

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

**Aplicação da Eletroforese Capilar e Cromatografia Líquida de alta eficiência para
a quantificação da dexametasona e diclofenaco em nanosuspensão.**

Laura Victoria Español Mariño

Tese para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. María Segunda Aurora Prado

SÃO PAULO
2015

Ficha Catalográfica

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

Espanõl Mariño, Laura Victoria
E77a Aplicação da eletroforese capilar e cromatografia líquida para
a quantificação da dexametasona e diclofenaco em nanosuspensão
/ Laura Victoria Espanõl Mariño. -- São Paulo, 2015.
130p.

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

1. Fármaco : Controle de qualidade 2. Polímeros : Química
farmacêutica I. T. II. Aurora Prado, Maria Segunda, orientador.

615.19015 CDD

Laura Victoria Español Mariño

**Aplicação da eletroforese capilar e cromatografia líquida de alta eficiência para a
quantificação da dexametasona e diclofenaco em nanosuspensão.**

Versão Original

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. María Segunda Aurora Prado
orientador/presidente

Maria Helena Ambrosio Zanin

1º Examinador

Vera Regina Leopoldo Constantino

2º Examinador

São Paulo, 23 de fevereiro de 2015.

***“El futuro pertenece a quienes creen en
la belleza de sus sueños”***

Eleanor Roosevelt

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar e me permitir aperfeiçoar em cada dia.

Aos meus pais, Carlos e Jacqueline, por todo o apoio e amor incondicional.

Aos meus irmãos, Angela e Carlos, por todas as brincadeiras de infância, paciência e carinho.

Aos meus tios Edwin e Rosalba, por me motivar e apoiar em cada passo da minha vida.

A minha orientadora, María Segunda Prado, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, dedicação, amizade e conhecimento.

Aos professores Jesús Santamaria, Manuel Arruebo e Victor Sebastian pela ajuda e colaboração que tornaram possível a realização deste trabalho.

À professora Marcela Aragón por me brindar ajuda e apoio no meu caminho acadêmico.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade da Universidade de São Paulo e os colegas do Instituto de Nanociência da Espanha, pela amizade e apoio em todos os dias de trabalho.

A meus companheiros de trabalho Aline, Claudia, Andrea, Elenice, Antônio, Veronica, Adriana, Marcela, Ane, Pilar, Celia, Hugo e Marzia, pela amizade e trabalho em equipe.

Ao Prof. Eugenio Vispe, por disponibilizar o uso do equipamento de HPLC na Espanha. Agradeço também à Nuria pelo auxílio nas análises de IR.

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

Ao departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Maciej, por me apoiar e acompanhar neste momento da minha vida.

A todas aquelas pessoas que, de uma forma ou de outra, estiveram comigo durante essa jornada, o meu eterno agradecimento.

CONTEÚDO

LISTA DE ABREVIACÕES	14
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 A Inflamação	23
2.2 Antiinflamatórios Hormonais: dexametasona (DEXA).....	27
2.3 Antiinflamatórios não hormonais: diclofenaco de sódio (DS).....	29
2.4 Nanotecnologia e Nanopartículas.....	30
2.5 Nanopartículas poliméricas	33
2.6 Métodos de preparação de Nanopartículas Poliméricas.....	33
2.6.1 Método por emulsificação/difusão do solvente	34
2.6.2 Método por <i>salting-out</i>	35
2.6.3 Método de Emulsificação/evaporação do solvente	36
2.7 Copolímero PLGA.....	37
2.8 Caracterizações físico-químicas das nanopartículas poliméricas biodegradáveis ...	39
2.8.1 Avaliação morfológica.....	40
2.8.2 Potencial Zeta	40
2.8.3 Determinação do pH.....	41
2.8.4 Distribuição do tamanho da partícula	42
2.8.5 Calorimetria exploratória diferencial e espectroscopia no infravermelho.	42
2.9 Desenho Experimental	44
2.10 Experimentos Fatoriais	46
2.11 Cromatografia de alta eficiência.....	47
2.12 Eletroforese Capilar	49
2.12.1 Modos de separação em eletroforese capilar	51
2.12.1.1 Eletroforese Capilar de Zona (CZE)	51
2.12.1.2 Cromatografia eletrocínética micelar (MEKC).....	53
2.13 Comparação de CE com outras técnicas.....	53
2.14 Referencias para quantificação dos fármacos por cromatografia líquida.....	55
2.15 Referências para quantificação por eletroforese capilar dos fármacos.....	56
3. OBJETIVOS	58
3.1 Objetivo geral	58
3.2 Objetivos específicos.....	58

4.	MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1	Materiais	59
4.1.1	Solventes e reagentes:	59
4.1.2	Substâncias ativas:	59
4.1.3	Substâncias utilizadas para encontrar o padrão interno:	59
4.1.4	Equipamentos	60
4.2	Métodos.....	60
4.2.1	Caracterização dos padrões	60
4.2.1.1	Ponto de fusão	60
4.2.1.2	Espectrometria de absorção na região do ultravioleta (UV).....	61
4.2.1.3	Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho.	61
4.2.1.4	Calorimetria exploratória diferencial.....	61
4.2.2	Desenvolvimento das nanopartículas pelo método emulsificação- evaporação do solvente.	61
4.2.2.1	Desenvolvimento do método de elaboração das nanopartículas de PLGA por emulsão simple (o/w).....	62
4.2.2.2	Método de elaboração das nanopartículas de PLGA por emulsão simple (o/w).....	62
4.2.3	Caracterização físico-química das nanopartículas.	65
4.2.4	Método de quantificação dos fármacos diclofenaco de sódio e dexametasona nas nanopartículas por HPLC	67
4.2.5	Método de quantificação dos fármacos diclofenaco de sódio e dexametasona nas nanopartículas por CE.....	68
4.2.6	Validação dos métodos analíticos para avaliar a eficiência de encapsulação de nanopartículas de PLGA contendo DS e DEXA por HPLC e CE.....	69
4.2.7	Determinação da eficiência de encapsulação	70
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1	Caracterização e identificação dos fármacos.	72
5.2	Desenvolvimento do método de elaboração das nanopartículas.	77
5.3	Preparo e avaliação físico-química do sistema nanoestruturado polimérico contendo diclofenaco de sódio e dexametasona.....	82
5.3.1	Tamanho de partícula.....	83
5.3.2	Polidispersividade.	84
5.3.3	Potencial Zeta	85
5.3.4	pH	85

5.3.5	Morfologia das nanopartículas por SEM	85
5.3.6	Morfologia das nanopartículas por TEM	89
5.3.7	Espectrometria de absorção na região do Infravermelho	91
5.4	Método de HPLC para identificação e separação simultânea do diclofenaco de sódio e dexametasona.	94
5.4.1	Validação do método para a quantificação simultânea do diclofenaco de sódio e dexametasona por HPLC.....	94
5.5	Método de Eletroforese Capilar para identificação e separação simultânea do diclofenaco de sódio e dexametasona.	101
	Escolha do padrão interno:	103
5.5.1	Validação do método para a quantificação simultânea do diclofenaco de sódio e dexametasona por CE.....	104
5.6	Determinação da eficiência de encapsulação	110
5.6.1	Método Indireto para HPLC:	110
5.6.2	Método Direto (CE):.....	111
5.7	Delineamento experimental	114
6.	CONCLUSÃO.....	120
7.	REFERÊNCIAS.....	121

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas
- Figura 2** Representação esquemática da produção de prostanóides (prostaglandinas e tromboxanos) a partir do metabolismo do ácido araquidônico.
- Figura 3** Representação esquemática da fórmula estrutural da dexametasona ($C_{22}H_{29}FO_5$ PM 392,46).
- Figura 4** Representação esquemática da fórmula estrutura do Diclofenaco de sódio ($C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ PM 318,13).
- Figura 5** Esquema ilustrativo do método de emulsificação/difusão do solvente.
- Figura 6** Esquema ilustrativo do método de *salting-out* para a preparação de nanopartículas.
- Figura 7** Esquema ilustrativo da preparação de nanopartículas através do método de emulsificação/evaporação do solvente.
- Figura 8** Sínteses e hidrólise do copolímero ácido poli (D,L láctico-co-glicólico), PLGA.
- Figura 9** Rota metabólica de bio-reabsorção dos poli (α - hidroxí ácidos).
- Figura 10** Estratégia inicial para o planeamento de experiências.
- Figura 11** Sistema representando uma função ligando os fatores às respostas.
- Figura 12** Representação de um equipamento de HPLC
- Figura 13** Diagrama esquemático do sistema de CE.
- Figura 14** Procedimento de elaboração das nanopartículas pelo método de emulsão- evaporação do solvente.
- Figura 15** Equipamento 90Plus Particle Size Analyzer.
- Figura 16** Equipamento Inspect™ F50 Scanning Electron Microscope.
- Figura 17** Equipamento TENAI FEI T20 electron microscope.
- Figura 18** Representação gráfica da quantificação dos fármacos encapsulados pela técnica de HPLC.
- Figura 19** Representação gráfica da quantificação dos fármacos encapsulados pela técnica de CE.
- Figura 20** Espectros de absorção obtidos na região do UV dos fármacos.
- Figura 21** Espectro de absorção do dexametasona na região do infravermelho.
- Figura 22** Espectro de absorção do diclofenaco de sódio na região do infravermelho.

- Figura 23** Curva de DSC da amostra de diclofenaco de sódio (taxa de aquecimento de 10°C/min).
- Figura 24** Curva de DSC da amostra de dexametasona (taxa de aquecimento de 10°C/min).
- Figura 25** Tamanho de partícula hidrodinâmico obtido por DLS. Variação de surfactante nas sínteses de nanopartículas.
- Figura 26** Micrografias por microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas utilizando diferentes surfactantes a) Pluronic e b) PVA.
- Figura 27** Tamanho de partícula hidrodinâmico obtido por DLS. Variação de surfactante na síntese de nanopartículas.
- Figura 28** Micrografias por microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas utilizando diferente solvente orgânico a) acetato de etila e b) acetona.
- Figura 29** Sonicador Branson Digital Sonifier 450:400 W, 20 KHz.
- Figura 30** Micrografias por microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas utilizando diferente solvente.
- Figura 31** Micrografias por microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de PLGA contendo DS e DEXA.
- Figura 32** Micrografias por microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de PLGA contendo DS e DEXA.
- Figura 33** Espectro de absorção de IV da dexametasona, diclofenaco de sódio, PLGA e mistura mecânica.
- Figura 34** Espectro de absorção de IV das nanopartículas com fármaco (a) mistura física (b) e nanopartículas sem fármaco (c).
- Figura 35** Cromatograma do diclofenaco de sódio (50,0 µg mL⁻¹) e dexametasona (50,0 µg mL⁻¹).
- Figura 36** Cromatograma da NP com os fármacos diclofenaco de sódio (50,0µg mL⁻¹) e dexametasona (50,0 µg mL⁻¹) e placebo.
- Figura 37** Curva analítica do diclofenaco de sódio na faixa de concentrações de 0,78 µg mL⁻¹ a 400 µg mL⁻¹). Detecção UV em 260 nm.
- Figura 38** Curva analítica da dexametasona na faixa de concentrações de 0.88 µg mL⁻¹ a 400 µg mL⁻¹
- Figura 39** Eletroferograma da solução padrão de diclofenaco de sódio (100,0µg mL⁻¹) dexametasona (200,0 µg mL⁻¹) por CZE.

- Figura 40** Eletroferograma de diclofenaco de sódio ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), dexametasona ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) por MECK.
- Figura 41** Eletroferograma de diclofenaco de sódio $100,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e dexametasona 100 mmol L^{-1} com diferentes padrões (a) furosemida 100 mmol L^{-1} (b) ácido salicílico $100,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (c) niacinamida $100,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (d) lidocaína $100,0 \text{ mmol L}^{-1}$
- Figura 42** Eletroferograma de diclofenaco de sódio $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e Dexametasona $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ furosemida $100 \mu\text{g mL}^{-1}$
- Figura 43** Eletroferograma (a) fármacos e o padrão interno (diclofenaco de sódio $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e Dexametasona $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ furosemida $100 \mu\text{g mL}^{-1}$). (b) placebo, no método analítico por CE.
- Figura 44** Curva analítica do diclofenaco de sódio na faixa de concentrações de $75,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $225,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Detecção UV em 240 nm .
- Figura 45** Curva analítica da dexametasona na faixa de concentrações de $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $300,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.
- Figura 46** Eficiência de encapsulação encontrada pelo método indireto utilizando como técnica de quantificação HPLC.
- Figura 47** Eficiência de encapsulação encontrada pelo método indireto utilizando como técnica de quantificação CE.
- Figura 48** Eficiência de encapsulação encontrada pelo método indireto (HPLC) e método direto (CE) para o Diclofenaco de Sódio.
- Figura 49** Eficiência de encapsulação encontrada pelo método indireto (HPLC) e método direto (CE) para a Dexametasona.
- Figura 50** Diagrama de Pareto Padronizado para tamanho de partícula (nm), potencial zeta, eficiência de encapsulação Diclofenaco de sódio e eficiência de encapsulação da dexametasona.
- Figura 51** Efeitos das variáveis sobre a eficiência de encapsulação do diclofenaco de sódio (%EE Diclo).
- Figura 52** Efeitos das variáveis sobre a eficiência de encapsulação da dexametasona (%EE Dexa).
- Figura 53** Efeito do PLGA no tamanho de partícula (nm) tendo constantes as outras duas variáveis (tempo 25s, 3% Pluronic).

- Figura 54** Efeito do PLGA na eficiência de encapsulação de diclofenaco de sódio e dexametasona, tendo constantes as outras duas variáveis (tempo 25s, 3% Pluronic).
- Figura 55** Efeito do Pluronic no tamanho de partícula (nm) tendo constantes as outras duas variáveis (PLGA 100mg e 25s).
- Figura 56** Efeito do tempo de sonicação (s) no tamanho de partícula (nm) tendo constantes as outras duas variáveis (100mg PLGA, 5% Pluronic).

LISTA DE TABELA

- Tabela 1** Polímeros mais comumente utilizados para aplicações biomédicas na nanotecnologia.
- Tabela 2** Comparação entre as principais técnicas de separação utilizadas em toxicologia forense.
- Tabela 3** Condições de trabalho utilizadas para a determinação e quantificação do diclofenaco de sódio por cromatografia líquida.
- Tabela 4** Condições de trabalho utilizadas para a determinação e quantificação da dexametasona por cromatografia líquida.
- Tabela 5** Condições de trabalho utilizadas para a determinação e quantificação da dexametasona por eletroforese capilar.
- Tabela 6** Condições de trabalho utilizadas para a determinação e quantificação da dexametasona por eletroforese capilar.
- Tabela 7** Variáveis no estudo fatorial, sendo FO (Fase Orgânica) e FA (Fase Aquosa).
- Tabela 8** Condições experimentais para o estudo fatorial.
- Tabela 9** Condições cromatográficas para a avaliação da eficiência de encapsulação do DS e DEXA em nanopartículas poliméricas.
- Tabela 10** Condições de eletroforese capilar para a avaliação da eficiência de encapsulação do DS e DEXA em nanopartículas poliméricas.
- Tabela 11** Pontos de fusão teórico e encontrados para os padrões de diclofenaco de sódio e dexametasona.
- Tabela 12** Comprimentos de onda teórico e experimental dos padrões de diclofenaco de sódio e dexametasona.
- Tabela 13** Bandas do espectro de absorção no IV da dexametasona.
- Tabela 14** Bandas do espectro de infravermelho do diclofenaco de sódio.
- Tabela 15** Caracterização das NPs de PLGA. Tamanho de partícula, polidispersividade e potencial zeta.
- Tabela 16** Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do diclofenaco de sódio. Método HPLC. Detecção a 260nm.
- Tabela 17** Resultados experimentais obtidos na determinação da curva analítica da dexametasona. Método HPLC. Detecção a 260nm.

- Tabela 18** Concentração teórica, concentração obtida e porcentagem de recuperação do teste de exatidão do método de quantificação de diclofenaco de sódio por HPLC.
- Tabela 19** Resultados experimentais obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação do diclofenaco de sódio e dexametasona por HPLC.
- Tabela 20** Precisão do método de HPLC para quantificação do DS e DEXA.
- Tabela 21** Resultados experimentais obtidos na determinação da curva analítica do diclofenaco de sódio. Método MECK. Detecção a 240nm.
- Tabela 22** Resultados experimentais obtidos na determinação da curva analítica da dexametasona. Método MECK. Detecção a 240nm.
- Tabela 23** Concentração teórica, concentração obtida e porcentagem de recuperação do teste de exatidão do método de quantificação de diclofenaco de sódio e dexametasona.
- Tabela 24** Resultados experimentais obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação do diclofenaco de sódio e dexametasona.
- Tabela 25** Quantidade de fármaco encapsulado e eficiência de encapsulação de nanopartículas de PLGA.
- Tabela 26** Resultados experimentais obtidos na determinação da precisão do método. Método MECK. Detecção a 240nm.
- Tabela 27** Quantidade de fármaco encapsulado e eficiência de encapsulação de nanopartículas de PLGA, pela técnica de eletroforese capilar.

LISTA DE ABREVIÇÕES

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
NPs	Nanopartículas
PLGA	Acido Poli- D,L- láctico co- glicólico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
CE	Eletroforese capilar
ICH	<i>Internacional Conference on Harmonization</i>
TBS	Tetraborato de sódio
MEKC	Cromatografia eletrocinética micelar
PGs	Prostaglandinas
TXs	Tromboxanos
PLA2	Fosfolipase A2
COX	Ciclooxigenase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
PCL	Policaprolactona
PLA	Acido poli-láctico
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
CV	Coeficiente de variação
DP	Desvio Padrão
ACN	Acetonitrila
PVA	Álcool polivinílico
IR	Infravermelho
UV	Ultravioleta
λ	Comprimentos de onda

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	Velocidade de migração em eletroforese capilar.
Equação 2	Mobilidade eletroforética efetiva.
Equação 3	Tempo de migração em CZE.
Equação 4	Limite de detecção.
Equação 5	Limite de quantificação.
Equação 6	Coeficiente de variação.
Equação 7	Eficiência de encapsulação.

RESUMO

ESPAÑOL MARIÑO, L.V. **Aplicação da Eletroforese Capilar e Cromatografia Líquida de alta eficiência para a quantificação da dexametasona e diclofenaco em nanosuspensão**. 2015. 130f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os grandes desafios da medicina contemporânea destacam a necessidade de uma intensa pesquisa para desenvolver novos tratamentos para muitas doenças crônicas, tais como as reumáticas, que sejam efetivos, seguros e com qualidade. Uma das novas ferramentas para o desenvolvimento de novos medicamentos é a nanotecnologia, a qual nos últimos anos tem aumentado a sua aplicação na área farmacêutica contemplando um crescente otimismo acerca do seu potencial uso para obter melhores oportunidades de diagnóstico e de terapias mais eficazes. No presente trabalho foram encapsulados dois antiinflamatórios em sistemas nanoparticulados, nanoesferas de ácido poli-láctico co-glicólico (PLGA), a técnica utilizada permitiu a encapsulação de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma nanopartícula polimérica, diclofenaco de sódio (DS) e dexametasona (DX), respectivamente, obtendo nanopartículas com potencial para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas. Para o desenvolvimento das nanoesferas se utilizou a técnica de emulsão/evaporação do solvente. As nanoesferas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), medição do pH, medição do tamanho de partícula, potencial zeta e polidispersividade e espectroscopia vibracional de infravermelho (IR). A eficiência de encapsulação (EE) dos fármacos (diclofenaco de sódio e dexametasona) nas nanoesferas foi realizada pelas técnicas analíticas, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese capilar (CE), previamente validadas. Na melhor formulação foi obtida encapsulação de $51,4 \pm 5,5$ % para o diclofenaco e $66,9 \pm 8,4$ para a dexametasona.

Palavras-chave: nanopartícula, PLGA, antiinflamatório.

ABSTRACT

ESPAÑOL MARIÑO, L.V. **Application of Capillary Electrophoresis and High Performance Liquid Chromatography for the quantification of diclofenac and dexamethasone in nanosuspension.** 2015. 130 f. (Master thesis). Faculty Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2015.

The great challenges of contemporary medicine emphasize the need for intensive research to develop new treatments for many chronic diseases, such as the rheumatic, to be effective, safe and of good quality. One of the new tools for the development of new drugs is the nanotechnology, which in recent years has increased its application in the pharmaceutical area contemplating a growing optimism about its potential use to get better opportunities for diagnosis and more effective therapies. In the present work were encapsulated two anti-inflammatories in nanoparticulate systems, nanospheres poly-lactic co-glycolic acid (PLGA), the technique used allows the encapsulation of hydrophilic and hydrophobic compounds in the same polymer nanoparticle, diclofenac sodium (DS) and dexamethasone (DX), respectively, obtaining nanoparticles with potential for the treatment of chronic inflammatory diseases. For the development of nanospheres the technique used was emulsion / solvent evaporation. The nanospheres were characterized by zeta potential infrared, particle size, scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and pH. The encapsulation of the drug (diclofenac sodium and dexamethasone) in the nanospheres was performed by previously validated analytical techniques high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE). In the best formulation was achieved encapsulation $51.4 \pm 5.5\%$ for diclofenac and 66.9 ± 8.4 for dexamethasone.

Keywords: nanoparticle, PLGA, antiinflammatory.

1. INTRODUÇÃO

Entre as muitas doenças que afetam a população mundial, as que envolvem processos inflamatórios, representam um grupo importante. Doenças tais como artrite reumatoide, gota, lúpus eritematoso sistêmico, bursite, tenossinovite ou transtornos neurodegenerativos implicam reações inflamatórias que em alguns casos incapacitam e provocam uma diminuição da qualidade de vida das pessoas. (SRINIVASAN *et al.*, 2001)

O processo de inflamação como parte do mecanismo de defesa imune é normal e benéfico para nosso organismo, porém quando se prolonga em forma indevida, produz danos com manifestações clínicas importantes (JANEWAY, 2001). O processo inflamatório possui basicamente duas fases: aguda e crônica. A fase aguda tem duração relativamente curta, apresenta eventos vasculares como exsudação plasmática e migração de neutrófilos e é caracterizada por febre, dor e edema, enquanto que a fase crônica apresenta duração mais longa e está associada à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos e necrose tecidual (KOROLKOVAS, 2014).

Os antiinflamatórios não esteroides (AINEs) são medicamentos utilizados para tratamentos sintomáticos e tratamento de síndromes dolorosas agudas e crônicas. Seu uso é ascendente mundialmente. Em 1996, sua comercialização alcançava a cifra de 2,2 bilhões de dólares, com 73 milhões de prescrições anuais em todo o mundo. Nos dias atuais as vendas chegam a os seis bilhões (KATZUNG, 2010). Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) são um dos medicamentos mais usados no mundo. (LEE *et al.*, 2011)

Países onde o diclofenaco domina o mercado analgésico são nações em grande parte, de baixa e média renda, como Bangladesh, Paquistão, Tailândia e Vietnã. Mas a lista também inclui Inglaterra, Austrália e Nova Zelândia. O fármaco é o número três entre NSAIDs em Canadá, com mais de 17 por cento do mercado (KNOX, 2014) tem potente atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética; tem capacidade de inibir as ciclooxygenasas tipo 1 e 2, ação que dá lugar ao bloqueio

da síntese de mediadores da inflamação (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos). O DS está aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento sintomático em longo prazo da artrite reumatoide, osteoartrite e espondilite anquilosante. Sabe-se, porém, que a administração oral do DS pode causar inúmeros efeitos adversos, incluindo desde perturbações gastrointestinais até toxicidade hepática e renal (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Outra classe de antiinflamatórios são os glicocorticoides, utilizados como imunossupressores e antiinflamatórios, atuam diminuindo a produção de anticorpos e secreção de mediadores inflamatórios, neste grupo se destaca a dexametasona, antiinflamatório e antialérgico de ação prolongada, de uso tópico, oral e parenteral. Este é utilizado como adjuvante no tratamento de distúrbios reumáticos, como artrite gotosa aguda, artrite reumatoide, bursite aguda e subaguda, espondilite anquilosante, epicondilite e osteoartrite pós-traumática. Também é usado no tratamento de asma brônquica crônica, rinite e distúrbios alérgicos. Entretanto, seu uso contínuo na forma intra-articular, provoca dano e desgaste na cartilagem e outros efeitos adversos que conduzem a limitar a duração do tratamento. (BUTOESCU; JORDAN and DOELKER, 2009).

Os AINEs e glicocorticoides ajudam ao tratamento de muitas doenças que apresentam inflamação aguda e crônica, mas os efeitos secundários deles são um impedimento para a terapia crônica. Por o qual eles são bons candidatos para se utilizar em sistemas de liberação controlada, promovendo a manutenção de níveis plasmáticos do fármaco em concentrações terapêuticas que não apresentem toxicidade, tendo como solução os sistemas nanocarreadores, alvos de pesquisa nos últimos anos.

Dentre os nanocarreadores, encontrassem as nanopartículas (NPs), as quais podem ser nanoesferas (NS) e nanocápsulas (NC), tem a capacidade de carregar uma ampla gama de compostos para as diferentes vias de administração por períodos de tempo prolongado, melhorar a eficácia dos medicamentos com liberação progressiva do fármaco, direcionamento a alvos específicos, aumento da estabilidade e redução dos efeitos secundários (menor número de doses). (M. SAMARASINGHE; KANWAR; and KANWAR, 2012). Dependendo do método de

preparação, nanocápsulas ou nanoesferas podem ser obtidas. O fármaco pode ficar dissolvido, encapsulado ou preso na matriz polimérica. (MOINARD-CHÉCOT *et al.*, 2008). As nanocápsulas são constituídas de um núcleo oleoso circundado por uma membrana polimérica e a substância ativa fica solubilizada no núcleo oleoso (LANGER, 2000). A nanoesfera é um sistema matricial, no qual o fármaco é fisicamente ou uniformemente disperso. (MOINARD-CHÉCOT *et al.*, 2008) (Figura1).

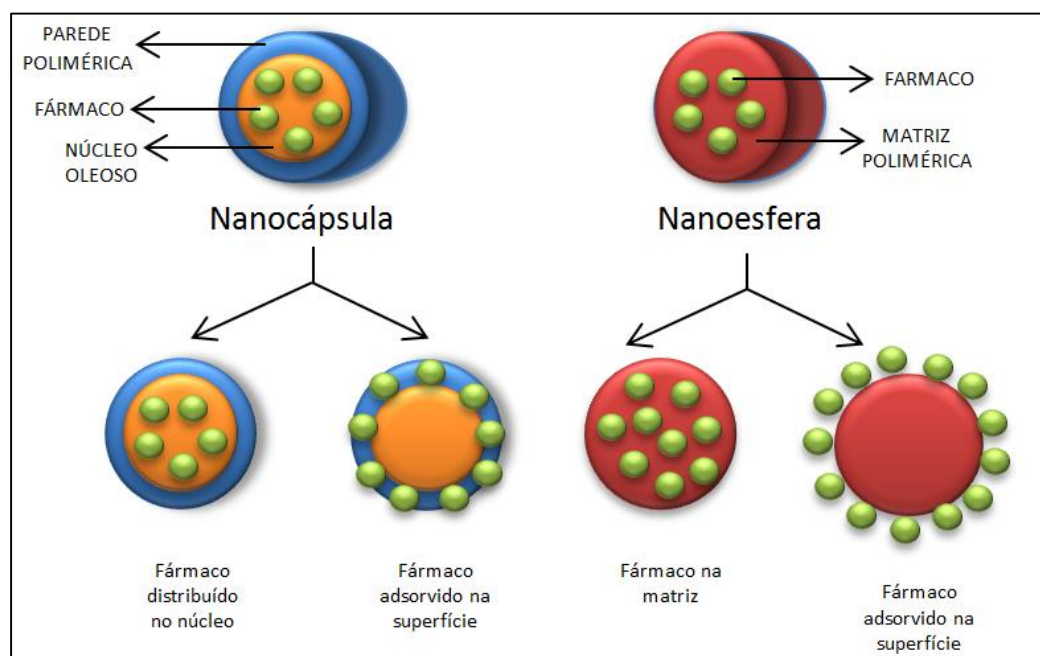


Figura 1: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas, a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso da nanopartícula; b) fármaco adsorvido na parede polimérica da nanocápsula; c) fármaco aderido na matriz polimérica da nanoesfera; d) fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica (Adaptado de SCHAFFAZICK, *et al.*, 2003).

No presente trabalho foi utilizada a técnica de emulsão-evaporação do solvente que permitiu a encapsulação da dexametasona e o diclofenaco de sódio. Com o objetivo de carregar dois fármacos antiinflamatórios com diferente mecanismo de ação para um possível tratamento mais eficaz e seguro nas doenças crônicas como a artrite reumatoide.

Este sistema carreador vai permitir a modulação da liberação e proteção dos fármacos para que sua atividade seja mais específica, diminuir os efeitos adversos

locais e sistêmicos, melhorar a eficiência no tratamento, aumentar a velocidade na resposta terapêutica e reduzir custos para o tratamento de doenças crônicas como na artrite reumatoide. Desse ponto de vista, pretende-se usar a nanomedicina como ferramenta para o desenvolvimento de novas estratégias da terapêutica.

A modificação na liberação de fármaco, às vezes, faz necessário um sistema inovador para um desempenho terapêutico ideal. Pelo qual, os polímeros empregados na elaboração dos nanocarreadores são componentes essenciais para a formação desses sistemas, já que exercem ação direta na liberação dos fármacos e, o conhecimento das suas propriedades físico-químicas e tóxicas dos polímeros é indispensável na aplicabilidade e na elaboração dos sistemas coloidais. (VILLANOVA; ORÉFICE and CUNHA, 2010).

No presente trabalho para a elaboração das nanopartículas foi utilizado o biopolímero poli (D,L- láctico co- glicólico (PLGA), um dos mais utilizados por sua biodegradação, biocompatibilidade e o fato de que medicamentos com PLGA têm sido aprovados para uso parenteral por autoridades regulatórias mundiais. O biopolímero tem sido utilizado em diferentes áreas, na encapsulação de fármacos, engenharia de tecido, inserção de implantes em tratamento de defeito ósseo e em vacinas. Este biopolímero se hidrolisa nas ligações éster, sendo metabolizado a ácidos monoméricos que são eliminados através do ciclo de Krebs (SCOTT, 2003).

As nanopartículas apresentam comportamentos diferentes com relação à macroescala, por este motivo, se faz necessária a caracterização físico-química a fim de revelar o desempenho das nanoesferas e nanocápsulas. Os métodos aplicados na caracterização do sistema coloidal são baseados na determinação do pH, medição do potencial zeta, distribuição do tamanho da partícula, avaliação morfológica, eficiência de encapsulação do fármaco, massa molar do polímero e na cinética de liberação, de forma a comprovar a estabilidade do fármaco (BECK *et al.*, 2006).

Para avaliar a morfologia das nanopartículas poliméricas são utilizadas a microscopia eletrônica de varredura (SEM) e a microscopia eletrônica de transmissão (TEM). O objetivo dos análises microscópicos é obter informações

quanto à forma, ao tamanho, à espessura e a diferenciação das nanocápsulas e nanoesferas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Dentre as principais técnicas de quantificação dos fármacos nas NPs encontram-se a espectrofotometria no UV, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a eletroforese capilar (CE) (ARNEDO *et al.*, 2000).

A principal vantagem da eletroforese capilar em relação às outras técnicas de separação é a maior eficiência e resolução obtidas em um menor tempo de análise e com a utilização de volumes pequenos da amostra e solventes orgânicos (SILVA, 2003). Os métodos utilizados foram validados segundo os critérios estabelecidos na Farmacopeia Americana, *Internacional Conference on Harmonization* (ICH) (USP-NF, 2011), no que diz respeito à linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação.

Vários métodos analíticos têm sido descritos na literatura para determinação do diclofenaco, tanto em fluidos biológicos quanto em diferentes formas farmacêuticas. Na análise de preparações farmacêuticas contendo diclofenaco de sódio são frequentemente empregados métodos espectrofotométricos, fluorimétricos e potenciométricos. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem sido utilizada para análise de diclofenaco em formas farmacêuticas, como: comprimidos e adesivos transdérmicos tipo “patch” (A. M PIMENTA, 2002).

O método HPLC com detector ultravioleta é um dos mais populares métodos utilizados para quantificação do DS e seus metabólitos. Muitos métodos utilizando HPLC foram publicados para a determinação do diclofenaco de sódio e de seus metabólitos em fluidos biológicos (KOKKI *et al.*, 2008). Tem sido utilizados métodos de RP-HPLC (HPLC Fase Reversa) para quantificação e liberação de diclofenaco de sódio em macromoléculas biológicas. (BHATTACHARYA *et al.*, 2013). Rápidas determinações de diclofenaco em formulações farmacêuticas tem se conseguido com técnicas como Electroforeses capilar. (LACHMANN; KRATZEL; NOE, 2012).

Técnicas analíticas para a dexametasona têm sido descritas em diferentes trabalhos, dentre as mais utilizadas se encontra a espectrofotometria, por se tratar de uma técnica barata, de fácil aplicação e com resultados rápidos. Também têm

sido desenvolvidas metodologias analíticas por HPLC para a determinação quantitativa da dexametasona em matéria-prima e comprimidos (BECK *et al.*, 2003) Tem sido desenvolvido a validação de indicador de estabilidade por RP-HPLC para a determinação de esparfloxacino e dexametasona em formulações farmacêuticas na presença de produtos de degradação induzidos por estresse. (RAZZAQ *et al.*, 2013). Técnicas de eletroforeses capilar com detecção UV e espectroscopia de massas têm sido utilizadas para a determinação de metabolitos de hormonas esteroides (SIRÉN; SEPPÄNEN-LAAKSO and OREŠIČ, 2008).

A escolha de uma metodologia analítica adequada é de fundamental importância para o procedimento do controle de qualidade de uma matéria-prima ou produto acabado. A aplicabilidade de métodos oficiais nem sempre é possível, considerando a grande diversificação destas matérias-primas em diferentes formulações farmacêuticas, pelo qual é muito importante desenvolver novas metodologias analíticas com técnicas recentes como eletroforese capilar. No presente trabalho foram desenvolvidas metodologias rápidas e precisas através de HPLC e CE para determinar a eficiência de encapsulação nas nanopartículas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Inflamação

Dá-se o nome de inflamação ao conjunto de fenômenos bioquímicos, morfológicos e fisiológicos, sucessivos, ativos e complexos, pelos quais se exterioriza a reação vascular e tissular dos tecidos vivos a qualquer agressão, ou seja, a inflamação é um mecanismo que provoca alterações no sistema vascular, nos componentes líquidos e celulares, visando destruir, diluir ou isolar o agente lesivo. Sendo uma reação de defesa e de reparação do dano tecidual (KUMMER; COELHO, 2002).

O processo inflamatório consiste na resposta orgânica mais precoce diante de lesão tissular ou infecção. Este processo fisiológico envolve uma ação coordenada

entre o sistema imunológico e o tecido na qual ocorreu à lesão. Diante de um trauma tissular, o acúmulo local de prostaglandinas, tromboxanos e outros mediadores químicos ocasionam a sensibilização periférica da dor, que se caracteriza por uma alteração no limiar de nociceptores, com consequentes hiperalgia e/ou alodínia. Os mecanismos dos processos inflamatórios no corpo humano são extremamente complicados e não podem ser atribuídos a um único mediador ou fator (NETO, 2002). O processo inflamatório possui basicamente duas fases: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por febre, dor e edema, enquanto que a fase crônica é caracterizada por proliferação celular. (SÜLEYMAN *et al.*, 2004).

A inflamação aguda, com duração relativamente curta, apresenta eventos vasculares como exsudação plasmática e migração de neutrófilos. Esta se refere à resposta inicial à lesão tecidual, é mediada pela liberação de mediadores químicos, e em geral, precede o desenvolvimento da resposta imune. A inflamação crônica apresenta duração mais longa e está associada à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos e necrose tecidual. O resultado da resposta imune pode ser benéfico para o hospedeiro quando permite que os agentes invasores sejam neutralizados e/ou fagocitados. Por outro lado pode ser deletério se resultar em inflamação crônica sem resolução do processo subjacente (KOOGAN, 2008).

Os componentes básicos de um processo inflamatório envolvem eventos irritativos, vasculares, exsudativos, celulares, mediadores derivados de células e resposta imune. Alguns autacóides como a histamina e a serotonina, considerados mediadores de ação rápida (primários), e a plasmina, bradicinina, prostaglandina, tromboxano e leucotrieno, mediadores de ação prolongada (secundários), agem promovendo a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular. (HALL, 2010).

A produção de prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) e leucotrienos é iniciada com a liberação do ácido araquidônico a partir dos fosfolipídios de membrana, em uma reação catalisada pela fosfolipase A2 (PLA2). A PLA2 é ativada em resposta a vários estímulos, tais como: ação da trombina nas

plaquetas, do fator do complemento C5A nos neutrófilos, da bradicinina nos fibroblastos, das reações antígeno-anticorpo nos mastócitos e da lesão celular promovida por diferentes agentes (espécies reativas de oxigênio (ROS), UV-B, agentes químicos, etc.). (HALL, 2010).

O ácido araquidônico uma vez liberado, serve de substrato para as duas isoformas da enzima ciclooxigenase (COX), onde é convertido em prostaglandinas e tromboxanos, e também para a 5-lipoxigenase (5-LOX), sendo por essa via metabólica, convertido em leucotrienos. (KOOGAN, 2008).

Na inflamação ocorre aumento de PGs, que são mediadores importantes da hiperalgesia. O efeito hiperalgésico da bradicinina, por exemplo, é potencializado pelas PGs e também pode ser induzido por esses mediadores. As PGs podem provocar hiperalgesia de forma lenta e com longa duração, ou de forma rápida e de curta duração. O envolvimento dessas PGs em diferentes situações clínicas pode facilitar ou não a ação dos antiinflamatórios (NETO, 2002).

A ciclooxigenase também chamada prostaglandina H2 sintetase (PGHS), é uma glicoproteína dimérica integral da membrana, encontrada predominantemente no retículo endoplasmático. Nas células dos mamíferos existem pelo menos duas isoforma. (GRAY *et al.*, 2002).

A COX é a enzima que catalisa os dois primeiros passos na biossíntese de prostaglandinas: oxidação do ácido araquidônico ao endoperóxido (PGG₂) e sua subsequente redução a PGH₂ (ambos compostos intermediários). A COX apresenta dois sítios catalíticos: o sítio ciclooxigenase e o sítio peroxidase. O primeiro converte o ácido araquidônico em PGG₂ que, por sua vez, é reduzido ao intermediário instável PGG₂ pelo sítio peroxidase, o qual não é inibido pelos AINEs. A partir daí, a PGH₂ é convertida pelas isomerases tissulares específicas em muitos prostanoides (prostaglandinas e tromboxanos) (Figura 2) (KUMMER; COELHO, 2002).

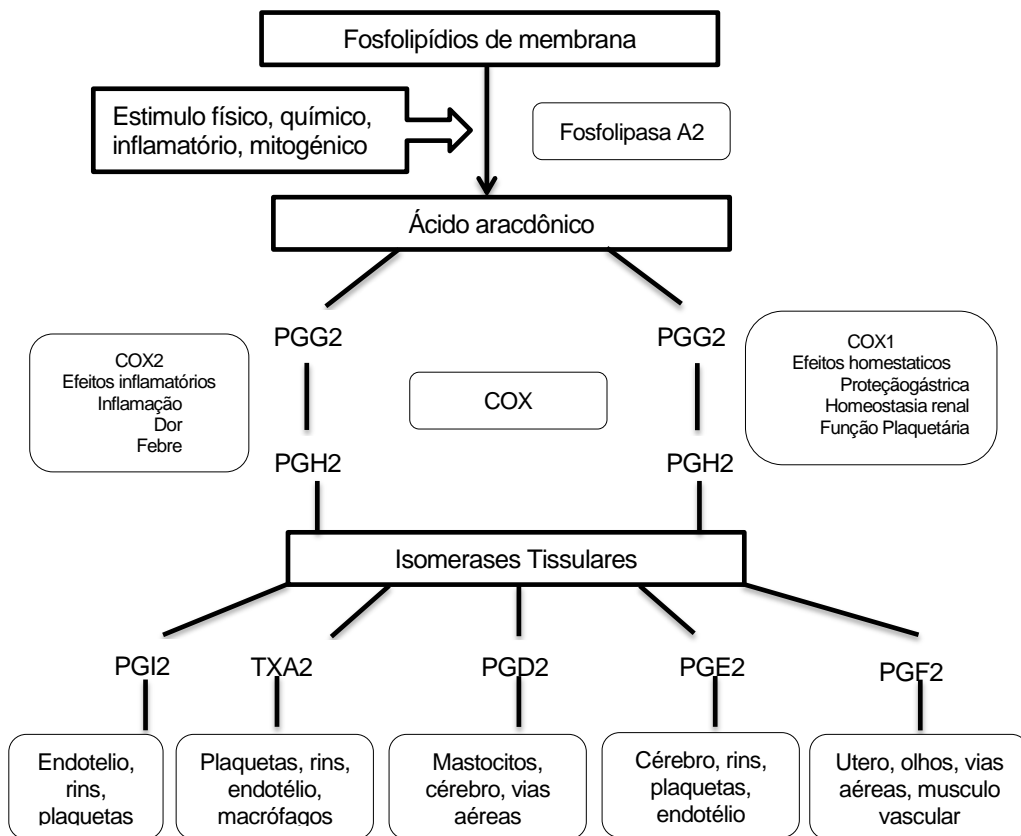


Figura 2 – Representação esquemática da produção de prostanoídeos (prostaglandinas e tromboxanos) a partir do metabolismo do ácido araquidônico. (Adaptado de KUMMER e COELHO, 2002).

A COX-1 é constitutivamente expressa em muitos tecidos, incluindo estômago, fígado e células epiteliais do trato gastrointestinal. A COX-2 é uma enzima induzível e responsável pelo aumento da formação de prostaglandinas em sítios de inflamação. A expressão da COX-2 também tem sido demonstrada em tecidos sinoviais de pacientes portadores de artrite reumatoide. A inibição da isoforma COX-1 no estômago pode ser responsável pelas injúrias gastrointestinais e úlceras pépticas em pacientes fazendo uso de AINEs. Contudo, a COX-1 e a COX-2 são duas proteínas estruturalmente distintas, apresentando uma homologia de 60% na sequência de aminoácidos do seu DNA complementar. (CULLEN *et al.*, 1998; HALL, 2010).

Em geral, os AINES inibem, de forma variável, ambas as isoformas COX em suas dosagens terapêuticas. Desse modo, passaram a ser caracterizados de acordo com sua capacidade de inibição COX-1 e COX-2. Tal característica é expressa em termos de IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% da atividade COX), usando sistemas de testes *In vitro*. Razões de IC₅₀ para COX-1 e COX-2 são calculadas para avaliar a capacidade de inibição de cada isoforma; uma baixa relação COX-2/COX-1 implica ser o agente relativamente seletivo para COX-2. Tais relações podem ser usadas como guia para a possível seletividade *In vivo* de um determinado composto (SINATRA *et al.*, 2009).

2.2 Antiinflamatórios Hormonais: dexametasona (DEXA)

Os corticosteroides são hormônios do grupo dos esteroides (produzidos pelo córtex das glândulas suprarrenais) e seus derivados. Estas substâncias podem ser sintetizadas artificialmente e tem propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras. Os antiinflamatórios conhecidos como glicocorticoides corticoides ou corticosteroides, são agentes inibidores da produção de prostaglandinas e leucotrienos pela ação inibitória sobre a enzima fosfolipase A₂, por meio da liberação de lipocortina-1 (mediador proteico antiinflamatório). Os glicocorticoides reduzem a transcrição de várias proteínas inflamatórias, como algumas citosinas, óxido-nítrico sintetase induzida e COX2. (KOROLKOVAS, 2014).

A dexametasona (Figura 3) é um antiinflamatório de ação prolongada e antialérgico, utilizado pelas vias tópica, oral e parenteral. Atualmente a dexametasona é utilizada em muitas aplicações biomédicas, tais como: a cultura de células (para promover a diferenciação de células mesenquimais stem) (KOEHLER *et al.*, 2013), oftalmologia (para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas do segmento posterior do olho, uveíte (CHENNAMANENI *et al.*, 2013) vitreorretinopatia proliferativa, neovascularização sub-retiniana e edema macular diabético. DEXA também é usado em alergologia, devido à sua capacidade para inibir as funções de linfócitos, fibroblastos, macrófagos e outras

células do sistema imunológico. Ela também tem uso em hematologia pediátrica no tratamento de leucemia linfoblástica aguda, devido à sua capacidade de induzir a apoptose de linfócitos B e T. Ela é utilizada como adjuvante no tratamento de distúrbios reumáticos, como artrite gotosa aguda, artrite reumatoide, bursite aguda e subaguda, espondilite anquilosante, epicondilite e osteoartrite pós-traumática. Também é usado no tratamento de rinite e distúrbios alérgicos. (FRATODDI *et al.*, 2012)

Apesar das muitas vantagens a utilização da dexametasona em formulações farmacêuticas tem também uma limitação, devido a sua alta hidrofobicidade são necessárias doses elevadas para alcançar o seu nível terapêutico. Isso resulta em geração de efeitos colaterais indesejáveis, tais como a osteoporose (HURSON *et al.*, 2007), altas concentrações de açúcar no sangue, a hipertensão, hemorragia gástrica e intestinal devido a úlceras e retenção de líquidos (GOODWIN *et al.*, 2011).

A dexametasona é um pó transparente, branco a quase branco, inodoro; praticamente insolúvel em água; facilmente solúvel em metanol, acetona e dioxano. Levemente solúvel em diclorometano (USP-NF, 2011)

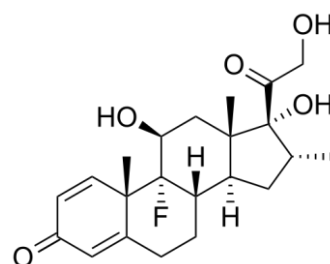


Figura 3. Representação esquemática da fórmula estrutural da dexametasona (C₂₂H₂₉FO₅ PM 392,46)

O mecanismo “clássico” de ação dos glucocorticoides se relaciona à ligação do esteroide a receptores citosólicos que, dimerizados, dirigem-se ao núcleo celular e liga-se a regiões promotoras do DNA onde, na maioria das vezes, induzem à transcrição. Os efeitos antiinflamatórios são decorrentes da estimulação da biossíntese da proteína lipomodulina que, por sua vez, inibe a ação enzimática da fosfolipase A₂. Deste modo é impedida a liberação de ácido araquidônico e, em consequência, não se formam seus metabolitos, como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, que são mediadores da inflamação. (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

2.3 Antiinflamatórios não hormonais: diclofenaco de sódio (DS).

Os antiinflamatórios não esteroides (AINEs) são um grupo variado de fármacos que têm em comum a capacidade anti-inflamatória, analgésica e de combater a hipertermia. (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012)

O principal mecanismo de ação dos AINEs ocorre através da inibição da enzima COX e consequente redução da conversão do ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. Alguns prostaglandinas se ocupam de manter a integridade e proliferação da mucosa gástrica, pelo qual quando ela é inibida pelos AINEs pode ocasionar gastrite, disfunção plaquetária, comprometimento renal e broncoespasmo. O efeito antitrombótico ocorre pelo bloqueio da COX-1, inibindo a produção do TX e ocasionando o predomínio da atividade de prostaciclina endotelial. (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012)

O diclofenaco de sódio (Figura 4) antiinflamatório não esteroide (AINE) pode ser utilizado no tratamento sintomático, em longo prazo, da artrite reumatoide, da osteoartrite e da espondilite ancilósante. Também é útil no tratamento, em curto prazo, da dor musculoesquelética aguda e dismenorria. (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

O diclofenaco de sódio é levemente solúvel em água, facilmente solúvel em metanol, solúvel em etanol, ligeiramente solúvel em ácido acético glacial, pouco solúvel em acetona, praticamente insolúvel em éter, clorofórmio e tolueno. (USP-NF, 2011)

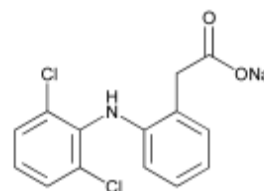


Figura 4. Representação esquemática da fórmula estrutural do Diclofenaco de sódio ($C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ PM 318,13)

O diclofenaco de sódio está aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela *Agencia Nacional Vigilancia Sanitaria* (ANVISA) para o tratamento sintomático em longo prazo da artrite reumatoide, osteoartrite e espondilose

anquilosante, sendo também utilizadas para tratamentos em curto prazo de lesões musculoesqueléticas agudas, tendinites, bursites, dor pós-operatória e dismenorreia. (SALLUM, 2007).

2.4 Nanotecnologia e Nanopartículas

A nanotecnologia, ciência e tecnologia que foca as propriedades especiais dos materiais de tamanho nanométrico, está se tornando um dos mais promissores campos de pesquisa na atualidade, convertendo-se numa tecnologia interdisciplinar, baseada na física, química, biologia, engenharias, computação e medicina ("Little Big Science", 2014)

A FDA define nanotecnologia como o processo para a obtenção, o controle, a fabricação e/ou a manipulação intencional de materiais que têm pelo menos uma dimensão entre 1 a 100 nm, apesar desta restrição de tamanho, comumente refere-se a estruturas de até várias centenas de nanômetros (FAROKHZAD; LANGER, 2009). Além disso, o material na escala nanométrica tem que demonstrar propriedades físicas, químicas e biológicas que permitam aplicação inovadora desse material. Essas propriedades inovadoras devem ser atribuídas exclusivamente a sua dimensão nanométrica. No caso de material constituído por partículas maiores que 100 e menores que 1000 nm, porém com característica inovadora, esse será considerado material obtido por nanotecnologia ("Drugs", 2014).

A nanotecnologia farmacêutica é a área das ciências farmacêuticas envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica. Estudos de tais sistemas têm sido realizados ativamente no mundo com o propósito de direcionar e controlar a liberação de fármacos (SURI; FENNIRI; SINGH, 2007). A aplicação da nanotecnologia para o tratamento, diagnóstico, monitoramento e controle de sistemas biológicos foi recentemente denominada "Nanomedicina" pelo *National Institute of Health* nos Estados Unidos. (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2005).

Essa tecnologia surgiu na década dos anos 60 com o desenvolvimento da microencapsulação, técnica na qual os polímeros e outras substâncias são transformados em partículas de tamanho micrométrico. A microencapsulação é bastante utilizada na indústria farmacêutica e cosmética por permitir a proteção de substâncias láveis e voláteis e o controle da liberação do fármaco, contribuindo para a melhora da biodisponibilidade e redução da dose terapêutica e toxicidade. A microencapsulação serviu de modelo para técnicas mais sofisticadas, agora em escala nanométrica, permitindo o desenvolvimento de nanopartículas. (SUAVE *et al.*, 2009).

Os sistemas coloidais de natureza lipossomal e biopolimérica têm sido ativamente estudados até agora. Desde 1968, várias pesquisas têm sido dedicadas ao uso potencial desses sistemas como sistema de vetorização biocompatível, assim como na elucidação e solução de seus problemas fundamentais como a sensibilidade das membranas fosfolipídicas à degradação biológica. Nos anos 90, surgiram nanossistemas mais sofisticados revestidos por polímeros hidrofílicos, denominados sistemas furtivos, que permitem um tempo de circulação maior no organismo (BARRATT, 2000).

Há cerca de vinte anos, formulações com nanopartículas poliméricas têm sido desenvolvidas como alternativa ao uso de formulações com o fármaco livre. Os principais objetivos para o desenvolvimento de nanocarreadores são promover a vetorização de fármacos como antibióticos ou antitumorais, diminuir a toxicidade de fármacos antiinflamatórios, aumentar a biodisponibilidade ocular do fármaco, bem como aumentar a estabilidade de hormônios, proteínas e peptídeos no trato gastrointestinal (ADRIANA R. POHLMANN, 2007). A vetorização de fármacos é utilizada principalmente para solucionar os problemas ou limites que alguns fármacos possam apresentar nas formulações convencionais, como instabilidade química, física ou biológica, baixa solubilidade e/ou absorção, grande volume de distribuição ou baixa especificidade. (GODIN; TOUITOU, 2007).

Os sistemas carreadores nanoestruturados apresentam diâmetro na ordem de nanômetros, entre 10 e 1000 nm, e diferem de acordo com a composição

qualitativa e a organização em nível molecular. (SCHAFFAZICK *et al.*, 2002) Esses sistemas são desenvolvidos com objetivo de aumentar o controle de liberação do fármaco, a especificidade e a seletividade no local de ação assim como, diminuir a dose e os efeitos colaterais (BARRATT, 2000).

Com o uso das nanopartículas em sistemas de liberação é possível melhorar a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, prolongar a meia-vida sistêmica por meio da redução de imunogenicidade, liberar o fármaco de forma modificada (diminuindo a frequência de administração), liberação do fármaco no local específico para minimizar os efeitos secundários sistêmicos, associar dois ou mais fármacos para gerar efeito sinérgico e suprimir a resistência a esses quando são utilizados isoladamente. (ZHANG *et al.*, 2007).

Dependentemente da composição, estrutura e método de desenvolvimento, algumas das principais vantagens e/ou funções dos nanocarreadores são: prolongamento do tempo de circulação no sangue e habilidade de acumular-se em sítios específicos; habilidade de reconhecer, chegar especificamente a o sítio alvo; habilidade de responder às características do estímulo local da patologia e habilidade de penetrar na célula por degradação do polímero quando o alvo for intracelular. (TORCHILIN, 2007).

Uma forma efetiva para alcançar a eficiência nessa liberação do fármaco tem sido baseada no entendimento de suas interações com: o ambiente biológico, população de células-alvo, receptores de superfície dessas células, alterações que podem aparecer com a progressão da doença nesses receptores, mecanismo no sítio de ação, a retenção do ativo, a administração de múltiplas substâncias, os mecanismos moleculares e a fisiopatologia da doença. (SURI; FENNIRI and SINGH, 2007).

Entre os diferentes tipos de nanocarreadores, as nanopartículas poliméricas permitem oferecer uma alternativa interessante, possuindo uma alta estabilidade tanto em fluidos biológicos quanto durante o armazenamento. Há alguns anos, um grande interesse tem sido focado nas nanopartículas poliméricas como um promissor sistema de liberação de fármacos, devido às suas possibilidades de

aumento da eficácia do ativo, redução da toxicidade e liberação controlada. (GODIN; TOUITOU, 2007).

2.5 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais compostos por polímeros naturais, sintéticos ou semissintéticos. Estes sistemas poliméricos são amplamente utilizados para a liberação de fármacos, uma vez que para além de permitirem realizar a liberação dos mesmos de uma forma controlada, também os podem direcionar para sítios específicos. (RAWAT *et al.*, 2006).

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

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

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

2.6 Métodos de preparação de Nanopartículas Poliméricas

São vários os métodos desenvolvidos para a preparação de nanopartículas poliméricas que se encontram descritos na literatura. De uma maneira geral estes

podem ser classificados em duas grandes categorias, técnicas top-down e bottom-up. Os métodos top-down utiliza redução do tamanho para obter nanopartículas de tamanho controlado. A redução do tamanho esta baseada na aplicação duma forte tensão de cisalhamento por onda de emissão de som (sonicação), alta pressão (microfluidização), e agitação de alta velocidade (homogeneização). Os métodos bottom-up começam a partir de moléculas individuais para formar nanopartículas, por polimerização. Os métodos de polimerização comumente utilizados são a polimerização em emulsão (água em óleo, óleo em água, e a polimerização em estruturas bicontínuas), polimerização em dispersão, e polimerização interfacial (BRIGGER; DUBERNET and COUVREUR, 2002).

Os monómeros, iniciadores, aditivos e solventes são os componentes químicos básicos utilizados nos métodos de polimerização. Os principais inconvenientes dos métodos bottom-up são a presença de sub-produtos residuais nas nanopartículas finais que possam gerar toxicidade nas nanopartículas, a dificuldade na predição do peso molecular do polímero, afetando a biodistribuição e o comportamento de liberação do fármaco a partir das nanopartículas; a possibilidade de inibição do fármaco devido às interações ou reações cruzadas do fármaco com monômeros ativados e íons H⁺ presentes durante a polimerização. Para superar essas limitações, os métodos de bottom-up foram desenvolvidos utilizando polímeros naturais e biodegradáveis. A emulsão/evaporação, salting out, nanoprecipitação, e emulsão/ difusão são os principais métodos utilizados para formar nanopartículas poliméricas. (CHORNY *et al.*, 2002).

2.6.1 Método por emulsificação/difusão do solvente

No método de emulsificação/difusão do solvente, o polímero é dissolvido num solvente parcialmente hidrossolúvel como, por exemplo, acetona e acetonitrila, mas saturado com água para assegurar o equilíbrio termodinâmico de ambos os líquidos. Para que ocorra a precipitação do polímero e a consequente formação de nanopartículas, é necessário promover a difusão do solvente disperso através da diluição de um excesso de água, quando o solvente orgânico

é parcialmente miscível com água, ou de qualquer outro solvente orgânico (REIS, 2007)

Subsequentemente, a fase saturada de polímero-água-solvente é emulsionada numa solução aquosa contendo um estabilizante, levando à difusão do solvente para a fase externa. Dessa forma, poderão resultar nanoesferas ou nanocápsulas, de acordo com a razão óleo-polímero. Finalmente, o solvente é eliminado por evaporação. O procedimento encontra-se ilustrado na Figura 5.

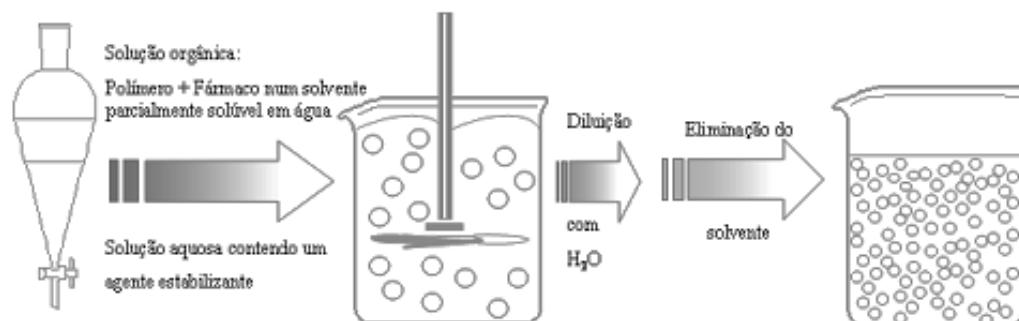


Figura 5. Esquema ilustrativo do método de emulsificação/difusão do solvente. (Adaptado de REIS, 2007).

2.6.2 Método por *salting-out*

O método *salting-out* consiste na separação de um solvente hidrossolúvel de uma fase aquosa através do efeito *salting-out*. Este processo pode ser considerado uma variante do método de emulsificação/difusão do solvente. O polímero e o fármaco a encapsular são, inicialmente, dissolvidos num solvente como, por exemplo, a acetona, e são, subsequentemente, emulsionados num gel aquoso contendo o agente de *salting-out* um estabilizante coloidal (por exemplo, a hidroxietilcelulose). Esta emulsão O/A (óleo em água) é diluída com um volume de água suficiente para promover a difusão da acetona para a fase aquosa, induzindo a formação de nanopartículas. Este agente *salting-out* poderá ser um eletrólito, normalmente o cloreto de magnésio, cloreto de cálcio ou acetato de magnésio, ou um não eletrólito, como seja a sacarose. Por fim, o solvente e o agente *salting-out* são eliminados por filtração cruzada (GONZÁLEZ QUINTANA; NOTARIO

RODRÍGUEZ; GUZMÁN SABO, 2001). Os passos preparativos deste método encontram-se ilustrados na Figura 6.

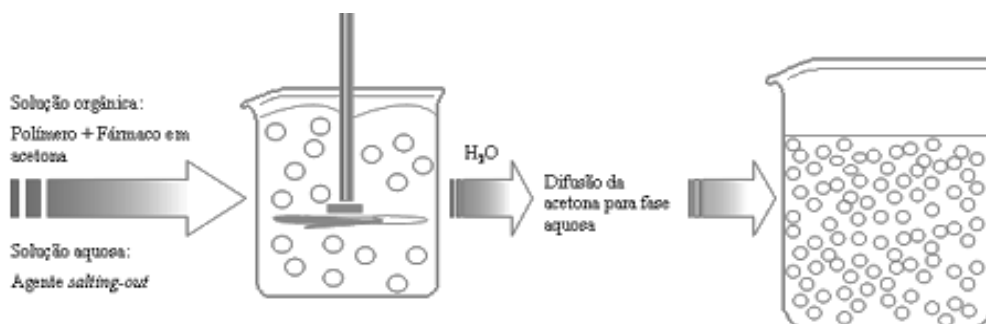


Figura 6. Esquema ilustrativo do método de *salting-out* para a preparação de nanopartículas. (Adaptado de REIS, 2007).

2.6.3 Método de Emulsificação/evaporação do solvente

Este método envolve dois passos principais: o primeiro engloba a emulsificação, sobre elevada agitação do polímero dissolvido numa solução orgânica numa fase aquosa. O segundo envolve a evaporação do solvente do polímero por aumento de temperatura sobre pressão reduzida ou agitação contínua. O solvente é então eliminado e o polímero precipita, formando as nanoesferas, tal como mostra a Figura 7 (REIS, 2007).

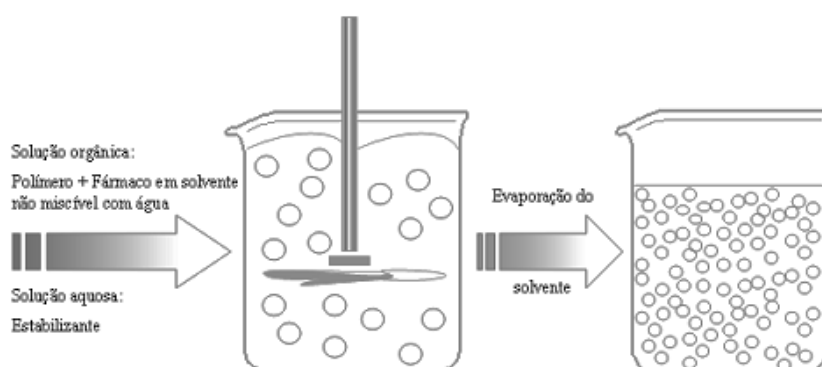


Figura 7. Esquema ilustrativo da preparação de nanopartículas através do método de emulsificação/evaporação do solvente. (Adaptado de REIS 2007).

2.7 Copolímero PLGA

Os polímeros podem ser utilizados como material na preparação de nanopartículas, os mais importantes são os copolímeros, matérias que tem recebido grande importância devido a suas características físico-químicas.

Dentro dos polímeros mais utilizados são: poly (lactic acid) (PLA), poly (glycolic acid) (PGA), seu copolímero poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), poly (lactic acid-ethylene glycol) (PLA-PEG) e poly- ϵ -caprolactone (PCL), na Tabela 1 pode-se observar alguns exemplos (SCOTT, 2003).

Tabela 1. Polímeros mais comumente utilizados para aplicações biomédicas na nanotecnologia como nanopartículas.

Polímero	Fármaco	Doença
PLGA	Doxorubicina	Câncer
PLGA/PLA/PCL	Isradipina	Parkinson
PLGA-PEG	Cisplatino	Câncer
PEO-PLGA	Plaquitaxel	Câncer
PECA	Amoxicilina	Inecções bacteriais
PLA	Toxoide tétano	Vacina
PCL	Ellipticina	Antineoplasicos

O polímero mais utilizado por suas propriedades é o PLGA, aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*), poliéster que corresponde ao copolímero linear de D, L ácido láctico e ácido glicólico, o qual pode ser encontrado em diferentes proporções de monômeros dependendo de suas propriedades. (RAO *et al.*, 2010)

Biodegradação

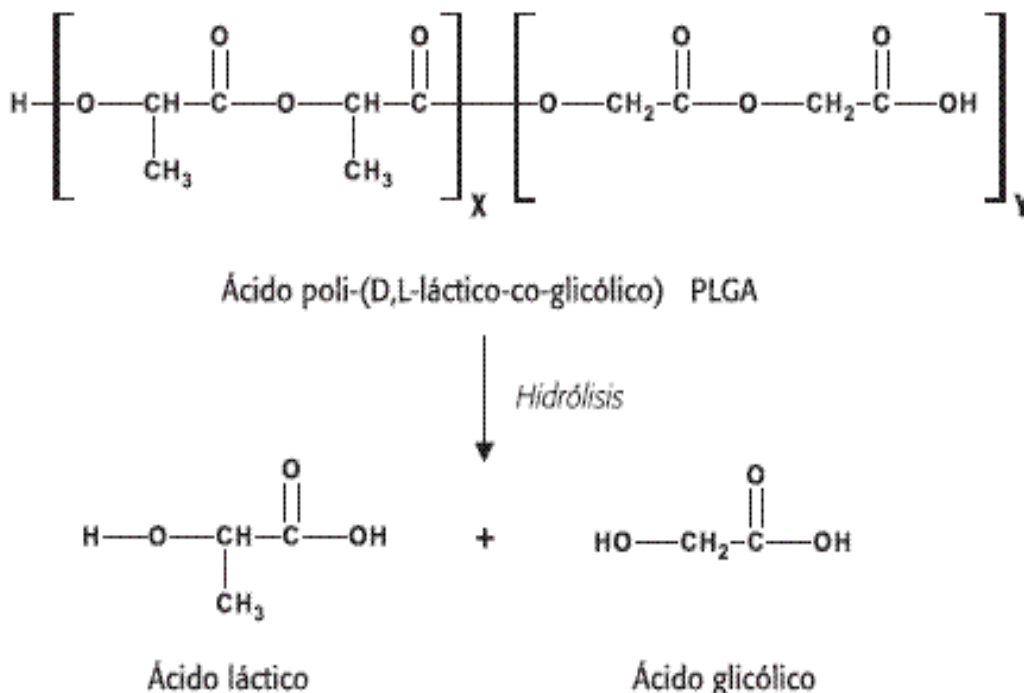


Figura 8. Sínteses e hidrólise do copolímero ácido poli (D,L láctico-co-glicólico), PLGA.

As nanopartículas PLGA sofrem degradação hidrolítica como mostrado na Figura 8, a qual é modulada variando as características do polímero como a sua composição química, porosidade, caráter hidrofílico/ hidrofóbico, morfologia (cristalino/amorfo), o peso molecular e a distribuição de peso molecular. Os polímeros PLGA apresentam hidrólises em os enlaces éster, metabolizado a ácidos monoméricos e se submete a eliminação através do ciclo de Krebs, como se pode observar na Figura 9, a possível rota de bio-reabsorção do polímero (SCOTT, 2003).

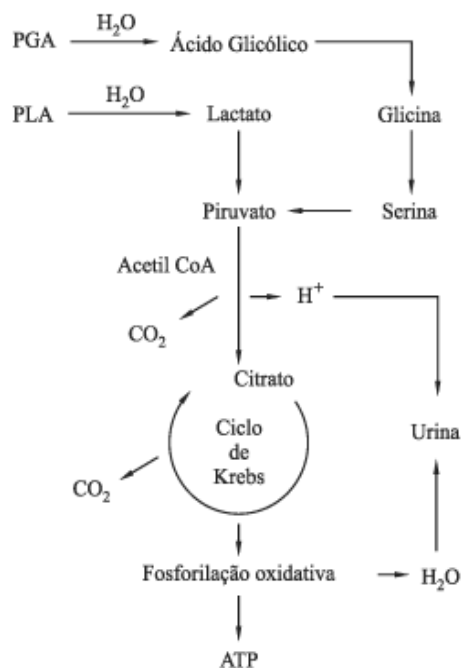


Figura 9. Rota metabólica de bio-reabsorção dos poli (α- hidroxi ácidos) PLA e PGA.

2.8 Caracterizações físico-químicas das nanopartículas poliméricas biodegradáveis

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

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

2.8.1 Avaliação morfológica

Para avaliar a morfologia das nanopartículas poliméricas são utilizadas técnicas como a microscopia eletrônica de varredura (SEM) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). O objetivo dessas análises microscópicas é caracterização das nanopartículas quanto à forma, ao tamanho e à espessura (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A principal razão para utilização da Microscopia Eletrônica de Transmissão é que permite caracterizar a morfologia, cristalografia e tamanho dos materiais. As medidas podem ser realizadas com resolução espacial e em energia de alguns angströms e elétron-volts, respectivamente, geralmente sob condições de alto vácuo. (WILLIAMS; CARTER, 2009)

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

2.8.2 Potencial Zeta

Potencial Zeta é a medida do potencial elétrico entre a superfície externa da camada compacta que se desenvolve ao redor da partícula e o meio líquido em que ela está inserida. O potencial zeta é um parâmetro importante para avaliação da estabilidade de sistema coloidal, o qual é influenciado pela maioria das partículas dispersas em um sistema aquoso que irá adquirir uma carga elétrica em sua superfície, tornando-a eletricamente carregada. (MAINARDES; EVANGELISTA, 2005).

Convencionalmente, um potencial zeta pode ser elevado em um sentido positivo ou negativo. Os principais componentes presentes nas nanopartículas poliméricas capazes de influenciar a variação do potencial zeta são os polímeros

constituintes das nanopartículas. Um potencial relativamente alto confere uma boa estabilidade físico-química, ou seja, o sistema coloidal vai resistir aglomeração. Já um potencial baixo dificulta a manutenção da estabilidade do sistema (MELO et al., 2011).

Neste sentido, Melo (2011) afirma que o potencial zeta pode variar de acordo com o pH, meio dispersante, a composição da partícula e a força iônica presente na solução. As nanocápsulas e nanoesferas que apresentarem valores próximos a ± 30 mV possuem boa estabilidade em solução coloidal (MELO *et al.*, 2011)

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

2.8.3 Determinação do pH

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

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

2.8.4 Distribuição do tamanho da partícula

A distribuição do tamanho das partículas caracteriza a tendência à sedimentação e à agregação das mesmas, avaliando-se a estabilidade do sistema. O diâmetro da nanocápsula é influenciado por vários fatores: natureza e concentração dos polímeros e do fármaco, concentração de tensoativos, natureza do óleo utilizado como núcleo, proporção entre o solvente orgânico e água, além da velocidade difusa da fase orgânica na aquosa (MAINARDES; EVANGELISTA, 2005).

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

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

2.8.5 Calorimetria exploratória diferencial e espectroscopia no infravermelho.

Outras técnicas empregadas para a determinação da forma de associação do fármaco a nanopartículas incluem a calorimetria exploratória diferencial, a difração de raios X e/ou a espectroscopia no infravermelho. A seguir, serão descritos alguns exemplos do emprego destas técnicas.

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

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

A caracterização do estado físico de indometacina associada a nanocápsulas e a nanoesferas de policaprolactona (PCL), realizada por DSC e difração de raios X, indicou que o fármaco está disperso molecularmente na matriz polimérica. Adicionalmente, através do uso de espectroscopia no infravermelho, foi verificada a ausência de reações químicas entre a indometacina e o polímero. Empregando-se DSC, raios X e espectroscopia no infravermelho também foi verificado que o diclofenaco sódico estaria disperso molecularmente em nanoestruturas preparadas com ureia-formaldeído. Ainda, através de DSC e raios X, foi verificado que um fármaco anti-hipertensivo diidropiridínico estaria molecularmente disperso na matriz de nanoesferas, preparadas com policaprolactona (PCL), ácido poli-láctico (PLA) ou PLGA (A. R. KULKARNI, 2000).

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

2.9 Desenho Experimental

O planejamento experimental é uma ferramenta poderosa para estudar o efeito conjunto de vários fatores sobre uma variável resposta de interesse. Para o desenho experimental é fundamental conhecer as variáveis independentes importantes para os estudos a realizar, assim como os valores dos seus limites inferior e superior.

Algumas experiências devem ser realizadas a fim de se obter dados sobre as variáveis dependentes. A partir desses resultados, devem ser utilizadas técnicas estatísticas de modo a poder determinar a relação de dependência das variáveis independentes com as variáveis dependentes. O desenho de experimentos é uma dessas técnicas, que atualmente é usada em grande escala e que permite determinar as variáveis que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo, tendo como resultados: (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

1. Redução da variação do processo e melhor concordância entre os valores nominais obtidos e os valores pretendidos;
2. Redução do tempo do processo;
3. Redução do custo operacional;
4. Melhoria no rendimento do processo.

Entende-se por experimento (ou ensaio) um teste no qual se efetuam, propositadamente, alterações de certas variáveis ou parâmetros do processo (os fatores) para observar as mudanças que ocorrem numa ou mais características da unidade experimental e identificar as respectivas causas. Designa-se por unidade experimental a entidade na qual são feitas as medições de uma ou mais características. Os fatores podem ser controláveis ou não. Considera-se um fator controlável, uma variável cujos valores são alterados pelos investigadores com o intuito de determinar o efeito numa ou mais respostas. Os valores que o fator assume designam-se por níveis (ou tratamentos), podendo estes ser qualitativos ou quantitativos. O efeito de um fator é a alteração média observada na resposta

quando o fator muda de nível. Designa-se resposta o resultado de uma experiência, ou seja, a resposta será a característica da qualidade que os investigadores estão interessados em aperfeiçoar. (CALADO; MONTGOMERY, 2003). Qualquer desenho ou planeamento de experiências requer, antes da sua execução, uma abordagem sistemática para que a sua aplicação conduza a resultados positivos e encontra-se esquematizado na Figura 10.

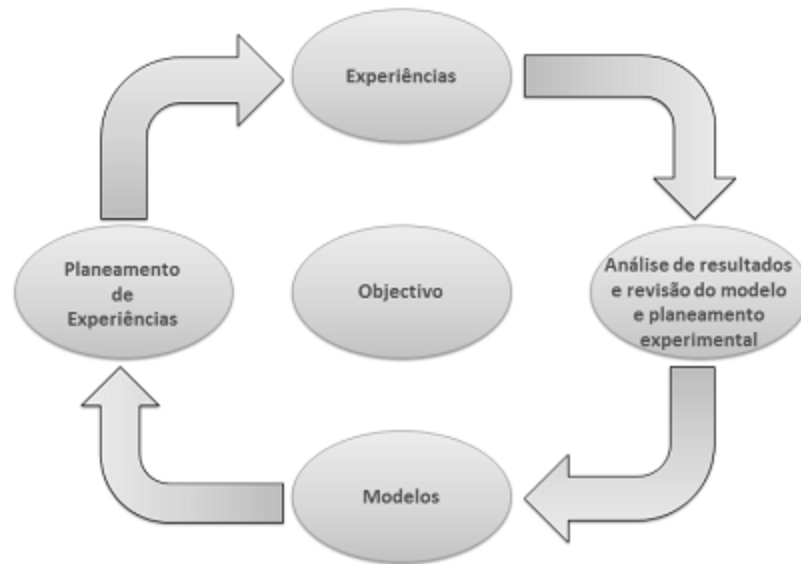


Figura 10. Estratégia inicial para o planeamento de experiências.
Tomado de (SILVA, 2012)

Após a realização dos ensaios, deve utilizar-se por princípio, a análise de variância para tratamento de resultados obtidos. Esta permite determinar de forma objetiva quais os fatores e/ou interações que afetam significativamente a(s) resposta(s); posteriormente, é possível determinar a combinação de níveis que conduz à maximização dos objetivos pré-estabelecidos. Existem vários tipos de planeamento de experiências: desenho com um fator a vários níveis; desenho fatorial completo; desenho fatorial fraccionado; método de Taguchi; otimização simplex; metodologia de superfície de resposta. No estudo presente vai ser avaliada a metodologia de desenho fatorial (SILVA, 2012).

2.10 Experimentos Fatoriais

Uma das técnicas mais conhecidas é o planejamento fatorial, no qual estão envolvidos k fatores (ou variáveis) cada um deles presente em diferentes níveis. O caso mais simples é aquele em que cada fator k está presente em apenas dois níveis. Na realização de um experimento com k fatores em dois níveis, são feitas $2 \times 2 \times \dots \times 2$ (k vezes) = 2^k observações da variável resposta e, portanto, este planejamento é denominado experimento fatorial 2^k (NEVES; SCHVARTZMAN and JORDÃO, 2002).

A Figura 11 mostra esquematicamente certo número de fatores k atuando sobre o sistema em estudo, produzindo as respostas R_1, R_2, \dots, R_j . O sistema atua como uma função desconhecida que opera sobre as variáveis de entrada, os fatores, e produz como saída às respostas observadas. O objetivo do planejamento experimental é descobrir essa função, ou obter uma aproximação satisfatória para ela. Com o conhecimento desta função poderá escolher as melhores condições de operação do sistema.



Figura 11. Sistema representando uma função ligando os fatores às respostas (DE BARROS NETO; SCARMINIO and BRUNS, 1995).

O planejamento fatorial tem sido muito aplicado em pesquisas básicas e tecnológicas e é classificado como um método do tipo simultâneo, onde as variáveis de interesse que realmente apresentam influências significativas na resposta são avaliadas ao mesmo tempo.

De um modo geral, o planejamento fatorial pode ser representado por b^k , onde " k " é o número de fatores " b " é o número de níveis escolhidos. Isso só acontece com bigual para todos os fatores.

Em geral, os planejamentos fatoriais do tipo 2^k são os mais comuns. Um dos aspectos favoráveis deste tipo de planejamento é a realização de poucos

experimentos. Torna-se óbvio que com um número reduzido de níveis não é possível explorar de maneira completa uma grande região no espaço das variáveis. Entretanto, podem-se observar tendências importantes para a realização de investigações posteriores, (VIEIRA, 1999).

2.11 Cromatografia de alta eficiência

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

A cromatografia líquida de alta eficiência emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados, e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostra, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. (MEYER, 2013).

A separação cromatográfica é o resultado de interações específicas entre moléculas da amostra e as fases móvel e estacionária. Uma vez que a migração diferencial é dinâmica e depende do equilíbrio de distribuição de cada componente entre a fase móvel e a fase estacionária, a composição de ambas fases e a temperatura de separação serão as variáveis que afetarão o processo. A mobilidade exibida pelo soluto pode-se dar em função de diferenças na adsorção, partição, solubilidade, pressão de vapor, tamanho da molécula ou densidade de carga iônica (CASS; DEGANI, 2001).

Conforme a Figura 12, o equipamento de HPLC é basicamente constituído de seis componentes. O reservatório de solventes (Reservoir) é o local onde se encontram os solventes da fase móvel que é impulsionada até a coluna cromatográfica por um sistema de bomba (Pump) composto de uma ou mais bombas de alta pressão.

A coluna cromatográfica (Coluna) é o local onde ocorre a separação da amostra que é introduzida através de um injetor (Injetor) que se localiza entre a bomba e a coluna. A composição do efluente que passa pela coluna gera sinais elétricos através de um detector (Detector) e esses sinais são compilados em um processador de dados (Data acquisition), um computador, que os transforma em um conjunto de picos conhecido como cromatograma (CZAPLICKI, 2013).

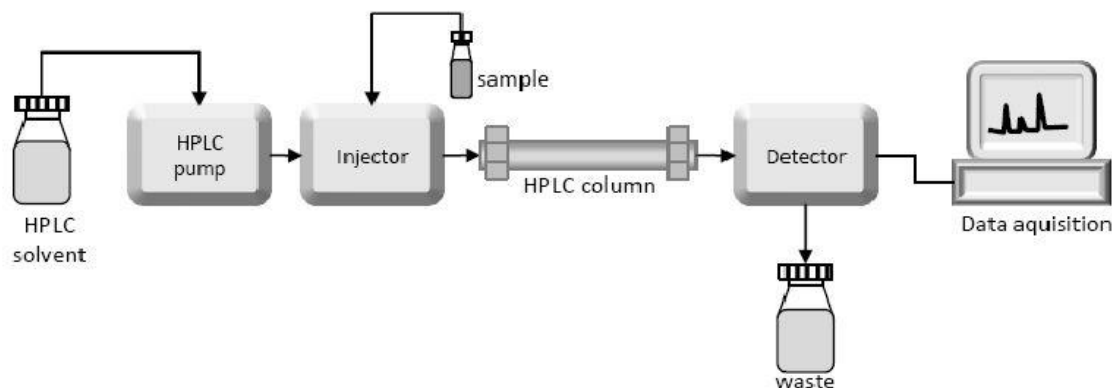


Figura 12. Representação de um equipamento de HPLC (CZAPLICKI, 2013).

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

A coluna cromatográfica é feita de um material inerte que resiste a todas as pressões em que ela vai ser usada. A capacidade da coluna é determinada pelo comprimento, diâmetro e pelo material de recheio. As colunas geralmente utilizadas são: octadecil (C18, RP18, ODS), octil (C8, RP8), CN (cianopropil) e NH₂ (amina).

Quanto aos detectores, não existe um que apresente todas as propriedades para que ele seja ideal para HPLC. Não são versáteis, ou universais, mas existem

detectores que apresentam ampla faixa de aplicações. A sensibilidade de um detector é determinada a partir da relação entre o sinal produzido e a quantidade de amostra que gera este sinal. A linearidade é a faixa linear do sistema, onde o sinal do detector é diretamente proporcional à concentração do soluto (CASS; DEGANI, 2001)

Os detectores mais empregados na HPLC são os fotométricos, baseados na absorvância no ultravioleta e no visível. Os detectores de fluorescência, utilizados como métodos de detecção específica, são sensíveis para substâncias que fluorescem. Este tipo de detector pode detectar quantidades da ordem picograma. Também são utilizados detectores por índice de refração, os quais acompanham continuamente a diferença no índice de refração entre a fase móvel pura e o efluente que sai da coluna contendo os componentes da amostra. A resposta deste detector é moderada, geralmente de ordem micrograma. (MEYER, 2013).

2.12 Eletroforese Capilar

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

Nos últimos anos, a eletroforese capilar tem sido reconhecida como uma das maiores inovações na área de separações, com aplicação em diversos campos da química analítica. As publicações de Everaerts e de Jorgenson são comumente citadas como ponto inicial da eletroforese capilar moderna. Desde então, os instrumentos comerciais de CE se desenvolveram e o número de aplicações e publicações que utilizam a técnica têm aumentado progressivamente (JORGENSEN; LUKACS, 1981).

A eletroforese capilar consiste de dois reservatórios que contêm uma solução tampão idêntica e que são conectados entre si por meio de um tubo capilar de sílica fundida, preenchido com a mesma solução tampão, a qual é denominada eletrólito. Em cada reservatório é mantido um eletrodo de platina que o conecta a uma fonte de alta tensão que fornece a diferença de potencial

requerida para a separação dos analitos. A mobilidade eletroforética dos íons é determinada por carga/tamanho (GERVASIO *et al.*, 2003). A Figura 13 representa uma montagem típica em eletroforese capilar. Neste exemplo, aplica-se uma voltagem de ~30kV entre os extremos de uma solução contida num capilar de sílica fundida, de 50 cm de comprimento e diâmetro interno 25 a 75 μm .

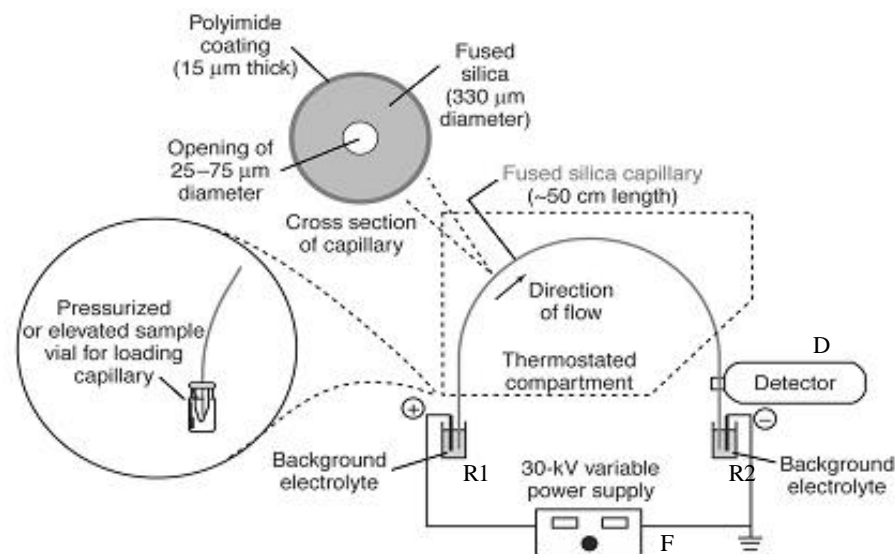


Figura 13- Diagrama esquemático do sistema CE. R1 e R2 são os recipientes contendo solução eletrolítica onde se encontram os eletrodos (e1 e e2) conectados à fonte de potência (F). A detecção radial da absorção molecular é representada por uma fonte de radiação (ν) e um detector (D) acoplado a um computador. (GERVASIO *et al.*, 2003).

A injeção de amostra, na eletroforese capilar, pode ser feita por: injeção hidrodinâmica e eletrocinética. Na injeção hidrodinâmica utiliza-se uma gradiente de pressão, é feita aplicando-se pressão pela introdução de um gás inerte no reservatório contendo a amostra ou pela aplicação de vácuo no reservatório que contém a solução tampão na outra extremidade do capilar. A injeção por sifonagem é feita pelo deslocamento de líquido provocado pela diferença de altura dos reservatórios de amostra e tampão. Na injeção eletrocinética um gradiente de alta tensão é aplicado na amostra durante um curto período de injeção, é feita pela aplicação de um potencial, geralmente entre 5 e 15 kV, por alguns segundos. (SANTOS; TAVARES and RUBIM, 2000)

Após a injeção das amostras, o reservatório do tampão é repostado. A eletroforese capilar é realizada em tubos com dimensões capilares, tipicamente 25-75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo. O uso do capilar apresenta numerosas vantagens, particularmente por favorecer a dissipação de calor, que é causado pela passagem de corrente através do meio condutor (efeito *Joule*). Um dos fatores desfavoráveis decorrentes do efeito *Joule* é que moléculas localizadas na região central do meio de separação migrarão mais rapidamente do que as moléculas localizadas nas bordas, causando o efeito de dispersão de zona (TAVARES, 1997).

Altas temperaturas também podem causar degradação térmica de algumas moléculas, principalmente proteínas. A alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados (10-30kV), resultando em separações de alta eficiência e baixo risco para o operador, uma vez que as correntes são de no máximo de 100 μA (TAVARES, 1997).

2.12.1 Modos de separação em eletroforese capilar

Durante décadas passadas, a eletroforese capilar e suas muitas variantes têm demonstrado serem técnicas de grande poder de separação, entre as principais técnicas se encontram:

2.12.1.1 Eletroforese Capilar de Zona (CZE)

Técnica de separação efetuada em capilares e baseada somente nas diferenças entre as mobilidades de espécies carregadas (analitos), em eletrólitos que podem ser aquosos ou orgânicos. Estes podem conter aditivos, como ciclodextrinas, complexantes ou ligantes, que interagem com os analitos e alteram suas mobilidades eletroforéticas (SILVA *et al.*, 2007a).

A CZE é um dos modos de separação eletroforética mais usados na prática, provavelmente em razão da sua fácil implementação, e otimização das condições experimentais. Em CZE, o tubo capilar é simplesmente preenchido com um eletrólito, geralmente com características tamponantes. A separação ocorre como

resultado de duas estratégias: maximizar as diferenças entre as mobilidades efetivas dos solutos e minimizar as causas de alargamento das zonas (SILVA *et al.*, 2007a).

As equações discutidas a seguir são aplicáveis à eletroforese capilar de zona praticada em capilares de sílica fundida.

Quando uma espécie carregada eletricamente é exposta a um campo elétrico, essa migra com velocidade (v_i) característica que é proporcional ao campo elétrico aplicado (E) e a soma das mobilidades eletroforéticas do analito (μ_{ep}) e do fluxo eletrosmótico (μ_{eof}), como mostra a Equação 1.

$$v_i = (\mu_{ep} + \mu_{eof}) E$$

Equação 1. Velocidade de migração em eletroforese capilar.

Para soluções de eletrólitos compostos de um ácido ou base, fracos, existem pelo menos duas espécies em equilíbrio, a molécula não ionizada (com mobilidade zero), e a base ou ácido conjugado, cada qual com um valor particular de mobilidade. Assim, da mesma forma que os íons simples são caracterizados por um valor de mobilidade iônica, o conceito de mobilidade efetiva é utilizado para descrever a migração de eletrólitos fracos. A mobilidade eletroforética efetiva (μ_{ef}) de um analito é dada pela somatória das mobilidades eletroforéticas (μ_j) de todas as n espécies relacionadas entre si por equilíbrios químicos, multiplicadas pela distribuição destas espécies (α_j):

$$\mu_{ef} = \sum_{j=1}^n \alpha_j \cdot \mu_j$$

Equação 2. Mobilidade eletroforética efetiva.

A Equação 2 mostra que a mobilidade efetiva depende diretamente do grau de dissociação do composto que se apresente em equilíbrio ácido-base num dado pH. Por exemplo, a cocaína apresenta pKa igual a 8,6 em uma solução aquosa de pH igual a este valor, metade das moléculas presentes na solução estarão

dissociadas e por isso terão mobilidade, e as moléculas que estiverem não dissociadas não migraram. Assim, a mobilidade efetiva desta substância será 50% do valor de sua mobilidade iônica (se todas as espécies estivessem dissociadas) (SILVA *et al.*, 2007a).

A equação tradicional que descreve o tempo de migração (t_i) em CZE pode ser escrita como:

$$t_i = \frac{L_{ef} \cdot L_{tot}}{(\mu_{ep} + \mu_{eof}) \cdot V}$$

Equação 3. Tempo de migração em CZE.

Onde V é a diferença de potencial aplicada, L_{tot} é o comprimento do capilar, e o L_{ef} é a distância do ponto de injeção à posição do detector.

2.12.1.2 Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC)

A cromatografia eletrocinética micelar foi introduzida por Terabe em 1984, voltada para separação de misturas contendo solutos neutros. Em MEKC, agentes tensoativos iônicos (dodecilsulfato de sódio – SDS), em condições favoráveis permite a formação de micelas, os tensoativos são adicionados ao eletrólito de corrida, proporcionando um sistema cromatográfico de duas fases. Desse modo o eletrólito representa a fase primária, a qual é transportada electrosmóticamente pela ação do campo elétrico, enquanto que as micelas que representam a fase secundária são transportadas pela combinação da eletroforese e eletrósmose. A partição diferenciada de solutos neutros entre as duas fases é responsável pela seletividade da separação (SILVA *et al.*, 2007a)

2.13 Comparação de CE com outras técnicas

A CE apresenta-se como técnica analítica complementar à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e à cromatografia gasosa (GC). A Tabela 2 apresenta uma comparação entre estas três técnicas de separação. Deve-se

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

Tabela 2 Comparação entre as principais técnicas de separação utilizadas em toxicologia forense (adoptado de Picó y Mañes 2003).

Técnica	Vantagens	Desvantagens	Soluções
GC	Alta capacidade de separação dos picos Alta sensibilidade e seletividade	Inadequada para análise de compostos polares, termolábeis e de baixa volatilidade; Consumo de gases de alta pureza	Uso de reações de derivatização.
HPLC	Permite a análise de compostos orgânicos, Maior flexibilidade para otimização das separações, por permitir a variação tanto da fase móvel e fase estacionária;	Grande consumo de solventes orgânicos; Elevado custo operacional (exige o uso de colunas e solventes caros de alta pureza)	Desenvolvimento de colunas analíticas mais eficientes e de menor tamanho, permitindo melhores separações e menor consumo de solventes.
CE	Alta capacidade de separação; Baixo consumo de solventes; Menor necessidade de preparo de amostras	Baixa sensibilidade.	Pré-concentração das amostras; Utilização de detectores altamente seletivos (como os detectores de fluorescência induzida a laser ou espectrômetros de massas).

2.14 Referencias para quantificação dos fármacos por cromatografia líquida.

Foi realizada uma pesquisa dos métodos de quantificação por HPLC para o diclofenaco de sódio e a dexametasona (Tabelas de 3 a 6).

Tabela 3. Condições de trabalho utilizadas para a determinação e quantificação do diclofenaco de sódio por cromatografia líquida.

Diclofenaco de Sódio

Coluna	Equipo	Fase móvel	λ	Referencia
C-8 , 5 μ m (120×4mm I.D., 7 μ m).	HPLC model 114 M (Beckman Instrument, Switzerland)	Acetonitrila:Água (50:50% v/v) pH3,3 ajustado com acido acético, 2mL min ⁻¹	280 nm	(EL-SAYED <i>et al.</i> , 1988)
Separon SGX C-18 (150×3.3 mm I.D., 7 μ m)	Spect 100 (Thermo Separation Products, Santa Clara,A).	Metanol – Tampão fosfato pH 6.5 (110:100)	284 nm	(KLIMEŠ <i>et al.</i> , 2001)
C18, 125 mm x 4 mm i.d. column (Sigma–Aldrich)	Waters 486 (Waters, Milford, MA)	Metanol: tampão fosfato pH 2.5 (65:35, v/v)	245 nm	(HÁJKOVÁ <i>et al.</i> , 2002)
Eclipse XDB-C18 HPLC(150 mm x 4.6 mm, 5 μ m)	Agilent Technologies 1200 series	Tampão fosfat metanol (30/70 % v/v) pH 2,5	280 nm	(DAVARANI <i>et al.</i> , 2012)
Hypersil BDS, C18 (250mmx 4.6mm;5m)	Analytical Technologies Limited (Gujarat,India).	Acetonitrila:Metanol (70:30, v/v). 1.0 ml min ⁻¹	276 nm	(BHATTACHAR YA <i>et al.</i> , 2013)
HiQ C18HS column (5 μ , 4.6mmX250mm)	HPLC Shimadzu LC-2010	Tampão de acetato de amónio (10 mmol L ⁻¹ , pH 4,5 e 0,1% de TEA v /v) e metanol (40:60 v/v)	273 nm	(KHANVILKAR <i>et al.</i> , 2013)

Tabela 4. Condições de trabalho utilizadas para a determinação e quantificação do da dexametasona por cromatografia liquida.

Dexametasona				
Coluna	Equipo	Fase móvel	λ	Referencia
MetaSil silano octadecil (250x 4.6 mm, 5 μ m)	Shimadzu LC-10 (Shimadzu, Kyoto, Japan).	Metanol: Água (65:35v/v), 1mlmin ⁻¹ . 25 °C.	254 nm	(GARCIA <i>et al.</i> , 2003)
Hypercarb (30mmx2.1mm, 5 μ m).	LC/MS system (Thermo-Finnigan, USA)	Acetonitrila/ água/ acido formico (95:5:0.5, v/v/v), 0.2mL min ⁻¹ . 30 °C.	240 nm	(LUO <i>et al.</i> , 2005)
Discovery C-18 column (150X4.6 mm,5 μ m)	LDC analytical spectromonitor 3200	ACN: Água (28:72% v/v), pH 2.3 e fluxo de 1.2 mL min ⁻¹ .	254 nm	(KUMAR <i>et al.</i> , 2006)
C8-Hydrobond AQ column (3 μ m, 2.1x150 mm)	5500 varian (Walnut Creek, California, USA)	Gradiente fase móvel A (buffer 10 mmol L ⁻¹ formato de amonio) fase movel B (ACN). 40:60 v/v por 4,5min e 10:90 por 6 min	254 nm	(SAMTA NI; JUSKO, 2007)
ACE Phenyl column (10 cm x 4.6 mm, 3 μ m)	Hitachi LaChrom Elite HPLC system	Gradiente, fase móvel A (Água: ACN, 90:20) fase movel B (ACN: Isopropanol, 80:20) 30°C	240 nm	(XIONG; XIAO; RUSTUM , 2009)
(Kyoto, Japan) Hypersil C 8 column (250 X 4.6 mm, 5 μ m)	Shimadzu LC-20A system	Tampão fosfato 0.02 mol L ⁻¹ : metanol, 40:60 v/v, 25°C	270 nm	(RAZZA Q <i>et al.</i> , 2013)

2.15 Referências para quantificação por eletroforese capilar dos fármacos.

Tabela 5. Condições de trabalho utilizadas para a determinação e quantificação do da dexametasona por eletroforese capilar.

Coluna	Eletrolito	pH	λ (nm)	Voltage m	T(min)	Referencia
65cmx50 μ m* 50cm ao detetor	Buffer borato-fosfato 20 mmol L ⁻¹ com cholate sódio 100 mmol L ⁻¹ .	9	210	20KV	13	(NISHI <i>et al.</i> , 1990)
65cmx50 μ m* 50cm ao detetor	20 mmol L ⁻¹ fosfato-borato com 50 mmol L ⁻¹ SDS, 4 mol L ⁻¹ urea e 15 mmol L ⁻¹ Gama ciclodextrina.	9	220	20KV	12	(NISHI; MATSUO, 1991)
57cmx75 μ m* 50cm ao detetor	MeOH:Buffer (10:90) Buffer Borato 40 mmol L ⁻¹ com SDS 20 mmol L ⁻¹ .	9,2	240	30KV	13,8	(GU; MELEKA- BOULES; CHEN, 1996)
33.5cm 25cm ao detetor	ACN:TRIS 25 mmol L ⁻¹ ; H2O (60:20:20)	-	200	30KV	5,2	(DITTMANN <i>et al.</i> , 1997)
64.5cmx50 μ m* 56cm ao detetor	Tetraborato Sódio 100 mmol L ⁻¹	9,2	242	25KV	7.05	(BAEYENS <i>et al.</i> , 1997).
70cmx 75 μ m, 47 cm ao detetor	57.0 mmol L ⁻¹ sodium phosphate buffer	7	240	17.2 kV	17	(CANDIOTI <i>et al.</i> , 2006)
64.5cmx50 μ m* 56cm ao detetor	20 mmol L ⁻¹ ammonium acetate	9.6	247	30KV	11,2	(SIRÉN; SEPPÄNEN- LAAKSO; OREŠIČ, 2008)

Tabela 6. Condições de trabalho utilizadas para a determinação e quantificação do da dexametasona por eletroforese capilar.

Coluna	Eletrolito	pH	λ (nm)	Voltagem	T(min)	Referencia
58,7cmx75 μ m, 50cm ao detector	MeOH:Buffer (3:97), Buffer NaH ₂ PO ₄ 40 mmol L ⁻¹ com SDS 104 mmol L ⁻¹	8	254	20KV	18.5	(MABOUND OU <i>et al.</i> , 1994).
58,7cmx75 μ m, 50cm ao detector	Buffer fosfato *KH ₂ PO ₄ e KH ₂ PO ₄ 50 mmol L ⁻¹	7	200	30KV	10	(MRESTANI ; NEUBERT; KRAUSE, 1998)
50 cmx75 μ m, 28 cm ao detector	50 mmol L ⁻¹ tetraborate buffer	9,2	276	20kv	4 min	(MARÍA S AURORA-PRADO, 2002)
30cmx 50 μ m	25 mmol L ⁻¹ sodium tetraborate	9.3	200 e 214	28kv	1,5	(LACHMAN N; KRATZEL; NOE, 2012)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver nanopartículas de PLGA contendo diclofenaco de sódio e dexametasona; caracterizá-las físico-quimicamente e determinar a eficiência de encapsulação dos fármacos por cromatografia liquida de alta eficiência e eletroforese capilar.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterização físico-química dos padrões (diclofenaco de sódio e dexametasona).

- Desenvolvimento das nanopartículas pelo método emulsificação-
evaporação do solvente, utilizando delineamento experimental para obter a
melhor formulação.
- Caracterização físico-química das nanopartículas (pH, SEM, TEM, DLS, IR).
- Desenvolvimento e validação dos métodos de HPLC e CE, segundo as
diretrizes ICH e USP, para determinar a eficiência de encapsulação do
diclofenaco de sódio e dexametasona nas nanoesferas de PLGA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Solventes e reagentes:

Além dos solventes reagentes comumente utilizados no laboratório foram utilizados os seguintes: Acetato de etila, acetonitrila e metanol grau HPLC (Merck), , Poli-(D,L-láctico-co-glicólico) PLGA 50:50 (MW: 30-38kDa) Resomer® RG 504 (Boehringer Ingelheim), surfactante Pluronic® F68 (average MW 8350 Da, Sigma-Aldrich), álcool polivinílico (PVA, PM 49000) Mowiol® (Aldrich). O agente de contraste para microscopia Phosphotungstic Acid Hydrate (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)

4.1.2 Substâncias ativas:

- Diclofenaco de sódio (Sigma Aldrich).
- Dexametasona (Sigma Aldrich).

4.1.3 Substâncias utilizadas para encontrar o padrão interno:

- Furosemida (Sigma Aldrich).
- Acido salicílico (Sigma Aldrich).
- Niacinamida (Sigma Aldrich).
- Lidocaína (Sigma Aldrich).

4.1.4 Equipamentos

Sonicador S-150D (Branson, Canada), 90Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven, USA). Inspect™ F50 Scanning Electron Microscope (FEI, USA), Spectrafuge™ 24D Digital Microcentrifuge (Labnet, USA), Balança analítica Mettler modelo AB204 (Mettler Toledo, USA), pHmêtro digital modelo PG1800 (Gehaka, USA), espectrofotômetro UV-1203 (Shimadzu Corporation, Japan), sistema de calorimetria exploratória diferencial Mettler Toledo TGA/SDTA, Espectrofotômetro de infravermelho VERTEX 70 Series FT-IR Spectrometers. Cromatografo a liquido HPLC (Waters Instrument 2690 Alliance, USA). Equipamento de eletroforese capilar Beckman and Coulter P/ACE MDQ equipado com detector UV-VIS com arranjo de diodos.

4.2 Métodos

4.2.1 Caracterização dos padrões

Os padrões (DS e DEXA) foram submetidos a testes preliminares de identificação e caracterização físico-química, com a finalidade de avaliar as condições de trabalho para uso com segurança nos procedimentos experimentais. A identificação foi realizada através da determinação do ponto de fusão, técnicas de espectrofotometria de absorção no ultravioleta (UV), infravermelho (IR) e análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC).

4.2.1.1 Ponto de fusão

As amostras dos fármacos foram colocadas em um tubo capilar de vidro com uma das extremidades selada até cerca de 3,0 mm de altura em aparelho convencional de ponto de fusão. Começou-se a aquecer a uma razão de 5°C/min; quando a temperatura chegou a 10°C abaixo do início de fusão teórico da amostra, reduziu-se a velocidade de aquecimento a cerca de 1°C/min. A temperatura na qual a amostra funde sobre a parede do tubo é definida como o

início da fusão e a temperatura na qual a amostra torna-se completamente líquida é definida como o final de fusão ou o ponto de fusão (USP-NF, 2011).

4.2.1.2 Espectrometria de absorção na região do ultravioleta (UV).

A identificação espectrofotométrica foi realizada mediante a espectroscopia no ultravioleta, realizando varredura de 200 a 600 nm. O espectro de absorção foi obtido mediante preparo de uma solução dos fármacos (diclofenaco de sódio e acetato de dexametasona) na concentração de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol e depois foram comparados com os máximos de absorção descritos na literatura.

4.2.1.3 Espectroscopia vibracional de absorção na região do Infravermelho.

A identificação foi realizada mediante a espectroscopia no Infravermelho, realizando varredura de 200 a 600 nm. O espectro de absorção foi obtido utilizando-se o equipamento VERTEX 70 Series FT-IR Spectrometers e depois foram comparados com os máximos de absorção descritos na literatura.

4.2.1.4 Calorimetria exploratória diferencial

A análise térmica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada utilizando-se o equipamento Mettler Toledo TGA/SDTA 851e. Para as análises, cerca de 5,0 mg das amostras de diclofenaco de sódio e dexametasona foram acondicionadas em suporte de alumínio com tampa lacrada, submetidas à taxa de aquecimento de $10 \text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, avaliando desde temperatura ambiente (25°C) até 400°C .

4.2.2 Desenvolvimento das nanopartículas pelo método emulsificação- evaporação do solvente.

4.2.2.1 Desenvolvimento do método de elaboração das nanopartículas de PLGA por emulsão simple (o/w).

Foi utilizada uma metodologia baseada na técnica de “emulsificação-
evaporação de solvente” com algumas modificações (FILLAFER *et al.*, 2008a),
(HARIHARAN *et al.*, 2006).

Antes da elaboração de nanopartículas carregadas com fármaco, foi otimizado o procedimento da emulsão simple, em nanopartículas vazias (sem fármaco). Foram estudados, surfactante, solvente e parâmetros de sonicação, com o objetivo de encontrar um tamanho adequado (< 1000nm), homogêneo e monodisperso.

Surfactante

As nanopartículas foram sintetizadas com os estabilizadores Pluronic F-68 e álcool polivinílico (PVA). O surfactante Pluronic F68 foi adicionado à fase orgânica em quanto o PVA foi adicionado na fase aquosa.

Solvente

Foram testados dois solventes para serem utilizados na fase orgânica da sínteses das nanopartículas: acetona e acetato de etila (AcE).

Parâmetros de sonicação

Na sonicação foi utilizado o equipamento Branson Digital Sonifier 450: 400 W, 20 KHz, e foram testadas diferentes amplitudes: 10, 20, 30, 40, 50, 60%

4.2.2.2 Método de elaboração das nanopartículas de PLGA por emulsão simple (o/w).

Logo depois de otimizar o processo de obtenção das partículas placebo, as nanopartículas foram carregadas com fármaco e foi utilizado o mesmo processo de obtenção.

Para a preparação das nanopartículas foi feita uma fase orgânica, onde o PLGA (50 mg) e o tensoativo Pluronic® F68 (150 mg) foram dissolvidos em acetato de etila (quando as nanopartículas foram carregadas com os fármacos, eles foram dissolvidos em acetato de etila: metanol (9:1) e foram misturados na fase orgânica em agitação magnética por 10 minutos). Em seguida 10mL de água MilliQ foram adicionados à fase orgânica e a mistura resultante foi sonicada num banho de gelo por 25 segundos com um sonicador (Digital Sonifier 450, Branson, USA) a 40 % de amplitude. (Figura 14) Para a eliminação do solvente foi deixado em agitação magnética (600rpm) dum dia para outro. Logo, as nanopartículas foram lavadas três vezes por centrifugação (10.000rpm, 15min) com água para retirar o fármaco adsorvido nas paredes. Os sobrenadantes foram recolhidos para ser quantificados e encontrar a eficiência de encapsulação. Foram feitas três replicatas.

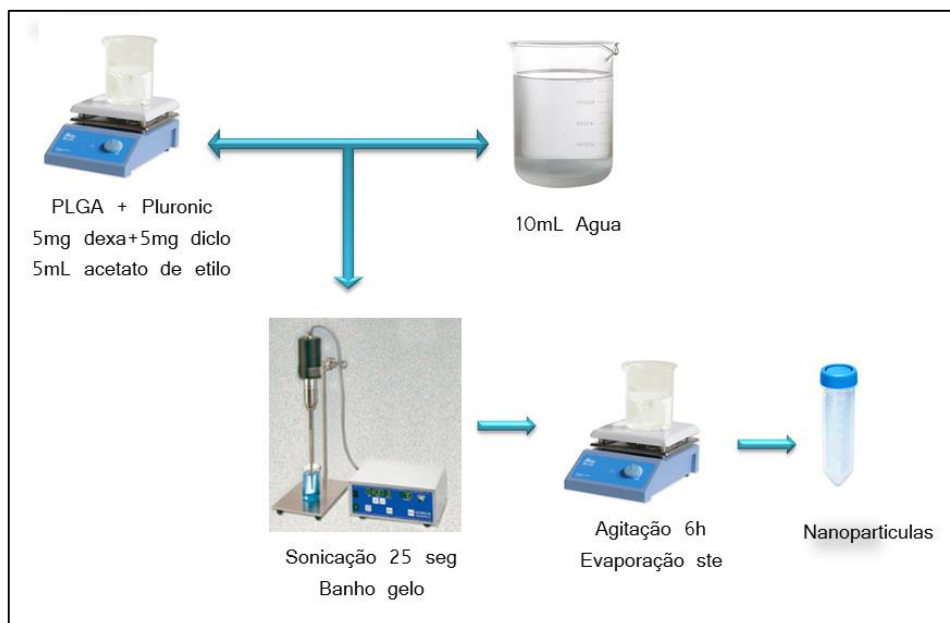


Figura 14. Procedimento de elaboração das nanopartículas pelo método de emulsão-evaporação do solvente.

Para poder aperfeiçoar o método de obtenção das NPs foi feito um estudo experimental no *software Minitab 15®*, o estudo tinha dos níveis e três variáveis como se mostra na Tabela 7; se mantiveram fixas a quantidade de fármaco (10,0

mg de diclofenaco e 10,0 mg de dexametasona), amplitude de sonicação (40%) e relação fase orgânica: fase aquosa (FO:FA) (1:2).

Tabela 7. Variáveis no estudo fatorial, sendo FO (Fase Orgânica) e FA (Fase Aquosa).

Variáveis		Níveis	
		-	+
A	Relação Fármaco: Polímero	1:05	1:10
B	Tempo de sonicação	25 seg	35 seg
C	% Surfactante (m/v)	3	5

Na realização do estudo experimental foram realizados 8 ensaios, de acordo com o modelo obtido no *software MiniTab 15®* as diferentes condições podem se observar na Tabela 8.

Tabela 8. Condições experimentais para o estudo fatorial.

amostra	farmaco:polimero	Tempo sonicação (s)	Conc. do surfactante
1	01:05	25	3% (150mg em 5mL)
2	01:10	25	3% (150mg em 5mL)
3	01:05	45	3% (150mg em 5mL)
4	01:10	45	3% (150mg em 5mL)
5	01:05	25	5% (250mg em 5mL)
6	01:10	25	5% (250mg em 5mL)
7	01:05	45	5% (250mg em 5mL)
8	01:10	45	5% (250mg em 5mL)

4.2.3 Caracterização físico-química das nanopartículas.

Distribuição do tamanho de partícula:

A determinação do diâmetro das partículas e a sua distribuição (Índice de Polidispersão, IP) foram realizadas pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons ou Dynamic Light scattering. A fim de se obter o perfil de distribuição de cada formulação produzida, uma alíquota das suspensões de nanopartículas foram diluídas em água purificada (1:10) e analisadas com ângulo de espalhamento de 90° e temperatura de 25°C no equipamento 90 Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven, USA) representado na Figura 15. Todos os lotes de nanopartículas foram analisados por triplicata.



Figura 15 – Equipamento 90Plus Particle Size Analyzer.

Potencial zeta

O potencial zeta foi medido empregando equipamento 90 Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven, USA) (Figura 15). Uma suspensão de nanopartículas (150uL) é diluída em 1.5mL de solução de KCl 1 mmol L⁻¹ no pH 7,4 e foram efetuadas cinco corridas e 80 ciclos.

Microscopia eletrônica de varredura (SEM):

As imagens de Microscopia eletrônica de varredura foram obtidas num equipamento Inspect™ F50 Scanning Electron Microscope (FEI, USA) operando num voltagem de aceleração de 200V - 30 KV equipado com uma fonte Schottky Field Emission. (Figura 16).

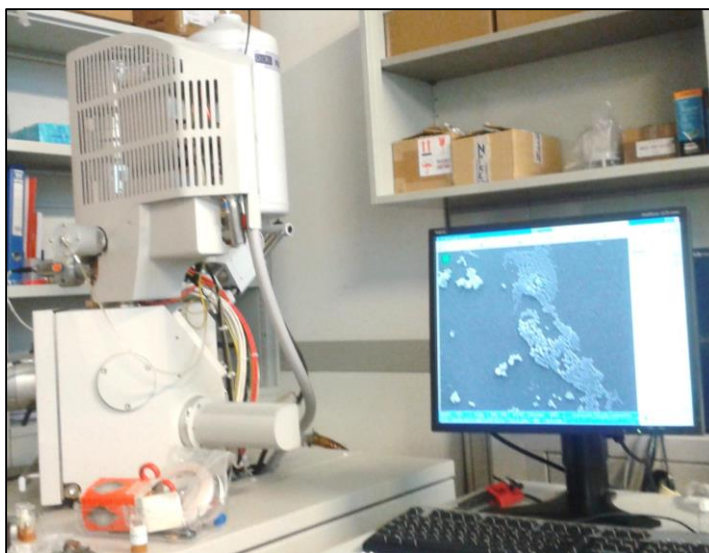


Figura 16 – Equipamento Inspect™ F50 Scanning Electron Microscope.

As nanopartículas em suspensão foram misturadas com o agente de tingimento (ácido fosfotúngstico 7% m/v), seguido de lavagem com água destilada. Em seguida, uma gota de nanopartículas em suspensão é depositada sobre placas de silício e posteriormente recoberta com uma camada de platina e sua morfologia examinada no Microscópio Eletrônico de Varredura Inspect™ F50.

Microscopia eletrônica de transmissão:

As imagens de Microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas num TENAI FEI T20 (FEI, Hillsboro, OR, USA) operado em modo de campo luminoso com uma voltagem de aceleração de 200kv. (Figura 17).

As nanopartículas em suspensão foram misturadas com o agente de tingimento (ácido fosfotúngstico 7% m/v), seguido de lavagem com água destilada. Logo analisadas no microscópio TENAI FEI T20.



Figura 17 – Equipamento TENAI FEI T20 electron microscope.

Espectrometria de absorção na região do Infravermelho

A técnica de Infravermelho foi utilizada para observar possível interação dos fármacos com o polímero. Os espectros de absorção foram obtidos utilizando-se o equipamento VERTEX 70 Series FT-IR Spectrometers. Foram avaliados os fármacos (diclofenaco de sódio e dexametasona), o polímero (PLGA) e uma mistura mecânica 1:1 dos fármacos com o polímero (5mg DS e DX: 5mg PLGA).

4.2.4 Método de quantificação dos fármacos diclofenaco de sódio e dexametasona nas nanopartículas por HPLC

Para a determinação da eficiência de encapsulação dos fármacos nas nanopartículas foi utilizado um HPLC (Waters Instrument 2690 Alliance, USA).

Para o desenvolvimento do método por HPLC foram realizadas pesquisas bibliográficas e testes de bancada com o objetivo de definir as condições mais adequadas para avaliação dos fármacos. O método implementado para a quantificação dos fármacos nas nanopartículas apresentou as seguintes condições cromatográficas (Tabela 9).

Tabela 9 – Condições cromatográficas para a avaliação da eficiência de encapsulação do DS e DEXA em nanopartículas poliméricas de PLGA

Condições Cromatográficas	
Fase móvel	Água: acetonitrila (50:50)
Coluna	C18, 2.6um, 75x4.6mm Phenomenex kinetex
Fluxo	0.4mL/min
Temperatura	40°C
Volume de injeção	20µL
Longitude de onda	λ : 260nm

4.2.5 Método de quantificação dos fármacos diclofenaco de sódio e dexametasona nas nanopartículas por CE.

No caso do desenvolvimento do método por eletroforese capilar foram realizadas pesquisas bibliográficas e testes de bancada com o objetivo de definir quais são as condições mais adequadas para avaliação dos fármacos por CE. As condições trabalhadas para a determinação dos fármacos nas nanopartículas encontrassem na Tabela10.

Tabela 10 – Condições de eletroforese capilar para a avaliação da eficiência de encapsulação do DS e DEXA em nanopartículas poliméricas de PLGA

Coluna capilar	Sílica fundida 30,2 cm de comprimento total (20 cm até o detector), 50 um d.i.
Voltagem	20 KV
Detecção	239 nm
Eletrolito	20,0 mmol L ⁻¹ TBS, 20,0 mmol L ⁻¹ SDS, 5% Metanol, pH 9,2

4.2.6 Validação dos métodos analíticos para avaliar a eficiência de encapsulação de nanopartículas de PLGA contendo DS e DEXA por HPLC e CE.

As validações dos métodos analíticos estão apresentadas a continuação.

Linearidade

No calculo de linearidade, foram utilizadas soluções dos padrões na faixa de 50 % a 150% da concentração nominal (para o diclofenaco de sódio e para dexametasona) a partir das soluções estoque dos padrões. As curvas analíticas foram construídas a partir dos resultados das áreas dos picos obtidos dessas injeções vs concentrações. Foram realizadas 3 curvas analíticas.

Especificidade

A especificidade foi avaliada injetando as soluções de amostra e a solução placebo, foram avaliadas as interferências das matérias-primas utilizadas na preparação das nanopartículas de PLGA, A análise foi realizada por meio de observação visual dos cromatogramas e eletroferogramas obtidos.

Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os métodos de quantificação foram determinados através do desvio padrão médio (DPM) da resposta de diferentes concentrações e da inclinação (S) da curva de calibração conforme as Equações . Foram efetuadas três leituras para cada concentração.

$$LD = \left[\frac{3 \times DPm}{S} \right]$$

Equação 4. Limite de detecção.

$$LQ = \left[\frac{10 \times DPm}{S} \right]$$

Equação 5. Limite de quantificação.

Precisão do método

A precisão por repetibilidade foi determinada para avaliar a proximidade dos resultados obtidos em uma serie de medidas. Foram utilizadas amostras, em injeção única, em replicas de 9.

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

Equação 6. Coeficiente de variação.

Onde: CV = Coeficiente de variação

DP = Desvio padrão

CMD = Concentração media determinada em porcentagem

4.2.7 Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação, do diclofenaco de sódio e dexametasona, foi realizada utilizando duas técnicas analíticas.

Quantificação por HPLC: Foi determinada a eficiência de encapsulação pelo método indireto, este método determina a concentração de fármaco não associado ao sistema carreador, após um análise do sobrenadante resultante do processo de lavagem e centrifugação das formulações.

Primeiramente foi tomada uma alíquota de nanosuspensão (1.5mL) e as nanopartículas foram centrifugadas e a seguir lavadas três vezes com água, em seguida os sobrenadantes foram recolhidos (fármaco não encapsulado nas nanopartículas). (Figura 18)

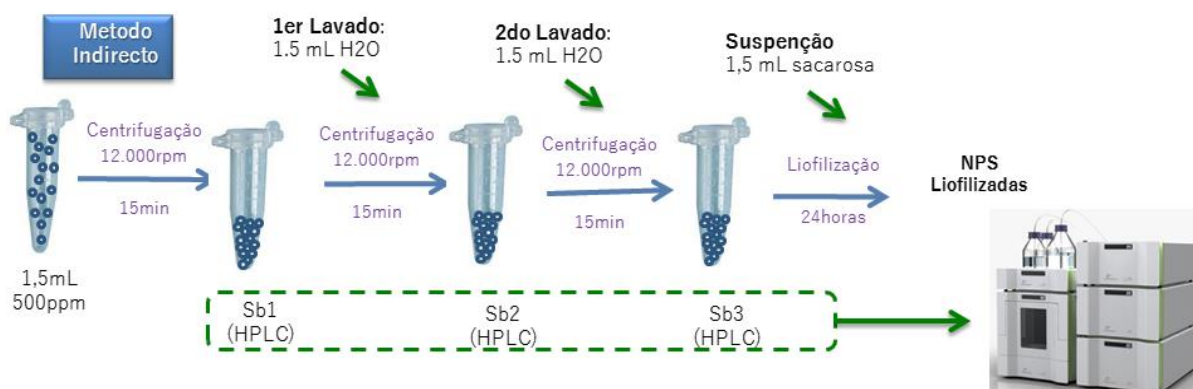


Figura 18. Representação gráfica da quantificação dos fármacos encapsulados pela técnica de HPLC.

Os sobrenadantes foram diluídos (1:2) em metanol e água (50: 50 v/v), filtração em membrana de poro 0,22um e analisados por HPLC (método validado). As análises foram realizadas em triplicada.

A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada a partir da seguinte equação (Equação 7).

$$EE\% = \frac{(Fco\ inicial - Fco\ livre)}{Fco\ inicial} \times 100$$

Equação 7. Eficiência de encapsulação.

Onde, *Fco inicial* corresponde à concentração de fármaco (Diclofenaco ou Dexametasona) adicionada inicialmente à formulação e, *Fco livre* é a concentração do fármaco não incorporado à partícula quantificada por HPLC. Os valores de EE% foram expressos por media e DP.

Quantificação por CE: Foi determinada a eficiência de encapsulação pelo método direto, este método determina a concentração de fármaco encontrado associado ao sistema carreador.

Como se apresenta na Figura 19, foram pesadas 20mg de NPs e abertas com 1,0 mL de uma solução de NaOH 0,1M, logo foram adicionados 0,5mL de metanol para a precipitação do polímero, logo é ajustado o pH da amostra com H₂PO₄, a solução é centrifugada para separar o polímero, o sobrenadante é filtrado em membrana de poro 0,22um e analisada por CE (método validado) a partir da equação da reta da curva analítica dos fármacos. As análises foram realizadas em triplicada. A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada a partir da Equação 7.

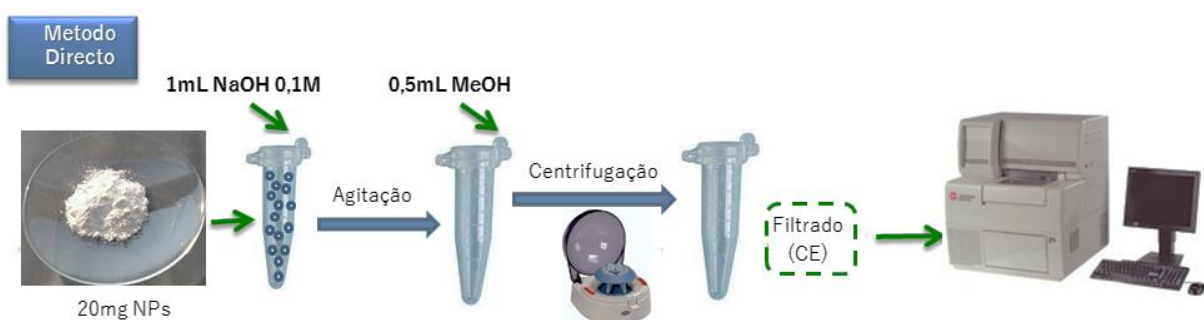


Figura 19. Representação gráfica da quantificação dos fármacos encapsulados pela técnica de CE.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização e identificação dos fármacos.

Temperatura de fusão:

Os resultados apresentados na Tabela 11 mostram que as faixas de temperatura se encontram dentro dos limites estipulados pela literatura (O'NEIL, 2013).

Tabela 11. Pontos de fusão teórico e encontrados para os padrões de diclofenaco de sódio e dexametasona.

Fármaco	Ponto de fusão na literatura (°C)	Ponto de fusão experimental (°C)
Diclofenaco de sódio	283-285	284-285
Dexametasona	268-270	268- 271

Espectrofotometria no ultravioleta (UV):

Os espectros de absorção para o diclofenaco de sódio e a dexametasona obtidos na varredura de 200 a 600 nm podem ser observados na Figura 20 e Tabela 12. Os comprimentos de onda máximos ($\lambda_{\text{máx}}$) correspondem aos encontrados na literatura (O'NEIL, 2013).

Tabela 12. Comprimentos de onda teórico e experimental dos padrões de diclofenaco de sódio e dexametasona.

Fármaco	$\lambda_{\text{máx}}$ literatura (metanol)	$\lambda_{\text{máx}}$ experimental (metanol)
Diclofenaco de sódio	283 nm	280,1 nm
Dexametasona	239 nm	234 nm

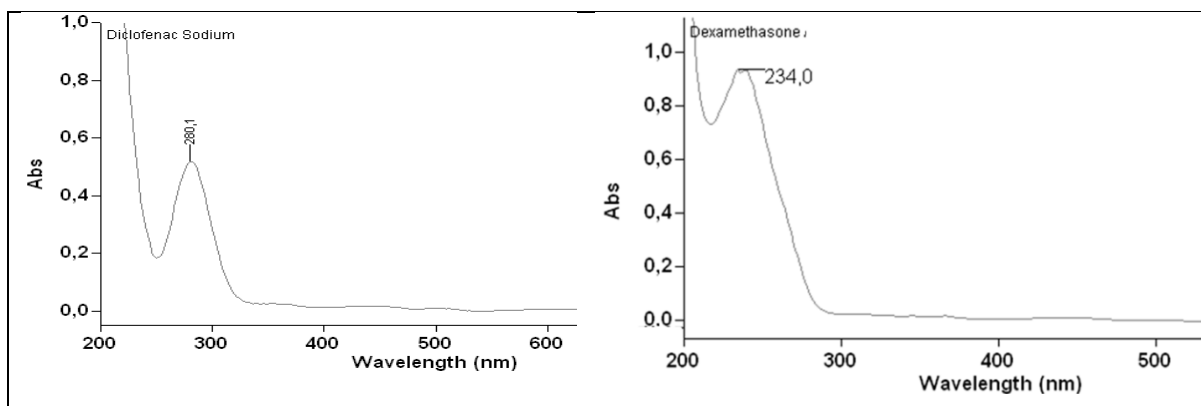


Figura 20. Espectros de absorção obtidos na região do UV dos fármacos (DS e DX).

Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV):

Experimentos de absorção na região do IV foram conduzidos utilizando equipamento VERTEX 70 Series FT-IR Spectrometers. As Figuras 21 e 22 apresentam os resultados obtidos.

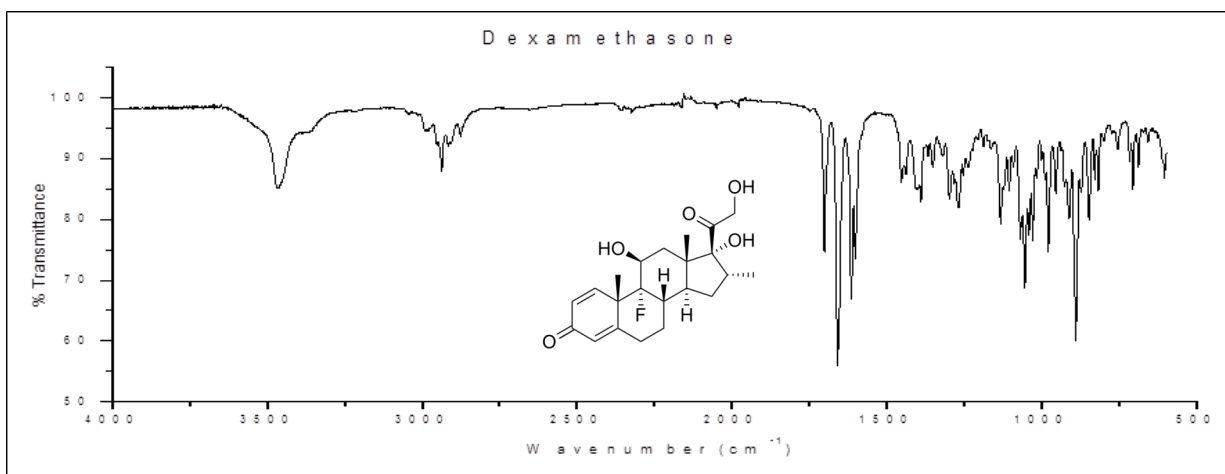


Figura 21. Espectro de absorção do dexametasona na região do infravermelho (IV).

A Tabela 13 mostra as bandas do espectro de absorção na região do IV dexametasona.

Tabela 13. Bandas do espectro de absorção no IV da dexametasona.

ν (cm ⁻¹)	Atribuição
3400 - 3675	Deformação axial da ligação O-H. ligações de H intramoleculares.
3000 – 3050	Deformação axial da ligação C-H aromáticos.
2850 – 3000	Deformação axial da ligação C-H, alifáticos.
1700	Deformações do carbonilo C=O

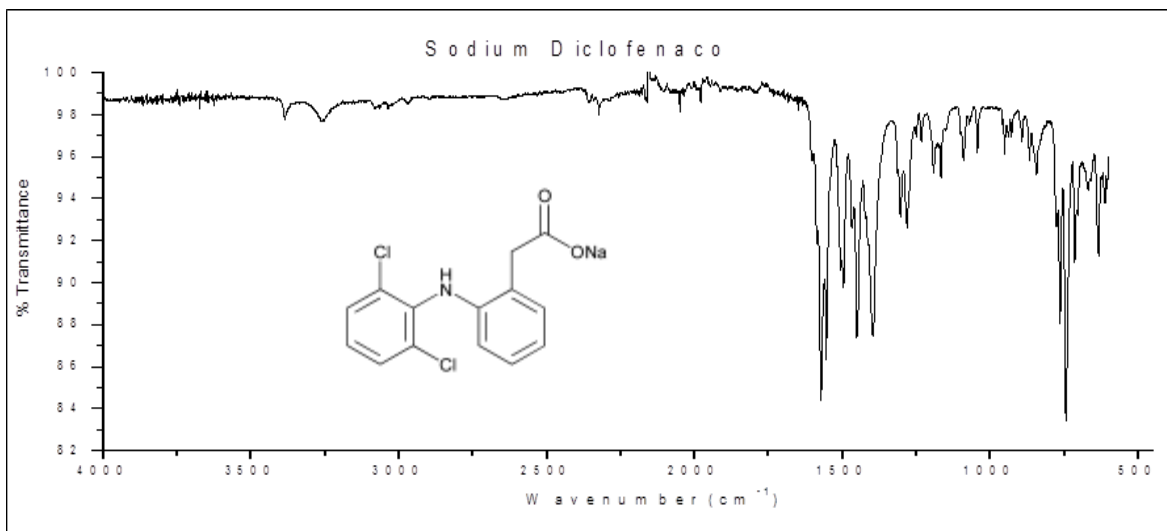


Figura 22. Espectro de absorção do diclofenaco de sódio na região do Infravermelho (IV).

A Tabela 14 mostra as bandas do espectro de absorção na região do infravermelho do diclofenaco de sódio.

Tabela 14. Bandas do espectro de infravermelho do diclofenaco de sódio.

ν (cm ⁻¹)	Atribuição
3350 – 3380	Deformação do N-H
3000 – 3050	Deformação axial da ligação C-H aromáticos.
2850 – 3000	Deformação axial da ligação C-H, alifáticos.
1750 – 1720	Deformações C=O

Os espectros de absorção de infravermelho encontrados experimentalmente para os fármacos concordam com os da literatura, identificando as matérias primas: diclofenaco de sódio e dexametasona. (SILVERSTEIN, 2000).

Calorimetria exploratória diferencial:

No estudo de caracterização térmica para o diclofenaco de sódio e a dexametasona foi empregada à metodologia termo analítica de DSC.

A curva DSC do diclofenaco de sódio (Figura 23) observa-se uma endotérmica ao redor de 289°C, seguida por uma exotérmica. Este resultado é indicativo de aquecimento seguido por decomposição, indicando o ponto de fusão da amostra que pode variar entre 265°C – 295°C (PALOMO; BALLESTEROS and FRUTOS, 1999).

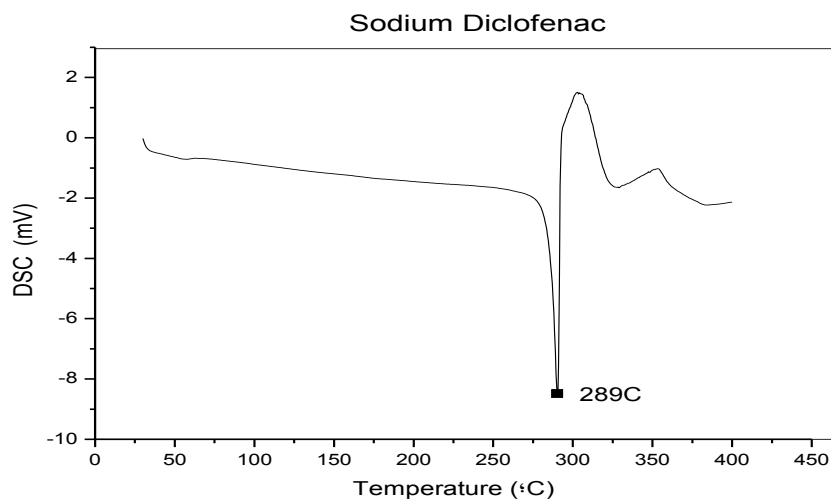


Figura 23. Curva de DSC da amostra de diclofenaco de sódio (taxa de aquecimento de 10°C/min).

A curva DSC da dexametasona (Figura 24) apresenta o pico de fusão do fármaco, encontrando-se entre os valores relatados na literatura, os quais variam de 268°C a 271°C (O'NEIL, 2013).

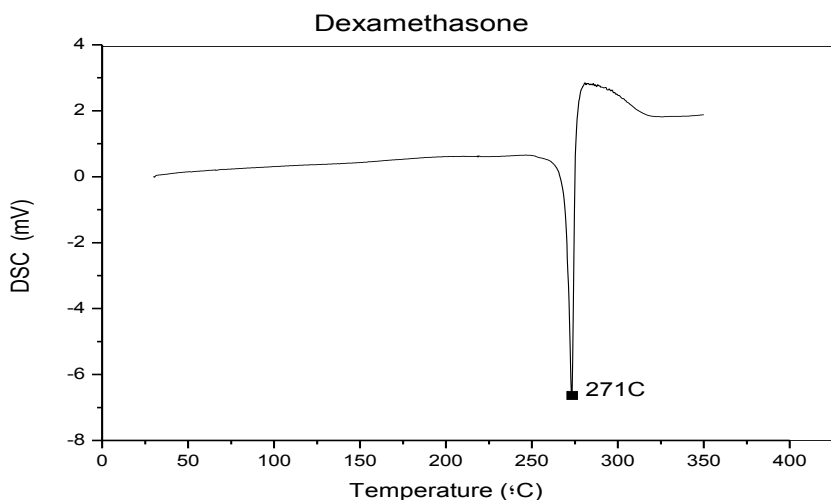


Figura 24. Curva de DSC da amostra de dexametasona (taxa de aquecimento de 10°C/min).

Na análise térmica os picos endotérmicos encontrados experimentalmente para os fármacos concordam com os pontos de fusão da literatura (O'NEIL, 2013), corroborando e identificando as matérias primas: diclofenaco de sódio e dexametasona utilizadas para a elaboração das nanopartículas.

5.2 Desenvolvimento do método de elaboração das nanopartículas.

Para a síntese das nanopartículas poliméricas foi utilizada uma metodologia baseada na técnica de “emulsificação-evaporação de solvente” com algumas modificações (FILLAFER *et al.*, 2008a), (HARIHARAN *et al.*, 2006).

Antes da elaboração de nanopartículas carregadas com os fármacos foi otimizado o procedimento da emulsão simples em nanopartículas vazias (sem fármaco). Foram estudados, surfactante, solvente e parâmetros de sonicação. Os tamanhos de partículas obtidos foram realizados no DLS, obtendo o tamanho de partícula hidrodinâmico em intensidade.

Surfactante

As nanopartículas foram sintetizadas com os estabilizadores Pluronic F-68 e álcool polivinílico (PVA). O surfactante Pluronic F68 foi adicionado à fase orgânica em quanto o PVA foi adicionado à fase aquosa.

O estabilizador determina a formação de nanoesferas, e afeta a distribuição de tamanho de partícula. Utilizando álcool polivinílico (PVA 2%) como surfactante, tamanhos de nanopartículas maiores foram obtidos $182,8 \pm 7$ nm, enquanto que, quando foi utilizado Pluronic F-68 3% as nanopartículas apresentaram diâmetros de $109,5 \pm 4$ nm. (Figura 25).

Segundo as micrografias obtidas por TEM (Figura 26) pode-se observar que utilizando Pluronic como estabilizador foram obtidos tamanhos menores e mais homogêneas que utilizando o PVA.

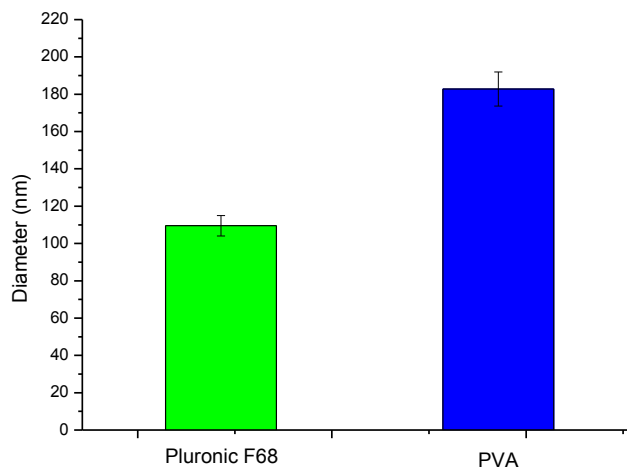


Figura 25. Tamanho de partícula hidrodinâmico obtido por DLS. Variação de surfactante na síntese de nanopartículas.

Polímeros como álcool polivinílico e plurônicos são agentes estabilizantes comumente utilizados na preparação de nanopartículas de PLGA (GOGOTSI, 2006). Song e colaboradores mostraram o efeito do tipo dos estabilizadores sobre o tamanho médio das nanopartículas de PLGA, encontraram resultados similares com os obtidos, 213 ± 5 nm e 117 ± 3 nm, para PVA e Pluronic F68, respectivamente. (SONG *et al.*, 2006).

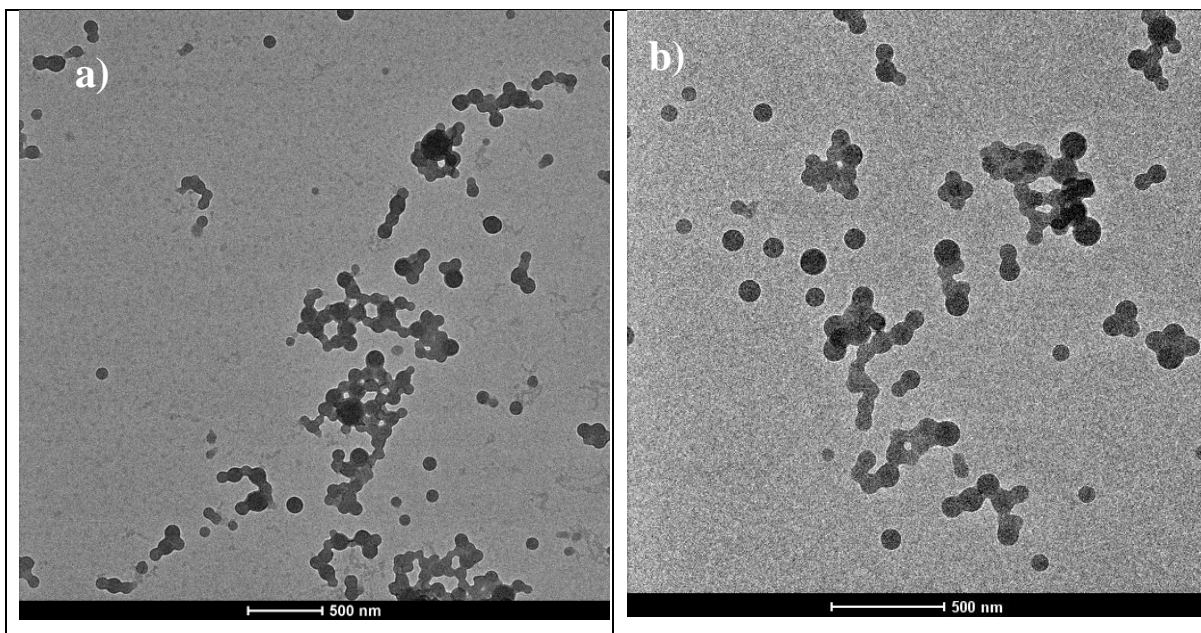


Figura 26. Micrografias por microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas utilizando diferentes surfactantes a) Pluronic e b) PVA.

Quando o plurônico foi utilizado como estabilizador, nas formulações foram encontrados menores tamanhos das nanopartículas e mais homogêneas, pelo qual foi selecionado o Pluronic F68 como tensoativos.

Solvente

Foram testados dois solventes para serem utilizados na fase orgânica na síntese das nanopartículas (acetona e acetato de etila). Com acetona as nanopartículas apresentaram tamanho de $112,5 \pm 6$ nm, em quanto utilizando acetato de etila as nanopartículas apresentaram tamanho de $109,5 \pm 4$ nm. (Figura 27). O acetato de etila e a acetona são preferidos sobre diclorometano e clorofórmio, porque são menos tóxicos para aplicações *In vivo*. (GREF; MINAMITAKE; LANGER, 1996).

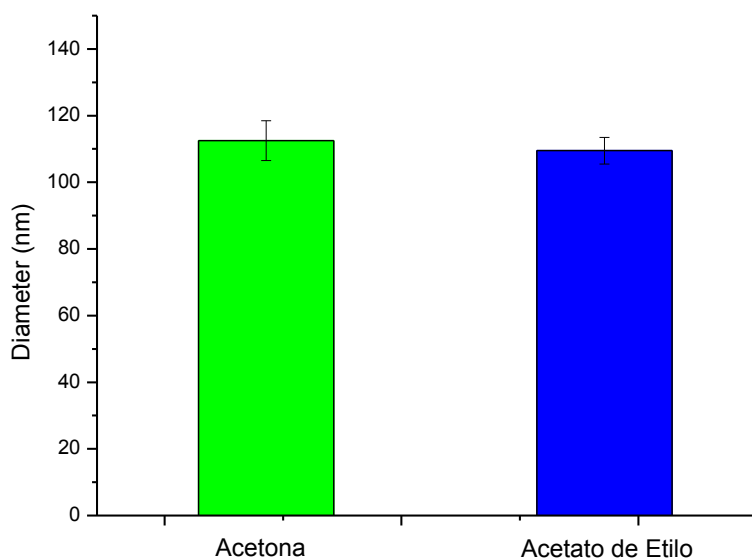


Figura 27 Tamanho de partícula hidrodinâmico obtido por DLS. Variação de surfactante na síntese de nanopartículas.

Os tamanhos obtidos pelos dois solventes foram muito similares, mas de acordo as micrografias de SEM (Figura 28) foram mais homogêneas e esféricas as nanopartículas obtidas por acetato de etila.

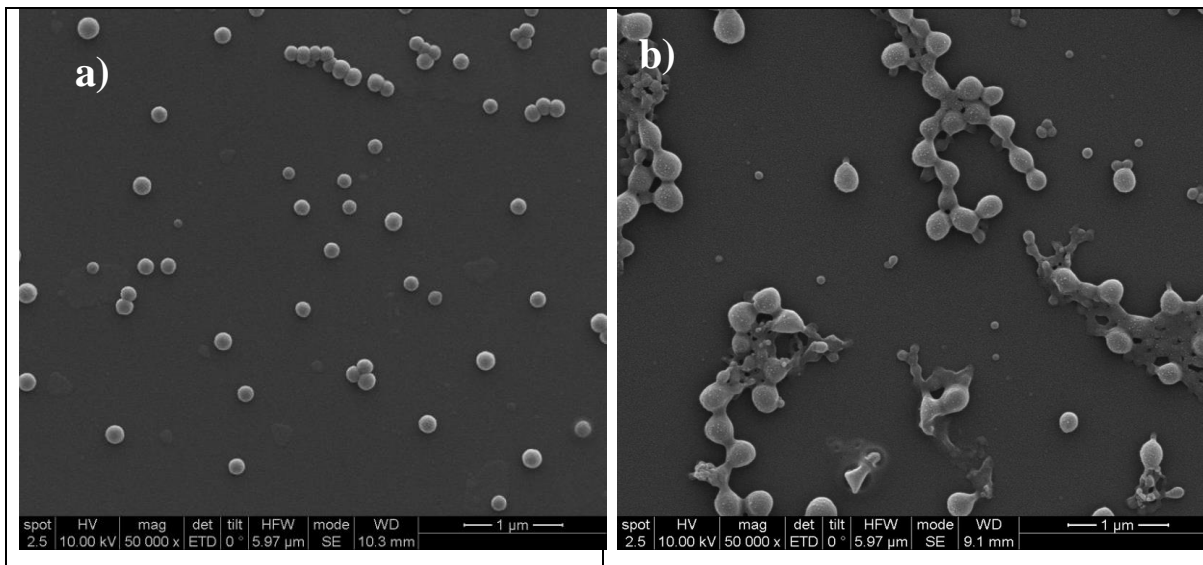


Figura 28 Micrografias por microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas utilizando diferente solvente orgânico a) acetato de etila e b) acetona.

O acetato de etila foi escolhido para a preparação de nanopartículas porque produz partículas mais esféricas e de menor tamanho, além de ser menos tóxico do que a acetona.

Parâmetros de sonicação

Na sonicação foi utilizado o equipamento Branson Digital Sonifier 450: 400 W, 20 KHz (Figura 29) e foram testadas diferentes amplitudes.



Figura 29 Sonicador Branson Digital Sonifier 450:400 W, 20 KHz.

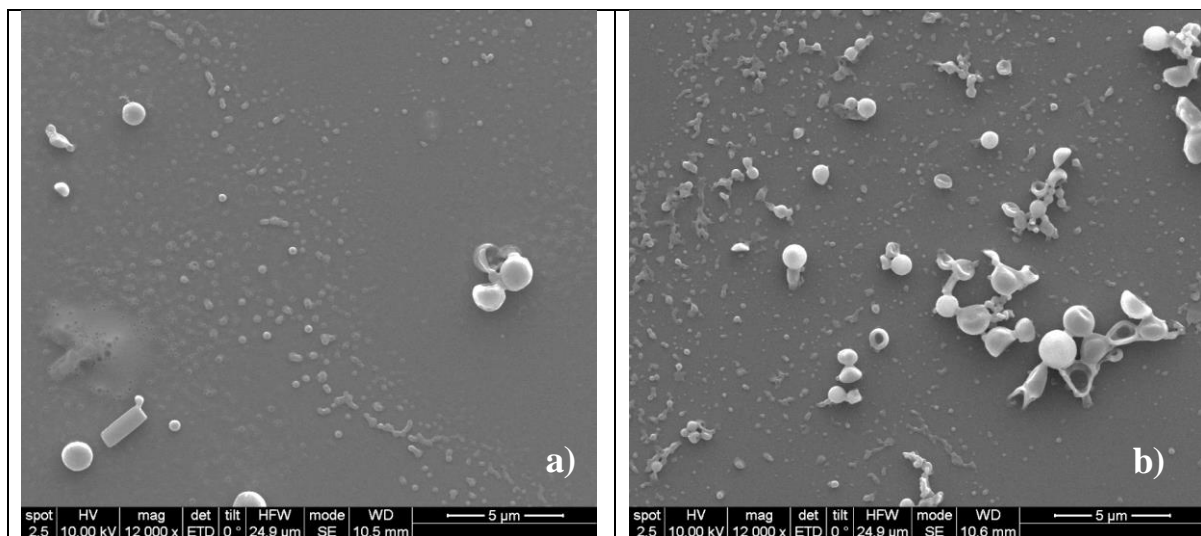
Uma etapa de adição de energia é fundamental para a obtenção de sistemas emulsionados. A fim de avaliar a influência dessa etapa no diâmetro médio das nanopartículas, foi estudada a amplitude de sonicação (10, 20, 30, 40, 50 e 60%).

De acordo com as micrografias obtidas por SEM utilizando 10% e 20% observaram-se agregações de polímero, possivelmente, faltou energia no sistema devido à baixa amplitude de sonicação, levando a não formação das nanopartículas.

Enquanto que, com 50% e 60% as nanopartículas tinham um aspecto não muito esférico, provavelmente, porque quando a força de amplitude é maior o calor liberado é muito alto e não há a formação das nanopartículas adequadamente.

Entretanto utilizando 30% e 40% de amplitude, foram encontradas nanopartículas mais esféricas e de tamanho homogêneo, obtendo melhores resultados com 40%.

Segundo as micrografias de SEM obtidas na Figura 30, os melhores resultados encontrados foram utilizando uma amplitude de 40%, pelo qual foi selecionado este parâmetro na elaboração das nanopartículas.



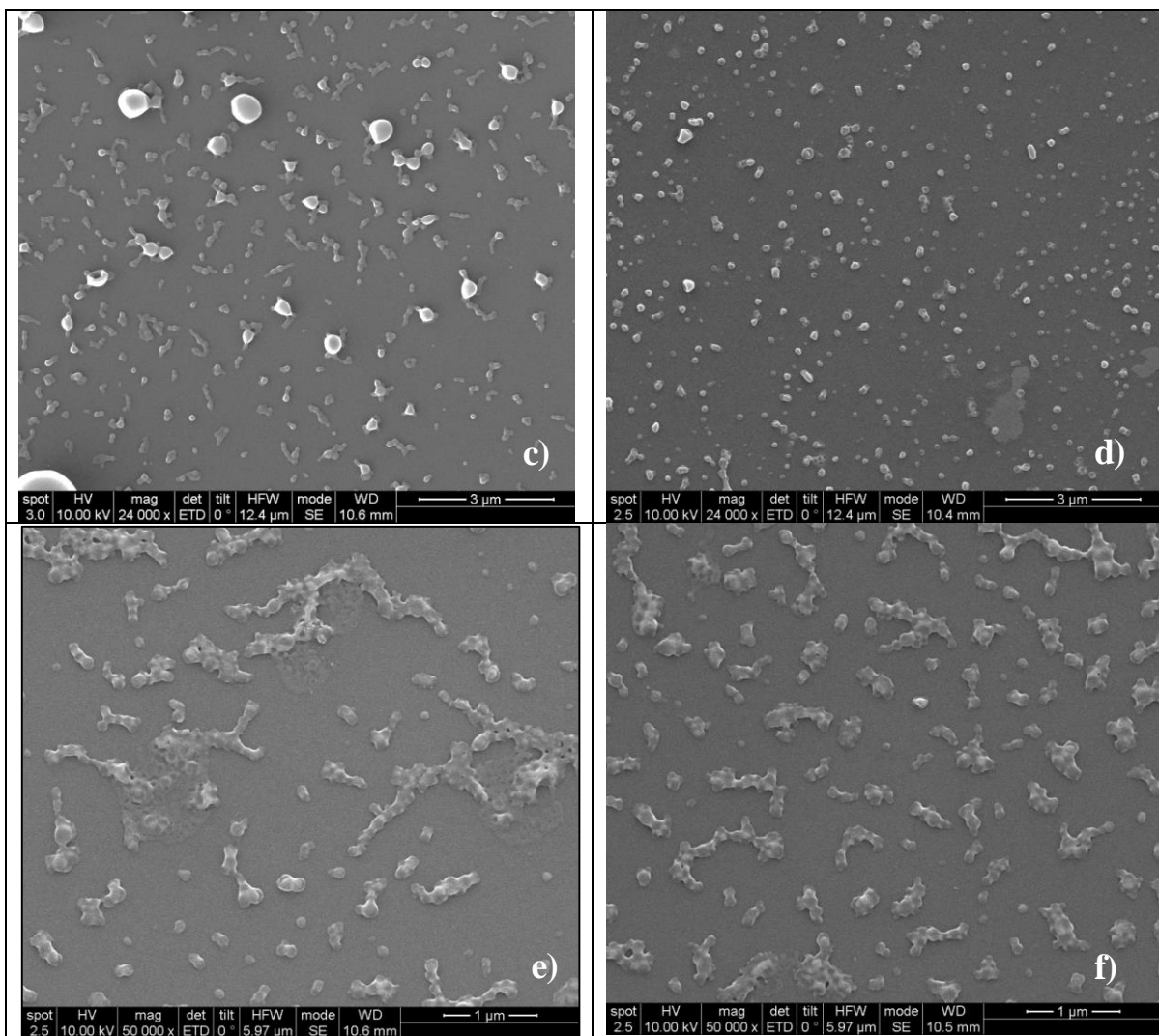


Figura 30. Micrografias por microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas utilizando diferente amplitude a)10% b) 20% c) 30% d) 40% e) 50% f) 60%.

5.3 Preparo e caracterização físico-química do sistema nanoestruturado polimérico contendo diclofenaco de sódio e dexametasona.

Depois de otimizar o procedimento de elaboração das nanopartículas sem fármaco, foi realizado o delineamento experimental para conseguir uma formulação que permita obter uma alta eficiência de encapsulação para os dois fármacos.

Foram realizadas as oito formulações do delineamento experimental por triplicada. Para confirmar o adequado preparo das nanopartículas poliméricas foram avaliadas verificando as características físico-químicas das mesmas.

5.3.1 Tamanho de partícula

Partículas com tamanho menor que 1 μm são consideradas nanopartículas, enquanto que as partículas maiores são denominadas micropartículas (BERGMANN, 2008). O diâmetro das partículas foi determinado no equipamento de espalhamento de Luz dinâmico (DLS) 90Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven, USA). O tamanho das nanopartículas (Tabela 15) foi em geral, considerado aceitável já que se encontra num tamanho inferior a 1 μm (SCHAFFAZICK *et al.*, 2002).

Também foi medido o tamanho de partícula utilizando o software ImageJ®, o qual permite medir o diâmetro das nanopartículas nas micrografias do SEM, foram medidas 200 nanopartículas e foi realizada a media e um gráfico da disparidade de tamanho (Figura 31).

O tamanho médio das nanopartículas obtido por DLS encontrou-se entre $97,2 \pm 1,5$ nm e $139,1 \pm 1,5$ nm. Franz Gabor e colaboradores (2008) e Ratzinger e colaboradores (2010), relataram tamanho médio entre 140 e 170 nm, 120 e 159 nm, respectivamente. Esses autores utilizaram, em seus trabalhos, método de preparo da nanopartículas similar ao utilizado no presente trabalho (método de emulsão evaporação do solvente). (FILLAFER *et al.*, 2008b), (RATZINGER *et al.*, 2010).

Song e colaboradores fizeram um estudo sobre o efeito do solvente na fase orgânica sobre o tamanho de partícula em nanopartículas de PLGA. Encontraram tamanhos de 117 ± 3 nm, 221 ± 5 nm e 461 ± 10 nm, utilizando Pluronic com acetato de etila, acetona e diclorometano respectivamente, concluindo que se obtém nanopartículas estáveis e monodispersas com acetato de etila. Pelo qual tem concordância com os resultados obtidos (SONG *et al.*, 2006).

O parâmetro avaliado do tamanho de partículas é uma característica física importante, pois está relacionado diretamente com a área de superfície das partículas e conseqüentemente com a velocidade de difusão do fármaco a partir da matriz polimérica, alterando assim diretamente a velocidade de liberação do fármaco a partir do sistema nanoparticulado (JÚNIOR, 2008).

Tabela 15. Caracterização das NPs de PLGA. Tamanho de partícula, polidispersividade e potencial zeta.

	pH*	Diâmetro (nm) No DLS*	Diâmetro (nm) No SEM	Polidispersividade*	Potencial Zeta (mV)*
F01	6,58 ± 0,1	110,6 ± 2,4	121,37 ± 26,62	0,183 ± 0,015	-22,59 ± 0,34
F02	6,39 ± 2,6	139,1 ± 1,5	132,81 ± 68,95	0,131 ± 0,007	-20,23 ± 0,57
F03	7,00 ± 1,2	100,7 ± 0,9	122,77 ± 29,34	0,149 ± 0,120	-16,02 ± 0,35
F04	6,75 ± 0,1	108,5 ± 1,1	110,18 ± 25,21	0,133 ± 0,011	-20,75 ± 0,46
F05	6,46 ± 0,9	107,8 ± 2,7	126,95 ± 43,09	0,191 ± 0,130	-15,92 ± 0,73
F06	6,59 ± 0,2	119,2 ± 0,7	103,41 ± 21,38	0,144 ± 0,009	-14,2 ± 1,42
F07	6,68 ± 0,8	97,2 ± 0,4	123,56 ± 31,46	0,135 ± 0,006	-18,21 ± 0,68
F08	6,45 ± 0,4	105,5 ± 0,3	132,20 ± 35,94	0,134 ± 0,006	-22,13 ± 0,72
F _{vazia}	6,86 ± 0,7	109,9 ± 0,5	137,97 ± 26,25	0,134 ± 0,011	-18,6 ± 0,29

*media de três medições

5.3.2 Polidispersividade.

No que se refere ao índice de polidispersividade, foram obtidos valores entre 0,131 e 0,191 (Tabela 15). Ratzinger e colaboradores (2010) relataram que as nanopartículas obtidas pelo método de emulsão evaporação, similar ao utilizado, obtiveram índices de polidispersividade entre 0,089 e 0,142. Os autores concluíram que tais índices indicaram limitada variabilidade do tamanho médio das

partículas. (RATZINGER *et al.*, 2010). Dessa forma, os resultados obtidos foram considerados adequados.

5.3.3 Potencial Zeta

A Tabela 15 descreve os valores referentes ao potencial zeta apresentado pelas nanoesferas, o valor encontrado para as nanopartículas contendo os fármacos (diclofenaco de sódio e dexametasona) encontra-se na faixa de $-14,2 \pm 1,42$ e $-22,59 \pm 0,34$ mV, e para as nanopartículas isentas do fármaco (branco) o valor foi de $-18,6 \pm 0,29$. Esses valores foram similares àquele obtido por Shaikh e colaboradores (2009) de $-24,8 \pm 1,9$ mV. Esses autores utilizaram, para a preparação da nanopartícula, método similar ao utilizado no presente trabalho. (SHAIKH *et al.*, 2009).

A carga superficial das nanopartículas é um parâmetro importante para avaliação da estabilidade e da interação das nanoestruturas entre si e com outras substâncias. Valores de potencial zeta elevados sugerem maior estabilidade do sistema, pois a repulsão entre as partículas previne o fenômeno de agregação. Desta forma, os valores de potencial zeta encontrados para todas as formulações, apresentam-se adequados para permitir que as nanoesferas em suspensão mantenham-se sem agregação.

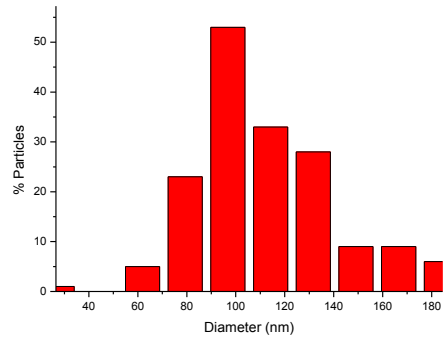
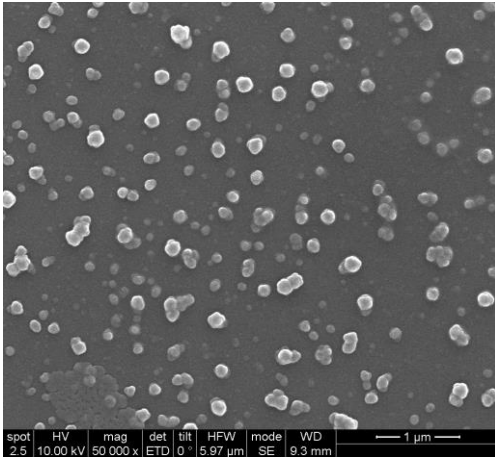
5.3.4 pH

Quanto ao pH encontrado em as formulações realizadas obtiveram-se valores na faixa de $6,39 \pm 2,6$ até $7,00 \pm 1,2$, encontrando-se dentro da faixa que os medicamentos injetáveis devem ter pH 4 até 8. (GUASCA, 2010)

5.3.5 Morfologia das nanopartículas por SEM

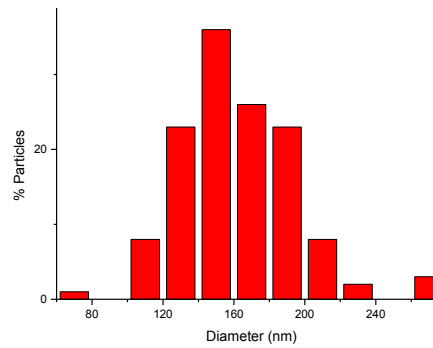
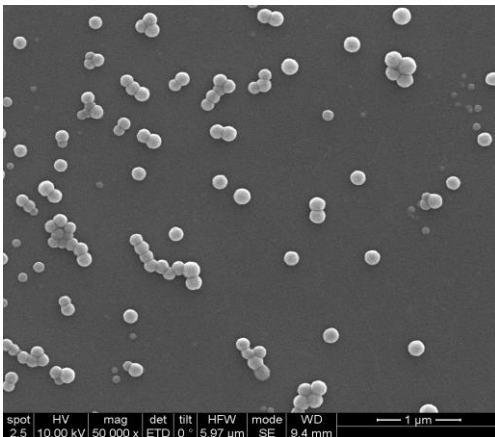
Na Figura 31 podem-se observar por SEM as nanopartículas obtidas, encontrando tamanhos inferiores de 250 nm, monodispersas e com forma uniforme.

Formula N° 1



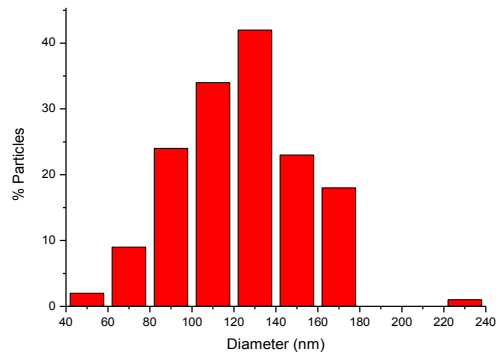
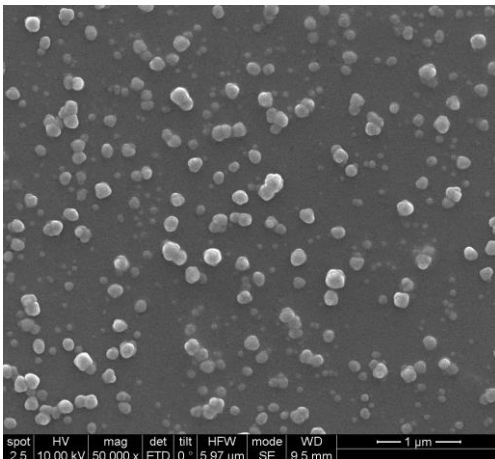
Prom	121,37	Min	72,34
Desv	26,62	Max	201,41

Formula N° 2



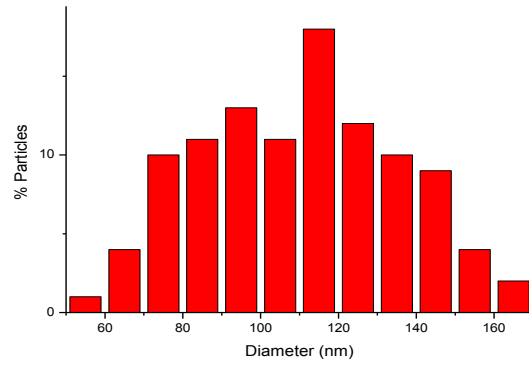
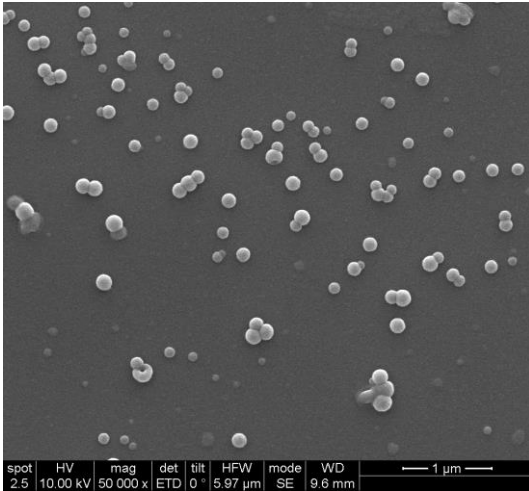
Mean	162,81	Min	68,25
SD	32,89	Max	261,86

Formula N° 3



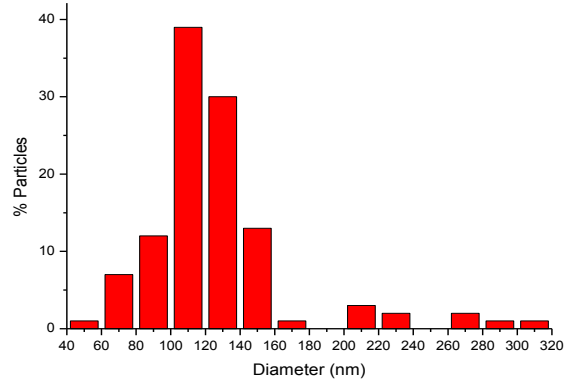
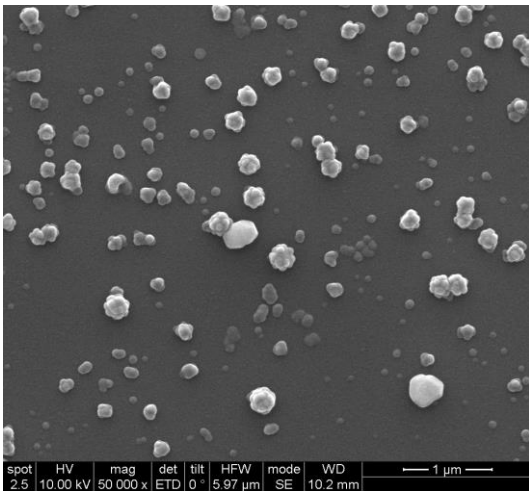
Mean	122,765	Min	56,167
SD	29,338	Max	222,1

Formula N° 4



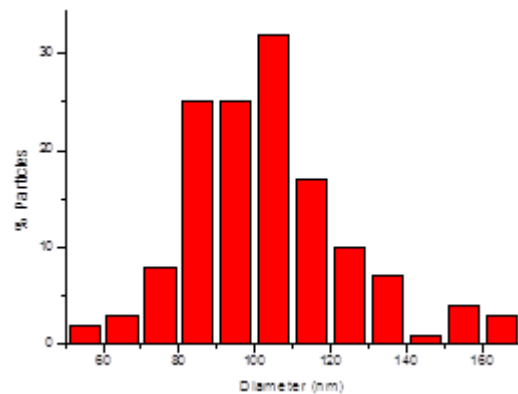
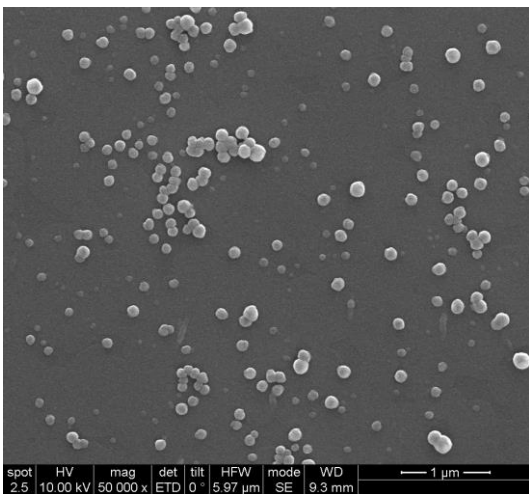
Mean	110,177	Min	59,811
SD	25,210	Max	162,964

Formula N° 5



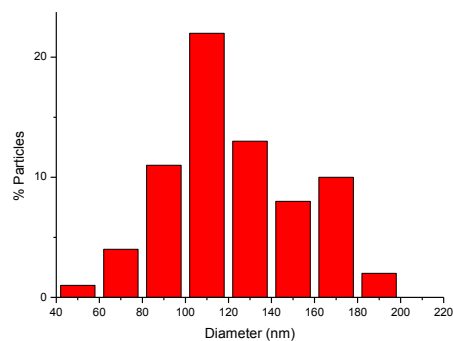
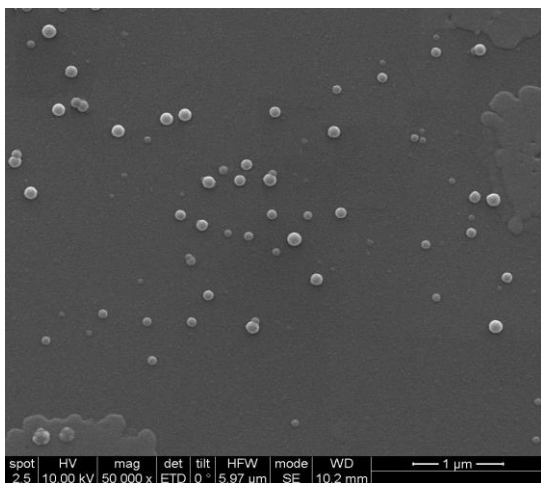
Mean	126,948	Min	53,601
SD	43,094	Max	301,532

Formula N° 6



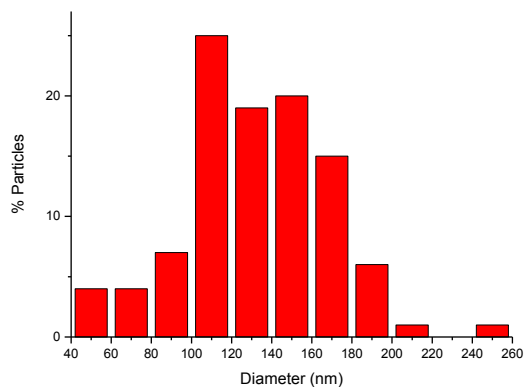
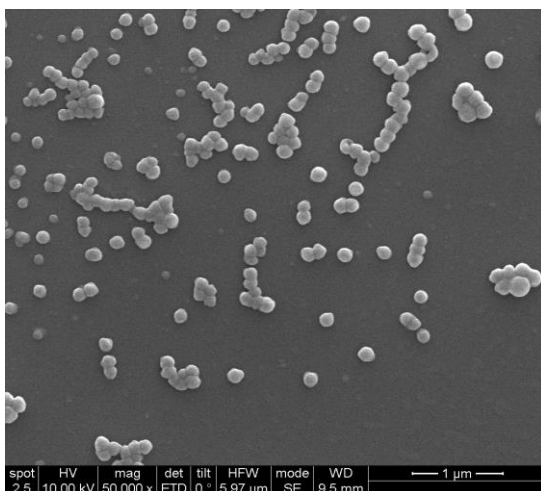
Mean	103,409	Min	51,365
SD	21,381	Max	162,432

Formula Nº 7



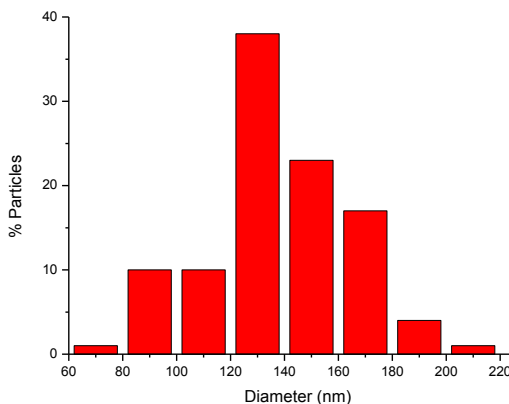
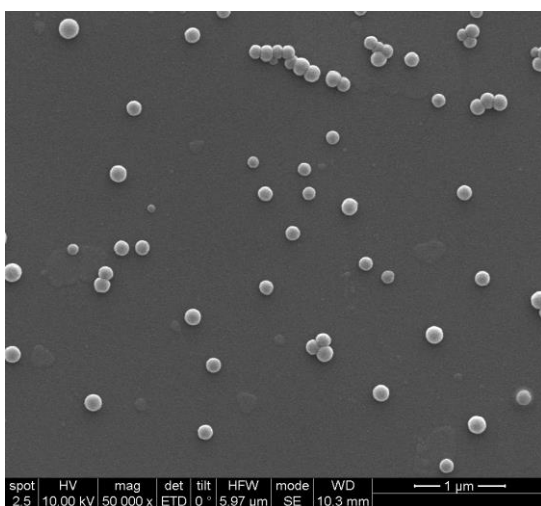
Mean	123,558	Min	59,88
SD	31,461	Max	198,52

Formula Nº 8



Mean	132,203	Min	50,98
SD	35,944	Max	249,813

Nanopartícula vazia



Mean	137,970	Min	69,605
SD	26,245	Max	204,761

Figura 31. Micrografias por microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de PLGA contendo DS e DX.

A análise morfológica por SEM mostrou nanopartículas com forma esférica, sem formação de aglomerados de nanopartículas. A obtenção de nanopartículas com forma esférica é importante quando se deseja administrá-las endovenosa e intra-articularmente, já que essa forma regular facilita o fluxo das partículas na corrente sanguínea.

Na análise por SEM as formulações apresentaram tamanho nanométrico. Pode-se observar nanopartículas com tamanhos que variam na faixa de $103,41 \pm 21,38$ e $148,65 \pm 26,79$, aproximadamente. Na análise de tamanho por espalhamento de luz, o diâmetro médio obtido para as nanopartículas foi de aproximadamente $97,2$ e $139,1 \pm 1,5$ nm, (Tabela 15). Portanto, houve uma correlação entre os tamanhos obtidos nessas duas técnicas (DLS e SEM).

Diversas técnicas têm sido empregadas para a análise da morfologia e do tamanho das nanopartículas: espalhamento de luz, microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão dentre outras. (BOOTZ *et al.*, 2004) No entanto, a combinação das técnicas tem sido muito recomendada para uma melhor caracterização das amostras pelo qual foi realizada a MET.

5.3.6 Morfologia das nanopartículas por TEM

A análise morfológica por TEM mostrou nanopartículas com forma esférica, com tamanho e forma similares e sem formação de aglomerados. Na Figura 32 podem-se observar as micrografias de algumas nanopartículas das formulações elaboradas.

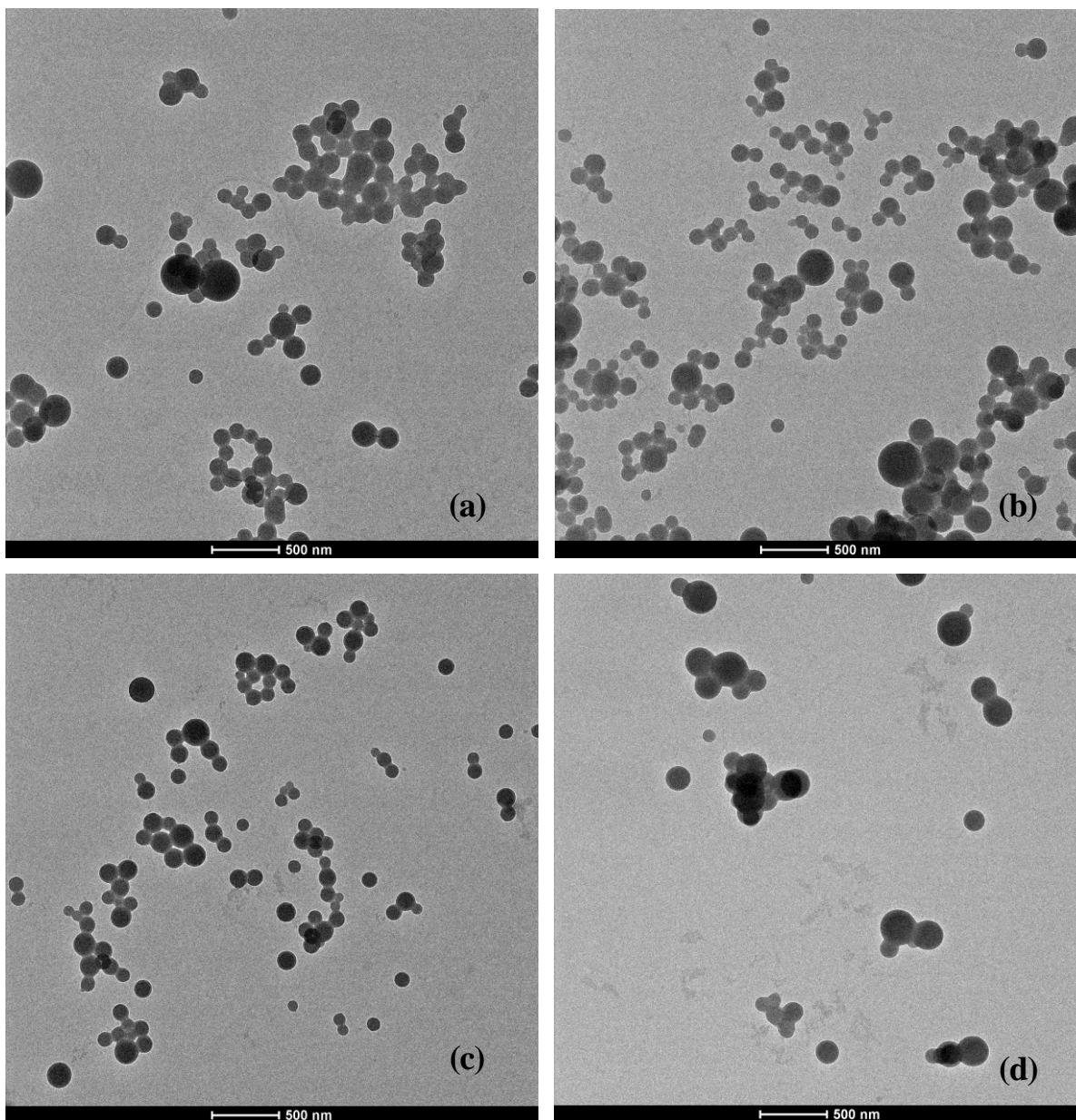


Figura 32. Micrografias por microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de PLGA contendo DS e DEXA (a) F06, (b) F09, (c) F08, (D) F10 Branco.

TEM somente foi realizada para as formulações que tiveram uma maior eficiência de encapsulação (F06, F08 e F09) e as nanopartículas sem fármaco (vazias), comparando com as micrografias obtidas por SEM pode-se corroborar que são formadas nanopartículas de forma esférica, tamanho homogêneo e sem aglomerados.

5.3.7 Espectrometria de absorção na região do Infravermelho

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho pode fornecer informações importantes sobre a compatibilidade fármaco-excipiente, ocorrência de reações entre as espécies químicas envolvidas, durante ou após qualquer processo físico. Tem sido utilizada em estudos de pré-formulação de sistemas de liberação e de medicamentos (JÚNIOR, 2008).

Na Figura 33 podem-se observar os espectros obtidos para cada componente da formulação realizada (diclofenaco de sódio, dexametasona e o polímero PLGA) e a mistura mecânica.

O espectro da dexametasona indicou uma banda típica referente à vibração de deformação axial da ligação OH em $3400-3675\text{ cm}^{-1}$, as bandas da deformação axial das ligações CH aromáticos em $3020-3050\text{ cm}^{-1}$, ligações CH alifáticos em $2850-3000\text{ cm}^{-1}$ e a banda típica da deformação axial do carbonilo em $1660-1700\text{ cm}^{-1}$, conforme o encontrado na literatura (SILVERSTEIN, 2000). O espectro do diclofenaco de sódio pode-se observar duas bandas em $3350-3380\text{ cm}^{-1}$ correspondente à deformação da ligação NH, em $3000-3050\text{ cm}^{-1}$ as bandas da deformação axial da ligação CH aromático, e em $1750-1720\text{ cm}^{-1}$ as deformações do grupo C=O, conforme o encontrado na literatura (SILVERSTEIN, 2000).

Para o PLGA, o espectro de infravermelho obtido apresenta bandas nas regiões de estiramento C=O e C-O típicos de ésteres. A 1660 cm^{-1} visualiza-se uma banda intensa e aguda, causada pelo alongamento da ligação C=O dos ésteres, entre $2980-2850\text{ cm}^{-1}$ apresentam-se bandas características de estiramentos simétricos e assimétricos de grupos CH₂ e CH₃, encontrando-se de acordo ao reportado na literatura (MOTTA; DUEK, 2006).

O espectro obtido para a mistura física apresenta as bandas de absorção características nas mesmas faixas de número de onda observados para cada um dos componentes da mistura (DEX, DS e PLGA). Portanto é possível estabelecer que não há interação química entre os fármacos e o veículo polimérico PLGA.

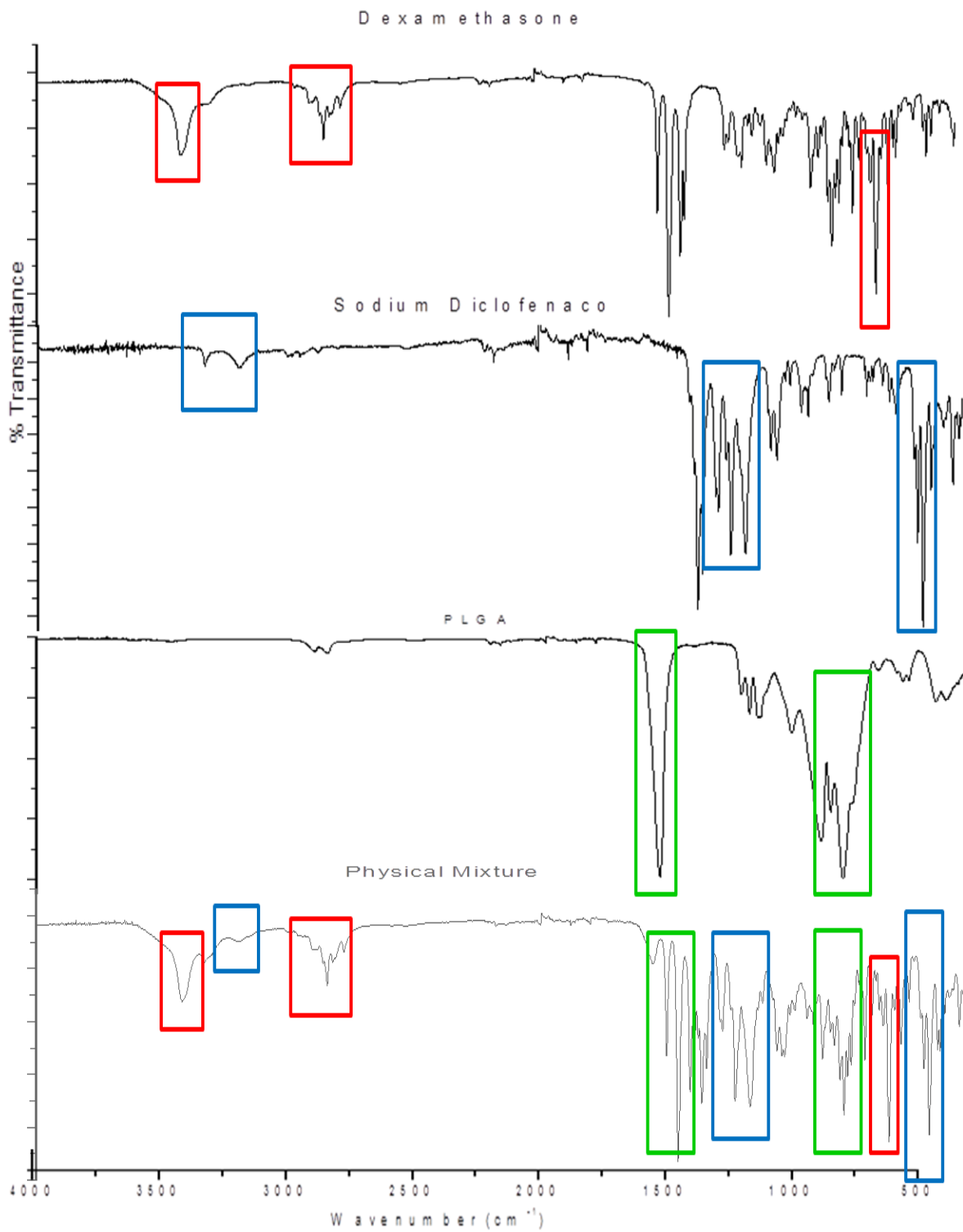


Figura 33. Espectro de absorção de IV da dexametasona, diclofenaco de sódio, PLGA e mistura mecânica.

Na Figura 34 encontra-se o espectro obtido da nanopartícula carregada e vazia, podem-se observar algumas modificações com respeito da mistura física, nas nanopartículas formadas na região do infravermelho que apresentou maior modificação na faixa de 3000 a 3600 cm^{-1} correspondente possivelmente a um grupo hidroxila, indicando a presença de novas ligações.

Os resultados obtidos a partir da análise dos espectros FTIR indicaram que as absorções típicas dos grupos funcionais dos fármacos e o PLGA (observadas na mistura física) são semelhantes às encontradas após incorporação dos fármacos aos sistemas poliméricos, sugerindo que a integridade química do fármaco foi mantida. Além disso, estes resultados também demonstraram o sucesso do método de incorporação dos fármacos no sistema poliméricos, já que na nanopartícula carregada se tem uma mudança em relação às nanopartículas branco, pelo qual se tem a formação de um novo sistema nanoparticulado contendo os fármacos.

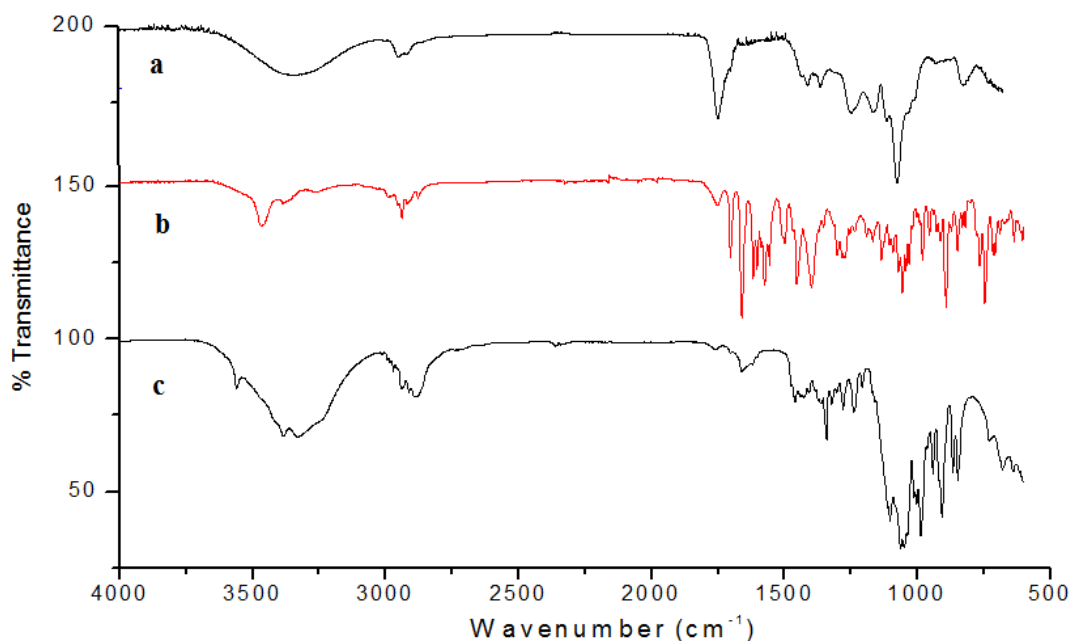


Figura 34. Espectro de absorção de IV das nanopartículas com fármaco (a) mistura física (b) e nanopartículas sem fármaco (c).

5.4 Método de HPLC para identificação e separação simultânea do diclofenaco de sódio e dexametasona.

Para o desenvolvimento do método de cromatografia líquida foram feitas modificações do método de Sayed e Kumar. Eles utilizaram como fase móvel acetonitrila: água (28:72% v/v, pH 2.3) e obtiveram um tempo de corrida para a dexametasona de 9,9 min (KUMAR *et al.*, 2006).

No método desenvolvido foi utilizada outra proporção na fase móvel acetonitrila: água (50:50% v/v, pH 3), obtendo boa separação da dexametasona e diclofenaco de sódio, com tempo de análise inferior aos 6 minutos. Na Figura 35 se pode observar o cromatograma por HPLC dos padrões dos fármacos diclofenaco de sódio e dexametasona por método isocrático.

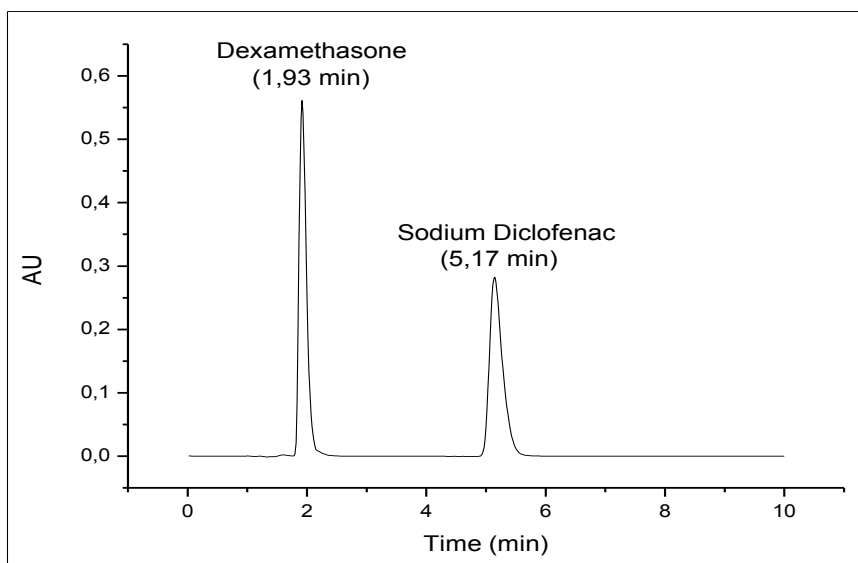


Figura 35. Cromatograma do diclofenaco de sódio ($50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e dexametasona ($50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), fase móvel: ACN/água (pH=3) = 50/50; Fluxo: $0,4 \text{ mL min}^{-1}$; Coluna: Phenomenex kinetex C18, $2,6 \mu\text{m}$, $75 \times 4,6 \text{ mm}$; $T=40^\circ\text{C}$, detecção em 260 nm.

5.4.1 Validação do método para a quantificação simultânea do diclofenaco de sódio e dexametasona por HPLC.

Na validação do método foram utilizados os parâmetros a seguir:

- Coluna Phenomenex kinetex C18, 2.6 μm , 75x4.6 mm
- Fluxo: 0,4 mL min⁻¹
- Fase móvel: ACN/água (pH=3) = 50/50
- Detecção UV: 260 nm
- Temperatura: 40°C

Especificidade

A especificidade é a capacidade que um método tem de avaliar, de forma inequívoca, a substância em exame na presença de componentes que poderiam interferir em sua determinação numa mistura complexa (USP-NF, 2011).

Na Figura 36 pode se observar o cromatograma da NP carregada com fármacos e a NP vazia, não foi observada nenhum pico no tempo de retenção dos fármacos (1,93 e 5,17 min), pelo qual o método pode ser considerado específico para detectar os fármacos nas nanopartículas.

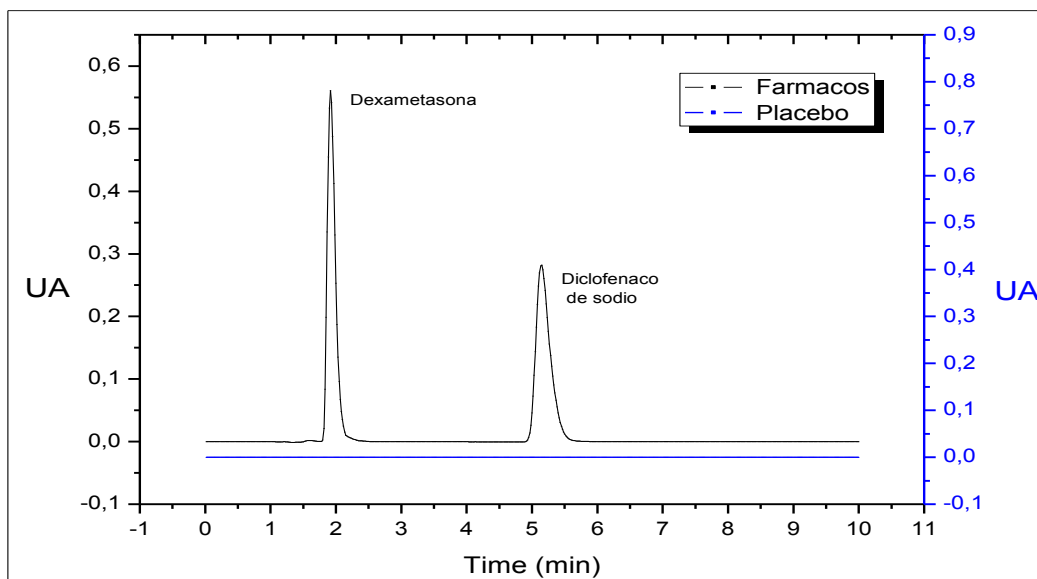


Figura 36 – Cromatograma da NP com os fármacos diclofenaco de sódio (50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e dexametasona (50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e placebo (NP sem os fármacos). Condições: fase móvel: ACN/água (pH=3) = 50/50; Fluxo: 0.4 mL/min; Coluna: Phenomenex kinetex C18, 2.6 μm , 75x4.6 mm; T=40°C, detecção em 260 nm.

Linearidade

Foram construídas as curvas analíticas para cada fármaco (DS e DX) e obteve-se linearidade, com coeficiente de correlação acima de 0,99. Segundo a Anvisa, o coeficiente de correlação de linearidade acima de 0,99 é satisfatório (BLIESNER, 2006).

A Figura 37 apresenta a curva analítica do diclofenaco de sódio obtida a 260 nm e os valores experimentais obtidos na construção da curva são mostrados na Tabela 16.

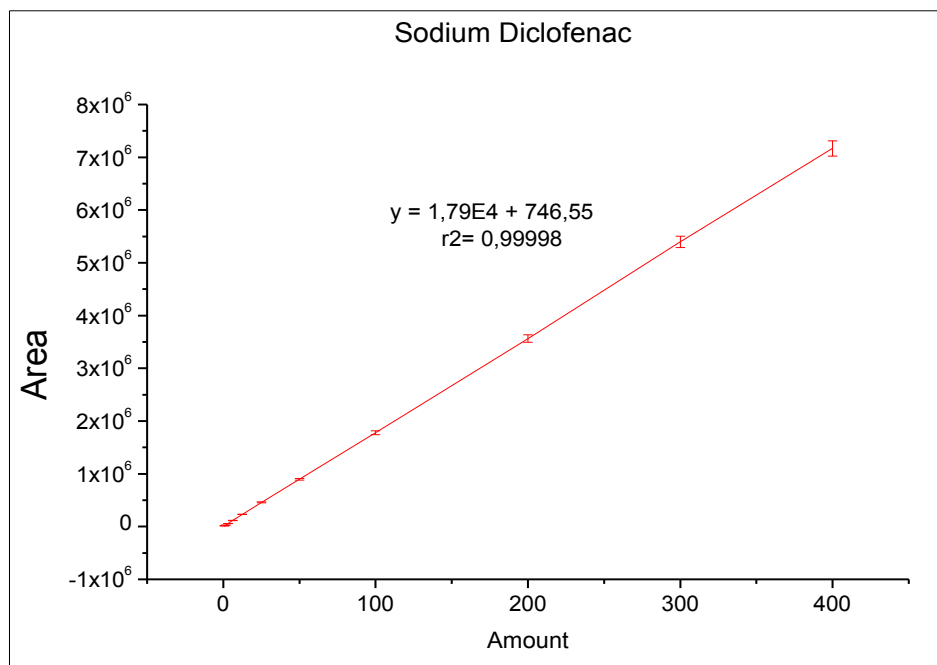


Figura 37. Curva analítica do diclofenaco de sódio na faixa de concentrações de 0,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 400,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Detecção UV em 260 nm

Tabela 16. Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do diclofenaco de sódio. Método HPLC. Detecção a 260nm.

Concentração de leitura ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área Do Pico
0,8	1,45E+04
1,6	2,89E+04
3,1	5,79E+04
6,3	1,16E+05
12,5	2,31E+05

25,0	4,57E+05
50,0	8,97E+05
100,0	1,78E+06
200,0	3,56E+06
300,0	5,40E+06
400,0	7,17E+06
Inclinação (b)	1,792 E+04
Desvio padrão da inclinação	27,297
Intercepto (a)	746,553
Desvio padrão do intercepto (Sa)	4,53E3
Coefficiente de correlação	0,99998

A Figura 38 apresenta a curva analítica da dexametasona obtida a 260 nm e os valores experimentais obtidos na construção da curva de calibração são mostrados na Tabela 17.

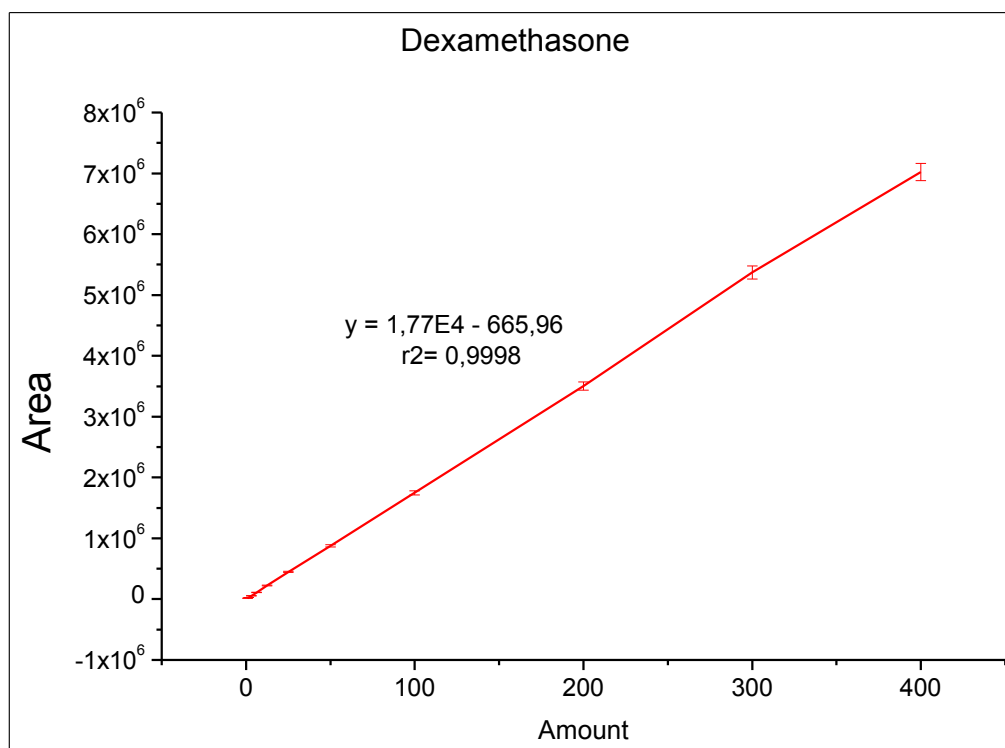


Figura 38. Curva analítica da dexametasona na faixa de concentrações de $0,88 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $400,0 \mu\text{g mL}^{-1}$

Tabela 17. Resultados experimentais obtidos na determinação da curva analítica da dexametasona. Método HPLC. Detecção a 260 nm.

Concentração de leitura ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área Do Pico
0,88	1,45E+04
1,56	2,74E+04
3,13	5,48E+04
6,25	1,10E+05
12,50	2,25E+05
25,00	4,48E+05
50,00	8,76E+05
100,00	1,75E+06
200,00	3,50E+06
300,00	5,37E+06
400,00	7,02E+06
Inclinação (b)	1,77E+06
Desvio padrão da inclinação	70,91
Intercepto (a)	-665,96
Desvio padrão do intercepto (Sa)	1,1775e4
Coeficiente de correlação	0,9998

Exatidão

O teste de recuperação está relacionado com a exatidão do método, o qual traduz o grau de concordância entre os resultados encontrados pelo método e um valor aceito como referência (USP-NF, 2011).

A exatidão do método foi calculada considerando a diferença entre a média e o valor verdadeiro aceito. Foram utilizadas as concentrações de 0,025 mg/mL (25%), 0,050 mg/mL (50%) e 0,100 mg/mL (100%) simuladas (solução do fármaco + placebo), em triplicata, para cada concentração. A exatidão foi calculada e os resultados estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Concentração teórica, concentração obtida e porcentagem de recuperação do teste de exatidão do método de quantificação de diclofenaco de sódio por HPLC.

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Diclofenaco de Sódio		Dexametasona	
	[obtida] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	[obtida] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)
100,00	99,47	99,47	100,35	100,35
100,00	98,80	98,80	99,30	99,30
100,00	97,03	97,03	98,66	98,66
	Média	98,43	Média	99,44
	SD	1,26	SD	0,85
50,00	49,84	99,69	50,53	101,07
50,00	49,84	99,68	50,86	101,72
50,00	49,76	99,51	50,24	100,48
	Média	99,63	Média	101,09
	SD	0,10	SD	0,62
25,00	24,63	98,51	25,30	101,20
25,00	24,69	98,74	25,33	101,32
25,00	24,82	99,30	24,73	98,93
	Média	98,85	Média	100,48
	SD	0,41	SD	1,35

O resultado da exatidão apresentada nas Tabelas para os dois fármacos mostrou que a recuperação é próxima de 100% e dentro da faixa aceitável de recuperação (80-110%), segundo. (BRITO *et al.*, 2005)). O desempenho indicou que o método de quantificação desenvolvido é capaz de proporcionar resultados próximos do valor real para a quantificação dos fármacos nas nanopartículas.

Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

A Tabela 19 apresenta os resultados relativos aos limites de detecção e quantificação do diclofenaco de sódio e da dexametasona.

Tabela 19. Resultados experimentais obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação do diclofenaco de sódio e dexametasona por HPLC.

	Dexametasona	Diclofenaco de Sódio
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	7,19	2,77
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	21,79	8,39

Precisão do método.

A precisão foi determinada para avaliar a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de amostragem múltipla. Foram utilizadas amostras em replica de 10. A Tabela 20 apresenta os resultados obtidos.

O coeficiente de variação (% CV) nas medidas foi menor que 5%, por tanto a precisão do método foi considerada satisfatória segundo os critérios de aceitação.

Tabela 20. Precisão do método de HPLC para quantificação do DS e DEXA.

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Diclofenaco de sódio ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Dexametasona ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
100,00	100,70	101,71
100,00	102,03	100,50
100,00	102,85	100,33
100,00	103,00	102,24
100,00	101,86	101,60
100,00	99,97	99,30
100,00	99,12	99,03
100,00	99,37	99,24
100,00	100,37	101,46
100,00	100,00	99,43
Média	100,93	100,49
SD	1,41	1,20
% CV	1,40	1,20

Os testes para os dois fármacos apresentaram coeficiente de variação (CV) igual 1,40% e 1,20% para o diclofenaco de sódio e a dexametasona respectivamente (Tabela 20). Esses resultados podem ser considerados adequados quando comparados à exigência da regulamentação vigente (RE nº 899) que define o máximo 2% na validação do método. (SILVA *et al.*, 2007b).

5.5 Método de Eletroforese Capilar para identificação e separação simultânea do diclofenaco de sódio e dexametasona.

Com a finalidade de encontrar uma metodologia eficiente para determinar a taxa de encapsulamento dos fármacos nas nanopartículas por eletroforese capilar, alguns testes preliminares foram realizados para encontrar um método adequado para a quantificação dos fármacos.

Trabalhou-se primeiramente com CZE, foi utilizada como eletrólito uma solução de tetraborato de sódio (TBS) 50 mmol L⁻¹ e pH 9,4 com tensão aplicada de 15 KV. Na Figura 39 se pode observar que com a técnica de eletroforese capilar de zona não é possível a separação dos fármacos, já que a dexametasona sai como o fluxo eletrosmótico, isto se dá, porque neste pH a dexametasona se encontra neutra e não irá se separar do fluxo. Por este motivo foram realizados outros testes, com a outra técnica cromatografia eletrocinética micelar (MECK).

A Cromatografia eletrocinética micelar é o modo de eletroforese que tem a capacidade de separar solutos neutros e carregados eletricamente ao mesmo tempo. Na MECK são adicionados surfactantes iônicos em altas concentrações ao eletrólito para a formação de micelas. As micelas formam estruturas tridimensionais em que as partes hidrofóbicas do surfactante ficam voltadas para o interior e a parte eletricamente carregada para o exterior da micela, no caso do dodecil sulfato de sódio, formando agregados anfifílicos. As moléculas mais hidrofóbicas irão se ligar à região hidrofóbica da micela do surfactante.

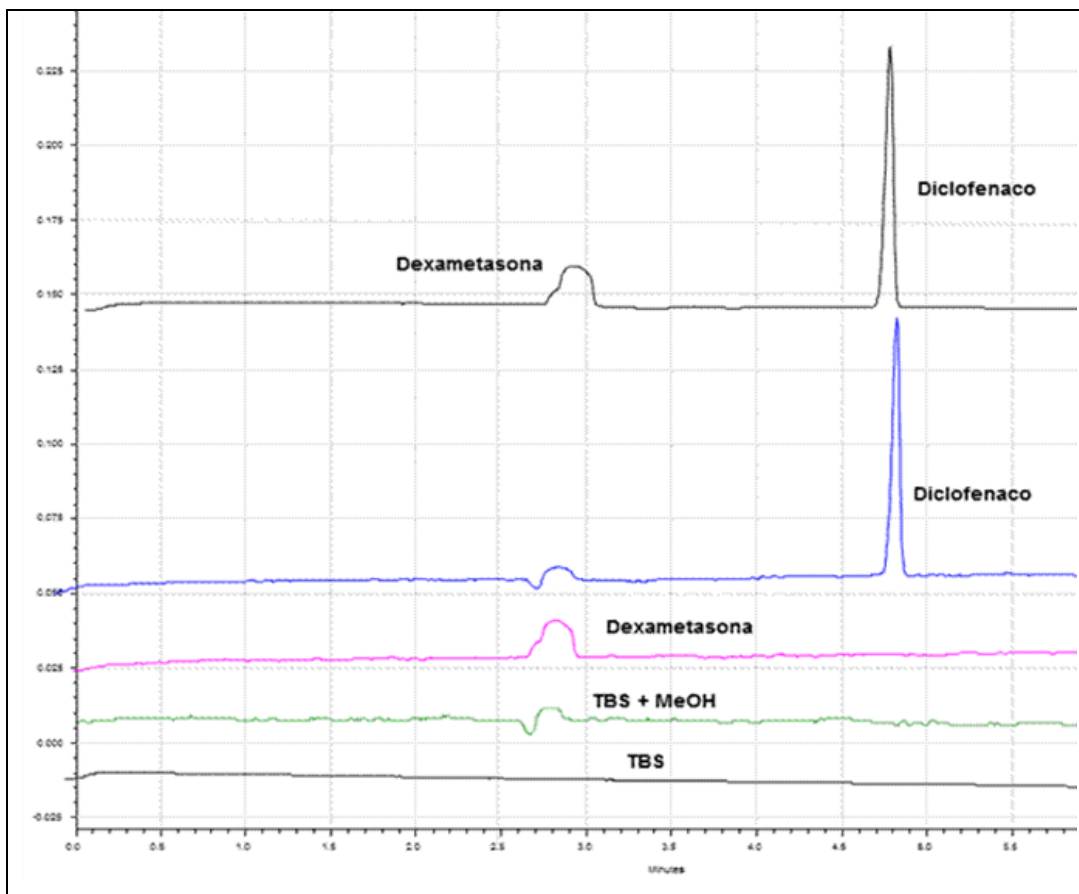


Figura 39 Eletroferograma da solução padrão de diclofenaco de sódio ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), dexametasona ($200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) por CZE Condições: eletrólito: tetraborato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 9,4, tensão aplicada $+15\text{kV}$, temperatura 25°C , Detecção UV em 280 nm . Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i.

A separação de solutos neutros é baseada na interação hidrofóbica dos solutos com a micela. Moléculas menos hidrofóbicas irão se ligar mais fracamente à micela. Quanto mais forte a interação, maior é a mobilidade dos solutos ligados à micela a um pH alto (WILLIAM C. BRUMLEY, 1994)

Sendo a dexametasona insolúvel em água, foi utilizada a técnica de MECK, já que permite a separação da dexametasona e do diclofenaco de sódio.

Na Figura 40 se pode observar o eletroferograma obtido para os padrões dos fármacos diclofenaco de sódio e dexametasona utilizando a técnica de MECK, a qual permitiu a separação dos fármacos num tempo de análise inferior a 4 minutos.

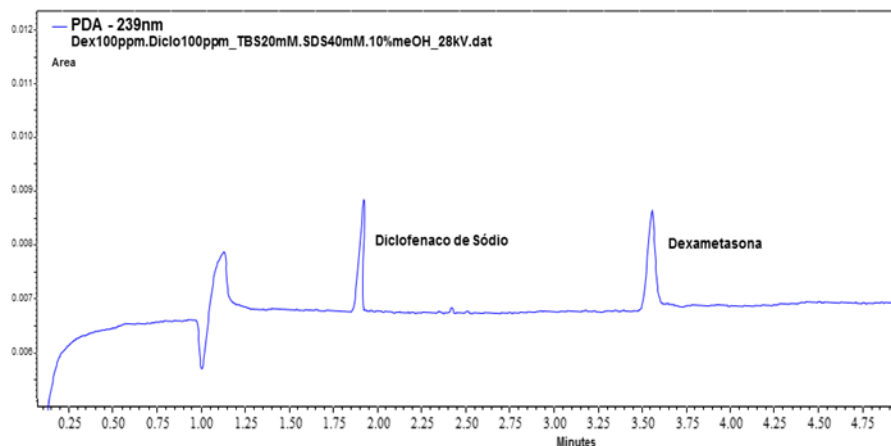


Figura 40 Eletroferograma da solução padrão de diclofenaco de sódio ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), dexametasona ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) por MECK. Condições: eletrólito: tetraborato de sódio 20 mmol L^{-1} , dodecil sulfato de sódio 40 mmol L^{-1} . pH 9,2, tensão aplicada +28kV, temperatura 25°C , Detecção UV em 239 nm. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i.

Escolha do padrão interno:

Para encontrar o padrão interno adequado realizaram-se diferentes ensaios com os padrões: furosemida, ácido salicílico, niacinamida e lidocaína, (Figura 41) obtendo os seguintes eletroferogramas:

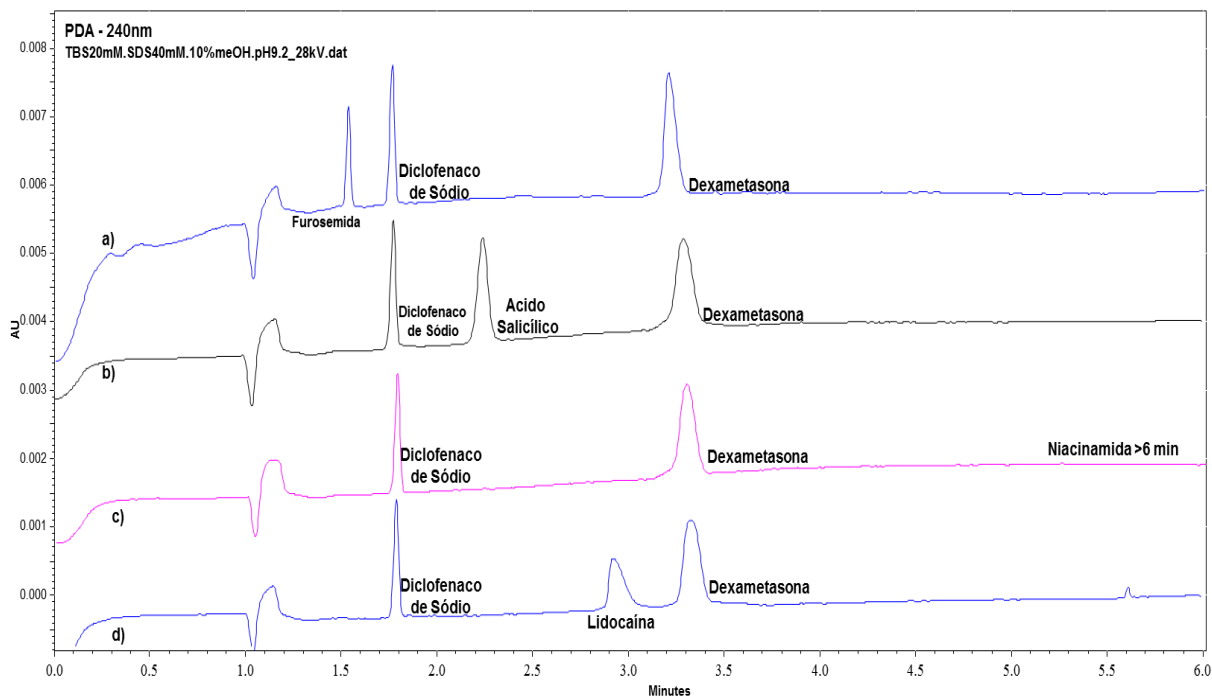


Figura 41 Eletroferograma de diclofenaco de sódio $100 \mu\text{gml L}^{-1}$ e Dexametasona $100 \mu\text{gml L}^{-1}$ com diferentes padrões a) furosemida $100 \mu\text{gml L}^{-1}$ b) acido saliclico $100 \mu\text{gml L}^{-1}$ c) niacinamida $100 \mu\text{gml L}^{-1}$ d) lidocaína $100 \mu\text{gml L}^{-1}$ Condições: eletrólito: tetraborato de sódio 20 mmol L^{-1} , dodecil sulfato de sódio 40 mmol.L^{-1} . pH 9,2, tensão aplicada +28kV, temperatura 25°C , Detecção UV em 240 nm. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i.

Com o objetivo de não aumentar o tempo de análise pelo padrão interno, foi descartada a niacinamida, enquanto a lidocaína e o acido salicílico apresentaram picos com maior dispersão e menor resolução do que a furosemida. Desta forma a furosemida foi selecionada por ter uma adequada resolução com o diclofenaco de sódio (Figura 42).

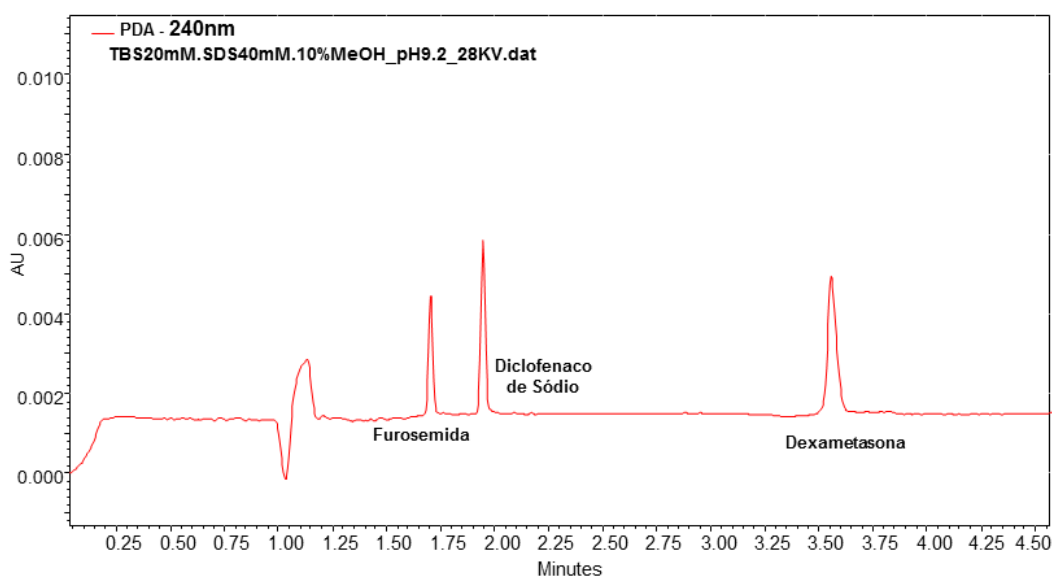


Figura 42 Eletroferograma de diclofenaco de sódio $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e Dexametasona $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ furosemida $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ Condições: eletrólito: tetraborato de sódio 20 mmol L^{-1} , dodecil sulfato de sódio 40 mmol L^{-1} . pH 9,2, tensão aplicada +28kV, temperatura 25°C , Detecção UV em 240 nm. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i.

5.5.1 Validação do método para a quantificação simultânea do diclofenaco de sódio e dexametasona por CE.

Na validação do método foram utilizados os parâmetros a seguir:

- Colunas capilares de sílica fundida com 50 μm d.i. e 30 cm de comprimento total (20 cm até detector).
- Temperatura da coluna: +20 $^{\circ}\text{C}$
- Detecção: 240nm
- Voltagem: +28kV
- Eletrólito: Tetraborato de Sódio 20,0 mmol L^{-1} , Dodecil sulfato de sódio 40,0 mmol L^{-1} , 10% de metanol, pH 9,2

Especificidade

Na Figura 43 pode se observa que o eletrólito e o placebo não apresentaram algum pico no tempo de retenção dos fármacos e o padrão interno

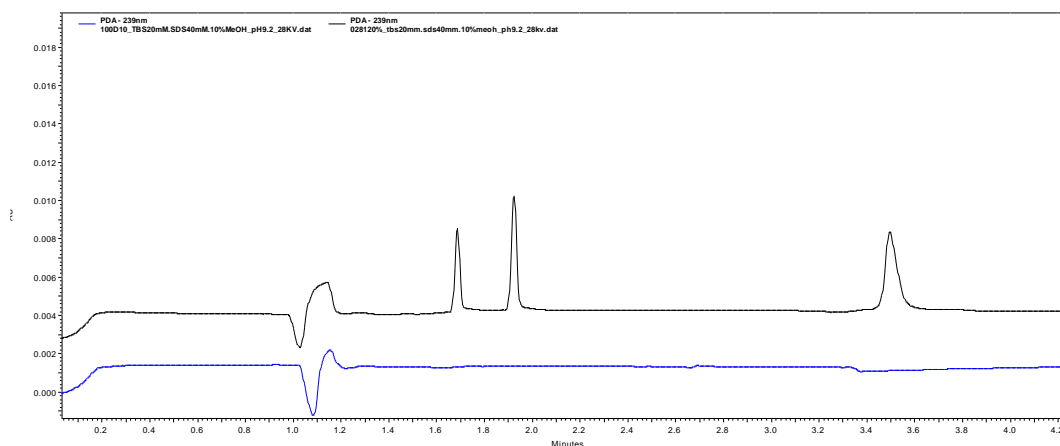


Figura 43. Eletroferograma (a) fármacos e o padrão interno (diclofenaco de sódio 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e Dexametasona 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ furosemida 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (b) placebo, no método analítico por CE. Condições: eletrólito: tetraborato de sódio 20 mmol L^{-1} , dodecil sulfato de sódio 40 mmol L^{-1} . pH 9,2, tensão aplicada +28kV, temperatura 25 $^{\circ}\text{C}$. Detecção UV em 240 nm. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x 50 μm d.i.

Linearidade

A Figura 44 apresenta a curva analítica do diclofenaco de sódio obtida a 240 nm e os valores experimentais obtidos na construção da curva analítica são mostrados na Tabela 21.

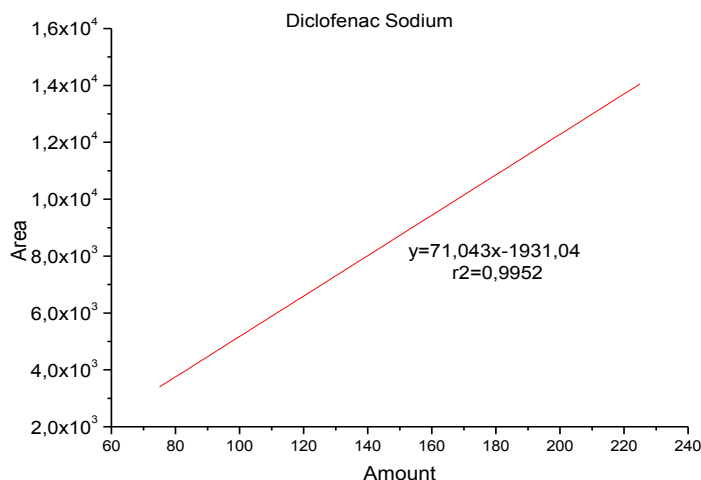


Figura 44. Curva analítica do diclofenaco de sódio na faixa de concentrações de $75,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $225,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Detecção UV em 240 nm.

Tabela 21. Resultados experimentais obtidos na determinação da curva analítica do diclofenaco de sódio. Método MECK. Detecção a 240nm.

Concentração de leitura ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área do Pico
75	3360,50
105	5779,67
120	6331,25
135	7965,50
165	9511,00
180	10684,67
225	14248,50
Inclinação (b)	71,043
Desvio padrão da inclinação	2,213
Intercepto (a)	-1931,036
Desvio padrão do intercepto (Sa)	334,051
Coeficiente de correlação (r2)	0,9952

A Figura 45 apresenta a curva analítica da dexametasona obtida a 240 nm e os valores experimentais obtidos na construção da curva analítica são mostrados na Tabela 22.

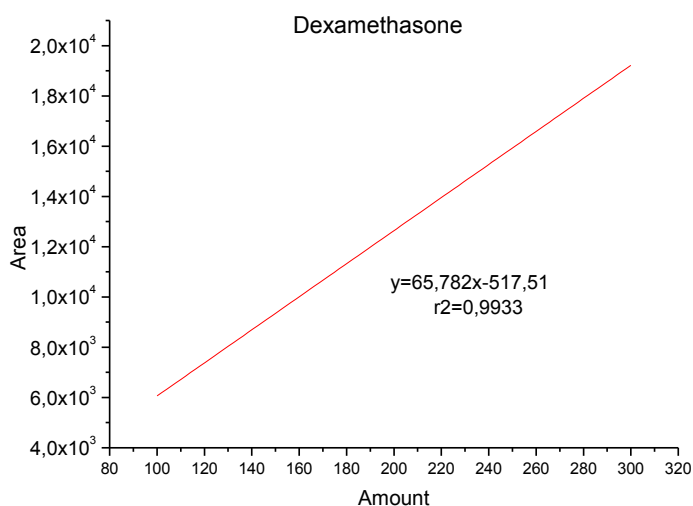


Figura 45 Curva analítica da dexametasona na faixa de concentrações de $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $300,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 22. Resultados experimentais obtidos na determinação da curva analítica da dexametasona. Método MECK. Detecção a 240nm.

Concentração de leitura ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área Do Pico
100	5541,75
140	8696,67
160	10215,00
180	11731,50
200	12938,75
220	13758,75
240	15449,75
300	18833,00
Inclinação (b)	65,782
Desvio padrão da inclinação	2,198
Intercepto (a)	-517,513
Desvio padrão do intercepto (Sa)	442,070
Coeficiente de correlação (r2)	0,9933

Exatidão

A exatidão do método foi calculada considerando a diferença entre a média e o valor verdadeiro aceito. Foram utilizadas as concentrações de 50% (Diclo 75,0

$\mu\text{g mL}^{-1}$ e Dexta $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), 70% (Diclo $105,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e Dexta $140,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), 100% (Diclo $150,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e Dexta $200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) simuladas (solução do fármaco + placebo), em triplicata, para cada concentração. A exatidão foi calculada e os resultados estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Concentração teórica, concentração obtida e porcentagem de recuperação do teste de exatidão do método de quantificação de diclofenaco de sódio e dexametasona.

Diclofenaco de Sódio			Dexametasona		
Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	[obtida] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	[obtida] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)
75,00	77,10	102,80	100,00	102,67	102,67
75,00	78,33	104,43	100,00	102,94	102,94
75,00	78,01	104,02	100,00	100,10	100,10
Média		103,75	Média		101,90
SD		0,85	SD		1,57
105,00	108,04	102,89	140,00	140,67	100,48
105,00	104,68	99,69	140,00	142,15	101,54
105,00	107,13	102,03	140,00	143,49	102,49
Média		101,54	Média		101,50
SD		1,66	SD		1,01
150,00	149,13	99,42	200,00	204,95	102,48
150,00	149,67	99,78	200,00	201,14	100,57
150,00	150,34	100,23	200,00	194,57	97,28
Média		101,69	Média		100,11
SD		1,95	SD		2,63

O resultado da exatidão apresentada nas Tabelas para os dois fármacos mostrou que a recuperação é próxima de 100% e dentro da faixa aceitável de recuperação (80-110%) (BRITO *et al.*, 2005). O desempenho indicou que o método de quantificação desenvolvido é capaz de proporcionar resultados próximos do valor real para a quantificação dos fármacos nas nanopartículas.

Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

A Tabela 24 apresenta os resultados relativos aos limites de detecção e quantificação do diclofenaco de sódio e da dexametasona.

Tabela 24. Resultados experimentais obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação do diclofenaco de sódio e dexametasona.

	Diclofenaco de sódio	Dexametasona
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,181	0,185
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,550	0,559

Precisão do método

O coeficiente de variação (% CV) para a razão das áreas dos picos foi menor que 2%, por tanto a precisão do sistema foi considerada satisfatória segundo os critérios de aceitação. (SILVA *et al.*, 2007b).

Tabela 25. Resultados experimentais obtidos na determinação da precisão do método. Método MECK. Detecção a 240nm

Ensaio	Razão das áreas dos picos diclo/furo	Razão das áreas dos picos dexa/furo
1,0	1,329	1,817
2,0	1,355	1,818
3,0	1,362	1,808
4,0	1,276	1,735
5,0	1,352	1,798
6,0	1,334	1,810

7,0	1,331	1,862
8,0	1,332	1,803
9,0	1,329	1,788
Média	1,333	1,806
SD	0,025	0,035
% CV	1,870	1,938

5.6 Determinação da eficiência de encapsulação

A quantificação dos fármacos (DS e DEXA) encapsulados nas nanopartículas foi realizada pelas duas técnicas analíticas, cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar.

5.6.1 Método Indireto para HPLC:

No método indireto foi determinada a concentração de fármaco não associado ao sistema carreador, após uma análise do sobrenadante resultante do processo de lavagem (três centrifugações das formulações).

Os resultados obtidos por HPLC para a eficiência de encapsulação de diclofenaco de sódio e dexametasona estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26 – Quantidade de fármaco encapsulado e eficiência de encapsulação de nanopartículas de PLGA.

	DICLO	DEXA
F01	43,22 ± 10,55	53,11 ± 7,00
F02	42,87 ± 8,53	57,11 ± 4,44
F03	40,67 ± 10,26	45,00 ± 2,36
F04	52,60 ± 6,09	62,47 ± 9,61
F05	49,37 ± 2,78	46,67 ± 4,71
F06	54,60 ± 6,93	56,64 ± 2,78
F07	53,93 ± 4,01	60,67 ± 12,10
F08	49,09 ± 3,27	66,37 ± 10,85

Na Figura 46 pode-se observar as eficiências de encapsulação encontradas para as 8 formulações realizadas. A dexametasona apresentou uma encapsulação de $45,00 \pm 2,4\%$ até $66,37 \pm 10,9\%$, enquanto o diclofenaco de $40,67 \pm 10,3\%$ a $54,60 \pm 6,9\%$ nas diferentes formulações. A dexametasona apresentou uma maior encapsulação por ser mais hidrofóbica e, assim, ter maior afinidade pelo polímero hidrofóbico e maior possibilidade de encapsular do que o diclofenaco de sódio que é hidrofílico. No entanto o método de encapsulação permitiu obter bons resultados para os dois fármacos.

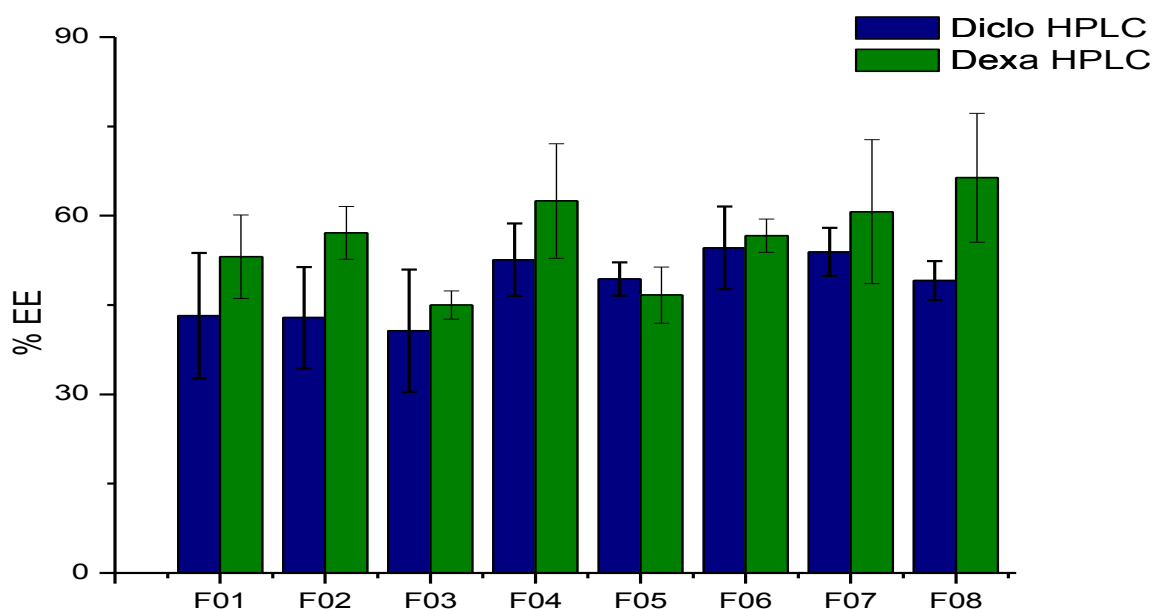


Figura 46. Eficiência de encapsulação encontrada pelo método indireto utilizando como técnica de quantificação HPLC.

5.6.2 Método Direto (CE):

Utilizando a metodologia analítica de eletroforese capilar foi quantificada a eficiência de encapsulação dos fármacos nas nanopartículas de PLGA. Foi utilizada o método direto, as nanopartículas em pó (previamente liofilizadas) foram abertas por dissolução com NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, seguido da precipitação do polímero com metanol.

Os resultados obtidos por CE para a eficiência de encapsulação de diclofenaco de sódio e dexametasona estão apresentados na Tabela 27.

Tabela 27 – Quantidade de fármaco encapsulado e eficiência de encapsulação de nanopartículas de PLGA, pela técnica de eletroforese capilar

	DICLO	DEXA
F01	40,39 ± 1,91	57,89 ± 0,82
F02	46,11 ± 1,77	69,32 ± 0,86
F03	31,26 ± 4,32	33,75 ± 0,75
F04	55,83 ± 3,52	61,68 ± 2,56
F05	36,43 ± 4,84	38,77 ± 4,78
F06	40,21 ± 2,00	50,04 ± 0,30
F07	43,40 ± 0,99	61,07 ± 3,02
F08	51,42 ± 5,54	66,88 ± 8,44

Na Figura 47 pode-se observar as eficiências de encapsulação encontradas para as 8 formulações realizadas. A dexametasona apresentou uma encapsulação de 33,75 ± 0,8% a 69,32 ± 0,9 % enquanto o diclofenaco de sódio de 31,3 ± 4,3% a 55,8 ± 3,5% nas diferentes formulações. Ao igual que o encontrado na EE obtida por CE, a dexametasona apresentou uma maior encapsulação que o diclofenaco de sódio.

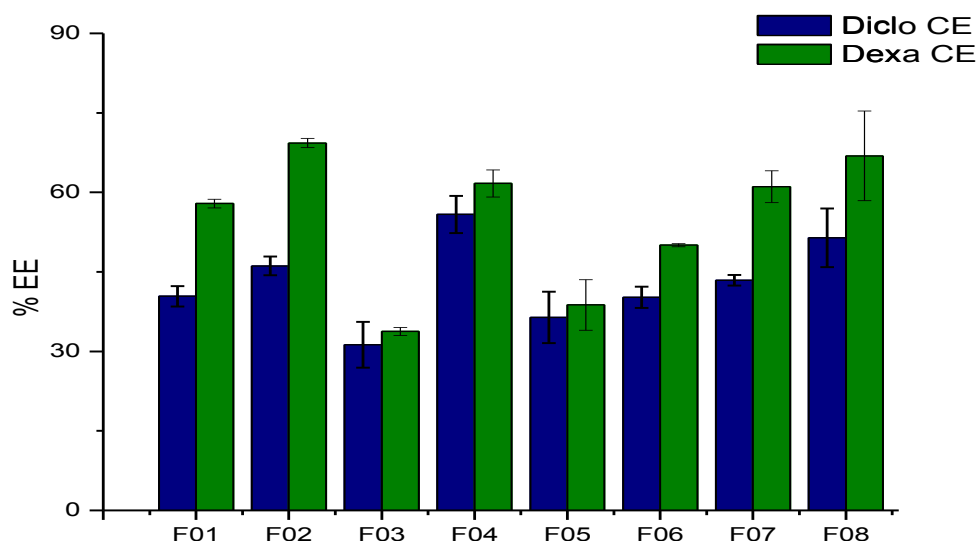


Figura 47. Eficiência de encapsulação encontrada pelo método indireto utilizando como técnica de quantificação CE.

A eficiência de encapsulação dos fármacos foi similar utilizando as duas técnicas de quantificação HPLC e CE, porém obtiveram maiores eficiências de encapsulação no método indireto (Figura 48 e 49) possivelmente, porque as nanopartículas com três lavagens não estavam completamente limpas, ficando fármaco adsorvido na superfície. Portanto, para motivos de eficiência de encapsulação o mais adequado foi pelo método direto, através da técnica de eletroforese capilar.

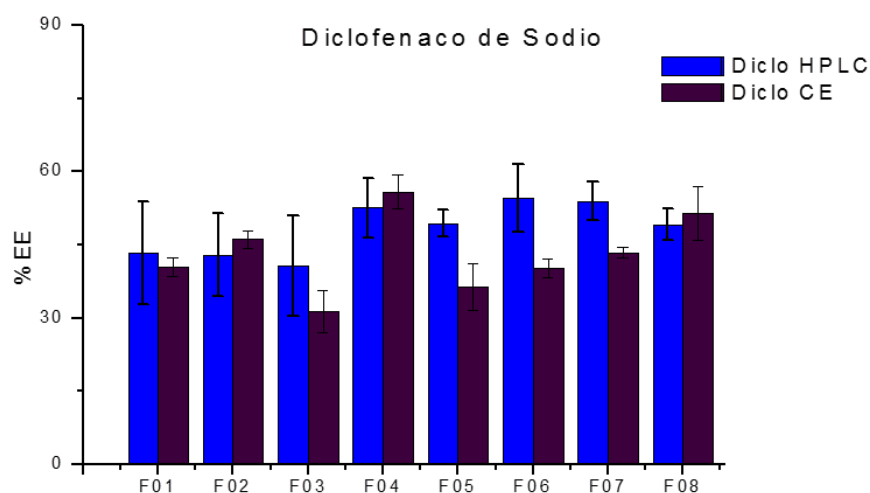


Figura 48. Eficiência de encapsulação encontrada pelo método indireto (HPLC) e método direto (CE) para o Diclofenaco de Sódio.

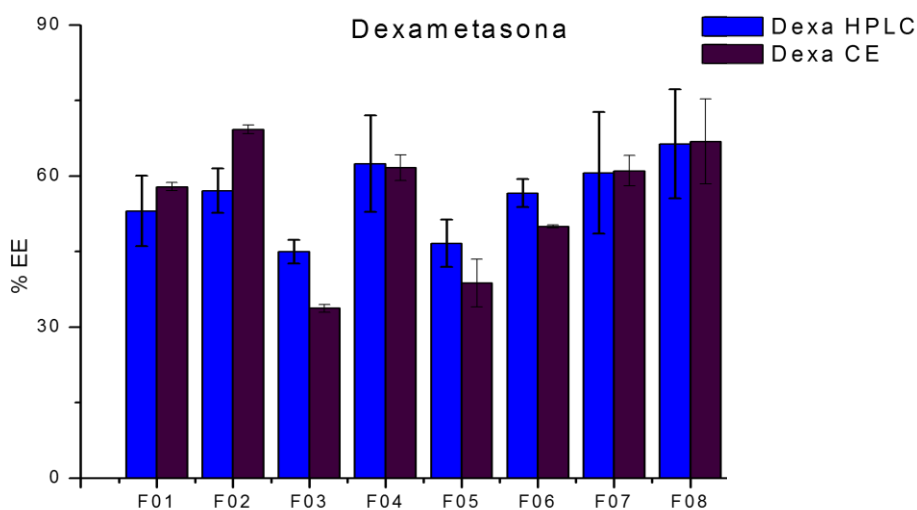


Figura 49. Eficiência de encapsulação encontrada pelo método indireto (HPLC) e método direto (CE) para a Dexametasona.

De acordo com a Figura 47 se pode concluir que o método realizado para a encapsulação conjunta dos fármacos permitiu a co-encapsulação dos dois fármacos e que nas formulações F04, F06 e F08 se obtiveram as maiores eficiências de encapsulação, devido a que nessas a quantidade de polímero PLGA era maior. Na F08 conseguiram-se os melhores resultados (Tabela 27), $51,42 \pm 5,54$ % para o diclofenaco e $66,88 \pm 8,44$ % para a dexametasona.

De forma similar, Yordanov e colaboradores (2013) relataram eficiência de encapsulação entre 63 e 68 % de etoposídeo em nanopartículas obtidas por um método similar ao elaborado. Assim sendo, a eficiência de encapsulação do diclofenaco e dexametasona relatada no presente trabalho (51% e 66% respectivamente) pode ser considerada satisfatória.

5.7 Delineamento experimental

Os efeitos dos três parâmetros escolhidos (concentração polímero PLGA, concentração Pluronic e tempo de sonicação) foram estudados utilizando um planejamento fatorial completo. No diagrama de pareto obtido para as respostas pode-se observar somente que as quantidades de PLGA e de Pluronic tiveram efeito significativo de 95% sobre o tamanho de partícula (Figura 50). Porém, as variáveis estudadas não tiveram efeito significativo na EE do Diclo, EE da DEXA e potencial zeta.

Ao falta de um efeito significativo indica que o método de elaboração das nanopartículas é robusto. O método desenvolvido permite uma encapsulação dos fármacos (DS e DX) adequada aproximadamente maior ao 50% para a maioria das formulações elaboradas.

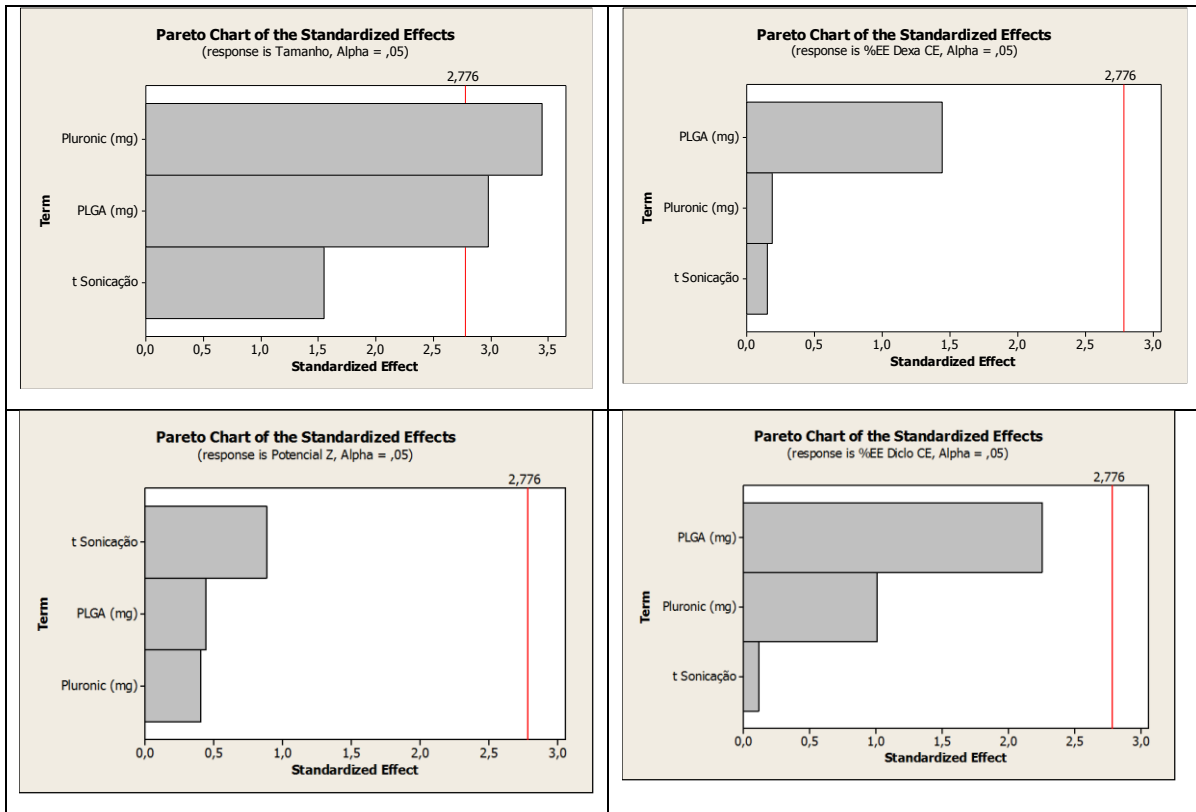


Figura 50. Diagrama de Pareto Padronizado para tamanho de partícula (nm), potencial zeta, eficiência de encapsulação Diclofenaco de sódio (%EE Diclo) e eficiência de encapsulação da dexametasona (%EE Dexa).

No entanto nas Figuras 51 e 52 se pode ver a influencia das variáveis na eficiência de encapsulação dos fármacos, a quantidade de polímero PLGA influencia diretamente na encapsulação dos fármacos. Porém, ao aumentar o PLGA pode se ver um aumento na eficiência de encapsulação. O tempo de sonicação não tem uma influência marcada.

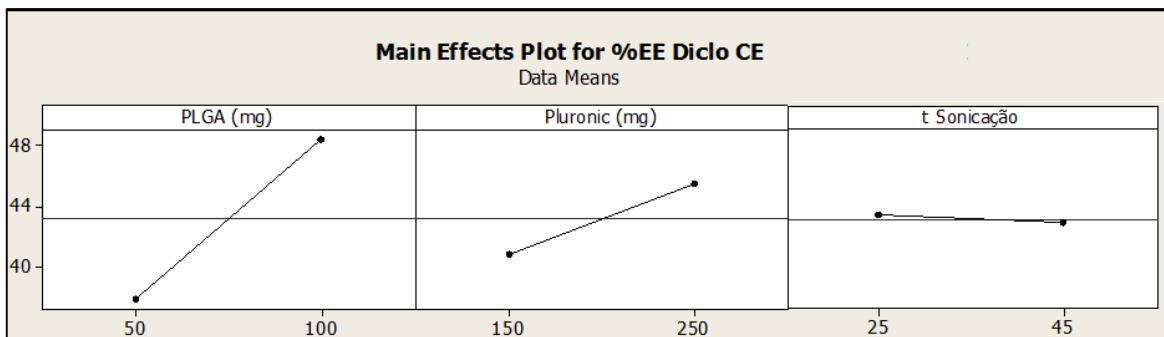


Figura 51. Efeitos das variáveis sobre a eficiência de encapsulação do diclofenaco de sódio (%EE Diclo).

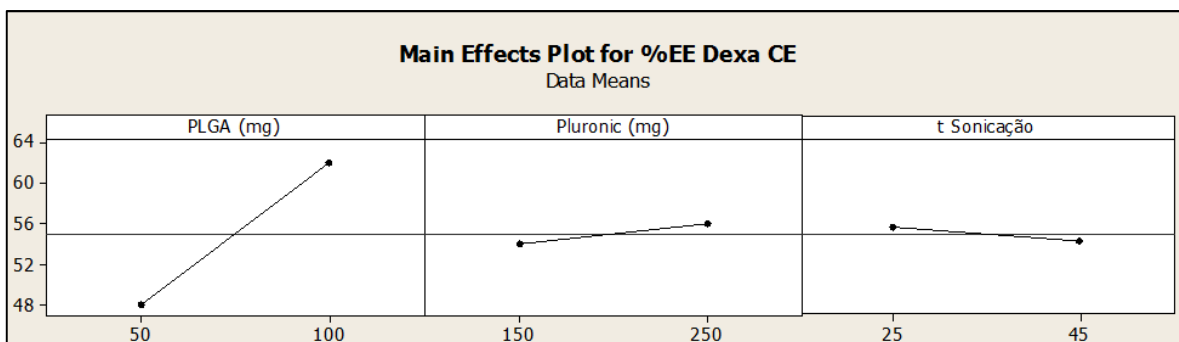


Figura 52. Efeitos das variáveis sobre a eficiência de encapsulação da dexametasona (%EE Dexa).

Efeito da concentração do polímero PLGA

A concentração do polímero na fase orgânica foi um fator importante no aumento do tamanho das nanopartículas, isso é conforme ao encontrado na literatura. (SONG *et al.*, 1997),(SCHLICHER *et al.*, 1997). Ao aumentar a concentração de polímero PLGA aumenta a viscosidade da solução orgânica, porém, a alta resistência viscosa às forças da sonicação dificulta a formação de nanopartículas com menores tamanhos. (KWON *et al.*, 2001). (Figura53).

O aumento da concentração de PLGA gera o aumento na viscosidade da fase orgânica, reduzindo assim, a tensão de cisalhamento e promove a formação de gotículas maiores. Além disso, o aumento da viscosidade poderia dificultar a dispersão rápida de uma solução de PLGA para a fase aquosa, resultando em gotículas maiores o qual forma nanopartículas de maior tamanho após da eliminação do solvente orgânico. (SONG *et al.*, 2008).

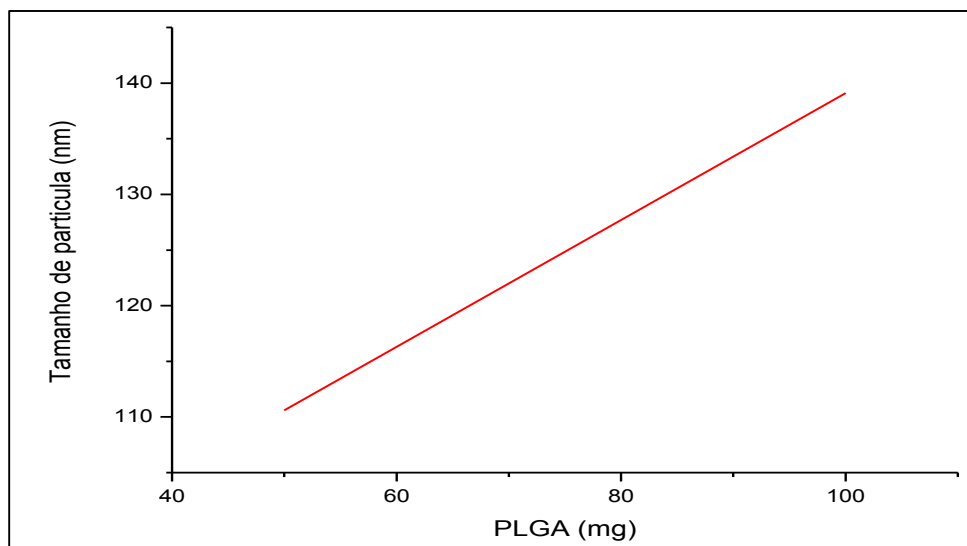


Figura 53 Efeito do PLGA no tamanho de partícula (nm) tendo constantes as outras duas variáveis (tempo 25s, 3% Pluronic).

Por outro lado, um aumento da concentração de PLGA resultou num aumento da eficiência de encapsulamento dos fármacos, o que concorda com o encontrado na literatura. (KWON *et al.*, 2001). (Figura 54)

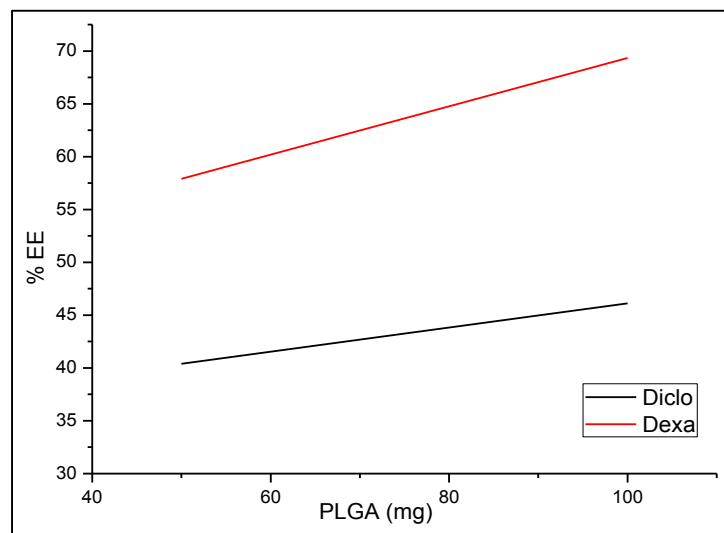


Figura 54 Efeito do PLGA na eficiência de encapsulação de diclofenaco de sódio e dexametasona, tendo constantes as outras duas variáveis (tempo 25s, 3% Pluronic).

Efeito da concentração do Pluronic

Quando a concentração do Pluronic aumentou de 150mg a 250 mg, a eficiência de encapsulação dos dois fármacos aumentou, possivelmente, devido ao aumento da estabilidade proporcionada pelo estabilizante na formação das micelas na emulsão (Figura 49 e 50).

Todos os surfactantes citados na literatura têm valores teóricos de HLB (balance hidrofílico- lipofílico) de 1 até aproximadamente 50. Os surfactantes mais hidrofílicos têm valores de HLB superior a 10, enquanto os mais lipofílicos têm valores de HLB entre 1 e 10. (BOUCHEMAL *et al.*, 2004)

O Pluronic® F68 apresenta um alto equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB=29, a 25 °C), e de acordo com Bouchemal *et al.*, a média de tamanho da partícula diminui quando o valor do HLB do sistema coloidal aumenta, eles utilizaram Pluronic F68 como agente estabilizante e formaram nanopartículas com tamanho de 124 ± 46 nm, similar ao encontrado no presente estudo realizado. (BOUCHEMAL *et al.*, 2004)

Ao aumentar a concentração do Pluronic, o tamanho de partícula diminui (Figura 55). Deve-se provavelmente, que aumentando a quantidade de Pluronic a tensão interfacial diminui. (GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2004) gerando uma diminuição na tensão de cisalhamento durante a emulsificação e promovendo uma formação de gotículas de emulsão menores. Assim, o diâmetro médio das nanopartículas diminuiu com o aumento da concentração de Pluronic. (SONG *et al.*, 2008).

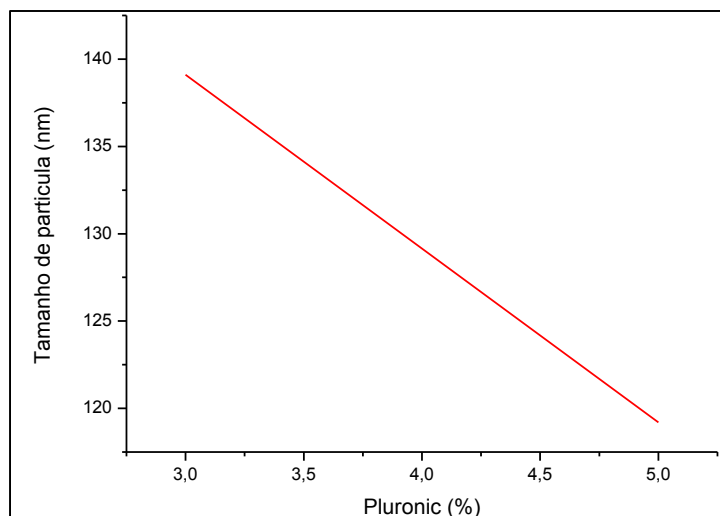


Figura 55 Efeito do Pluronic no tamanho de partícula (nm) tendo constantes as outras duas variáveis (PLGA 100mg e 25s).

Efeito do tempo de sonicação

Ao aumentar o tempo de sonicação o tamanho de partícula diminui (Figura 56), esta concorda com os resultados obtidos por Song e colaboradores (2008) eles encontraram que ao aumentar o tempo de sonicação o tamanho da partícula diminuía (LANCHEROS *et al.*, 2014)(SONG *et al.*, 2008)

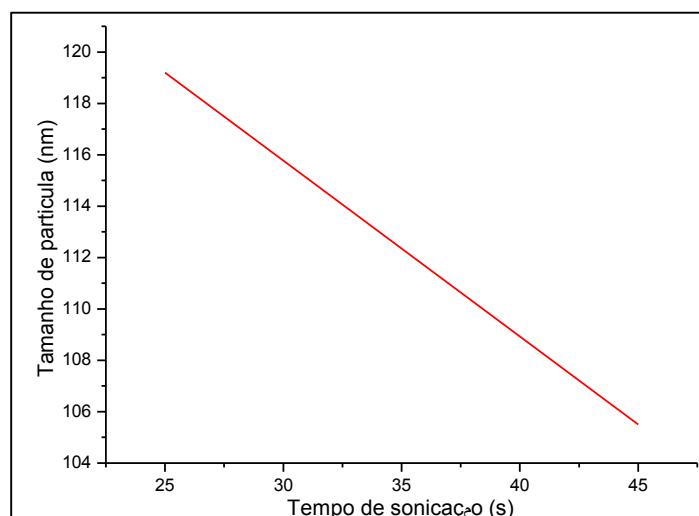


Figura 56 Efeito do tempo de sonicação (s) no tamanho de partícula (nm) tendo constantes as outras duas variáveis (100mg PLGA, 5% Pluronic).

6. CONCLUSÃO

Os métodos analíticos, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese capilar (CE) foram desenvolvidos, validados e aplicados para a determinação da eficiência de encapsulação dos fármacos antiinflamatórios, dexametasona e diclofenaco de sódio nas nanopartículas (NPs) poliméricas. As nanopartículas foram obtidas através da técnica de emulsão–evaporação de solvente. A eficiência de encapsulação dos fármacos foi otimizada através do desenho experimental fatorial. As nanopartículas contendo os fármacos foram caracterizadas físico-quimicamente observando sua morfologia por TEM e SEM, as NPs apresentaram forma esférica, com tamanho e forma similares e sem formação de aglomerados. O potencial zeta demonstrou que as NPs são estáveis em suspensão. O pH foi avaliado durante um mês observando que as NPs obtidas apresentaram adequada estabilidade pelo período avaliado. Através da técnica de espectroscopia vibracional IR foi observado que os fármacos não apresentam interação química com o veículo copolímero ácido poli (D,L láctico-co-glicólico) (PLGA). A eficiência de encapsulação obtida foi maior que 50% para ambos os fármacos. Os métodos analíticos validados foram lineares, precisos e exatos, o método CE foi mais rápido e menos agressivo ao meio ambiente, pelo pouco uso de solvente orgânico. Portanto, a eletroforese capilar é um método alternativo à HPLC e acreditasse que se tornara importante para futuras investigações de nanopartículas e para a nanociência em geral.

7. REFERÊNCIAS

Administracion de medicamentos parenterales por Lesmine. Disponível em: <<http://www.buenastareas.com/ensayos/Administracion-De-Medicamentos-Parenterales/24509360.html>>. Acesso em: 3 fev. 2015.

ADRIANA R. POHLMANN, L. C. Structural model of polymeric nanospheres containing indomethacin ethyl ester and in vivo antiedematogenic activity. **International Journal of Nanotechnology - INT J NANOTECHNOL**, v. 4, n. 5, 2007.

A. M PIMENTA, A. N. A. Simultaneous potentiometric and fluorimetric determination of diclofenac in a sequential injection analysis system. **Analytica Chimica Acta**, n. 2, p. 185–194, 2002.

ANASTOS, N.; BARNETT, N.; LEWIS, S. Capillary electrophoresis for forensic drug analysis: a review. **Talanta**, v. 67, n. 2, p. 269–279, 15 ago. 2005.

A. R. KULKARNI, K. S. S. Urea-formaldehyde nanocapsules for the controlled release of diclofenac sodium. **Journal of Microencapsulation**, v. 17, n. 4, p. 449–458, Enero 2000.

ARNEDO, A. et al. Determination of oligonucleotide ISIS 2922 in nanoparticulate delivery systems by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 871, n. 1–2, p. 311–320, 25 fev. 2000.

ASSIS, D. N. DE. **Biodistribuição do fluconazol marcado com 99m tecnécio, livre e encapsulado em nanocápsulas, em um modelo experimental de infecção com Candida Albicans.** Dissertação de Mestrado. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/NCFA-7D3MEN>>. Acesso em: 5 nov. 2014.

BAEYENS, V. et al. Determination of dexamethasone in tears by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications**, v. 692, n. 1, p. 222–226, 25 abr. 1997.

BARRATT, NULL. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 5, p. 163–171, maio 2000.

BARTOLOMEI, M. et al. Physico-chemical characterisation and intrinsic dissolution studies of a new hydrate form of diclofenac sodium: comparison with anhydrous form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 5, p. 1105–1113, 18 mar. 2006.

BECK, R. C. R. et al. Nanoparticles containing dexamethasone: Physicochemical properties and anti-inflammatory activity. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, n. 1, p. 11–15, 2003.

BECK, R. C. R. et al. Nanoparticle-coated organic-inorganic microparticles: experimental design and gastrointestinal tolerance evaluation. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 990–996, out. 2006.

BHATTACHARYA, S. S. et al. A RP-HPLC method for quantification of diclofenac sodium released from biological macromolecules. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 354–359, jul. 2013.

BLIESNER, D. M. Components of Methods Validation. In: **Validating Chromatographic Methods**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2006. p. 8–14.

BOOTZ, A. et al. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 57, n. 2, p. 369–375, mar. 2004.

BOUCHEMAL, K. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n. 1–2, p. 241–251, 6 ago. 2004.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 5, p. 631–651, 13 set. 2002.

BRITO, N. M. et al. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: ESTRATÉGIA E DISCUSSÃO. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, n. 0, 9 dez. 2005.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman - 12.ed.** [s.l.] McGraw Hill Brasil, 2012.

BUTOESCU, N.; JORDAN, O.; DOELKER, E. Intra-articular drug delivery systems for the treatment of rheumatic diseases: a review of the factors influencing their performance. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 73, n. 2, p. 205–218, out. 2009.

CALADO, V.; MONTGOMERY, V. C. E D. **Planejamento de Experimentos usando o Statistica**. [s.l.] Editora E-papers, [s.d.].

CANDIOTI, L. V. et al. Multiple response optimization applied to the development of a capillary electrophoretic method for pharmaceutical analysis. **Talanta**, v. 69, n. 1, p. 140–147, 15 mar. 2006.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. [s.l.] EdUFSCar, 2001.

CHENNAMANENI, S. R. et al. Development of a novel bioerodible dexamethasone implant for uveitis and postoperative cataract inflammation. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 167, n. 1, p. 53–59, 10 abr. 2013.

CHORNY, M. et al. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 83, n. 3, p. 389–400, 30 out. 2002.

CULLEN, L. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide in man. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 287, n. 2, p. 578–582, nov. 1998.

CZAPLICKI, S. Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. In: MARTIN, D. (Ed.). **Column Chromatography**. [s.l.] InTech, 2013.

DAVARANI, S. S. H. et al. Electro membrane extraction of sodium diclofenac as an acidic compound from wastewater, urine, bovine milk, and plasma samples and quantification by high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 722, p. 55–62, Abril 2012.

DE BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. [s.l.] Editora da UNICAMP, 1995.

DITTMANN, M. M. et al. Advances in capillary electrochromatography. **Journal of Capillary Electrophoresis**, v. 4, n. 5, p. 201–212, out. 1997.

Drugs. WebContent. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/default.htm>>. Acesso em: 5 nov. 2014.

EL-SAYED, Y. M. et al. A rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac sodium in serum and its use in pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 40, n. 10, p. 727–729, 1 out. 1988.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950–2962, 15 abr. 2009.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. **ACS Nano**, v. 3, n. 1, p. 16–20, Enero 2009.

FILLAFER, C. et al. Fluorescent Bionanoprobes to Characterize Cytoadhesion and Cytoinvasion. **Small**, v. 4, n. 5, p. 627–633, 1 maio 2008a.

FILLAFER, C. et al. Fluorescent Bionanoprobes to Characterize Cytoadhesion and Cytoinvasion. **Small**, v. 4, n. 5, p. 627–633, 1 maio 2008b.

FRATODDI, I. et al. Functional polymeric nanoparticles for dexamethasone loading and release. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 93, p. 59–66, 1 maio 2012.

GALINDO-RODRIGUEZ, S. et al. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 8, p. 1428–1439, ago. 2004.

GAMISANS, F. et al. Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 179, n. 1, p. 37–48, 1 mar. 1999.

GARCIA, C. V. et al. Determination of dexamethasone acetate in cream by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, n. 3, p. 597–600, 10 mar. 2003.

GERVASIO, A. P. G. et al. Capillary electrophoresis coupled to plasma spectrometry: an efficient tool for speciation. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 65–74, jan. 2003.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 11, p. 1152–1161, 30 set. 2007.

GOGOTSI, Y. **Nanomaterials Handbook**. [s.l.] CRC Press, 2006.

GONZÁLEZ QUINTANA, X.; NOTARIO RODRÍGUEZ, M.; GUZMÁN SABO, A. Las plaquetas en la diabetes mellitus. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, v. 17, n. 1, p. 19–24, abr. 2001.

GOODWIN, J. E. et al. Knockout of the vascular endothelial glucocorticoid receptor abrogates dexamethasone-induced hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 29, n. 7, p. 1347–1356, jul. 2011.

GRAY, P. A. et al. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cyclo-oxygenase and lipoxygenase activity in whole blood from aspirin-sensitive asthmatics vs healthy donors. **British Journal of Pharmacology**, v. 137, n. 7, p. 1031–1038, dez. 2002.

GRAF, R.; MINAMITAKE, Y.; LANGER, R. S. **Copolymer of polyalkylene glycol and biodegradable polymer selected from polyanhydride, polyhydroxybutyric acid, polycaprolactones, polyorthoesters, polysiloxanes, polyglycolic acid or polylactic acid or copolymer**, 6 ago. 1996. Disponível em: <<http://www.google.co.in/patents/US5543158>>. Acesso em: 3 fev. 2015

GU, X.; MELEKA-BOULES, M.; CHEN, C. L. Micellar electrokinetic capillary chromatography combined with immunoaffinity chromatography for identification and determination of dexamethasone and flumethasone in equine urine. **Journal of Capillary Electrophoresis**, v. 3, n. 1, p. 43–49, fev. 1996.

HÁJKOVÁ, R. et al. Simultaneous determination of methylparaben, propylparaben, sodium diclofenac and its degradation product in a topical emulgel by reversed-phase liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, Papers presented at the international conference: Instrument methods of analysis ; modern trends and applications. v. 467, n. 1–2, p. 91–96, 3 set. 2002.

HALL, J. E. **Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology**. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 2010.

HARIHARAN, S. et al. Design of estradiol loaded PLGA nanoparticulate formulations: a potential oral delivery system for hormone therapy. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 1, p. 184–195, jan. 2006.

HURSON, C. J. et al. Gene expression analysis in human osteoblasts exposed to dexamethasone identifies altered developmental pathways as putative drivers of osteoporosis. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 8, n. 1, p. 12, 12 fev. 2007.

JANEWAY, C. A. How the immune system works to protect the host from infection: A personal view. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 13, p. 7461–7468, 19 jun. 2001.

JORGENSON, J. W.; LUKACS, K. D. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 1298–1302, 1 jul. 1981.

JÚNIOR, S.; [UNESP, A. A. DA. Micropartículas de ácido poli láctico-co-glicólico obtidas por Spray Drying para liberação prolongada intra-ocular de fármacos. **Aleph**, p. 177 f., 11 abr. 2008.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica - 10ed.** [s.l.] McGraw Hill Brasil, 2010.

KHANVILKAR, V. et al. CHROMATOGRAPHIC METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR SIMULTANEOUS ESTIMATION OF TRAMADOL HYDROCHLORIDE AND DICLOFENAC SODIUM IN BULK AND FORMULATION. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 7, p. 5196–5205, 2013.

KLIMEŠ, J. et al. HPLC evaluation of diclofenac in transdermal therapeutic preparations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 217, n. 1–2, p. 153–160, Abril 2001.

KNOX, R. **World's Most Popular Painkiller Raises Heart Attack Risk**. Disponível em: <<http://www.npr.org/blogs/health/2013/02/12/171832741/worlds-most-popular-painkiller-raises-heart-attack-risk>>. Acesso em: 5 nov. 2014.

KOEHLER, K. C. et al. A Diels-Alder modulated approach to control and sustain the release of dexamethasone and induce osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 34, n. 16, p. 4150–4158, maio 2013.

KOKKI, H. et al. Diclofenac readily penetrates the cerebrospinal fluid in children. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 65, n. 6, p. 879–884, jun. 2008.

KOOGAN, G. **ECKERT / FISIOLOGIA ANIMAL - 4 ED.** Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 2008.

KUEMPEL, E. D.; GERACI, C. L.; SCHULTE, P. A. Risk Assessment Approaches and Research Needs for Nanomaterials: An Examination of Data and Information from Current Studies. In: SIMEONOVA, P. P.; OPOPOL, N.; LUSTER, M. I. (Eds.). **Nanotechnology – Toxicological Issues and Environmental Safety and Environmental Safety**. NATO Science for Peace and Security Series. [s.l.] Springer Netherlands, 2007. p. 119–145.

KUMAR, V. et al. HPLC Determination of dexamethasone in human plasma and its application to an in vitro release study from endovascular stents. **Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61, n. 11, p. 908–911, 1 nov. 2006.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Rev Bras Anestesiol**, p. 498–512, 2002.

KWON, H.-Y. et al. Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification–diffusion method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 182, n. 1–3, p. 123–130, 30 jun. 2001.

LACHMANN, B.; KRATZEL, M.; NOE, C. R. Rapid Determination of Diclofenac in Pharmaceutical Formulations by Capillary Zone Electrophoresis. **Scientia Pharmaceutica**, v. 80, n. 2, p. 311–316, jun. 2012.

LANCHEROS, R. J. et al. PLGA nanoparticles production by emulsion and evaporation to encapsulate N-acetylcysteine (NAC). **Universitas Scientiarum**, v. 19, n. 2, p. 161–168, ago. 2014.

LANGER, R. Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. **Accounts of Chemical Research**, v. 33, n. 2, p. 94–101, fev. 2000.

LEE, S.-H. et al. Prescription Pattern of NSAIDs and the Prevalence of NSAID-induced Gastrointestinal Risk Factors of Orthopaedic Patients in Clinical Practice in Korea. **Journal of Korean Medical Science**, v. 26, n. 4, p. 561–567, abr. 2011.

Little Big Science. Disponível em: <<https://www.yumpu.com/en/document/view/24559421/little-big-science>>. Acesso em: 5 nov. 2014.

Livro - DTG - Dicionário Terapêutico Guanabara 2014/2015 - Korolkovas. Disponível em: <<http://www.livrariaflorence.com.br/dtg-dicionario-terapeutico-guanabara-2014-2015-korolkovas>>. Acesso em: 5 nov. 2014.

LUO, Y. et al. Resolution, quantification and confirmation of betamethasone and dexamethasone in equine plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 6, p. 825–832, 30 mar. 2005.

MABOUNDOU, C. W. et al. Separation of fifteen non-steroidal anti-inflammatory drugs using micellar electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Chromatography. B, Biomedical Applications**, v. 657, n. 1, p. 173–183, 1 jul. 1994.

MAINARDES, R. M.; EVANGELISTA, R. C. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 290, n. 1–2, p. 137–144, 16 fev. 2005.

MARÍA S AURORA-PRADO, M. S. Comparison between capillary electrophoresis and liquid chromatography for the determination of diclofenac sodium in a pharmaceutical tablet. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 2, p. 333–40, 2002.

MELO, N. F. S. DE et al. Poly(Lactide-co-Glycolide) Nanocapsules Containing Benzocaine: Influence of the Composition of the Oily Nucleus on Physico-Chemical Properties and Anesthetic Activity. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 8, p. 1984–1994, 1 ago. 2011.

MEYER, V. R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2013.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, n. 3, p. 311–330, mar. 2005.

MOINARD-CHÉCOT, D. et al. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion process. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 317, n. 2, p. 458–468, Enero 2008.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Síntese, caracterização e degradação “in vitro” do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 11, n. 3, p. 340–350, 2006.

MRESTANI, Y.; NEUBERT, R. H.; KRAUSE, A. Partition behaviour of drugs in microemulsions measured by electrokinetic chromatography. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 5, p. 799–801, maio 1998.

M. SAMARASINGHE, R.; K. KANWAR, R.; R. KANWAR, J. The Role of Nanomedicine in Cell Based Therapeutics in Cancer and Inflammation. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v. 1, n. 3, p. 133–144, 2012.

MÜLLER, C. R. et al. Spray-dried diclofenac-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. **Die Pharmazie**, v. 56, n. 11, p. 864–867, nov. 2001.

NETO, O. A. **Dor: Princípios e prática**. [s.l.] Artmed, [s.d.].

NEVES, C. DE F. C.; SCHVARTZMAN, M. M. DE A. M.; JORDÃO, E. Técnica para seleção de variáveis aplicada à separação de gases. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 327–329, maio 2002.

NISHI, H. et al. Separation and determination of lipophilic corticosteroids and benzothiazepin analogues by micellar electrokinetic chromatography using bile salts. **Journal of Chromatography A**, v. 513, p. 279–295, jan. 1990.

NISHI, H.; MATSUO, M. Separation of Corticosteroids and Aromatic Hydrocarbons by Cyclodextrin-Modified Micellar Electrokinetic Chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 14, n. 5, p. 973–986, 1 mar. 1991.

O'NEIL, M. J. (ED.). **The Merck Index**. Fifteenth Edition, New edition edition ed. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2013.

PALOMO, M. E.; BALLESTEROS, M. P.; FRUTOS, P. Analysis of diclofenac sodium and derivatives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, n. 1, p. 83–94, out. 1999.

PICÓ, Y.; RODRÍGUEZ, R.; MAÑES, J. Capillary electrophoresis for the determination of pesticide residues. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 133–151, mar. 2003.

RAFFIN, R. P. et al. Nanocápsulas poliméricas secas contendo indometacina: estudo de formulação e de tolerância gastrointestinal em ratos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. vol. 22, no. 2, 2003.

RAO, D. A. et al. Biodegradable PLGA based nanoparticles for sustained regional lymphatic drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 4, p. 2018–2031, 2010.

RATZINGER, G. et al. Surface modification of PLGA nanospheres with Gd-DTPA and Gd-DOTA for high-relaxivity MRI contrast agents. **Biomaterials**, v. 31, n. 33, p. 8716–8723, nov. 2010.

RAWAT, M. et al. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 9, p. 1790–1798, set. 2006.

RAZZAQ, S. N. et al. Simultaneous RP-HPLC determination of sparfloxacin and dexamethasone in pharmaceutical formulations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 2, p. 301–309, jun. 2013.

REIS, A. C. B. P. Encapsulação de fármacos peptídicos pelo método de emulsificação/gelificação interna. 2007.

SALLUM, J. M. C. **Estudo comparativo do potencial antiinflamatório do diclofenaco de potássio e da hidrocortisona no Eritema Solar**. Dissertation. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/5386>>. Acesso em: 5 nov. 2014.

SAMTANI, M. N.; JUSKO, W. J. Quantification of dexamethasone and corticosterone in rat biofluids and fetal tissue using highly sensitive analytical methods: assay validation and application to a pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 21, n. 6, p. 585–597, 1 jun. 2007.

SANTOS, M. R.; TAVARES, M. F. M.; RUBIM, J. C. Development of a laser induced fluorescence detection scheme for capillary electrophoresis. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 585–589, out. 2000.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. vol. 21, no. 2, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, out. 2003.

SCHLICHER, E. J. A. M. et al. Preparation and characterisation of Poly (d,l-lactic-co-glycolic acid) microspheres containing desferrioxamine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 153, n. 2, p. 235–245, 30 jul. 1997.

SCOTT, G. **Degradable Polymers: Principles and Applications**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2003.

SHAHWAL, V. K. PREFORMULATION STUDIES AND PREPERATION OF DITHRANOL LOADED SOLID LIPID NANOPARTICLES. **International Journal of Biomedical Research**, v. 3, n. 7, 12 ago. 2012.

SHAIKH, J. et al. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3–4, p. 223–230, 28 jun. 2009.

SILVA, J. A. F. DA. Electrochemical detection in capillary electrophoresis. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 56–64, jan. 2003.

SILVA, J. A. F. DA et al. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 740–744, jun. 2007a.

SILVA, R. M. F. DA et al. Indinavir sulfate capsules: pharmaceutics-technical-industrial and dissolution method development and evaluation. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 385–395, set. 2007b.

SILVA, S. G. A. Desenho de experiências aplicado à produção de nanopartículas de PLGA para liberação controlada de Doxorubicina. 2012.

SILVERSTEIN, R. M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. [s.l.] Livros Técnicos e Científicos, 2000.

SINATRA, R. S. et al. **Acute Pain Management**. [s.l.] Cambridge University Press, 2009.

SIRÉN, H.; SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; OREŠIČ, M. Capillary electrophoresis with UV detection and mass spectrometry in method development for profiling metabolites of steroid hormone metabolism. **Journal of Chromatography B**, v. 871, n. 2, p. 375–382, ago. 2008.

SISMOTTO, M.; PASCHOAL, J. A. R.; REYES, F. G. R. Analytical and regulatory aspects for determination of macrolide residues in animal-derived foods by liquid chromatography associated with mass spectrometry. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 449–461, jan. 2013.

SOANE, D.; OFFORD, D.; WARE, W. Nanotechnology Applications in Textiles. In: SCHULTE, J. (Ed.). **Nanotechnology**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2005. p. 149–161.

SONG, C. X. et al. Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 43, n. 2–3, p. 197–212, 18 jan. 1997.

SONG, K. C. et al. The effect of type of organic phase solvents on the particle size of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 276, n. 1–3, p. 162–167, 15 mar. 2006.

SONG, X. et al. PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and verapamil hydrochloride: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 350, n. 1–2, p. 320–329, 28 fev. 2008.

SRINIVASAN, K. et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of Pongamia pinnata leaves in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, n. 2-3, p. 151–157, dez. 2001.

SUAVE, J. et al. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, n. 2, p. 12–20, 27 maio 2009.

SÜLEYMAN, H. et al. Anti-inflammatory effects of selective COX-2 inhibitors. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 775–780, dez. 2004.

SURI, S. S.; FENNIRI, H.; SINGH, B. Nanotechnology-based drug delivery systems. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 2, n. 1, p. 16, 1 dez. 2007.

TAVARES, M. F. M. Separation Mechanisms in Capillary Electrophoresis. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493–511, out. 1997.

TORCHILIN, V. P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. **The AAPS journal**, v. 9, n. 2, p. E128–147, 2007.

United States Pharmacopeia and National Formulary. [s.l.] United States Pharmacopeial Convention, Incorporated, 2011.

VIEIRA, S. **Estatística experimental**. [s.l.] Atlas, 1999.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. **Aplicações Farmacêuticas de Polímeros**. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=47013642012>>. Acesso em: 5 nov. 2014.

WILLIAM C. BRUMLEY, C. M. B. Capillary liquid chromatography-mass spectrometry and micellar electrokinetic chromatography as complementary techniques in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, n. 2, p. 635–644, 1994.

WILLIAMS, D. B.; CARTER, C. B. **Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2009.

XIONG, Y.; XIAO, K. P.; RUSTUM, A. M. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method to separate low levels of dexamethasone and other related compounds from betamethasone. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 3, p. 646–654, Abril 2009.

ZHANG, L. et al. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, n. 5, p. 761–769, 24 out. 2007.