) *	-0,200	-0,100	0,318	-0,31	0,773
Velocidade (rpm)					
Concentração AH% (p/v) *	5,300	2,650	0,318	8,35	0,004
Velocidade (rpm)					
Ponto Central		-21,725	0,608	-35,73	0,000
DP = 0,898146					
R-Sq = 99,95%		R-Sq (pred) = 96,83%		R-Sq(adj) = 99,69%	

Índices de ajuste do modelo: DP; desvio-padrão; R-sq.: coeficiente de determinação; R-sq (adj): coeficiente de determinação ajustado; R-sq(prev): coeficiente de determinação de previsão do modelo ajustado; coeficiente SE: erro padrão do coeficiente de regressão.

Com relação aos coeficientes de determinação, de determinação ajustado e de previsão, para a resposta diâmetro hidrodinâmico médio, os valores observados foram respectivamente de 99,95, 99,69 e 96,83%, de acordo coma a Tabela 5. Foi observado efeito de curvatura no modelo (valor-p igual a 0,000, $\alpha=0,05$, para o ponto central), conforme mencionado anteriormente. O desvio-padrão obtido foi 0,89, sendo esse valor considerado adequado (valor reduzido). Dessa forma, pode-se inferir que entre os efeitos principais, a concentração de ácido hialurônico (coeficiente igual a 21,075) foi a variável que apresentou maior influência no diâmetro hidrodinâmico médio (valor-p igual a 0,000, $\alpha=0,05$). Quanto a interação, foi observada significância

para aquela entre a concentração do ácido hialurônico (%p/v) e a velocidade de agitação (rpm) (valor-p igual a 0,004, $\alpha=0,05$).

Tabela 6. Teste para significância dos coeficientes de regressão e índices de ajuste do modelo no ensaio para avaliação do índice de polidispersividade em função da concentração do AH% (p/v), tempo de agitação (min) e velocidade de agitação (rpm).

Termos	Efeito	Coeficiente	Coeficiente SE	Estatística T	Nível de significância (P)
Constante		0,2625	0,00621	42,29	0,000
Tempo agitação (min)	0,0040	0,00200	0,00621	0,32	0,768
Concentração AH% (p/v)	0,37450	0,18725	0,00621	30,17	0,000
Velocidade (rpm)	0,02200	0,01100	0,00621	1,77	0,174
Tempo agitação (min) *	-0,01350	-0,00675	0,00621	-1,09	0,356
Concentração AH% (p/v)					
Tempo agitação (min) *	0,00500	0,00250	0,00621	0,40	0,714
Velocidade (rpm)					
Concentração AH% (p/v) *	0,01950	0,00975	0,00621	1,57	0,214
Velocidade (rpm)					
Ponto Central		-0,1125	0,0119	-9,47	0,002
DP = 0,0175547					
R-Sq = 99,70%		R-Sq (pred) = 80,99%		R-Sq(adj) = 99,01%	

Índices de ajuste do modelo: DP; desvio-padrão; R-sq.: coeficiente de determinação; R-sq (adj): coeficiente de determinação ajustado; R-sq(pred): coeficiente de determinação de previsão do modelo ajustado; coeficiente SE: erro padrão do coeficiente de regressão.

Para o índice de polidispersividade, os coeficientes de determinação, de determinação ajustado e de previsão foram respectivamente de 99,70, 99,01 e 80,99% (Tabela 6). De forma similar a análise anterior, foi observado efeito de curvatura no modelo (valor-p igual a 0,002 para o ponto central). O desvio-padrão obtido foi 0,017, sendo esse valor considerado adequado (valor reduzido). Dessa forma, pode-se inferir que entre os efeitos principais, a

concentração de ácido hialurônico (coeficiente igual a 0,187) foi a variável que apresentou maior influência no índice de polidispersividade (valor-p igual a 0,000, $\alpha=0,05$). Quanto a interação, não foi observada qualquer significância entre os efeitos. Os valores-p foram iguais a 0,356, 0,714 e 0,214 ($\alpha=0,05$), respectivamente para tempo agitação (min) * concentração AH% (p/v), tempo agitação (min) * velocidade (rpm) e concentração AH% (p/v) * velocidade (rpm).

Tabela 7. Teste para significância dos coeficientes de regressão e índices de ajuste do modelo no ensaio para avaliação do potencial zeta em função da concentração do AH% (p/v), tempo de agitação (min) e velocidade de agitação (rpm).

Termos	Efeito	Coeficiente	Coeficiente SE	Estatística T	Nível de significância (P)
Constante		13,880	0,166	83,73	0,000
Tempo agitação (min)	-0,379	-0,190	0,166	-1,14	0,336
Concentração AH% (p/v)	22,889	11,445	0,166	69,04	0,000
Velocidade (rpm)	1,044	0,522	0,166	3,15	0,051
Tempo agitação (min) * Concentração AH% (p/v)	-0,671	-0,335	0,166	-2,02	0,136
Tempo agitação (min) * Velocidade (rpm)	1,924	0,962	0,166	5,80	0,010
Concentração AH% (p/v) * Velocidade (rpm)	-1,594	-0,797	0,166	-4,81	0,017
Ponto Central		-9,9990	0,317	-31,47	0,000
DP = 0,468873					
R-Sq = 99,95%		R-Sq (pred) = 96,71%		R-Sq(adj) = 99,83%	

Índices de ajuste do modelo: DP; desvio-padrão; R-sq.: coeficiente de determinação; R-sq (adj): coeficiente de determinação ajustado; R-sq(pred): coeficiente de determinação de previsão do modelo ajustado; coeficiente SE: erro padrão do coeficiente de regressão.

No que se refere ao potencial zeta, os coeficientes de determinação, de determinação ajustado e de previsão foram respectivamente de 99,95, 99,83 e

96,71% (Tabela 7). Foi observado efeito de curvatura no modelo (valor-p igual a 0,000, $\alpha=0,05$, para o ponto central), conforme mencionado anteriormente. O desvio-padrão obtido foi 0,47, sendo esse valor considerado adequado (valor reduzido). Da mesma forma que as análises anteriores (Tabelas 5 e 6), pode-se inferir que entre os efeitos principais, a concentração de ácido hialurônico (coeficiente igual a 11,445) também foi a variável que apresentou maior influência no potencial zeta (valor-p igual a 0,000, $\alpha=0,05$). Quanto a interação, foi observada significância para aquela entre o tempo de agitação (min) e a velocidade concentração (rpm) (valor-p igual a 0,010, $\alpha=0,05$).

A análise dos resíduos (diferença entre a observação e a média do tratamento correspondente) para os valores de diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade (IP) e potencial zeta foi efetuada conforme Figuras 15, 16 e 17, respectivamente. A violação da suposição de independência dos erros pode invalidar as inferências realizadas por meio da análise de regressão, apresentada nas Tabelas 5, 6 e 7. Dessa forma, para a validade do modelo de regressão obtido é necessário confirmar a normalidade da distribuição dos resíduos, comprovar a ausência de autocorrelação desses e, ainda, a variância dos resíduos deve ser constante (ausência de heterocedasticidade) (MONTGOMERY, 2004).

Figura 15. Gráfico de resíduos no ensaio para avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio (DM) das nanopartículas em função do tempo de agitação (min), concentração do AH% e velocidade de agitação (rpm).

Figura 16. Gráfico de resíduos no ensaio para avaliação do índice de polidispersividade (IP) das nanopartículas em função do tempo de agitação (min), concentração do AH% e velocidade de agitação (rpm).

Figura 17. Gráfico de resíduos no ensaio para avaliação do potencial zeta (Pz) das nanopartículas em função do tempo de agitação (min), concentração do AH% e velocidade de agitação (rpm).

A suposição de normalidade foi verificada por meio do gráfico de probabilidade normal e pelo histograma dos resíduos. No gráfico de probabilidade normal, o resíduo é representado em função de seu valor esperado, calculado a partir da suposição de que os resíduos seguem distribuição normal. Considerando os resultados obtidos (Figuras 15, 16 e 17), a localização dos pontos em relação à curva de probabilidade permite inferir que a suposição de normalidade é válida (gráficos de histograma e de probabilidade normal). Além disso, foi observada ausência de heterocedasticidade (valores ajustados *versus* resíduos) e de correlação (valores observados *versus* resíduos).

Em resumo, os resultados obtidos demonstraram que a concentração de ácido hialurônico foi a variável que mais influenciou de forma significativa o

diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas durante o seu revestimento. Uma vez que o efeito de curvatura foi observado, não foi possível gerar uma equação que representasse o processo de revestimento dessas nanopartículas. Dessa forma, a análise estatística forneceu informações valiosas para futura otimização do processo de obtenção do nanossistema. Vale ressaltar que esse modelo explica a preparação de pequenos volumes de nanopartículas. Sendo assim, ajustes no processo de revestimento das nanopartículas possivelmente serão necessários na transposição de escala laboratorial para escala industrial (*scale-up*).

A análise térmica abrange um grupo de técnicas, a partir das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em função do tempo ou da temperatura enquanto que essa substância é submetida à uma programação controlada de temperatura e sob atmosfera especificada (IONASHIRO, GIOLITO, 1980; SILVA *et al.*, 2007). Essas técnicas permitem avaliar a estabilidade térmica e, com isso, determinar as temperaturas em que ocorrem as etapas de decomposição térmica da substância e dos produtos intermediários que se formam durante os processos térmicos, quando estão associados ou não a outras substâncias. Assim, a análise térmica tem se tornado uma ferramenta na área farmacêutica, atuando como parte integrante de diferentes etapas do desenvolvimento de medicamentos (VYAZOVKIN, 2008).

Com o objetivo de confirmar a ocorrência do revestimento das nanopartículas de PBCA-AZT, utilizando ácido hialurônico, bem como as possíveis interações entre esses constituintes, foram realizadas análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG). Dessa

forma, analisamos o comportamento térmico das amostras das nanopartículas de PBCA (nanopartículas brancas), das nanopartículas com AZT, das nanopartículas com AZT revestidas com AH, das nanopartículas brancas revestidas com AH, das misturas físicas, na proporção 1:1, das nanopartículas brancas e AZT, das nanopartículas com AZT e AH e das nanopartículas brancas e AH. A seguir, as curvas obtidas são apresentadas nas Figuras 18 a 23.

Figura 18 – Curvas de DSC de nanopartículas de PBCA, AH, nanopartículas revestidas (PBCA-AH) e mistura física (PBCA+AH) obtidas utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 2,0 mg, razão de aquecimento de 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/minuto.

A curva DSC (Figura 18) obtida para as nanopartículas de PBCA apresenta um pico endotérmico na faixa de 150-200°C que, devido ao seu perfil largo, é característico de eventos simultâneos e/ou subsequentes. Presumimos que esse evento ocorreu devido à perda de umidade durante a análise e, em seguida, dá-se início ao processo de degradação da estrutura polimérica do PBCA. Dessa forma, Sullivan e Birkinshaw (2004) observaram comportamento semelhante, o que foi atribuído ao evento de degradação. Como citado anteriormente, também foram realizadas análises termogravimétricas. Sendo assim, é possível observar que o PBCA manteve-se estável até cerca de 150 °C, quando ocorre a sua primeira etapa de decomposição. Na sequência, aproximadamente entre 175 a 250 °C, o polímero perde massa gradualmente e após 250°C, sofre perda de massa intensa, devido à decomposição (2ª. etapa).

O ácido hialurônico (AH), agente de revestimento das nanopartículas estudadas, apresenta comportamento de uma substância higroscópica. Pela análise da curva DSC obtida para o AH (Figura 18), é possível observar um comportamento estável até cerca de 180 °C, ocorrendo apenas um evento endotérmico intenso, provavelmente devido à perda de água. Após isso ocorrem eventos exotérmicos variados, sugerindo possível fusão acompanhada de decomposição. Esse comportamento pode ser confirmado pela análise da curva TG.

Figura 19 – Curvas de TG de nanopartículas de PBCA, AH, nanopartículas revestidas (PBCA-AH) e mistura física (PBCA+AH) obtidas utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 2,0 mg, razão de aquecimento de 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL/minuto.

Da mesma forma, ao analisarmos a curva de DSC para a formulação desenvolvida (PBCA-AH), foi verificada a ausência do pico exotérmico presente no termograma das nanopartículas de PBCA. Esse fato pode evidenciar a presença do revestimento, uma vez que não foi possível observar o evento referente à degradação das nanopartículas. Possivelmente, o AH adsorvido à superfície das partículas, seja capaz de protegê-las frente à degradação, uma vez que os eventos térmicos atribuídos à completa despolimerização desse derivado ocorrem em uma temperatura superior à degradação da estrutura polimérica das nanopartículas. Além disso, os eventos endotérmicos característicos do AH aparecem mais largos e/ou deslocados, indicando

possíveis interações entre essa substância e as nanopartículas de PBCA. Essa observação pode também reforçar a evidência da ocorrência do revestimento.

Finalmente, a partir da curva obtida para a mistura física (PBCA+AH), notam-se diferenças pronunciadas entre o comportamento térmico dessa mistura binária e aquele relativo à formulação revestida. Ainda, por meio desse termograma (Figura 18), podemos supor que haja algum tipo de interação, mesmo que fraca, entre as nanopartículas e o AH, uma vez que os picos encontram-se deslocados. No entanto, na mistura física, pode-se observar a presença do pico exotérmico referente à possível degradação das nanopartículas de PBCA, o que evidencia o não revestimento das mesmas. Os eventos descritos anteriormente podem ser confirmados pela análise da Figura 19.

Figura 20 – Curvas de DSC de nanopartículas de PBCA, AZT, nanopartículas de AZT (PBCA-AZT) e mistura física (PBCA+AZT) obtidas utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 2,0 mg, razão de aquecimento de 10 °C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/minuto.

Na análise das Figuras 20 e 21, foi observado que a zidovudina (AZT) é uma substância anidra e não higroscópica. Isso pode ser percebido, pois a AZT mantém-se estável em temperatura ambiente até cerca de 250 °C . A curva DSC da AZT demonstra um primeiro evento endotérmico, na faixa de temperatura de 114 °C a 134 °C, com um consumo de energia, característico do processo de fusão da substância. A curva DSC demonstra que a substância apresenta uma temperatura de fusão ao redor de 124 °C, confirmando o preconizado na literatura (USP 31, 2008; FARMACOPÉIA BRITÂNICA, 2009). O processo de decomposição tem início ao redor de 177 °C, sendo evidenciado por eventos consecutivos. O primeiro, um evento exotérmico, aconteceu na faixa de temperatura entre 177 e 247 °C. O segundo evento ocorrido foi um evento endotérmico e de menor intensidade e ocorreu entre 250 e 350 °C. A curva DSC da AZT apresentada neste estudo foi muito semelhante a obtida por Rodrigues e colaboradores (2005).

Figura 21 – Curvas de TG de nanopartículas de PBCA, AZT, nanopartículas de AZT (PBCA-AZT) e mistura física (PBCA+AZT) obtidas utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 2,0 mg, razão de aquecimento de 10 °C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL/minuto.

Na análise da curva de DSC para a formulação desenvolvida (PBCA-AZT), foi verificada a ausência do pico exotérmico presente no termograma das nanopartículas de PBCA. Esse fato pode evidenciar a associação entre o PBCA e o AZT, uma vez que não foi possível observar o evento referente à degradação das nanopartículas. Da mesma maneira, pode-se verificar um evento endotérmico de maior intensidade ao redor de 200 °C, indicando, portanto, que houve decomposição térmica nessa faixa de temperatura. Essa diferença de comportamento térmico sugere uma forte evidência de que houve a formação de uma interação diferente da que ocorre na mistura física de nanopartículas de PBCA e AZT.

A partir da curva de TG obtida para a mistura física (PBCA+AH) (Figura 19) é possível observar, diferenças pronunciadas entre o comportamento térmico dessa mistura binária e aquele relativo à formulação revestida, ou seja, a mistura física tem comportamento similar ao AZT e ao PBCA na região de temperatura até cerca de 200 °C. Observa-se que sua decomposição térmica ocorre em mais de uma etapa, confirmado em DSC.

Figura 22 – Curvas de DSC de nanopartículas de PBCA, AH, AZT, nanopartículas de AZT revestidas (PBCA-AZT-AH) e mistura física (PBCA-AZT+AH) obtidas utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 2,0 mg, razão de aquecimento de 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/minuto.

Finalmente, na curva de DSC para a principal formulação desenvolvida (PBCA-AZT-AH) (Figura 22), foi verificada a ausência do pico exotérmico presente no termograma das nanopartículas de PBCA. Esse fato pode comprovar a presença do revestimento, uma vez que não foi possível observar

o evento referente à degradação das nanopartículas. Possivelmente, ao AH adsorvido à superfície das partículas, seja capaz de protegê-las frente à degradação. Além disso, os eventos endotérmicos dessa formulação aparecem mais largos, indicando possíveis interações entre o AH e as nanopartículas de PBCA-AZT. Essa observação pode também reforçar a ocorrência do revestimento.

Figura 23 – Curvas de TG de nanopartículas de PBCA, AZT, nanopartículas de AZT revestidas (PBCA-AZT-AH) e mistura física (PBCA-AZT+AH) obtidas utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 2,0 mg, razão de aquecimento de 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL/minuto.

A partir da curva obtida para a mistura física (PBCA-AZT + AH), notam-se diferenças pronunciadas entre o comportamento térmico dessa mistura binária e aquele relativo à formulação revestida. Ainda, por meio desse termograma, podemos supor que haja algum tipo de interação, mesmo que

fraca, entre as nanopartículas e o AH, uma vez que os picos encontram-se deslocados. No entanto, pode-se observar a presença do pico exotérmico referente à possível degradação das nanopartículas de PBCA-AZT, o que evidencia o não revestimento das mesmas.

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos com o objetivo de caracterizar possíveis modificações ocorridas na estrutura das nanopartículas após o revestimento por ácido hialurônico. Com base nos resultados apresentados nas Figuras 24 a 26, pode-se observar que as principais bandas no espectro de nanopartículas de PBCA referem-se aos modos vibracionais característicos das ligações C-H (2985 cm^{-1}), $\text{C}\equiv\text{N}$ (2249 cm^{-1}), $\text{C}=\text{O}$ (1752 cm^{-1}), C-O (1258 cm^{-1}) e C-C (1459 cm^{-1}). Nesse caso, os resultados obtidos encontram-se semelhantes aos apresentados na literatura (HE et al. 2009; REDDY, MURTHY, 2004; SULLIVAN, BIRKINSHAW, 2004)

Figura 24. Espectros de infravermelho das amostras de AZT, nanopartículas de PBCA e nanopartículas de PBCA-AZT.

Figura 25. Espectros de infravermelho das amostras de AH, nanopartículas de PBCA, nanopartículas de PBCA-AZT e nanopartículas de PBCA-AH.

Figura 26. Espectros de infravermelho das amostras de AZT, AH, nanopartículas de PBCA-AZT e nanopartículas de PBCA-AZT-AH.

Da mesma forma, com base nos resultados apresentados nas Figuras 24 a 26, pode-se observar que a banda referente à ligação característica do

polímero PBCA (C $\equiv$ N) apresenta-se suprimida quando as nanopartículas são revestidas por AH. Tal observação pode indicar a ocorrência de interações químicas entre as nanopartículas e o AH e sugere a ocorrência do revestimento (HE et al. 2009; TAVARES, 2013). Lemarchand e colaboradores (2004), ao avaliar o processo de revestimento de nanopartículas semelhantes, sugerem que interações hidrofóbicas podem controlar a adsorção do polímero à superfície dessas estruturas.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos até o presente momento permitiram as seguintes conclusões:

- As condições utilizadas para a síntese das nanopartículas de PBCA, PBCA-AZT e PBCA-AZT-AH apresentaram-se satisfatórias. Além disso, as características físico-químicas dessas partículas (diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade e potencial zeta) foram bastante similares às descritas na literatura;
- Após o revestimento, foi observado um aumento significativo no diâmetro hidrodinâmico médio e mudança do potencial zeta das nanopartículas. Tais modificações indicam que o revestimento foi adequadamente alcançado. Além disso, todas as amostras apresentaram baixos índices de polidispersividade, sugerindo que o revestimento foi homogêneo.
- As análises térmicas indicaram uma possível comprovação da ocorrência do revestimento já que, para a formulação revestida, pôde-se perceber a ausência do evento exotérmico principal referente às nanopartículas de PBCA. Além disso, houve diferenças pronunciadas entre o comportamento térmico da mistura binária (nanopartículas de PBCA-AZT + AH) e aquele obtido para a formulação revestida;

- A partir dos espectros de absorção na região do infravermelho constatou-se evidência adicional da ocorrência do revestimento uma vez que, no espectro obtido para as nanopartículas de PBCA-AZT-AH foi observada a presença de todas as bandas do AH. Já a banda do PBCA ($C\equiv N$) apresentou-se suprimida.

CAPÍTULO II

Desenvolvimento, validação e aplicação do método analítico por Espectrofotometria Derivada para quantificação da zidovudina associada às nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) revestidas com ácido hialurônico

1. INTRODUÇÃO

O AZT é um fármaco hidrofílico e, uma vez que sofre extenso metabolismo de primeira passagem, apresenta baixa biodisponibilidade oral (60-65%). Adicionalmente, sua meia-vida é de aproximadamente 1 hora. Assim, para manter níveis terapêuticos adequados, altas doses são frequentemente administradas, sendo que esquemas terapêuticos prolongados com AZT podem causar efeitos indesejados como intoxicação da medula óssea, resultando granulocitopenia e anemia. Esses efeitos colaterais são dose-dependentes, porém, podem ser minimizados se as doses administradas diárias e as oscilações do nível plasmático efetivo do fármaco forem reduzidas (AMIDON *et al.*, 1995; BIOPHARMACEUTICAL CLASSIFICATION SYSTEM, 2011; BRASIL, 2003).

Com o objetivo de evitar tais efeitos indesejáveis e minorar as dificuldades referidas anteriormente, novos sistemas de liberação vem sendo desenvolvidos. Podem ser citadas as nanopartículas poliméricas, as vesículas lipídicas, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), as nanoemulsões, as nanopartículas magnéticas, entre outros (BAROLI, 2010; DEVALAPALLY, *et.al.*, 2007; DOMINGUES, *et.al.*, 2008; HARIVARDHAN-REDDY, MURTHY, 2004; KAUR, *et.al.*, 2008; LÖBENBERG, *et.al.*, 1997; MAINARDES, *et.al.*, 2009; OJEWOLE, *et al.*, 2008; RAO, *et al.*, 2005; REIS, *et al.*, 2006; SCHAFFAZICK, *et al.*, 2003; WILSON, *et al.*, 2008).

Nesse contexto, a quantificação do fármaco veiculado é um grande desafio durante o desenvolvimento desses diferentes sistemas de liberação. Isso ocorre não só devido à complexa composição dessas estruturas, mas

também pela necessidade de quantificação de pequenas quantidades de fármaco nelas contidas.

O doseamento da zidovudina é descrito na Farmacopéia Brasileira 5^a. ed. (2010) e outros compêndios na forma isolada, cuja técnica preconizada é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Por essa técnica, vários métodos analíticos são descritos para a quantificação de fármacos em nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) (PACA), (HE, *et.al.*, 2009; LIU, CHEN, 2009, XI-XAO *et.al.*; 2006). Apesar das inúmeras vantagens dessa técnica, podemos citar algumas limitações, como o alto custo dos reagentes empregados e da manutenção do aparelho, longos períodos de tempo para a execução das análises, necessidade de experiência e destreza na utilização do aparelho, uso de grandes quantidades de solventes, entre outras. Com o intuito de aplicar uma técnica simples, direta e menos onerosa em tempo e recursos, métodos empregando a espectrofotometria também foram aplicados para quantificação de fármacos em nanopartículas (LIU, CHEN, 2009; TAVARES *et al.*, 2012, WEISS *et.al.*, 2007). Embora muito mais simples, a espectrofotometria direta apresenta sérias dificuldades com relação à sobreposição de bandas interferentes devidas às complexas formulações.

Paralelamente, a técnica de espectrofotometria derivada (ED) de 1^a ordem com detecção no ultravioleta (UV), apresenta várias vantagens (CONSIGLIERE, *et al.*, 2001; DONATO, *et.al.*, 2010; GOMES *et.al.*, 2009; ICH, 2005; TSUBONE, C., *et.al.*, 2008), tais como:

- aplicação na análises de fármacos e excipientes na presença de diferentes matrizes;

- pode ser aplicado nos estudos de cinética de liberação de fármacos; nos estudos de estabilidade para quantificação do fármaco na presença de compostos de degradação;
- pode ser empregado para eliminação de bandas interferentes;
- possui curto tempo de análise;
- é uma técnica de baixo custo e que utiliza pequenas quantidades de solventes.

A ED de 1ª ordem é baseada no espectro derivado, o qual é gerado a partir do espectro convencional ou de ordem zero. A derivatização do espectro de ordem zero pode resultar na separação de sinais sobrepostos e/ou na eliminação de interferência causada pela presença de diferentes compostos em uma amostra, sem a necessidade de separação ou purificação prévias. Atualmente, a ED é considerada uma ferramenta útil para a resolução de vários problemas analíticos e, dessa forma, vêm sendo aplicada, sobretudo na área farmacêutica (GOMES *et.al.*, 2009; RANDAU *et.al.*, 2005; TAVARES *et.al.*, 2012).

De acordo com as características do espectro de ordem zero, deve ser escolhida a ordem de derivada de melhor sensibilidade para a análise a ser realizada. De acordo com CONSIGLIERI (1992) num espectro de zero ordem constituído por um pico simples, a derivada de 1ª ordem é representada pela diferenciação da absorção envolvida *versus* comprimento de onda ($dA/d\lambda$), caracterizado por um ponto máximo e outro mínimo. A distância vertical entre esses dois pontos é proporcional à concentração do analito que gerou o pico inicial. Teoricamente, o valor da derivada de 1ª ordem é igual a zero no comprimento de onda de máxima absorção do espectro convencional. O

espectro derivado de 2ª ordem ($d^2A/d\lambda$) tem dois máximos intercalados por um mínimo, no λ máximo do espectro normal.

Para a determinação dos sistemas multicomponentes pela espectrofotometria derivada, diversos métodos podem ser aplicados para a medida, como o método do ponto de anulação, o do zero pico e da tangente. O método mais utilizado é o do ponto de anulação, também conhecido como *zero crossing*, no qual a medida é realizada no comprimento de onda onde a derivada dos interferentes é igual a zero. Dessa forma, a leitura do valor da derivada é feita diretamente no equipamento e corresponde à absorbância devida ao componente que se deseja determinar (CONSIGLIERI *et al.*, 2001).

Uma vez que não há a descrição na literatura da quantificação da zidovudina em nanopartículas poliméricas por meio dessa técnica, o objetivo do presente capítulo foi desenvolver e validar um método por espectrofotometria derivada no UV para quantificação do AZT encapsulado nas nanopartículas de PBCA revestidas ou não com o AH.

2. MATERIAL

2.1. Matérias-primas, solventes e reagentes

- Acetonitrila grau cromatográfico - Merck®;
- Ácido clorídrico p.a. - Synth®;
- Ácido hialurônico p.a. – Sigma®;
- Água purificada Milli-Q – Millipore®;
- Dextran® FITC 70.000 p.a. – Sigma-Aldrich®;
- Hidróxido de sódio p.a. – Synth®;
- Metanol grau cromatográfico - Merck®
- *n*-butil-2-cianoacrilato p.a. - Sichel Werk®;
- Zidovudina, matéria-prima de grau farmacêutico de pureza (Farmanguinhos, Rio de Janeiro - RJ);
- Zidovudina, substância química de referência, grau de pureza > 99 % (Farmanguinhos, Rio de Janeiro - RJ);

Os reagentes empregados na síntese das nanopartículas foram previamente relacionados no Capítulo I, item 2.1.

2.2. Equipamentos e utensílios

- Balança analítica Mettler Toledo®, modelo AB 204;
- Banho de ultrassom Thorton®, modelo T14;
- Centrífuga Quimis®, modelo Q222T;
- Espectrofotômetro TermoHigro®, modelo Evolution 600, munido de cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e acoplado a computador;
- Tubos do tipo Eppendorf®;
- Tubos do tipo Falconn®;
- Ultrafiltro do tipo Amicon® Ultra-0,5.

3. MÉTODOS

No processo de validação, é importante detectar erros sistemáticos dos procedimentos analíticos e oferecer evidências comprovadas de que o método realiza o que pretende. Inicialmente, é necessário validar o método analítico em termos de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação (BRASIL, 2003; DIEFENBACH, *et al.*, 2008; FAN, STEWART, 2002; ICH, 2005; PEREIRA, *et al.*, 2005; RIBANI, *et al.*, 2004). Dessa forma, o método proposto nesse projeto será validado segundo esses critérios.

3.1. Condições analíticas

- Solvente: HCl 0,1M/Metanol:Acetonitrila (8:2, v/v)
- Ordem da derivada: 1ª ordem
- Delta lambda ($\Delta\lambda$): 2 nm
- Fator de escala: 1,0
- Velocidade de varredura: 240 nm/min
- Intervalo de varredura: 200 – 340 nm
- Método de quantificação: ponto de anulação

3.2. Preparo das soluções

Foram preparadas as seguintes soluções:

- Solução Padrão de AZT;
- Solução Placebo 1 (nanopartículas de PBCA);

- Solução Placebo 2 (nanopartículas de PBCA-AH);
- Solução Amostra 1 (nanopartículas de PBCA na presença de AZT);
- Solução Amostra 2 (nanopartículas de PBCA-AH na presença de AZT).

3.2.1. Solução padrão de AZT

Foram pesados exatamente cerca de 100 mg de AZT, substância química de referência, e transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 250 mL. Adicionou-se 1,0 mL de HCl 0,1 M e homogeneizou-se. Deixou-se a solução em ultrassom por 10 min. e completou-se o volume com Metanol:Acetonitrila (MeOH:ACN) (8:2, v/v). Foram transferidos 5,0 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se uma concentração final de 20 µg/mL de AZT.

3.2.2. Soluções dos placebos

- *Nanopartículas de PBCA (placebo 1):*

Pipetaram-se 10,0 mL da suspensão de nanopartículas e transferiram-se para balão volumétrico de 250 mL. Adicionou-se 1,0 mL de HCl 0,1M e homogeneizou-se. Deixou-se a solução em ultrassom por 10 min. e completou-se o volume com MeOH:ACN (8:2, v/v). Foram transferidos 5,0 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com o mesmo solvente. Retiraram-se 15,0 mL dessa solução e transferiram-se para

tubo tipo Falcon®. A solução obtida foi centrifugada a 10.000 rpm, por 60 min. à temperatura ambiente e o sobrenadante foi utilizado para a leitura no espectrofotômetro.

- *Nanopartículas de PBCA-AH (placebo 2):*

Pipetaram-se 10,0 mL da suspensão de nanopartículas revestidas (PBCA-AH) e transferiram-se para balão volumétrico de 250 mL. Adicionou-se 1,0 mL de HCl 0,1M e homogeneizou-se. Deixou-se a solução em ultrassom por 10 min. e completou-se o volume com MeOH:ACN (8:2, v/v). Foram transferidos 5,0 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com o mesmo solvente. Retiraram-se 15,0 mL dessa solução e transferiram-se para tubo tipo Falcon®. A solução obtida foi centrifugada a 10.000 rpm, por 60 min. à temperatura ambiente e o sobrenadante foi utilizado para a leitura no espectrofotômetro.

3.2.3. Soluções da amostra

- *Amostra simulada de Nanopartículas de PBCA com AZT (amostra 1)*

Foram pesados exatamente cerca de 100 mg de AZT (substância química de referência) e transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 250 mL. Pipetaram-se 10 mL da suspensão de nanopartículas de PBCA e transferiram-se para o referido balão. Adicionou-se 1,0 mL de HCl

0,1 M e homogeneizou-se. Deixou-se a solução em ultrassom por 10 min. e completou-se o volume com MeOH:ACN (8:2, v/v). Foram transferidos 5,0 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se concentração final de AZT igual a 20,0 µg/mL. Retiraram-se 15,0 mL desta solução e transferiram-se para tubo tipo Falcon®. A solução obtida foi centrifugada a 10.000 rpm, por 60 min. à temperatura ambiente e o sobrenadante foi utilizado para a leitura no espectrofotômetro.

- *Amostra simulada de Nanopartículas de PBCA-AH com AZT (amostra 2)*

Foram pesados exatamente cerca de 100 mg de AZT (substância química de referência) e transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 250 mL. Pipetaram-se 10,0 mL da suspensão de nanopartículas de PBCA-AH e transferiram-se para o referido balão. Adicionou-se 1,0 mL de HCl 0,1 M e homogeneizou-se. Deixou-se a solução em ultrassom por 10 min. e completou-se o volume com MeOH:ACN (8:2, v/v). Foram transferidos 5,0 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se concentração final de AZT igual a 20,0 µg/mL. Retiraram-se 15,0 mL desta solução e transferiram-se para tubo tipo Falcon®. A solução obtida foi centrifugada a 10.000 rpm, por 60 min. à temperatura ambiente e o sobrenadante foi utilizado para a leitura no espectrofotômetro.

3.3. Especificidade (pesquisa de interferentes)

Avaliou-se a especificidade do método por meio da análise das soluções padrão, placebos (1 e 2) e amostras (1 e 2). Após o aparelho ter sido calibrado com HCl 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v), realizou-se a varredura no intervalo de 200-340 nm. A partir do espectro obtido, foram obtidas as derivadas de 1ª ordem.

3.4. Linearidade

Para a avaliação da linearidade, foram preparadas em triplicata, soluções de AZT em HCl 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v), nas concentrações de 1,25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 5,0 µg/mL; 8,0 µg/mL; 10,0 µg/mL; 16,0 µg/mL; 20,0 µg/mL e 40 µg/mL. Após o aparelho ter sido calibrado com HCl 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v), realizou-se a varredura no intervalo de 200-340 nm. A partir dos espectros obtidos, as derivadas de 1ª ordem foram obtidas e a curva analítica foi construída. A linearidade foi avaliada pela análise de regressão linear, utilizando ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados.

3.5. Precisão e exatidão:

Com o objetivo de determinar precisão e exatidão intra-dia, alíquotas de 10,0 mL dos placebos 1 e 2 foram adicionadas a soluções de AZT nas concentrações de 25,0; 50,0 e 200,0 µg/mL. Cada amostra foi diluída com HCl

0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v) para obter concentrações iguais a 2,5; 5,0 e 20,0 µg/mL. Alíquotas dessas soluções foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 60 min. à temperatura ambiente e o sobrenadante foi utilizado para a leitura no espectrofotômetro. Após o aparelho ter sido zerado com HCl 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v), a varredura foi realizada no intervalo de 200-340 nm. A partir do espectro obtido, as derivadas de 1ª ordem foram obtidas.

Para a determinação da precisão e exatidão inter-dia, o mesmo procedimento foi realizado. No entanto, as leituras foram realizadas três vezes, por três dias consecutivos.

Os resultados de precisão foram expressos pelo coeficiente de variação (CV%), de acordo com a Equação 1:

$$CV(\%) = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{média}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Os resultados de exatidão foram expressos de acordo com a Equação 2:

$$E(\%) = \frac{\text{valor mensurado}}{\text{valor teórico}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

3.6. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ):

O limite de detecção é o menor valor de concentração da substância em análise possível de ser detectado, porém não quantificado precisa e exatamente (BRASIL, 2003). Empregando-se a Equação 3, o LD foi calculado, baseando-se na curva analítica:

$$LD = \frac{3.3\sigma}{IC} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde, LD é o limite de detecção estimado ($\mu\text{g/mL}$), σ , o desvio padrão médio obtido por meio da curva de analítica e IC, a inclinação da curva de analítica.

Empregando-se a Equação 4, o LD foi calculado, baseando-se na curva de analítica:

$$LQ = \frac{10\sigma}{IC} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde, LQ é o limite de quantificação estimado ($\mu\text{g/mL}$), σ , o desvio padrão médio obtido por meio da curva de analítica e IC, a inclinação da curva de analítica.

3.7. Determinação da Eficácia de Encapsulação do fármaco às nanopartículas de PBCA-AH

Em um tubo de ensaio (Tubo 1), a 200 μL da suspensão de nanopartículas PBCA-AH-AZT foram acrescentados 3,0 mL de HCl 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v). Em outro tubo de ensaio (Tubo 2), a 200 μL da suspensão de nanopartículas PBCA-AH foram acrescentados 3,0 mL de HCl 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v). Teoricamente, cada 200 μL da suspensão possuem 200 μg do fármaco. Em seguida, os materiais dos tubos 1 e 2 foram transferidos para tubos tipo Falcon[®] e centrifugados a 10000rpm por 15 minutos a 20,0°C. Os sobrenadantes dos Tubos 1 e 2 foram submetidos a varredura no intervalo de 200-340 nm, empregando-se como branco HCl 0,1M/MeOH:ACN

(8:2, v/v). Em paralelo, uma solução padrão de AZT de concentração de 20 µg/mL de AZT em HCl 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v) foi submetida ao mesmo procedimento. Os valores de absorbância utilizados foram os da de 1ª derivada em 290,0 nm. Sendo assim, foi possível obter a concentração total de fármaco (C_T).

Em ultrafiltro do tipo Amicon® Ultra-0,5, acoplado a um tubo tipo Eppendorf®, foram acrescentados 200 µL da suspensão de nanopartículas PBCA-AH-AZT. O sistema tubo Eppendorf®-ultrafiltro foi submetido à centrifugação a 10000rpm por 15 minutos a 20,0° C. Com esse procedimento de ultrafiltração- centrifugação foi possível obter um filtrado com a porção do fármaco livre (F_L). Cerca de 140,0 µL do ultrafiltrado foram acrescidos de 60,0 µL de água ultrapura e transferidos para um tubo de ensaio (Tubo 3) ao qual foram adicionados 3,0 mL de HCl 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v). Essa solução foi submetida a varredura no intervalo de 200-340 nm, empregando-se como branco HCl 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v) e verificando a absorbância conforme descrito para a suspensão de nanopartículas e empregando a seguinte equação (Equação 5).

$$\%EE = \frac{CT-FL}{CT} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde: EE = eficácia de encapsulação

CT = concentração total

FL = fármaco livre (não-encapsulado).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi desenvolvido método para quantificação da zidovudina associada às nanopartículas baseado na espectrofotometria derivada. Essa etapa é um grande desafio, uma vez que a quantidade de fármaco associado é pequena e também devido à complexa composição das nanoesferas. Várias são as técnicas analíticas empregadas para a quantificação de fármacos em nanopartículas de PACA. A mais citada na literatura é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (HE, *et.al.*, 2009; LIU, CHEN, 2009, XI-XAO, *et.al.*, 2006).

A espectrofotometria derivada (ED) é uma transformação matemática do espectro de ordem zero em um espectro em derivada (PASCHOAL *et al.*, 2003, TAVARES *et al.*, 2012), consiste na diferença da absorção (dA) *versus* variação do comprimento de onda (dλ) (CONSIGLIERI, 1992, DONATO *et al.*, 2010). Portanto, a derivação do espectro não aumenta o conteúdo de informações da análise, uma vez que estas são as mesmas contidas no espectro de ordem zero, ela somente individualiza os constituintes, permitindo uma melhor visualização das pequenas características espectrais (DONATO *et al.*, 2010, PASCHOAL *et al.*, 2003).

A espectrofotometria derivada apresenta maior seletividade quando comparada à espectrofotometria convencional. A espectrofotometria derivada também pode ser mais sensível, em certas situações, como quando a banda é mais larga e menos aguda que seu interferente (CONSIGLIERI, *et al.*, 2001, TAVARES *et al.*, 2012). O aumento da seletividade deve-se à separação das bandas sobrepostas, enquanto que o aumento da sensibilidade é devido à

amplificação do sinal da derivada e à diminuição do ruído (DONATO *et al.*, 2010, PASCHOAL *et al.*, 2003). Seu uso está baseado no fato de que o sinal obtido, numa determinada faixa de concentração, é proporcional à concentração da substância, ou seja, segue a lei de Beer-Lambert. (WEISS *et.al.*, 2007; LIU, CHEN, 2009).

Na literatura são descritos vários solventes para a ruptura das nanopartículas e, conseqüente, quantificação do fármaco associado. Dentre esses, clorofórmio (WEISS *et al.*, 2007), metanol (HE *et al.*, 2009), álcool (PASCHOAL *et al.*, 2003) e acetonitrila (MAKSIMENKO *et al.*, 2008) são os mais amplamente empregados. Esses solventes, bem como suas misturas em diferentes proporções, foram avaliados em relação à habilidade de rompimento das partículas.

Na avaliação do espectro de ordem zero do AZT em presença de nanopartículas de PBCA e PBCA-AH, é possível observar a interferência dessas substâncias no espectro de absorção do fármaco (Figura 27). Por conseguinte, a espectrofotometria convencional, ou de ordem zero, não pode ser indicada para a quantificação do fármaco associado ao sistema nanoestruturado.

Figura 27 – Espectro de ordem zero de: (a) PBCA em presença de AZT (20,0 µg/mL), (b) PBCA-AH em presença de AZT (20,0 µg/mL), (c) AZT (20,0 µg/mL), (d) PBCA, (e) PBCA-AH. Solvente: HCl 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v).

Dessa maneira, com o objetivo de quantificar o AZT por meio de uma técnica direta, de fácil execução, sem emprego de grandes quantidades de solvente, utilizou-se a espectrofotometria derivada de 1ª ordem (ED^1) cuja aplicação possibilitou a remoção de interferências por meio do método do ponto de anulação ou *zero-crossing*. Os espectros de ED^1 referentes aos placebos 1 e 2, zidovudina (AZT), bem como das nanopartículas em presença do AZT (soluções amostra 1 e 2) são mostrados na Figura 28. A partir da

análise desses espectros, é possível observar que, em 290 nm há a anulação da interferência dos constituintes das nanopartículas e o sinal referente ao AZT, embora não na sua maior amplitude, exibe valor que denota ainda boa sensibilidade e que pode apresentar razoáveis precisão e exatidão. Portanto, esse comprimento de onda foi selecionado para dar andamento à validação do método.

Figura 28 – Espectros derivados de 1ª ordem de: (a) PBCA-AH, (b) PBCA, (c) PBCA-AH em presença de AZT (20,0 µg/mL), (d) AZT (20,0 µg/mL), (e) PBCA em presença de AZT (20,0 µg/mL). Solvente: HCl 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v).

O método do ponto de anulação é bastante seguro no que diz respeito à eliminação do interferente na análise, assim como sua medida pode ser realizada pela leitura direta no equipamento, evitando a confecção de gráficos ou outros cálculos e, por esse motivo é o método de escolha na maioria das vezes. Com a adoção desse método, há a necessidade de preparo de um placebo com os constituintes da matriz exceto o fármaco a ser determinado, a fim de determinar com mínima margem de erro, o comprimento de onda no qual o placebo apresenta derivada igual a zero. Assim, uma desvantagem é o prévio conhecimento da composição da matriz ou excipiente no qual está misturado ou dissolvido o analito (CONSIGLIERI, 1992).

Para que o espectro da derivada seja de boa qualidade, alguns parâmetros devem ser avaliados e determinados, dentre eles o fator de escala, o delta lambda ($d\lambda$) e a velocidade da varredura são de extrema importância. O fator de escala deve ser ajustado para melhor visualização no espectro. (DONATO *et al.*, 2010).

O delta lambda ($\Delta\lambda$), intervalo de diferenciação dos valores de absorbância em função do comprimento de onda, é um dos principais parâmetros instrumentais a ser ajustado. À medida que o $\Delta\lambda$ é aumentado, melhor é a definição do espectro derivado e maior a amplitude, entretanto, o emprego de $\Delta\lambda$ muito elevados leva à perda de resolução uma vez que há perda de informação do espectro de zero ordem. Quando o $\Delta\lambda$ é muito baixo, o ruído pode interferir na análise. (MORELLI, 2003; CONSIGLIERI, 1992). A velocidade da varredura interfere não somente no tempo de análise, mas sobretudo na resolução do espectro de absorção normal. Velocidades de varredura muito rápidas acarretam igualmente perda de informação a partir do

espectro normal (CONSIGLIERI, 1992). Sendo assim, após testar vários parâmetros, optou-se por $\Delta\lambda$ igual a 2 nm e velocidade de varredura igual a 240 nm/min, uma vez que esses parâmetros não ofereceram perda de resolução.

Sendo assim, foi possível obter as derivadas das soluções do padrão, dos placebos e das amostras e demonstrar que o método se aplica para eliminar a interferência dos polímeros e demais constituintes e viabilizar a quantificação de AZT nas nanopartículas de PBCA revestidas ou não com o AH.

A linearidade é avaliada por meio da curva analítica e está relacionada com a capacidade do método em demonstrar que os resultados experimentais obtidos são diretamente proporcionais à resposta instrumental (SHABIR, 2003; TAVARES, 2013). Para a avaliação da linearidade, foram preparadas com o emprego de balões volumétricos, em triplicata, soluções de AZT em HCl 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v), nas concentrações de 1,25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 5,0 µg/mL; 8,0 µg/mL; 10,0 µg/mL; 16,0 µg/mL; 20,0 µg/mL e 40 µg/mL. Após o aparelho ter sido calibrado com HCl 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v), realizou-se a varredura no intervalo de 200-340 nm. A partir dos espectros obtidos, as derivadas de 1ª ordem foram traçadas e a curva analítica foi construída. Os espectros de ED¹ obtidos, bem como a curva analítica construída a partir das amplitudes dos picos a 290 nm, estão mostrados nas Figuras 29 e 30, respectivamente.

Figura 29 – Espectros derivados de 1ª ordem sobrepostos de soluções de AZT nas concentrações de 1,25 a 40 µg/mL.

Figura 30 – Curva analítica obtida a partir da medida de absorbância em 290 nm. Solvente: HCl 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v).

A partir dos resultados encontrados, observou-se correlação linear (0,9807) entre a amplitude dos picos a 290,0nm e as concentrações correspondentes de AZT no intervalo de 1,25 a 40,0 $\mu\text{g/mL}$ e, portanto, o método mostrou-se linear.

A precisão de uma metodologia analítica representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra homogênea, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas e padronizadas. A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Dessa forma, os valores de precisão,

calculados como CV (%) e exatidão (E%), intra- e inter-dia, para os placebos 1 e 2 são mostrados nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

Tabela 8 – Ensaio intra e inter-dia para a determinação da precisão e exatidão do método de ED1 (290,0 nm) para o placebo 1

Intra-dia				Inter-dia		
Concentração de AZT (µg/mL)	Média ^a ± d.p. (µg/mL)	CV (%)	E (%)	Média ^b ± d.p. (µg/mL)	CV (%)	E (%)
2,5	2,42±0,009	0,36	96,6	2,40±0,058	2,43	95,7
5	5,34±0,103	1,93	105,2	5,26±0,087	1,65	105,2
20	19,71±0,067	0,34	98,5	19,72±0,049	0,25	98,6

^a n=3; ^b n=9; d.p. = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; E = exatidão.

Tabela 9 – Ensaio intra e inter-dia para a determinação da precisão e exatidão do método de ED1 (290,0 nm) para o placebo 2

Intra-dia				Inter-dia		
Concentração de AZT (µg/mL)	Média ^a ± d.p. (µg/mL)	CV (%)	E (%)	Média ^b ± d.p. (µg/mL)	CV (%)	E (%)
2,5	2,55±0,057	2,22	102,1	2,55±0,060	2,32	101,9
5	4,53±0,065	1,44	96,4	4,63±0,061	1,3	98,4
20	20,15±0,021	0,10	100,7	20,15±0,019	0,10	100,7

^a n=3; ^b n=9; d.p. = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; E = exatidão.

O limite de detecção (LD) é o menor valor de concentração da substância em análise possível de ser detectado, porém não quantificado precisa e exatamente (BRASIL, 2003). Empregando-se a Equação 3, item 3.6, o LD estimado de AZT foi igual a 0,03 µg/mL. Portanto, valores de

concentração de AZT igual ou superior ao LD foram diferenciados do ruído do equipamento e detectados (BRASIL, 2003).

Por outro lado, o limite de quantificação (LQ) de um método de análise reflete a menor concentração da substância em exame que possa ser medida precisa e exatamente, utilizando um determinado procedimento analítico (BRASIL, 2003). Nesse sentido, o LQ estimado, segundo a Equação 4, , item 3.6, foi de 0,10 µg/mL. Como consequência, valores de AZT igual ou superior ao valor estimado são quantificados com precisão e exatidão aceitáveis pela metodologia empregada, demonstrando a boa sensibilidade do método (BRASIL, 2003).

Nesse trabalho, foi possível determinar a eficácia de encapsulação do AZT durante o processo de obtenção das nanopartículas. O resultado obtido foi de, aproximadamente, 63,98% quando da utilização da concentração inicial de AZT igual a 0,2 mg/mL. Apesar de representar um índice satisfatório, consideramos que essa porcentagem não alcançou valores mais elevados devido ao fato de que, no pH ácido utilizado para a preparação das nanopartículas, o AZT encontra-se na forma ionizada. Assim, esse fator faz com que o fármaco tenha uma maior afinidade pelo meio aquoso externo em detrimento às nanopartículas. Esses resultados vão ao encontro àqueles obtidos nos trabalhos de Liu e Chen (2009) e Simenova e colegas (2009). Em ambos os casos, os autores demonstraram que a eficiência de incorporação torna-se menor à medida que a concentração do princípio ativo era incrementada, o que comprova a teoria de que a encapsulação de fármacos nas nanopartículas de PBCA é um processo saturável.

5. CONCLUSÕES

- Até o presente momento não foi encontrada descrição na literatura da quantificação da zidovudina em nanopartículas poliméricas empregando essa técnica. Sendo assim, nessa etapa do trabalho foi desenvolvido e validado um método por espectrofotometria derivada (ED¹) no UV para quantificação do AZT encapsulado em nanopartículas de PBCA revestidas ou não com o AH. Sendo assim, o método, conforme resultados obtidos nos espectros derivados, mostrou-se adequado para eliminar os interferentes na matriz.

- Da mesma forma, esse método mostrou-se adequado na determinação da eficácia de encapsulação do AZT às nanopartículas desenvolvidas.

CAPÍTULO III

**Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel
contendo nanopartículas PBCA- AZT-AH**

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de formulações tópicas e/ou transdérmicas é uma estratégia interessante visando o transporte de fármacos quando essa é uma alternativa para superar aspectos indesejados relacionados às características farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos fármacos. A administração pela via transdérmica oferece vantagens em diversas circunstâncias quando comparada às outras vias de administração. O metabolismo pré-sistêmico, responsável por degradar diversos fármacos e diminuir a biodisponibilidade, é um problema comum para fármacos administrados por via oral. Sendo assim, a via transdérmica impede que esse efeito ocorra, evitando ou diminuindo os efeitos indesejáveis gerados. Da mesma forma, a via transdérmica oferece vantagem sobre as vias intravenosa e intramuscular por ser indolor e não invasiva, aumentando a adesão do paciente à terapia (ALLEN JR., *et.al.*, 2007).

Muitos fatores alteram a qualidade do medicamento, incluindo a estabilidade do princípio ativo, a interação entre excipientes e princípios ativos, a técnica de manipulação, a forma farmacêutica, o recipiente de acondicionamento, as condições de armazenamento e transporte, além do período entre a manipulação/produção e a administração (BRASIL, 2004, FRIEDRICH *et.al.*, 2007, MANFIO *et.al.*, 2007, REMINGTON, 2004, SILVA *et.al.*, 2009).

A estabilidade é a extensão na qual o produto retém, dentro de limites especificados e por todo o seu período de armazenamento e uso (prazo de validade), as mesmas propriedades e características que possuía no momento de sua fabricação. Dessa maneira, cinco requisitos de estabilidade são

considerados importantes (ALLEN JR., *et.al.*, 2007, AULTON, 2005, BRASIL, 2004, MANFIO *et.al.*, 2007, SILVA *et.al.*, 2009):

- *Estabilidade química*: a substância ativa mantém sua integridade química e a potência rotulada dentro de limites especificados;
- *Estabilidade física*: as propriedades físicas originais, incluindo aspecto, características organolépticas, uniformidade, entre outras, são mantidas;
- *Estabilidade microbiológica*: a esterilidade ou resistência ao crescimento microbiano é retida de acordo com os critérios especificados. Os conservantes retêm a efetividade dentro dos limites especificados;
- *Estabilidade terapêutica*: os efeitos terapêuticos permanecem inalterados;
- *Estabilidade toxicológica*: Nenhum aumento significativo na toxicidade do fármaco ocorre desde o preparo até a utilização do medicamento.

Os estudos de estabilidade fornecem indicações sobre o comportamento do produto, desde a fabricação até o término de validade, frente às condições ambientais que possa ser submetido. Os estudos de estabilidade contribuem para (BRASIL, 2004, FRIEDRICH *et.al.*, 2007, REMINGTON, 2004, SILVA *et.al.*, 2009):

- Orientar o desenvolvimento da formulação e do material de acondicionamento adequado;
- Fornecer subsídios para o aperfeiçoamento das formulações;

- Estimar o prazo de validade e fornecer informações para a sua confirmação;
- Conhecer as vias de degradação e produtos de decomposição do fármaco;
- Detectar possíveis interações com demais componentes da formulação;
- Auxiliar o monitoramento da estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica, produzindo informações sobre a confiabilidade e segurança dos produtos.

Cada componente pode afetar a estabilidade de um produto. Variáveis relacionadas à formulação, ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte podem influenciar na estabilidade do produto. Conforme a origem, as alterações podem ser classificadas como extrínsecas, quando determinadas por fatores externos (tempo, luz, temperatura, oxigênio, umidade, material de acondicionamento, microrganismos e vibração); ou intrínsecas, quando determinadas por fatores internos (incompatibilidades físico-químicas entre os componentes da formulação) (AULTON , 2005, BRASIL, 2004, REMINGTON, 2004).

Os estudos de estabilidade devem ser realizados antes de disponibilizar os produtos ao consumo, requisito fundamental à qualidade e à segurança dos mesmos. Produtos expostos ao consumo e que apresentem problemas de estabilidade físico-química e/ou microbiológica, além de descumprirem os requisitos técnicos de qualidade, podem colocar em risco a saúde do consumidor e configurar infração sanitária. Pelo perfil de estabilidade de um

produto, é possível avaliar seu desempenho, segurança e eficácia (BRASIL, 2004).

Nesses estudos, é muito comum haver uma avaliação detalhada das características reológicas e organolépticas dos géis, pois essas fornecem informações importantes sobre o comportamento das formulações frente a condições diversas no decorrer do tempo, garantindo, assim, a eficácia e a segurança dos produtos (SOUZA, FERREIRA, 2010).

Estudos complementares, como estabilidade de prateleira, estabilidade frente a diferentes embalagens e doseamento de ativos, serão necessários em avaliações futuras, a fim de se obter informações mais detalhadas sobre a vida útil dos produtos desenvolvidos (BRASIL, 2004, SOUZA, FERREIRA, 2010).

2. MATERIAL

2.1. Matérias-primas, solventes e reagentes

- Água purificada Milli-Q – Millipore®;
- Carbopol 940®, grau farmacêutico, Henrifarma;
- Propilenoglicol, grau farmacêutico, Galena;
- Metilparabeno, grau farmacêutico, Galena;
- Trietanolamina, grau farmacêutico, Synth;
- Zidovudina, matéria-prima de grau farmacêutico de pureza (Farmanguinhos, Rio de Janeiro - RJ);

Os reagentes empregados na análise das nanopartículas foram previamente relacionados no Capítulo II, item 2.1.

2.2. Equipamentos e utensílios

- Balança analítica Mettler Toledo®, modelo AB 204;
- Estufa Quimis®, modelo Q316M4;
- Frascos de vidro com tampa plástica opaca e rosqueável;
- Mixer Mondial, modelo Vesatile;
- Potenciômetro Metrohm®, modelo 827;
- Refrigerador Prosdócimo – série Luxo, modelo 340;
- Viscosímetro do tipo Brookfield®, modelo LVDL.

3. MÉTODOS

3.1. Formulação estudada

Gel base de Carbopol 940[®]:

Carbopol 940 [®]	1,0g
Metilparabeno	0,1g
Propilenoglicol	5,0g
Trietanolamina	3 gotas
Água Milli-Q – Millipore [®]	q.s.p. 100,0g

Formulação proposta:

Nanopartículas PBCA-AH-AZT	2%
Gel de Carbopol 940 [®]	q.s.p. 10,g

3.1.1. Método de preparo

Para o preparo de 600 g de gel de Carbopol 940[®], 6 g de Carbopol 940[®] foram dispersos em um volume de 600 mL de água Milli-Q[®], com o auxílio de um *mixer*. Com a total dispersão do carbômero, 600 mg de metilparabeno, previamente dissolvido em quantidade suficiente de água foram acrescentados. Ao término dessa etapa, o valor de pH foi determinado e corrigido para valor próximo a 7,0, com a adição de trietanolamina.

A massa obtida de gel foi dividida em duas partes. Na primeira, houve a incorporação de nanopartículas de AZT contendo 1 mg/mL de zidovudina, resultando em um gel com concentração de 2% de nanopartículas de AZT;

enquanto que na segunda parte não houve incorporação de nanopartículas, tendo por função servir de controle para as análises de estabilidade.

3.2. Estudo de estabilidade preliminar

Toda a massa de gel foi dividida em quatro recipientes. Cada um destes recipientes foi submetido a diferentes condições de armazenamento, variando assim, a temperatura e a incidência de luz de acordo com o estudo de estabilidade acelerada. Ao todo foram oito amostras analisadas que seguiram as condições citadas a seguir.

Os recipientes foram armazenados em quatro condições diferentes: estufa a $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$, temperatura ambiente, a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/60\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$, temperatura ambiente com incidência de luz a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/60\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$ e geladeira, a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (BRASIL, 2011; SOUZA, FERREIRA, 2010).

As amostras armazenadas nas quatro condições que continham ou não as nanopartículas de AZT incorporadas foram submetidas a três análises físico-químicas: medida de valores de pH, verificação da viscosidade e avaliação do aspecto. Essas determinações foram realizadas no período compreendido entre o dia 0 e o dia 28, totalizando assim, quatro semanas de análise de estabilidade acelerada do produto.

A determinação do pH foi realizada pelo método potenciométrico, utilizando medidor de pH digital.

A viscosidade aparente foi determinada utilizando-se o viscosímetro de Brookfield LVDL, empregando o *spindle* TR 11, sendo os resultados expressos em centipoise (cP).

A avaliação do aspecto foi baseada em critérios subjetivos, construindo-se uma escala de valores arbitrários e as leituras foram realizadas semanalmente no período de estudo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento da formulação

A base de um gel de Carbopol 940[®] constitui uma formulação simples. Essa base foi escolhida por apresentar uma boa estabilidade físico-química previamente conhecida, o que possibilita a incorporação de fármacos.

O gel de Carbopol 940[®], empregado em formulações cutâneas apresenta vantagens como o fato de não ser irritante, ser um bom agente de adesividade, além de ser um bom formador de colóide líofilo que, dentre os colóides, é um dos mais estáveis. O Carbopol 940[®] também é conhecido como carbômero, polímero do ácido acrílico, polímero carboxivinílico, Acristin[®] ou Acritamer[®]. Consiste de polímeros de alto peso molecular, contendo unidades de ácido acrílico cruzadas com alilsucrose ou ésteres alílicos de pentaeritritol. Apresenta-se na forma de um pó branco, leve higroscópico com sabor ácido e odor característico moderado.

O metilparabeno é dos conservantes mais empregados em medicamentos e cosméticos. É efetivo em uma ampla faixa de pH (4-8) e possui amplo espectro de ação antimicrobiana, sendo mais ativo contra as bactérias Gram+. A adição de 2 a 5% de propilenoglicol ou a combinação com outros parabenos aumenta a sua eficácia.

O propilenoglicol é um líquido claro, incolor, viscoso, com leve aroma e sabor doce. É miscível com água e álcool, mas é imiscível com óleos minerais e fixos. Foi empregado como um umectante, ou seja, com o objetivo de

dificultar que formulação perca o seu teor hídrico, contribuindo para a manutenção da estabilidade da formulação.

A trietanolamina também é chamada de trietilamina, trihidroxitrietilamina, TEA ou triatanolamina foi empregada um agente corretivo de pH. As dispersões aquosas Carbopol 940[®] são ácidas, geralmente apresentando-se líquidas e com valores de pH entre 2,7 a 3,5. Sendo assim, foi necessário o emprego da trietanolamina para aumentar o valor de pH da formulação até próximo da faixa neutra para que a formulação apresenta-se como uma forma farmacêutica semissólida.

A água Milli-Q – Millipore[®] é considerada uma água purificada. Apresenta um menor número de impurezas sólidas quando comparada com água potável e pode ser empregada como veículo nas preparações não-estéreis de uso externo e interno, necessitando de outros processos de purificação para ser empregada em formulações estéreis.

O método de manipulação empregado foi uma hidratação associada ao processo de agitação. A hidratação pode ser observada pelo intumescimento do carbômero, já que essas partículas coloidais são consideradas colóides liofílicos, formando assim um colóide hidrofílico. Além disso, assumimos que essa gelificação foi obtida de forma homogênea, graças a dois fatores associados, ou seja, a agitação vigorosa e o acerto do pH para faixa neutra de valores de pH. A agitação vigorosa empregando um *mixer* contribuiu para a não formação de grumos e o acerto do valor de pH para valores próximo a 7,0, propiciou a formação do gel, dando origem a uma formulação semissólida.

4.2. Estudo de estabilidade preliminar

Os resultados presentes nas tabelas e gráficos a seguir respeitam a seguinte legenda:

- Amostra 1: gel de Carbopol 940[®] armazenado em temperatura ambiente, $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/60\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$.
- Amostra 2: gel de Carbopol 940[®] armazenado em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/60\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$), com incidência de luz.
- Amostra 3: gel de Carbopol 940[®] armazenado em geladeira, a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Amostra 4: gel de Carbopol 940[®] armazenado em estufa a $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$.
- Amostra 5: gel de Carbopol 940[®] contendo 2% de nanopartículas PBCA-AZT-AH armazenado em temperatura ambiente, $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/60\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$.
- Amostra 6: gel de Carbopol 940[®] contendo 2% de nanopartículas PBCA-AZT-AH armazenado em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/60\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$) com incidência de luz.
- Amostra 7: gel de Carbopol 940[®] contendo 2% de nanopartículas PBCA-AZT-AH armazenado em geladeira, a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Amostra 8: gel de Carbopol 940[®] contendo 2% de nanopartículas PBCA-AZT-AH armazenado em estufa a $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$.

Quanto à avaliação da estabilidade, a partir dos resultados das análises de pH, viscosidade e aspecto, mostrados nas Tabelas 10 e 11 e Figuras 31 a

34, é possível observar que não houve variação significativa. Da mesma forma, resultado semelhante foi observado com as amostras com a incorporação das nanopartículas. Esse resultado já era esperado, uma vez que a formulação base foi escolhida devido à sua alta estabilidade quando comparado com outros veículos e também pela verificação desse veículo em várias especialidades farmacêuticas ainda comercializadas.

A Tabela 10 exibe os resultados obtidos pela análise de pH de todas as amostras e as Figuras 31 e 34 representam esses resultados graficamente.

Tabela 10 - Resultados obtidos pela análise de determinação de pH para as amostras de gel base de Carbopol 940[®] (amostras de 1 a 4) e gel contendo nanopartículas PBCA-AZT-AH (amostras de 5 a 8) sob diferentes condições de temperatura e umidade relativa .

Amostras	pH				
	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28
1	6,98	6,66	6,62	6,62	6,86
2	6,98	6,76	6,74	6,72	6,94
3	6,98	6,70	6,67	6,67	6,84
4	6,98	6,65	6,64	6,63	6,90
5	6,98	6,79	6,76	6,75	6,97
6	6,98	6,79	6,76	6,75	6,98
7	6,98	6,79	6,75	6,74	6,87
8	6,98	6,73	6,72	6,70	6,96

Figura 31 – Representação gráfica da variação de valores de pH de amostras do gel base de Carbopol 940® (amostras de 1 a 4), submetidas a diferentes condições de temperatura e umidade.

Figura 32 – Representação gráfica da variação de valores de pH de amostras do gel contendo nanopartículas PBCA-AZT-AH (amostras de 5 a 8), submetidas a diferentes condições de temperatura e umidade.

Como observado nas Figuras 31 e 32, houve um discreto aumento do valor de pH dos géis que continham a dispersão de nanopartículas PBCA-AZT-AH incorporada, porém não foi significativo. Isso pode ter ocorrido devido ao método que foi empregado para a obtenção das nanopartículas, uma vez que essas são obtidas em pH ácido e, em seguida, neutralizadas para concluir o procedimento ($\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$). Sendo assim, entendemos que o valor de pH das amostras de géis com nanopartículas foi elevado em cerca de 0,2 unidade de pH, o que é naturalmente esperado, já que o gel base foi preparado com valor de pH ligeiramente mais alto.

A Tabela 11 exibe os resultados obtidos pela análise de viscosidade de todas as amostras e as Figuras 42 e 43 representam estes resultados graficamente.

Tabela 11 – Resultados obtidos pela análise de viscosidade, em cP, para as amostras de gel base de Carbopol 940[®] (amostras de 1 a 4) e gel contendo nanopartículas PBCA-AZT-AH (amostras de 5 a 8) sob diferentes condições de temperatura e umidade relativa .

Viscosidade (cP)					
Amostras	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28
1	46900	45800	46600	46500	46600
2	46900	46600	46100	46200	46500
3	46900	47100	47000	47100	47000
4	46900	47600	47400	47300	46900
5	45400	46500	44700	46600	46100
6	45400	45800	45400	47700	46000
7	45400	48200	48100	47400	46800
8	45400	46100	45900	43400	45900

Figura 33 – Representação gráfica da variação de viscosidade de amostras do gel base de Carbopol 940® (amostras de 1 a 4), submetidas a diferentes condições de temperatura e umidade.

Figura 34 – Representação gráfica da variação de viscosidade de amostras do gel contendo nanopartículas PBCA-AZT-AH (amostras de 5 a 8), submetidas a diferentes condições de temperatura e umidade.

Quanto à viscosidade, foi possível observar que não houve influência de valores extremos de temperatura. As amostras submetidas a baixas temperaturas (geladeira) e altas temperaturas (estufa) mantiveram viscosidade semelhante à obtida no início do experimento, quando a temperatura foi ajustada para 25 °C, ou seja, temperatura ambiente. Sendo assim, a

formulação mostrou-se adequada à incorporação de nanopartículas, podendo ser um bom veículo para a administração do AZT contido nessas nanoestruturas.

O propósito da avaliação do aspecto foi o de verificar a ocorrência de quaisquer alterações que comprometessem a homogeneidade do sistema desenvolvido. Não foram observadas modificações aparentes na base analisada durante o período de estudo, mostrando-se, portanto, homogênea e inalterada, quando mantida à temperatura ambiente, em geladeira e em estufa.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- Frente aos resultados obtidos com este trabalho, pode-se sugerir que a formulação apresenta a estabilidade necessária e satisfatória à incorporação de nanopartículas, podendo ser um bom veículo para a administração do AZT contido nessas nanoestruturas.
- O estudo de estabilidade preliminar é uma ferramenta importante útil para a previsão da estabilidade de medicamentos, mas torna-se necessária a realização de estudos complementares para estabelecer o prazo de validade desses produtos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBU-IZZA, K.; TAMBRALLO, L.; LU, D.R. In vivo evaluation of zidovudine (AZT) – loaded ethylcellulose microspheres after oral administration in beagle dogs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.86, n.5, p.554-559, 1997.
- ALLEN JR., L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p.301-340.
- ALYAUTDIN, R.N.; PETROV, V.E.; LANGER, K.; BERTHOLD, A.; KHARKEVICH, D.A.; KREUTER, J. Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polyssorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, v. 14, n. 3, p. 325-328, 1997.
- AMATO NETO, V. *AIDS na prática médica*. São Paulo: Sarvier,1996. p.126-136.
- AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmacological Research*, v.12, n.3, p.413-420, 1995.
- ALLEN JR., L.V., POPOVICH, N.G., ANSEL, H.C. *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. Cap.4, p.111-158.
- ARAÚJO, A.S.A. *Análise térmica e determinação dos parâmetros cinéticos de preparações farmacêuticas e novas especialidades de zidovudina (AZT)*. São Paulo: USP, 2003. 241p. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- AULTON, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap.7, p. 112-123.
- ATTWOOD, D. Sistemas dispersos. In: AULTON, Michael E. *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap. 6, p. 84-99.
- BALAKRISHNAN, P., SHANMUGAM, S., LEE, W.S. KIM, J.O., OH, D.H., KIM, D.D., YOO, B.K., CHOI, H.G., WOO, J.S., YONG, C.S. Formulation and in vitro assessment of minoxidil niosomes for enhanced skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v.377, p. 1–8, 2009.

BALINT, G.A. Antiretroviral therapeutic possibilities for human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacology & Therapeutics*, v.89, p. 17-27, 2001.

BAROLI, B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.99, n.1, p.21-50, 2010.

BARRY, B.W. *Dermatological formulations: percutaneous absorption*. New York: Marcel Dekker, 1983, v.18, p. 480.

BARRY, B.W., MEYER, M.C. The rheological properties Of Carbopol® gels I. Continuous shear and creep properties of Carbopol® gels. *International Journal of Pharmaceutics*, v.2, p.1-25, 1979.

BEHAN, N.; BIRKINSHAW, C.; CLARKE, N. Poly n-butyl cyanoacrylate nanoparticles: a mechanism study of polymerization and particle formation. *Biomaterials*, v.22, p. 1335-1344, 2001.

BERTHOLON, I.; VAUTHIER, C.; LABARRE, D. Complement activation by core-shell poly(isobutylcyanoacrylate)-polysaccharide nanoparticles: Influences of surface morphology, length, and type of polysaccharide. *Pharmaceutical Research*, v. 23, p.1313–1323, 2006.

BIOPHARMACEUTICAL CLASSIFICATION SYSTEM, Therapeutic Systems Research Laboratories, 2008. Disponível em: <<http://www.tsrlinc.com/services/bcs/index.htm>>. Acesso em: 23 mar. 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Substituta. Portaria nº151 de 14 de Outubro de 2009. Aprova, na forma dos Anexos a esta Portaria, etapas sequenciadas e o Fluxograma Mínimo para o Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo HIV em indivíduos com idade acima de 18 (dezoito) meses, de uso obrigatório pelas instituições de saúde públicas e privadas. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, p. 40, 16 out. 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. *Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, p.47, 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde. *Boletim epidemiológico HIV-DST*. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/publicacao/2014/boletim-epidemiologico-2014>>. Acesso em: 09 jan. 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde. *Sintomas e fases da aids*. Disponível em: <www.aids.gov.br/pagina/sintomas-e-fases-da-aids>. Acesso em: 06 jan. 2013.

BRASIL, RDC 50, de 20 de setembro de 2011, *Diário Oficial da União*, Brasília, n. 183, Seção I, p.694 set. 2011.

BRASIL, Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia Para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, Brasília, n. 104, Seção I, p.56, jun. 2003

CAMILO, K.F.B. *Complexo pectina/caseína: aspectos básicos e aplicados*. 2007. 166f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

CAO, J.; SUN, J.; WANG, J.; LI, X.; DENG, Y. N-trimethyl chitosan-coated multivesicular liposomes for oxymatrine oral delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 35, n. 11, p. 1339-1347, 2009.

CEVC, G., GEBAUER, D., STIEBER, J., SCHA"TZLEIN, A., BLUME, G. Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1368, p. 201–215, 1998.

CHAUVIERRE, C.; LABARRE, D.; COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Novel polysaccharide-decorated poly(isobutyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, v. 20, n. 11, p.1786-1793, 2003.

CHORILLI, M., LEONARDI, G.R., OLIVEIRA, A.G., SCARPA, M.V. Lipossomas em formulações dermocosméticas. *Infarma*, v.16, n. 7-8, p. 75-79, 2004.

CONSIGLIERE, V.O.; VALS, N.R.M.; MAGALHÃES, J.F. First-derivative spectrophotometric determination of pyridoxine hydrochloride in pharmaceutical preparations. *Analytical Letters*, v. 34, n. 11, p. 1875-1888, 2001.

CONSIGLIERI, V.O. Doseamento da vitamina B6 por espectrofotometria derivada no ultravioleta. Dissertação para obtenção do grau de Mestre. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 1992.

CORRÊA, M.A. *Incorporação de naproxeno em sistema microemulsionado: liberação in vitro e avaliação biológica*. São Paulo: USP, 1997. 146p. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as drug carrier: present state and perspectives. *Journal of Controlled Release*, v. 17, n. 2, p.187-198, 1991.

CUNHA, A.L.C.P. Desenvolvimento de adesivos biológicos biodegradáveis. Coimbra, 2008. 193p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008.

DAS, S.; NG, W. K.; TAN, R. B. H. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, v. 47, n. 1, p. 139–51, 2012.

DEMBRI, A.; MONTISCI, M.J.; GANTIER, J.C.; CHACUN, H.; PONCHEL, G. Targeting of 3'- azido 3'- deoxythymidine (AZT) –loaded Poly (Isoexilcianoacrilato) nanospheres to the gastrointestinal mucosa and

associated lymphoid tissue. *Pharmaceutical Research*, v.18, n.4, p.467-473, 2001.

DESAI S. D.; BLANCHARD, J. Pluronic® F127-based ocular delivery system containing biodegradable polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules of pilocarpine. *Drug Delivery*, v.7, n.4, p.201-207, 2000.

DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M.M. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.96, n.10, p.2547-2565, 2007.

DIEFENBACH, I. C. F.; FRIEDRICH, M.; BITTENCOURT, C. F.; SANTOS, M. R.; ESCARRONE, A. L.V. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para o doseamento de sibutramina em cápsulas. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 27, n. 4, p. 612-617, 2008.

DOMINGUES, G.S.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R.; POHLMANN, A.R. Micropartículas nanorevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. *Química Nova*, v.31, n.8, p.1966-1972, 2008.

DONATO, E.M.; CANEDO, N. A. P.; ADAMS, A. I. H.; BERGOLD, A. M. Espectrofotometria Derivada: uma contribuição prática para o desenvolvimento de métodos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 31, n. 2, p. 125-130, 2010.

DORA, C.L., PUTAUX, J.L., PIGNOT-PAINTRAND, I., DUBREUIL, F., SOLDI, V., BORSALI, R., LEMOS-SENNA, E. Physicochemical and morphological characterizations of glyceryl tristearate/castor oil nanocarriers prepared by the solvent diffusion method. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.23, n.11, p.1972-1981, 2012

FAN, B.; STEWART, J.T. Determinations of zidovudine/didanosine/nevirapine and zidovudine/didanosine/ritonavir in human serum by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.30, p.955-960, 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5.ed. Brasília : Anvisa, 2010. p.1377-1378.

FARMACOPÉIA BRITÂNICA, v. I e II, p. 6433, 2009.

FLEXNER, C. Agentes anti-retrovirais e tratamento da infecção pelo HIV. In: HARDMAN, Joel G. et al. *Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2004. Cap. 50, p. 1145-1179.

FLYNN, G.L. General introduction and conceptual differentiation of topical and transdermal drug delivery systems. Differentiation with respect to delivery kinetics. In: SHAH, V.P., MAIBACH, H.I., eds. *Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration*. New York: Plenum, 1993. cap.20, p.369-391.

FLYNN, G.L. Topical drug absorption and topical pharmaceutical systems. In: BANKER, G.S., RHODES, C.T., eds. *Modern pharmaceuticals*. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1990. p.263-325.

FRIEDRICH, M., PRIMO, F.T., FUNCK, J.A.B., LAPORTA, L.V., ALVES, M.P. Avaliação da estabilidade físico-química de creme não-iônico inscrito no Formulário Nacional. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 26, n. 4, p. 558-562, 2007.

GARG, M.; JAIN, N.K. Reduced hematopoietic toxicity, enhanced cellular uptake and altered pharmacokinetics of azidothymidine loaded galactosylated liposomes. *Journal of Drug Targeting*, v.14, n.1, p.1-11, 2006.

GODIN, B., TOUITOU, E. Ethosomes: New Prospects in Transdermal Delivery *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v.20, n.1, p.63–102, 2003.

GOMES, F.P., GARCIA, P.L., ALVES, J.M.P., SINGH, A.K.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M., SANTORO, M.I.R.M. UV-derivative spectrophotometric and stability-indicating high-performance liquid chromatographic methods for determination of simvastatin in tablets. *Latin American Journal of Pharmacy*. Buenos Aires, v. 28, n.2, p.261-269, 2009.

GOLDSMITH, C. *Actualité Des Leucémie*. Disponível em: <http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/actu/d/medecine-leucemies-soignees-grace-virus-sida-43365/> / Acesso em: 22 maio 2014.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.; HARDMAN, J.G. *Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed. New York: McGraw-Hill Interamericana, 1996. p.886-889.

GRAHAME-SMITH, D.G.; ARONSON, J.K. A farmacoterapia das doenças infecciosas. In: GRAHAME-SMITH, D.G.; ARONSON, J.K. *Tratado de Farmacologia Clínica e Farmacoterapia*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, cap. 22, p.196-200.

GRIFFITH, B.P., CAMPBELL, S., MAYO, D.R. Human immunodeficiency viruses. In: MURRAY, P.R. *Manual Clinical Microbiology*. Washington: ASM Press, 2007, cap. 83, p.1308-1329.

GUIMARÃES, M. Avaliação da liberação e permeação em membrana sintética do cetoconazol em crêmes O/A. São Paulo: USP, 2001. 170 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

GUNASEELAN, S.; GUNASEELAN, K.; DESHMUKHM.;ZHANG, X.;SINKO, P.J. Surface modifications of nanocarriers for effective intracellular delivery of anti-HIV drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v.62, p.518-531, 2010.

GUTLEBEN, W.; SCHERER, K.; TUAN, N.D.; STOIBER, H.; DIERICH, M.P.; ZEMANN, A. Simultaneous separation of 11 protease and reverse transcriptase inhibitors for human immunodeficiency virus therapy by co-electroosmotic

capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 982, p.153-161, 2002.

GUZZO, C.A., LAZARUS, G.S., WERTH, V.P. Dermatological pharmacology. In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E., MOLINOFF, P.B., RUDDON, R.W., GILMAN, A.G. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 9. ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p.1593-1616.

HARIVARDHAN-REDDY, L.; MURTHY, R.S.R. Estudio de la influencia de los factores de polimerización de nanopartículas de polibutyl-cianoacrilato y la cinética de liberación de fármaco in vitro. *Ars Pharmaceutica*, v.45, n.3, p.211-234, 2004.

HE, M.; ZHAO, Z.; YIN, L.; TANG, C.; YIN, C. Hyaluronic acid coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles as anticancer drug carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, v.373, p.165-173, 2009.

HILLAIREAU, H.; LE DOAN, T.; BESNARD, M.; CHACUN, H.; JANIN, J.; COUVREUR, P. Encapsulation of antiviral nucleotide analogues azydothymidine-triphosphate and cidofovir in poly(isso-butylcianoacrilato) nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, n.324, p.37-42, 2006.

HILLAIREAU, H.; LE DOAN, T.; BESNARD, M.; CHACUN, H.; JANIN, J.; COUVREUR, P. Encapsulation of mono- and oligo- nucleotides into aqueous-core nanocapsules in presence of various water-soluble polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, n.331, p.148-152, 2007.

HORWITZ, J.P.; CHAU, J.; NOEL, M. Nucleosides.5.monomesylates of (1,2)-deoxy-beta-Dlyxofuranosil-thymine. *Journal of Organic Chemistry*, Columbus, v. 29, p. 2076, 1964.

HSIEH, D.S. Understanding permeation enhancement technologies. In: *Drug permeation enhancement: theory and applications*. New York: Marcel Dekker, 1994. cap.1, p.3-17.

ICH; International Conference on Harmonization of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Q2B(R1): *Guideline on Validation of Analytical Procedure – Methodology*, 2005.

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados de análise térmica. *Cerâmica*, v. 26, n.121, p.17-24, 1980.

JIN, S.X.; BI, D.Z.; WANG, J.; WANG, Y.Z.; HU, H.G.; DENG, Y.H. Pharmacokinetics and tissue distribution of zidovudine in rats following intravenous administration of zidovudine myristate loaded liposomes. *Pharmazie*, v. 11, n. 60, p.840-843, 2005.

KARARLI, T.T., KIRCHHOFF, C.F., PENZOTTI-JR, S.C., Enhancement of transdermal transport of azidothymidine (AZT) with novel terpene and terpene-like enhancers: in vivo – in vitro correlations. *Journal of Controlled Release*, v.34, p.43-51, 1995.

KAUR, C.D.; NAHAR, M.; JAIN, N.K. Lymphatic targeting of zidovudine using surface-engineered liposomes. *Journal of Drug Targeting*, v. 16, n. 10, p. 798-805, 2008.

KIM, J.Y.; SONG, J.Y.; LEE, E.J.; PARK, S.K. Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system. *Colloid and Polymer Science*, v. 281, p. 614–623, 2003.

LEMARCHAND, C.; GREF, R.; COUVREUR, P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 327–341, 2004.

LIMOUZIN, C.; CAVAGGIA, A.; GANACHAUD, F.; HEMMERY, P. Anionic polymerization of n-butyl cyanoacrylate in emulsion and miniemulsion. *Macromolecules*, v. 36, p. 667–674, 2003.

LIU, H.; CHEN, J. Indomethacin-loaded Poly (butylcyanoacrylate) Nanoparticles: Preparation and Characterization. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, n. 63, p. 207-216, 2009.

LÖBENBERG, R.; ARAUJO, L.; KREUTER, J. Body distribution of azidothymidine bound to nanoparticles after oral administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 44, n. 2, p.127-132, 1997.

MAINARDES, R.M.; GREMIÃO, M.P.D.; BRUNETTI, I.L.; FONSECA, L.M.; KHALIL, M.N. Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: Influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 98, n. 1, p. 257-267, 2009.

MAKSIMENKO, O.; PAVLOV, E.; TOUSHOV, E.; MOLIN, A.; STUKALOV, Y.; PRUDSKOVA, T.; FELDMAN, V.; KREUTER, J.; GELPERIN, S. Radiation sterilisation of doxorubicin bound to poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 356, p. 325–332, 2008.

MANFIO, J.L.; DAL'MASO, A.; PUGENS, A.M.; BRUM JÚNIOR L.; STEPPE, M. Determinação do prazo de validade do medicamento carboxicisteína xarope através do método de Arrhenius. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.43, n.4, p.563-570, 2007.

MARCATO, P.D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 6, n. 2, p. 1-37, 2009.

McCARRON, P.A.; WOOLFSON, D.; KEATING, S.M. Response surface methodology as a predictive tool for determining the effects of preparation conditions on the physicochemical properties of poly (isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 193, p. 37-47, 1999.

MITSUYA, H.; WEINHOLD, K.J.; FURMAN, P.A.; STACLAIR, M.H.; LERMAN, S.N.; GALLO, R.C.; BOLLOGNESI, D.; BARRY, D.W.; BRODER, S. 3'-azido-3'-deoxythymidine (BW A09U)- na antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human lymphotropic- T vírus type III lymphadenopathy-

associated virus in vitro. *Proceedings of the National Academy Sciences of the U.S.A.*, Washington, v. 82, n. 20, p. 7096, 1985.

MONTGOMERY, D. C. *Introdução ao Controle Estatístico de Qualidade*. 4 ed. São Paulo: LTC, p. 365-406, 2004.

MORELLI, B. Determination of binary mixtures of analgesic and spasmolytic drugs in pure and dosage forms by derivative spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 33, p. 423-433, 2003.

MOU, D.; CHEN, H.; DU, D.; MAO, C.; WAN, J.; XU, H.; YANG, X. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics* v. 353, p. 270-276, 2008.

NARDOTTO, G.H.B. Desenvolvimento de lipossomas deformáveis para a administração transdérmica de remifentanil. Ribeirão Preto: USP, 2009. 80 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, São Paulo 2009.

NAYAK, U.W.; GOPAL, S.; MUTALIK, S.; RANJITH, A.K.; REDDY, M.S.; GUPTA, P.; UDUPA, N. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of zidovudine. *Journal of Microencapsulation*, v. 26, n. 3, p. 214-222, 2009.

NEMEN, D, LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. *Química Nova*, v. 34, n. 3, p. 408-413, 2011.

NEVES, J., AMIJI, M.M., BAHIA, M.F.; SARMENTO, B. Nanotechnology-based systems for the treatment and prevention of HIV/AIDS. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 62, p. 458-477, 2010.

OJEWOLE, E.; MACKRAJ, I.; NAIDOO, P.; GOVENDER, T. Exploring the use of novel drug delivery systems for antiretroviral drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 70, p. 697-710, 2008.

OLIVEIRA, A.G., SCARPA, M.V., CORREA, M.A., CERA, L.F.R., PEDRONI FORMARIZ, T.P. Microemulsões: Estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

ORJALES, I.R. Agentes promotores de la permeación percutánea. *Revista Cubana Farmacia*, Havana, v. 32, n. 1, p. 68-75, 1998.

OSTERTAG, W.; ROSELER, G.; KRIEG, C.J.; KIND, J. COLE, T.; CROZIER, T.; GAEDICKE, G.; STEINHEIDER, G.; KLUGE, N.; DUBE, S. Induction of endogenous virus and thymine kinase by 7-bromodeoxyridine in cell-cultures transformed by friend virus. *Proceedings of the National Academy Sciences of the U.S.A.*, Washington, v.71, p.4980, 1974.

PARSLOW, T.G. A resposta imunológica. In: Parlow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB, org. *Imunologia médica*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. p. 52- 60.

PASCHOAL, L.R.; FERREIRA, W. A.; PRADO, M.R. D.; VILELA, A. P. O. Aplicação do método de espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39, n. 1, p. 105-113, 2003.

PEREIRA, E.A.; MICKE, G.A.; TAVARES, M.F.M. Determination of antiretroviral agents in human serum by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, v. 1091, p. 169-176, 2005.

RANDAU, K.P.; MEIRA, J.L.; FARIAS BRAGA, J.M.; MONTEIRO, D.B.; ROLIM NETO, P.J. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para anti-retroviral zidovudina (AZT) matéria-prima. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, v. 24, n. 1, p. 104-108, 2005.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWE, R.J. *Farmacologia*. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, cap. 47, p. 679-691.

RAO, K.R.; SENAPATI, P.; DAS, M.K. Formulation and *in vitro* evaluation of ethyl cellulose microspheres containing zidovudine. *Journal of Microencapsulation*, v. 22, n. 8, p. 863-876, 2005.

REDDY, L.H.; MURTHY, R.R. Influence of polymerization technique and experimental variables on the particle properties and release kinetics of methotrexate from poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Acta Pharmaceutica*, v. 54, p.103–118, 2004.

REIS, C.P.; NEUFELD, R.J.; RIBEIRO, A.J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation. I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, v. 2, p. 8-21, 2006.

REUKOV, V.; MAXIMOV, V.; VERTGEL, A. Proteins Conjugated to Poly(Butyl Cyanoacrylate) Nanoparticles as Potential Neuroprotective Agents. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 108, n. 2, 2011

REMYINGTON A Ciência e a prática da Farmácia. 20ª.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. p.1022-1031.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. Revista Química Nova, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIEGER, M.M. Factors affecting sorption of topically applied substances. In: ZATZ, J.L. *Skin permeation: fundamentals and application*. Wheaton: Allured, 1993. cap.2, p.33-72.

RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.F.M.; SILVA, M.A.S.; MATOS, J.R. Aplicação de técnicas termoanalíticas na caracterização, determinação da pureza e cinética de degradação da zidovudina (AZT). *Acta Farmacêutica Bonaerense*, v. 24, n. 3, p. 383-387, 2005.

SALTÃO, R., VEIGA, F. Ciclodextrinas em novo sistemas terapêuticos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* v. 37, n. 1, jan./abr. 2001.

SANTOS, C.M.P., Nanoencapsulação de Ingredientes Activos em Cosmetologia. Porto: UFP, 2012. 57 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHREIEF, H., BOUWSTRAB, J. Liposomes and niosomes as topical drug carriers: dermal and transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 30, p. 1-15, 1994.

SEKI, T., KAWAGUCHI, T., JUNI, K., SUGIBAYASHI, K., MORIMOTO, Y. Sustained transdermal delivery of zidovudine via controlled release of penetration enhancer. *Journal of Controlled Release*, v. 17, p. 41-48, 1991.

SEKI, T.; TOEDA, C. KAWZGUCHI, T., JUNI, K., SUGIBAYASHI, K., MORIMOTO, Y. Enhanced transdermal delivery of zidovudine in rats and human skin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 38, n. 11, p. 3086-3089, 1990.

SERIKAKU, D. Avaliação *in vitro* da liberação, penetração e retenção cutâneas de ciclopiroxolamina em formulações de uso tópico. São Paulo: USP, 2006. 193 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SERRA, C.H.R.; KOONO, E.E.M.; KANO, E.K.; SHRAMM, S.G.; ARMANDO, Y.P.; PORTA, V. Bioequivalence and Pharmacokinetics of Two Zidovudine Formulations in Healthy Brazilian Volunteers: An Open-Label, Randomized, Single-Dose, Two-Way Crossover Study. *Clinical Therapeutics*, v. 30, n. 5, p. 902-908, 2008.

SEVERINO, P., SANTANA, M.A.H., MALMONGE, S.M., SOUTO, E.B. Polímeros Usados como Sistemas de Transporte de Princípios Ativos. *Polímeros*, v. 21, n. 5, p. 361-368, 2011.

SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography*, v. 987, n. 1-2, p. 57-66, 2003.

SHAH, J.C. Analysis of permeation data: evaluation of the lag time method. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 90, p. 161-169, 1993.

SILVA, C., MARTINI, E., TAVARES, G., SILVEIRA, T., DE OLIVEIRA, M.C., TEIXEIRA, H. Caracterização Físico-química de Nanoemulsões Catiônicas como Sistemas de Liberação de Oligonucleotídeos. *Acta Farm. Bonaerense*, v.25, n.1, p. 17-21, 2006.

SILVA, E.C., DE PAOLA, M.V.R.V, MATOS, J.R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, n. 3, p.347-356, 2007.

SILVA, J.A., APOLINÁRIO, A.C. SOUZA, M.S.R., DAMASCENO, B.P.G.L., MEDEIROS, A.C.D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 31, n.3, p. 125-131, 2010.

SILVA, K.E.R., ALVES, L.D.S., PASSOS, R.C.S., FARIA, A.R., ROLIM NETO, P.J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos da indústria farmacêutica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 30, n.2, p. 129-135, 2009.

SIMEONOVA, M.; IVANOVA, G.; ECHEV, V.; MARKOVA, N.; KAMBUROV, M.; PETKOV, C.; DEVERY, A.; O'CONNOR, R.; BROUGHAM, D. Physicochemical characterization and in vitro behavior of daunorubicin-loaded poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, v. 5, p. 2109–2121, 2003.

SINGH, S.; DOBHALL, A.K.; JAIN, A.; PANDIT, J.K.; CHAKRABORTY, S. Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticles of a water soluble drug: zidovudine. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 58, n. 5, p. 650-655, 2010.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVIA, T.M.; KULKARNIA, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, v. 70, p. 1–20, 2001.

SOUZA, K.C., MOHALLEN, N.D.S., Nanocompósitos magnéticos: Potencialidades de aplicações em biomedicina. *Química Nova*, v. 34, n. 10, p. 1692-1703, 2011.

SOUZA, M. V. N.; ALMEIDA, M. V. Drogas anti-HIV: Passado, Presente e Perspectivas Futuras. *Química Nova Interativa*. Disponível em <<http://qnint.sbq.org.br/qni/visualizarTema.php?idTema=41>>. Data de acesso: 12 jan. 2013.

SOUZA, V.B., FERREIRA, J.R.N., Desenvolvimento e estudos de estabilidade de cremes e géis contendo sementes e extratos do bagaço da uva Isabel (*Vitis labrusca* L.). *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, V.31, N.3, p. 217-222, 2010.

STEVEN, M.S., PETTINELLI, C.B. Strategies and progress in the development of antiretroviral agents. In. DeVITA Jr., HELLMAN, S., ROSENBERG, S.A. *AIDS: Biology, Diagnosis, Treatment and Prevention*. Philadelphia: Lippincott-Raven Published, Cap. 21, p. 467-475, 1997.

STORPIRTIS, S; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. *Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p.321.

SULLIVAN, C.O.; BIRKINSHAW, C. In vitro degradation of insulin-loaded poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Biomaterials*, v. 25, p. 4375–4382, 2004.

SUWANPIDOKKUL N.; THONGNOPNUA, P.; UMPRAYN, K. Transdermal delivery of zidovudine (AZT): The effects of vehicles, enhancers, and polymer membranes on permeation across cadaver pig skin. *AAPS PharmSciTech*, v. 5, n. 3, p. 1-8, 2004.

TABORIANSKI, A. M. *Validação de métodos para análise e estudos de estabilidade de anti-retrovirais em preparações farmacêuticas*. São Paulo: USP, 2003. 143 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

TAVARES, G.D. *Nanopartículas de poli (n-butil-cianoacrilato) revestidas com N,N,N-trimetilquitosana: desenvolvimento, caracterização e estudos de permeabilidade in vitro*. São Paulo: USP, 2013. 191 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

TAVARES, G.D., ISHIKAWA, G.M., MONTEIRO, T.F., ZANOLINI, C. KEDOR-HACKMANN, E.R.M., BOU-CHACRA, N.A., COSIGLIERI, V.O., Derivative spectrophotometric method for determination of acyclovir in polymeric nanoparticles. *Química Nova*, v. 35, n. 1, p. 203-206, 2012.

THOMAS, N.S., PANCHAGNULA, R., Transdermal delivery of zidovudine: effect of vehicles on permeation across rat skin and their mechanism of action. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 18, p. 71-79, 2003.

TSUBONE, C., GARCIA, P.L., GOMES, F.P., KEDOR-HACKMANN, E.R.M., SANTORO, M.I.R.M. Quantitative determination of nadolol in tablets by high performance liquid chromatography and UV derivative spectrophotometry. *Analytical Letters*, v. 41, n. 3, p. 424-436, 2008.

USP 31. The United States Pharmacopeia Convention 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852, v. 2, p. 2498-2499, 2008.

VAUTHIER, C, DUBERNET, C, FATTAL E, PINTO-ALPHANDARY H, COUVREUR P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 55, n. 4, p. 519-548, 2003.

VILLANOVA, J.C.O., ORÉFICE, R.L., CUNHA, A.S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

VYAZOVKIN, S. Thermal Analysis. *Analytical Chemistry*, v. 80, p. 4301-4316, 2008.

WEISS, C. K.; ZIENER, U.; LANDFESTER, K. A route to nonfunctionalized and functionalized poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles: preparation in miniemulsion. *Macromolecules*, v. 40, n. 4, p. 928-38, 2007.

WELLS, Barbara G. et al. HIV/AIDS. *Manual de Farmacoterapia*. 6. ed. São Paulo: Mcgraw-hill, 2007. Cap. 39, p. 412-430.

WILSON, B.; SAMANTA, M.K.; SANTHI, K.; KUMAR, K.P.S.; PARAMAKRISHNAN, N.; SURESH, B. Targeted delivery of tacrine into brain with polysorbate 80-coated poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 70, p. 75-84, 2008.

XI-XIAO, Y.; JAN-HAI, C.; SHI-TING, L.; DAN, G.; XV-XIN, Z. Polybutylcyanoacrylate nanoparticles as a carrier for mitomycin C in rabbits bearing VX2-liver tumor. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 46, p. 211–217, 2006.

YENICE, I.; MOCAN, M.C.; PALASKA, E.; BOCHOT, A.; BILENSOY, E.; VURAL, I.; IRKEÇ, M.; HINCAL, A.A. Hyaluronic acid coated poly-ε-caprolactone nanospheres deliver high concentrations of cyclosporine A into the cornea. *Experimental Eye Research*, v. 87, p. 162-167, 2008.

YOO, H.S.; PARK, T.G. Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA–PEG block copolymer. *Journal of Controlled Release*, v. 70, p. 63–70, 2001.

ZHANG, Q.; SHEN, Z.; NAGAI, T. Prolonged hypoglycemic effect of insulin-loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles after pulmonary administration to normal rats. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 218, n.1-2, p.75-80, 2001.

ANEXOS