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

Nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) revestidas com *N*,*N*,*N*-trimetilquitosana: desenvolvimento, caracterização e estudos de permeabilidade *in vitro*

Guilherme Diniz Tavares

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

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

São Paulo 2013

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

Nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) revestidas com *N*,*N*,*N*-trimetilquitosana: desenvolvimento, caracterização e estudos de permeabilidade *in vitro*

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890. O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Guilherme Diniz Tavares

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

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

São Paulo 2013

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

<u> </u>	
	Tavares, Guilherme Diniz
T213	n Nanopartículas de poli (n-butil-cianoacrilato) revestidas com
	N,N,N-trimetilquitosana: desenvolvimento, caracterização
	e estudos de permeabilidade in vitro / Guilherme Diniz Tavares.
	São Paulo, 2013.
	190p.
	Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
	Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
	Orientador: Consiglieiri, vladi Olga
	Co-orientador: Bou-Chacra, Nádia Araci
	 Formulações farmacêuticas Tecnologia farmacêutica Nanotecnologia I. T. II. Consiglieiri, Vladi Olga, orientador.
	III Bou-Chacra Nádia Araci co-orientador
	III. Dou-Chaera, Ivadia Araci, co-offentador.
	615 4 CDD
1	010.1 000

Guilherme Diniz Tavares

Nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) revestidas com *N*,*N*,*N*-trimetilquitosana: desenvolvimento, caracterização e estudos de permeabilidade *in vitro*

Comissão Julgadora da Tese para a obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri

1° Examinador

2° Examinador

3° Examinador

4° Examinador

São Paulo, _____de ____.

RESUMO

TAVARES, G.D. Nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) revestidas com *N*,*N*,*N* trimetilquitosana: desenvolvimento, caracterização e estudos de permeabilidade *in vitro*. 2013. 214 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A via oral é considerada preferencial para a administração de fármacos, sobretudo no tratamento de doenças crônicas. Entretanto, princípios ativos administrados por essa via podem apresentar biodisponibilidade variável e/ou limitada. Diversos tipos de sistemas de liberação vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de melhorar esse parâmetro, dentre os quais se destacam as nanopartículas de poli (alquil-cianoacrilato) (PACA). Pelo exposto, no presente trabalho foram desenvolvidas nanopartículas de poli(n-butilcianoacrilato) (PBCA) contendo aciclovir (ACV), revestidas por N,N,N-trimetilquitosana (TMQ), um promissor promotor de absorção. A TMQ foi sintetizada com elevado rendimento e grau de quaternização de aproximadamente 73%. As nanopartículas de PBCA foram obtidas com rendimento adequado e apresentaram características físico-químicas semelhantes às descritas na literatura. Após o revestimento, foi observado um aumento no diâmetro médio, bem com uma inversão nos valores de potencial zeta. Essas observações podem indicar a ocorrência do revestimento. A partir das análises de DSC, pôde-se comprovar a eficiência do revestimento das nanopartículas pelo derivado sintetizado, já que o comportamento das nanopartículas de PBCA-TMQ foi diferente daquele obtido para a mistura física entre os constituintes da formulação. Nessa mesma perspectiva, análises de FTIR foram conduzidas e a ocorrência do revestimento foi corroborada. Além disso, as análises morfológicas por Microscopia de Forca Atômica (AFM) revelaram que as nanopartículas revestidas apresentam baixa tendência à agregação, o que pode ser um indicativo de estabilidade para a formulação desenvolvida. Em relação aos ensaios de citotoxicidade, foi evidenciado que as nanopartículas de PBCA não apresentaram toxicidade significativa frente às células Caco-2, ao passo que a formulação revestida mostrou um efeito tóxico dose-dependente influenciado pelo grau de quaternização. Além disso, as nanopartículas desenvolvidas foram capazes de diminuir, reversivelmente, a Resistência Elétrica Transepitelial (RET) da monocamada de células. A fim de quantificar o fármaco associado às nanopartículas, foi desenvolvido e validado método analítico por espectrofotometria derivada com detecção no UV. Tal método mostrou-se capaz de eliminar a interferência dos excipientes, permitindo a guantificação do ACV na formulação de nanopartículas com precisão e exatidão adequadas. Assim, a porcentagem de fármaco associado às nanoestruturas pode ser calculada, obtendo-se um valor satisfatório. De maneira semelhante, foi desenvolvido e validado método por CLAE para a quantificação do fármaco nos ensaios de permeação. A metodologia proposta mostrou-se adequada considerando-se as recomendações da RE 899/03. Por meio dos ensaios de permeabilidade em células Caco-2, foi constatado que a formulação desenvolvida aumentou em 3 vezes o valor de Permeabilidade aparente (Papp) do fármaco em estudo. Além disso, as nanopartículas revestidas foram capazes de propiciar a liberação controlada do ACV nos ensaios de liberação in vitro utilizando meios com diferentes valores de pH (1,2; 6,8 e 7,4).

Palavras-chave: administração oral, nanopartículas poliméricas, *N,N,N*-trimetilquitosana, liberação controlada, permeabilidade *in vitro*.

Abstract

TAVARES, G.D. *N,NN*-trimethylchitosan coated poly (n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles: development, characterization and *in vitro* permeability. 2013. 214 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The oral route is considered for the administration of drugs, especially in the treatment of chronic diseases. However, drugs administered by this route may have variable and/or limited bioavailability. Various types of delivery systems have been developed with the goal of improving this parameter, among which stand out the nanoparticles of poly (alkylcyanoacrylate) (PACA). Such nanomaterials have been coated to improve stability in the gastrointestinal tract, promote greater solubility or enhance permeation. Therefore, in this work were developed nanoparticles of poly (n-butilcianoacrilato) (PBCA) containing acyclovir (ACV), coated with N,N,N-trimethylchitosan (TMC), a promising absorption promoter. The TMC was synthesized with high-yield and approximately 73% of quaternization. The PBCA nanoparticles presented physico-chemical characteristics similar to those described in the literature. After the coating, it was observed an increase in the average diameter, and a inversion on the values of zeta potential. These observations may indicate the occurrence of coating. DSC analysis could proved the efficiency of the coating of nanoparticles, since the behavior of nanoparticles of PBCA-TMC was different from those obtained for the physical mixture between the constituents of the formulation. In this same perspective, FTIR analyses were conducted and the occurrence of coating was corroborated. In addition, morphological analyses by Atomic Force Microscopy (AFM) showed that nanoparticles coated presented low tendency to aggregate, which can be an indication of stability for the formulation developed. In relation to cytotoxicity assays, it was evidenced that the PBCA nanoparticles showed no significant toxicity against the Caco-2 cells. whereas the coated formulation showed a dose-dependent toxic effect influenced by the degree of quaternization. In addition, the nanoparticles developed were able to decrease, reversibly, Transepitelial Electric Resistance (TEER) of the monolayer. In order to quantify the drug associated with nanoparticles, was developed and validated analytical method by derivative spectrophotometry with UV detection. This method was able to eliminate the interference of excipients, allowing the quantification of ACV in the formulation of nanoparticles with appropriate precision and accuracy. Thus, the percentage of drug associated with nanostructures can be calculated, obtaining a satisfactory value. Similarly, has been developed and validated HPLC method for the quantification of drug permeation tests. The proposed methodology was appropriate considering the recommendations of the RE 899/03. Through the permeability assays in Caco-2 cells, it has been found that the formulation developed increased by 3 times the value os Apparent Permeability (Papp) of ACV. In addition, the nanoparticles were able to provide controlled release of ACV in vitro using media with different pH values (1.2; 6.8 and 7.4).

Keywords: oral administration, polymeric nanoparticles, *N*,*N*,*N*-trimethylchitosan, controlled release, permeability *in vitro*.

"Não há impasse quando se está imbuído de desafio.

Não se anda porque existe um caminho; por andar é que se abre o caminho."

Daisaku Qkeda

Àqueles que estiveram comigo durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e da docência. Por guiar meus passos e me mostrar que tudo acontece no tempo certo!

Aos espíritos de luz e ao meu anjo da guarda, pela presença constante.

À Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri, pela orientação e amizade. Obrigado pelos ensinamentos e oportunidades!

À Profa. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra, pela co-orientação e o carinho de sempre. Obrigado por todos os conselhos: os científicos e os de vida!

À minha família pelo apoio, amor eterno e por sempre acreditarem em mim. Mãe e pai: todo esse esforço foi por vocês! Lu e Rê: vocês são meus espelhos! Diogo, Lídia e Elisa: minha vida são vocês! Alex e Léo: obrigado por serem meus irmãos.

Ao Diogo pela cumplicidade, companheirismo e dedicação. Você foi fundamental para essa conquista!

À minha família carioca, pelo carinho.

Aos amigos de Minas que, mesmo de longe, continuaram na torcida pelo meu sucesso. Flávia, Karine, Tulim, Pedroca, Helersom, Ed, Let´s, Delm´s, Vivi, Jana, Thila, Nane, Tocha, Nave, LeaMara, Adriana "Regina", Viviana, Mari Linhares e Samu: vocês são especiais!

Aos melhores amigos que alguém pode ter: Fran e Du, vocês sempre terão meu ombro e um lugar no meu coração. Obrigado por tudo!

Á família paulistana, pelos bons momentos: Samir, Ti e Thaleco. Vocês foram importantíssimos nessa caminhada.

Ás boas amizades que Sampa me proporcionou: Rô, Custódio, Júnior, Dudu Viola, Xanda, Érika, Claudo, Panda, Belle, Camila, Anny, Marc, Pedro, Má, Rafa Paraíso, Michelle, Marina, Rafa Melo, Talita e Marcelo Guimarães. Valeu pelo carinho e pelas boas risadas!

Aos xequemateanos, grandes irmãos e apoiadores constantes.

Ás snoopyanas, pela alegria habitual.

Á família Bicudo, por fazerem de tudo para que eu me sentisse em casa nesses anos de São Paulo. Muito obrigado pelo carinho de vocês!

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

Á Profa. Sílvia Storpirtis, por abrir as portas do Laboratório de Permeabilidade de Fármacos em Culturas Celulares para que fossem realizados os experimentos com as células Caco-2.

Á Profa. Érika Rosa Maria Kedor-Hackmann, por permitir a utilização do espectrofotômetro para a validação do método de espectrofotometria derivada.

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

Aos funcionários do Laboratório de Farmacotécnica da FCF-USP: Clau, Edgar e Dora por serem sempre tão solícitos.

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

Aos professores e amigos da UFOP e UFMG: vocês foram meu alicerce!

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

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de pesquisa.

Ás dificuldades, por me fazerem entender o quão forte posso ser!

Sumário

			Página
Lista	de figur	as	Ι
Lista	de tabe	las	IV
1. Int	roduçã	0	1
2. Re	visão c	la literatura	6
	2.1.	Carreadores nanoestruturados para a administração oral de fármacos	7
	2.1.1.	Barreiras fisiológicas para a absorção de nanosistemas	8
	2.1.1.	Nanopartículas poliméricas para liberação oral de fármacos	14
	2.1.	Nanopartículas de poli (alquil-cianoacrilato)	16
	2.1.1.	Propriedades e aplicações	16
	2.2.2.	Métodos de preparação	19
	2.2.3.	Incorporação de fármacos à nanopartículas de PACA	23
	2.2.4. das n	Influência das condições experimentais nas características anopartículas de PACA	24
	2.3.	Quitosana e seus derivados como promotores de permeação intestinal	28
	2.3.1	Quitosana	28
	2.3.2.	<i>N,N,N-</i> trimetilquitosana (TMQ)	31
	2.3.2.	1. Síntese e aplicações	31
	2.3.2.	2. Caracterização	35
	2.1.	Aciclovir	37
3.1.	Objet	ivo geral	42
3.2.	Objet	ivos específicos	42

CAPÍTULO I - Desenvolvimento, caracterização físico-química e biológica de nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) revestidas com *N,N,N*-trimetilquitosana

		~			
1. INT	RODU	ÇÃO			45
2. MA	TERIA	L			47
	2.1. M 2.1.1.	atérias-primas, solver Equipamentos e disp	ntes e reagentes		47 48
3. MÉ	TODOS	- 4p.a			40
	21 6	íntoco o coroctorizaçã	a da N/N/N/trimat	ilquitocopo (TMO)	43
	3.2. S (PBCA	Síntese das nanopar A)	tículas de poli (<i>n</i> -butil-cianoacrilato)	49 51
	3.3. cianoa	Revestimento das acrilato) com <i>N,N,N</i> -tri	nanopartículas metilquitosana (PE	de poli (<i>n</i> -butil- BCA-TMQ)	52
	3.3.1. 2.2.2	Preparação das hario	iâncie de Devectir	ids	52
	3.3.Z.				52
	3.4. D nanop 3.5. D	eterminação do dian artículas eterminação do poten	cial zeta (ζ) das na	ao de tamanno das anopartículas	53 53
	3.6. Explor	Caracterização das atória Diferencial (DS	nanopartículas C)	por Calorimetria	54
	3.7. C Absor	aracterização das na ção na Região do Infr	anopartículas por avermelho	Espectroscopia de	55
	3.8. A de For	valiação da morfologi ça Atômica (AFM)	a das nanopartícu	llas por Microscopia	55
	3.9. Av	valiação da citotoxicid	ade das nanoparti	iculas	56
	3.9.1.	Cultivo das células Ca	aco-2		56
	3.9.2.	Ensaio de citotoxicida	ade		57
	3.10. <i>A</i>	Avaliação da Resistên	icia Elétrica Transe	epitelial (RET)	58
4. RE	SULTA	DOS E DISCUSSÃO			60
	4.1. Sí	ntese e caracterizacã	o da <i>N.N.N</i> -trimet	ilquitosana (TMQ)	60
	4.2. A de pol	valiação da Eficiência i (<i>n</i> -butil-cianoacrilato	de Revestimento) com <i>N,N,N</i> -trime	das nanopartículas tilquitosana	65
	4.3.	Desenvolvimento,	caracterização	físico-química e	68

morfológica das nanopartículas

5. CONCLUSÕES	
4.4.2. Efeito das nanopartículas de PBCA-TMQ na Resistência Elétrica Transepitelial (RET) de células Caco-2	85
4.4.1. Avaliação da citotoxicidade	80
4.4. Ensaios biológicos in vitro das nanopartículas	80

CAPÍTULO II - Desenvolvimento e validação de método analítico por Espectrofotometria Derivada para a quantificação do aciclovir na formulação de nanopartículas

1. INTRODUÇÃO	93
2. MATERIAL	95
2.1. Matérias-primas, solventes e reagentes	95
2.2. Equipamentos	95
3. MÉTODOS	96
3.1. Condições analíticas	96
3.2. Preparo das soluções	96
3.2.1. Solução padrão	96
3.2.2. Soluções placebo	97
3.2.3. Soluções amostra	98
3.3. Especificidade	99
3.4. Linearidade	99
3.5. Precisão e exatidão	100
3.6. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)	101
3.7. Teste de recuperação	101
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
4.1. Especificidade	102
4.2. Linearidade	105

5. CONCLUSÕES	
4.5. Teste de Recuperação	109
4.4. Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)	109
4.3. Precisão e Exatidão	107

CAPÍTULO III - Desenvolvimento e validação de método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para quantificação do aciclovir nos estudos de permeabilidade *in vitro*

1. INTRODUÇÃO	113
2. MATERIAL	114
2.2. Matérias-primas, solventes e reagentes	114
3. MÉTODOS	116
3.1. Métodos analíticos para quantificação de amoxicilina (padrão de baixa permeabilidade), metoprolol (padrão de alta permeabilidade) e aciclovir	115
3.2. Preparo de soluções-padrão da curva analítica	116
3.3. Preparo de amostras de padrão de controle de qualidade	117
3.4. Preparo de amostras provenientes dos estudos de permeabilidade	117
3.5. Parâmetros de validação	118
3.5.1. Especificidade	118
3.5.2. Linearidade	118
3.5.3. Precisão	119
3.5.4. Exatidão	119
3.5.5. Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)	120
3.5.6. Estabilidade	120
3.5.6.1. Estabilidade de curta duração	120

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	121
4.1. Desenvolvimento do método de quantificação	121
4.2. Especificidade	124
4.3. Linearidade	126
4.4. Precisão e Exatidão	127
4.5. Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)	128
4.6. Estabilidade de curta duração	129
5. CONCLUSÕES	131

CAPÍTULO IV - Caracterização físico-química e avaliação da permeabilidade *in vitro* do aciclovir encapsulado em nanopartículas de poli (*n*-butilcianoacrilato) revestidas com *N*,*N*,*N*-trimetilquitosana

1. INTRODUÇÃO	136
2. MATERIAL	138
2.1. Matérias-primas, solventes e reagentes	138
2.2. Equipamentos e dispositivos diversos	139
3. MÉTODOS	140
3.1. Preparo das nanopartículas de poli (<i>n</i> -butil-cianoacrilato) contendo aciclovir (PBCA-ACV)	140
3.2. Determinação da porcentagem de encapsulação do fármaco às nanopartículas de PBCA	140
3.3 Revestimento das nanopartículas	142
3.4. Determinação do diâmetro e distribuição do tamanho das nanopartículas	142
3.5. Determinação do potencial zeta (ζ) das nanoparticulas	143
 3.6. Avaliação do perfil de liberação do aciclovir a partir das nanopartículas 3.7. Estudos de permeabilidade <i>in vitro</i> 	143
	144
5.7.1. Cullivo das celulas Gaco-Z	144

3.7.2. Monitoramento da integridade da membrana de células Caco-2	144	
3.7.3. Ensaio de permeabilidade	145	
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO		
 4.1. Desenvolvimento e caracterização físico-química das nanopartículas 	147	
4.2. Estudos de permeabilidade in vitro	158	
5. CONCLUSÕES		
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		
ANEXOS	193	

Lista de Figuras

	Página
Figura 1 – Representação esquemática de possíveis rotas para a captação de nanosistema.	11
Figura 2 – Representação esquemática das junções oclusivas.	13
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.	15
Figura 4 – Estrutura dos ACA descritas na literatura.	17
Figura 5 – Métodos para a preparação de nanopartículas de PACA.	20
Figura 6 – Etapas de iniciação e propagação envolvidas durante a polimerização de ACA.	21
Figura 7 – Mecanismo proposto para a formação das partículas em presença de dextran.	23
Figura 8 – Estrutura química da quitosana.	28
Figura 9 – Representação da reação de quaternização do grupo amino de quitosana com iodeto de metila.	31
Figura 10 – Espectro de ¹ H-RMN típico de <i>N,N,N</i> -trimetilquitosana.	35
Figura 11 – Estrutura química do aciclovir.	37
Figura 12 – Esquema representativo do mecanismo de ação do aciclovir.	38
Figura 13 - Espectro de ¹ H-RMN da TMQ sintetizada.	62
Figura 14 – (a) Curva de calibração obtida a partir da condutividade de soluções de TMQ. (b) Eficiência de revestimento das nanopartículas com o derivado quaternizado.	67
Figura 15 - Curvas de DSC de nanopartículas de PBCA, TMQ, nanopartículas revestidas (PBCA-TMQ) e mistura física (PBCA+TMQ).	74
Figura 16 – Curva de TG de TMQ.	76
Figura 17 – Espectro de infravermelho das amostras de nanopartículas de PBCA (a), do derivado sintetizado (TMQ) (b) e das nanopartículas revestidas (PBCA-TMQ) (c).	78
Figura 18 – Imagens de AFM referentes às nanopartículas de PBCA (a) e PBCA-TMQ 0,5% (b).	79
Figura 19 – Viabilidade de células Caco-2 incubadas com diferentes concentrações de PBCA e PBCA-TMQ por 4 h, avaliada pela técnica do MTT.	82

Figura 20 – Efeito da formulação de nanopartículas de PBCA-TMQ (75,0 86 µg/mL) na RET de células Caco-2.

Figura 21 – Espectro de ordem zero de: (a) PBCA-TMQ contendo ACV (20,0 103 μ g/mL), (b) PBCA contendo ACV (20,0 μ g/mL), (c) ACV (20,0 μ g/mL), (d) PBCA-TMQ, (e) PBCA.

Figura 22 – Espectros derivados de 1^a ordem de: (a) ACV em presença de 104 PBCA (20,0 μ g/mL), (b) ACV (20,0 μ g/mL), (c) ACV em presença de PBCA-TMQ (20,0 μ g/mL), (d) PBCA-TMQ, (e) PBCA.

Figura 23 - (a) Espectros sobrepostos de soluções de ACV nas 106 concentrações de 1,25 a 40 µg/mL. (b) Curva analítica obtida a partir da medida de absorbância em 295,2 nm.

Figura 24 – Cromatograma de injeção do aciclovir em solução tampão 121 Hanks pH 7,4.

Figura 25 – Cromatograma de injeção do aciclovir em solução tampão 122 Hanks pH 7,4.

Figura 26 - Cromatograma das injeções da solução do branco (solução tampão Hanks pH 7,4) (a) Cromatograma da solução da formulação branca (nanopartículas de poli (n-butil-cianoacrilato) revestidas com *N,N,N*-trimetilquitosana) a 900 ng/mL em tampão Hanks (b). Cromatograma da injeção de ACV a 100 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.

Figura 27 - Curva analítica referente ao método analítico desenvolvido para quantificação do aciclovir em tampão Hanks empregando-se CLAE-UV.

Figura 28 - Curva analítica para o ACV obtida a partir da medida de absorbância em 295,2 nm. Solvente: HCI 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v).

Figura 29 - Curva analítica para o ACV obtida a partir da medida de absorbância em 295,2 nm. Solvente: HCI 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v).

Figura 30 - Perfil de liberação do ACV encapsulado em nanopartículas de 151 PBCA em diferentes meios de dissolução.

Figura 31 - Perfil de liberação do ACV encapsulado em nanopartículas de 154 PBCA-TMQ em diferentes meios de dissolução.

Figura 32 – Valores de Resistência Elétrica Transepitelial (RET) obtidos com as membranas de células Caco-2 aos 10, 15 e 21 dias de cultivo em meio com pH 7,4.

Figura 33 – Quantidade permeada de amoxicilina (ng/mL) através das 159 membranas das células Caco-2 em função do tempo.

Figura 34 – Quantidade permeada de metoprolol (ng/mL) através das 159 membranas das células Caco-2 em função do tempo.

Figura 35 – Valores de Resistência Elétrica Transepitelial (RET) obtidos com 161 as membranas de células Caco-2 nas condições dos experimentos de permeabilidade.

Figura 36 – Quantidade permeada de aciclovir (ng/mL) através das 163 membranas das células Caco-2 em função do tempo.

Figura 37 – Quantidade permeada de aciclovir em nanopartículas de PBCA-TMQ (ng/mL) através das membranas das células Caco-2 em função do tempo.

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1 – Determinação do diâmetro, distribuição de tamanho e Potencial zeta das nanopartículas de PBCA.	71
Tabela 2 – Determinação do diâmetro, distribuição de tamanho e Potencial zeta das nanopartículas de PBCA-TMQ.	72
Tabela 3 – Ensaios intra- e inter-dia para a determinação da precisão e exatidão do método de ED ¹ (295,2 nm) para o placebo 1.	107
Tabela 4 – Ensaios intra- e inter-dia para a determinação da precisão e exatidão do método de ED ¹ (295,2 nm) para o placebo 2.	108
Tabela 5 – Resultados obtidos para o Teste de Recuperação do ACV em presença de nanopartículas de PBCA pelo método de ED ¹ (295,2 nm).	110
Tabela 6 – Resultados obtidos para o Teste de Recuperação do ACV em presença de nanopartículas de PBCA-TMQ pelo método de ED ¹ (295,2 nm).	110
Tabela 7 - Condições de partida para a validação dos métodos dequantificação dos compostos nos ensaios de permeabilidade <i>in vitro</i> .	117
Tabela 8 - Condições relativas aos métodos de quantificação porCLAE desenvolvidos e validados para os compostos utilizados nosestudos de permeabilidade.	125
Tabela 9 - Precisão e exatidão calculados a partir da determinaçãode três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e emdias consecutivos (inter-dias) para o aciclovir utilizando CLAE-UV.	130
Tabela 10 - LD e LQ obtidos na validação dos métodos paraquantificação do ACV empregando-se CLAE-UV.	131
Tabela 11 - Estabilidade do ACV em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.	132
Tabela 12 - Avaliação da porcentagem de encapsulação do ACV emnanopartículas de PBCA.	147

Tabela 13 – Determinação do diâmetro, distribuição de tamanho e
potencial zeta das nanopartículas de PBCA-ACV.149

Tabela 14 – Determinação do diâmetro, distribuição de tamanho e potencial zeta das nanopartículas de PBCA-ACV-TMQ. 150

Tabela 15 – Valores de P*app* para os compostos amoxicilina, metoprolol, aciclovir, bem como para o aciclovir em nanopartículas de PBCA-TMQ determinados a partir da quantidade permeada através de monocamadas de células Caco-2.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A via oral é considerada preferencial para a administração de fármacos, sobretudo no tratamento de doenças crônicas (PLAPIED *et al.*, 2011). Entretanto, princípios ativos administrados por essa via podem apresentar biodisponibilidade variável e/ou limitada (OOSTENDORP *et al.*, 2009), principalmente devido à baixa solubilidade e ausência de estabilidade do fármaco no ambiente gastrintestinal, bem como à sua ineficiente permeabilidade (GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2005).

Dessa forma, sistemas de liberação inovadores vêm sendo desenvolvidos com vistas a contornar esses inconvenientes, com destaque para os carreadores nanoestruturados (SALAMA *et al.*, 2006; YVONNE; LEONG, 2008; LOPES *et al.*, 2010). Tais carreadores oferecem inúmeras vantagens para a administração oral, sobretudo no que diz respeito ao aumento da solubilidade de fármacos, sua proteção frente à degradação no trato gastrintestinal (TGI), bem como ao incremento da absorção intestinal dos mesmos (ROGER *et al.*, 2010). Assim, existem relatos na literatura do desenvolvimento de lipossomas (SUN *et al.*, 2008), nanopartículas lipídicas (LI *et al.*, 2009) ou poliméricas (KALARIA *et al.*, 2009), nanoemulsões (KHANDAVILLI *et al.*, 2007), micelas (KWON *et al.*, 2007) e dendrímeros (KE *et al.*, 2008).

Dentre os nanosistemas, as nanopartículas poliméricas apresentam como vantagem uma maior estabilidade nos fluidos do TGI. Além disso, devido à disponibilidade de diferentes materiais poliméricos para sua preparação, é possível modular as propriedades físico-químicas desses carreadores, tais como hidrofobicidade, carga superficial, eficiência de incorporação do fármaco e seu perfil de liberação, visando otimizar o comportamento *in vivo* desses sistemas (GALINDO-RODRIGUEZ *et al.,* 2005; PAPLIED *et al.,* 2011; ZAKERI-MILANI *et*

al., 2013). Dessa forma, diversas publicações e patentes demonstraram que as nanopartículas poliméricas podem incrementar a biodisponibilidade oral de substâncias ativas em estudos pré-clínicos (PAPLIED *et al.*, 2011).

Em particular, nanopartículas de poli (alquil-cianoacrilato) (PACA) vêm sendo intensamente estudadas como ferramenta para a liberação controlada e/ou direcionada de inúmeros agentes farmacológicos, tais como moléculas citotóxicas, antibióticos, peptídeos e genes (HUANG et al., 2007; LE DROUMAGUET et al., 2012). Esses sitemas nanoestruturados apresentam as vantagens de serem formados por monômeros biocompatíveis e biodegradáveis, além de possibilitarem maior facilidade de preparação, bem como de transposição à escala industrial quando em comparação a outras nanopartículas poliméricas (BEHAN et al., 2001; VALTIER et al., 2003; WEILING et al., 2007). Estudos da literatura têm sugerido a aplicação desses carreadores para a liberação oral, já que podem proteger o fármaco encapsulado frente à degradação por enzimas presentes no TGI, além de possibilitar liberação controlada do mesmo devido à sua natureza polimérica. No entanto, sua utilização pelas vias ocular, intravenosa e transdérmica também vêm sendo investigadas. Além disso, alguns estudos demonstraram a potencialidade das nanopartículas de PACA em atravessar a barreira hematoencefálica (VAUTHIER et al., 2007; GRAF et al., 2009).

A fim de potencializar a estabilidade, bem como as propriedades biológicas dessas partículas, pode-se modificar sua superfície externa com moléculas dotadas de características específicas, tais como a quitosana. Nesse sentido, BRAVO-OSUNA e colaboradores (2006), desenvolveram nanopartículas de poli (*iso*-butil-cianoacrilato) revestidas com quitosana ou seu derivado tiolado e

3

demonstraram o aumento no comportamento adesivo das mesmas, utilizando como modelo membrana intestinal de rato. Essa estratégia pode ser interessante para sistemas de liberação nanoparticulados para aplicação oral, uma vez que a quitosana apresenta, ainda, capacidade de favorecer a permeação de ativos biológicos hidrofílicos e/ou macromoleculares através de superfícies mucosas (THANOU *et al.*, 2001).

No entanto, a quitosana (pKa = 5,5-6,5) perde sua carga e se precipita em ambientes neutros e/ou básicos, como o meio intestinal (SAHNI et al., 2008). Essa informação é particularmente importante, uma vez que estudos da literatura têm demonstrado que apenas a quitosana em sua forma protonada é capaz de abrir, reversivelmente, as junções oclusivas e facilitar o transporte paracelular de compostos farmacológicos (MOURYA, INAMDAR, 2009). Por essa razão, derivados quaternizados, sintetizados por meio da introdução de grupamentos alquila aos grupos amina presentes na estrutura molecular da guitosana, vêm sendo amplamente investigados (SIEVAL et al., 1998; AVADI et al., 2003; AVADI et al., 2004; BAYAT et al., 2006; VERHEUL et al., 2009). Tais derivados, como a trimetilquitosana, a dimetiletilquitosana e a trietilquitosana, apresentam elevada solubilidade nos meios neutro e básico e, portanto, mostram-se mais úteis para incrementar a absorção intestinal de ativos farmacológicos (SADEGHI et al., 2008). Dentre esses, foi demonstrado que a trimetilquitosana apresenta as maiores taxas de permeação in vitro e in vivo através do epitélio intestinal (KOTZE et al., 1999; JONKER et al., 2002; WERLE et al., 2009).

Frente ao exposto e considerando a inexistência de formulação similar na literatura, a intenção desse trabalho é de, utilizando o aciclovir como fármaco

4

modelo, desenvolver e avaliar um novo sistema de liberação constituído por nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) revestidas com N, N, Ntrimetilquitosana com vistas à modular a liberação e incrementar a permeação intestinal de fármacos. Além disso, esse sistema poderá ser capaz de proteger princípios ativos encapsulados frente a possíveis degradações no TGI. O nanosistema desenvolvido será caracterizado em relação à suas propriedades biológicas in físico-químicas, morfológicas e vitro. Adicionalmente, а permeabilidade intestinal do fármaco modelo encapsulado nas nanopartículas será avaliada utilizando-se metodologia in vitro com o emprego de células Caco-2.

Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Carreadores nanoestruturados para a administração oral de fármacos

A via oral é considerada preferencial para a administração de fármacos, oferecendo inúmeras vantagens tais como conveniência, facilidade de adesão ao tratamento e adequada relação custo-benefício (GOMEZ-ORELLANA *et al.*, 2005; YVONNE; LEONG, 2008). Além disso, constitui a via de escolha para o tratamento de doenças crônicas (PLAPIED *et al.*, 2011). Entretanto, princípios ativos administrados por essa via podem apresentar biodisponibilidade variável e/ou limitada (OOSTENDORP *et al.*, 2009). Tal inconveniente ocorre principalmente devido a: (a) baixa solubilidade do fármaco; (b) instabilidade da molécula ativa frente ao ambiente do trato gastrointestinal (TGI); (c) absorção do ativo restrita a uma determinada região do TGI e (d) baixa permeabilidade do fármaco (GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2005).

Com a finalidade de contornar tais inconvenientes, diferentes sistemas para a otimização da liberação oral de fármacos têm sido desenvolvidos. Dentre esses, os mais comumente empregados envolvem a utilização de dispersões sólidas (VASCONCELOS *et al.*, 2007; JANSSENS; VAN DEN MOOTER, 2009), promotores de permeação (MOTLEKAR *et al.*, 2006; SHAH *et al.*; 2008), polímeros bioadesivos (BERNKOP-SCHNÜRCH, 2000; ACCILLI *et al.*, 2004) e, especialmente, sistemas de liberação nanoestruturados (SALAMA *et al.*, 2006; YVONNE; LEONG, 2008; LOPES *et al.*, 2010; BELOQUI *et al.*, 2013). Nesse sentido, diversos estudos da literatura vêm demonstrando o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos encapsulados em nanocarreadores, tais como lipossomas (SUN *et al.*, 2008), nanopartículas lipídicas (LI *et al.*, 2009) ou poliméricas (KALARIA *et al.*, 2009), nanoemulsões (KHANDAVILLI *et al.*, 2007), micelas (KWON *et al.*, 2007) e dendrímeros (KE *et al.*, 2008).

Devido as suas propriedades, esses carreadores oferecem inúmeras vantagens para a administração oral, sobretudo no que diz respeito ao aumento da solubilidade do fármaco, sua proteção frente à degradação no TGI, bem como ao incremento da absorção intestinal do mesmo (VIEHOF *et al.*, 2013). No entanto, além do aumento na biodisponibilidade oral de ativos biológicos, o desafio atual é desenvolver partículas que permaneçam intactas ao longo do trato digestório e, por isso, possam ser consideradas verdadeiros nanovetores, com propriedades semelhantes àqueles administrados pela via intravenosa (ROGER *et al.*, 2010).

2.1.2. Barreiras fisiológicas para a absorção de nanosistemas

Após administração oral, a primeira barreira encontrada pelos nanocarreadores é o lúmen do TGI. De fato, a literatura descreve que esses sistemas podem se desestabilizar ou degradar em ambientes apresentando extremos de pH, elevada força iônica ou alto conteúdo de enzimas e proteínas (PREGO *et al.*, 2006). Portanto, a nanoestrutura desenvolvida deve ser resistente e estável nessas condições (FRANCIS *et al.*, 2004). Diante disso, a estabilidade desses sistemas de liberação vem sendo amplamente estudada e, em alguns casos, modificações nas formulações têm sido propostas. Nesse sentido, alguns estudos demonstraram que o revestimento dos nanosistemas com polietilenogilcol (TOBÍO *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2003; RAMACHANDRAN *et al.*, 2009) ou quitosana

(FILIPOVIC-GRCIC *et al.*, 2001; PREGO *et al.*, 2006) é capaz de incrementar a estabilidade dos mesmos. Esses constituintes, por meio de um mecanismo de estabilização estérica, podem impedir que o ambiente ácido e a ação enzimática afetem a estrutura dos carreadores (ROGER *et al.*, 2010).

Antes da absorção intestinal, os nanocarreadores devem difundir-se através do muco adjacente à parede intestinal. Tal muco, cuja espessura é de aproximadamente 30-100 µm, protege a superfície epitelial devido à propriedade lubrificante conferida pela mucina. Essa glicoproteína, principal constituinte do muco, diminui significativamente a difusão de pequenas e grandes moléculas criando, por conseguinte, uma barreira física para a absorção das partículas (PLAPIED et al., 2011). Entretanto, sistemas de liberação nanoestruturados apresentando carga superficial positiva podem ser transportados mais facilmente através do muco já que, o elevado número de moléculas de ácido siálico e acúcar presentes na estrutura da mucina, conferem à mesma uma acentuada carga negativa (ROGER et al., 2010). Conseqüentemente, a interação eletrostática com as cargas presentes na mucina pode favorecer a absorção dessas partículas através do muco e aumentar sua internalização pelas células epiteliais, as quais também são carregadas negativamente (NORRIS et al., 1998; LAI et al., 2009). A esse respeito, existe o relato de que a quitosana, por conferir carga positiva às nanoestruturas, pode aderir à superfície mucosa e essa bioadesão ocasiona uma maior probabilidade de absorção do fármaco (BEHRENS et al., 2002).

Diferentes mecanismos são utilizados para o transporte dos nanocarreadores através da barreira intestinal (Figura 1). Uma rota possível para a penetração dos nanosistemas é o transporte passivo transcelular, o qual inclui a

difusão através das células intestinais (FASANO, 1998). Nessa via, a razão de absorção é governada pela lei de Fick, a qual depende, dentre outros fatores, das propriedades físico-químicas do soluto e do gradiente de concentração através das células (ROGER *et al.*, 2010). Tal transporte constitui a rota preferencial para substâncias suficientemente lipofílicas e de moderado peso molecular. Dessa forma, em teoria, estruturas supramoleculares como os nanocarreadores não poderiam difundir-se de forma satisfatória (FRANCIS *et al.*, 2004).

Frente ao exposto, o transporte ativo através das células parece ser mais adequado para a absorção de nanoestruturas. A esse respeito, deve-se considerar o transporte mediado por células M, bem como pelos enterócitos (ROGER *et al.*, 2010; PLAPIED *et al.*, 2011). As células M são células especializadas da mucosa associada ao tecido linfóide, podendo formar estruturas distintas, tais como as placas de *Peyer* e são caracterizadas por sua habilidade em transportar antígenos do lúmen intestinal para as células do sistema imune.



Figura 1 – Representação esquemática de possíveis rotas para a captação de nanosistemas. (1) pinocitose (endocitose) via receptor, (2) transporte transcelular, (3) transporte paracelular, (4) captação via células M. A largura das setas representa a contribuição de cada processo para a absorção dos nanocarreadores (Adaptado de PAPLIED *et al.*, 2011).

Assim, devido às suas propriedades absortivas, a captação de sistemas nanoestruturados por essas células é amplamente descrita na literatura (BAYDEN *et al.*, 2005; des RIEUX *et al.*, 2006; DAMGE *et al.*, 2008). De maneira semelhante, o mecanismo de captação dos nanosistemas via enterócitos vem sendo amplamente estudado (des RIEUX *et al.*, 2005). Tal captação pode ser alcançada, sobretudo, pelo processo de pinocitose (macropinocitose ou endocitose). A esse respeito, alguns autores atribuem que a pinocitose envolvendo a ligação das nanoestruturas com receptores específicos, pode

constituir uma excelente estratégia para o aumento da absorção das mesmas (PAPLIED *et al.*, 2011).

Por outro lado, no transporte passivo paracelular, há a passagem das partículas através dos espaços intercelulares. Dessa forma, existe uma limitação para a absorção de nanosistemas por essa via, uma vez que o diâmetro dos poros nesses espaços é da ordem de 3 a 10 Å (ROGER *et al.*, 2010) e esses representam menos de 1% da área absortiva total do intestino (PLAPIED *et al.*, 2011). Todavia, é importante considerar a presença das junções oclusivas (ou *tight junctions*), as quais constituem uma barreira contra a passagem de substâncias indesejadas pelos poros, entre células justapostas (GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2009). Essas junções são compostas por um grupo de proteínas citosólicas e transmembranares, principalmente ocludinas, claudinas, actina e *zonula occludens* 1 (ZO-1) (Figura 2) e, entre esse complexo de proteínas, estão definidos os espaços intercelulares. Portanto, para que haja a passagem do fármaco (ou das nanoestruturas), as junções oclusivas devem ser abertas (DELI, 2009).



Figura 2 – Representação esquemática das junções oclusivas. ZO-1 = *zona* occludens 1, ZO-2 = *zona* occludens 2, ZO-3 = *zona* occludens 3 (Adaptado de PAPLIED *et al.*, 2011)

Nesse cenário, nanosistemas contendo diferentes polímeros, entre os quais quitosana (SADEGHI *et al.*, 2008) ou seu derivado quaternizado (*N*,*N*,*N*-trimetilquitosana) (CAO *et al.*, 2009) e poli (amidoamina) (KITCHENS *et al.*, 2007), foram desenvolvidos visando o aumento do transporte paracelular, a partir da abertura reversível das junções oclusivas. Para tanto, esses compostos podem atuar sobre as junções pela reorganização estrutural das proteínas associadas às junções oclusivas (DELI, 2009).

Duas diferentes hipóteses procuram explicar o incremento no transporte paracelular de fármacos encapsulados a sistemas nanoestruturados. Em uma primeira abordagem, os nanocarreadores, após passagem pela camada de muco, são desestruturados e liberam seus constituintes, os quais são capazes de abrir as junções oclusivas. Dessa forma, o fármaco é capaz de permear pelos espaços intercelulares (LIN *et al.*, 2008). Entretanto, o ativo, liberado na camada mucosa,

deve apresentar estabilidade nesse meio, além da capacidade de se difundir através do muco (ROGER *et al.*, 2010). Por outro lado, uma segunda teoria sugere que o fármaco permaneça encapsulado durante o transporte pela camada mucosa e, dessa forma, o carreador chegaria intacto para exercer sua ação sobre as junções oclusivas (ROGER *et al.*, 2010; PLAPIED *et al.*, 2011).

2.1.3. Nanopartículas poliméricas para liberação oral de fármacos

As nanopartículas poliméricas (NP) são sistemas carreadores de fármacos os quais apresentam diâmetro inferior a 1000 nanômetros. O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, que diferem entre si de acordo com sua composição e organização estrutural (Figura 3). As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo aquoso ou oleoso, estando o fármaco dissolvido neste núcleo (a) e/ou adsorvido à parede polimérica (b). Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode se encontrar retido (c) ou adsorvido (d) (SCHAFFAZIK *et al.*, 2003, LOPES *et al.*, 2010).


Figura 3 - Representação esquemática da estrutura de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas (Adaptado de SCHAFFAZIK *et al.,* 2003).

Vários polímeros sintéticos podem ser utilizados na preparação de nanocápsulas e nanoesferas, sendo poli (ácido lático) (PLA), poli (ácido lático-coácido glicólico) (PLGA), poli (ε-caprolactona) (PCL), copolímeros do ácido metacrílico e derivados de cianoacrilato, os mais amplamente empregados (PAPLIED *et al.*, 2011). Por outro lado, NP à base de polímeros naturais, tais como quitosana, alginato e gelatina, também estão sendo preparadas (ROGER *et al.*, 2010). Em geral, tais polímeros apresentam características adequadas no que diz respeito à biocompatibilidade, biodegradabilidade e toxicidade. Além disso, podem proteger o composto bioativo frente à degradação e controlar sua liberação nos fluidos biológicos (LOPES *et al.*, 2010).

Quando em comparação aos demais sistemas nanoestruturados para aplicação oral, as NP apresentam algumas vantagens. Por exemplo, em relação aos lipossomas, bem como às micelas, os carreadores nanoparticulados mostramse mais estáveis nos fluidos do TGI. Além disso, devido à possibilidade de utilização de diferentes materiais poliméricos, é possível modular as propriedades físico-químicas das nanopartículas, tais como hidrofobicidade, carga superficial, eficiência de incorporação do fármaco e seu perfil de liberação, visando otimizar o comportamento *in vivo* desses sistemas (GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2005; PAPLIED *et al.*, 2011; LE DROUMAGUET *et al.*, 2012). Portanto, a enorme versatilidade dos vetores nanoparticulados pode permitir a adequada liberação de uma ampla gama de ativos biológicos (YAMANAKA; LEONG, 2008; ZAKERI-MILANI *et al.*, 2013). Nesse sentido, existem relatos na literatura da utilização de nanopartículas para a administração oral de peptídeos, proteínas, genes, nutracêuticos e fármacos sintéticos (LOPES *et al.*, 2010). Adicionalmente, diversas publicações e patentes demonstraram que as NP podem incrementar a biodisponibilidade oral de substâncias ativas em estudos pré-clínicos (PAPLIED *et al.*, 2011).

2.2. Nanopartículas de poli (alquil-cianoacrilato)

2.2.1. Propriedades e aplicações

Os monômeros derivados de alquil-cianoacrilatos (ACA) (Figura 4) vêm sendo utilizados desde 1966 devido a suas excelentes propriedades adesivas e, por isso, são amplamente empregados como suturas cirúrgicas. Dessa forma, vários produtos comerciais para aplicação médica estão disponíveis no mercado (OOWAKI *et al.*, 2000; REECE *et al.*, 2001), sobretudo, produtos contendo ACA de cadeia longa, tal como o *n*-butil-cianoacrilato (*n*-BCA) (Indermil[®], Liquiband[®], Histoacryl[®]) (VAUTHIER *et al.*, 2003).



Figura 4 – Estrutura dos ACA descritas na literatura: metil-cianoacrilato (MCA), etilcianoacrilato (ECA), *n*-butil-cianoacrilato (*n*BCA), *iso*-butil-cianoacrilato (IBCA), *iso*-hexilcianoacrilato (IHCA), octil-cianoacrilato (OCA), *iso*-estearil-cianoacrilato (ISCA), hexadecilcianoacrilato (HDCA) e metoxi-poli(etilenoglicol)-cianoacrilato (MePEGCA). (Adaptado de: NICOLAS; COUVREUR, 2009).

Posteriormente, em 1979, Couvreur e colaboradores desenvolveram um procedimento simples para a produção de nanopartículas matriciais elaboradas a partir de MCA e ECA. Tal método consistiu do gotejamento do monômero, sob agitação, em solução de HCI (2 < pH < 3) contendo um tensoativo não-iônico ou macromolecular (NICOLAS; COUVREUR, 2009). Desde então, nanopartículas de poli (alquil-cianoacrilato) (PACA) vem sendo intensamente estudadas como ferramenta para a liberação modificada e/ou direcionada de inúmeros agentes farmacológicos, desde moléculas de baixo peso molecular até macromoléculas (proteínas e peptídeos) e DNA (HUANG *et al.*, 2007, GRAF *et al.*, 2009; REN *et al.*, 2011).

Esses sistemas nanoestruturados apresentam as vantagens de serem formados a partir de monômeros biocompatíveis e biodegradáveis, além de

possibilitarem maior facilidade de preparação, bem como de transposição à escala industrial quando em comparação a outras nanopartículas poliméricas (BEHAN *et al.*, 2001; VAUTHIER *et al.*, 2003). Diante disso, estudos da literatura têm focado a aplicação das nanopartículas de PACA para a administração de fármacos por diferentes vias de administração, tais como oral (SULLIVAN; BIRKINSHAW, 2004), oftálmica (DESAI *et al.*, 2000), transdérmica (SIMEONOVA *et al.*, 2003) e parenteral (XI-XAO *et al.*, 2006). Por outro lado, nanoparticulas de PACA contendo doxorubicina, atualmente em Ensaio Clínico de Fase III, têm demonstrado incremento do percentual de sobrevivência, bem como da segurança comparativamente ao tratamento padrão em pacientes acometidos por hepatocarcinoma multi-droga resistente (LE DROUMAGUET *et al.*, 2012).

Em relação à administração oral, alguns trabalhos empregando nanopartículas à base de ACA demonstraram a potencialidade desses carreadores em incrementar a biodisponibilidade de compostos bioativos. No estudo de Damgé e colaboradores (1997), os autores investigaram a estabilidade *in vitro* da insulina associada à nanoesferas de poli (*iso*-butil-cianoacrilato) em presença de enzimas digestivas. Como esperado, a insulina livre foi rapidamente degradada em presença de pepsina, tripsina e quimiotripsina. Por outro lado, os resultados indicaram que de 75 a 85% da dose inicial de insulina incorporada às nanopartículas foi recuperada após incubação com pepsina e entre 80 e 95%, após incubação com quimiotripsina. No caso da incubação com tripsina, essa porcentagem foi igual a 83%. Além disso, os pesquisadores relataram que, após a administração oral da formulação em ratos, o efeito hipoglicemiante foi marcadamente mais acentuado guando em comparação à insulina livre.

De maneira semelhante, Roger e colaboradores (2010) citam que no trabalho de Maincent e colegas (1986) foi observado um aumento de aproximadamente duas vezes na biodisponibilidade oral da vincamina associada à nanopartículas de poli (*iso*-hexil-cianoacrilato). Mais recentemente, He e co-autores (2008) desenvolveram nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) contendo timopentina (TP), um peptídeo sintético, e constataram que sua biodisponibilidade oral foi similar à observada quando da administração de TP pela via parenteral.

2.2.2. Métodos de preparação

A literatura aponta que diferentes tipos de nanopartículas à base de PACA podem ser obtidas dependendo do método de preparação (Figura 5). Entretanto, o método mais simples e mais comumente utilizado envolve a polimerização do monômero correspondente e é utilizado para a preparação de nanocápsulas (método de polimerização interfacial) ou nanoesferas (método de polimerização em emulsão). Por outro lado, tais nanosistemas podem ser obtidos a partir da utilização do polímero pré-formado, com o emprego dos métodos de nanocápsulas) ou emulsificação-evaporação do solvente, obtendo-se nanoesferas (VAUTHIER *et al.*, 2007).



Figura 5 – 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).

Particularmente, para a preparação de nanoesferas, o método mais amplamente empregado emprega a polimerização em emulsão (ALYAUTDIN *et al.*, 1997; DESAI; BLANCHARD, 2000; ZHANG *et al.*, 2001; RADWAN; ABOUL-ENEIN, 2002; XI-XIAO *et al.*, 2006; ARIAS *et al.*, 2008; LIU; CHEN, 2009; DUAN *et al.*, 2009). Tal método é simples, não utiliza solvente orgânico e mostra-se capaz de produzir nanopartículas matriciais estáveis, com bom rendimento e que, em geral, apresentam satisfatória porcentagem de fármaco encapsulado. Nesse processo, a polimerização pode ocorrer por três diferentes mecanismos: (a) aniônico, (b) zwitteriônico e (c) radicalar (Figura 6). Na prática, devido à excepcional reatividade dos ACA, os mecanismos (a) e (b) são os mais freqüentes, ocorrendo facilmente à temperatura ambiente (WU *et al.*, 2009). De fato, pela presença de dois fortes grupos retiradores de elétrons (COOR e CN) ligados ao carbono-α da dupla ligação, os monômeros ACA exibem elevada reatividade frente a ânions (I⁻, Br⁻, CH₃COO⁻, OH⁻, etc.) ou bases fracas (álcool, água, aminoácidos, etc.). Dessa forma, mesmo quantidades mínimas de um desses compostos no meio reacional são suficientes para iniciar uma rápida polimerização (NICOLAS; COUVREUR, 2009).



Figura 6 – Etapas de iniciação e propagação envolvidas durante a polimerização de ACA: (a) mecanismo aniônico, (b) mecanismo zwitteriônico, (c) mecanismo radicalar. B^- = base, Nu = nucleófilo, P[•] = radical. (Adaptado de NICOLAS; COUVREUR, 2009).

Assim, o pH do meio reacional é ajustado, mais comumente, para 2,5 com solução diluída de HCI e a polimerização ocorre rapidamente, sendo iniciada pelos íons hidroxila presentes na água ou pelos grupos nucleofílicos presentes nas cadeias dos tensoavtivos ou estabilizantes. Além disso, existem relatos de que alguns constituintes da formulação podem contribuir para a iniciação do processo (VAUTHIER *et al.*, 2007). Nesse sentido, deve ser ressaltado que alguns fármacos

são capazes de iniciar a reação, o que pode levar a perda de sua atividade biológica (WEISS *et al.*, 2007).

Geralmente, a polimerização é finalizada de 3 a 4 h, sob agitação vigorosa e o tempo de reação depende da natureza do monômero. Por exemplo, 3 h geralmente são suficientes para a polimerização do BCA, já para o HCA 4 h são necessárias (VAUTHIER *et al.*, 2007). Diferentes agentes podem ser utilizados para a estabilização das partículas, tais como Pluronic[®], quitosana ou dextran, sendo que os mesmos tem influência no diâmetro, bem como no potencial zeta das nanoesferas formadas (PERACCHIA *et al.*, 1997; LIMOUZIN *et al.*, 2003; BRAVO-OSUNA *et al.*, 2007a) No caso da utilização do dextran, as partículas apresentam diâmetro médio entre 160 e 200 nm e potencial zeta variando de - 5 a - 27 mV (BERTHOLON *et al.*, 2006).

A respeito do mecanismo de polimerização aniônica, quando da utilização do estabilizante dextran, Reddy & Murthy (2004a), descrevem que os íons hidroxila presentes no meio fazem com que as unidades monoméricas consigam formar oligômeros. Esses, por sua vez, iniciam a propagação, aumentando o comprimento de suas cadeias até alcançarem um nível crítico, a partir do qual há a redução de sua solubilidade aquosa. Com isso, há a precipitação dos oligômeros, com conseqüente formação de partículas primárias (processo conhecido como nucleação homogênea). Então, gotículas de monômeros residuais difundem-se em direção às partículas primárias formando, assim, estruturas intumescidas. Tais estruturas aumentam de tamanho com a continuidade da reação de polimerização entre o monômero e íons presentes em solução, até que todo o monômero seja utilizado. Nessa fase, o dextran recobre as

partículas formadas, estabilizando-as pelo mecanismo de repulsão estérica (Figura 7)



Figura 7 – Mecanismo proposto para a formação das partículas em presença de dextran. (a) = início do processo de polimerização a partir dos íons hidroxila presentes no meio reacional, (b) = formação de oligômeros, (c) = propagação da reação e aumento do comprimento das cadeias dos oligômeros, (d) = formação de estruturas intumescidas, (e) estabilização estérica das partículas formadas (Adaptado de REDDY; MURTHY, 2004a).

2.2.3. Incorporação de fármacos à nanopartículas de PACA

Devido à elevada área superficial dessas nanoestruturas porosas, uma grande variedade de fármacos pode ser eficientemente associada, incluindo moléculas citostáticas, antibióticos, hormônios e fármacos antivirais (SULLIVAN; BIRKINSHAW, 2004). Estudos da literatura apontam que, para a encapsulação de fármacos hidrofílicos, as nanoesferas mostram-se bastante eficientes. Por outro lado, para moléculas lipofílicas alguns recursos, como a adição de solubilizantes (tais como a ciclodextrina) é capaz de otimizar o processo (GRAF *et al.*, 2009). Diante disso, a incorporação de fármacos às nanoesferas pode ser alcançada por

diferentes processos: o ativo pode estar presente no meio reacional antes da adição do monômero (preferencialmente no caso de substâncias lipofílicas), ser introduzido após a iniciação do processo de polimerização ou adicionado às partículas pré-formadas (para moléculas hidrofílicas). No último caso, evita-se a interferência do componente ativo no processo de polimerização e o fármaco se associa às nanoesferas por um mecanismo de adsorção (SIMEONOVA *et al.*, 2003; MAcCARRON *et al.*, 2009).

2.2.4. Influência das condições experimentais nas características das nanopartículas de PACA

As condições de preparo das nanopartículas de PACA influem fortemente em suas características físico-químicas, tais como diâmetro, potencial zeta e porcentagem de incorporação do fármaco. Nesse contexto, alguns estudos se dedicaram a elucidar a influência de diversos parâmetros nas propriedades das partículas formadas (McCARRON *et al.*, 1999, REDDY; MURTHY, 2004a, LIU; CHEN, 2009). No trabalho de Liu e Chen (2009), nanoesferas de poli (*n*-butilcianoacrilato) contendo o fármaco indometacina (IDC), foram preparadas pelo processo de polimerização aniônica e os efeitos de diferentes variáveis do processo (pH, concentração do tensoativo e quantidade de fármaco adicionado ao meio de polimerização) foram investigados. Como resultado, os autores observaram que o decréscimo do pH diminui consideravelmente o tamanho das partículas obtidas. Isso pôde ser explicado pela diminuição da concentração de fons hidroxila no meio de polimerização. Esse resultado vai ao encontro do observado no estudo de McCarron e colaboradores (1999), quando da investigação da influência do pH no diâmetro de nanoesferas de poli (*iso*-butilcianoacrilato).

Por outro lado, o potencial zeta das partículas também foi alterado em função do pH, sendo as duas grandezas diretamente proporcionais. Segundo os autores, isso pode ser atribuído ao aumento do grau de ionização da IDC, bem como à maior adsorção de ânions provenientes da fase aquosa. Além disso, o pH mostrou influência significativa na porcentagem de fármaco encapsulado nas nanopartículas e, em geral, em menores valores de pH houve uma maior eficiência de encapsulação. Nesse caso, a explicação é atribuída à redução do caráter iônico do fármaco em estudo (pka = 4,5), o que leva ao aumento de sua afinidade pela cadeia de oligômeros formados durante a reação de polimerização. De fato, Couvreur e colaboradores (1991) descreveram que a capacidade adsortiva das nanopartículas torna-se maior guando o fármaco encontra-se em sua forma não-ionizada. No que diz respeito à concentração do tensoativo, os pesquisadores concluíram, como esperado, que uma quantidade insuficiente desse constituinte leva à agregação das partículas, o que ocasiona um aumento substancial no diâmetro das mesmas. Esse resultado confirma a importância de uma quantidade adequada de tensoativo, visando o recobrimento efetivo das nanopartículas e contribuindo para sua estabilidade. No que diz respeito à eficiência de incorporação do fármaco, foi demonstrado que um aumento na concentração do tensoativo foi capaz de elevar a porcentagem de encapsulação. No entanto, os pesquisadores encontraram que, quando do excesso desse agente, a taxa de encapsulação da IDC é diminuída. Esses resultados foram explicados da seguinte maneira: em baixas concentrações do tensoativo, as

nanopartículas de PBCA, cuja superfície é extremamente porosa, podem perder certa guantidade de fármaco por difusão para o meio externo. De modo contrário, na medida em que a concentração do estabilizante é aumentada, essa superfície porosa torna-se gradualmente lisa, minimizando a perda de fármaco durante a síntese. Já para quantidades excessivas do tensoativo houve, possivelmente, uma ligação entre o fármaco e esse agente, o que explicaria menores quantidades de fármaco incorporado. Na avaliação da influência da concentração de IDC nas propriedades das partículas, foi observado que o aumento na quantidade de fármaco conduziu a um ligeiro acréscimo no diâmetro das partículas. A esse respeito, os estudos da literatura são controversos e, dessa forma, essa correlação parece depender do tipo de fármaco em estudo (SULLIVAN; BIRKINSHAW, 2004). Além disso, foi observado que o potencial zeta das nanopartículas era afetado pela guantidade de IDC presente no meio reacional. Nesse caso, com o aumento da quantidade de fármaco na superfície das partículas, houve uma maior exposição dos grupamentos COO⁻ presentes na estrutura do mesmo. Finalmente, foi encontrado que a eficiência de incorporação torna-se menor na medida em que a concentração de IDC é aumentada. Esse resultado está concordante ao observado no trabalho de Reddy & Murthy (2004a), que desenvolveram nanopartículas de PBCA para veiculação de doxorrubicina. Tais dados permitem supor que exista um limite para a encapsulação do fármaco a essas nanopartículas.

A fim de potencializar as propriedades biológicas das nanopartículas de PACA visando sua aplicação pela via oral, pode-se, por exemplo, modificar sua superfície externa com moléculas dotadas de características específicas, tais

como a quitosana. Nesse sentido, Bravo-Osuna e colaboradores (2007), desenvolveram nanopartículas de poli (*iso*-butil cianoacrilato) revestidas com quitosana ou seu derivado tiolado e demonstraram o aumento no comportamento adesivo das mesmas, utilizando como modelo membrana intestinal de rato. Essa estratégia pode ser interessante, uma vez que a quitosana e seus derivados, além de auxiliarem na manutenção da estabilidade de nanoestruturas no TGI (PREGO *et al.*, 2006; CAO *et al.*, 2009), apresentam a capacidade de favorecer a permeação de ativos biológicos através da mucosa intestinal (THANOU *et al.*, 2000).

2.3. Quitosana e seus derivados como promotores de permeação intestinal

2.3.1. Quitosana

A quitosana (Figura 8) é um aminopolissacarideo biodegradável, hidrofílico, de baixa toxicidade e biocompatível, obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina, um polímero encontrado em carapaças de crustáceos, cutículas de insetos e parede celular de alguns fungos. Em relação a sua estrutura química é considerada um copolímero, formado por unidades de β -(1,4) 2-amino 2-desoxi-D - glicose e β -(1,4) 2-acetamido- 2- desoxi -D- glicose com a presença de grupos amino e grupos hidroxila primário e secundário (TORRES *et al.*, 2005; TAKAHASHI *et al.*, 2007). Este biopolímero é caracterizado como uma base fraca, sendo insolúvel em água e solventes orgânicos, porém, solúvel em soluções acidas diluídas (pH <6,5), onde ocorre a conversão das unidades glicosaminas para forma solúvel R-NH3⁺. No entanto, em contato com soluções neutras, alcalinas ou em presença de poliânions, sofre precipitação (SINHA *et al.*, 2004).



Figura 8 – Estrutura química da quitosana (Fonte: GARCIA et al., 2008).

Devido a suas características de adesividade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, a quitosana tem se tornado um material

potencialmente atraente para diversos usos, principalmente na área farmacêutica. Esse polissacarídeo vem sendo usado como sistema polimérico na liberação modificada de fármacos de diversas classes terapêuticas, tais como, antibióticos, antiinflamatórios, anti-hipertensivos, além de peptídeos e proteínas (FELT *et al.*, 1999; BERNKOP-SCHNURCH, 2001; FLOREA *et al.*, 2006; BOONYO *et al.*, 2007; SANDRI *et al.*, 2010)

Adicionalmente, uma propriedade interessante desse polímero diz respeito à sua capacidade de incrementar a permeabilidade paracelular de ativos macromoleculares e/ou hidrofílicos através da mucosa epitelial, induzindo a abertura transitória das junções oclusivas presentes nas membranas celulares (BORCHARD *et al.*, 1996; SCHIPPER *et al.*, 1999; FINI; ORIENTI, 2003). Tal mecanismo ocorre através da interação de cargas positivas dos grupamentos amino presentes na posição C-2 da quitosana com os sítios de cargas negativas presentes na superfície celular, bem como nas junções oclusivas (ARTURSSON *et al.*, 1994; ILLUM, 1998; SAHNI *et al.*, 2008). Com isso, há a redistribuição das ocludinas e ZO-1 e a modificação da estrutura filamentosa da actina-F, a qual passa a apresentar uma estrutura globular (DELI, 2009).

Nesse sentido, Illum e colaboradores (1994) foram os primeiros a reportar que a quitosana (5% p/v) mostrava-se hábil em promover a absorção de pequenas moléculas polares, bem como de peptídeos e proteínas através da mucosa nasal em ratos e ovelhas. Em seguida, Artursson e colaboradores (1994) observaram que esse polímero poderia incrementar a permeação paracelular do [¹⁴C]-manitol através de células Caco-2. Posteriormente, no estudo de ASPDEN e colegas (1996), foi avaliada *in vivo* a capacidade da quitosana em promover a absorção

intestinal do peptídeo buserelina. Como resultado, os autores demonstraram, após administração intraduodenal em ratos, um aumento significativo na biodisponibilidade do peptídeo quando em comparação à formulações contendo apenas o ativo ou àquelas contendo buserelina associada ao Carbopol[®] 943. Entretanto, em todos os estudos mencionados, o incremento da absorção foi encontrado apenas em ambientes ácidos, os quais apresentam menores valores de pH em relação ao pKa da quitosana (5,5 – 6,5) (MOURYA *et al.*, 2009).

De fato, esse biopolímero policatiônico perde sua carga e se precipita em ambientes neutros e/ou básicos, tal como o meio intestinal (SAHNI *et al.*, 2008). Isso se deve à baixa densidade de cargas ao longo de suas cadeias, como conseqüência do baixo número de sítios amino protonados no pH do intestino (CURTI, 2004). Essa informação é particularmente importante, uma vez que estudos da literatura têm demonstrado que apenas a quitosana em sua forma protonada é capaz de abrir, reversivelmente, as junções oclusivas e facilitar o transporte paracelular de compostos farmacológicos (MOURYA, INAMDAR, 2009).

Pelo exposto, derivados quaternizados, sintetizados por meio da introdução de grupamentos alquila aos grupos amina presentes na estrutura molecular da quitosana, vêm sendo amplamente investigados (SIEVAL *et al.*, 1998; AVADI *et al.*, 2003; AVADI *et al.*, 2004; BAYAT *et al.*, 2006; VERHEUL *et al.*, 2009; GUAN *et al.*, 2012b). Tais derivados, como a trimetilquitosana, a dimetiletilquitosana e a trietilquitosana são polieletrólitos catiônicos em toda a escala de pH e, por isso, apresentam elevada solubilidade nos meios neutro e básico, mostrando-se, portanto, mais úteis para incrementar a absorção intestinal de ativos biológicos

(SADEGHI *et al.*, 2008). Dentre esses, foi demonstrado que a trimetilquitosana (TMQ) propicia as maiores taxas de permeação *in vitro* e *in vivo* através do epitélio intestinal (KOTZÉ *et al.*, 1999; JONKER *et al.*, 2002; WERLE *et al.*, 2009).

2.3.2. N,N,N-trimetilquitosana (TMQ)

2.3.2.1. Síntese e aplicações

A introdução de cargas positivas permanentes nas cadeias de quitosana pode ser efetuada via adição de um substituinte contendo um grupo amônio quaternário ou pela quaternização dos grupos amino desse polímero. A primeira alternativa envolve a reação da quitosana com um epóxido de sal de amônio, tal como o cloreto de glicidiltrimetilamônio e a segunda pode ser acompanhada pela alquilação redutiva ou pela N-alquilação direta e extensiva da quitosana com iodeto de metila (CURTI, 2004) (Figura 9).



Figura 9 – Representação da reação de quaternização do grupo amino de quitosana com iodeto de metila. NMP = N-metilpirrolidona (Adaptado de MOURYA; INAMDAR, 2009).

Dessa forma, diversos trabalhos foram realizados com emprego do método de N-alquilação na presença do iodeto de metila, em meio fortemente alcalino (SIEVAL *et al.*, 1998; THANOU *et al.*, 2000; SNYMAN *et al.*, 2002; SAHNI *et al.*, 2008; BAL *et al.*, 2009; GUAN *et al.*, 2012a). A utilização de uma base forte é essencial para a neutralização do ácido iodídrico liberado durante a reação de alquilação. Já o sal sódico é adicionado visando blindar as cargas eletrostáticas no polímero já que, conforme avança a reação, a densidade de carga aumenta e a velocidade de quaternização é afetada pelo impedimento eletrostático das moléculas (DOMARD *et al.*, 1986).

Uma das principais características da TMQ é expressa pelo grau médio de quaternização (GQ), que está diretamente relacionado ao número médio de sítios quaternizados em suas cadeias. A densidade de carga desse derivado é um fator importante, o qual exerce influência na propriedade da macromolécula de aumentar a absorção de fármacos através da mucosa epitelial (HAMMAN *et al.*, 2000). Dessa forma, os estudos da literatura indicam que uma alta densidade de cargas (GQ ~ 60%) é necessária para que haja um incremento substancial na permeabilidade paracelular das moléculas bioativas (KOTZÉ *et al.*, 1998; HAMMAN, KOTZÉ, 2004; SAHNI *et al.*, 2008; NNAMANI *et al.*, 2011). No entanto, os derivados excessivamente quaternizados mostram-se mais citotóxicos (ROLF *et al.*, 2008).

Nesse sentido, Thanou e colaboradores (1999) investigaram a segurança, bem como a eficiência de moléculas de TMQ (GQ = 20, 40 e 60%, 1% p/v) na permeação do dextran (*Dextran Texas Red*[®]). Para a avaliação da segurança, foram conduzidos testes de citotoxicidade e ciliotoxicidade, utilizando-se células Caco-2 e tecido de traquéia de embriões de frango, respectivamente. A partir dos resultados encontrados, os autores demonstraram a ausência de danos substanciais às membranas das células Caco-2, além de efeitos insignificantes na freqüência de batimento ciliar dos tecidos empregados. No que diz respeito à promoção da permeação celular, foi constatado que apenas os derivados de maior grau de quaternização apresentaram eficiência satisfatória. Entretanto, esse mesmo grupo de pesquisa (THANOU *et al.*, 2000) demonstrou, posteriormente, que a permeação do manitol através de células Caco-2 era significativamente maior quando da utilização de TMQ 60% em detrimento ao derivado apresentando grau de quaternização igual a 40%. Tal constatação reforça a teoria de que a extensão de abertura das junções oclusivas depende fortemente do GQ e, conseqüentemente, da densidade de cargas do polímero sintetizado.

Com o intuito de incrementar o grau médio de quaternização (GQ) e, consequentemente, a propriedade absortiva da TMQ, alguns autores têm aumentado o número de etapas da reação, o tempo de reação ou usado quitosanas de diferentes graus de desacetilação. Entretanto, os resultados demonstraram que a obtenção de produtos com altos valores de GQ leva à ocorrência de O-metilação dos grupamentos hidroxila 3 e 6 da quitosana, formando, em geral, derivados menos solúveis em água (MOURYA; INAMDAR, 2009). No trabalho de Sieval e colegas (1998), amostras de TMQ foram obtidas à 60°C empregando-se CH₃I, em presença de base forte (NaOH). O meio reacional foi constituído por N-metilpirrolidona e o tempo de reação foi de 60 minutos. Os autores concluíram que o número de etapas da reação contribui fortemente para a quaternização do produto final. Dessa forma, com a execução de apenas uma etapa foi possível a obtenção de um derivado de quitosana com grau de quaternização de 10-15% e pouco solúvel em água, uma vez que tal amostra apresentou-se essencialmente dimetilada. Por outro lado, foi demonstrada a necessidade de efetuar-se a reação em duas etapas para a obtenção de um derivado com grau médio de quaternização próximo de 60% e com boa solubilidade aquosa. Além disso, uma terceira etapa da reação resultou em um alto grau de quaternização (85%), mas produziu um derivado completamente O-metilado e pouco solúvel (CURTI, 2004).

De maneira semelhante, o estudo de Polnok e colaboradores (2004) foi dedicado à investigação do efeito do processo de metilação, bem como do tipo de base utilizada nos graus de quaternização e O-metilação do derivado obtido. Para tanto, várias amostras foram sintetizadas por meio do mecanismo de metilação redutiva (CH₃I, NaI, N-metilpirrolidona, 60°C), variando-se o número de etapas de reação (1 ou 2 etapas por 20 minutos, seguidas ou não por 1 ou 2 etapas adicionais de 60 minutos) e o tipo de base adicionada (NaOH ou dimetilaminopiridina). A partir dos resultados obtidos, os autores observaram que a utilização de uma base mais forte (NaOH) é essencial para a obtenção de adequados GQ. Além disso, as reações elaboradas em três etapas, produziram derivados com elevados graus de quaternização e O-metilação e, portanto, baixa solubilidade aquosa.

2.3.2.2. Caracterização

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H-RMN) é a técnica mais comumente empregada para a caracterização de amostras de TMQ no que diz respeito à eficiência de quaternização. Dessa forma, o espectro de ¹H-RMN típico para esse composto é mostrado na Figura 10. De acordo com Sieval e colaboradores (1998), para esse derivado, o sinal em ~3,3 ppm é atribuído aos hidrogênios dos grupos metilas do sítio quaternizado e o sinal em ~3,1 ppm corresponde aos hidrogênios do grupo amino dimetilado. Já o conjunto de sinais na região 5,6-4,5 ppm corresponde ao hidrogênio localizado na posição 1 do anel (H-1), os quais se apresentam mais desdobrados do que nos espectros de quitosana devido à presença de outros vizinhos, tais como o sítio quaternizado e dimetilado, além dos grupos acetamido e amino presentes na cadeia macromolecular.



Figura 10 – Espectro de ¹H-RMN típico de *N,N,N*-trimetilquitosana. (Adaptado de MOURYA; INAMDAR, 2009).

Além disso, de acordo com Domard e colaboradores (1987), a ocorrência da metilação dos grupos hidroxila ligados aos carbonos 3 e 6 das unidades de glicosamino (O-metilação) leva ao aparecimento dos sinais desses hidrogênios em ~3,5 e 3,4 ppm, respectivamente (CURTI, 2004).

2.4. Aciclovir

O aciclovir (Figura 11) (2-amino 1,9-dihidro-9-[(2-hidroxietoxi)metil]-6Hpurina-6-ona), apresenta-se sob a forma de um pó cristalino branco, muito pouco solúvel em água, insolúvel em álcool e solúvel em solução de HCI 0,1 mol/L (UNITED STATES PHARMACOPEIA 32 NF/27, 2010). Em relação à constante de dissociação (pka) apresenta dois valores: 2,27 para a protonação e 9,25 para a desprotonação (ATTIA *et al.*, 2007). Esse análogo sintético da 2-desoxiguanosina é o agente antiviral mais eficaz e seletivo contra os vírus do Herpes Simples (HSV1 e HSV2), bem como da Varicella Zoster (VZV). Além disso, possui atividade *in vitro* contra o vírus Epstein-Barr, o citomegalovírus e o herpesvírus humano 6 (HHV-6) (PALMBERGER *et al.*, 2009; PERRET *et al.*, 2013). Dessa forma, tal fármaco é considerado como de primeira escolha para o tratamento de infecções causadas pelo HSV, principalmente devido a sua elevada seletividade pelo vírus herpético e baixa toxicidade às células do hospedeiro (SNOECK, 2000).



Figura 11 – Estrutura química do aciclovir (BARBOZA et al., 2010)

Em relação ao mecanismo de ação (Figura 12), são necessárias três etapas de fosforilação para a ativação do ACV. Inicialmente, o fármaco é convertido no derivado monofosfato pela timidina quinase viral, a qual é muito mais eficaz na fosforilação quando em comparação à enzima da célula do hospedeiro. Por conseguinte, tal conversão ocorre apenas nas células infectadas e o ACV se acumula apenas nessas células. A seguir, as quinases presentes na célula do hospedeiro convertem o monofosfato em di- e trifosfato sendo, esse último, responsável por inibir a síntese do DNA viral através de dois mecanismos: inibição competitiva do desoxiGTP para a DNA polimerase viral (com ligação ao molde de DNA na forma de complexo irreversível) e interrupção da cadeia após incorporação ao DNA do vírus (SAFRIN, 2005).



Figura 12 – Esquema representativo do mecanismo de ação do aciclovir. (a) entrada do fármaco na célula infectada, (b) conversão no derivado monofosfato pela timidina quinase viral, (c) e (d) conversão em di- e trifosfato pelas quinases do hospedeiro, (e) inibição da síntese do DNA viral. TK = timidina quinase. HSV = vírus do Herpes Simples. (Adaptado de STULZER, 2008).

Existe uma ampla evidência da eficácia clínica do aciclovir, sendo que o mesmo é utilizado em vários tratamentos de acordo com o tipo de infecção: para o tratamento de herpes labial, recomenda-se a utilização de creme contendo 5% de aciclovir aplicado 5 vezes ao dia, por 5 dias. No tratamento da ceratite herpética, utiliza-se pomada oftálmica, contendo 3% de ACV, administrada 5 vezes ao dia durante 7 dias. No caso de infecções genitais, pode-se empregar preparações tópicas de aciclovir em propilenoglicol 5 vezes ao dia, durante 5-10 dias; já no tratamento sistêmico, utiliza-se infusão intravenosa (sob a forma de sal sódico de ACV, com doses correspondendo a 5 mg/Kg, administrada a cada 8 horas, por 5-10 dias) ou formas sólidas orais (por exemplo, comprimidos de 200 mg, 5 vezes ao dia durante 5-10 dias). Ressalta-se que no caso de pacientes imunodeprimidos o tratamento deve ser realizado por um período de 6 meses (CAMILO, 2007).

Em relação ao tratamento sistêmico do herpes genital, a via oral é preferível em relação à parenteral, devido aos riscos de toxicidade local. No entanto, após administração oral, o ACV apresenta absorção lenta, dose-dependente, altamente variável e incompleta (aproximadamente 80% da dose administrada é excretada através das fezes), com biodisponibilidade de 10-30% (CORTESI, ESPOSITO, 2008; LEMBO *et al.*, 2013) e tempo de meia-vida biológica de 1,5-2 horas (JUNYAPRASERT, PORNSUWANNAPHA, 2008). A principal justificativa para a baixa biodisponibilidade desse antiviral (logP: ~0,0023) está relacionada a sua limitada permeabilidade intestinal e, por essa razão, é classificado como sendo da classe III segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), isto é, de alta solubilidade (em meio aquoso, à 37°C, na faixa de pH entre 1,0 e 7,5, segundo a FDA) e baixa permeabilidade (ATTIA *et al.*, 2007). Em relação à ineficiência na permeação intestinal, é importante considerar que o ACV é transportado via difusão passiva através da rota paracelular, a qual ocupa menor área superficial quando em comparação à rota transcelular (de VRUEH *et al.*, 1998; KRISTL, TUKKER, 1998). De fato, os poros intercelulares representam apenas 0,01 a 0,1% da área absortiva total do intestino (GONÇALVES; de SOUZA; STORPIRTIS, 2009). Além disso, uma vez que as células do epitélio intestinal são seladas pelas junções oclusivas, há uma restrição natural ao transporte de moléculas hidrofílicas por entre esse epitélio, via rota paracelular (SHAH, 2006).

No sentido de contornar os inconvenientes apresentados, é necessária a administração freqüente de altas doses de ACV por um período de tempo prolongado, o que pode causar efeitos adversos tais como náusea, diarréia e dores de cabeça. Tais fatos justificam a principal causa da não adesão ao tratamento, sobretudo em pacientes imunodeprimidos, os quais já utilizam uma grande variedade de outros medicamentos (SHAH *et al.*, 2008).

Diversos estudos objetivaram o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados capazes de modular a liberação do ACV, com conseqüente melhoria em sua biodisponibilidade. Assim, existem relatos do desenvolvimento de nanopartículas de polietilenoglicol-poli (etil-2-cianoacrilato) (FRESTA *et al.*, 2000), ácido poli (d,l-lático) (GIANNAVOLA *et al.*, 2003) e poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (KUSUM, BHOSALE, 2009). Entretanto, esses sistemas tiveram como objetivo outras vias de administração que não a oral.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.3. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral desenvolver um novo sistema de liberação, constituído por nanopartículas de poli (*n*-butil cianoacrilato) revestidas com *N*,*N*,*N*-trimetilquitosana para a administração oral de fármacos.

3.4. Objetivos específicos

Mais especificamente, pretende-se:

- ✓ Sintetizar e caracterizar o composto *N*,*N*,*N*-trimetilquitosana;
- Desenvolver nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) revestidas com o derivado da quitosana e caracterizar o sistema obtido com relação às suas propriedades físico-químicas, morfológicas e biológicas *in vitro*;
- Desenvolver e validar um método para quantificação do fármaco modelo (aciclovir) nas nanopartículas desenvolvidas por espectrofotometria derivada no ultravioleta;
- ✓ Desenvolver e validar um método para quantificação do aciclovir nos ensaios de permeação *in vitro* por cromatografia líquida de alta eficiência;
- ✓ Incorporar o fármaco às nanopartículas desenvolvidas e avaliar as características físico-químicas do sistema obtido;
- ✓ Avaliar as características de permeabilidade do fármaco modelo encapsulado nas nanopartículas utilizando modelo *in vitro* (células Caco-2).

Trabalho Experimental

TRABALHO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO I

Desenvolvimento, caracterização físico-química e biológica de nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) revestidas com *N,N,N-*trimetilquitosana

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados biodegradáveis para a liberação de fármacos vem despertando grande interesse. Dessa forma, diversos estudos, com resultados encorajadores, têm sido amplamente publicados na literatura (LEMARCHAND *et al.*, 2004, BRAVO-OSUNA *et al.*, 2006, YAMANKA; LEONG, 2008, LOPES *et al.*, 2010, CAI *et al.*, 2010; GUAN *et al.*, 2012a). Esses carreadores coloidais apresentam diversas vantagens, tais como a possibilidade de proteção do ativo encapsulado frente à degradações *in vivo*, relativa estabilidade nos fluidos biológicos e a capacidade de modulação da liberação do fármaco e, por isso, são considerados bastante promissores (LEMARCHAND *et al.*, 2004; LE DROUMAGUET *et al.*, 2012).

Apesar do grande número de trabalhos dedicados à administração de nanopartículas pela via parenteral, sua aplicação por outras vias também vem sendo objeto de inúmeras pesquisas. Em particular, a aplicação de nanovetores pela via oral tem sido fortemente investigada no sentido de contornar os inconvenientes advindos da baixa solubilidade, ineficiente permeabilidade e intenso metabolismo pré-sistêmico de uma ampla gama de fármacos (CAI *et al.*, 2010).

Com vistas a incrementar a estabilidade das partículas nos fluidos do TGI e potencializar sua eficiência de captura pela mucosa intestinal, há relatos sobre a modificação da superfície externa das mesmas. Essa modificação é normalmente realizada pelo revestimento com co-polímeros anfifílicos, tais como polietilenoglicol (PEG) (BAZILE *et al.*,1995, PERACCHIA *et al.*,1998, FIÉVEZ *et al.*, 2007, RAMACHANDRAN *et al.*, 2009) ou polissacarídeos, como a quitosana (CALVO *et al.*, 1997, YANG *et al.*, 2000, CHAUVIERRE *et al.*, 2003, BRAVO-OSUNA *et al.*, 2006). Tal revestimento pode ser alcançado por diferentes mecanismos, os quais envolvem interações eletrostáticas ou hidrofóbicas, bem como ligações covalentes entre o polímero de revestimento e as nanoestruturas (LEMARCHAND *et al.*, 2004).

A quitosana, devido a sua bioadesividade, possui alta afinidade pelas membranas celulares e, com isso, apresenta características interessantes para utilização em revestimento de nanopartículas. Adicionalmente, possui a capacidade de favorecer a permeação de ativos biológicos através da mucosa epitelial (THANOU *et al.*, 2000). No entanto, por ser insolúvel, esse polímero perde sua carga e se precipita no pH intestinal (SAHNI *et al.*, 2008). Por outro lado, derivados quaternizados, como a *N*,*N*,*N*-trimetilquitosana (TMQ), apresentam maior solubilidade em meios neutro e/ou básicos e, portanto, mostram-se mais adequados para incrementar a permeabilidade intestinal de fármacos (SADEGHI *et al.*, 2008).

Portanto, o objetivo dessa etapa do trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar as potencialidades de um sistema inovador, baseado em nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) (PBCA) revestidas com TMQ, para a administração oral de princípios ativos. Tal sistema combina as vantagens dos carreadores nanoestruturados à base de poli (alquil-cianoacrilato) (PACA) com as interessantes propriedades do derivado quaternizado da quitosana.

2. MATERIAL

2.1. Matérias-primas, solventes e reagentes

- Ácido clorídrico Synth[®];
- Água deuterada Tedia Brazil[®];
- Bicarbonato de sódio Ecibra[®];
- Cloreto de sódio Synth[®];
- Dextran 70.000 Sigma-Aldrich [®];
- Dimetilsulfóxido ASC Carlo Erba[®];
- Glicose Sigma-Aldrich[®];
- Hidróxido de sódio Synth[®];
- lodeto de metila Merck[®];
- Iodeto de sódio Synth[®];
- Kit MTT para citotoxicidade (MTT em pó 15 mg/frasco, solução de solubilização de MTT - 10% de Triton X-100 plus e 0,1N HCl em isopropanol anidro) - Sigma-Aldrich[®]
- Meio DMEM em pó Cultilab[®];
- Meio DMEM líquido sem fenol Cultilab[®];
- *n*-butil-2-cianoacrilato Sichel Werk[®];
- N-metil-2-pirrolidona Synth[®];
- Quitosana (baixo peso molecular, viscosidade = 20.000 cps, grau de desacetilação = 92%) - Sigma-Aldrich[®];
- Solução de antibióticos estreptomicina (100 μg/mL) e Penicilina (100 Ul/mL) - Cultilab[®];
- Solução de tripsina 0,25% e EDTA 1 mM Cultilab[®];

47

• Soro fetal bovino - Cultilab[®].

2.1.1. Equipamentos e dispositivos diversos

- Agitador magnético 114/E Nova Ética[®];
- Balança analítica modelo AX200 Shimadzu[®];
- Banho ultrassônico Unique, modelo USC-2800A
- Centrífuga modelo BR4i Jouan[®];
- Célula calorimétrica DSC 2920 TA Instruments[®];
- Condutivímetro Q795-A Químis;
- Espectrofotômetro FTIR Galaxy-Matsoni, modelo 3020
- Espectrômetro Bruker Avance DPX;
- Fluxo laminar LFS 12, Veco Instruments[®];
- Garrafas de cultivo celular 25 e 75 cm² TPP;
- Incubadora de CO₂ Thermo, modelo Forma Series II;
- Leitora de placas Espectrofotômetro Nano Drop NanoDrop Technology;
- Liofilizador L101 Liobras[®];
- Membrana de diálise (12.000 g/mol) Sigma-Aldrich[®];
- Minivoltímetro Millicell ERS[®] Millipore[®];
- NanoScope III A Veeco Instruments[®];
- pHmetro Metrohm, modelo 827;
- Placa Transwell de 6 poços com inserts de policarbonato -Corning[®];
- Placas de 96 poços com fundo chato TPP;
- Zetasizer 3000 Hs Malvern[®].

3. MÉTODOS

3.1. Síntese e caracterização da *N,N,N*-trimetilquitosana (TMQ)

Para a síntese da quitosana trimetilada, foi utilizado o método descrito por CURTI e colaboradores (2004) com modificações. A quitosana foi tamisada (125 µm) e posteriormente dispersa em 40 mL de N-metil-2-pirrolidona e o sistema foi mantido sob agitação por aproximadamente 15 horas. Após esse período, foram adicionados 2,4 g de Nal, 5,5 mL de solução aquosa de NaOH (15% p/v) e 5,7 mL de iodeto de metila e a reação foi mantida por 24 horas à temperatura ambiente. Foram adicionados 0,3 g de NaOH e 1mL de iodeto de metila, a cada 3 h após o início da reação, até que fossem completadas 12 h. A reação prosseguiu por mais 12 h e, ao seu final, o pH foi ajustado para 7,5 antes do isolamento do derivado alguilado de guitosana. Terminada a reação, a solução obtida foi dialisada contra água durante 5 dias, em seguida contra NaCl 0,1 M por 3 dias e, novamente, contra água por 2 dias. Após a diálise, a solução foi filtrada e, em seguida, liofilizada por 24 h. Para a obtenção do espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, foi utilizada solução de TMQ em água deuterada, na concentração de 10 mg/mL, utilizando o espectrômetro Bruker Avance DPX de 300 MHz, a 75 °C. O pulso utilizado foi de 8,2 µs (90°) acumulando-se 16 varreduras (NS = 16) e o parâmetro LB foi de 0,3 Hz. O grau médio de quaternização (GQ) foi obtido de acordo com as Equações 1 e 2 (CURTI, CAMPANA-FILHO, 2006):

$$\% GQ = \left(\frac{A_{N^+(CH_3)_3}}{9} \times \frac{1}{S}\right) \times 100$$
 (Equação 1)

$$S = \frac{A_{N^+(CH_3)_3}}{9} + \frac{A_{HN(CH_3)_2}}{6} + \frac{A_{HN(COCH_3)}}{3}$$
(Equação 2)

Em que:

S = soma das áreas dos sinais correspondentes aos sítios quaternizados, dimetilados e acetilados.

 $A_{N^+(CH_3)_3}$ = área do sinal correspondente aos sítios quaternizados.

 $A_{HN(CH_3)_2}$ = área do sinal correspondente aos sítios dimetilados.

 $A_{HN(COCH_3)}$ = área do sinal correspondente aos sítios acetilados.

A TMQ recém-sintetizada foi ainda caracterizada em relação a seu comportamento térmico por meio de análise termogravimétrica (TG). A curva de TG foi obtida empregando-se o equipamento TA-2920 (TA Instruments[®], New castle, DE, EUA) no intervalo de temperatura de 25 a 600 °C, utilizando-se cápsulas de alumínio seladas hermeticamente, com massa de amostra de aproximadamente 3,0 mg, razão de aquecimento de 10 °C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.
3.2. Síntese das nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) (PBCA)

Para a síntese das nanopartículas foi empregado o método de polimerização em emulsão, o qual se encontra amplamente descrito na literatura (COUVREUR; VAUTHIER, 1991; ZHANG et al., 1996; CHAUVIERRE et al., 2003; LUO et al., 2009). Dessa forma, 100 µL do monômero n-butil-cianoacrilato (10 mg/mL) foram adicionados, por gotejamento e sob agitação vigorosa (800 rpm), a uma solução aquosa de HCI 0,1M (pH 2,5, 10 mL) contendo 100 mg de dextran 70.000. Após 4 horas de agitação, foram adicionados cerca de 100 µL de NaOH 0,1 M até completa neutralização da suspensão coloidal (pH = 7,0 ± 0,3). Finalmente, as nanopartículas obtidas foram filtradas em membranas de acetato de celulose de porosidade igual a 0,45 µm. Para a 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 minutos, e o pH foi ajustado para 7, com NaOH 0,1M. Para o cálculo do rendimento do processo, foi adotado o método proposto por Wilson e colaboradores (2008): as nanopartículas foram liofilizadas e, posteriormente, pesadas. O cálculo foi executado levando-se em consideração as quantidades de monômero, bem como de dextran empregadas na síntese das partículas. As análises foram conduzidas em triplicata.

3.3. Revestimento das nanopartículas de poli (*n*-butilcianoacrilato) com *N*,*N*,*N*-trimetilquitosana (PBCA-TMQ)

3.3.1. Preparação das nanopartículas revestidas

Para a obtenção das nanopartículas revestidas (PBCA-TMQ) foi empregado o método de adsorção (LEMARCHAND *et al.*, 2004). Primeiramente, foram preparadas soluções de TMQ a 1,5 %, 1,0%, 0,75%, 0,5% e 0,25% (p/v) em água purificada. Em seguida, 2,5 mL de cada uma dessas soluções foram transferidos para erlenmeyers e 5,0 mL da suspensão de nanopartículas foram adicionados sob gotejamento e agitação de 50 rpm por 1 h.

3.3.2. Determinação da Eficiência de Revestimento (ER)

O método para a determinação da ER foi baseado no procedimento descrito por Cao e colaboradores (2009), com modificações. Após o preparo das nanopartículas revestidas, tal como descrito no subitem anterior, as mesmas foram submetidas à centrifugação (20.000 rpm, 30 minutos) para a remoção do excesso do polímero de revestimento. Posteriormente, a quantificação de TMQ associada às nanopartículas foi realizada indiretamente, por meio de medidas de condutividade dos sobrenadantes obtidos após centrifugação. Para tanto, uma curva de calibração foi construída com concentrações de TMQ iguais a: 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,4%, 0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,5% (p/v) em solução de glicose a 5% (p/v), a fim de evitar-se interferência de eletrólitos nas medidas. Esse mesmo solvente foi utilizado para a diluição dos sobrenadantes obtidos. As análises foram realizadas em triplicata e o cálculo para determinação da Eficiência de Revestimento (ER) foi realizado a partir da Equação 3. A comparação entre as médias dos valores da ER foi realizada empregando-*se o* Teste *t* de *Student*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de p < 0,05.

$$ER = \frac{Concentração de TMQ no sobrenadante}{Concentração inicial de TMQ} \times 100$$
(Equação 3)

3.4. Determinação do diâmetro e distribuição de tamanho das nanopartículas

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho das nanopartículas foram avaliados por meio de espectroscopia de correlação fotônica. Foram utilizados 50 µL das suspensões de nanopartículas (PBCA e PBCA-TMQ) diluídos em 1,5 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. Os resultados foram obtidos a partir da média de 10 determinações, sendo as análises realizadas em triplicata.

3.5. Determinação do potencial zeta (ζ) das nanopartículas

Para a determinação do potencial zeta das formulações (PBCA e PBCA-TMQ), 50 µL das nanopartículas foram diluídos em 1,5 mL de solução de NaCI (0,001M) preparada com água ultrapura Milli-Q, para garantir uma intensidade de sinal adequada por parte do equipamento. As medidas foram executadas por meio da medida da mobilidade eletroforética por anenometria *laser Doppler,* em triplicata, à temperatura de 25 °C e pH 7,0, utilizando-se o equipamento Zetasizer 3000 HS.

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

Análises de DSC foram conduzidas visando avaliar as interações entre as nanopartículas de PBCA e o polímero de revestimento. Dessa forma, foram analisadas amostras das nanopartículas (PBCA), do derivado quaternizado obtido (TMQ), da mistura física de ambos, na proporção de 2:1 (PBCA+TMQ), bem como das nanopartículas revestidas com esse derivado (PBCA-TMQ). As curvas de DSC foram obtidas empregando-se equipamento TA-2920 (TA Instruments[®], New Castle, DE, EUA) no intervalo de temperatura de 25 a 400 °C, utilizando-se cápsulas de alumínio seladas hermeticamente, com massa de amostras de aproximadamente 3,0 g, 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/ΔH_{fusão} : 28,50 J.g⁻¹) no intervalo de temperatura compreendido entre 25 °C a 320 °C.

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

Os espectros de Infravermelho do derivado quaternizado (TMQ), bem como das formulações de nanopartículas (PBCA e PBCA-TMQ), foram obtidos por meio de Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourrier (FTIR). Tais espectros, abrangendo a região de 4000-400 cm⁻¹, foram obtidos em Espectrofotômetro FTIR Galaxy-Matsoni, modelo 3020, à temperatura ambiente, em pastilhas contendo mistura de 1,5 mg de amostra e 250 mg de KBr. Os espectros foram adquiridos com resolução de 4 cm⁻¹ e 64 scans/minuto.

3.8. Avaliação da morfologia das nanopartículas por Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica foi realizada utilizando o equipamento NanoScope III A (Veeco Instruments, Santa Barbara, CA), com acessório para a realização de Microscopia de Força Atômica, no modo de contato intermitente, utilizando sondas de silício de comprimento igual a 228 µm, com freqüência de ressonância de 200 Khz e constantes de força de 5-8 N/m. Aproximadamente 10 µL das amostras (PBCA e PBCA-TMQ) foram depositados em mica recentemente clivada. O excesso de umidade das amostras foi retirado com o uso de um fluxo de nitrogênio e a varredura foi efetuada a uma velocidade de 1 Hz com resolução de 512 x 512 pixels.

3.9. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas

3.9.1. Cultivo das células Caco-2

As células Caco-2 foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, EUA) e cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) com alta concentração de glicose (4,5 g/L), 2,2 g/L de bicarbonato de sódio e suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de aminoácidos não essenciais. 1% de solução de glutamina 200 mM e antibióticos (penicilina 100 Ul/mL e estreptomicina 100 µg/mL). As células foram utilizadas entre os repiques de passagem 20 a 30. O banco celular foi mantido em cultivo em garrafas de 75 cm², sendo o meio substituído a cada dois dias. O subcultivo foi realizado guando a cultura atingia, no mínimo, 80% de cobertura da garrafa (cerca de 3 a 4 dias), da seguinte maneira: o meio de cultivo foi aspirado e descartado, as células aderidas à parede da garrafa foram isoladas com 2 mL de solução de tripsina (0,25%) e EDTA (1mM) e incubadas à 37 °C por 5 minutos. Em seguida, as células foram ressuspendidas em meio DMEM e divididas na proporção 1:4 em novas garrafas contendo 15 mL de meio DMEM. As culturas foram mantidas em incubadora sob temperatura de 37 °C, atmosfera constituída de 5% de CO₂ e 90% de umidade relativa.

3.9.2. Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios de toxicidade foram realizados de acordo com o protocolo descrito no guia ISO 10993-5 (ISO, 2009), que dispõe sobre as técnicas para avaliação *in vitro* da citotoxicidade.

As células Caco-2 foram semeadas em meio DMEM em microplacas de 96 poços, na densidade de 2 x 10⁴ células/poço, incubadas por 24 h a 37 °C com 5% de CO₂ e 90% de umidade. Após esse tempo, o meio de cultura foi retirado e foram adicionados 100 µL das soluções de nanopartículas (PBCA e PBCA-TMQ), preparadas em meio DMEM sem fenol, nas concentrações de 1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 25,0; 50,0; 75,0; e 100,0 µg/mL (em sextuplicatas). Também foram adicionados meio DMEM sem fenol contendo dimetilsulfóxido (DMSO) a 50% (controle positivo) e meio contendo apenas meio DMEM sem fenol (controle negativo). As placas foram incubadas a 37 °C por 4 h. Posteriormente, as soluções dos poços foram retiradas por aspiração e foram adicionados 30 µL da solução de MTT (solução a 5 mg/mL, diluída em meio DMEM sem fenol e tampão PBS 9:1, v/v). Após 2 h de incubação a 37 °C foram adicionados 70 µL da solução de solubilização do MTT (10% de Triton X-100 plus e 0,1 N HCl em isopropanol anidro). A placa foi, então, levada ao agitador orbital, com agitação de 100 rpm por 15 minutos para facilitar a solubilização dos cristais de formazan. Após a solubilização, foram determinadas as absorbâncias em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 nm e 690 nm. O cálculo da porcentagem de viabilidade celular para as células tratadas com as diluições em estudo foi realizado a partir das médias das respectivas absorbâncias, considerando-se o

valor médio da absorbância do grupo controle negativo como 100% de viabilidade. A comparação entre as médias dos valores da % de viabilidade celular foi realizada empregando-se o Teste *t* de *Student*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de p < 0,05.

3.10. Avaliação da Resistência Elétrica Transepitelial (RET)

Para os experimentos relativos à avaliação da RET, as células Caco-2 foram cultivadas como descrito no item 3.8.1. Posteriormente, as células foram transferidas para placas Transwell[®], contendo seis poços, com suporte de policarbonato de 0,4 µm de poro e área de 4,72 cm², empregando-se suspensão de células com densidade de 5 \times 10⁴ cel/cm². Após 21 dias de cultivo, o meio de cultura foi retirado dos compartimentos apicais e 1,5 mL da suspensão de nanopartículas (PBCA-TMQ, 75,0 µg/mL), preparada em meio DMEM sem fenol (pH = 7,4), foram adicionadas aos mesmos (preenchendo cinco poços). O controle negativo foi realizado, adicionando-se 1,5 mL de meio DMEM sem fenol (pH = 7,4) a um dos poços. Após a adição das nanopartículas, o monitoramento do valor de resistividade elétrica foi realizado nos tempos 0, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos, utilizando o minivoltímetro Millicel ERS[®]- Millipore. Após 120 minutos, as soluções foram cuidadosamente aspiradas e cada um dos compartimentos foi lavado por três vezes com meio DMEM sem fenol. O mesmo procedimento foi aplicado aos compartimentos basolaterais. Em seguida, foi adicionado meio fresco a ambos os compartimentos e as células foram incubadas a 37 °C, 5% de CO2 e 90% de umidade relativa, por 24 h. Após esse período, a RET foi novamente medida visando checar a recuperação dos valores de resistividade. A comparação entre as médias dos valores da RET foi realizada empregando-se o Teste *t* de *Student*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de p < 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese e caracterização da *N,N,N*-trimetilquitosana (TMQ)

Como descrito anteriormente, a TMQ apresenta maior solubilidade quando em comparação à quitosana, a qual se mostra solúvel apenas em pH ácido. Mourya e Inamdar (2009) reportam que, mesmo nessa faixa de pH, existe a dificuldade de preparação de soluções de guitosana, devido à elevada viscosidade das mesmas. Por outro lado, esses autores citam que a TMQ, ainda que pouco quaternizada, é solúvel em uma ampla faixa de pH (1 a 9), sendo esse aumento de solubilidade relacionado à presença de grupamentos amino quaternários na posição C-2 do derivado da guitosana. Entretanto, amostras de TMQ obtidas em diversos estudos da literatura com o emprego de NaOH 15% ou 6% no início da reação mostraram-se solúveis em água devido, além da presença dos sítios quaternizados, às cargas positivas resultantes da protonação dos grupos amino, que não foram quaternizados (DOMARD et al., 1986; DUNG et al., 1994; LANG et al., 1997; HAMMAN, KOTZÉ, 2001, CURTI, 2004). Isso ocorre pela presença do ácido iodídrico, liberado durante a reação de alquilação, indicando que as concentrações de NaOH empregadas nessas reações não foram suficientes para neutralizar o ácido gerado (BAL et al., 2010). Dessa forma, no presente trabalho, o produto foi obtido mantendo-se a concentração inicial de NaOH (15%), mas ajustando periodicamente a alcalinidade do meio e neutralizando-o ao final da reação.

Sob outra perspectiva, diversos trabalhos adotaram a temperatura de 60 °C e um tempo médio de 2 a 3 horas para a síntese de TMQ (KOTZÉ *et al.*, 1998; THANOU *et al.*, 2000; POLNOK *et al.*, 2004; VERHEUL *et al.*, 2008). No entanto, devido à elevada volatilidade do iodeto de metila, pode haver perda desse reagente, o que comprometeria a obtenção do derivado quaternizado e, conseqüentemente, o rendimento da reação. Dessa forma, e com base no trabalho de Curti (2004), a reação de alquilação da quitosana foi efetuada à temperatura ambiente, por um tempo mais prolongado e pôde ser realizada em erlenmeyer fechado, sob agitação magnética. As adições periódicas de NaOH e iodeto de metila foram realizadas rapidamente, evitando, assim, a perda de iodeto de metila por evaporação. Ao final da reação, o rendimento foi considerado adequado, com uma porcentagem de 79% de produto obtido.

A espectroscopia de ¹H-RMN é a técnica freqüentemente empregada para se determinar o grau médio de quaternização das amostras de TMQ e, além disso, constitui uma ferramenta muito importante para a avaliação das mudanças ocorridas na macromolécula de quitosana após a reação de alquilação. Por meio dessa técnica é possível avaliar, ainda, a extensão da dimetilação nos grupos amino e da metilação nas hidroxilas (O-metilação), reações simultâneas à quaternização dos grupos amino de quitosana, que também dependem das condições empregadas nas reações (CURTI, 2004). Dessa forma, o espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do produto obtido está apresentado na Figura 13, bem como no Anexo A.



Figura 13 - Espectro de ¹H-RMN da TMQ sintetizada.

A partir da análise do espectro, o qual se mostra bastante semelhante ao espectro típico de TMQ disponível na literatura (THANOU *et al.*, 2000; POLNOK *et al.*, 2004; BRITTO; CAMPANA-FILHO, 2004; VERHEUL *et al.*, 2009), pode-se perceber que o sinal característico do sítio quaternizado situa-se na região de ~3,7 ppm e o sinal correspondente à dimetilação do nitrogênio em 3,0 ppm. Na região de 4,7-6,0 estão os sinais relativos ao hidrogênio H-1 e em 2,5 o sinal correspondente aos hidrogênios do grupo acetamido. Os sinais em ~ 3,8 e 3,9 são atribuídos à metilação dos grupos hidroxila dos carbonos 3 e 6 das unidades de glicosamino, respectivamente e, pela intensidade desses sinais, é possível verificar que a reação de O-metilação não foi favorecida. Sendo assim, na Figura

13, pode ser observado que o espectro correspondente à amostra de TMQ contém principalmente sítios trimetilados em suas cadeias.

Os valores de sinais atribuídos ao produto obtido foram ligeiramente diferentes daqueles descritos na literatura (SIEVAL *et al.*, 1998). Essa pequena diferença pode ser devido às condições empregadas na obtenção do espetro de ¹H-RMN, tais como tempo de aquisição, pulso e número de varreduras.

Para a preparação de soluções aquosas do derivado sintetizado, foi necessário o auxílio da ultrassonificação por, pelo menos, 20 minutos. Essa observação reforça a influência da O-metilação na solubilidade da TMQ. Assim, apesar de não ser favorecida, a ocorrência de tal reação foi capaz de dificultar, mesmo que levemente, a solubilização do polímero. Por outro lado, é possível inferir que o produto foi solúvel em água, principalmente, devido às cargas positivas nos nitrogênios quaternizados, já que houve o controle da alcalinidade do meio reacional, evitando-se, portanto, a protonação dos grupos amino (que não reagiram) das cadeias de quitosana pelo ácido iodídrico liberado durante a reação de N-alquilação (CURTI, 2004).

Por meio do espectro obtido, o grau médio de quaternização foi determinado de acordo com as Equações 1 e 2. Essas equações consideram que nas cadeias da TMQ há somente unidades contendo grupos amino quaternizados, dimetilados e acetilados, pois envolve a relação dos sinais correspondentes a esses sítios nos espectros de ¹H-RMN. Dessa forma, podem ser empregadas somente para amostras de TMQ que não contenham grupos amino protonados ou livres em suas cadeias (CURTI, CAMPANA-FILHO, 2006). É importante ressaltar que diversos estudos da literatura (SIEVAL *et al.*, 1998; THANOU *et al.*, 2000; SNYMAN *et al.*,

2002; SAHNI *et al.*, 2008; BAL *et al.*, 2009) empregam uma equação diferente (Equação 4), na qual a soma das integrais dos sinais do hidrogênio H-1 é utilizada como referência interna:

$$\% GQ = \left(\frac{A_{CH_3}}{9 \times A_{H1}}\right)$$
 (Equação 4)

Em que:

A_{CH 3} = área do sinal correspondente aos hidrogênios das metilas do grupo amino trimetilado.

 A_{H1} = soma das áreas dos sinais correspondente ao hidrogênio H-1.

No entanto, a área do sinal da referência interna (H-1) é, em geral, muito próxima do sinal do hidrogênio do solvente utilizado na solubilização da TMQ; já a área do sinal relativo ao sítio quaternizado pode estar parcialmente sobreposta ao sinal correspondente ao sítio O-metilado. Dessa forma, a definição e a integração desses sinais podem ser dificultadas, o que evidencia uma possível deficiência relacionada a essa metodologia para determinação do grau de quaternização de amostras de TMQ (CURTI, 2004; MOURYA; INAMDAR, 2009).

Apesar das equações empregadas nesse trabalho também utilizarem o sinal relativo ao sítio quaternizado, como a síntese da TMQ foi conduzida com ajustes periódicos do pH e sua neutralização ao final da reação, o uso dessas equações foi considerado mais adequado. Como resultado, foi obtido o valor de 72,9% de quaternização para a TMQ, o qual se apresentou semelhante àquele descrito no trabalho de CURTI (2004) (70,3%). Em relação a esse valor, a literatura aponta

que apenas a TMQ com grau médio de quaternização maior ou igual a 60% é capaz de incrementar substancialmente a permeabilidade paracelular de ativos farmacológicos (KOTZÉ *et al.*, 1998; HAMMAN; KOTZÉ, 2004; SAHNI *et al.*, 2008).

4.2. Avaliação da Eficiência de Revestimento das nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) com *N*,*N*,*N*-trimetilquitosana

A influência da característica de superfície de carreadores coloidais na interação com diferentes superfícies biológicas tem se tornado cada vez mais evidente. Dessa forma, o simples revestimento das partículas com polímeros dotados de propriedades específicas pode ser interessante para modular as características destes carreadores com o epitélio absortivo. Nesse sentido, a TMQ vem se destacando no campo farmacêutico como um promissor promotor de absorção (SADEGHI et al., 2008). Portanto, o escopo desse trabalho foi desenvolver nanopartículas revestidas com esse biopolímero com o intuito de reunir duas importantes propriedades: a possibilidade de liberação modificada a partir das nanopartículas de PBCA e o aumento da permeação intestinal proporcionado pelo derivado da quitosana. Sob outra perspectiva, esse polímero de revestimento poderá ser capaz de incrementar a estabilidade das partículas nos fluidos biológicos do TGI. A literatura descreve que o revestimento é alcançado devido ao fato de o polímero se apoiar na superfície das partículas, por meio do enredamento das cadeias poliméricas, resultado em uma estrutura nuclear revestida (CALVO et al., 1997; WANG et al., 2010). Além disso, como o revestimento foi conseguido com a incubação das nanopartículas em solução do polímero catiônico, consideramos que esse processo também possa ser alcançado pela interação entre as cargas negativas presentes na superfície do nanosistema e as cargas positivas permanentes da cadeia da TMQ.

Portanto, nessa parte do trabalho foram preparadas diversas formulações revestidas, contendo diferentes concentrações do derivado quaternizado: 1,5 %, 1,0%, 0,75%, 0,5% e 0,25% (p/v) com o intuito de avaliarmos a Eficiência de Revestimento (ER) das nanopartículas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 14.



Figura 14 – (a) Curva de calibração obtida a partir da condutividade de soluções de TMQ com concentrações iguais a: 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,4%, 0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,5% (p/v) em solução de glicose a 5% (p/v). (b) Eficiência de revestimento das nanopartículas com o derivado quaternizado. As concentrações de TMQ empregadas foram iguais a: 0,25%, 0,5%; 0,75%; 1,0% e 1,5% (p/v). Os valores são expressos como média \pm desvio padrão de três medidas (n = 3). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de p < 0,05.

A partir dos resultados obtidos, pode-se perceber um significativo aumento na ER comparando-se os valores encontrados com a utilização de soluções de TMQ nas concentrações de 0,25 e 0,5% (p/v): 42 \pm 6,9% e 85 \pm 5,6%, respectivamente. No entanto, após a concentração de 0,5% (p/v), a quantidade do polímero adsorvido à superfície das nanopartículas permanece aproximadamente constante (Figura 14b). Tais resultados indicam que pode existir um limite para a adsorção do polímero à superfície das nanopartículas. Nessa mesma perspectiva, Cao e colegas (2009) descreveram que a eficiência de revestimento de lipossomas multilamelares com TMQ foi incrementada quando utilizadas concentrações crescentes desse polímero (0,05% a 0,5% p/v). No entanto, em maiores concentrações (0,7%, 1,0% e 1,5% p/v) a quantidade de polímero presente na superfície das vesículas foi semelhante à formulação preparada com 0,5% p/v. Por isso, os autores consideraram que a saturação foi alcançada a partir dessa concentração. Assim, para as análises posteriores do presente trabalho, foi selecionada a formulação PBCA-TMQ 0,5% p/v, sobretudo por razões econômicas.

4.3. Desenvolvimento, caracterização físico-química e morfológica das nanopartículas

As características físico-químicas, tais como diâmetro médio, distribuição de tamanho e potencial zeta, constituem importantes parâmetros no que diz respeito à estabilidade e propriedades biológicas dos nanosistemas desenvolvidos. Em relação ao diâmetro, pode-se afirmar que o mesmo desempenha papel essencial na capacidade de captação celular das nanopartículas. No que diz respeito à distribuição de tamanho das partículas, tem-se que formulações monodispersas apresentam melhores características de estabilidade. Já o potencial zeta é um

importante parâmetro, tanto para a estabilidade quanto para o reconhecimento e distribuição dos nanosistemas após sua administração por diferentes vias de administração (McCARRON et al., 1999). Dessa forma, a composição qualiquantitativa bem como as condições do processo são de extrema importância. Por exemplo, a concentração do monômero empregado apresenta um profundo efeito no diâmetro e distribuição de tamanho das nanopartículas, de modo que altas concentrações são capazes de gerar partículas de tamanho elevado e com ampla distribuição de tamanho (REDDY; MURTHY, 2004). Por outro lado, existe na literatura o relato de que o pH do meio pode influenciar na carga superficial das nanopartículas formadas. No estudo de Liu e Chen (2009), foi comprovado que a diminuição do pH leva ao decréscimo de pontecial zeta para valores menos negativos, o que poderia prejudicar a estabilidade e a funcionalidade biológica desses nanosistemas. Assim, analisando estudos publicados na literatura (ALYAUTDIN et al., 1997; McCARRON et al., 1999; DESAI; BLANCHARD, 2000; ZHANG et al., 2001; RADWAN; ABOUL-ENEIN, 2002; VAUTHIER et al., 2003; REDDY; MURTHY, 2004a; REDDY; MURTHY, 2004b; XI-XIAO et al., 2006; VAUTHIER et al., 2007; ARIAS et al., 2008; WILSON, 2008; LIU; CHEN, 2009; DUAN et al., 2009; REUKOV et al., 2010), foram escolhidas as melhores condições para a síntese das nanopartículas de PBCA. Diante disso, foi possível determinar que os parâmetros mais amplamente utilizados e que levaram à formação de partículas com características físico-químicas consideradas adequadas, são os seguintes: concentração de monômero = 1%; concentração do estabilizante (dextran 70.000) = 1%; pH do meio reacional = 2,5; tempo de agitação do sistema = 4 horas, com posterior neutralização do meio reacional, velocidade de agitação = 800 rpm e temperatura ambiente.

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 um 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, devida 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 aplamente utilizados, como o Pluronic[®] F68 (REUKOV *et al.*, 2010). Como resultado, obtivemos um rendimento médio da reação de polimerização igual a $83,2 \pm 2,1\%$.

Os resultados referentes ao diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de PBCA sintetizadas nesse trabalho são mostradas na Tabela 1. 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.

Diâmetro (nm)	Índice de polidispersão	Potencial Zeta (mV)
175,1 ± 3,9	0,136 ± 0,04	- 11,7 ± 1,34

Tabela 1 – Determinação do diâmetro, distribuição de tamanho e Potencial zeta das nanopartículas de PBCA*

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

Em relação ao valor de diâmetro obtido, o resultado apresentado está em conformidade ao encontrado no estudo de Mulik e co-autores (2009) (173,9 \pm 0,67 nm). A partir do valor de polidispersão determinado, é possível constatar a obtenção de um sistema monodisperso, uma vez que a literatura aponta que formulações com valores abaixo de 0,3 apresentam esta característica (KÜLKAMP *et al.*, 2009).

No que diz respeito ao potencial zeta, Reddy e Murthy (2004a) observaram valor similar (-11,9 mV), no entanto os autores não informam o valor do desvio padrão para esta medida. Adicionalmente, Chauvierre e colaboradores reportaram um valor igual a - 11,0 ± 1 mV. A esse respeito, a literatura aponta que valores ligeiramente negativos podem ser atribuídos ao baixo grau de dissociação dos grupamentos acrílicos presentes na estrutura das nanopartículas (REDDY; MURTHY, 2004b), bem como à adsorção de ânions provenientes da fase aquosa (LIU; CHEN, 2009).

Os resultados das características físico-químicas relativas ao diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta das partículas após o revestimento estão mostrados na Tabela 2.

Diâmetro (nm)	Índice de polidispersão	Potencial Zeta (mV)
296,2 ± 4,6	0,245 ± 0,125	$+36,5 \pm 2,7$

Tabela 2 – Determinação do diâmetro, distribuição de tamanho e Potencial zeta das nanopartículas de PBCA-TMQ*

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

A partir dos resultados obtidos, pode-se perceber um aumento no diâmetro das nanopartículas de PBCA-TMQ quando em comparação às nanopartículas não revestidas. Esse aumento constitui a primeira indicação da adsorção do polímero à superfície dos nanosistemas. Além disso, as nanopartículas de PBCA apresentaram potencial zeta negativo (-11,7 mV) (Tabela 1), o qual, após incubação com a TMQ, foi invertido para valor positivo: + 36,5 mV (Tabela 2). Tal valor é similar ao encontrado por Wang e colegas (2010) quando da preparação de nanopartículas de TMQ (+ 32,0 mV). Essa inversão do potencial zeta também pode indicar a presença do revestimento na superfície das partículas. De fato, a literatura aponta que a determinação do potencial zeta é uma das técnicas mais amplamente utilizadas para a comprovação do revestimento de nanoestruturas (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 mais positivos que + 30 mV e mais negativos que -30 mV são consideradas estáveis (CAO et al., 2009). Por outro lado, nanoestruturas com carga superficial positiva podem ser transportadas mais facilmente através do muco, por meio da interação eletrostática com as cargas negativas presentes na mucina. Essa interação pode

auxiliar na absorção intestinal, uma vez que o muco constitui a primeira barreira para a captação de nanosistemas (ROGER, *et al.*, 2010).

No que diz respeito ao índice de polidispersão, um aumento desse valor em relação às nanopartículas de PBCA foi observado. Esse aumento pode ser devido ao revestimento não homogêneo das nanopartículas, o que leva a uma maior distribuição no diâmetro das mesmas. No entanto, tal valor encontra-se abaixo de 0,3, o que, como já descrito, indica a obtenção de sistema monodisperso.

Visando a confirmação do revestimento das nanopartículas de PBCA pelo polímero sintetizado, bem como a avaliação de possíveis interações entre esses constituintes, foi realizada a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Dessa forma, analisamos o comportamento térmico das nanopartículas, do derivado quaternizado da quitosana (TMQ), da mistura física entre ambos, além da formulação obtida após o procedimento de revestimento. As curvas obtidas são apresentadas na Figura 15.



Figura 15 – Curvas de DSC de nanopartículas de PBCA, TMQ, nanopartículas revestidas (PBCA-TMQ) e mistura física (PBCA+TMQ) obtidas utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 3,0 mg, razão de aquecimento de 10 °C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/minuto.

A curva de DSC obtida para as nanopartículas de PBCA apresenta um pequeno pico endotérmico em 134,2 °C. Presumimos que esse evento seja devido à evaporação de moléculas de água de cristalização. Por outro lado, o principal pico observado para essas partículas ocorre em 250,2 °C e, possivelmente, corresponde à degradação de sua estrutura polimérica. Nesse sentido, Sullivan e Birkinshaw (2004) observaram comportamento térmico semelhante, o que foi atribuído, justamente, ao evento de degradação.

Com relação à TMQ, observa-se um evento endotérmico entre 25 °C e 112,5 °C, característico da evaporação de moléculas de água adsorvidas a esse polímero (BRITTO; CAMPANA-FILHO, 2004). De fato, durante a pesagem desse composto, pôde-se observar sua elevada higroscopicidade, uma vez que sua

massa aumentava constantemente devido à adsorção de água do meio ambiente. Por outro lado, em torno de 213 °C pode-se observar a ocorrência de um pico endotérmico, o qual pode ser atribuído à decomposição dos sítios substituídos desse derivado metilado (MOURYA; INAMDAR, 2009). Nesse sentido, no estudo de Britto e Campana-Filho (2004) diferentes amostras de TMQ (5%, 21% e 31% quaternizadas) foram avaliadas com relação à cinética de degradação térmica. Assim, análises termogravimétricas (TG) foram conduzidas para as amostras em estudo. Como resultado, foi relatado que os eventos térmicos entre 190-250 °C podem ser atribuídos à degradação do polímero. Os pesquisadores também observaram que a metilação da quitosana diminui sua estabilidade térmica, sendo esse decréscimo mais pronunciado quanto maior o grau de quaternização obtido. Por outro lado, foi descrito que a completa decomposição térmica das amostras de TMQ aconteceu a partir de 350 °C, o que envolve sua despolimerização, bem como os processos pirolíticos.

Extrapolando esses resultados para o comportamento da TMQ observado em nosso trabalho, é provável que o evento térmico entre 187,5 e 237,5 °C seja, de fato, relativo à decomposição dos sítios substituídos do polímero. Porém, como o derivado sintetizado apresenta elevado grau de quaternização (~73%), a decomposição ocorreu mais rapidamente devido à menor estabilidade térmica do mesmo. Com o intuito de comprovarmos essa teoria, foi realizada a análise termogravimétrica (TG) na amostra de TMQ sintetizada. O resultado é apresentado na Figura 16 e mostra que a perda de massa (em %) referente à decomposição polimérica, de fato ocorre em intervalo de temperatura compatível com o evento mostrado na cura de DSC (Figura 15).



Figura 16 – Curva de TG de TMQ obtida utilizando-se cápsula de alumínio selada, com massa de amostra de aproximadamente 3,0 mg, razão de aquecimento de 10 °C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/minuto.

Ao examinarmos a curva de DSC para a formulação desenvolvida (PBCA-TMQ) (Figura 15), 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, a TMQ adsorvida 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 da TMQ aparecem mais largos e/ou deslocados, indicando possíveis interações entre esse polímero e as nanopartículas de PBCA. Essa observação pode também reforçar a ocorrência do revestimento.

Finalmente, a partir da curva obtida para a mistura física (PBCA+TMQ, 2:1), notam-se diferenças pronunciadas entre o comportamento térmico dessa mistura binária e aquele relativo à formulação revestida (Figura 15). Ainda, por meio desse termograma, podemos supor que haja algum tipo de interação, mesmo que fraca, entre as nanopartículas e o polímero quaternizado, 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, o que evidencia o não revestimento das mesmas.

Análises de FTIR foram conduzidas visando caracterizar possíveis modificações químicas ocorridas na estrutura das nanopartículas após o revestimento com o derivado quaternizado (Figura 17 e Anexo B). Com base nos resultados apresentados na Figura 17a, pode-se perceber que as principais bandas no espectro das nanopartículas de PBCA referem-se às ligações C-H (2985 cm⁻¹), C=N (2249 cm⁻¹), C=O (1752 cm⁻¹), C-O (1258 cm⁻¹) e C-C (1459 cm⁻¹). Por outro lado, as bandas caraterísticas no espectro da TMQ podem ser observadas em 1854 cm⁻¹ (N-H), 1486 cm⁻¹ (C-H) e 1239 cm⁻¹ (C-N) (Figura 17b). Em ambos os casos, os resultados obtidos encontram-se compatíveis com a literatura (YANG *et al.*, 2000; REDDY; MURTHY, 2004; SULLIVAN *et al.*, 2004; ARIAS *et al.*, 2006; BRITTO; CAMPANA-FILHO, 2004; CAMPANA-FILHO; BRITTO, 2009). A partir da análise do espectro obtido para as nanopartículas de PBCA-TMQ (Figura 16c), pode ser observada a presença de todas as bandas do derivado quaternizado (TMQ). Por outro lado, a banda referente à ligação

característica do polímero PBCA (C≡N) apresenta-se suprimida. Tal observação pode indicar a ocorrência de interações químicas entre as nanopartículas e o polímero catiônico e representa uma indicação adicional da ocorrência do revestimento. A esse respeito, a literatura sugere que durante o procedimento de revestimento, interações eletrostáticas, bem como interações hidrofóbicas podem governar a adsorção do polímero à superfície das nanopartículas (LEMARCHAND *et al.*, 2004).







A Figura 18 apresenta os resultados obtidos na análise por Microscopia de Força Atômica (AFM) para as nanopartículas de PBCA (a) e PBCA-TMQ (b). Com base na Figura 18a, podem ser visualizadas estruturas esféricas as quais apresentam, em sua maioria, homogeneidade na distribuição de tamanho. Esta observação corrobora os resultados referentes ao índice de polidispersão mostrados na Tabela 1.



Figura 18 – Imagens de AFM referentes às nanopartículas de PBCA (a) e PBCA-TMQ 0,5% (b).

No entanto, algumas partículas apresentaram-se maiores e, em nosso entendimento, esse comportamento pode ser devido à dificuldade no controle da reação de polimerização, mesmo com os ajustes de pH e das concentrações de monômero e estabilizante adicionados. A partir da imagem de AFM referente às nanopartículas de PBCA-TMQ (Figura 18b), percebe-se uma menor tendência à agregação quando em comparação às nanopartículas não revestidas (Figura 18a). Tal fato pode ser explicado com base nos valores de potencial zeta para as duas formulações: com o revestimento houve um aumento (em módulo) no valor do potencial zeta, o que resultou em maior repulsão entre as partículas com conseqüente aumento em sua estabilidade. Assim, o revestimento realizado pode

ter influência acentuada na estabilidade de armazenamento da formulação desenvolvida.

4.4. Ensaios biológicos in vitro das nanopartículas

4.4.1. Avaliação da citotoxicidade

Ensaios de citotoxicidade são largamente utilizados em estudos toxicológicos *in vitro* e, dentre estes, o ensaio com o sal de tetrazólio (MTT) é um dos mais empregados. Desde sua introdução por MOSMANN em 1983, estudos toxicológicos *in vitro* utilizando o sal de tetrazólio, como diferentes linhagens celulares, demonstraram ser uma maneira rápida para a detecção da citotoxicidade ou da viabilidade celular a partir da exposição a substâncias potencialmente tóxicas (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). O MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é um sal amarelado solúvel em água, o qual é convertido, pela enzima succinil-desidrogenase mitocondrial, presente no interior das células, a um composto insolúvel de coloração roxa (o formazan). Tal produto pode, então, ser medido por espectrofotometria na região do visível (BELLAMY, 1992). É importante ressaltar que apenas as células viáveis são passíveis de realizar esta conversão e, uma vez que o produto formado é impermeável à membrana celular, este se acumula nestas células (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

Face ao exposto, para a avaliação da citotoxicidade das formulações de nanopartículas desenvolvidas nesse trabalho foi empregado o método do MTT preconizado e padronizado conforme a ISO 10993-5 (ISO, 2009). De acordo com esse guia, valores de viabilidade celular abaixo de 70% caracterizam significativa toxicidade do composto analisado, o que inviabilizaria futuros ensaios de

permeabilidade em células Caco-2 e poderia frustrar a intenção de utilizar esse novo carreador para a administração oral de fármacos. Assim, suspensões das nanopartículas de PBCA e PBCA-TMQ foram preparadas em meio DMEM sem fenol nas concentrações de 1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 25,0; 50,0; 75,0; e 100,0 µg/mL e deixadas em contato com as células Caco-2, por 4 horas. Como controle negativo foi usado o meio DMEM sem fenol e os valores médios obtidos nos ensaios foram estabelecidos como viabilidade celular de 100%. Como controle positivo, utilizouse DMSO a uma concentração de 50% para garantir a total mortalidade celular. Os resultados obtidos para esse ensaio estão mostrados na Figura 19.

Por meio da análise dos dados, foi observado que, para as nanopartículas de PBCA, não houve indícios de citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas, já que não existe diferença estatisticamente significativa entre os valores de viabilidade celular para essas concentrações e aqueles encontrados para o grupo controle. Além disso, a viabilidade celular foi maior que 70% para todas as concentrações estudadas, o que, segundo a ISO 10993-5, não caracteriza efeito tóxico.



■PBCA ■PBCA-TMQ 0.5%

Figura 19 – Viabilidade de células Caco-2 incubadas com diferentes concentrações de PBCA e PBCA-TMQ por 4 h, avaliada pela técnica do MTT. Os valores representam a média e o desvio padrão de seis determinações (n = 6). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de p < 0,05.

Vauthier e colaboradores (2003) citam que a citotoxicidade de nanopartículas de PACA pode estar atribuída a: (1) liberação de produtos de degradação a partir da hidrólise da cadeia polimérica, (2) estimulação celular, com conseqüente liberação de mediadores inflamatórios e (3) adesão à membrana celular. Diante disso, esse grupo de pesquisa descreve que vários autores têm reportado diferentes ensaios de citotoxicidade a fim de avaliar a ocorrência desses mecanismos. Ainda de acordo com esses pesquisadores, Kreuter e co-autores (1984) descreveram que, após incubação de nanopartículas de poli (*n*-butilcianoacrilato) (75,0 µg/mL) com hepatócitos, nenhum efeito citotóxico foi observado. Entretanto, danos celulares significativos foram observados quando da utilização dessas partículas na concentração de 150,0 µg/mL. Esses resultados

foram confirmados após incubação de nanopartículas de poli (iso-butilcianoacrilato) (100,0 µg/mL) com células de fibroblastos (L929), não ocorrendo mortalidade celular após os tempos de 3 e 7 horas. Portanto, apesar de se tratar de uma linhagem celular diferente, os resultados de viabilidade celular frente a células Caco-2 obtidos nesse trabalho estão de acordo com os dados da literatura e podem indicar a segurança da utilização das nanopartículas de PBCA. A esse respeito, cabe salientar um estudo interessante realizado por Gipps e colegas (1987), no qual diversas nanopartículas à base de poli (alquil-cianoacrilato) apresentando diferentes comprimentos de cadeia lateral (PMCA, PECA, PBCA, PIBCA e PIHCA), foram ensaiadas com relação à citotoxicidade frente à células mesenquimais tumorais ou sadias. Utilizando o corante vermelho neutro, os autores observaram que as nanopartículas compostas por polímeros de cadeia curta (PMCA e PECA) mostraram-se mais citotóxicas guando em comparação àquelas de cadeias longas (PBCA, PIBCA e PIHCA), independentemente da célula utilizada. Tais resultados podem ser explicados pela rápida liberação de produtos de degradação a partir das partículas de cadeia mais curta, uma vez que a degradação hidrolítica das nanopartículas de PACA é tanto maior quanto menor o comprimento da cadeia lateral do monômero correspondente (LEONARD et al., 1996). Dessa forma, similarmente ao presente trabalho, o estudo de Gipps e coautores (1987), reforça a baixa toxicidade das nanopartículas de PBCA.

Com relação às nanopartículas de PBCA-TMQ, foi observada uma boa tolerabilidade das células Caco-2 até a concentração de 75,0 µg/mL (Figura 19). Analisando os dados, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores de viabilidade celular referentes às concentrações

de nanopartículas de 1,0 a 75,0 µg/mL, com os valores encontrados para o grupo controle. Além disso, para essas concentrações, a viabilidade celular foi maior que 70% em todos os casos. Entretanto, na concentração de 100,0 µg/mL, essa porcentagem foi igual a 68,1 ± 3,8 e, segundo a ISO 10993-5, pode caracterizar o aparecimento de efeitos tóxicos. Adicionalmente, tal porcentagem apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05).

A literatura descreve que os efeitos tóxicos provenientes da TMQ podem estar encapsulados ao elevado grau de quaternização desse polímero (VERHEUL *et al.*, 2008), de forma que um incremento na densidade de cargas pode levar ao aumento da citotoxicidade do mesmo (JINTAPATTANAKIT *et al.*, 2008; YIN *et al.*, 2009). Por exemplo, no estudo de Hass e colaboradores, foram preparadas nanopartículas de poli-(ε-caprolactona) revestidas com TMQ apresentando diferentes graus de quaternização (4%, 10%, 18% e 66%). Com relação aos efeitos citotóxicos frente às células COS-1, os autores relataram que a formulação revestida com o polímero de maior grau de quaternização apresentou toxicidade mais elevada. Por outro lado, existem relatos de um efeito tóxico dose-dependente para esse derivado metilado (MAO *et al.*, 2005). Assim, é possível considerar que em uma maior concentração (100,0 μg/mL), a densidade de cargas do polímero, altamente quaternizado (~73%), encontra-se mais pronunciada e, por isso, pode levar ao aparecimento dos efeitos tóxicos.

Além disso, derivados apresentando o mesmo grau de quaternização, porém com diferentes massas molares, podem apresentar efeitos tóxicos diferenciados (KEAN *et al.*, 2005), de forma que o aumento na massa molar do polímero favorece o aparecimento de citotoxicidade (MAO *et al.*, 2005, JINTAPATTANAKIT *et al.*, 2008).

4.4.2. Efeito das nanopartículas de PBCA-TMQ na Resistência Elétrica Transepitelial (RET) de células Caco-2

A partir da década de 1980, as células Caco-2 tornaram-se promissora ferramenta nos estudos de avaliação das funções das células intestinais por apresentarem peculiaridades interessantes em relação aos outros tipos celulares até então disponíveis. Destaca-se, dentre essas, sua capacidade de diferenciação espontânea em cultivo in vitro, expressando muitas características morfológicas e bioquímicas presentes no intestino delgado humano (ARTURSSON, KARLSSON, 1991). Mantidas as condições adequadas de cultivo, as células Caco-2 crescem monocamada de células cilíndricas formando uma polarizadas, com microvilosidades na borda apical, apresentando, ainda, as junções oclusivas entre as células adjacentes (BALIMARE; CHONG, 2005). Assim, diversos estudos utilizam essas células para avaliação do efeito da TMQ frente a essas junções, por meio da medida da resisitividade elétrica transepitelial (KOTZÉ et al., 1999; THANOU et al., 2000; FLOREA et al., 2006; VERHEUL et al., 2008; VERHEUL et al., 2009), já que o decréscimo da RET está relacionado ao aumento da permeabilidade paracelular (ROGER et al., 2010).

Dessa forma, a partir dos resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade, foi utilizada a formulação de PBCA-TMQ na concentração de 75,0 µg/mL para a avaliação da influência das nanopartículas na RET das células Caco-2. Para tanto, o experimento foi conduzido por 120 minutos, já que esse é o tempo normalmente

utilizado nos ensaios de permeabilidade *in vitro* empregando essa linhagem celular. Como controle, foram utilizadas células Caco-2 em meio DMEM sem fenol. Nesse caso, a resistividade durante todo o experimento ficou compreendida entre 250-300 $\Omega \times \text{cm}^2$. No tempo zero, o valor médio de RET das células incubadas com as nanopartículas foi igual a 278,7 ± 8,3 $\Omega \times \text{cm}^2$. Assim, consideramos este como sendo o valor inicial de resistividade. Com os resultados apresentados na Figura 20 é possível observar que a incubação das células com a formulação estudada, resulta em diminuição estatisticamente significativa (p < 0,05) da RET das células Caco-2 a partir de 100 minutos, quando em comparação ao grupo controle.



Figura 20 – Efeito da formulação de nanopartículas de PBCA-TMQ (75,0 μ g/mL) na RET de células Caco-2. Os valores são expressos como média ± desvio padrão de três medidas (n = 3). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de p < 0,05. Linha sólida = controle. Linha tracejada = PBCA-TMQ.
Em diversos estudos da literatura existem dados que demonstram um decréscimo acentuado da RET de células Caco-2 após sua incubação com soluções de TMQ. No estudo de Kotzé e colegas (1999), os autores encontraram uma diminuição de até 70% do valor de resistividade inicial quando da utilização de TMQ com grau de quaternização igual a 61,2%. Mesmo com esse abaixamento pronunciado, os pesquisadores demonstraram, por meio do ensaio com azul de Trypan, não haver efeitos tóxicos significativos às células após a remoção do polímero. De maneira semelhante, Thanou e colaboradores (2000) relataram uma diminuição de 60% no valor inicial da RET de células Caco-2, utilizando uma solução de TMQ 60% quaternizada. Resultado semelhante foi encontrado por Florea e co-autores (2006), quando da utilização de TMQ apresentando o mesmo grau de quaternização. Em nosso trabalho, esses valores foram diminuídos em 24,5% e 31,0% após 100 e 120 minutos, respectivamente. Essa discrepância, em comparação aos estudos citados acima, pode ser explicada com base nos dados da pesquisa de Sadeghi e colaboradores (2008), na qual foi comparada a eficiência da TMQ (GQ ~ 50%, 250,0 µg/mL), em solução ou sob a forma de nanopartículas, em relação ao decréscimo da resistividade paracelular de células Caco-2. Em presença das nanopartículas, a diminuição da RET foi de aproximadamente 20% do valor inicial. Por outro lado, com a solução do polímero quaternizado esse valor foi diminuído em cerca de 55%. Esse resultado foi justificado pela maior densidade de cargas superficiais do polímero em solução, permitindo, por conseguinte, sua maior fixação às cargas negativas presentes no interior das junções oclusivas. Além disso, é possível que o efeito menos pronunciado observado no presente estudo seja devido à diluição da suspensão de nanopartículas e conseqüente diminuição da concentração de TMQ. A esse respeito, Thanou e co-autores (2000) citam que a influência desse polímero na resistividade das células Caco-2 é claramente dose-dependente.

Com a finalidade de avaliar a recuperação da resistividade, após o período de 120 minutos, as soluções foram cuidadosamente aspiradas e os compartimentos apicais e basolaterais foram lavados por três vezes com meio DMEM sem fenol. Em seguida, foi adicionado meio fresco a ambos os compartimentos e as células foram incubadas por 24 h. Após esse período, a RET foi novamente medida visando verificar a recuperação dos valores. Como resultado, foi encontrado um valor médio de resistividade igual a 262 ± 9,2 Ω × cm² para as células incubadas com as nanopartículas de PBCA-TMC. Já para as células utilizadas como controle, esse valor foi de 288,7 Ω × cm². Esses resultados indicam a recuperação da resistividade celular após a retirada das amostras em estudo e sugerem que a formulação foi capaz de induzir a abertura transitória das junções oclusivas, sem exercer efeitos tóxicos agudos. Dessa forma, tal resultado comprova a ausência de citotoxicidade das nanopartículas revestidas na concentração de 75,0 µg/mL (Figura 19).

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- O método empregado para a síntese do derivado quaternizado da quitosana foi considerado adequado, uma vez que foi obtido um rendimento de 79%. Além disso, foi sintetizada uma amostra de TMQ contendo, principalmente, sítios trimetilados em suas cadeias e com grau médio de quaternização igual a 72,9%;
- As condições utilizadas para a síntese das nanopartículas de PBCA foram satisfatórias e resultaram em um rendimento médio de aproximadamente 83% de produto formado. Além disso, as características físico-químicas dessas partículas (diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta) foram bastante similares às descritas na literatura;
- O revestimento das nanopartículas pelo derivado quaternizado da quitosana foi alcançado de modo satisfatório, sendo que a eficiência do processo foi de aproximadamente 85%. Além disso, por meio das análises conduzidas, sugere-se que a saturação foi alcançada a partir da concentração de TMQ igual a 0,5% p/v.
- Após o revestimento, foi observado aumento no diâmetro das partículas, além de inversão no potencial zeta, o qual tornou-se

89

essencialmente positivo. Tais modificações indicam que o revestimento foi adequadamente alcançado. No entanto, essas amostras exibiram uma maior dispersividade, o que pode indicar que o revestimento não 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 e aquele obtido para a formulação revestida;
- A partir das análises de FITR, constatou-se evidência adicional da ocorrência do revestimento uma vez que, no espectro obtido para as nanopartículas de PBCA-TMQ foi observada a presença de todas as bandas do derivado quaternizado (TMQ). Já a banda referente à ligação característica do polímero PBCA (C≡N) apresentou-se suprimida.
- Por meio da análise morfológica, foi observado que a formulação revestida apresentou menor tendência à agregação. Essa observação corrobora os resultados de potencial zeta e pode indicar que o revestimento apresenta influência na estabilidade das partículas;

90

- O ensaio de citotoxicidade comprovou a ausência de efeitos tóxicos das nanopartículas de PBCA. No entanto, para a formulação revestida a ocorrência de toxicidade pode ser devido, principalmente, ao alto grau de quaternização do produto obtido, podendo ser dosedependente;
- As nanopartículas de PBCA-TMQ na concentração de 75 µg/mL foram capazes de diminuir a resistência elétrica transepitelial das células Caco-2 a partir de 100 minutos de experimento. Esse decréscimo da RET foi menos pronunciado quando em comparação a estudos relatados na literatura, provavelmente pela menor densidade de cargas do polímero sob a forma de nanopartículas, bem como por uma relação de dose-dependência.

CAPÍTULO II

Desenvolvimento e validação de método analítico por Espectrofotometria Derivada para a quantificação do aciclovir na formulação de nanopartículas

1. INTRODUÇÃO

Um grande desafio durante o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas, diz respeito à quantificação do fármaco encapsulado. Tal fato pode ser explicado pela complexa composição das mesmas, bem como pela necessidade de quantificação de pequenas quantidades da substância farmacologicamente ativa. Nesse contexto, diversas técnicas analíticas são descritas para a quantificação de fármacos em nanopartículas de PACA, especialmente a espectrofotometria (WEISS *et al.*, 2007, MULIK *et al.*, 2009, LIU; CHEN, 2009) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (XI-XIAO *et al.*, 2006, HE *et al.*, 2009, LUO *et al.*, 2009).

Os métodos espectrofotométricos convencionais são bastante susceptíveis à presença de interferentes em misturas complexas, tais como as nanopartículas. Por isso, requerem tratamento prévio da amostra ou a extração do analito e nem sempre provêem uma resposta adequada. Por outro lado, apesar das inquestionáveis vantagens da CLAE, a mesma apresenta algumas limitações, tais como alto custo, longos períodos de tempo para a execução das análises e experiência no manuseio do equipamento e processamento da amostra. Adicionalmente, os inconvenientes relacionados à utilização de solventes orgânicos vêm encorajando o desenvolvimento de métodos mais simples, rápidos e com menor utilização desses solventes. Nesse sentido, o método de espectrofotometria derivada (ED) com detecção no UV apresenta baixo custo e pode ser aplicado a análises de matérias-primas e princípios ativos, bem como em estudos de cinética de liberação de fármacos, na sua detecção em presença de

compostos de degradação, além de várias outras aplicações (SIQUEIRA-MOURA *et al.*, 2008; TAVARES *et al.*, 2012).

Essa técnica 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 da 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 (KARPINSKA, 2004, BOSCH-OJEDA; SANCHES-ROJAS, 2004, MENDEZ *et al.*, 2010).

Alguns métodos empregando ED foram descritos para a quantificação do aciclovir (ACV) em diferentes formas farmacêuticas, tais como preparações injetáveis e cremes (MAHROUS *et al.*, 1992), ou em presença de guanina, sua maior impureza (DAABEES, 1998). Entretanto, até o presente momento, não há descrição na literatura da quantificação desse fármaco em nanopartículas poliméricas por meio dessa técnica.

Diante disso, o objetivo dessa etapa do trabalho foi desenvolver e validar método por espectrofotometria derivada no UV para a quantificação do aciclovir encapsulado nas nanopartículas de PBCA revestidas ou não com a TMQ.

2. MATERIAL

2.1. Matérias-primas, solventes e reagentes

- Acetonitrila grau cromatográfico Merck[®];
- Aciclovir (> 99,0%), matéria-prima de grau farmacêutico, procedência: Medley Indústria Farmacêutica;
- Aciclovir (99,89%), substância química de referência, procedência: Laboratório Farmacêutico Aché;
- Ácido Clorídrico p.a. Synth[®];
- Metanol grau cromatográfico Merck[®].

Os demais reagentes utilizados na síntese da TMQ, bem como no preparo das nanopartículas de PBCA e PBCA-TMQ foram previamente descritos no **Capítulo I**, itens **3.1**, **3.2** e **3.3.1**, respectivamente.

2.2. Equipamentos

- Balança analítica Mettler Toledo[®], modelo AB 204;
- Banho de ultrassom Thorton[®], modelo T14;
- Centrífuga Quimis[®], modelo Q222T;
- Espectrofotômetro Shimadzu[®], modelo UV-1601, munido de cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e acoplado a computador.

3. MÉTODOS

3.1. Condições analíticas

- Solvente: HCI 0,1M/Metanol:Acetonitrila (8:2, v/v)
- Ordem da derivada: 1ª ordem
- Delta lambda: 2 nm
- Fator de escala: 1,0
- Velocidade de varredura: 370 nm/min
- Assentamento das ordenadas: + 0,100 a 0,100
- Intervalo de varredura: 320 220 nm
- Método de quantificação: Método do ponto de anulação

3.2. Preparo das soluções

3.2.1. Solução padrão

Foram pesados exatamente cerca de 100 mg de ACV, 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 ultra-som por 10 minutos 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 ACV.

3.2.2. Soluções placebo

• 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 HCI 0,1M e homogeneizou-se. Deixou-se a solução em ultra-som por 10 minutos 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 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi utilizado para a leitura no espectrofotômetro.

Nanopartículas de PBCA-TMQ (placebo 2)

Pipetaram-se 10,0 mL da suspensão de nanopartículas revestidas (PBCA-TMQ) 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 ultra-som por 10 minutos 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 contrifugada a 10.000 rpm, por 60 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi utilizado para a leitura no espectrofotômetro.

97

3.2.3. Soluções amostra

• Nanopartículas de PBCA em presença de ACV (amostra 1)

Foram pesados exatamente cerca de 100 mg de ACV 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 HCI 0,1 M e homogeneizou-se. Deixou-se a solução em ultra-som por 10 minutos 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 ACV 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 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi utilizado para a leitura no espectrofotômetro.

• Nanopartículas de PBCA-TMQ em presença de ACV (amostra 2)

Foram pesados exatamente cerca de 100 mg de ACV e transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 250 mL. Pipetaram-se 10,0 mL da suspensão de nanopartículas de PBCA-TMQ e transferiram-se para o referido balão. Adicionou-se 1,0 mL de HCI 0,1 M e homogeneizou-se. Deixou-se a solução em ultra-som por 10 minutos 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 ACV 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 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi utilizado para a leitura no espectrofotômetro.

3.3. Especificidade

A especificidade do método foi avaliada 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 220-320 nm. A partir do espectro obtido, traçaram-se as derivadas de 1ª ordem.

3.4. Linearidade

Alíquotas da solução padrão de ACV foram transferidas para balões volumétricos e diluídas com HCI 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v), obtendo-se as concentrações finais 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. Cada solução foi preparada em triplicata. Após o aparelho ter sido calibrado com HCI 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v), realizou-se a varredura no intervalo de 220-320 nm. A partir do espectro obtido, traçaram-se as derivadas de 1ª ordem, com leituras efetuadas a 295,2 nm. A linearidade foi avaliada pela análise de regressão linear, utilizando ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados.

3.5. Precisão e exatidão

Para a determinação da precisão e exatidão intra-dia, alíquotas de 10,0 mL dos placebos 1 e 2 foram adicionadas à quantidades conhecidas de soluções de ACV nas concentrações de 25,0; 100,0 e 200,0 µg/mL. Cada amostra foi diluída com HCI 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v) com a finalidade de obter concentrações iguais a 2,5; 10,0 e 20,0 µg/mL. Alíquotas dessas soluções foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 60 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi utilizado para a leitura no espectrofotômetro. Após o aparelho ter sido zerado com HCI 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v), realizou-se a varredura no intervalo de 220-320 nm. A partir do espectro obtido, traçaram-se as derivadas de 1ª ordem, com leituras efetuadas a 295,2 nm.

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 do coeficiente de variação (CV%), de acordo com a Equação 5:

$$CV(\%) = \frac{desvio \, padrão}{média} \times 100$$
 (Equação 5)

Os resultados de exatidão foram expressos matematicamente a partir da equação 6:

$$E(\%) = \frac{valor \ mensurado}{valor \ teórico} \times 100$$
(Equação 6)

100

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

LD e LQ foram estimados por meio de cálculos baseados na curva de calibração, utilizando as Equações 7 e 8, respectivamente:

$$LD = \frac{3.3\sigma}{IC}$$
(Equação 7)

Onde, LD é o limite de detecção estimado (μ g/mL), σ , o desvio padrão médio obtido por meio da curva de calibração e IC, a inclinação da curva de calibração.

$$LQ = \frac{10\sigma}{IC}$$
(Equação 8)

Onde, LQ é o limite de quantificação estimado (µg/mL), σ, o desvio padrão médio obtido por meio da curva de calibração e IC, a inclinação da curva de calibração.

3.7. Teste de recuperação

Alíquotas das soluções amostra 1 e 2 de concentração teórica 20,0 µg/mL foram adicionadas à alíquotas de soluções padrão (80,0; 130,0 e 180,0 µg/mL) em balões volumétricos de 10,0 mL. Após diluição com HCI 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v), a concentração final das amostras ficou compreendida na linearidade e faixa do método (10,0; 15,0 e 20,0 µg/mL). Após o aparelho ter sido zerado com HCI 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v), realizou-se a varredura no intervalo de 220-320 nm. A partir do espectro obtido, traçaram-se as derivadas de 1ª ordem, com leituras efetuadas a 295,2 nm. As leituras foram realizadas em nove replicatas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No processo de validação, é importante detectar erros sistemáticos dos procedimentos analíticos e oferecer evidências comprovadas 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, RIBANI *et al.*, 2004). Dessa forma, o método proposto nessa parte do trabalho foi validado segundo esses critérios.

4.1. Especificidade

A literatura descreve a utilização de diferentes solventes para a desestruturação das nanopartículas e conseqüente quantificação do fármaco encapsulado. Dentre esses, clorofórmio (WEISS *et al.*, 2007), etanol (MULIK *et al.*, 2009), metanol (HE *et al.*, 2009) e acetonitrila (MAKSIMENKO *et al.*, 2008) são os mais amplamente empregados. Dessa forma, tais solventes, bem como suas misturas em diferentes proporções, foram avaliados por meio de observação visual em relação à habilidade de rompimento das partículas. Como resultado, a utilização de metanol:acetonitrila (8:2, v/v) mostrou-se mais eficiente quando em comparação aos demais solventes. No entanto, a adição de HCI 0,1 foi necessária para garantir a completa solubilização do ACV.

Avaliando-se o espectro de ordem zero do ACV em presença de nanopartículas de PBCA e PBCA-TMQ, fica evidente a interferência dessas formulações no espectro normal do fármaco (Figura 21), o que leva a um aumento

na absorbância do mesmo. Por essa razão, as técnicas espectrofotométricas convencionais não poderiam ser empregadas para a quantificação do princípio ativo nessas matrizes.



Figura 21 – Espectro de ordem zero de: (a) PBCA-TMQ contendo ACV (20,0 μ g/mL), (b) PBCA contendo ACV (20,0 μ g/mL), (c) ACV (20,0 μ g/mL), (d) PBCA-TMQ, (e) PBCA. Abs = absorbância. Solvente: HCI 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v).

Portanto, para assegurar a eliminação da interferência dos placebos na quantificação do ACV, a espectrofotometria derivada de 1ª ordem (ED¹) foi avaliada. Os espectros de ED¹ referentes aos placebos 1 e 2, aciclovir, bem como do ACV em presença dos sistemas nanoparticulados (soluções amostra 1 e 2) são mostrados na Figura 22. A partir da análise desses espectros, observou-se que em 295,2 nm ocorreu, simultaneamente, a anulação da interferência dos constituintes das nanopartículas e o máximo de absorção do ACV. Assim, esse foi considerado o ponto ideal para efetuar a quantificação do fármaco, devido sua maior sensibilidade.



Figura 22 – Espectros derivados de 1^a ordem de: (a) ACV em presença de PBCA (20,0 μ g/mL), (b) ACV (20,0 μ g/mL), (c) ACV em presença de PBCA-TMQ (20,0 μ g/mL), (d) PBCA-TMQ, (e) PBCA. Abs = absorbância. Solvente: HCl 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v).

Diversas técnicas ou métodos de derivadas são encontrados na literatura para a determinação de fármacos encapsulados: zero pico, ponto de anulação, calibração multivariada, dentre outras. Entretanto, o método do ponto de anulação, aplicado nesse trabalho, é o mais amplamente utilizado, sobretudo pela praticidade e simplicidade (BOSCH-OJEDA; SANCHES-ROJAS, 2004, EL-SAYED; EL-SALEM, 2005). Com a finalidade de aprimorar a técnica empregada, alguns parâmetros devem ser ajustados experimentalmente. Em uma primeira abordagem, o intervalo de comprimento de onda para cálculos das derivadas (delta lambda, $\Delta\lambda$) é o principal parâmetro instrumental que afeta a forma do espectro da derivada. Esse parâmetro necessita ser experimentalmente testado, visando uma melhor seletividade, maior sensibilidade e adequada relação sinalruído (MORELLI, 2003). Por outro lado, segundo Toral e colaboradores (2002) o valor do fator de escala deve ser avaliado a fim de evitar o efeito de distorção no espectro obtido. A partir dessas considerações, diferentes valores de delta lambda e fatores de escala foram testados para o método desenvolvido, sendo que os valores de $\Delta\lambda$ = 2,0 e fator de escala = 1,0 permitiram a adequada relação sinal-ruído e boa resolução dos espectros.

4.2. Linearidade

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). Para a avaliação da linearidade, foram preparadas, em triplicata, soluções de ACV em HCI 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. Os espectros de ED¹ obtidos, bem como a curva analítica construída a partir das amplitudes dos picos a 295,2 nm, estão mostrados na Figura 23.



Figura 23 - (a) Espectros sobrepostos de soluções de ACV nas concentrações de 1,25 a 40 μ g/mL. (b) Curva analítica obtida a partir da medida de absorbância em 295,2 nm. Solvente: HCI 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v).

A partir dos resultados encontrados, observou-se correlação linear (0,9999) entre a amplitude dos picos a 295,2 nm e as concentrações correspondentes de ACV no intervalo entre 1,25 e 40,0 µg/mL e, portanto, o método mostrou-se linear em toda a faixa de concentração estudada.

4.3. Precisão e Exatidão

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. Já a exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Esses parâmetros permitem concluir sobre o erro analítico do método (RIBANI *et al.*, 2004). 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 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3 – Ensaios intra- e inter-dia para a determinação da precisão e exatidão do método de ED¹ (295,2 nm) para o placebo 1

	li	ntra-dia		In	ter-dia	
Concentração de ACV (µg/mL)	Média ^ª ± d.p. (µg/mL)	CV (%)	E (%)	Média ^⁰ ± d.p. (µg/mL)	CV (%)	E (%)
2,5	2,53 ± 0,045	1,78	101,4	$2,44 \pm 0,072$	2,95	97,6
10,0	10,21 ± 0,046	0,45	102,1	10,26 ± 0,170	1.65	102,6
20,0	20,28 ± 0,027	0,13	101,4	20,56 ± 0,210	1.02	102,8

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

	In	tra-dia		Int	er-dia	
Concentração de ACV (µg/mL)	Média ^ª ± d.p. (µg/mL)	CV (%)	E (%)	Média ^b ± d.p. (µg/mL)	CV (%)	E (%)
2.5	2.49± 0.024	0.96	99.68	2.46 ± 0.10	4.06	98.4
10.0	10.05± 0.08	0.79	100.50	10.31 ± 0.26	2.52	103.1
20.0	20.19 ± 0.039	0.19	100.95	20.16 ± 0.42	2.08	100.8

Tabela 4 – Ensaios intra- e inter-dia para a determinação da precisão e exatidão do método de ED¹ (295,2 nm) para o placebo 2

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

Com base nos resultados, pode-se observar que os valores obtidos para o CV (%), na avaliação da precisão do método, não extrapolaram o valor máximo exigido pela legislação brasileira (5%) (BRASIL, 2003). Os valores médios para os ensaios intra- e inter-dia foram iguais a 0,79% e 1,87% para as nanopartículas de PBCA em presença de ACV (placebo 1) e, 0,65% e 2,89% para as nanopartículas de PBCA-TMQ em presença de ACV (placebo 2). Esses valores confirmam a precisão, reprodutibilidade e repetibilidade do método de ED¹ a 295,2 nm. As médias dos valores de exatidão intra- e inter-dia para o placebo 1 foram iguais a 101,6 e 101,0%. Já para o placebo 2, os valores corresponderam a 100,3 e 100,7%, respectivamente. Tais resultados indicam boa exatidão para o método proposto.

4.4. 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 7, item 2.2.6, o LD estimado do ACV foi igual a 0.08 µg/mL. Portanto, valores de concentração desse antiviral igual ou superior ao limite de detecção foram diferenciados do ruído do equipamento e detectados (BRASIL, 2003).

Por outro lado, o limite de quantificação 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 8, foi de 0.25 µg/mL. Como consequência, valores de concentração de ACV igual ou superior ao valor estimado são quantificados com precisão e exatidão aceitáveis pela metodologia empregada, demonstrando a boa sensibilidade do método (BRASIL, 2003).

4.5. Teste de Recuperação

A recuperação é definida como a proporação da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada em concentrações conhecidas na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada precisa e exatamente (RIBANI *et al.*, 2004). Nesse contexto, os estudos de recuperação foram conduzidos visando corroborar os resultados de exatidão encontrados para o método de ED¹ (295,2 nm).

As Tabelas 5 e 6 contem os resultados obtidos nos testes recuperação. As médias dos valores de recuperação para as nanopartículas de PBCA e PBCA-TMQ em presença de ACV foram iguais a 100,3% e 100, 2%, respectivamente. Tais resultados indicam uma exatidão satisfatória para o método desenvolvido.

Tabela 5 – Resultados obtidos para o Teste de Recuperação do ACV em presença de nanopartículas de PBCA pelo método de ED¹ (295,2 nm)

Concentração (µg/mL)					
	Padrão	Amostra	Concentração final	Valor encontrado (média ^ª ± d.p.)	Recuperação (%)
	80.0	20.0	10.0	10.01 ± 0.014	100.1
	130.0	20.0	15.0	14.97 ± 0.024	99.8
	180.0	20.0	20.0	20.24 ± 0.041	101.2

^an = 3; d.p. = desvio padrão.

Tabela 6 – Resultados obtidos para o Teste de Recuperação do ACV em presença de nanopartículas de PBCA-TMQ pelo método de ED¹ (295,2 nm)

Concentração (ug/mL)

Padrão	Amostra	Concentração final	Valor encontrado (média ^ª ± d.p.)	Recuperação (%)
80.0	20.0	10.0	9.93 ± 0.019	99.3
130.0	20.0	15.0	15.12 ± 0.028	100.8
180.0	20.0	20.0	20.10 ± 0.060	100.5

^an = 3; d.p. = desvio padrão.

5. CONCLUSÕES

Até o presente momento, não há descrição na literatura de método por espectrofotometria derivada de 1^a ordem para a quantificação do ACV em nanopartículas poliméricas à base de PACA. Diante disso, um novo método de ED¹ foi desenvolvido para a determinação do fármaco nessas nanopartículas, revestidas ou não com a TMQ. O método desenvolvido foi capaz de eliminar a interferência dos excipientes, permitindo a quantificação do ACV nas formulações com precisão e exatidão adequadas. Além disso, tal método mostrou-se simples, rápido e sensível e poderá ser facilmente aplicado na determinação do ACV estidado a esses nanocarreadores.

Capítulo III

CAPÍTULO III

Desenvolvimento e validação de método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para quantificação do aciclovir nos estudos de permeabilidade *in vitro*

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, vários modelos baseados em culturas celulares para determinação da permeabilidade *in vitro* têm sido desenvolvidos. Dentre eles, destacam-se aqueles empregando células Caco-2, as quais vêm sendo amplamente utilizadas como ferramenta de triagem nos estágios iniciais de desenvolvimento de novos fármacos e/ou sistemas de liberação (BALIMANE; CHONG, 2005).

A quantificação das amostras provenientes de experimentos de permeabilidade requer o desenvolvimento de métodos analíticos, o que caracteriza um dos grandes desafios para estes tipos de estudo. Os compostos, na maioria das vezes, apresentam-se em concentrações significativamente reduzidas, tornando imprescindível que o método apresente adequada sensibilidade para ser eficientemente utilizado com segurança e confiabilidade, possibilitando a interpretação acurada dos dados provenientes dos estudos de permeabilidade. As técnicas analíticas baseadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dotadas de detectores com alto grau de sensibilidade são as mais empregadas na quantificação de fármacos em estudos de permeabilidade (GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2009).

Diversos métodos analíticos, sobretudo aqueles empregando a técnica de CLAE, são descritos na literatura para a quantificação do aciclovir (ACV) em estudos de permeabilidade *in vitro* (TRAPANI *et al.*, 2004; SHAHA *et al.*, 2008; KRATZ *et al.*, 2011). No entanto, até o presente momento, não existe relato de

metodologia reportando a determinação e quantificação do aciclovir encapsulado à nanopartículas de poli (*n*-butil cianoacrilato) revestidas com *N*,*N*,*N*-trimetilquitosana, em ensaios de permeabilidade com células Caco-2. Sendo assim, o objetivo nesse capítulo do trabalho foi desenvolver e validar método de análise, por CLAE, visando essa quantificação.

2. MATERIAL

2.1. Matérias-primas, solventes e reagentes

- Acetonitrila grau cromatográfico Merck[®];
- Aciclovir (99,89%), substância química de referência, procedência: Laboratório Farmacêutico Aché;
- Ácido clorídrico Synth[®];
- Fosfato de sódio bibásico Synth[®];
- Hidróxido de sódio Synth[®].
- Solução Tampão Hanks Cultilab;

Os demais reagentes utilizados na síntese da TMQ, bem como no preparo das nanopartículas de PBCA e PBCA-TMQ foram previamente descritos no **Capítulo 1**, itens **3.1**, **3.2** e **3.3.1**, respectivamente.

2.2. Equipamentos e dispositivos diversos

- Balança analítica Shimadzu, modelo AX200;
- Banho ultrassônico Unique, modelo USC-2800A;
- Coluna cromatográfica Luna C18, 250 mm de comprimento e 4,60 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 μm, Phenomenex®;
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu composto por bomba LC-10ADVP, degaseificador DGU-14A, injetor automático de

amostras SIL-10ADVP, detector DAD SPD-M10AVVP, forno de coluna CTO10AVP; Certificado de Qualificação Operacional e de Performance Nº 512/11 – HPLC Instrumentação Analítica;

- Membranas filtrantes Sartorius de acetato de celulose com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 μm;
- pHmetro Metrohm, modelo 827;
- Sistema de filtração á vácuo Quimis;

3. MÉTODOS

3.1. Métodos analíticos para quantificação de amoxicilina (padrão de baixa permeabilidade), metoprolol (padrão de alta permeabilidade) e aciclovir

Na literatura encontram-se descritos diversos métodos para a quantificação por CLAE de amoxicilina nas mais variadas matrizes (ABREU *et al.*, 2003; FOROUTAN *et al.*, 2007; DELIS *et al.*, 2009; RAMBLA-ALEGRE *et al.*, 2011), assim como para o metoprolol (RANTA *et al.*, 2002; DELAMOYE *et al.*, 2004; DONGRE *et al.*, 2008). Entretanto, os métodos utilizados nesse trabalho foram aqueles desenvolvidos e validados previamente pelo Laboratório de Permeabilidade de Fármacos em Culturas Celulares (LPFCC) do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Por outro lado, para a quantificação do aciclovir foi utilizada, inicialmente, as condições apresentadas na Tabela 7.

Analito	Fase móvel	Fluxo (mL/min)	λ (nm)
Amoxicilinaª	10 mM de NaH ₂ PO ₄ em pH 4,8 e acetonitrila (95:5 v/v)	1,0	235
Metoprolol ^a	0,7% de trietilamina em pH 3,0 e acetonitrila (70:30 v/v)	1,0	220
Aciclovir	20 mM de NaH ₂ PO ₄ em pH 7,4 e metanol (60:40 v/v)	0,6	255

Tabela 7 - Condições de partida para a validação dos métodos de quantificação dos compostos nos ensaios de permeabilidade *in vitro*

^aMétodo previamente validado pelo LPFC.

3.2. Preparo de soluções-padrão da curva analítica

As soluções-padrão das curvas de calibração foram preparadas a cada dia de análise a partir de solução-estoque na concentração de 1,0 mg/mL, recentemente preparada. A solução-estoque foi preparada a partir da pesagem de 25,0 mg de aciclovir, seguida de sua solubilização em balão volumétrico calibrado de 25 mL, utilizando-se como solvente água ultrapurificada. Para auxiliar na solubilização do fármaco, tornou-se necessário a utilização do banho ultrassônico por 20 minutos. A partir das soluções-estoque foram preparadas as soluções-padrão por diluições sucessivas em solução tampão Hanks até atingir as concentrações de uso para construção da curva analítica: 100 ng/mL; 200 ng/mL; 500 ng/mL; 1.000 ng/mL e 5.000 ng/mL.

3.3. Preparo de amostras de padrão de controle de qualidade

As amostras de controle de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) para o aciclovir foram preparadas a partir de solução-estoque obtida por nova pesagem do padrão conforme procedimento descrito no item **3.2**. Os respectivos valores de concentração foram iguais a: 200 ng/mL; 2.000 ng/mL e 4.000 ng/mL. Após o preparo, estas amostras de padrão de controle de qualidade foram aliquotadas em frascos de vidro âmbar e armazenadas sob refrigeração.

3.4. Preparo de amostras provenientes dos estudos de permeabilidade

Para a análise das amostras provenientes dos estudos de permeabilidade, optou-se pela injeção direta no sistema cromatográfico, sem a necessidade de procedimentos de extração e purificação.

3.5. Parâmetros de validação

A validação do método foi realizada por meio da determinação dos parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação e estabilidade, conforme a Resolução 899/03 (BRASIL, 2003), que dispõe sobre as características a serem consideradas durante a validação de procedimentos bioanalíticos.

3.5.1. Especificidade

A especificidade do método foi avaliada por meio da análise de seis amostras de solução tampão Hanks em comparação com a solução contendo aciclovir, em concentração próxima ao limite de quantificação a fim de que possíveis interferências provenientes do tampão fossem avaliadas. De maneira semelhante, foram analisadas amostras da formulação de nanopartículas de poli (*n*-butil cianoacrilato) revestidas com *N*,*N*,*N*-trimetilquitosana (solução a 900 ng/mL em tampão Hanks), visando avaliar interferências por parte da formulação desenvolvida.

3.5.2. Linearidade

Para a construção da curva analítica foram utilizadas soluções de aciclovir em tampão Hanks nas concentrações descritas no item **3.2**, em triplicata. Estabeleceu-se correlação linear entre valores de concentração, considerados variáveis independentes (x), e as áreas dos sinais cromatográficos do padrão, consideradas variáveis dependentes (y). Os parâmetros de correlação foram estimados empregando-se o método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2003).

3.5.3. Precisão

Esse parâmetro foi determinado analisando-se amostras de controle de qualidade em três concentrações diferentes (200 ng/mL; 2.000 ng/mL e 4.000 ng/mL), em seis réplicas no mesmo dia (precisão intra-dia) e em dois dias consecutivos (precisão inter-dias).

Os resultados de precisão foram expressos pelo coeficiente de variação (CV%), de acordo com a equação 5:

$$CV(\%) = \frac{desvio \, padrão}{média} \times 100$$
 (Equação 5)

3.5.4. Exatidão

O referido parâmetro foi determinado pela análise de amostras de controle de qualidade em três diferentes concentrações e em seis réplicas em um mesmo dia (exatidão intra-dia) e em dois dias diferentes (exatidão inter-dias). Os resultados de exatidão foram expressos matematicamente a partir da Equação 6:

$$E(\%) = \frac{valor \ mensurado}{valor \ teórico} \times 100$$
(Equação 6)

3.5.5. Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Para a determinação do Limite de Detecção, foram feitas injeções em ordem decrescente de concentração do aciclovir até que o sinal cromatográfico atingisse área referente a três vezes o ruído da linha base, no tempo de retenção do pico de interesse. Por outro lado, para a determinação do Limite de Quantificação as injeções foram feitas até que a área do pico fosse dez vezes superior ao ruído da linha base no tempo de retenção do pico de interesse.

3.5.6. Estabilidade

3.5.6.1. Estabilidade de curta duração

Para a determinação desse parâmetro, foram utilizadas três amostras de padrão de controle de qualidade em três concentrações (baixa, média e alta), mantidas à temperatura ambiente durante 6 horas. A concentração dos analitos nas amostras de padrão de controle de qualidade foi comparada aos resultados de amostras recém-preparadas.

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise de amostras recém-preparadas.

Vale ressaltar que o parâmetro recuperação não foi determinado na validação do método em questão, uma vez que não se realizou qualquer procedimento de extração com as amostras provenientes do experimento de

permeabilidade, sendo realizada a injeção direta das mesmas sem tratamento prévio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento do método de quantificação

Como anteriormente descrito, e devido à característica polar do analito em questão (ACV), foi utilizada inicialmente a fase móvel composta por Tampão fosfato: Metanol (60:40 v/v). Tal fase móvel foi previamente filtrada em membrana de acetato de celulose, com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 µm e degaseificada em banho ultrassônico por vinte minutos.

Na Figura 24 está representado o cromatograma referente à injeção do ACV em solução tampão Hanks pH 7.4, utilizando-se como fase móvel a composição acima descrita.



Figura 24 – Cromatograma de injeção do aciclovir em solução tampão Hanks pH 7,4. Composição da Fase móvel: Tampão Fosfato pH 7,4: Metanol (60:40 v/v).

A partir da análise do cromatograma apresentado, pode-se perceber que com a utilização da fase móvel em questão, o pico referente ao ACV elui no volume morto, o que constitui um parâmetro cromatográfico inadequado. Dessa forma, optou-se por modificar a composição da fase móvel, utilizando aquela descrita no trabalho de Trapani e colaboradores (2004): Tampão fosfato pH 4,8: Acetonitrila (95:5 v/v). O cromatograma obtido nessa condição está representado na Figura 25.



Figura 25 – Cromatograma de injeção do aciclovir em solução tampão Hanks pH 7,4. Composição da Fase móvel: Tampão Fosfato pH 4,8: Metanol (60:40 v/v).

Em relação ao resultado obtido, sugere-se que, com a modificação da composição da fase móvel e consequente diminuição de sua polaridade, a afinidade do analito em relação à coluna mostrou-se maior. Tal fato pode ter ocasionado um aumento do tempo de retenção do ACV, permitindo uma melhor resolução do pico do analito em relação ao sinal do volume morto. No entanto, decidiu-se incrementar o fluxo inicial, a fim de avaliar se essa modificação poderia ser capaz de diminuir o tempo de retenção do fármaco (5,8 minutos). Dessa forma, o fluxo foi aumentado para 1,0 mL/min e, com isso, obtive-se a eluição do pico em tempo de corrida considerado satisfatório (4,6 minutos), com adequada simetria e pureza do mesmo (Figura 26 b).

Frente ao exposto e considerando os procedimentos analíticos internos do LPFCC, as condições cromatográficas utilizadas para a validação e quantificação dos fármacos nos ensaios de permeabilidade *in vitro* encontram-se sumarizadas na Tabela 8.

Analito	Fase móvel	Fase Fluxo estacionária (mL/min)		Temperatura do forno de coluna (° C)	λ (nm)	Tempo de retenção (min)
amoxicilina	10 mM de NaH ₂ PO ₄ em pH 4,8 e acetonitrila (95:5 v/v)	Coluna phenyl- 2 HYPERSIL (150 mm, 4,6 mm, 5µm), Thermo Scientific®	1,0	40	235	3,0
metoprolol	0,7% de trietilamina em pH 3,0 e acetonitrila (70:30 v/v)	Coluna phenyl- 2 HYPERSIL (150 mm, 4,6 mm, 5µm), Thermo Scientific®	1,0	40	220	3,4
Aciclovir	20 mM de NaH ₂ PO ₄ em pH 4,8 e acetonitrila	Coluna Luna C18 (250 mm, 4,6 mm, 5µm) Phenomenex®	1,0	40	255	4,6

Tabela 8. Condições relativas aos métodos de quantificação por CLAE desenvolvidos e validados para os compostos utilizados nos estudos de permeabilidade^a.

^aPara todos os métodos empregou-se volume de injeção de 50 μ L.

 λ = absorbância. UV = ultravioleta.

(95:5 v/v)

Torna-se importante mencionar, que a seleção dos fármacos amoxicilina e metoprolol como padrões de baixa e alta permeabilidade, respectivamente, para a condução dos ensaios de permeabilidade, foi realizada de acordo com a lista de recomendação do guia da agência regulatória norte-americana (FDA – *Food and Drug Administration*) que dispõe sobre bioisenções (UNITED STATES, 2000), bem

como pela simplicidade e facilidade de execução dos métodos de detecção por CLAE-UV, previamente desenvolvidos e validados.

4.2. Especificidade

A especificidade é definida como a capacidade do método em distinguir a substância analisada de todas as outras presentes na amostra (CAUSON, 1997). Na análise de amostras provenientes dos estudos de permeabilidade, interferentes potenciais incluem componentes endógenos, metabólitos, produtos de decomposição, além de adjuvantes como soro fetal ou muco simulado, quando utilizados.

Na Figura 26 estão representados os cromatogramas das injeções da solução do branco (tampão Hanks pH 7,4), da solução da formulação branca (nanopartículas de poli (n-butil-cianoacrilato) revestidas com *N,N,N*-trimetilquitosana), bem como a da injeção de ACV em tampão Hanks pH 7,4. Por meio dos cromatogramas, pode-se perceber que o método desenvolvido mostrouse seletivo para o analito em estudo, não ocorrendo interferências perceptíveis no pico em seu respectivo tempo de retenção.



Figura 26 - Cromatograma das injeções da solução do branco (solução tampão Hanks pH 7,4) (a) Cromatograma da solução da formulação branca (nanopartículas de poli (n-butilcianoacrilato) revestidas com *N,N,N*-trimetilquitosana) a 900 ng/mL em tampão Hanks (b). Cromatograma da injeção de ACV a 100 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.

127

4.3. Linearidade

A linearidade indica a relação entre concentração de analito e resposta do método, representada, neste estudo, pela área do sinal cromatográfico. É obtida por meio da construção da curva analítica, que representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito (BRASIL, 2003).

Assim, a linearidade foi avaliada pela injeção em triplicata de soluçõespadrão de ACV, conforme especificado no item **3.5**. A reta obtida para o método validado, bem como os parâmetros do gráfico estão representados na Figura 27. Por meio da análise dos resultados encontrados, observou-se uma correlação linear ($r^2 = 1$) entre a absorbância a 255 nm e as concentrações correspondentes de ACV no intervalo entre 100 e 5.000 ng/mL e, portanto, o método mostrou-se linear em toda a faixa de concentração estudada.



Figura 27 - Curva analítica referente ao método analítico desenvolvido para quantificação do aciclovir em tampão Hanks empregando-se CLAE-UV.

128

4.4. Precisão e Exatidão

A precisão de um método analítico representa o grau de concordância dos resultados obtidos quando um procedimento analítico é aplicado repetidamente. A precisão intra-dia refere-se à repetição do método com o mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento e os mesmos reagentes, em curto intervalo de tempo (no mesmo dia). A precisão inter-dias é obtida por meio de alteração de condições, como mudança de analista ou reagentes e utilização do método durante várias semanas ou meses. Já a exatidão é uma medida de erro sistemático, sendo definida como concordância entre o valor determinado e o valor real e expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (CAUSON, 1997).

A precisão e exatidão do método foram determinadas em dois níveis: intradia e inter-dias (2 dias consecutivos), sendo ambas avaliadas pela análise dos resultados obtidos das injeções de soluções-padrão controle previamente descritas no item **3.3**. Os resultados para precisão, calculada em relação à área dos cromatogramas, e exatidão, calculada em relação às concentrações determinadas, relativos ao ACV estão descritos na Tabela 9.

Concontração	Precisão	o CV (%)	Exatidão (%)			
(ng/mL)	Intra-dia (n=3)	Inter-dias (n=6)	Intra-dia (n=3)	Inter-dias (n=6)		
200	0,8	3,6	97,5	99,7		
2.000	1,6	1,1	96,0	101,9		
4.000	1,2	0,8	96,4	103,6		

Tabela 9 - Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o aciclovir utilizando CLAE-UV.

Com base nos resultados, pode-se observar que os valores obtidos para o CV (%), na avaliação da precisão do método, não extrapolaram o valor máximo exigido pela legislação (5%) (BRASIL, 2003). Esses valores confirmam a precisão, reprodutibilidade e repetibilidade do método em estudo. Além disso, os resultados indicam boa exatidão para a metodologia proposta.

4.1. Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

De acordo com a Resolução 899/03, o limite de detecção é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Por outro lado, o limite inferior de quantificação deve representar a menor concentração que pode ser determinada com exatidão e precisão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Ainda segundo a legislação, o pico de resposta da substância no LQ deve ser identificável e reprodutível com precisão de 20% e exatidão de 80-120%. Os valores relativos aos LD e LQ determinados neste estudo para o ACV, bem como os valores de precisão e exatidão de LIQ estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - LD e LQ obtidos na validação dos métodos para quantificação do ACV empregando-se CLAE-UV.

Analito	LD	LQ	Precisão (LQ)	Exatidão (LQ)		
aciclovir	35 ng/mL	100 ng/mL	5,5%	95,5%		

De acordo com os resultados obtidos e segundo a legislação vigente (BRASIL, 2003), valores de concentração do analito em estudo iguais ou superiores a 35 ng/mL foram diferenciados do ruído do equipamento e detectados. Por outro lado, valores de concentração de ACV iguais ou superiores a 100 ng/mL podem ser quantificados com precisão e exatidão aceitáveis pela metodologia empregada, demonstrando boa sensibilidade do método.

4.2. Estabilidade de curta duração

A determinação da estabilidade de um fármaco em uma matriz biológica depende de vários fatores, tais como propriedades químicas do analito, condições de armazenamento da amostra, tipo de matriz biológica e material de acondicionamento (UNITED STATES, 2001). Tal determinação é fundamental para garantir que a concentração da substância a ser analisada não sofreu alteração entre a coleta e o momento da análise (CAUSON, 1997).

Conforme recomendado pela Resolução 899/03 (BRASIL, 2003), é importante que se determine a estabilidade das amostras em temperatura

ambiente e em ciclos de congelamento e descongelamento. No entanto, no presente trabalho foi conduzida apenas a determinação da estabilidade de curta duração, uma vez que à medida que as amostras foram coletadas nos ensaios de permeabilidade, procedeu-se a quantificação das mesmas. Sendo que o tempo entre a coleta e a quantificação não ultrapassou 6 h.

Os resultados encontrados para esse importante parâmetro estão dispostos

na Tabela 11.

Tabela 11 - Estabilidade do ACV em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração	An	nostras rec preparada:	ém- s	Amostra	Amostras em TA por 6 horas					
(ng/mL)	Conc. deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc. deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio ^a			
200	195	0,8	97,5	206	1,7	102,9	5,4			
2.000	1920	1,6	96,0	2.036	0,5	101,8	5,8			
4.000	3856	1,2	96,4	4.137	0,4	103,4	7,0			

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Conc. Deter. = Concentração determinada.

Analisando-se os resultados obtidos, pode-se afirmar que as amostras são consideradas estáveis, já que não foi observado desvio superior a 15% do valor obtido em relação às amostras recém-preparadas, (BRASIL, 2003).

5. CONCLUSÕES

O método analítico desenvolvido mostrou-se adequado para a quantificação de aciclovir em sistema nanoestruturado de poli (n-butil-cianoacrilato) revestido por TMQ em experimentos de permeabilidade que empregam células Caco-2. A validação do método demonstrou a sua seletividade, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade. Além disso, o método mostrou-se rápido e empregou quantidades mínimas de solvente orgânico.

Capítulo IV

CAPÍTULO IV

Caracterização físico-química e avaliação da permeabilidade *in vitro* do aciclovir encapsulado em nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) revestidas com *N*,*N*,*N*-trimetilquitosana

1. INTRODUÇÃO

A via oral é considerada preferencial para a administração de fármacos, oferecendo inúmeras vantagens tais como conveniência, facilidade de adesão ao tratamento e adequada relação custo-benefício (GOMEZ-ORELLANA *et al.*, 2005; YVONNE; LEONG, 2008). Além disso, constitui a via de escolha para o tratamento de doenças crônicas (PLAPIED *et al.*, 2011). No entanto, ativos biológicos administrados por essa via podem apresentar biodisponibilidade variável e/ou limitada.

Dessa forma, a literatura descreve o desenvolvimento de sistemas de liberação inovadores, capazes de contornar esse inconveniente. Nesse sentido, carreadores nanoestruturados merecem posição de destaque (SALAMA *et al.*, 2006; YVONNE; LEONG, 2008; LOPES *et al.*, 2010). Mais especificamente, existem vários estudos envolvendo a utilização de nanopartículas poliméricas visando à otimização da biodisponibilidade oral de diferentes princípios ativos (GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2005; PAPLIED *et al.*, 2011).

Nesse cenário, nanopartículas de poli (alquil-cianoacrilato) (PACA) vêm sendo intensamente estudadas como ferramenta para a liberação controlada e/ou direcionada de inúmeros agentes farmacológicos. Além disso, a aplicação desses carreadores para a liberação oral de fármacos tem sido apontada como promissora, já que os mesmos são capazes de proteger o fármaco encapsulado frente à degradação por enzimas presentes no trato gastrintestinal (TGI), além de possibilitar liberação controlada do mesmo devido à sua natureza polimérica (VAUTHIER *et al.*, 2007; GRAF *et al.*, 2009). Alguns estudos, com o intuito de potencializar as vantagens das nanopartículas de PACA na liberação oral empregam do revestimento desses nanovetores com moléculas de características bioadesivas, tais como a quitosana (BRAVO-OSUNA *et al.*, 2006). Entretando, a utilização da *N*,*N*,*N*-trimetilquitosana (TQM) como polímero de revestimento constitui, de acordo com nosso conhecimento, uma estratégia inédita.

Pelo exposto, o presente capítulo do trabalho teve como objetivos a avaliação das propriedades físico-químicas, bem como a investigação da capacidade promotora de absorção de nanopartículas de poli (*n-butil-cianoacrilato*) PBCA revestidas com TMQ, após a incorporação do acicolvir. Esse antiviral foi eleito como fármaco modelo devido à sua baixa biodisponibilidade oral, como consequência de uma ineficiente permeabilidade intestinal o que o classifica como Classe III pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB classe III).

3. MATERIAL

3.1. Matérias-primas, solventes e reagentes

- Acetonitrila grau cromatográfico Merck[®];
- Ácido clorídrico Synth[®];
- Amoxicilina, substância química de referência (99,3%) Sigma-Aldrich[®]
- Bicarbonato de sódio Ecibra[®];
- Cloreto de sódio Synth[®];
- Dextran 70.000 Sigma-Aldrich [®];
- Fosfato de sódio bibásico Synth[®];
- Glicose Sigma-Aldrich[®];
- Hidróxido de sódio Synth[®];
- Meio DMEM em pó Cultilab[®];
- Meio DMEM líquido sem fenol Cultilab[®];
- Metanol grau cromatográfico Merck[®];
- Metoprolol, substância química de referência (100%) Medley Farmacêutica Ltda;
- *n*-butil-2-cianoacrilato Sichel Werk[®];
- Solução de antibióticos estreptomicina (100 µg/mL) e Penicilina (100 Ul/mL) - Cultilab[®];
- Solução de tripsina 0,25% e EDTA 1 mM Cultilab[®];
- Soro fetal bovino Cultilab[®].

Os demais reagentes utilizados na síntese da TMQ, foram previamente descritos no **Capítulo I**, item **3.1**.

3.2. Equipamentos e dispositivos diversos

- Agitador magnético 114/E Nova Ética[®];
- Balança analítica modelo AX200 Shimadzu[®];
- Banho ultrassônico Unique, modelo USC-2800A
- Centrífuga modelo BR4i Jouan[®];
- Coluna cromatográfica Hypersil phenyl-2, 150 mm de comprimento de 4,60 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 μm, Thermo Scientific®;
- Coluna cromatográfica Luna C18, 250 mm de comprimento de 4,60 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 μm, Phenomenex®;
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu composto por bomba LC-10ADVP, degaseificador DGU-14A, injetor automático de amostras SIL-10ADVP, detector DAD SPD-M10AVVP, forno de coluna CTO10AVP; Certificado de Qualificação Operacional e de Performance Nº 512/11 – HPLC Instrumentação Analítica;
- Espectrofotômetro Shimadzu[®], modelo UV-1601, munido de cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e acoplado a computador
- Fluxo laminar LFS 12, Veco Instruments[®];
- Garrafas de cultivo celular 25 e 75 cm² TPP;
- Incubadora de CO₂ Thermo, modelo Forma Series II;
- Membrana de diálise (12.000 g/mol) Sigma-Aldrich[®];
- Membranas filtrantes Sartorius de acetato de celulose com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 μm;
- Minivoltímetro Millicell ERS[®] Millipore[®];
- pHmetro Metrohm, modelo 827;

- Placa Transwell de 6 poços com inserts de policarbonato -Corning[®];
- Zetasizer 3000 Hs Malvern[®].

4. MÉTODOS

4.1. Preparo das nanopartículas de poli (*n*-butil-cianoacrilato) contendo aciclovir (PBCA-ACV)

Para a obtenção das nanopartículas de PBCA-ACV, 100 μL do monômero n-butil-cianoacrilato (10 mg/mL) foram adicionados, por gotejamento e sob agitação vigorosa (800 rpm), a uma solução aquosa de HCI 0,1M, pH 2,5, contendo 100 mg de dextran 70.000. Após 3 h de polimerização, foram adicionados volumes pré-determinados de solução de ACV (100,0 mg/mL, em HCI 0,1M, pH 2,5) de forma que a concentração de fármaco no meio reacional fosse igual a 2,5 mg/mL; 5,0 mg/mL ou 10 mg/mL. Ao final de 4 h de agitação, foram adicionados cerca de 100 μL de NaOH 0,1 M até completa neutralização da suspensão coloidal (pH 7,0 ± 0,3). Finalmente, as nanopartículas obtidas foram filtradas em membranas de acetato de celulose de porosidade igual a 0,45 μm. Para a purificação, as nanopartículas foram submetidas à centrifugação (20.000 rpm, 60 minutos, 25 °C) (XI-XAO *et al.*, 2006). O pellet obtido foi ressuspendido em água purificada, com auxílio de ultrassonificação por 15 minutos, e o pH foi ajustado para 7,0, com NaOH 0,1M.

4.2. Determinação da porcentagem de encapsulação do fármaco às nanopartículas de PBCA

Para a quantificação do ACV na formulação de nanopartículas, foi utilizado o método por espectrofotometria derivada na região do ultravioleta, previamente desenvolvido e validado (**Capítulo II**) (TAVARES *et al.*, 2012). Foram analisados o

sobrenadante e as nanopartículas purificadas obtidos no item anterior. Para a quantificação do fármaco livre, 100 µL do sobrenadante foram transferidos para balão volumétrico de 10,0 mL. Posteriormente, 10 µL de HCl 0,1 M foram adicionados e o volume foi completado com solução de metanol:acetonitrila (8:2 v/v). Essa solução foi então utilizada para leitura no espectrofotômetro. Para a determinação do ACV encapsulado, 100 µL das nanopartículas purificadas foram transferidos para balão volumétrico de 10,0 mL. Posteriormente, 10 µL de HCI 0,1M foram adicionados e o volume foi completado com solução de metanol:acetonitrila (8:2 v/v). Essa solução foi transferida para tubo tipo Falcon[®], sendo centrifugada a 10.000 rpm, por 60 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi utilizado para a leitura no espectrofotômetro. Para a determinação da concentração de fármaco nas nanopartículas, foi construída curva padrão de ACV em HCI 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v), com concentrações de ACV iguais a 5,0 µg/mL; 10,0 µg/mL; 15,0 µg/mL; 20,0 µg/mL; 40 µg/mL e 50 µg/mL. Para tanto, realizou-se a varredura no intervalo de 220-320 nm e, a partir do espectro obtido, tracaram-se as derivadas de 1ª ordem, com leituras efetuadas a 295,2 nm. As análises foram realizadas em triplicata e a porcentagem de fármaco encapsulado (PE) foi obtida por meio da Equação 9:

$$PE = \frac{[ACV] \text{ nas nanopartículas purificadas}}{[ACV] \text{ total}} \times 100$$
(Equação 9)

4.3. Revestimento das nanopartículas

Para o revestimento das nanopartículas de PBCA-ACV, 2,5 mL de uma solução de TMQ a 0,5% p/v foram transferidos para erlenmeyer e 5,0 mL da suspensão de nanopartículas de PBCA-ACV, após purificação, foram adicionados sob gotejamento e agitação de 50 rpm por 1 h. Posteriormente, as nanopartículas de PBCA-ACV revestidas com TMQ (PBCA-ACV-TMQ) foram submetidas à centrifugação (20.000 rpm, 30 minutos) para a remoção do excesso do polímero de revestimento e o volume foi completado para 7,5 mL com água purificada, com ajuste de pH para 7,0. Finalmente, a Eficiência de Revestimento (ER) foi novamente calculada conforme subitem **3.3.2, Capítulo I.** Além disso, a determinação da porcentagem de encapsulação do fármaco foi conduzida de acordo com o método apresentado no item anterior.

4.4. Determinação do diâmetro e distribuição do tamanho das nanopartículas

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho das nanopartículas foram avaliadas por meio de espectroscopia de correlação fotônica, utilizando o equipamento Zetasizer 300 Hs, conforme item **3.4**, **Capítulo I**. As medidas foram realizadas em triplicata.

4.5. Determinação do potencial zeta (ζ) das nanopartículas

As medidas para a determinação do potencial zeta das formulações foram executadas por meio da medida de mobilidade eletroforética por anemometria laser Doppler, utilizando-se o equipamento Zetasizer 3000 Hs, de acordo com o método descrito no **item 3.5**, **Capítulo I**. As medidas foram realizadas em triplicata.

4.6. Avaliação do perfil de liberação do aciclovir a partir das nanopartículas

O perfil de liberação do ACV a partir das nanopartículas (revestidas ou não) foi avaliado pelo método da difusão através da membrana de diálise (NECKEL; LEMOS-SENNA, 2005). Uma alíquota de 2,0 mL de suspensão de nanopartículas (PBCA-ACV ou PBCA-ACV-TMQ) foi transferida para o interior do saco de diálise. Após o seu fechamento, o mesmo foi introduzido em béquer contendo 200 mL de diferentes meios: Fluido Gástrico Simulado sem Enzimas (FGSE) pH 1,2 (USP, 34), Tampão Fosfato pH 7,4 ou Fluido intestinal Simulado sem Enzimas (FISE) pH 6,8 (USP, 34). O sistema foi mantido sob agitação (100 rpm) a 37 °C e, no tempo zero e após 30 minutos, 1, 2, 4, e 8 h, alíquotas de 3,0 mL do meio de liberação foram coletadas para análise e diluídas em HCl 0,1 M/MeOH:ACN (8:2, v/v). O volume de amostra retirado foi imediatamente reposto com o meio de liberação e para a análise das alíquotas foi utilizado o método por espectrofotometria derivada na região do ultravioleta, previamente desenvolvido e validado (**Capítulo II**) (TAVARES *et al.*, 2012). Para a construção da curva padrão, foram utilizadas soluções de ACV com concentrações iguais a 5,0 µg/mL; 10,0 µg/mL; 15,0 µg/mL; 20,0 µg/mL; 40 µg/mL e 50 µg/mL em HCI 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v). Para tanto, realizou-se a varredura no intervalo de 220-320 nm e, a partir do espectro obtido, traçaram-se as derivadas de 1^a ordem, com leituras efetuadas a 295,2 nm. As análises foram conduzidas em triplicata.

4.7. Estudos de permeabilidade in vitro

3.7.1. Cultivo das células Caco-2

O cultivo das células Caco-2 foi previamente descrito no **Capítulo I**, subitem **3.8.1**. Para os ensaios de permeabilidade, as células foram transferidas para placas Transwell[®] contendo 12 poços, com suporte de policarbonato de 0,4 μ m de poro e área de 1,12 cm². Nos ensaios, foi empregada suspensão de células com densidade igual a 5 × 10⁴ cel/cm².

3.7.2. Monitoramento da integridade da membrana de células Caco-2

As monocamadas formadas pelas células em cultivo foram monitoradas quanto ao valor de resistividade elétrica utilizando o minivoltímetro Millicell ERS[®] - Millipore. A determinação do valor de Resistência Elétrica Transepitelial (RET) ($\Omega \times cm^2$) foi realizada aos 10, 15 e 21 dias de cultivo e aos 30, 60, 90 e 120 minutos durante a realização do experimento de permeabilidade. Os meios utilizados apresentaram valores de pH iguais a 7,4 e 6,8.

3.7.3. Ensaio de permeabilidade

Previamente ao estudo de permeabilidade, as células foram lavadas com tampão Hank's contendo 200 mM de sais de HEPES (tampão de permeabilidade) com pH ajustado para 7,4. As células foram mantidas com este tampão por 20 minutos a 37 °C e a RET foi medida em cada membrana. Foram consideradas aptas para o início do experimento as membranas que apresentaram valor de RET acima de 200 $\Omega \times \text{cm}^2$.

Os experimentos foram iniciados com a adição da solução do fármaco livre, bem como da formulação de nanopartículas (PBCA-ACV-TMQ), na concentração de ACV igual a 8,0 µg/mL (correspondendo à concentração de nanopartículas igual a 75 µg/mL) aos compartimentos apicais (pH 6,8) das placas Transwell[®]. Além disso, foram adicionadas, também aos compartimentos apicais, as soluções dos padrões de permeabilidade: amoxicilina e metoprolol, nas concentrações iniciais de 25 µg/mL e 5 µg/mL, respectivamente. O pH do compartimento basolateral foi fixado em 7,4 e as placas foram mantidas sob agitação em agitador orbital a 37 °C (25 rpm). Foram realizadas coletas de 200 µL das amostras a partir dos compartimentos basolaterais aos 30, 60, 90 e 120 minutos. Após cada amostragem, procedeu-se à reposição de 200 µL de tampão de permeabilidade fresco, mantido a 37 °C, com a finalidade de manutenção do volume do meio no compartimento.

Os valores de Permeabilidade Aparente (*Papp*) em cm/s foram determinados de acordo com a Equação 10:

$$P app = \frac{VR}{(A \times C_0)} \times \frac{dC}{dt}$$
 (Equação 10)

Em que:

Papp = Permeabilidade Aparente

VR = Volume do compartimento receptor em cm³

A = Área do suporte permeável de cultivo celular

C₀ = Concentração inicial adicionada no compartimento doador

dC/dt = Diferencial da concentração em relação ao tempo do experimento

Os valores foram comparados estatisticamente empregando a análise de variância (ANOVA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de p < 0,05.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento e caracterização físico-química das nanopartículas

A literatura aponta que, para a encapsulação de moléculas hidrofílicas nas nanopartículas de PACA, as mesmas podem ser introduzidas após o início do processo de polimerização ou adicionadas às partículas pré-formadas. No último caso, evita-se a interferência do ingrediente ativo no processo de polimerização e o fármaco se associa às nanoestrututas por um mecanismo de adsorção (SIMEONOVA *et al.*, 2003; MAcCARRON *et al.*, 2009). Dessa forma, para o preparo das nanopartículas de PBCA-ACV, a solução do fármaco foi acrescentada ao meio reacional após 3 h do início da polimerização. Tal procedimento foi selecionado, principalmente, pelo fato de o ACV apresentar em sua estrutura química grupamentos doadores de elétrons capazes de iniciar o processo de polimerização, o que poderia comprometer sua função biológica.

A fim de avaliar a influência da concentração de ACV na eficiência de encapsulação das nanopartículas de PBCA, foram preparadas três diferentes formulações, contendo concentrações crescentes desse fármaco: 2,5 mg/mL; 5,0 mg/mL e 10 mg/mL. A curva padrão de ACV nas concentrações de 5,0 µg/mL; 10,0 µg/mL; 15,0 µg/mL; 20,0 µg/mL; 40 µg/mL e 50 µg/mL está apresentada na Figura 28 e os resultados encontrados estão disponibilizados na Tabela 12.



Figura 28 - Curva analítica para o ACV obtida a partir da medida de absorbância em 295,2 nm. Solvente: HCI 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v).

Tabela PBCA*	12-	Avaliação	da	porcentagem	de	encapsulação	do	ACV	em	nanopartículas	de

Concentração inicial de ACV (mg/mL)	PE (%)	Concentração de ACV encapsulado (mg/mL)			
2,5	56,7 ± 0.9	1,4 ± 0.03			
5,0	$63,9 \pm 2.5$	$3,2 \pm 0.16$			
10,0	36,0 ± 1.2	3,6 ± 0.12			

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

PE = porcentagem de encapsulação.

Com base nos dados apresentados, pode-se observar que a porcentagem de encapsulação (PE) é incrementada até a concentração de ACV igual a 5,0 mg/mL. Por outro lado, os resultados indicam a diminuição dessa porcentagem na concentração de 10,0 mg/mL. Isso pode sugerir que existe um limite para a encapsulação do ACV nas nanopartículas de PBCA, o que é corroborado pelos

valores de concentração de fármaco encapsulado: aproximadamente 3,2 mg/mL e 3,6 mg/mL para as concentrações iniciais de 5,0 mg/mL e 10,0 mg/mL, respectivamente (Tabela 12). Esses resultados vão ao encontro àqueles obtidos nos trabalhos de Liu e Chen (2009) e Simeonova e colegas (2009). Em ambos os casos, os autores demonstraram que a eficiência de incorporação torna-se menor à medida que a concentração de princípio ativo era incrementada, o que comprova a teoria de que a encapsulação de fármacos nas nanopartículas de PBCA é um processo saturável. Portanto, para a continuidade dos experimentos a concentração de ACV adicionada às nanopartículas foi igual a 5,0 mg/mL.

Diversos trabalhos publicados na literatura trazem como resultado, porcentagens de encapsulação superiores a 70% (DAMGÉ *et al.*, 1998; SULLIVAN; BIRKINSHAW, 2004; XI-XAO *et al.*, 2006; SIMEONOVA *et al.*, 2009) quando da preparação de nanopartículas de PBCA contendo diferentes princípios ativos. Esse parâmetro depende, obviamente, do tipo de fármaco, bem como do processo produtivo empregado no preparo das nanopartículas. Em nosso trabalho, essa porcentagem foi de, aproximadamente, 64% quando da utilização da concentração inicial de aciclovir igual a 5,0 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 ACV encontra-se prioritariamente na forma ionizada (pKa de protonação do fármaco = 2,27). Assim, esse fator faz com que o fármaco tenha uma maior afinidade pelo meio aquoso externo em detrimento às nanopartículas.

adsortiva das nanopartículas torna-se maior quando o fármaco encontra-se em sua forma não-ionizada.

Os resultados referentes ao diâmetro, distribuição de tamanho e potencial zeta das nanopartículas de PBCA-ACV estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Determinação do diâmetro, distribuição de tamanho e Potencial zeta das nanopartículas de PBCA-ACV*

Diâmetro (nm)	Indice de polidispersão (IP)	Potencial Zeta (mV)
187,4 ± 3,3	$0,180 \pm 0,24$	- 3,75 ± 2,0

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

Por meio da análise dos dados, percebe-se uma ligeira diferença em relação aos parâmetros obtidos para as nanopartículas de PBCA desenvolvidas nesse trabalho (**Tabela 1**, **Capítulo I** - diâmetro = $175,1 \pm 3,9$; IP = $0,136 \pm 0,04$; Potencial zeta = $-11,7 \pm 1,34$). Em relação ao diâmetro, um maior valor foi observado para as nanopartículas de PBCA-ACV. Tal aumento pode significar o primeiro indício da associação do fármaco às nanopartículas. A esse respeito, os trabalhos publicados por diferentes grupos de pesquisa mostram-se controversos e essa observação parece depender do tipo de fármaco em estudo (SULLIVAN; BIRKINSHAW, 2004), bem como do processo de preparação das nanopartículas (REDDY; MURTHY, 2004).

A respeito do potencial zeta, foi observado que, após a incorporação do fármaco, esse valor se tornou menos negativo (Tabela 13). Explicamos essa constatação a partir das constantes de ionização do ACV: esse fármaco

apresenta, como mencionado, dois valores de pKa: 2,27 para a protonação e 9,25 para a desprotonação (ATTIA *et al.*, 2007). Assim, encontra-se carregado positivamente em pH ácido, negativamente carregado em pH básico e nãoionizado nos valores de pH próximos à neutralidade (CAMILO, 2007). Dessa forma, e considerando que o pH da formulação de nanopartículas é igual a 7,0, pode-se concluir que nessa condição o ACV esteja em maior proporção na forma não-ionizada. Portanto, o menor valor do potencial zeta pode ser reflexo da não ionização do fármaco, o qual se encontra, em parte, adsorvido à superfície das nanopartículas.

O revestimento das nanopartículas de PBCA-ACV foi realizado a partir de solução de TMQ a 0,5% p/v já que, como descrito, tal revestimento foi alcançado de modo satisfatório a partir dessa concentração. Na Tabela 14 estão representados os dados referentes à caracterização do sistema revestido (nanopartículas de PBCA-ACV-TMQ), em relação ao diâmetro, distribuição de tamanho e potencial zeta.

Tabe	la 14	l —	Deter	minaçã	o de	o diá	àmetr	о,	distribuiç	ăo de	e tamanho	е	Potencial	zeta	das
nano	partío	cula	s de F	BCA-A	CV-	ТМС)*		-						
					,										

Diâmetro (nm)	Índice de polidispersão (IP)	Potencial Zeta (mV)				
$308,4 \pm 3,6$	0,283 ± 0,147	+36,1 ± 1,8				

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

Observando o valor encontrado para o diâmetro das nanopartículas de PBCA-ACV-TMQ, notamos um pequeno aumento dessa grandeza em relação ao

resultado obtido para as nanopartículas de PBCA-TMQ (296,2 ± 4,6 - Tabela 2, Capítulo I). Tal aumento pode ser atribuído, como descrito anteriormente, à contribuição do ACV encapsulado nas nanopartículas. Ao examinarmos o potencial zeta obtido para as nanopartículas de PBCA-ACV-TMQ, percebemos que o valor encontrado é bastante semelhante ao determinado para as nanopartículas de PBCA-TMQ: + 36,5 ± 2,7 (Tabela 2, Capítulo I). Essa inversão de valores em relação às nanopartículas de PBCA-ACV (Tabela 13) indica a ocorrência do recobrimento das partículas pelo derivado da quitosana e, como já postulado, pode contribuir positivamente na estabilidade da formulação (CAO et al., 2009). Considerando ainda esse resultado, sugerimos que o revestimento foi alcançado, em menor grau, por meio de interações eletrostáticas entre o polímero e as nanopartículas, já que as mesmas apresentam carga elétrica próxima à neutralidade. Possivelmente, o enredamento das cadeias poliméricas, bem como a ocorrência de interações químicas entre a TMQ e o polímero formador das nanoestruturas foram os grandes responsáveis pela formação da estrutura nuclear revestida.

Com o objetivo de investigar se a presença do ACV influenciaria nos valores de Eficiência de Revestimento (ER), reconduzimos esse experimento para as nanopartículas de PBCA-ACV-TMQ. O resultado obtido, $84,2 \pm 4,4\%$ foi similar àquele encontrado para as nanopartículas de PBCA-TMQ ($85 \pm 5,6\%$ - **Figura 14**, **Capítulo I**) e mostrou que o revestimento é eficazmente alcançado mesmo em presença do fármaco. Por outro lado, a porcentagem de ACV encapsulado nas nanopartículas revestidas foi avaliada, e o valor de $42,2 \pm 5,6\%$ (equivalente a 2,1 \pm 0,28 mg/mL de fármaco encapsulado) foi obtido. Esse resultado mostra-se

menor quando em comparação ao encontrado nas nanopartículas de PBCA-ACV ($63,9 \pm 2,5 \%$, o que equivale a cerca de 3,2 mg/mL de ACV) (Tabela 12). Para explicar tal fato, nossa teoria é a de que, no momento do revestimento, as moléculas de TMQ provocam o deslocamento de parte do fármaco presente na superfície das nanopartículas para o meio externo, diminuindo, por conseguinte, a quantidade de ACV incorporado. De fato, ao quantificarmos o sobrenadante obtido após o revestimento das nanopartículas, encontramos 1,0 \pm 0,03 mg/mL de fármaco, o que representa a quantidade aproximada de ACV deslocada das nanopartpiculas. Resultado semelhante foi obtido por Prego e colaboradores (2006), quando do revestimento de nanocápsulas contendo calcitonina com quitosana peguilada. No entanto, os dados obtidos nesse estudo mostraram que houve uma diminuição de aproximadamente 46% na porcentagem de encapsulação do fármaco. No presente trabalho, essa perda foi de 21,7%.

Para a avaliação do perfil de liberação do fármaco a partir das nanopartículas, bem como para investigar a influência do revestimento nesse parâmetro, as formulações (PBCA-ACV e PBCA-ACV-TMQ) foram submetidas a diferentes meios de dissolução, capazes de simular os fluidos biológicos (valores de pH iguais a 1,2; 6,8 e 7,4). Para tanto, foi utilizado o método de diálise e as alíquotas foram coletas, no meio receptor, nos primeiros 30 minutos e em intervalos de tempo pré-determinados por um período de 8 horas. Para a quantificação do ACV liberado, foi construída curva analítica nas concentrações de fármaco iguais a 5,0 µg/mL; 10,0 µg/mL; 15,0 µg/mL; 20,0 µg/mL; 40 µg/mL e 50 µg/mL, em HCI 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v) (Figura 29). Os resultados obtidos na

análise da liberação de ACV nas nanoparticulas de PBCA e PBCA-TMQ estão representados nas Figuras 30 e 31, respectivamente.



Figura 29 - Curva analítica para o ACV obtida a partir da medida de absorbância em 295,2 nm. Solvente: HCI 0,1M/MeOH:ACN (8:2, v/v).



Figura 30 - Perfil de liberação do ACV encapsulado em nanopartículas de PBCA em diferentes meios de dissolução. Os resultados são expressos como a média de 3 determinações e as barras representam o desvio padrão.

154

A literatura descreve que o método de encapsulação e, consequentemente, a distribuição do princípio ativo na estrutura matricial das nanopartículas de PACA determina, em grande parte, o perfil de liberação do mesmo. De forma que, nos casos em que o fármaco é adicionado ao meio reacional após a formação das partículas e, portanto, se encontra em maior proporção adsorvido à superfície das mesmas, a liberação é geralmente rápida e controlada pelos mecanismos de desorção e difusão do fármaco em direção ao meio externo. Por outro lado, quando da introdução do fármaco durante o processo de polimerização, este permanece encapsulado mais internamente e, dessa forma, a liberação do ativo se dá de forma sustentada. Nesse caso, a liberação ocorre em função da degradação da nanopartícula e/ou por meio da difusão do fármaco através da parede polimérica das nanoestruturas (VAUTHIER et al., 2007; GRAF et al., 2009). Além disso, outra teoria foi sugerida no trabalho de Liu e Chen guando da avaliação da liberação in vitro (pH 2,0) da indometacina (IDC) a partir de nanopartículas de PBCA. Nesse estudo, os autores observaram que o fármaco era liberado de acordo com um perfil bifásico: inicialmente, houve a rápida liberação do mesmo, o que foi atribuído á IDC adsorvida à superfície das nanopartículas. Em um segundo momento, o ativo foi liberado mais lentamente, comportamento que foi explicado pela presença de IDC em regiões mais profundas da matriz polimérica.

Muito embora o método empregado no presente trabalho proporcione a distribuição do fármaco principalmente na superfície externa das partículas, ao analisar os resultados obtidos para a liberação do ACV a partir das nanopartículas de PBCA nos diferentes meios, observamos um perfil semelhante ao descrito no

estudo apresentado por Liu e Chen. Dessa forma, para explicar o comportamento de liberação do fármaco, é possível afirmar que este esteja localizado, sobretudo, na parte externa das partículas, mas também no interior dos poros mais profundos dessas estruturas. Quando da preparação das nanopartículas de PBCA-ACV, após a introdução do fármaco ao meio de reação, a agitação foi mantida por 1 h adicional antes da interrupção da polimerização. Assim, possivelmente durante esse tempo, o fármaco foi capaz de se distribuir um pouco mais internamente na estrutura matricial das partículas.

Nesse cenário, observando o comportamento do ACV nos diferentes meios, pode ser constatada uma rápida liberação do mesmo (mais de 60% do fármaco liberado nas 2 primeiras horas), seguida por um período onde a liberação se tornou mais lenta. Sendo que, ao final de 8 h, no mínimo 90% do fármaco se encontra dissolvido, independente do meio receptor (Figura 30). Por outro lado, é interessante observar que a liberação se deu de modo mais rápido quando da exposição das nanopartículas de PBCA-ACV em Fluido Gástrico Simulado sem Enzimas (FGSE, pH 1,2) em detrimento aos demais meios (Figura 30). Essa explicação pode estar baseada na capacidade de ionização do ACV em meio ácido, o que o torna mais solúvel e, portanto, a difusão desse antiviral em direção ao FGSE é facilitada.

Analisando os resultados encontrados para as nanopartículas de PBCA-ACV-TMQ, pode ser observado que o perfil de liberação do fármaco se apresenta diferente daquele observado para as nanopartículas de PBCA-ACV e parece ser influenciado pelo polímero de revestimento (Figura 31).



Figura 31 - Perfil de liberação do ACV encapsulado em nanopartículas de PBCA-TMQ em diferentes meios de dissolução. Os resultados são expressos como a média de 3 determinações e as barras representam o desvio padrão.

Nesse caso, a liberação do ACV a partir das nanopartículas mostrou-se mais lenta, independentemente do meio utilizado. É possível que essa característica de liberação prolongada seja devido ao "efeito barreira" proporcionado pela TMQ, o qual limita a liberação do fármaco, controlando sua difusão. Com isso, apenas cerca de 60% da concentração inicial do ativo foi gradualmente dissolvida nos fluidos simulados durante o tempo de 8 horas (Figura 31). Esses resultados estão de acordo com estudos publicados, os quais demonstraram a capacidade da TMQ, sob a forma de nanopartículas, em controlar a liberação de fármacos *in vitro* (AMIDI *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2007; YIN *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2012; GUAN *et al.*, 2012; FOLMANN *et al.*, 2012).

Por outro lado, e como esperado, foi observado que a liberação se deu de modo mais rápido quando as nanopartículas foram expostas em Fluido Gástrico Simulado. Além disso, desde que a liberação do fármaco possa estar atrelada à degradação das nanopartículas, pode-se ainda supor que o revestimento seja capaz de retardar esse fenômeno, o que diminuiria a cedência de ACV para o meio externo e culminaria no perfil de liberação obtido na Figura 31.

O comportamento observado para as nanopartículas revestidas, sobretudo em pH 7,4, pode ser considerado interessante para fármacos que apresentem problemas de biodisponibilidade oral tal como o aciclovir, já que essa formulação poderia manter a concentração plasmática do fármaco por longos períodos, com redução da dose e/ou frequência de administração, aumentando. consequentemente, a adesão do tratamento por parte do paciente. Por outro lado, pode ser sugerido que a baixa cedência do ACV nos fluidos simulados do TGI poderia garantir que o nanosistema, em caso de sua absorção, alcançasse a circulação sistêmica com quantidade satisfatória de fármaco. Essa teoria merece ser destacada uma vez que, de acordo com a literatura, o grande ideal é desenvolver partículas que permaneçam intactas ao longo do trato digestório e, forma, possam ser consideradas verdadeiros nanovetores, com dessa propriedades semelhantes àqueles administrados pela via intravenosa (ROGER et al., 2010).

5.2. Estudos de permeabilidade in vitro

O intuito principal do presente trabalho foi o de obter um sistema capaz de controlar a liberação de fármacos, bem como incrementar sua permeabilidade intestinal. Nesse último caso, teorizamos que, a partir do revestimento das
nanopartículas desenvolvidas com o derivado quaternizado da quitosana, poderíamos alcançar a capacidade promotora de absorção desejada para a formulação. A TMQ foi escolhida com base no relato da literatura de que esse polímero catiônico é capaz de abrir, de modo reversível, as junções oclusivas presentes entre as células epiteliais do intestino, incrementando, dessa forma, a permeabilidade paracelular de ativos macromoleculares e/ou hidrofílicos (SAHNI *et al.*, 2008; WERLE *et al.*, 2009). Por outro lado, a TMQ constitui um polieletrólito catiônico em toda a escala de pH e, dessa forma, apresenta maior solubilidade nos meios neutro e básico quando em comparação à quitosana, mostrando-se mais útil para o propósito em questão (SADEGHI *et al.*, 2008).

Com a finalidade de avaliar a eficácia da formulação desenvolvida, ensaios de permeabilidade *in vitro* foram conduzidos por meio do emprego de células Caco-2, as quais, como já descrito, vêm sendo amplamente utilizadas como ferramenta de triagem nos estágios iniciais de desenvolvimento de novos fármacos e/ou sistemas de liberação (BALIMANE; CHONG, 2005). Dessa forma, nanopartículas de PBCA carregadas com ACV foram preparadas e posteriormente revestidas com o derivado da quitosana sintetizado. Assim, por meio dos ensaios com as células Caco-2, pode-se corroborar a influência da formulação na Resistência Elétrica Transepitelial (RET) dessas células, além de avaliar os efeitos das nanopartículas nos valores de Permeabilidade Aparente (P*app*) para o fármaco modelo.

Em um primeiro momento, a integridade das membranas formadas pelas células Caco-2 cultivadas no suporte de realização dos estudos de permeabilidade

foi avaliada por meio das medidas de RET. Os resultados encontrados são mostrados na Figura 32.



Figura 32 – Valores de Resistência Elétrica Transepitelial (RET) obtidos com as membranas de células Caco-2 aos 10, 15 e 21 dias de cultivo em meio com pH 7,4. Os resultados são expressos como média de 3 determinações e as barras representam o desvio padrão.

A avaliação da RET durante o cultivo celular demonstrou um aumento dos valores em função do tempo, até a manutenção de um valor estável entre o 15° e o 21° dias de formação das membranas (590 a 640 $\Omega \times \text{cm}^2$). Com base nos valores obtidos, pode-se considerar que a monocamada formada apresentam adequada integridade, ocorrendo, como esperado, formação do complexo juncional intercelular (FERNANDES, 2012). Valores similares obtidos para esse parâmetro encontram-se publicados na literatura (BEHRENS; KISSEL, 2003; SCHIMIDT *et al.*, 2007).

A determinação dos valores de permeabilidade para compostos cujos dados de P*app* já sejam conhecidos, constitui uma maneira alternativa para avaliar a integridade e viabilidade das membranas durante a realização dos ensaios. Vários fármacos são utilizados para essa finalidade, destacando-se o manitol, a digoxina, a cimetidina e a fluoresceína. No entanto, foram utilizados em nosso trabalho os compostos amoxicilina e metoprolol, os quais são classificados como padrões de baixa e alta permeabilidade, respectivamente. A escolha de tais padrões é justificada uma vez que os mesmos estão inseridos na lista de recomendações do guia da agência regulatória norte-americana (*Food and Drug Administration – FDA*), que dispõe sobre bioisenções (UNITED STATES, 2000; FERNANDES, 2012). Além disso, métodos analíticos para a quantificação desses compostos nos ensaios de permeabilidade já haviam sido previamente validados pelo Laboratório de Permeabilidade de Fármacos em Culturas Celulares (LPFCC).

As Figuras 33 e 34 representam a quantidade permeada, no sentido apicalbasolateral (A-B), em função do tempo para os padrões de baixa e alta permeabilidade, respectivamente.



Figura 33 – Quantidade permeada de amoxicilina (ng/mL) através das membranas das células Caco-2 em função do tempo. Os resultados são expressos como a média de 3 determinações e as barras representam o desvio padrão.



Figura 34 – Quantidade permeada de metoprolol (ng/mL) através das membranas das células Caco-2 em função do tempo. Os resultados são expressos como a média de 3 determinações e as barras representam o desvio padrão.

A partir dos dados de quantidade permeada, os valores de Papp para esses padrões foram calculados, obtendo-se os valors de $0,72 \times 10^{-6}$ cm/s para a

162

amoxicilina e 26,81 × 10^{-6} cm/s para o metoprolol (Tabela 15). Tais valores são concordantes com aqueles obtidos em estudos da literatura, indicando adequação das condições de cultivo das células Caco-2 e confiabilidade em relação aos resultados obtidos para o aciclovir (SUN *et al.*, 2002; MASUNGI *et al.*, 2004; TEKSIN *et al.*, 2010; FERNANDES, 2012).

Como já mencionado, a avaliação da RET como indicativo da integridade da membrana formada pelas células Caco-2 é bastante difundida na literatura, tendo sido obtidas significativas correlações entre os valores de resistência elétrica e a permeabilidade de compostos absorvidos pela via paracelular. Portanto, foram acompanhados os valores para esse parâmetro durante o tempo de realização do experimento. Os resultados obtidos para os compartimentos contendo ACV, bem como para as nanopartículas de PBCA-ACV-TMQ, aos 30, 60, 90 e 120 minutos, estão representados na Figura 35. Para a análise dos dados, foi considerada a média do valor inicial de resistividade em pH 6,8: 612 ± $5,6 \Omega \times cm^2$, $624 \pm 8,1 \Omega \times cm^2$ e $618 \pm 7,9 \Omega \times cm^2$, respectivamente, para o grupo controle (Células Caco-2), bem como para os poços contendo ACV e PBCA-ACV-TMQ.



Figura 35 – Valores de Resistência Elétrica Transepitelial (RET) obtidos com as membranas de células Caco-2 nas condições dos experimentos de permeabilidade. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão de três medidas (n = 3). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de p < 0,05.

Analisando os dados encontrados, observa-se claramente o efeito da formulação no abaixamento da RET da monocamada de células Caco-2. Tal efeito apresenta perfil semelhante ao obtido para as nanopartículas de PBCA-TMQ (**Figura 19, Capítulo I**) e está amplamente comprovado em estudos da literatura (KOTZÉ *et al.*, 1999; THANOU *et al.*, 2000; FLOREA *et al.*, 2006; SADEGHI *et al.*, 2008; MI *et al.*, 2008; TAFAGHODI *et al.*, 2012). Comparativamente aos valores de RET encontrados nos compartimentos contendo o grupo controle, essa diminuição mostrou-se estatisticamente significativa (p<0,05) a partir de 90 minutos. Dessa forma, foi observada diminuição de 29% e 35% após 90 e 120 minutos, respectivamente. Tais resultados podem sugerir a indução da abertura das junções oclusiva. A partir dos valores obtidos nos compartimentos contendo ACV, pôde-se perceber que durante todo o experimento, a RET das membranas

de células Caco-2 não foi alterada significativamente em comparação ao grupo controle, o que pode refletir a baixa toxicidade desse antiviral na concentração empregada (8,0 µg/mL)

Após administração oral, o ACV apresenta absorção lenta, dosedependente, altamente variável e incompleta, com biodisponibilidade variando entre 15-30% (CORTESI, ESPOSITO, 2008) e tempo de meia-vida biológica de 1,5-2 horas (JUNYAPRASERT, PORNSUWANNAPHA, 2008). A principal justificativa para a baixa biodisponibilidade desse antiviral (logP: ~0,0023) está relacionada à limitada permeabilidade intestinal, uma vez que o mesmo é transportado via difusão passiva através da rota paracelular. Por essa razão, é classificado como sendo da classe III segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). A Figura 36 representa a quantidade permeada de ACV, no sentido A-B, em função do tempo através das membranas de células Caco-2. A partir dos dados obtidos, foi calculado o valor de *Papp* para esse fármaco, cujo resultado foi igual a $0.39 \pm 0.05 \ 10^{-6}$ cm/s (Tabela 15).



Figura 36 – Quantidade permeada de aciclovir (ng/mL) através das membranas das células Caco-2 em função do tempo. Os resultados são expressos como a média de 3 determinações e as barras representam o desvio padrão.

No estudo de Shah e colaboradores (2008), os autores determinaram a permeabilidade do ACV em células Caco-2, no sentido A-B, obtendo resultado igual a $0.352 \pm 0.07 \times 10^{-6}$ cm/s. Tal valor reforça a baixa permeabilidade desse antiviral e pode suportar o dado obtido em nosso trabalho $(0,39 \pm 0.05 \times 10^{-6} \text{ cm/s})$ (Tabela 15). Dessa forma, sistemas de liberação capazes de incrementar a intestinal desse fármaco poderiam permeação levar ao aumento na biodisponibilidade oral do mesmo. Por essa razão, tal fármaco foi introduzido em nanopartículas de PBCA revestidas com TMQ e, visando confirmar a eficácia de tal formulação, avaliamos o possível incremento na permeabilidade do ACV por parte da formulação desenvolvida. Os resultados obtidos estão disponíveis na Figura 37, bem como na Tabela 15.



Figura 37 – Quantidade permeada de aciclovir em nanopartículas de PBCA-TMQ (ng/mL) através das membranas das células Caco-2 em função do tempo. Os resultados são expressos como a média de 3 determinações e as barras representam o desvio padrão.

Tabela 15 – Valores de P*app* para os compostos amoxicilina, metoprolol, aciclovir, bem como para o aciclovir em nanopartículas de PBCA-TMQ determinados a partir da quantidade permeada através de monocamadas de células Caco-2.

Composto	P <i>app</i> (10 ⁻⁶ cm/s)*
amoxicilina	0,72 ± 0,16
metoprolol	26,81 ± 2,12
aciclovir	$0,39 \pm 0,05$
aciclovir nanoestruturado	$1,27 \pm 0,60$

*Os valores são expressos como média ± desvio padrão

Analisando os dados referentes à quantidade de aciclovir permeada, observa-se que nos 30 minutos iniciais, esse processo foi comparável àquele encontrado para o fármaco livre (Figura 36). De acordo com os ensaios de liberação *in vitro*, em pH 6,8 existe uma pequena quantidade de fármaco liberado nos primeiros 30 minutos. Talvez, essa quantidade de ACV liberada possa iniciar o processo de permeação típico desse fármaco através da rota paracelular e, por isso, o perfil se mostre semelhante ao do fármaco não encapsulado.

Além disso, pôde-se notar claramente um incremento significativo na permeabilidade do fármaco a partir de 60 minutos, o qual se torna substancial a partir de 90 minutos de experimento (Figura 37). No entanto, foi surpreendente o aumento nos valores de ACV permeado no tempo de 60 minutos, uma vez que o esperado era que esse aumento estivesse atrelado à redução da RET proporcionada pela formulação em estudo, a partir de 90 minutos (Figura 35). No caso da formulação revestida, em 60 minutos, houve o aumento de aproximadamente 1,7 vezes na quantidade de fármaco permeado quando em comparação à permeação do ACV isoladamente (Figura 36). Essa observação pode ser explicada a partir de dados da literatura os quais sugerem que o transporte ativo através das células pode ser utilizado, e se mostra adequado, para a absorção de nanoestruturas (BAYDEN et al., 2005; des RIEUX et al., 2006; DAMGE et al., 2008; ROGER et al., 2010; PLAPIED et al., 2011). Dessa forma, pressupõe-se que, a partir dos 60 minutos iniciais, o transporte das nanoestruturas contendo aciclovir se dê, adicionalmente por transporte ativo. Essa teoria seria capaz de explicar o aumento da quantidade permeada de ACV na formulação de nanopartículas em comparação ao fármaco livre. Apesar da característica de bioadesividade menos intensa quando em comparação à quitosana, existem relatos de que o aumento no grau de quaternização da TMQ mostra-se favorável à mucoadesão. Tal característica pode resultar em um maior contato entre as nanopartículas revestidas e a membrana de células Caco-2, oferecendo uma maior probabilidade de internalização das mesmas (SAHNI *et al.*, 2008; YIN *et al.*, 2009). Portanto, esse fato poderia reforçar a explicação referente ao aumento da quantidade de ACV permeada no tempo de 60 minutos, já que nesse trabalho foi sintetizado um derivado altamente quaternizado (~73%).

Em uma ampla gama de estudos in vitro utilizando células Caco-2, foi observado um aumento na permeabilidade de diferentes compostos por meio da associação dos mesmos com a TMQ. Nesses trabalhos, foi comprovada a relação entre a redução da RET da monocamada de células e o incremento da permeação paracelular das moléculas em estudo (KOTZÉ et al., 1999; THANOU et al., 2000; FLOREA et al., 2006; CHEN et al., 2008; YIN et al., 2009; SANDRI et al., 2010; GUAN et al., 2012). Nessa mesma perspectiva, resultados semelhantes foram obtidos em nosso trabalho. Por meio dos dados apresentados na Figura 35, observou-se que a formulação em estudo foi capaz de diminuir a resistividade das células Caco-2. Sendo essa diminuição estatisticamente significativa a partir de 90 minutos de experimentos. Ao analisarmos os resultados da quantidade de ACV permeada a partir das nanopartículas revestidas (Figura 37), pôde-se observar que a quantidade de fármaco no compartimento basolateral mostrou-se cerca de 3 vezes maior que aquela encontrada para o antiviral livre (Figura 36). Esse resultado pode indicar a correlação entre a abertura das junções oclusivas e o aumento na permeabilidade do ACV, proporcionados pelas nanopartículas de

PBCA-ACV-TMQ. Comparando os valores de ACV permeado no tempo final do experimento, 120 minutos, foi observada similaridade em relação ao incremento na absorção do fármaco: a formulação revestida proporcionou incremento de 3,2 vezes na quantidade do antiviral permeado. Essa observação é compatível com o observado na Figura 35 e corrobora a proporcionalidade entre o abaixamento da RET e o aumento na quantidade de fármaco no compartimento basolateral. É interessante notar que ao longo do experimento de permeabilidade a quantidade de ACV permeada acumulada no compartimento basolateral foi incrementada de forma diferente nos intervalos de tempo de 0 a 60 minutos e entre 90 a 120 minutos. Em até 60 minutos, como já dito anteriormente, pressupõe-se que o aumento dessa quantidade seja por efeito da captação das nanoestruturas por transporte ativo. Após os 90 minutos, o incremento da quantidade permeada acumulada ocorre por associação dos mecanismos de transporte ativo e abertura das junções oclusivas, o que refletiu em uma maior inclinação da reta na porção terminal do experimento.

Com a finalidade de avaliar a recuperação da resistividade, após o período de 120 minutos, as soluções foram cuidadosamente aspiradas e os compartimentos apicais e basolaterais foram lavados por três vezes com meio DMEM sem fenol. Em seguida, foi adicionado meio fresco a ambos os compartimentos e as células foram incubadas por 24 h. Após esse período, a RET foi novamente medida visando verificar a recuperação dos valores. Como resultado, foi encontrado um valor médio de resistividade igual a 507,6 ± 4,7 $\Omega \times cm^2$ para as células incubadas com as nanopartículas de PBCA-ACV-TMQ, o que

equivaleria à aproximadamente 83% da resistividade medida previamente ao experimento de permeabilidade. Já para as células utilizadas como controle, esse valor foi de 552,8 $\Omega \times \text{cm}^2$. Tais valores indicam a recuperação da RET após a retirada das amostras em estudo e sugerem que a formulação foi capaz de induzir a abertura transitória das junções oclusivas, sem exercer efeitos tóxicos agudos na concentração estudada. Esses dados estão concordantes com estudos da literatura (THANOU *et al.*, 1999; THANOU *et al.*, 2000; JONKER *et al.*, 2002; SAHNI *et al.*, 2008; MOURYA; INAMDAR, 2009) e confirmam os resultados obtidos anteriormente para as nanopartículas de PBCA-TMQ (**Capítulo I**).

Por fim, analisando os dados disponibilizados na Tabela 15, foi obtido um aumento de aproximadamente 3 vezes nos valores de P*app* para o fármaco em estudo: $0,39 \pm 0,05$ para o ACV livre e $1,27 \pm 0,60$ para o fármaco nanoestruturado. Foi verificada, assim, a capacidade promotora de permeação da formulação desenvolvida. O aumento observado possibilitou a alteração do enquadramento do aciclovir (baixa permeabilidade) como sendo um fármaco de moderara permeabilidade, segundo Yee (1997). Este pesquisador correlacionou os valores de permeabilidade aparente de acordo com a fração absorvida, sendo que um fármaco pode ser considerado pouco absorvido (0 – 20%) quando o valor de *Papp* for menor que 1 x 10^{-6} cm/s, moderadamente absorvido (20 – 70%) quando o valor de *Papp* for maior que 10×10^{-6} cm/s (YEE, 1997).

Pelo que foi discutido, os resultados de incremento da permeabilidade, aliado ao comportamento observado em relação à liberação *in vitro* do fármaco

(Figura 31) faz com que as nanopartículas de PBCA-TMQ possam ser consideradas promissores sistemas de liberação de princípios ativos pela via oral.

6. CONCLUSÕES

- Os resultados referentes à porcentagem de encapsulação do ACV nas nanopartículas de PBCA indicam que existe um limite para a encapsulação do fármaco. De modo que a eficiência de incorporação tornou-se menor na medida em que a concentração de princípio ativo foi incrementada. Como resultado, foram obtidos aproximadamente 64% de encapsulação do ativo na formulação desenvolvida;
- O diâmetro, bem como o potencial zeta das nanoparticulas de PBCA-ACV apresentaram diferenças em relação às nanopartículas de PBCA. Dessa forma, o ligeiro aumento no diâmetro e uma diminuição nos valores de potencial zeta foram considerados indícios da encapsulação do fármaco;
- As partículas foram eficientemente recobertas pelo derivado da quitosana (ER = 84%), sendo a inversão do potencial zeta para valores mais positivos a constatação de tal revestimento;
- Após o revestimento das nanopartículas de PBCA-ACV com o polímero catiônico, houve uma diminuição significativa na porcentagem de fármaco encapsulado. Muito provavelmente, as moléculas de TMQ provocaram o deslocamento de parte do fármaco presente na superfície externa das

nanopartículas para o meio externo, diminuindo, por conseguinte, a quantidade de ACV incorporado;

- Os resultados obtidos para a liberação do ACV a partir das nanopartículas de PBCA nos diferentes meios indicam uma rápida liberação do mesmo nas duas primeiras horas, seguida por um período onde a liberação se tornou mais lenta. Essa observação sugere que o fármaco esteja localizado prioritariamente na superfície das partículas;
- A liberação do fármaco a partir das nanopartículas revestidas mostrou-se mais lenta, independentemente do meio utilizado. É provável que essa característica de liberação prolongada seja devido ao "efeito barreira" proporcionado pela TMQ, o qual limitaria a liberação do fármaco, influenciando em sua difusão; Dessa forma, foi possível desenvolver um sistema capaz de garantir a liberação controlada do ACV.
- Foi observado um aumento de aproximadamente 3 vezes nos valores de Papp para o fármaco em estudo, o que comprova, portanto, a capacidade promotora de absorção da formulação desenvolvida. Esse aumento na permeabilidade ocorreu, principalmente, por meio da abertura transitória das junções oclusivas.

Referências bibiográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUBAKAR, M.; COUVREUR, P.; PINTO-ALPHANDARY, P.; GOURITIN, B.; LACOUR, B.; FARINOTTI, R.; PUISIEUX, F.; VAUTHIER, C. Insulin-loaded nanocapsules for oral administration: in vitro and in vivo investigation. **Drug Delivery Research**, v. 49, p. 109–117, 2000.

ABREU, L.R.P.; ORTIZ, R.A.M. CASTRO, S.C.; PEDRAZZOLI JR, J. HPLC determination of amoxicillin comparative bioavailability in healthy volunteers after a single dose administration. **J Pharm Pharmaceut Sci**., v. 6, n. 2, p. 223-230, 2003.

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.

ARIAS, J.L.; RUIZ, M.A.; VIOTA, M. L.; DELGADO, A.V. Poly(alkylcyanoacrylate) colloidal particles as vehicles for antitumour drug delivery: A comparative study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n.62, p.64–70, 2008.

ARTURSSON, P.; LINDMARK, T.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). **Pharmaceutical Research**, v. 11, p. 1358–1361, 1994.

ATTIA I.A.; EL-GIZAWY S.A.; FOUDA M.A.; DONIA A.M. Influence of a Niosomal Formulation on the Oral Bioavailability of Acyclovir in Rabbits. *AAPS PharmSciTech.* 8(4),2007.

AVADI, M,R., SADEGHI, A.M.M., ERFAN,M., MOEZI, L., DEHPOUR, A.R., YOUNESSI, P., RAFIEE-TEHRANI, M., SHAFIEE, A. N,N,Diethyl N-methylchitosan as an enhancing agent for colon drug delivery, **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, 19, 421–433, 2004.

AVADI, M.R., ZOHOURIAN-MEHR, M.J., YOUNESSI, P., AMINI, M.,RAFIEE-TEHRANI, M., SHAFIEE, A. Optimized synthesis and characterization of n-triethyl chitosan, **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, 18 469–480, 2003.

BAL, S.M.; SLÜTTER, B.; VAN RIET, E.; KRUITHOF, A.C.; DING, Z.; KERSTEN, G.F.A.; JISKOOT, W.; BOUWSTRA, J.A. Efficient induction of immune responses through intradermal vaccination with N-trimethyl chitosan containing antigen formulations. **Journal of Controlled Release**, v.142, p.374–383, 2010.

BALIMANE, P.V.; CHONG, G.S. Cell culture based models for intestinal permeability: a critique. **Drug Discovery Today**. v. 10, n. 5, p. 335-343, 2005.

BARBOZA, F. M.; DALLA VECCHIA, D.; PEREIRA, A.V.; STULZER, H.K.; SILVA, M. A. S. Desenvolvimento e validação de um método analítico simples e rápido por espectroscopia UV para quantificação de aciclovir em matrizes hidrofílicas de liberação prolongada. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 747-749, 2010.

BAYAT, A., SADEGHI, A.M.M., AVADI, M.R., AMINI, M., RAFIEE-TEHRANI, M., SHAFIEE, A., JUNGINGER, H.E. Synthesis of N–N dimethyl N-ethyl chitosan as a carrier for oral delivery of peptide drugs, **Journal of Bioactive and Compatible Polymers** 21 (2006) 433–444.

BAYDEN, D. J.; JEPSON, M. A.; BAIRD, A. W. Intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting. **Drug Discovery Today**, v.10, p.1145-1157, 2005.

BAZILE, D.; PRUD'HOMME, C.; BASSOULLET, M.T.; MARLARD, M.; SPENLEHAUER, G.; VEILLARD, M. Stealth MePEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.84, p. 493–498, 1995.

BEHAN N, BIRKINSHAW C, CLARKE N. Poly n-butyl cyanoacrylate nanoparticles: a mechanistic study of polymerisation and particle formation.. **Biomaterials**. 22(11):1335-44, 2001.

BEHRENS, I.; KISSEL, T. Do cell culture conditions influence the carrier-mediated transport of peptides in Caco-2 cell monolayers?. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 19, p. 433-442, 2003.

BEHRENS, I.; PENA, A.I.; ALONSO, M.J.; KISSEL, T. Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle adsorption and transport. **Pharmaceutical Research**, v.19, p. 1185-1193, 2002.

BELLAMY, W.T. Prediction of response to drug therapy of cancer. A review of in vitro assays. **Drugs**, v. 15, n. 5, p. 690-708, 1992.

BELOQUI, A.; SOLINÍS, M.A.; GASCÓN, A.R.; POZO-RODRIGUEZ, A.; des RIEUX, A.; PRÉAT, V. Mechanism of transport of saquinavir-loaded nanostructured lipid carriers across the intestinal barrier. **Journal of Controlled Release**, v. 166, p. 115–123, 2013.

BERNKOP-SCHNURCH, A. Chitosan and its derivatives: potential excipients for peroral peptide delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 194, p. 1-13, 2001.

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

BOONYO, W., JUNGINGER, H. E., WARANUCH, N., POLNOK, A., PITAKSUTEEPONG, T. Chitosan and trimethyl chitosan chloride (TMC) as adjuvants for inducing immune responses to ovalbumin in mice following nasal administration. **Journal of Controled Release**, v. 12, p.168–175, 2007.

BORCHARD, G., LUEßEN, H. L., DE BOER, A. G., VERHOEF, J. C., LEHR, C.M., JUNGINGER, H. E. The potential of mucoadhesive polymers in enhancing intestinal peptide drug absorption. III: Effects of chitosan-glutamate and carbomer on epithelial tight junctions *in vitro*. Journal of Controlled Release, v. 39, p.131–138, 1996.

BRASIL. Resolução R.E. n.899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "**Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**". Disponível em: ">http://elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>.

BRASSEUR, N.; BRAULT, D.; COUVREUR, P. Adsorption of hematoporphyrin onto polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: carrier capacity and drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v.70, n.1–2, p. 129–135, 1991.

BRAVO-OSUNA, I.; SCHMITZ, T.; BERNKOP-SCHNURCH, A.; VAUTHIER, C.; PONCHEL, G. Elaboration and characterization of thiolated chitosan-coated acrylic nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.316, p.170–175, 2006.

BRAVO-OSUNA, I.; VAUTHIER, C.; CHACUN, H.; PONCHEL, G. Specific permeability modulation of intestinal paracelullar pathway by chitosan-poli(isobutylcyanoacrilate) core-shell nanoparticle. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, n.69, p.436-444, 2008.

BRAVO-OSUNA, I.; VAUTHIER, C.; PONCHEL, G. Tuning of shell and core characteristics of chitosan decorated acrylic nanoparticles. **European Journal of Pharmarmaceutical Science**, v. 30, p. 143–154, 2007.

BRITTO, D.; CAMPANA-FILHO, S.P. A Kinetic study on the thermal degradation of *N*,*N*,*N*-trimethylchitosan. **Polymer Degradation and Stability**, v. 84, p. 353-361, 2004.

CALVO, P.; REMUÑAN, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Development of positively charged colloidal carriers: chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron emulsions, **Colloid and Polymer Science**, v. 275, p.46–53, 1997.

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.

178

CAMPANA-FILHO, S.P.; DE BRITTO, D. Estudo das interações entre o complexo polieletrolítico trimetilquitosana/carboximetilcelulose e Cu⁺², ácido húmico e atrazina em solução aquosa. **Quím. Nova** vol.32, no.6, 2009.

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

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion, **J. Chromatog. B**.: *Biomed. Sci. Appl*, v.689, n.3, p.269-282, 1997.

CHAUVIERRE, C.; LABARRE, D.; COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Novel polysaccharide-decorated poly(isobutyl cyanoacrylate) nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 11, p.1786-93, 2003.

CHAUVIERRE, C.; LECLERC, L.; LABARRE, D.; APPEL, M.; MARDEN,M.C.; COUVREUR P, VAUTHIER C. Enhancing the tolerance of poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles with a modular surface design... International Journal of Pharmaceutics. 29;338(1-2):327-32, 2007.

CORTESI R, ESPOSITO E. Acyclovir delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery.**, 5(11):1217-30. 2008.

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.

CURTI, E.; CAMPANA FILHO, S. P. Viscosity Behavior of Chitosan and *N,N,N*-trimethylchitosan chroride salts in acid-free aqueous solution. **Journal of Macromolecular Science A: Pure and Applied Chemistry**, v. 43, p. 1-18, 2006.

CURTI, E. Estudos de obtenção e caracterização de *N,N,N*-trimetilquitosana e de seu comportamento viscosimétrico em solução aquosa. 2004. 130f. Tese (Doutorado em Ciências: Físico-química) – Instituto de Qímica de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

CURTI, E.; BRITTO, D.; CAMPANA-FILHO, S.P. Methylation of Chitosan with lodomethane: Effect of Reaction Conditions on Chemoselectivity and Degree of Substitution. **Macroomolecular Bioscience**, 3, n. 10 571–576, 2003.

DAMGE, C.; REIS, CP.; MAINCENT, P. Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v.5, p. 45-68, 2008.

179

DAMGE, C.; VRANCKX, H.; BALSCHMIDT, P.; COUVREUR, P. Poly(alkyl cyanoacrylate) nanospheres for oral administration of insulin. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 86, n.12, p.1403–1409, 1997.

DELAMOYE, M.; DUVERNEUIL, C.; PARAIRE, F.; MAZANCOURT, P.; ALVAREZ, J.-C. Simultaneous determination of thirteen b-blockers and one metabolite by gradient high-performance liquid chromatography with photodiode-array UV detection. **Forensic Science International**, v. 141, p. 23–31, 2004.

DELI, M.A. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1788, p. 892–910, 2009.

DES RIEUX, A.; FIEVEZ, V.; GARINOT, M.; SCHINAIDER Y.J.; PREAT, V. Nanoparticles as potential oral delivery system of proteins and vaccines: a mechanistic approach. **Journal of controlled release**, v.116, p. 1-27, 2006.

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.

DOMARD, A.; RINAUDO, M.; TERRASSINI, C. New method for quaternization of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.8, p. 105-107, 1986.

DONATO, E.M.; CANEDO, N.A.P.; ADAMS, A.I.H.; FRÖEHLICH, P.E.; 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.

DONGRE, V.G.; SHAH, S.B.; KARMUSE, P.P.; PHADKE, M.; JADHAV, V.K. Simultaneous determination of metoprolol succinate and amlodipine besylate in pharmaceutical dosage form by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 583–586, 2008.

DUAN, J.; ZHANG, Y.; CHEN,W.; SHEN, C.; LIAO, M.; PAN, Y.; WANG, J.; DENG, X.; ZHAO, J. Cationic Polybutyl Cyanoacrylate Nanoparticles for DNA Delivery. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p.1-9, 2009.

DUNG, P.L.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; DESBRIÉRES, J. Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. **Carbohydrate Polymer**, v. 24, p. 209-211, 1994.

EL-SAYED, A.A.Y.; EL-SALEM, N.A. Recent developments of derivative spectrophotometry and their analytical applications. **Analytical Science**, v. 21, n. 6, p. 595-607, 2005.

FERNANDES, M.B. Permeabilidade *in vitro* e *in silico* de análogos à nifuroxazida com atividade potencial frente a cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus.* 2012. 206f. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

FILIPOVIC-GRCIC, J.; SKALKO-BASNET, N.; JALSENJAK, I. Mucoadhesive chitosan-coated liposomes: characteristics and stability. **Journal of Microencapsulation**, v. 18, p. 3-12, 2001.

FINI, A.; ORIENTI, I. The role of chitosan in drug delivery: current and potential applications. **American Journal of Drug Delivery**, v.1, p. 43–59, 2003.

FLOREA, B. I.; THANOU, M.; JUNGINGER, H. E.; BORCHARD, G. Enhancement of bronchial octreotide absorption by chitosan and N-trimethyl chitosan shows linear in vitro/in vivo correlation. **Journal of Controled Release**, n. 110, p. 353–361, 2006.

FOROUTAN, S.M.; ZARGHI, A.; SHAFAATI, A.; KHODDAM, A.; MOVAHED, H. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by isocratic reversed-phase HPLC using UV detection. **J. of Pharmac. and Biomed. Anal.**, v. 45, p. 531–534, 2007.

FOTAKIS, G. TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 171-77, 2006.

FRESTA, M ; FONTANA, G.; BUCOLO, C.; CAVALLARO, G.; GIAMONA, G.; PUGLISI, G. Ocular Tolerability and In Vivo Bioavailability ofPoly(ethylene glycol) (PEG)-Coated Polyethyl-2-Cyanoacrylate Nanosphere-Encapsulated Acyclovir. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 90, n. 3, 2001.

GALINDO-RODRÍGUEZ, S.A.; ALLÉMAN, E.; FESS, H.; DOELKA, E. Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of in vivo studies. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 22, n. 5, p. 419-463, 2005.

GARINOT, M.; FIÉVEZ, V.; POURCELLE, V.; STOFFELBACH, F.; DES RIEUX, A.; PLAPIED, L.; THEATE, I.; FREICHELS, H.; JÉRÔME, C.; MARCHAND-BRYNAERT, J.; SCHNEIDER, Y.J.; PRÉAT, V. PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination. Journal of Controled Release, v. 120, n. 3, p.195-204, 2007.

GIANNAVOLA, C.; BUCOLO, C.; MALTESE, A.; PAOLINO, D.; VANDELLI, M. A.; PUGLISI, G.; LEE, V., H., L.; FRESTA, M. Influence of Preparation Conditions on

Acyclovir-Loaded Poly-*d*,*l*-Lactic Acid Nanospheres and Effect of PEG Coating on Ocular Drug Bioavailability. Pharmaceutical Research, v. 20, n.4, 2003.

GIPPS, E.; GROSCURT, P.; KREUTER, J.; SPEISER, P. P. The effects of poly(alkylcynoacrylate) nanoparticles on human normal and malignant mesenchymal cells in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 40, p. 23–31, 1987.

GONÇALVES, J.E.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando culturas celulares. In STORPIRTIS *et al.*, **Biofarmacotécnica – Série Ciências Farmacêuticas**. Guanabara Koogan, 1^a Ed, Rio de Janeiro, 2009.

GUAN, M.; ZHU, Q-L.; LIU, W..; GU, Z.L.; ZHANG, X.; ZHANG, Q. Uptake and transport of a novel anticancer drug delivery system: lactosyl-norcantharidinassociated *N*-trimethyl chitosan nanoparticles across intestinal Caco-2 cell monolayers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 1921–1930, 2012b.

GUAN, M.; ZHU, Q-L.; LIU, W.; GU, Z.L.; ZHANG, X.; ZHANG, Q.; BEI, Y-Y. Ntrimethyl chitosan nanoparticle-encapsulated lactosyl-norcantharidin for liver cancer therapy with high targeting efficacy. **Nanomedicine**, v. 8, p. 1172–1181, 2012a.

HAAS, J.; KUMAR, M.N.V.R.; BORCHARD, G.; BAKOWSKY, U.; LEHR, C.M. Preparation and Characterization of Chitosan and Trimethyl-chitosan modified Poly-(e-caprolactone) Nanoparticles as DNA Carriers. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 1, p. 22-30, 2005.

HAMMAN, J.H.; STANDER, M.; JUNGINGER, H.E.; KOTZÉ, A.F. Enhacement os paracellular drug transport across mucosal epithelial by N-trimethyl chitosan chloride. **STP Pharma Sciences**, v. 10, n. 1, p. 35-38, 2000.

HE, W.; JIANG, X.; ZHANG, Z. R. Preparation and evaluation of polybutylcyanoacrylate nanoparticles for oral delivery of thymopentin. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 97, n. 6, p. 2250-2259, 2008.

HUANG,C.H.; CHEN, C.M.; LEE, Y.D. Synthesis of high loading and encapsulation efficient paclitaxel-loaded poly(*n*-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion International Journal of Pharmaceutics v 338, n. 1-2, p. 267-275, 2009.

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**.

182

ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. **Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 1326–1331, 1998.

ISO – International Organization for Standardization. ISO 10993-5 – Biological Evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 3^a ed, ISO, 2009.

JALON, E. G; BLANCO-PRIETO, M. J; YGARTUA, P; SANTOYO, S. Increased efficacy of acyclovir-loaded microparticles against herpes simples virus type 1 in cell culture. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.56, p.183-187, 2003.

JANSSENS, S.; VAN DEN MOOTER, G. Review: physical chemistry of solid dispersions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 12, p.1571-1586, 2009.

JINTAPATTANAKIT, A.; MAO, S.; KISSEL, T.; JUNYAPRASERT, V.B. Physicochemical properties and biocompatibility of N-trimethyl chitosan: Effect of quaternization and dimethylation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.70, p.563–571, 2008.

JONKER, C.; HAMMAN, J.H.; KOTZÉ, A.F. Intestinal paracellular permeation enhancement with quaternized chitosan: in situ and in vitro evaluation, **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 238, p. 205–213, 2002.

JUNYAPRASERT V.B.; PORNSUWANNAPHA S. Floating properties and release characteristics of hollow microspheres of acyclovir. **Drug Delivery**.15(5):331-41.2008.

KALARIA, D. R.; SHARMA, G.; BENIWAL, V.; KUMAR, M. N. R. Design of biodegradable nanoparticles for oral delivery of doxorubicin: in vivo pharmacokinetics and toxicity studies in rats. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n.3, p. 492-501, 2009.

KE W, ZHAO Y, HUANG R, JIANG C, PEI Y. Enhanced oral bioavailability of doxorubicin in a dendrimer drug delivery system. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 6, p. 2208-2216, 2008.

KEAN, T.; ROTH, S.; THANOU, M. Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: cytotoxicity and transfection efficiency. **Journal of Controlled Release**, v.103, p. 643–653, 2005.

KHANDAVILLI, S.; PANCHAGNULA, R. Nanoemulsions as versatile formulations for paclitaxel delivery: peroral and dermal delivery studies in rats. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n.1, p. 154-162, 2007.

KITCHENS, K. M.; FORAKER, A. B.; KOLHATKAR, R. B.; SWAAN, P. W.; GHANDEHARI, H. Endocytosis and interaction of poly (amidoamine) dendrimers with Caco-2 cells. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n.11, p. 2138-2145, 2007.

KOTZÉ, A.F.; THANOU, M.; LUEBEN, H.L.; DE BOER, A.G.; VERHOEF, J.C.; JUNGINGER, H.E. Enhancement of paracellular drug transport with highly quaternized N-trimethyl chitosan chloride in neutral environments: in vitro evaluation in intestinal epithelial cells (Caco-2 cells), **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, p.253–257, 1999.

KRATZ, J.M.; TEIXEIRA, M.R.; KOESTER, C.M.O. SIMÕES. An HPLC-UV method for the measurement of permeability of marker drugs in the Caco-2 cell assay. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** (2011) 44: 531-537.

KRAUEL K.; PITAKSUTEEPONG T.; DAVIES N.M.; RADES T. Entrapment of bioactive molecules in poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles. **American Journal of Drug Delivery**, v.2, n.4, p. 251-9, 2004.

KUSUM V., D.; BHOSALE U.,V. Formulation and optimization of polymeric nano drug delivery system of acyclovir using 3² full factorial design. **International Journal of PharmTech Research**, v.1, n.3, p. 644-653, 2009.

KWON, S. H.; KIM, S. Y.; HA, K. W.; KANG, M. J.; HUH, J. S.; IM. T. J.; KIM, Y. M.; PARK, Y. M.; KANG, K. H.; LEE, S.; CHANG, J. Y.; LEE, J.; CHOI, Y. W. Pharmaceutical evaluation of genistein-loaded pluronic micelles for oral delivery. **Archives of Pharmacology Research**, v. 30, n. 9, p.1138-1143, 2007.

LAI, S.K.; WANG, Y.Y.; HANES, J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 158-171, 2009.

LANG, G.; WENDEL, H.; BIRKEL, S. Quaternary quitosana salts. In: MUZZARELLI, R.A.A.; PETER, M.G., eds. **Chitin Handbook**. GrottammareAP, European chitin society, p- 67-69, 1997.

LE DROUMAGUET, B.; NICOLAS, JULIEN.; BRAMBILLA, D.; MURA, S.; MAKSIMENKO, A.; KIMPE, L.; SALVATI, E.; ZONA, C.; AIROLDI, C.; CANOVI, M.; GOBBI, M.; NOIRAY, M.; LA FERLA, B.; NICOTRA, F.; SCHEPER, W.; FLORES, O.; MASSERINI, M.; ANDRIEUX, K.; COUVREUR, P. Versatile and Efficient Targeting Using a Single Nanoparticulate Platform: Application to Cancer and Alzheimer's Disease. **ACSNANO**, v. 6, n. 7, p. 5866–5879, 2012.

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

LEMBO, D.; SWAMINATHAN, S.; DONALISIO, M.; CIVRA, A.; PASTERO, L.; AQUILANO, D.; VAVIA, P.; TROTTA, F.; CAVALLI, R. Encapsulation of Acyclovir in new carboxylated cyclodextrin-based nanosponges improves the agent's antiviral efficacy. International Journal of Pharmaceutics, v. xxx, p.xxx– xxx, 2013.

LEONARD, F.; KULKARNI, R.K.; BRANDES, G.; NELSON, J.; CAMERON, J.J. Synthesis and degradation of poly(alkylcyanoacrylates). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 10, p. 259–272, 1996.

LI, H.; SONG, J-H.; PARK, J-S.; HAN, K. Polyethylene glycol-coated liposomes for oral delivery of recombinant human epidermal growth factor. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 258, n.1-2, p. 11-19, 2003.

LI, H.; ZHAO, X.; MA, Y.; ZHAI, G.; LI, L.; LOU, H. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. Journal **of Controlled Release**, v. 133, n. 3, p. 238-244, 2009.

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. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, n. *63, p.* 207-216, 2009.

LOPES, C. M.; MARTINS-LOPES, P.; SOUTO, E. B. Nanoparticulate carriers (NPC) for oral pharmaceutics and nutraceutics. **Pharmazie**, v. 65, p. 75–82, 2010.

MAO, S.; SHUAI, X.; UNGER, F.; WITTMAR, M.; XIE, X.; KISSEL, T. Synthesis, characterization and cytotoxicity of poly(ethylene glycol)-graft-trimethyl chitosan block copolymers. **Biomaterials**, v. 26, p.6343–6356, 2005.

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.

MI, F.L.; WU, Y.Y.; HSIN, Y.; SONAJE, K.; HO, Y.C.; CHEN, C.T. Oral Delivery of Peptide Drugs Using Nanoparticles Self-Assembled by Poly(γ -glutamic acid) and a Chitosan Derivative Functionalized by Trimethylation. **Bioconjugate Chem.** v. *19*, 1248–1255, 2008.

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.423-33, 2003.

MOURYA, V.K.; INAMDAR, N.N.. Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, 20:1057–1079, 2009.

NICOLAS J, COUVREUR P. Synthesis of poly(alkyl cyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. 1(1):111-27, 2009.

NNAMANI, P.O.; SCOLES, G.; KRÖL, S. Preliminary characterization of *N*-trimethylchitosan as a nanocarrier for malaria vaccine. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 48, p. 224–230, 2011.

NORRIS, D.A.; PURI, N.; SINKO, P.J. The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 34, p. 135-154, 1998.

OOWAKI, H.; MATSUDA, S.; SAKAI, N.; OHTA, T.; IWATA, H.; SADATO, A.; TAKI, W.; HASHIMOTO, N.; IKADA, Y. Non-adhesive cyanoacrylate as an embolic material for endovascular neurosurgery, **Biomaterials**, v. 21, p.1039–1046, 2000.

PERACCHIA, M.T.; VAUTHIER, C.; DESMAELE, D.; GULIK, A.; DEDIEU, J.C.; DEMOY, M.; D'ANGELO, J.; COUVREUR, P. Pegylated nanoparticles from a novel methoxypolyethylene glycol cyanoacrylate-hexadecyl cyanoacrylate amphiphilic copolymer. **Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 550–556, 1998.

PLAPIED, L.; DUHEM, N.; DES RIEUX, A.; PRÉAT, V. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 3, p. 228-237, 2011.

POLNOK, A.; BORCHARD, G.; VERHOEF, J.C.; SARISUT, N.; JUNGINGER, H.E. Influence of methylation process on the degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, p.77–83, 2004.

PREGO, C.; TORRES, D.; FERNANDEZ-MEGIA, E.; NOVOA-CARBALLAL, R.; QUIÑOÁ, E.; ALONSO, M.J. Chitosan–PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery: Effect of chitosan pegylation degree. **Journal of Controlled Release**, v. 111, p. 299–308, 2006.

PUKANUD,P.; PEUNGVICHA P.; SARISUTA N.Development of mannosylated liposomes for bioadhesive oral drug delivery via M cells of Peyer's patches. **Drug Delivery**, 16(5):289-94, 2009.

RADWAN, M. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. The effect of oral absorption enhancers on the in vivo performance of insulin-loaded poly(ethylcyanoacrylate) nanospheres in diabetic rats. **Journal of Microencapsulation**, v.19, n. 2, p.225-235, 2002.

RAMACHANDRAN, R.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Synthesis and characterization of PEGylated calcium phosphate nanoparticles for oral insulin delivery. **Journal of**

Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, v.88, n.1, p.41-48, 2009.

RAMBLA-ALEGRE, M.; MARTÍ-CENTELLES, R.; PESTEVE-ROMERO; J.; CARDA-BROCH, S. Application of a liquid chromatographic procedure for the analysis of penicillin antibiotics in biological fluids and pharmaceutical formulations using sodium dodecyl sulphate/propanol mobile phases and direct injection. **J**, **Chromatogr. A**, doi:10.1016/j.chroma.2010.12.015, 2011.

RANTA, V.-P.; TOROPAINEN, E.; TALVITIE, A.; AURIOLA, S.; URTTI, A. Simultaneous determination of eight b-blockers by gradient high-performance liquid chromatography with combined ultraviolet and fluorescence detection in corneal permeability studies *in vitro*. **J. Chromatog. B**, v. 772, p. 81–87, 2002.

REDDY, H. L.; MURTHY, R. S. R. Study of influence of polymerization factors on formation of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles and in vitro drug release kinetics. **Ars Pharmaceutica**, n. 45, v.3, p. 211-234, 2004a.

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, 2004b.

REECE, T.B.; MAXEY, T.S.; KRON, I.L. A prospectus on tissue adhesives. **American Journal of Surgery**, n. 182, p.40–44, 2001.

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.

REN, F.; CHEN, R.; WANG, Y.; SUN, Y.; JIANG, Y.; LI, G. Paclitaxel-Loaded Poly(n-butylcyanoacrylate) Nanoparticle Delivery System to Overcome Multidrug Resistance in Ovarian Cancer. Pharmaceutical Research v. 28, p.897–906, 2011. RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n.5, p. 771-780, 2004.

ROGER, E.; LAGARCE, F.; GARCION, E.; BENOIT, J-P. Biopharmaceutical Parameters to consider in order to alter the fate of nanocarriers after oral delivery. **Nanomedicine**, n. 5, v. 2, p. 287-306, 2010.

SADEGHI, A. M.; DORKOOSH, F. A.; AVADI, M. R.; WEINHOLD, M.; BAYAT, A.; DELIE, F.; GURNY, R.; LARIJANI, B.; RAFIEE-TEHRANI, M.; JUNGINGER, H. E. Permeation enhancer effect of chitosan and chitosan derivatives: comparison of formulations as soluble polymers and nanoparticulate systems on insulin

absorption in Caco-2 cells. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.70, n. 1, p.270-278, 2008.

SAHNI J., K; CHOPRA S.; AHMAD F.J. KHAR R., K. Potential prospects of chitosan derivative trimethyl chitosan chloride (TMC) as a polymeric absorption enhancer: synthesis, characterization and applications. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 60(9):1111-9, 2008.

SANDRI, G.; BONFERONI, M.C.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; BOSELLI, C.; CARAMELLA, C. Insulin-Loaded Nanoparticles Based on N-Trimethyl Chitosan: In Vitro (Caco-2Model) and Ex Vivo (Excised Rat Jejunum, Duodenum, and Ileum) Evaluation of Penetration Enhancement Properties. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 1, p.362-371, 2010.

SCHAFFAZICK, S. R; GUTERRES, S. S; FREITAS, L. L; POHLMANN, A. R. Caracterizacao e estabilidade fisico-quimica de sistemas poliméricos nonoparticulados para administracao de farmacos. **Quimica Nova**. v.26, p.726-737, 2003.

SCHIMIDT, E.; KELLYB, S.M.; VAN DER WALLE, C.F. Tight junction modulation and biochemical characterization of the zonula occludens toxin-C and N-termini. FEBS Letters, n. 58, 2974-2980, 2007.

SCHIPPER, N. G. M.; VÅRUM, K. M.; STENBERG, G.; OCKLIND, G.; LENNERNÄS, H.; ARTURSSON, P. Chitosan as absorption enhancers of poorly absorbable drugs 3: influence of mucus on absorption enhancement. **European** Journal of Pharmaceutical Science, v. 8, p. 335–343, 1999.

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 A, v. 987, n. 1-2, p. 57-66, 2003.

SHAH P.; JOGANI V.; MISHRA P.; MISHRA A.K.; BAGCHI T.; MISRA A. In vitro assessment of acyclovir permeation across cell monolayers in the presence of absorption enhancers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 34(3):279-88, 2008.

SIEVAL, A.B. THANOU, M., KOTZE['], A.F., VERHOEF, J.C., BRUSSEE, J., JUNGINGER, H.E. Preparations and NMR characterization of highly substituted N-trimethyl chitosan chloride, **Carbohydrate Polymer**. V. 36, p. 157–165, 1998.

SIMEONOVA, M.; IVANOVA,G.; ENCHEV, 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, 2009.

SIMEONOVA, M.; VELICHKOVA, R.; IVANOVA, G.; ENCHEV, V.; ABRAHAMS, I. Poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles for topical delivery of 5-fluorouracil. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p.133–140, 2003.

SNYMAN, D.; HAMMAN, J.H.; KOTZÉ, J.S.; ROLLINGS, J.E.; KOTZÉ, A.F. The relationship between the absolute molecular weight and the degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride. **Carbohydrate Polymer**, n. 50 145–150, 2002.

STULZER, H.K. **Desenvolvimento e avaliação de sistemas microparticulados de liberação modificada a base de quitosana contendo o antiviral aciclovir**. 2008. 268f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Qímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

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

SUN, W.; ZOU, W.; HUANG, G.; LI, A.; ZHANG, N. Pharmacokinetics and targeting property of TFu-loaded liposomes with different sizes after intravenous and oral administration. **Journal of Drug Targeting**, v.16, n.5, p. 357-365, 2008.

THANOU, M. M.; KOTZE, A. F.; SCHARRINGHAUSEN, T.; LUEßEN, H. L.; DE BOER, A. G.; VERHOEF, J. C.; JUNGINGER, H. E. Effect of degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride for enhanced transport of hydrophilic compounds across intestinal Caco-2 cell monolayers. **Journal of Controled Release**, n. 64, p. 15–25, 2000.

THANOU, M.M.; VERHOEF, J.C.; ROMEIJN, S.G.; NAGELKERKE, J.F.; FRANS, W. H. M.; HANS, M.; JUNGINGER, H. E. Effects of *N*-trimethyl chitosan chloride, a novel absorption enhancer, on Caco-2 intestinal epithelia and the ciliary beat frequency of chicken embryo trachea. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 185, n. 1, p. 73-82, 1999.

TOBÍO, M.; SÁNCHEZ, A.; VILA, A.; SORIANO, I.; EVORA, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.18, n. 3-4, p. 315-323, 2000.

TORAL, M. I.; POPE, S.; QUINTANILLA, S.; RICHTER, P. Simultaneous determination of amiloride and furosemide in pharmaceutical formulations by first

digital derivative spectrophotometry. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, p.117-126, 2002.

TRAPANI, G.; FRANCO, G.; TRAPANI, A.; LOPEDOTA, A.; LATROFA, A.; GALLUCCI, E.; MICELLI, S.; LISO, G. Frog Intestinal Sac: A new in vitro method for the assessment of intestinal permeability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.93, n.12, p.2909-2918, 2004.

UNITED STATES. Departament of Healthy and Human Services. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Waiver of *In Vivo* Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms based on Biopharmaceutics Classification System. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2000.

VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. **Drug Discovery Today**, n. 12, v. 23-24, p. 1068-1075, 2007.

VAUTHIER C, DUBERNET C, FATTAL E, PINTO-ALPHANDARY H, COUVREUR P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews.** 25;55(4):519-48, 2003.

VERHEUL, R.J.; AMIDI, M.; VAN DER WAL, S.; VAN RIET, E.; JISKOOT, W.; HENNINK, W.E. Synthesis, characterization and in vitro biological properties of O-methyl free *N*,*N*,*N*-trimethylated chitosan. **Biomaterials**, v. 29, p. 3642–3649, 2008.

VIEHOF, A.; JAVOT, L.; BÉDUNEAU, A.; PELLEQUER, Y.; LAMPRECHT, A. Oral insulin delivery by nanoparticles prepared with non-toxic solvents. **International Journal of Pharmaceutics**, v. xxx, p.xxx– xxx, 2013.

WANG, S.L.; JIANG, T.; MA, M.; HU, Y.; ZHANG, J. Preparation and evaluation of anti-neuroexcitation peptide (ANEP) loaded N-trimethyl chitosan chloride nanoparticles for brain-targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 386, n.1-2, p.249-55, 2010.

WANG, Z.H.; WANG, Z.Y.; SUN, C.S.; WANG, C.H.; JIANG, T.Y.; WANG, S.L. Trimethylated chitosan-conjugated PLGA nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. **Biomaterials**, v.31, p. 908–915, 2010.

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.

WERLE, M.; TAKEUCHI, H.; BERNKOP-SCHNURCH, A. Modified Chitosans for Oral Drug Delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 5, p. 1643-1656, 2009.

WU, M.; DELLACHERIE, E.; DURAND, A.; MARIE, E. Poly(*n*-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion polymerization (1):Dextran-based surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 69, p.141–146, 2009.

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.

YAMANAKA, Y.J.; LEONG, K. W. Engineering strategies to enhance nanoparticlemediated oral delivery. **Journal of Biomaterial Science: Polymer Edition**, v. 19, n.12, p. 1549–1570, 2008.

YANG, S.C.; GE, H.X.; HU, Y.; JIANG, J.Q.; YANG, C. Z. Formation of positively charged poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles stabilized with chitosan. **Colloid and Polymer Science**, v. 278, p. 285–292, 2000.

YEE, S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestine) absorption in man: fact or myth. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n.6, p. 736-766, 1997.

YIN, L.; DING, J.; HE, C.; CUI, L.; TANG, C.; YIN, C. Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery. **Biomaterials**, v.30, p.5691–5700, 2009.

ZAKERI-MILANI, P.; LOVEYMI, B.D.; JELVEHGARI, M.; VALIZADEH, H. The characteristics and improved intestinal permeability of vancomycin PLGA-nanoparticles as colloidal drug delivery system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p.174–181, 2013.

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