

ARIANE SIMÕES TUNUSSI

“Desenvolvimento do processo de nanoencapsulação para liberação controlada de antirretrovirais empregando nanopartículas poliméricas”

**SÃO PAULO
2022**

ARIANE SIMÕES TUNUSSI

“Desenvolvimento do processo de nanoencapsulação para liberação controlada de antirretrovirais empregando nanopartículas poliméricas”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Natalia Neto Pereira Cerize

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

**São Paulo
2022**

ARIANE SIMÕES TUNUSSI

“Desenvolvimento do processo de nanoencapsulação para liberação controlada de antirretrovirais empregando nanopartículas poliméricas”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof(a) Dra. Natalia Neto Pereira Cerize

**São Paulo
2022**

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Simões Tunussi, Ariane
?Desenvolvimento do processo de nanoencapsulação
para liberação controlada de antirretrovirais
empregando nanopartículas poliméricas? / Ariane
Simões Tunussi; orientadora Natalia Neto Pereira
Cerize. -- São Paulo, 2022.
63 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Nanospray Dryer. 2. Nanoencapsulação. 3.
Antirretroviral. 4. Nanopartículas funcionalizadas.
5. Polímeros. I. Neto Pereira Cerize, Natalia ,
orientador. II. Título.

Programa de Pós - Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas
Tecnológicas

FOLHA DE APROVAÇÃO DA BANCA - DISSERTAÇÃO

Candidata: Ariane Simões Tunussi

Título da Dissertação: “Desenvolvimento do processo de nanoencapsulação para liberação controlada de antirretrovirais empregando nanopartículas poliméricas”

Orientadora: Prof(a) Dra Natalia Neto Pereira Cerize

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, em sessão pública realizada / / , considerou

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinado (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinado (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinado (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone(11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO **1010/2019 - ERRATA**

Certificamos que o Protocolo CEP - ICB nº 1010/2019, referente ao projeto intitulado: "Desenvolvimento do processo de nanoencapsulação para liberação controlada de antirretrovirais empregando nanopartículas poliméricas", sob a responsabilidade do(a) aluno(a) "Ariane Simões Tunussi", e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) "Natalia Neto Pereira Cerize", do Departamento de Biotecnologia, foi analisado pela CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo CEP SH - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 07 de Julho de 2022.

Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP

Prof. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEP SH ICB/USP

Dedico esse trabalho em especial a minha avó Izabel (*in memoriam*) que tanto me incentivou e esteve ao meu lado em todos os momentos na minha vida pessoal, profissional e principalmente acadêmica. Gratidão sem fim por todo amor e apoio que a senhora teve por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelos dons que me deu nesta existência que serviram na realização deste projeto.

Ao meu marido João Henrique que acima de tudo é um grande amigo, sempre presente nos momentos difíceis com uma palavra de incentivo e muito amor.

Aos meus pais, Silmara e João Carlos e a minha irmã Larissa e todos os meus familiares, por todo seu amor, confiança no meu progresso e pelo apoio emocional.

A minha orientadora Dra. Natalia Cerize pela oportunidade, orientação, apoio e a confiança depositada em mim.

Gratidão pela participação dos professores Dr. Adriano Marim e Dra. Daniela Colevati cuja dedicação e atenção foram essenciais para que este trabalho fosse concluído satisfatoriamente.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia e aos seus docentes que nos incentivaram a percorrer o caminho da pesquisa científica.

Ao Instituto de Pesquisa Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT) em especial ao centro de Bionanomanufatura/Laboratório de Processos Químicos e Tecnologias de Partículas (LPP)/ Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI) pela oportunidade de aprendizado e realização deste trabalho.

A todos da equipe os antigos e os novos do LPP e do LBI que de certa forma contribuíram para o enriquecimento deste trabalho. Em especial Henrique Oliveira, Fernando Oliveira, Khellida Rocha e Patricia Leo.

Enfim agradeço a todos que sempre estiveram comigo apoiando, nem que sendo através de um sorriso.

**“ Por isso não tema, pois estou com você;
não tenha medo, pois sou o seu Deus.
Eu o fortalecerei e o ajudarei;
Eu o segurarei
com a minha mão direita vitoriosa”.**
(Isaías 41:10)

RESUMO

TUNUSSI, A.S. **Desenvolvimento do processo de nanoencapsulação para liberação controlada de antirretrovirais empregando nanopartículas poliméricas.** 2022. 63f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é uma das doenças infecciosas mais sérias que desafia, globalmente, a saúde pública. Os efeitos adversos ligados ao tratamento estão associados à curta meia vida e à baixa biodisponibilidade da maioria dos medicamentos antirretrovirais, devido ao seu metabolismo pré-sistêmico e degradação gastrintestinal. Esses fatores fazem com que a dosagem dos medicamentos antirretrovirais seja alta e frequente, o que leva à baixa adesão do paciente à terapia. Estratégias para superar essas limitações incluem a identificação de novas moléculas, modificação química das já existentes e desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos. Com isso esse projeto teve como principal objetivo desenvolver nanopartículas contendo antirretrovirais a partir de polímeros naturais e biossintéticos para obtenção de um novo sistema de liberação controlada. Para isso, foi empregado processo de secagem usando o equipamento *NanoSpray Dryer*, tendo sido avaliados os parâmetros de processo. As nanopartículas contendo os fármacos zidovudina e lamivudina foram caracterizadas quanto ao tamanho médio de partículas, morfologia; estudo liberação controlada em função do tempo e o teor do fármaco liberado nos diferentes meios simulando o meio gástrico e entérico ambos realizados por HPLC. Os materiais encapsulantes usados nessa etapa foram o Eudragit® RS100 (ED) e o Silicone® poli(dimetilsiloxano) graft poliacrilatos (SILO). Foi possível nanoencapsular os antirretrovirais, possibilitando avaliar sua eficiência de encapsulação chegando em até 70% e seu perfil de liberação controlada em função do tempo. Indicando que é possível melhorar a adesão do paciente ao tratamento diminuindo seus efeitos adversos.

PALAVRAS-CHAVE: *Nanospray dryer*, nanoencapsulação, antirretroviral, nanopartículas funcionalizadas, polímeros, sistema de liberação controlada.

ABSTRACT

TUNUSSI, A.S. **Development of the nanoencapsulation process for controlled release of antiretrovirals using polymeric nanoparticles.** 2022. 60f. 2022. 63f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

The human immunodeficiency virus (HIV) causes one of the most serious infectious diseases that challenges public health globally. Treatment-related adverse effects are associated with the short half-life and low bioavailability of most antiretroviral drugs, due to their pre-systemic metabolism and gastrointestinal degradation. These factors make the dosage of antiretroviral drugs high and frequent, which leads to poor patient adherence to therapy. Strategies to overcome these limitations include the identification of new molecules, chemical modification of existing ones, and the development of new drug delivery systems. Thus, this project had as main objective to develop nanoparticles containing antiretrovirals from natural and biosynthetic polymers to obtain a new controlled release system. For this, a drying process was used using the NanoSpray Dryer equipment, and the process parameters were evaluated. Nanoparticles containing the drugs zidovudine and lamivudine were characterized for average particle size, morphology; controlled release study as a function of time and drug content released in different media simulating gastric and enteric media, both performed by HPLC. The encapsulating materials used in this step were Eudragit® RS100 (ED) and Silicone® poly(dimethylsiloxane) graft polyacrylates (SILO). It was possible to nanoencapsulate the antiretrovirals, making it possible to evaluate their encapsulation efficiency reaching up to 70% and their controlled release profile as a function of time. Indicating that it is possible to improve patient adherence to treatment by decreasing its adverse effects.

KEYWORDS: *Nanospray dryer*, nanoencapsulation, antiretroviral, functionalized nanoparticles, polymers, controlled release system.

SUMÁRIO

1	Introdução	14
2	Revisão da literatura	14
2.1	Doença	14
2.2	Tratamento.....	17
2.3	Zidovudina.....	20
2.4	Lamivudina	21
2.5	Nanotecnologia	22
2.6	Nanoencapsulação	24
2.7	Liberação controlada.....	27
3	Objetivos	29
4	Materiais e Métodos.....	29
4.1	Materiais.....	29
4.2	Preparo de soluções poliméricas	30
4.3	Caracterização das soluções poliméricas antes da secagem	30
4.3.1	pH e Condutividade	30
4.3.2	Viscosidade	30
4.3.3	Tensão superficial	31
4.4	Secagem por spray-drying empregando <i>Nano Spray-Dryer B90</i>	31
4.5	Caracterização das partículas secas no <i>Nano Spray Dryer B90</i>	31
4.5.1	Espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier - FTIR.....	31
4.5.2	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	31
4.5.3	Tamanho médio de partículas – espalhamento de luz dinâmico.....	32
4.5.4	Tamanho médio de partículas – microscopia eletrônica da varredura.....	32
4.6	Determinação da eficiência de encapsulação	32
4.7	Liberação controlada	33
4.8	Teste <i>in vitro</i> de Citotoxicidade	34
5	Resultados	34
5.1	Definição dos polímeros encapsulantes (placebo)	34
5.2	Caracterização das nanopartículas placebo.....	37
5.2.1	Tamanho de partículas.....	37
5.3	Nanoencapsulação dos fármacos	44
5.4	Caracterizações das nanopartículas contendo antirretrovirais	44

5.5	Citotoxicidade.....	51
5.6	Processo de extração e quantificação de teor de ZDV	52
6	Conclusão	59
7	Referências.....	60

1 INTRODUÇÃO

O vírus do HIV provoca uma doença infecciosa séria que desafia, globalmente, a saúde pública. Em 2021, 38,4 milhões de pessoas viviam com HIV/AIDS no mundo. Até o final do ano de 2021, 28,7 milhões de pessoas que estavam com acesso a terapia antirretroviral, ainda tinha aproximadamente 10 milhões de pessoas sem medicação. Intervenções como aconselhamento educacional e terapia com fármacos antirretrovirais têm contribuído para transformar a infecção por HIV de fatal a uma doença infecciosa crônica controlável, embora as estatísticas ainda mostrem que o número de infecções continua inaceitavelmente alto (UNAIDS, 2022).

Tratamentos com antirretrovirais estão sendo os mais promissores até o momento, porém devido às altas dosagens da posologia que são necessárias, muitos pacientes apresentam graves efeitos adversos e acabam desistindo da terapia. Algumas estratégias estão sendo estudadas para melhorar esses efeitos como aplicar o uso da nanotecnologia em fármacos já existentes e a funcionalização para liberação controlada.

Com essas novas tecnologias aplicadas é possível reduzir o número de doses a serem administradas, possibilitando o aumento da biodisponibilidade dos fármacos, fazendo a protegendo da degradação em pH como do estômago e favorecendo absorção intestinal, com isso possibilita uma melhor adesão dos pacientes ao tratamento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

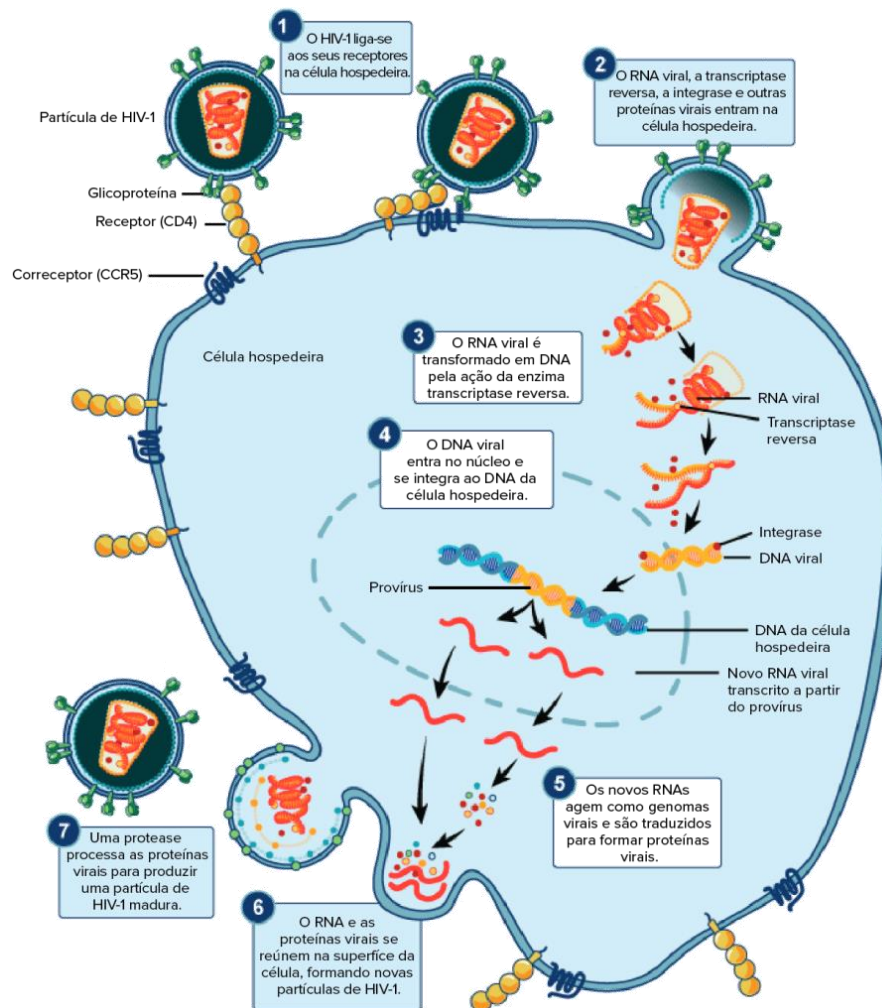
2.1 Doença

Há atualmente duas espécies conhecidas de HIV, o HIV-1 e HIV-2, com as suas respectivas subespécies. HIV-1 é a infecção mundialmente mais comum, enquanto que a HIV-2 é mais prevalente na África do Sul, a qual demora mais tempo para evoluir para imunodeficiência que a HIV-1.

A infecção humana por HIV é responsável por uma deterioração progressiva do sistema imunológico e que infecta principalmente os linfócitos T (LT) CD4+, os macrófagos e as células. Resultante da integração do genoma viral (DNA) dentro das células hospedeiras para sua replicação, conforme

ilustrado na **Figura 1**, que demonstra o ciclo de vida resumido da replicação viral do HIV. A AIDS é o estágio avançado da infecção causada pelo HIV. O vírus infecta as células hospedeiras se ligando à proteína viral gp120 em dois receptores transmembrana, o CD4+ e em uma das quimosinas CCR5 e CXCR4 (Pinto Neto *et al.*, 2021).

Figura 1. Ciclo de vida resumido da replicação viral do HIV (Fonte: Khan Academy: Virus de animais e humanos, 2021).



O HIV infecta os macrófagos e células T auxiliares CD4+, mas o que caracteriza a AIDS é a depleção das células CD4+. O estágio final da doença pode ser caracterizado como um espectro de doenças, incluindo infecções oportunistas como *Pneumocystis carinii* e *Mycobacterium tuberculosis*, demência e câncer. Em adição aos macrófagos, linfonodos, medula óssea, baço e pulmões, o sistema nervoso central representa o local onde o vírus mais se abriga, causando um significativo dano neuronal e demência. Sem tratamento, a infecção por HIV-1 pode ser fatal em 5 a 10 anos (OJEWOLE et al., 2008).

2.2 Tratamento

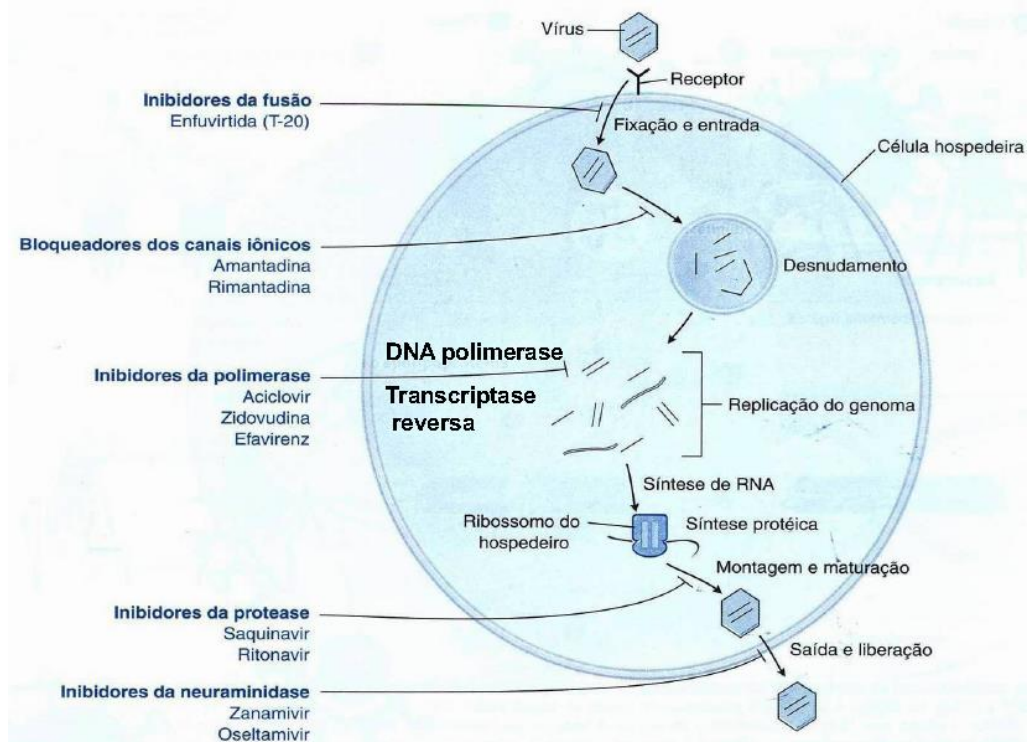
O objetivo principal do tratamento é reduzir a morbidade e mortalidade e prevenir a transmissão do HIV para outras pessoas. Atualmente, os antirretrovirais são classificados em inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (INTRs), inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos (INNTRs), inibidores de protease (IPs), que bloqueiam a etapa 7 (**Figura 1**), inibidores da fusão, que bloqueiam a etapa 1 da replicação do HIV. Todos esses medicamentos bloqueiam a etapa 4 (**Figura 1**) quando o material genético do HIV é convertido de ácido ribonucleico (RNA) em ácido desoxirribonucleico (DNA, foi listado na **Tabela 1** alguns dos medicamentos utilizados no coquetel e suas combinações (Pinto Neto *et al.*, 2021; Sem, 2003)

Tabela 1. Medicamentos utilizados no tratamento de HIV (Adaptado de (Sem, 2003; Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis, 2022).

Nome comercial	Princípio ativo
Agenerase	Amprenavir
Combivir	Zidovudina (AZT) + Lamivudina (3TC)
Crixivan	Indinavir
Dupliver ou Zidolam	Zidovudina (AZT) + Lamivudina (3TC) + Abacavir
Epivir	Lamivudina (3TC)
Fortovase	Saquinavir
Hivid	Zalcitabina (DDC)
Invirase	Mesilato Saquinavir
Kaletra	Lopinavir
Norvir	Ritonavir
Rescriptor	Delavirdina
Retrovir	Zidovudina (AZT)
Reyataz	Atazanavir
Sustiva	Efavirenz
T-20, Fuzeon	Enfuvirtide
Videx	Didanosina (DDL)
Viracept	Nelfinavir
Viramune	Nevirapina
Viread	Tenofovir
Zerit	Estavudina (d4T)
Ziagen	Abacavir

Esses medicamentos listados na **Tabela 1** são administrados em terapia combinada. Nos pacientes com imunodeficiência mais grave (linfócitos-T CD4+ abaixo de $200/\text{mm}^3$), sintomáticos ou assintomáticos, o ITRNN (inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo) deve ser preferencialmente o efavirenz e existe a alternativa de, ao invés de um ITRNN, se utilizar um IP (inibidor de protease) associado aos dois ITRN (inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo). Eles adiam o início dos sintomas da doença, diminuindo o ritmo da redução das células de proteção do sistema imunológico, mas, ainda assim, não conseguem eliminar o HIV do organismo, além da terapia estar associada com vários efeitos adversos (FOLHAS INFORMATIVAS ANEXO 1). A **Figura 2** representa as intervenções medicamentosas utilizadas e como são seus mecanismos de ação na célula infectada.

Figura 2. Imagem do mecanismo de intervenção medicamentosa na célula. (Fonte: “Profa. Dra. Michele M. de Castro Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP”, [s.d.]



Em geral, os efeitos adversos estão associados à curta meia vida e à baixa biodisponibilidade da maioria dos antirretrovirais, devido ao seu metabolismo pré-sistêmico e degradação gastrointestinal. Além disso, os locais

de abrigo do vírus, como sistema nervoso central, sistema linfático e macrófagos, são compartimentos que não podem ser acessados pela maioria dos fármacos na concentração terapêutica requerida. Como nesses locais a concentração é sub-terapêutica, com tempo de residência média curto, o HIV não consegue ser eliminado. Todos esses fatores fazem com que a posologia dos medicamentos antirretrovirais seja alta e frequente, o que leva à baixa adesão do paciente à terapia (OJEWOLE et al., 2008;Carvalho *et al.*, 2019).

Estratégias para superar essas limitações incluem a identificação de novas moléculas, modificação química das já existentes e desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos. Essa última pode promover a eficácia de fármacos já existentes e explorar novas vias de administração (OJEWOLE et al., 2008).

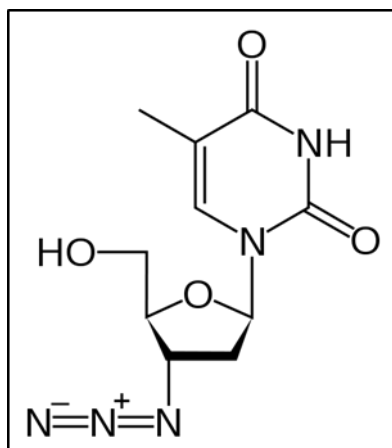
A introdução de um novo fármaco no mercado, além de levar vários anos de pesquisa, envolve custos altíssimos. Assim, a procura por novos sistemas de liberação é importante no sentido de se estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilitem administrar os fármacos com mais segurança e com efeitos colaterais minimizados (MAINARDES et al., 2005; MAINARDES et al., 2006; Aguiar *et al.*, 2012).

2.3 Zidovudina

A zidovudina (ZDV) ($C_{10}H_{16}N_3O_4$) **Figura 3** é um fármaco sintético apresentado na forma de pó branco com peso molecular de 267.242 g/mol, com solubilidade em água é em torno de 25 mg.mL⁻¹ a 25°C, possuindo uma boa estabilidade térmica e a luz. Seu pKa é de 9,78.

É empregada principalmente no tratamento do HIV seu mecanismo de ação consiste em inibir competitivamente a incorporação, pela enzima transcriptase reversa, da timidina ao DNA viral, ainda é escolhido como o principal medicamento combinada com outros antirretrovirais. As principais formas encontradas no mercado hoje são: Zidovudina 100mg Cápsula gelatinosa dura; Zidovudina solução injetável 10mg/mL Frasco-ampola; Zidovudina Solução oral 10mg/ml Frasco com 100mL; Zidovudina 300mg + Lamivudina 150mg comprimido revestido. (“ANEXO-III-Monografia-ZIDOVUDINA-.pdf”, [s.d.]; Pereira, 2011; Souza, De e Storpirtis, 2004).

Figura 3. Representação da estrutura química da zidovudina (Pereira, 2011).

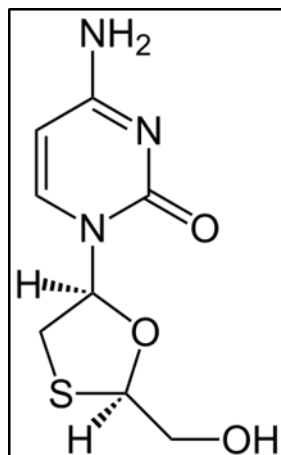


2.4 Lamivudina

A lamivudina (LAMI) ($C_8H_{11}N_3O_3S$) **Figura 4** é um fármaco análogo de nucleosídeo sintético com peso molecular de 229,26 g/mol, com o pKa de 4,3 apresenta-se como um pó branco amarelado com solubilidade em água é em torno de 70,0 mg.mL⁻¹ a 20°C, possuindo uma boa estabilidade térmica e a luz tanto na sua forma sólida como em solução.

A lamivudina é administrada em combinação com a zidovudina é um agente efetivo para o tratamento de pacientes tanto sintomáticos, quanto assintomáticos. A associação de lamivudina e zidovudina em um mesmo medicamento é uma tentativa de diminuir os erros e o abandono durante o tratamento. As principais formas encontradas no mercado hoje são: Lamivudina 150mg Comprimido revestido; Lamivudina solução oral 10mg/mL Frasco e Zidovudina 300mg + Lamivudina 150mg comprimido revestido (Beck *et al.*, 2007; Pereira, 2011; Souza, De e Storpirtis, 2004).

Figura 4. Representação da estrutura química da lamivudina (Pereira, 2011).



2.5 Nanotecnologia

A nanotecnologia refere-se à tecnologia utilizada para manipular estruturas muito pequenas, na formação da palavra Nanotecnologia, o termo “tecnologia” refere-se ao desenvolvimento e produção de novos materiais, já o prefixo “nano” está relacionado a uma escala de medida em que um nanômetro (nm) é um bilionésimo do metro.

A nanotecnologia é multidisciplinar, unindo diversas áreas de conhecimento. O impacto da nanociência e nanotecnologia nos sistemas de liberação controlada de ativos apresenta-se multifatorial e multinível, incluindo: (i) elucidação molecular de bases cronobiológicas das doenças e da ação de drogas, o que poderiam ajudar no desenvolvimento de métodos de diagnósticos, monitoramento ou tratamento mais seguros e rápidos; (ii) descobertas de novas moléculas/fármacos para o tratamento de doenças novas ou antigas; (iii) desenvolvimento de métodos mais eficientes de produção e caracterização usando técnicas combinatórias e de alto rendimento; além de (iv) contribuir e incluir questões e soluções regulatórias e éticas. Para a nanotecnologia contribuir na área de liberação controlada de drogas é necessário evoluir com sucesso desde laboratórios até etapa clínica, competir globalmente e com duração ilimitada e também apresentar comprovada segurança, eficácia, aceitabilidade e disponibilidade, indicando a necessidade de pesquisas interdisciplinares muito bem elaboradas (YOUAN, 2008).

Nesse contexto, polímeros biodegradáveis na forma de partículas coloidais têm sido estudados com promissoras possibilidades de sucesso, para

aplicações futuras em quimioterapia antimicrobiana, anticancerígena e anti-inflamatória injetável, tópica e oftálmica (LEE, 2001).

Nos últimos anos um grande número de publicações tem-se avançando com diferentes aspectos da nanotecnologia aplicada na área farmacêutica, como: conceitos da nanomedicina, nanopartículas lipídicas ou poliméricas; copolímeros em bloco (Pluronic®) como modificadores de respostas biológicas e vesículas poliméricas; desenvolvimento de formulações; sistemas de longa circulação e entrega direcionada, nanocarreadores multifuncionais; terapias celulares, diagnósticos e tratamento de câncer e doenças complexas; desenvolvimento clínico; “*theranostics*”; potencial de citotoxicidade; normas regulatórias e éticas (YOUAN, 2008).

Um exemplo de sucesso no emprego da nanotecnologia em um assunto muito importante para o desenvolvimento farmacêutico é o controle das propriedades físico-químicas de agentes bioativos permitindo a redução de efeitos adversos com o desenvolvimento e a aplicação de nanopartículas poliméricas, nanopartículas inorgânicas, nanossuspensões, dendrímeros, lipossomos, nanoemulsões e nanotubos de carbono. Alguns medicamentos lipossomas foram aprovados pelo FDA (Gelfuso *et al.*, 2015).

Atualmente, o emprego de técnicas de nanocristalização (geração de nanocristais por técnicas ‘*top-down*’ ou ‘*bottom-up*’) poderia minimizar essa limitação de biodisponibilidade das moléculas hidrofóbicas. Além disso, o emprego de técnicas “*bottom-up*” de nanofabricação requer uma habilidade de prever o tipo de estrutura agregada obtida, bem como sintetizar moléculas de forma controlada que interagem com superfícies biológicas em escala manométrica (YOUAN, 2008).

Os medicamentos disponíveis no mercado não evitam o metabolismo hepático dos fármacos. A terapia hoje adotada utiliza a via oral como a principal via de administração. São inquestionáveis as vantagens que a via oral oferece, mas para fármacos que sofrem metabolismo no trato gastrointestinal e metabolismo pré-sistêmico, outras rotas de administração devem ser exploradas. A rota transdérmica tem sido amplamente sugerida, pois garante níveis plasmáticos contínuos e evita o metabolismo hepático e gastrointestinal (NARISHETTY; PANCHAGNULA, 2004a; OH *et al.*, 1998; THOMAS; PANCHAGNULA, 2003; Gelfuso *et al.*, 2015).

Entretanto, tratando-se da zidovudina, um problema que limita o uso dessa via é a sua relativa hidrossolubilidade e a sua baixa permeabilidade transdérmica, necessitando assim do uso de técnicas físicas que melhorem a permeação, tais como iontoforese, micro-agulhas, etc. Porém nos estudos de hoje em aprimoramento em relação aos medicamentos projetadas em tamanho e estrutura adequados para aplicações farmacêuticas, o sistema que vem gerando resultados positivos como o sistemas de liberação controlada de medicamentos, visa melhorar a biodisponibilidade e os efeitos terapêuticos com diminuição dos efeitos colaterais (CERIZE, et al 2021).

2.6 Nanoencapsulação

As primeiras pesquisas da área farmacêutica sobre microencapsulação foram realizadas pela Universidade de Wisconsin (Estados Unidos). Verificou que as microcápsulas são usadas principalmente para aumentar a estabilidade de uma droga e para modificar ou retardar sua liberação em locais específicos de ação. Substâncias anti-inflamatórias, por exemplo, podem ter seu tempo de atuação no plasma sanguíneo aumentado pela microencapsulação, prolongando seu efeito no organismo (RÉ, 2000).

O conceito de microcápsula surgiu da idealização do modelo celular. Nesse conceito a membrana que envolve e protege o citoplasma e os demais componentes exerce ao mesmo tempo outras funções, como controlar a entrada e saída do material da célula. De modo semelhante, a microcápsula consiste, em geral, em uma camada de polímero que atua como filme protetor, isolando a substância ativa e evitando os efeitos de sua exposição inadequada. Essa membrana se desfaz sob estímulos específicos, liberando a substância em locais específicos ou na taxa mais adequada ao tratamento (RÉ, 2000)

A microencapsulação foi utilizada como modelo para o desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas, agora em escala nanométrica, permitindo a fabricação de sistemas nanoparticulados (PIMENTEL; et al. ,2007).

Existem várias técnicas de nanoencapsulação, visando formar sistemas nanoestruturados para veiculação de ativos, com objetivo de endereçar o alvo terapêutico, proteger o ativo da degradação de agentes do meio como pH, enzimas e outros agentes estressores, aumentar a biodisponibilidade do ativo

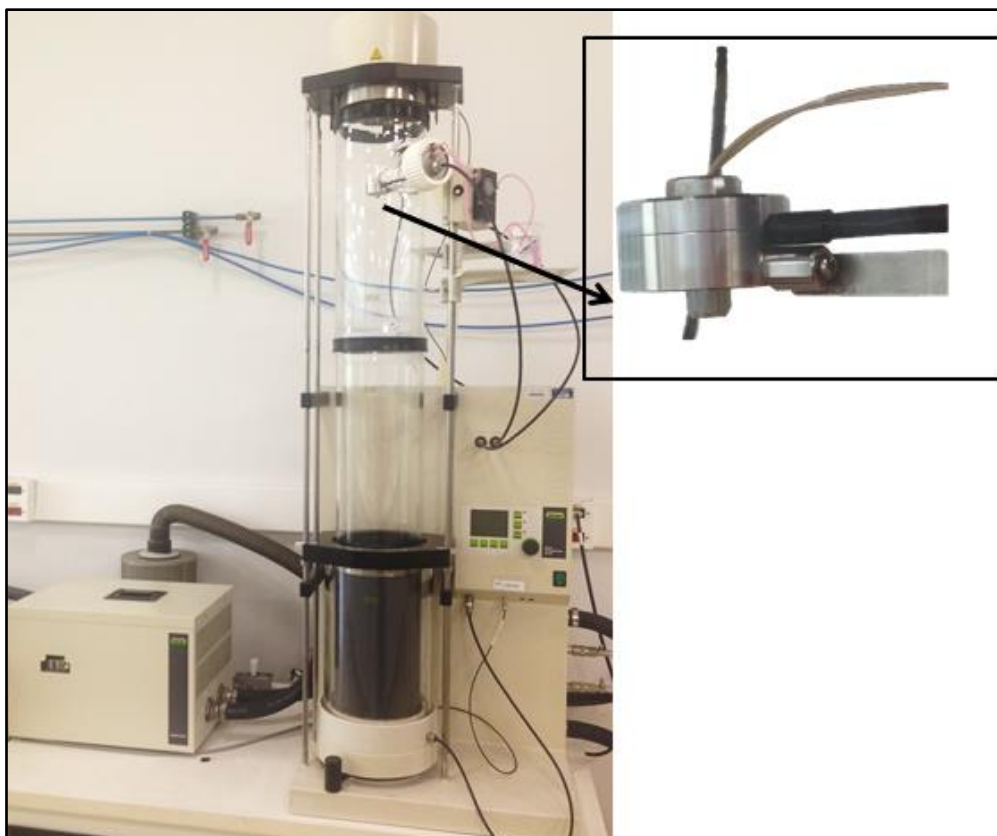
e controlar o perfil de liberação. Podemos mencionar métodos de emulsificação-
evaporação de solvente, emulsificação-difusão de solvente, polimerização *in situ*
ou interfacial, métodos de auto-agregação, geleificação iônica, fluido supercrítico
e métodos envolvendo spray, como *spray drying*, *nano spray drying* e *freeze
drying*. (CERIZE et al, 2021)

A tecnologia *spray drying* como ferramenta de encapsulação tem sido
empregada como um método de microencapsulação porque pode ser adaptada
pela criação de um sistema matricial do tipo esférico, partindo-se de uma mistura
liquida complexa contendo um material ativo solubilizado, disperso, ou mesmo
emulsificado, com um polímero na fase aquosa ou em solvente orgânico (RÉ,
2006). Diversos trabalhos da literatura relatam com sucesso a aplicação da
técnica de *spray drying* na encapsulação de diferentes ativos empregando
polímeros hidrofílicos como derivados de celulose (ZIGOULLI, S.; et al., 1999;
ONEDA, F.; RE, M.I., 2003.), quitosana (ASADA, M.; et al., 2004), dentre outros.
A tecnologia em questão permite a obtenção de sistemas microencapsulados
obtidos a partir de polímeros biodegradáveis. No entanto, a maioria desses
materiais é solúvel apenas em solventes orgânicos, o que requer um processo
de operação do equipamento em condições especiais (atmosfera inerte, baixas
temperaturas, etc.).

O *NanoSpray Dryer B-90*, uma tecnologia mais recente, utiliza um
processo de atomização por meio do emprego de uma membrana piezo-elétrica
com porosidade que pode ser de 4 μm ; 5,5 μm ; ou 7 μm . O processo de
atomização é gerado pela oscilação da membrana numa velocidade ultrassônica
e a recuperação das nanopartículas é realizada por meio de uma câmara
eletrostática. Com a membrana operando em alta temperatura, a presença da
solução e oscilação da membrana formam-se o *spray* e a secagem das
nanopartículas (K. BURKI, 2011). Nesse contexto, foi desenvolvido um novo
equipamento que utiliza a técnica de *Spray Drying* para a produção de
nanopartículas, modificando os princípios de atomização e recuperação do
material produzido. Nessa nova configuração é possível gerar um material
nanoestruturado, que pode ser empregado na nanoencapsulação de ativos de
interesses diversos. Esse processo foi projetado baseado na atomização por
membranas piezo-elétricas, que reduzem o tamanho da gota a ser aspergida.
Além disso, o equipamento supera uma limitação da técnica de *Spray Drying* que

consiste na recuperação de materiais nanoparticulados através da coleta em uma câmara eletrostática. Esse recurso permite ainda uma eficiência de recuperação de no mínimo 90 % do material seco. A **Figura 5** mostra uma fotografia do equipamento *NanoSpray Dryer B-90* empregado no presente trabalho. Os autores (Li *et al.*, 2010) apresentaram o *NanoSpray Dryer B-90*, como um novo e revolucionário secador por atomização desenvolvido pela Büchi, cuja utilização pode diminuir o tamanho das partículas secas produzidas para uma ordem de magnitude que pode atingir tamanhos nanométricos.

Figura 5. Fotografia do equipamento NanoSpray Dryer B-90 (BUCHI), pertencente ao Laboratório de Processos Químicos e Tecnologia de Partículas do IPT. No detalhe, foto da membrana piezo-elétrica.



Entretanto, a secagem em spray também pode ser usada para aplicações específicas na formulação de produtos farmacêuticos para a liberação da droga em meios específicos (por exemplo, para administração pulmonar ou permeação cutânea). A empresa BUCHI é uma referência no desenvolvimento de tecnologia de secagem por atomização, especialmente para dispositivos em escala laboratorial. Os autores Li et al, apresentaram nesse trabalho, os resultados de

cinco materiais para a formação da parede polimérica (goma arábica, proteína do soro, álcool polivinílico, amido modificado e maltodextrina), e foi apresentado métodos para encapsulação de nano-emulsões e formulação de nano-cristais (por exemplo, furosemida).

O *NanoSpray Dryer Büchi B-90* forneceu resultados satisfatórios na obtenção de partículas na escala nanométrica, com rendimentos de secagem relativamente altos (70 % e 90 %) para valores com baixa concentração (50 mg a 500 mg). Os cinco materiais poliméricos que formaram a parede da partícula apresentaram distribuições de tamanho na escala nanométrica, obtendo diâmetros de aproximadamente 350 nm com um desvio padrão de aproximadamente 100 nm para a goma arábica (0,1 % concentração de sólidos), que é um resultado notável para a tecnologia de *spray drying*. Os resultados preliminares de encapsulação de nano-emulsões e obtenção nano-cristais utilizando essa tecnologia pode surgir interesse para diversas atividades farmacêutica, e contribuindo perspectivas promissoras para essa técnica de secagem via *spray* na indústria farmacêutica (XIANG LI, 2010).

O trabalho de Oliveira et al mostrou a encapsulação de ingredientes ativos hidrofílicos, empregando a técnica de *nano spray drying*, para produção de nanopartículas poliméricas em diferentes matrizes, como goma arábica, goma de cajueiro, alginato, derivados de celulose e Eudragit.

2.7 Liberação controlada

A tecnologia de liberação de fármacos, existe hoje uma ampla variedade de sistemas, visando condicionar a velocidade e o local de liberação dos fármacos, e tem se estudado muito pela indústria farmacêutica. Dentre esses sistemas estão incluídos os lipossomas, as bombas osmóticas, os revestimentos entéricos, os sistemas transdérmicos, os pró-fármacos, os sistemas matriciais poliméricos, entre outros. De maneira particular, a utilização de sistemas matriciais constituídos por diversos tipos de polímeros é uma das estratégias mais empregadas quando do desenvolvimento de uma formulação oral de liberação controlada (Bizerra e Silva, 2016).

O desenvolvimento do material que irá definir como que será possível o controle da liberação da substância ativa, molecularmente dispersa ou

dissolvida num suporte resistente à desintegração (polímero ou agente formador da matriz) (Azevedo, 2021).

Os sistemas poliméricos de liberação controlada representam uma nova estratégia para incorporação de substâncias ativas tais como: (i) maior controle da liberação do princípio ativo; (ii) redução de doses tóxicas e subterapêuticas; (iii) monitoramento dos níveis de fármaco no sítio de aplicação; (iv) obtenção de altas concentrações de fármaco no local a ser tratado, quando comparadas com os níveis plasmáticos após administração oral; e (v) direcionamento do princípio ativo a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas, representando assim um meio útil de liberar na cavidade oral um fármaco que não é absorvido no sistema gastrointestinal. Além disso, diminui o intervalo de dosagem e reduz efeitos colaterais indesejados uma vez que utiliza uma menor quantidade do princípio ativo, resultando em menor custo (Bizerra e Silva, 2016).

Existem diversos mecanismos de liberação controlada, dentre estes podemos citar aqueles que usualmente ocorre quando tem uma matriz hidrofílica. (i) Transporte do meio de dissolução para a matriz polimérica; (ii) Intumescimento do polímero com formação de uma camada de gel; (iii) Difusão do fármaco através da camada de polímero intumescido; (iv) Erosão do polímero intumescido. Diante disto, nos últimos anos, através da liberação controlada de fármacos, possibilitou a diminuição dos efeitos colaterais e maximizando a biodisponibilidade dos medicamentos, requisitos de dosagem mais baixos, alta taxa de retenção de drogas, menor frequência de dosagem e alta tolerância e principalmente a boa aceitação do paciente (Bizerra e Silva, 2016; Lopes, Lobo e Costa, 2005; Promissoras, 2022).

Visando resolver os desafios da terapia do HIV, empregando a nanotecnologia como alternativa para trazer um aspecto novo para formulações empregando fármacos já conhecidos e com eficácia terapêutica já comprovada, este trabalho propôs o desenvolvimento do processo de nanoencapsulação de antirretrovirais para liberação controlada empregando nanopartículas poliméricas. Foram testadas algumas matrizes poliméricas, assim como dois fármacos antirretrovirais. As condições de processo para a obtenção das partículas foram o principal desafio deste estudo.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo principal desenvolver um produto nanoencapsulado a partir de polímeros naturais contendo fármaco anti-HIV que possam ser incorporados em formas farmacêuticas convencionais para o tratamento do HIV e da AIDS. Nesse contexto foi explorado principalmente os fármacos zidovudina e lamivudina que são ativos comumente empregados no tratamento da doença.

Visando cumprir o objetivo principal, destacam-se os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Estudo dos potenciais polímeros funcionais a serem empregados na formulação;
- ✓ Preparo e caracterização de nanopartículas (placebo) empregando polímeros e copolímeros funcionais;
- ✓ Nanoencapsulação dos antirretrovirais e caracterização do material obtido, físico-quimicamente e quanto à sua eficiência de encapsulação e perfis de liberação;
- ✓ Caracterização dos nanoencapsulados contendo antirretrovirais quanto à sua ação toxicológica e biológica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os fármacos zidovudina (**Figura 3**) e lamivudina (**Figura 4**) foram doados pela empresa Indústria farmacêutica Cristália (São Paulo, Brasil).

Todos os reagentes empregados foram adquiridos com grau analítico e utilizados conforme recebido. Os polímeros empregados na encapsulação foram: Alginato de sódio (AG) Mm 216.12, Sigma-Aldrich; Carboximetilcelulose (CMC), Mapric Mm 982.4; Goma arábica (GA), Sigma-Aldrich substância nativa tem em média um peso molecular entre 300 e 800 g/mol; Goma de cajueiro (GC), acervos do laboratório do IPT; Silicone poli(dimetilsiloxano) graft poliacrilatos (SILO), Sigma-Aldrich Mm ~100,000; Eudragit® RS100 (ED) Mm 407.9 e Eudragit® EPO (ED_EPO) Mm 47,000 g/mol, Evonick.

As soluções tampão foram preparadas com água deionizada por sistema de purificação de água Master System MS 2000 tipo Milli-Q.

4.2 Preparo de soluções poliméricas

As soluções poliméricas foram preparadas por dissolução em meio aquoso sob agitação mecânica em concentrações mássicas de 0,1%; 0,5 % e 1 %. O pH das soluções poliméricas preparadas foi ajustado para faixa adequada de solubilização pela adição (gota a gota) de NaOH 0,1M (hidróxido de sódio), NH₄OH P.A (hidróxido de amônia) ou CH₃COOH P.A (ácido acético glacial). A correção foi realizada sob agitação constante e temperatura próxima a 25°C. Após o preparo, as soluções foram armazenadas em frasco de vidro âmbar com tampa.

Para incorporação dos ativos às soluções poliméricas (10 mg/100mL – 20 mg/100mL) procedeu-se a solubilização dos mesmos nas soluções preparadas como descrito no parágrafo anterior, em temperatura ambiente e sob agitação mecânica (100 rpm, 10 min).

4.3 Caracterização das soluções poliméricas antes da secagem

4.3.1 pH e Condutividade

O pH das soluções poliméricas foi determinado empregando-se pHmetro (marca Mettler Toledo, modelo MP220), na temperatura ambiente. As análises de condutividade das soluções poliméricas foram realizadas utilizando-se condutivímetro, (modelo MC226, marca Mettler Toledo), na temperatura ambiente.

4.3.2 Viscosidade

Com o objetivo de avaliar a influência da concentração de polímero na viscosidade da solução e posteriormente no processo de secagem, as viscosidades das soluções foram determinadas empregando um equipamento do tipo Brookfield, modelo DV-III Ultra. As medidas de viscosidade foram realizadas empregando um aparato especial para pequenas amostras, denominado *Small Sample*, na temperatura de 25 °C, com *spindle* SC16 em 60 rpm de velocidade.

4.3.3 Tensão superficial

A tensão superficial das soluções poliméricas determinada com o auxílio de um tensiômetro, modelo DCAT-11, marca Dataphysics, empregando como aparato experimental a placa de Wilheimy.

4.4 Secagem por spray-drying empregando *Nano Spray-Dryer B90*

A secagem por aspersão no equipamento *Nano Spray-Dryer B90* foi realizada empregando dois tipos de membrana de atomização, com 4 μm ou 5,5 μm de porosidade. A coleta das partículas foi realizada em uma câmara eletrostática, o que permitiu a recuperação de aproximadamente 90 % do material seco. Para o processo de secagem, a temperatura inicial foi mantida em 120 °C, refletindo numa temperatura de saída de 56 °C. A vazão de ar secagem foi de 130 L/min e a velocidade de atomização variou de 50 % a 100 %.

4.5 Caracterização das partículas secas no *Nano Spray Dryer B90*

4.5.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier - FTIR

A avaliação do efeito da encapsulação de forma qualitativa dos polímeros e do fármaco foi realizada empregando a técnica de espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier. As amostras foram analisadas na forma de pastilhas preparadas pela deposição de massa conhecida do polímero e do nanoencapsulado em brometo de potássio (KBr) seco, e empregando-se espectrômetro FTIR, da marca Thermo Electron Corporation Scientific Division, modelo Nicolet 6700. Os espectros obtidos na faixa de 400 – 4000 cm^{-1} resultam de 32 acumulações obtidas com resolução 4 cm^{-1} .

4.5.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica na qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência, termicamente inerte, em função da temperatura enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura (De *et al.*, 2013)

As análises de DSC das nanopartículas foi realizada a corrida entre 20 a 500°C Apresentando uma taxa de aquecimento de 10°C/min. A realização dos ensaios considerou uma atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min. As análises foram iniciadas após o preenchimento do cadinho de alumina de 100 µL com uma massa aproximada de 5 mg de amostra. Esta análise foi realizada em um equipamento modelo DSC822, marca Mettler Toledo.

4.5.3 Tamanho médio de partículas – espalhamento de luz dinâmico

O tamanho médio das partículas foi determinado por espalhamento de luz dinâmico empregando-se o equipamento Delsa Nano, da Beckman Coulter - Delsa™ Nano Series. Para essa determinação, o pó seco (1 g) foi disperso em acetonitrila pelo emprego de banho de ultrassom (~30 min).

4.5.4 Tamanho médio de partículas – microscopia eletrônica da varredura

A morfologia das nanopartículas foi determinada e identificada com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo (SEM-FEG) da marca FEI modelo. Quanta 3D, pertencente ao Laboratório de Corrosão e Proteção do IPT.

As amostras foram depositadas na forma de pó sob uma fita dupla face adesiva de cobre e mantidas em dessecador sob vácuo por no mínimo 12 horas e recobertas, por sputtering, com uma fina camada de Au/Pt. As imagens foram geradas em alto vácuo sob tensão de aceleração de 20 kV e em diferentes magnitudes.

4.6 Determinação da eficiência de encapsulação

Para a quantificação da ZDV e das nanopartículas de Silo e ED, foi utilizado o método de gradiente por HPLC. Foram avaliadas as nanopartículas de Nano Silo e Nano ED obtidas no item 5.3.

Para determinar a concentração total, pesou-se a amostra Nano Silo e Nano ED, onde foi transferido para balão volumétrico. A extração foi realizada com: (I) agitação manual; (II) vortex e (III) banho ultrassom. O sobrenadante foi

utilizado para leitura no HPLC. Com o propósito de quantificar o a zidovudina livre, e a suspensão das nanopartículas contendo a associação de antirretrovirais, revestidas ou não, a suspensão foi filtrada ultrafiltro Millipore® de 0,2 nm. Essa solução foi utilizada para leitura no HPLC.

A concentração total dos fármacos corresponde à porção de fármaco livre somada à porção de fármaco encapsulado. Sendo assim, podemos utilizar a Equação 1 para determinar a % de encapsulação dos fármacos.

$$\text{Total teórico de ZDV (\%)} = \frac{\text{massa total ZDV} \times 100}{\text{Massa total de partículas (mg)}}$$

$$EE (\%) = \frac{\text{teor de ZDV analisado} \times 100}{\text{Teor teórico de ZDV}}$$

4.7 Liberação controlada

A liberação controlada do fármaco em função do pH foi determinada pela técnica de absorção em função do tempo pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) se baseia na separação de compostos químicos em solução e cada componente da amostra percorrem uma coluna interagindo de forma diferenciada. Os ensaios de liberação foram realizados a temperatura de 37 °C para simular a temperatura fisiológica e em diferentes meios de dissolução, incluindo solução tampão pH 8,0 e solução de HCl 0,1 M, com o objetivo de simular o fluido gástrico e o meio entérico, em que o fármaco é absorvido.

Para realização dos ensaios, amostras de fármacos nanoencapsulados (~2,5 mg) foram acondicionadas em frascos de Erlenmeyer de 125 mL e em seguida adicionados 25 mL da solução usada como meio de dissolução com o pH controlado. Uma incubadora da marca Nova Ética, modelo 430 foi empregada para promover a homogeneização dos ensaios. Amostras do tampão foram aliqüotadas após (1; 3; 5; 7; 10; 15; 20; 60; e 120) minutos.

As alíquotas foram quantificadas empregando cromatografia líquida de alta eficiência, equipamento da marca Ultimate 3000 - Dionex, detector UV/Vis e autosampler, operando com uma coluna Altima® C-18 (250 x 4,6 mm, com partículas de 5 µm - Grace Davison Discovery Science) A coluna foi mantida à temperatura constante de 25°C. A detecção foi realizada em um comprimento de onda de 270 nm.

4.8 Teste *in vitro* de Citotoxicidade

Neste estudo foi utilizada a linhagem celular NCTC Clone 929, células de tecido conectivo de camundongo. Como controle negativo foram utilizados tampão PBS: O controle negativo é utilizado para demonstrar na prática a resposta celular no ensaio e o controle positivo para comprovar uma resposta apropriada do sistema no teste. Volumes de 0,2 ml de uma suspensão, com $2,5 \times 10^5$ células/mL da linhagem NCTC Clone 929, foram distribuídos em microplaca de 96 poços. A placa foi incubada por 24 h a 37 °C em incubadora com 5% de CO₂. Após esse período, o meio de cultura foi retirado e acrescentou-se as diluições seriadas do fármaco. O experimento foi realizado em triplicata. A microplaca foi mantida por 24h em incubada a 37 °C. Após, foi retirado o tratamento e os poços foram lavados com PBS e adicionado solução de MTT a 5 µg/mL por 3 horas. Em seguida, a solução de MTT foi retirada e adicionou-se 200 µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazan formados pela atividade mitocondrial das células viáveis. Foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda 595 nm. Com os valores obtidos calculou-se a porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle e foi plotado em gráfico em função da concentração do extrato, utilizando a fórmula (Segat, 2017):

$$\text{Células viáveis (\%)} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle negativo}} \times 100$$

5 RESULTADOS

5.1 Definição dos polímeros encapsulantes (placebo)

Para definição dos polímeros funcionais adequados à nanoencapsulação dos fármacos avaliaram-se os polímeros alginato de sódio (AG),

carboximetilcelulose (CMC), goma arábica (GA), goma de cajueiro (GC), silicone poli(dimetilsiloxano) graft poliacrilatos (SILO), Eudragit® RS100 (ED) e Eudragit® EPO (ED_EPO), assim como diferentes concentrações indicados na **Tabela 2**. Foram preparadas 19 soluções aquosas poliméricas em três concentrações diferentes, 1 %, 0,5 % e 0,1 % (m/m) de polímero.

A viscosidade e a tensão superficial das soluções poliméricas são parâmetros determinantes para compreensão das dificuldades e limitações encontradas no processo de secagem por *nanospray drying* e seus valores também são apresentados na **Tabela 2**. As soluções de CMC e AG apresentaram aumento significativo da viscosidade em função do aumento da concentração do material polimérico. Esse comportamento não foi verificado para as soluções de GC, GA e ED. Tal resultado pode estar relacionado à massa molecular dos materiais, pois quanto maior a massa molecular do polímero maior será sua viscosidade em meio aquoso.

Com relação aos resultados de tensão superficial, aquelas que apresentaram o menor valor de tensão superficial foram às soluções de ED, inclusive com uma variação significativa entre as diferentes concentrações avaliadas. Esse resultado indica que o ED apresenta o maior potencial de atuar como emulsificante em meio aquoso que os demais materiais e poderia ser associado à composição química, pois se trata de um poliacrilato sintético com alto grau de funcionalização por grupos carboxílicos oriundo do ácido metacrílico utilizado em sua síntese. Analogamente à função dos emulsificantes de reduzir a tensão entre as diferentes fases de uma emulsão com finalidade de estabilizá-la, propõe-se a ação do ED no meio. Por outro lado, as amostras de CMC e AG não apresentaram variação na tensão superficial de forma significativa em função da mudança de concentração. Nesse caso, a pequena variação da tensão superficial para esses materiais poderia ser atribuída ao baixo grau de funcionalização e também a alta massa molecular.

Tabela 2. Resultados obtidos na caracterização das soluções poliméricas

Soluções	AMOSTRA	Viscosidade (cP)	Tensão Superficial (mN/m)	Condutividade (μ /cm)
1	Carboxmetilcelulose_1,0 %	54	73	167
2	Carboxmetilcelulose_0,5 %	19	72	--
3	Carboxmetilcelulose_0,1 %	8,3	72	19
4	Alginato_1,0 %	16,6	70	2030
5	Alginato_0,5 %	9,5	71	11
6	Alginato_0,1 %	6,3	70	23
7	Eudragit® RS100_1,0 %	8,5	40	3000
8	Eudragit® RS100_0,5 %	7,5	46	2060
9	Eudragit® RS100_0,1 %	9,2	61	63
10	Eudragit® EPO_0,1%	-	-	418
11	Goma Arabica_1,0 %	6,9	51	95
12	Goma Arabica_0,5 %	6,7	57	53
13	Goma Arabica_0,1 %	6,3	69	13
14	Goma Cajueiro_1,0 %	6,5	65	108
15	Goma Cajueiro_0,5 %	8,6	71	58
16	Goma Cajueiro_0,1 %	8,6	67	164
17	Silicone_1,0 %	---	---	769
18	Silicone_0,5 %	---	---	1692
19	Silicone_0,1 %	2,8	41	262

A solubilização dos polímeros Eudragit® RS100 e Eudragit® EPO, e consequentemente a eficiência de secagem dos mesmos, depende do pH do meio, uma vez, que suas formas protonadas apresentam maior solubilidade em meio aquoso. Dessa forma, o pH das soluções sempre foi ajustado de forma a favorecer as formas iônicas dos polímeros.

As soluções poliméricas de Goma de Cajueiro, Goma Arábica, Eudragit® RS100 e Silicone® foram facilmente atomizadas e secas no Nano Spray, nas diferentes concentrações avaliadas (**Tabela 3**). Para Alginato e Carboxmetilcelulose, foi identificada uma limitação durante o processo de secagem, pois as soluções com concentrações de 1 % e 0,5 % m/m não puderam ser atomizadas. Esse resultado foi atribuído aos altos valores de viscosidade dessas soluções quando comparados com as viscosidades das demais soluções estudadas (**Tabela 2**).

Essa hipótese ganha consistência quando se analisa os resultados encontrados para esses dois materiais com soluções em concentrações menores, 0,1 % m/m, nas quais as viscosidades foram próximas aos valores das soluções passíveis de atomização, em torno de 7 cP. Existe uma dificuldade de alimentação da solução de atomização no nanospray, quando está é muito viscosa, o que inviabiliza a secagem. Como a solução deve passar por uma membrana de atomização que formará gotas sub-micrométricas para câmara de secagem, o fluxo de atomização fica reduzido, quando não impossibilitado.

Tabela 3. Resultados obtidos na secagem das soluções poliméricas

AMOSTRA	Secagem
NanoGC_1,0 %	OK
NanoGC_0,5 %	OK
NanoGC_0,1 %	OK
NanoGA_1,0 %	OK
NanoGA_0,5 %	OK
NanoGA_0,1 %	OK
NanoED_1,0 %	OK
NanoED_0,5 %	OK
NanoED_0,1 %	OK
NanoED_EPO_0,1%	OK
NanoSilo 1,0 %	OK
NanoSilo 0,5 %	OK
NanoSilo 0,1 %	OK
NanoAG_1,0 %	Não Atomizou
NanoAG_0,5 %	Não Atomizou
NanoAG_0,1 %	OK
NanoCMC_1,0 %	Não Atomizou
NanoCMC_0,5 %	Não Atomizou
NanoCMC_0,1 %	OK

5.2 Caracterização das nanopartículas placebo

5.2.1 Tamanho de partículas

Para a encapsulação dos fármacos antirretrovirais, foram empregados os polímeros ED e Silo uma vez que estes apresentaram maior facilidade de

secagem em diferentes concentrações mássica e obtiveram melhores caracterizações em soluções. Para os ensaios utilizaram-se as proporções mássicas 10:1 e 5:1 de polímero: ativo. Todas as secagens realizadas empregaram soluções poliméricas na concentração de 0,1 % m/m e as mesmas foram conduzidas sem dificuldades e com rendimento de recuperação superior 80 %, como resumido na **Tabela 5**.

Tabela 4. Tamanho das nanopartículas placebo

Amostras	D _{4,3} (μm)	D ₁₀ (μm)	D ₅₀ (μm)	D ₉₀ (μm)
NanoAG_0,1 %	9.839	0.840	5.512	34.23
NanoED_1,0 %	3.945	1.226	2.677	9.249
NanoED_0,5 %	2.516	0.700	1.732	5.577
NanoED_0,1 %	Apresentou solubilização no etanol			
NanoCMC_0,1 %	5.489	1.001	3.654	12.98
NanoGA_1,0 %	2.019	0.758	1.763	3.660
NanoGA_0,5 %	2.906	0.788	2.488	5.676
NanoGA_0.1 %	3.480	0.822	2.589	7.386
NanoGC_1,0 %	6.723	0.858	3.282	20.37
NanoGC_0.5 %	2.961	0.698	2.556	5.827
NanoGC_0.5 %	9.839	0.840	5.512	34.23

Os resultados apresentados na **Tabela 4** são expressos respectivamente pelo diâmetro médio do volume (D [4,3]), percentil 10% (D [0,10]), mediana (D [0,50]) e percentil 90% (D [0,90]). Cabe destacar que na determinação do tamanho de partículas por DLS, pode haver o mascaramento do tamanho real da partícula pela presença de aglomerados, pois a suspensão em análise é instável e as partículas acabam decantando para o fundo da cubeta devido à formação de aglomerados. A hipótese de aglomeração das partículas durante as medidas de tamanho foi confirmada pela análise de MEV.

Nas **Figura 6** a **Figura 12** são mostradas micrografias das análises do MEV das nanopartículas obtidas a partir das diferentes soluções poliméricas. Como pode ser observado, o material seco obtido apresentou, em sua maior parte, partículas na escala nanométrica, principalmente nas soluções em concentrações poliméricas de 0,1 % m/m. Esse resultado pode ser confirmado, tendo como exemplo, as imagens das **Figura 8 (B)** e **Figura 9 (B)** em que a

maior parte das partículas estão com tamanho inferiores a 1 μm . Dessa forma, os resultados obtidos por DLS apresentados na **Tabela 4** referem-se a aglomerados de partículas e não fielmente o tamanho da estrutura das partículas. Esta medida pode ser uma referência e uma forma de caracterizar lotes de partículas, mas não reflete o tamanho real dos núcleos nanoestruturados.

O processo de desagregação das partículas, principalmente aquelas em escala nanométrica é difícil e em alguns casos impossível, como demonstrado pelas imagens das **Figura 7 (B)**, **Figura 9 (A)** e **Figura 10 (E)** pois entre cada partícula existe um ponto de coalescência entre as mesmas (denominado de pescoço entre partículas) o que impede fisicamente que as mesmas sejam dispersas em qualquer tipo de solvente que não as solubilize. Nesses casos a confirmação precisa do tamanho de partícula somente foi possível por microscopia eletrônica de varredura.

Cabe aqui mencionar que não é esperado que o tamanho das nanopartículas tenha influência sobre a ação antiviral, visto que a ZDV tem seu mecanismo de ação relacionado a inibição da enzima transcriptase reversa, da timidina do DNA viral. Neste momento de atuação, o fármaco já foi liberado e a função da matriz polimérica nanoestruturada é apenas modular o local de liberação. Ou seja, a encapsulação em partículas poliméricas se dá para melhorias em conseguir passar pelo trato gastrointestinal sem a liberação do fármaco.

Figura 6. Micrografias eletrônicas das partículas de Goma de Cajueiro obtidas a partir de solução 1,0 % nas ampliações de (A) 5.000x; e (B) 15.000x; e de solução 0,5 % nas ampliações de (C) 35.000x; e (D) 65.000x

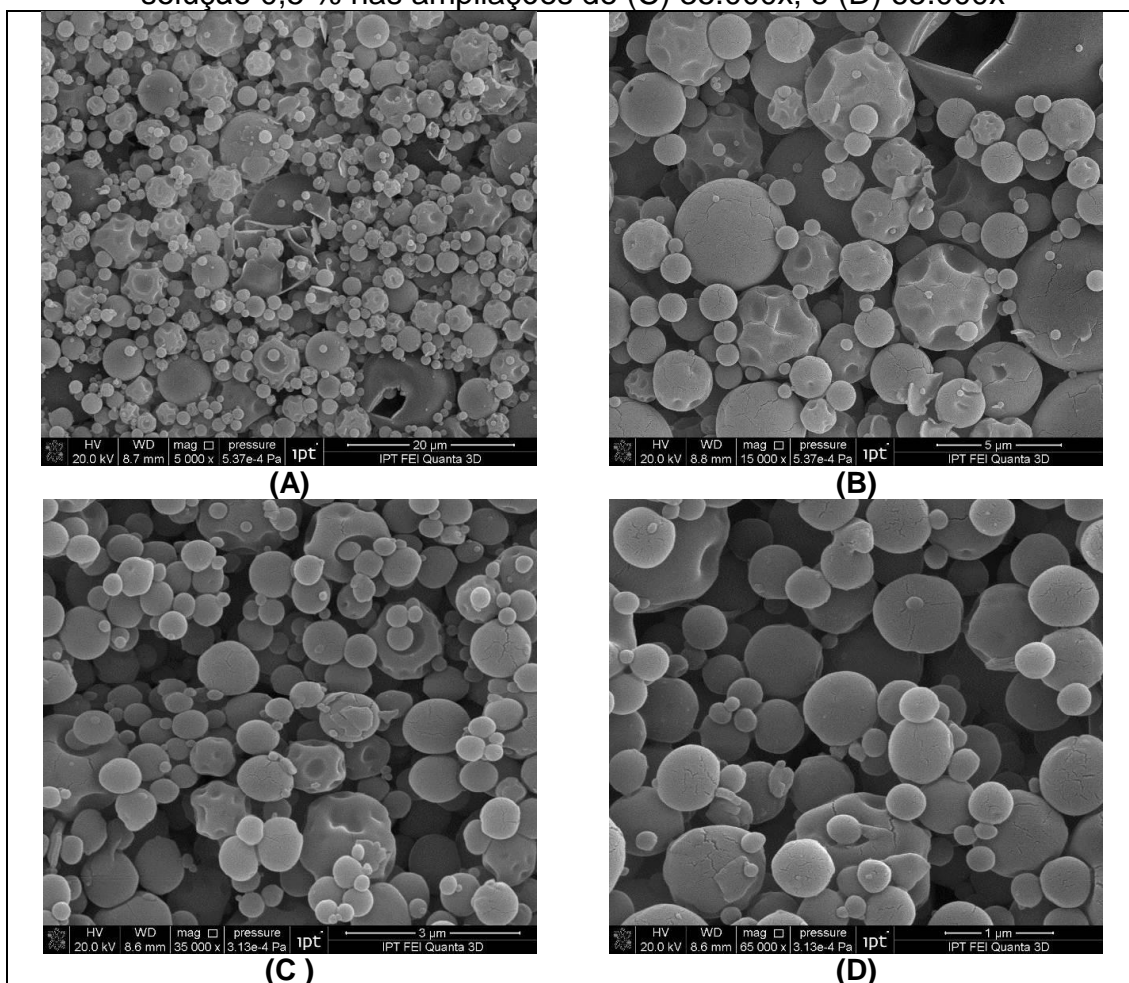


Figura 7. Micrografias eletrônicas das partículas de Goma Arábica obtidas a partir de solução 0,1 % nas ampliações de (A) 20.000x; e (B) 120.000x.

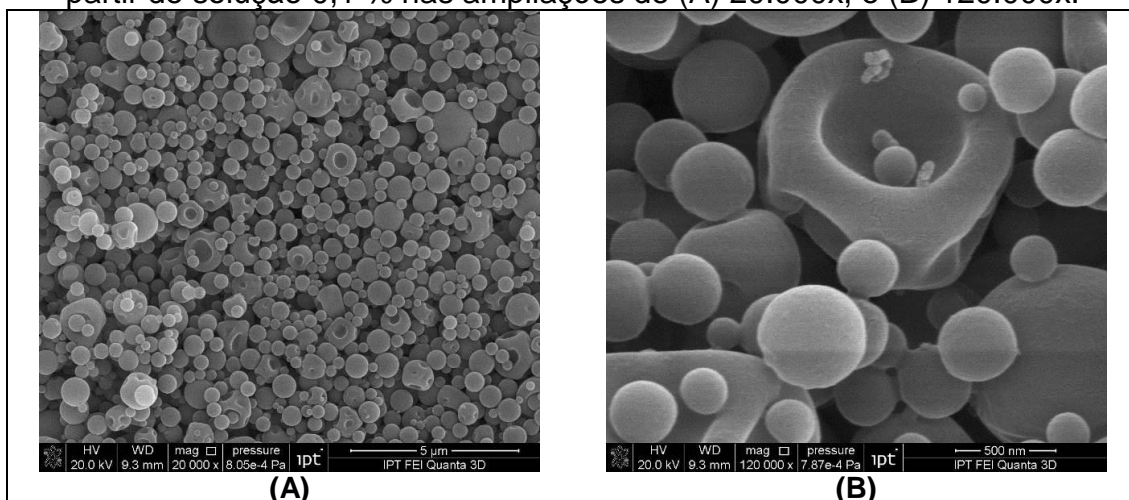


Figura 8. Micrografias eletrônicas das partículas de Carboximetilcelulose obtidas a partir de solução 0,1 % nas ampliações de (A) 20.000x; e (B) 50.000x.

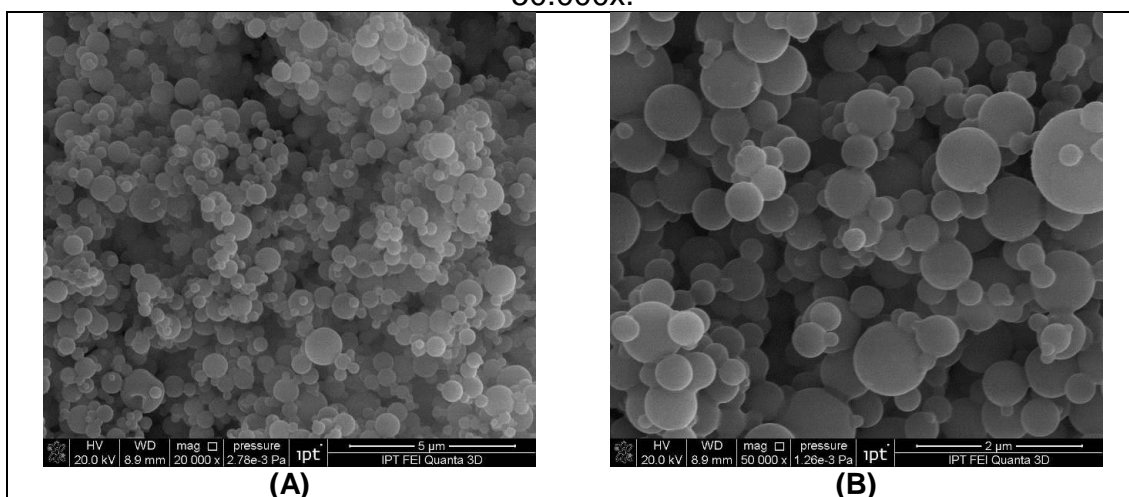


Figura 9. Micrografias eletrônicas das partículas de Alginato obtidas a partir de solução 0,1 % nas ampliações de (A) 10.000x; e (B) 80.000x.

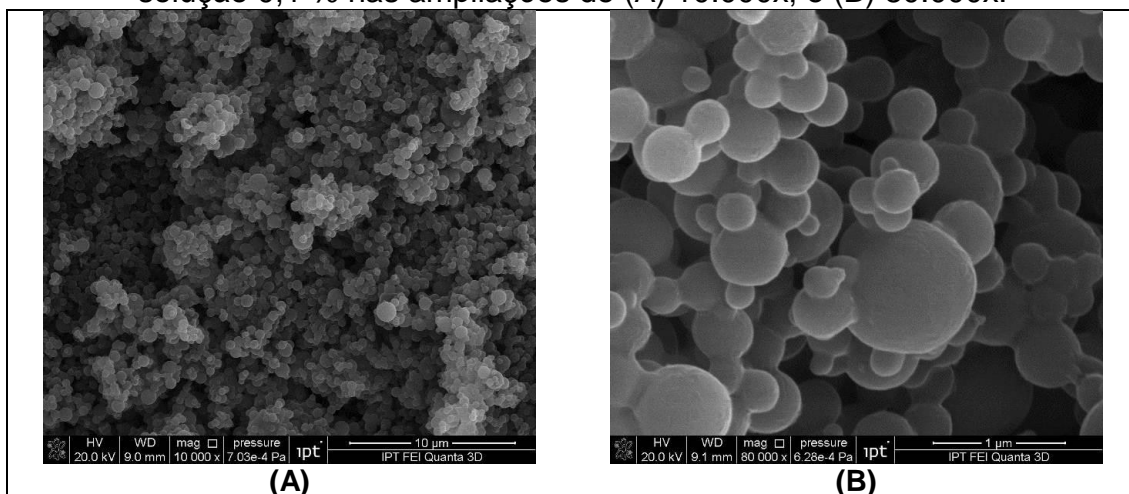


Figura 10. Micrografias eletrônicas das partículas de Eudragit® RS100 obtidas a partir de solução 1,0 % nas ampliações de (A) 20.000x e (B) 50.000x; de solução 0,5 % nas ampliações de (C) 20.000x e (D) 50.000x; de solução 0,1 % nas ampliações de (E) 25.000x e (F) 80.000x.

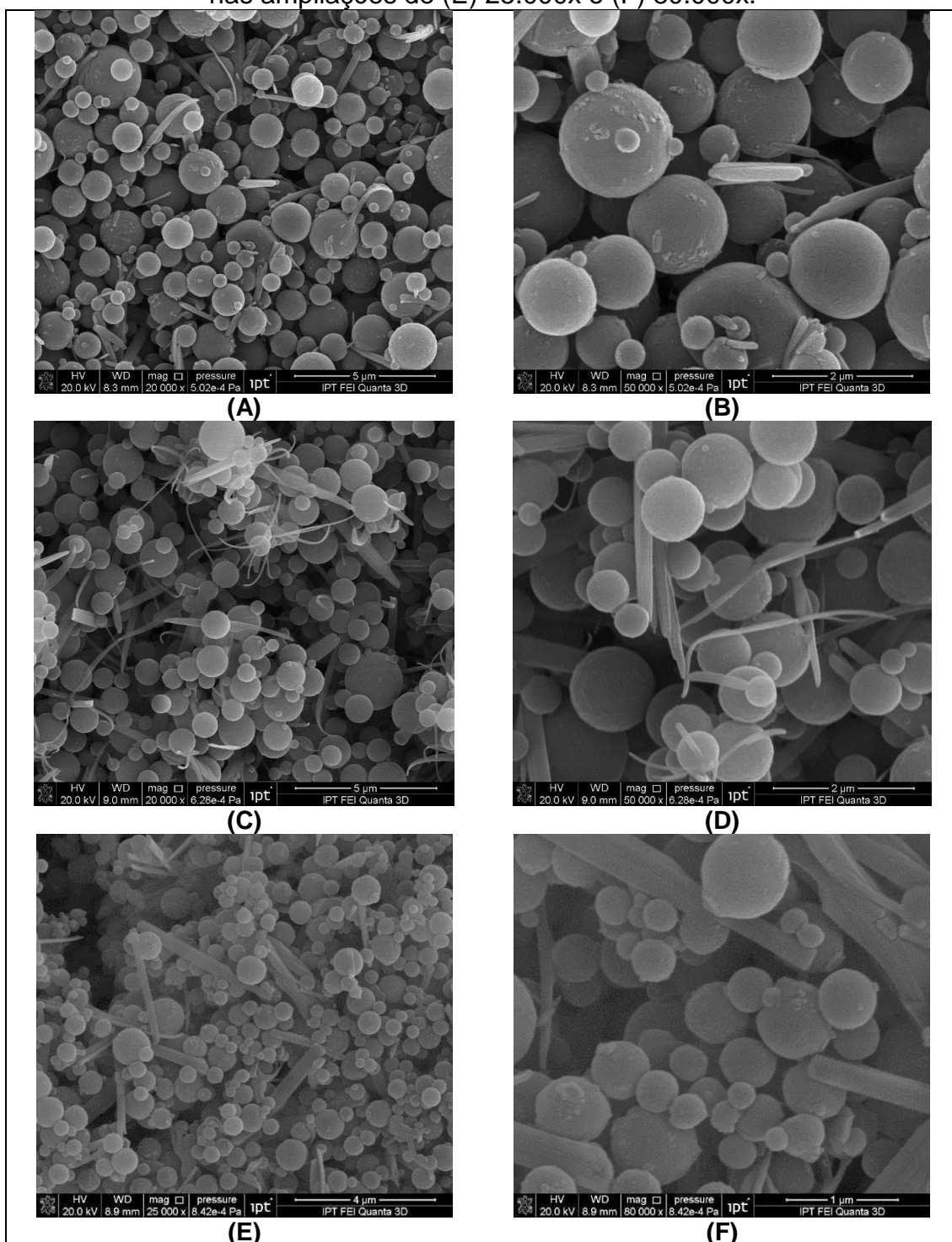


Figura 11. Micrografias eletrônicas das partículas de Eudragit®_EPO obtidas a partir de solução 0,1 % nas ampliações de (A) 5.000x e (B) 50.000x.

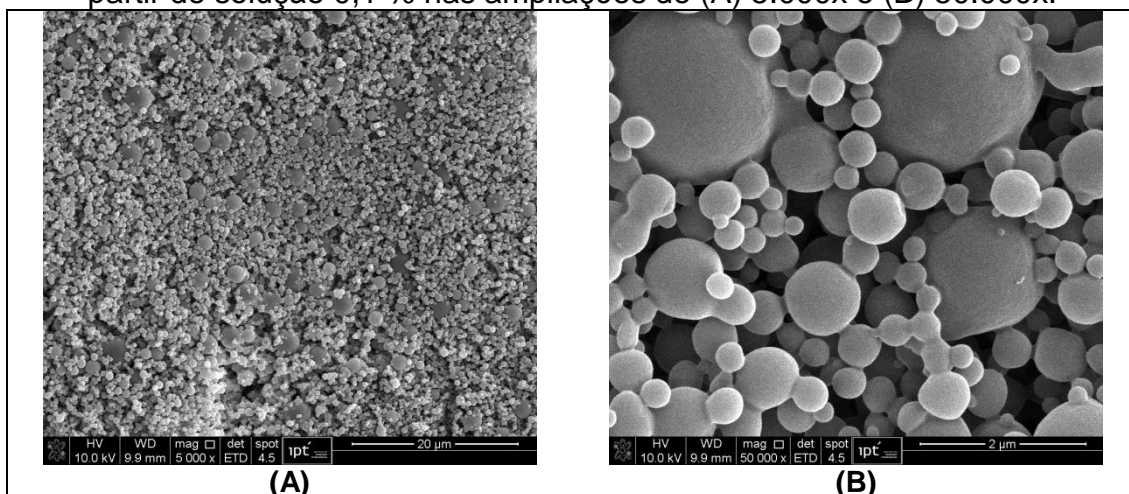
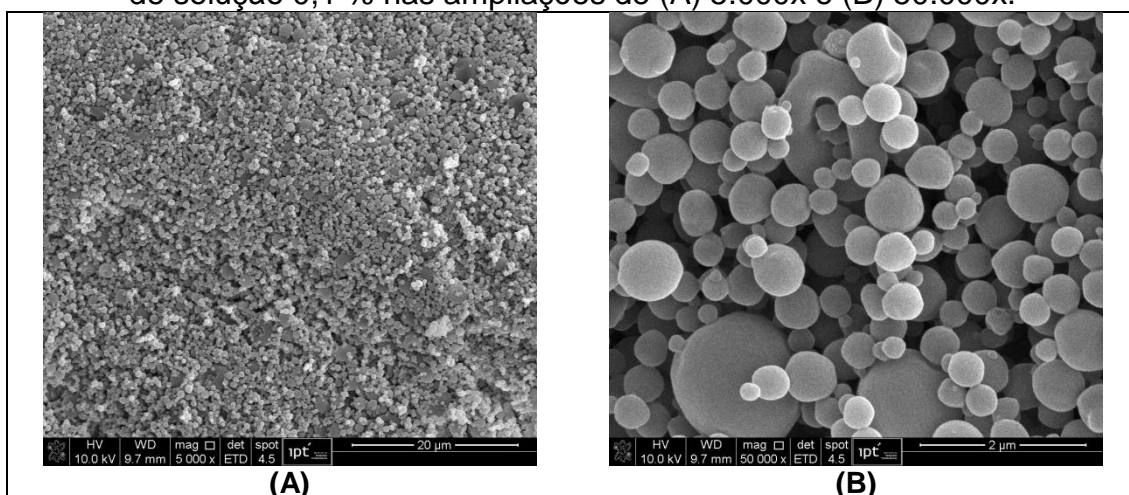


Figura 12. Micrografias eletrônicas das partículas de Silicone® obtidas a partir de solução 0,1 % nas ampliações de (A) 5.000x e (B) 50.000x.



5.3 Nanoencapsulação dos fármacos

Para a encapsulação dos fármacos antirretrovirais, foram empregados os polímeros Eudragit® RS100 e Silicone® uma vez que estes apresentaram maior facilidade de secagem em diferentes concentrações mássicas. Para os ensaios utilizaram-se as proporções mássicas 10:1 e 5:1 de polímero:ativo. As secagens realizadas foram na concentração polimérica de 0,1% m/m para evitar dificuldades no processo e desta forma com o rendimento de recuperação superior a 80 %, como resumido na **Tabela 5**.

Tabela 5. Soluções poliméricas contendo antirretrovirais

Amostra	Polímero	Fármaco	[] %	Pol:ativo	pH*	Secagem
1	Eudragit® RS100	ZDV	10%	10:1	8,01	Ok
2	Eudragit® RS100	ZDV	20%	5:1	7,46	Ok
3	Eudragit® RS100	ZDV	10%	10:1	8,34	Ok
4	Eudragit® RS100	ZDV	10%	10:1	8,22	Ok
5	Eudragit® RS100	ZDV	20%	5:1	8,02	Ok
6	Eudragit® RS100	ZDV	20%	5:1	7,55	Ok
7	Eudragit® RS100	ZDV	20%	5:1	8,46	Ok
8	Eudragit® RS100	ZDV	20%	5:1	9,03	Ok
9	Eudragit® RS100	ZDV	20%	5:1	8,56	Ok
10	Silicone®	ZDV	10%	10:1	7,88	Ok
11	Silicone®	ZDV	10%	10:1	8,33	Ok
12	Silicone®	ZDV	20%	5:1	8,26	Ok
13	Silicone®	ZDV	20%	5:1	9,22	Ok
14	SILO	ZDV	20%	5:1	7,46	Ok
15	SILO	ZDV	20%	5:1	8,55	Ok
16	SILO	ZDV	20%	5:1	8,87	Ok
17	SILO	ZDV	20%	5:1	9,35	Ok
18	SILO	ZDV	20%	5:1	8,71	Ok
19	SILO	LAMI	20%	5:1	8,44	Ok

*para a total solubilização dos polímeros é necessário o aumento do pH, sendo que o pH não necessariamente precisa estar todos na mesma faixa.

5.4 Caracterizações das nanopartículas contendo antirretrovirais

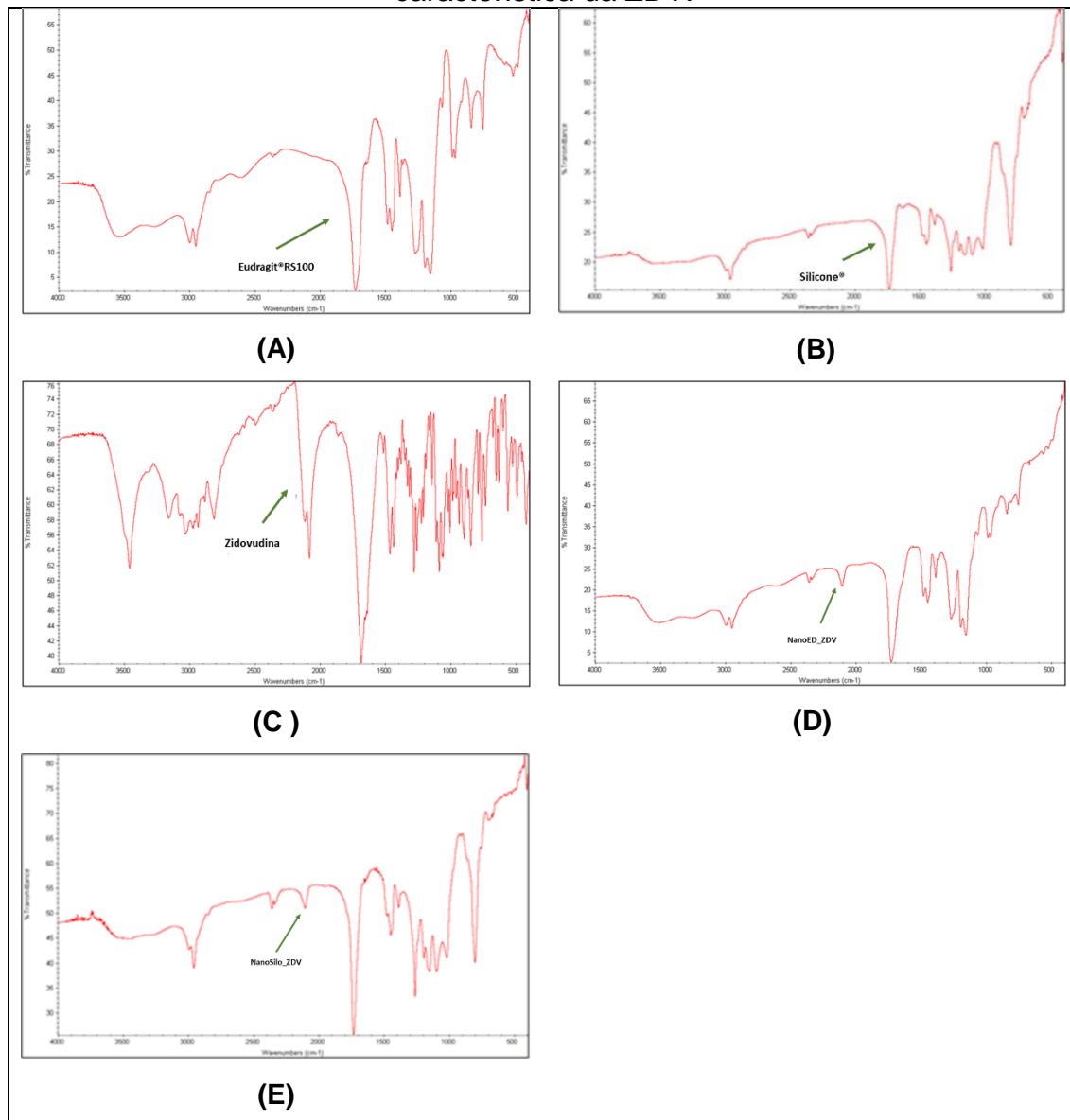
Os nanoencapsulados contendo zidovudina foram caracterizados quanto a composição química empregando-se a técnica de FTIR e técnica de DSC, visando a uma avaliação indireta da eficiência de encapsulação e a estabilidade do fármaco referente a temperatura.

A **Figura 13 (A, B e C)** apresenta os espectros FTIR dos materiais de Eudragit® RS100, Silicone® e a Zidovudina puros, respectivamente. Esses espectros foram utilizados como referência para avaliar os resultados obtidos na

caracterização dos produtos nanoencapsulados. A forma de interpretação dos resultados consistiu no conceito de que, caso o ativo estivesse completamente encapsulado pela matriz polimérica de ED ou Silo, os sinais de FTIR característicos do ativo não deveriam ser observados nos espectros dos nanoencapsulados, pois a matriz polimérica blindaria a interação da radiação com as moléculas de ativo, o mesmo poderíamos dizer com o DSC na **Figura** .

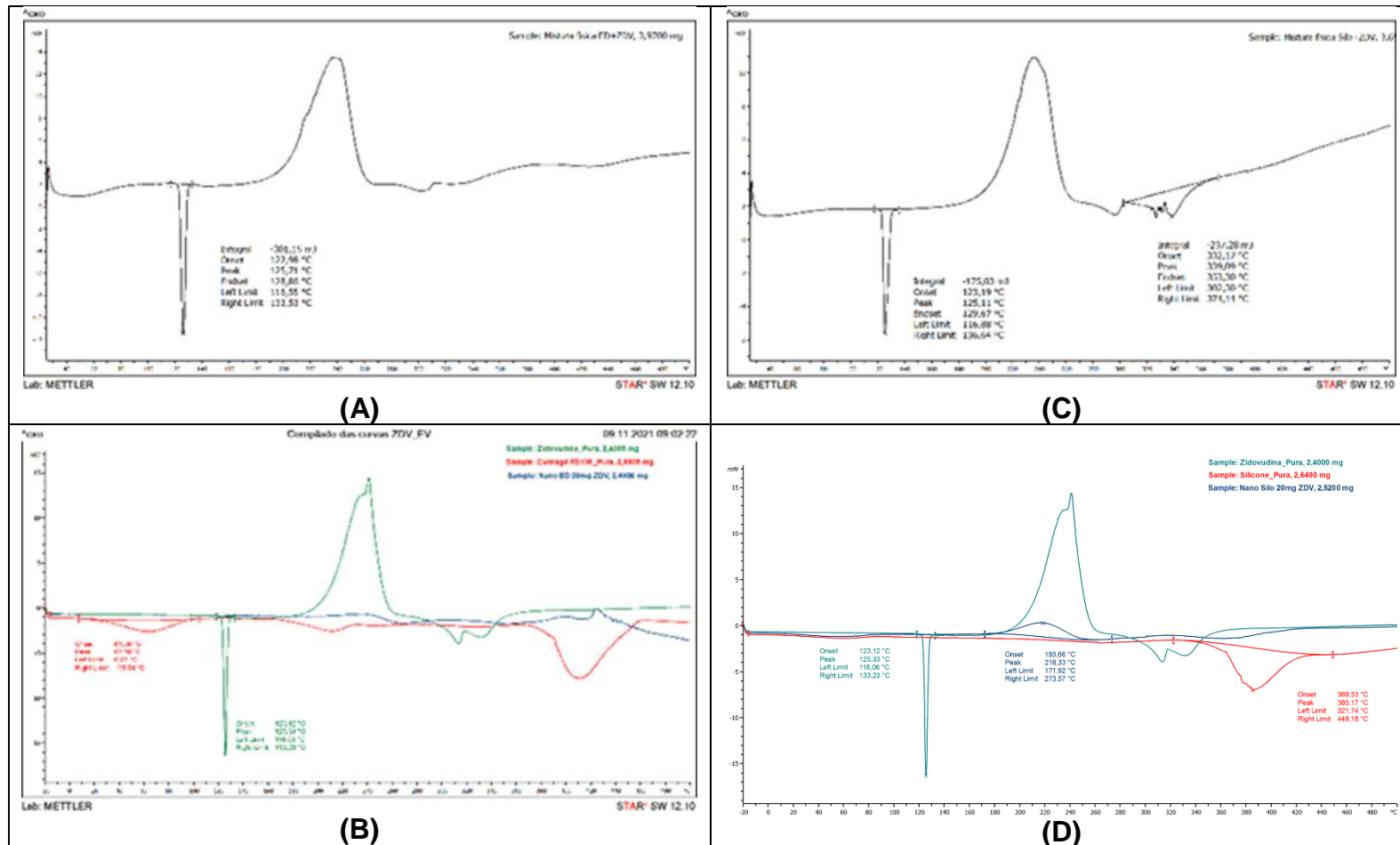
Os espectros FTIR dos nanoencapsulados obtidos com Eudragit® RS100 e Silicone® ~1720 cm⁻¹ característica da ZDV (banda indicada pela seta azul nos espectros da **Figura 13 (D e E)** esse resultado sugere, de forma indireta que parte do ativo não foi encapsulado completamente pela matriz polimérica, podendo o ativo estar livre, na forma de partícula dispersa com os nanoencapsulados, ou então, adsorvido na superfície dos nanoencapsulados, permitindo sua identificação pela análise de FTIR. Para avaliar qual dessas hipóteses é a mais provável, foi empregada a técnica de MEV para visualização das morfologias dos nanoencapsulados e identificar possíveis partículas de ativo livre.

Figura 133. Espectros FTIR do Eudragit® RS100_puro (A); do Silicone®_puro (B); da zidovudina_pura (C); da NanoED_20 mg ZDV (D); da NanoSilo_20 mg ZDV (E). As setas em azul destacam a banda em cerca de 1720 cm⁻¹, característica da ZDV.



A análise térmica é uma técnica amplamente utilizada para verificar o comportamento de fármacos, bem como a ocorrência de incompatibilidade ou interação entre os componentes avaliados. É possível compreender também a associação entre os fármacos e o polímero. As curvas de DSC das amostras Silicone® e Eudragit® contendo a ZDV, estão apresentadas na **Figura 4**.

Figura 14. Curvas de DSC das amostras (A) mistura física Eudragit® RS100 e ZDV;(B) compilado das curvas NanoED e ZDV; (C) mistura física Silicone® e ZDV; (D) compilado das curvas NanoSILO e ZDV



A curva de DSC **A e B** apresenta um primeiro evento endotérmico, na faixa de temperatura entre 115 e 135°C característico do processo de fusão do fármaco ZDV. A partir da temperatura de 160°C, observou-se o início do processo de decomposição térmica da ZDV. Com relação ao polímero NanoED puro conseguimos observar que houve um amplo evento endotérmico no início 35° C á 85 °C provavelmente devido a sua devido à desidratação e uma segunda variando de 390 °C a 450 °C, o que pode ser devido à degradação térmica. E quando observamos o evento da amostra NanoED com a ZDV é possível notar que não apresenta o evento endotérmico causado pela ZDV e sim só a faixa de fusão correspondente ao polímero Eudragit®, desta forma podemos concluir que o polímero se mostrou efetivo na encapsulação do fármaco.

A imagem da curva **C e D** conseguimos observar o mesmo perfil endotérmico da ZDV para ambas as curvas de mistura física. E o polímero silo apresentou evento endotérmico a partir de 340 °C á 420 °C. Com relação a encapsulação observamos o evento endotérmico principal do fármaco discretamente e o evento relacionado ao polímero silo também mais discreto com relação ao polímero puro. Podemos concluir através da análise da técnica de DSC que a encapsulação com Silicone® foi uma eficiência mais baixa que comparado com a amostra de Eudragit®.

Desta forma a **Figura 15** representa um desenho ilustrativo de como podemos encontrar as nanoparticulas encapsuladas com os antirretrovirais, ou seja, podemos ter os fármacos no interior da capsula da matriz ou na superfície.

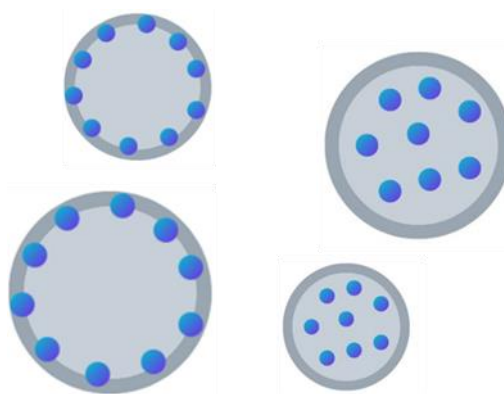
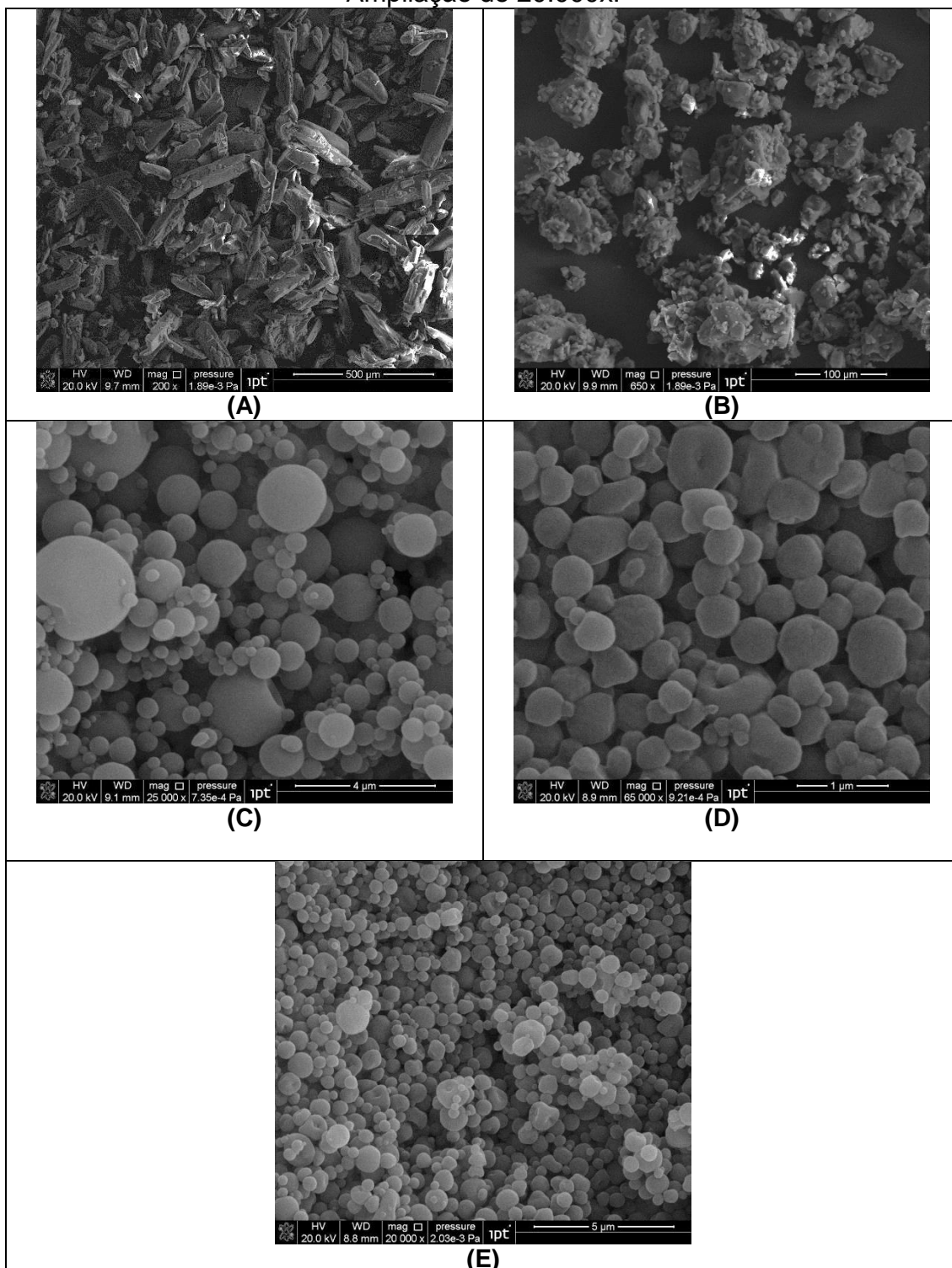


Figura 15. Desenho representativo da nanoencapsulação dos antirretrovirais.

A **Figura 146** são mostradas as micrografias eletrônicas das partículas obtidas no estudo da encapsulação dos fármacos. A **Figura 16 (A)** e a **Figura 16 (B)** apresentam micrografias dos fármacos como adquiridos, sem nenhuma etapa de secagem ou a presença de polímeros. É possível observar que os cristais de zidovudina e lamivudina pura apresentam tamanho em ordem micrométrica e morfologia irregular, com cristais na forma de agulhas, com alto razão de aspecto (largura/comprimento) e alta polidispersidade do tamanho dos cristais. Esses padrões morfológicos característicos dos cristais ajudaram na interpretação dos resultados de morfologia dos nanoencapsulados, principalmente com relação a uma possível presença de cristais livres sugerida nos espectros de FTIR.

Como observado nas micrografias das **Figura 16 (C a E)** podemos indicar que não tem perfil cristalino fora das partículas o que indica que houve a encapsulação. Esses resultados indicam que a observação da banda da característica de ZVD nos espectros de FTIR se deve à presença de material parcialmente encapsulado e aderido à superfície das nanopartículas poliméricas.

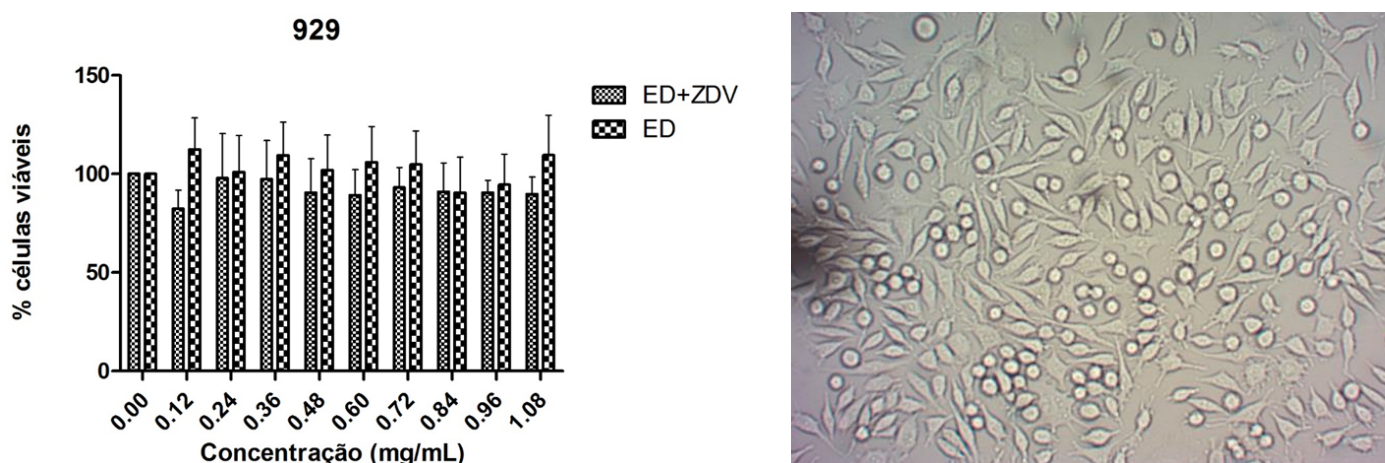
Figura 146. Micrografias eletrônicas das nanoparticulas secas com ativo. (A) zidovudina pura; (B) lamivudina pura; (C) 0,1%_NanoED NH4OH_20mg ZDV- Ampliação de 25.000x; (D) 0,1%_NanoSilo NH4OH pH 11,54_20mg ZDV- Ampliação de 65.000x; (E) 0,1%_NanoSilo NH4OH pH 11,50_20mg LAMI_ Ampliação de 20.000x.



5.5 Citotoxicidade

O efeito das nanopartículas (NanoED e NanoSilo) foi avaliado de acordo com a viabilidade celular através do ensaio de MTT. O objetivo deste teste foi investigar se as partículas apresentam efeito citotóxico para as células, previamente à realização de testes *in vivo*, principalmente para verificar a segurança biológica da aplicação do material. Foi avaliada a linhagem celular NCTC Clone 929, em contato com nanopartículas nas concentrações de 0,12 até 1,2 mg/mL por 24 h. Os resultados estão apresentados na **Figura 15**. A amostra NanoSilo não apresentou dispersão adequada ao meio de cultura para aplicação sobre as células, mantendo-se aglomerada e desta forma a citotoxicidade não foi avaliada. Novos desenvolvimentos e adaptação do protocolo deve ser realizado para validar o efeito destas partículas.

Figura 15. A imagem à esquerda é o gráfico de resultado da viabilidade celular da amostra NanoED e a imagem da direita é uma microscopia optica da célula 929.



As medidas mostram que as nanopartículas não modificaram a viabilidade celular de forma relevante em relação ao controle (células sem nanopartículas), indicando que não são citotóxicas às linhagens nas concentrações testadas.

5.6 Processo de extração e quantificação de teor de ZDV

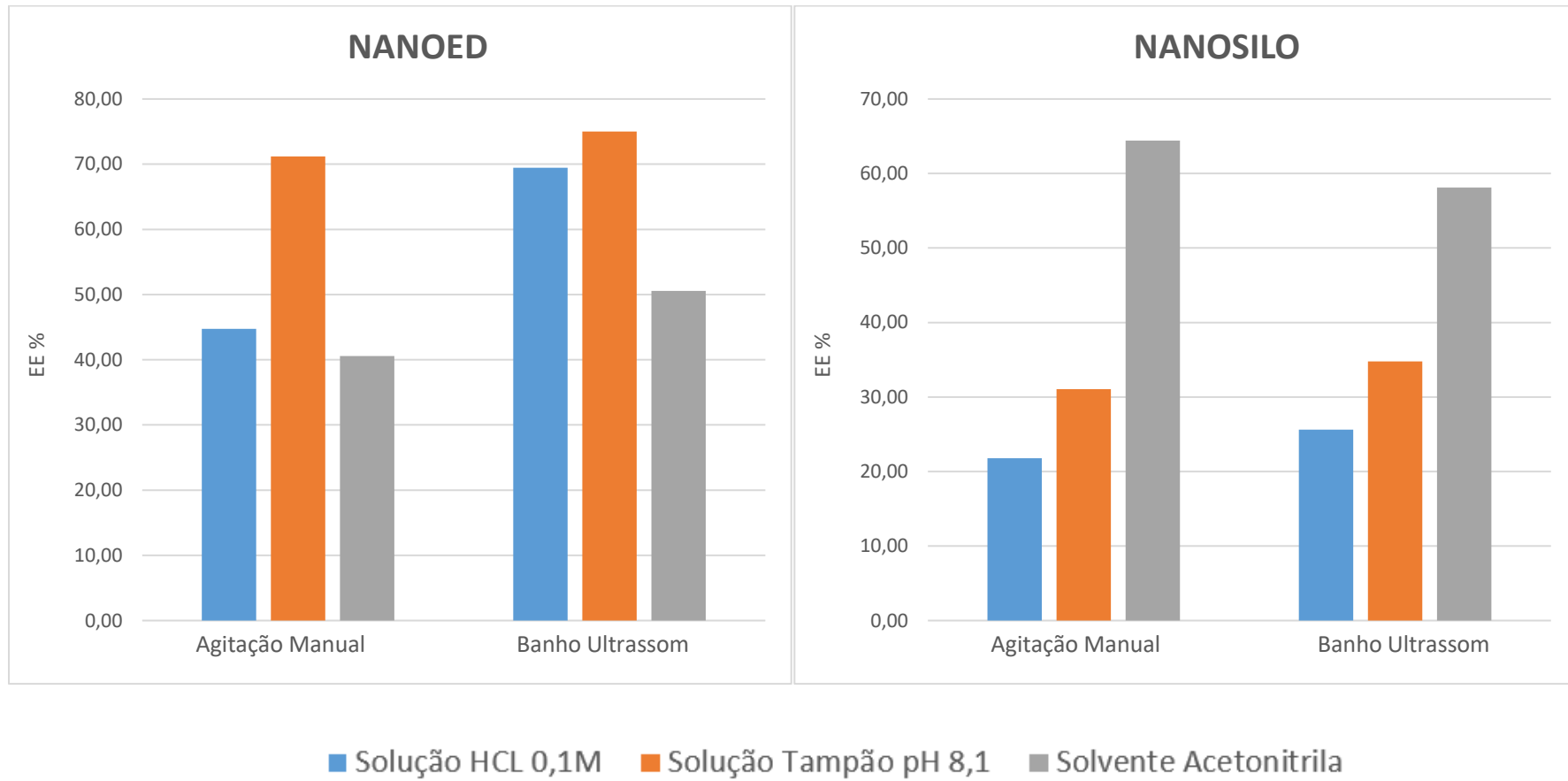
O estudo de eficiência de encapsulação descrito no item 4.6 onde as amostras NanoSilo e NanoED foram submetidas a três tipos de extração como descritos na **Tabela 6**. As extrações foram realizadas em diferentes meios como tampão básico com pH 8,1; tampão ácido com pH 3,0 e solvente acetonitrila. Quando observamos o NanoED nos três diferentes meios e nas três diferentes condições de extração, conseguimos observar que através do meio tampão básico houve o maior rompimento da partícula 1,300 mg sendo que o valor teórico calculado para a extração de 100% era de 1,734 mg, assim em que foi possível obter a maior eficiência de encapsulação, da ordem de 75%, quando em tampão ácido e acetonitrila e possível observar que é necessário o banho ultrassom para conseguir o rompimento da nanoestrutura e mesmo assim não foi o suficiente para liberar toda a ZDV. Este resultado confirma o efeito de proteção realizado pela nanopartícula em pHs ácidos e meios solventes, quando comparado aos pHs básicos, cumprindo o papel de sistema de veiculação e encapsulação do fármaco.

Na amostra NanoSilo foi possível avaliar que nos meios aquosos (pH ácido ou básico) não chegou a obter 50% de extração do fármaco, porém com o solvente acetonitrila tanto com o vórtex quanto o banho ultrassom foi possível extrair e obter 60% de eficiência de encapsulação. Com isso podemos sugerir que o NanoSilo seja um polímero mais resistente possibilitando uma maior proteção do fármaco encapsulado (quando comparado ao Eudragit) e melhor eficiência na liberação controlada. Pode-se também inferir que a eficiência de encapsulação do método aqui proposto é da ordem de 60 a 70%, o que é normalmente apresentado como altas taxas de encapsulação quando comparado a outras matrizes descritas na literatura.

Tabela 6. Resultados dos valores do processo de EE%

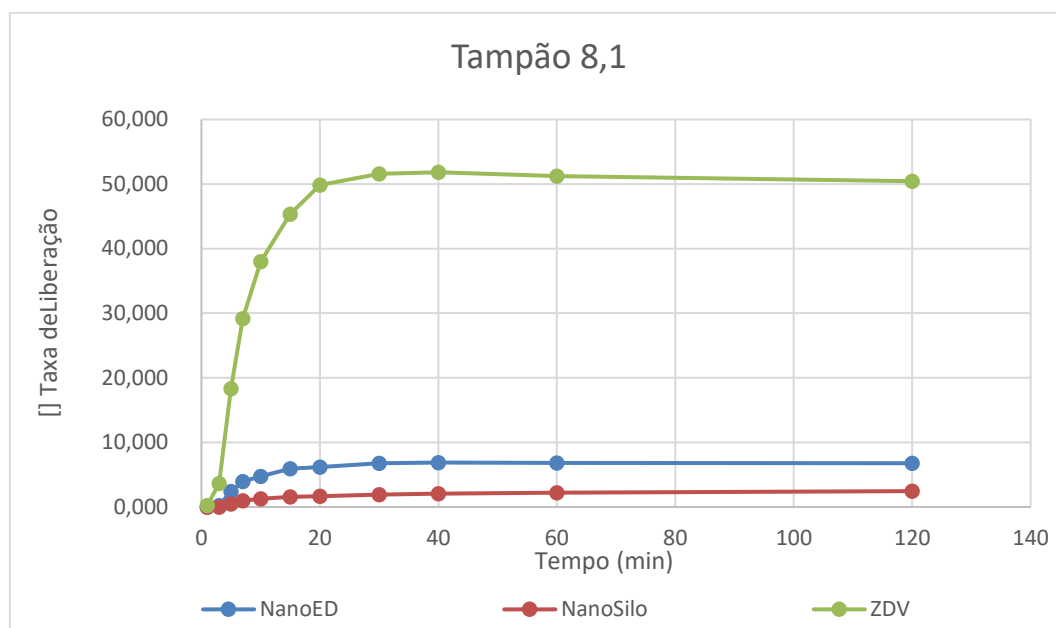
ID	Amostra	Meio utilizado	Condição	Tempo (min)	Massa partícula (mg)	volume extração mL	mg/L (HPLC) mg ZDV	Teor (HPLC) mg ZDV por g de Nano	Teor de ZDV (mg) (HPLC)	Teor de ZDV teórico ZDV na Nano* mg	EE (%)
1	Nano EDRS 100 + 20mg ZDV	Tampão ácido	Agitação manual	2	10,4	10	77,60	74,612	0,776	1,734	44,758
2	Nano EDRS 100 + 20mg ZDV	Tampão ácido	Ultrassom	60	10,4	10	120,43	115,800	1,204	1,734	69,466
3	Nano EDRS 100 + 20mg ZDV	Tampão Base	Agitação manual	2	10,7	10	127,01	118,697	1,270	1,784	71,204
4	Nano EDRS 100 + 20mg ZDV	Tampão Base	Ultrassom	60	10,4	10	130,03	125,033	1,300	1,734	75,005
5	Nano SILO + 20mg ZDV	Tampão ácido	Agitação manual	2	10,4	10	37,80	36,342	0,378	1,734	21,801
6	Nano SILO + 20mg ZDV	Tampão ácido	Ultrassom	60	10,3	10	44,01	42,731	0,440	1,717	25,633
7	Nano SILO + 20mg ZDV	Tampão Base	Agitação manual	2	10,5	10	54,34	51,756	0,543	1,750	31,047
8	Nano SILO + 20mg ZDV	Tampão Base	Ultrassom	60	10,8	10	62,65	58,006	0,626	1,800	34,797
9	Nano EDRS 100 + 20mg ZDV	Acetonitrila	Vortex	2	10,2	10	69,00	67,647	0,690	1,700	40,580
10	Nano EDRS 100 + 20mg ZDV	Acetonitrila	Ultrassom	20	10,2	10	86,00	84,314	0,860	1,700	50,578
11	Nano SILO + 20mg ZDV	Acetonitrila	Vortex	2	9,5	10	102,00	107,368	1,020	1,584	64,408
12	Nano SILO + 20mg ZDV	Acetonitrila	Ultrassom	20	9,5	10	92,00	96,842	0,920	1,584	58,094

Figura 17. Gráfico de resultado da viabilidade celular da amostra NanoED.



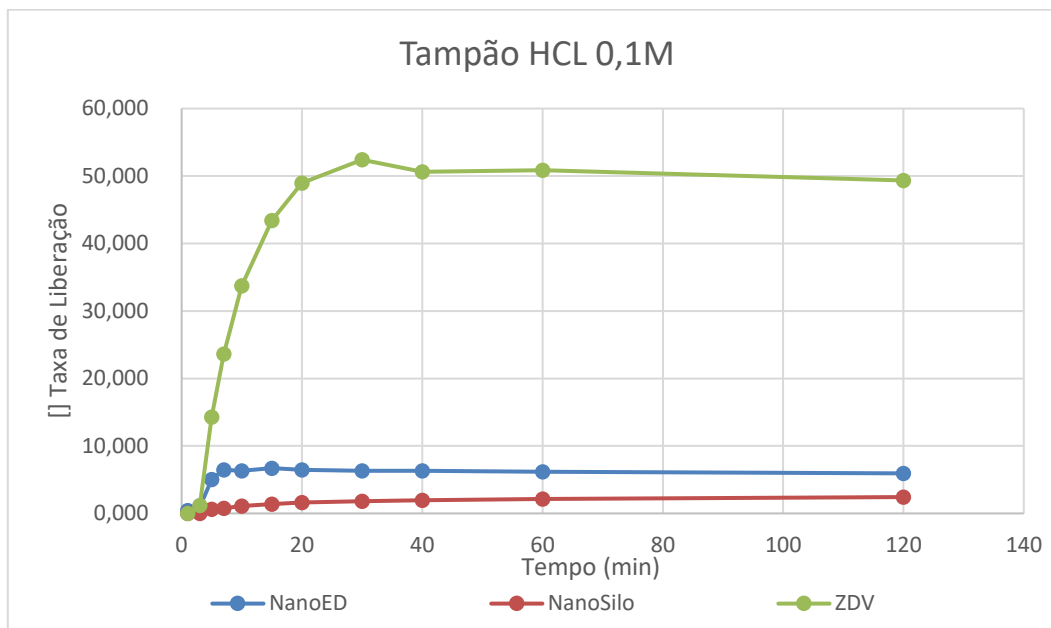
Para conseguirmos compreender melhor a **Tabela 6**, foi construído um gráfico representado na **Figura 17**, mostrando a diferença do NanoED em diferentes meios como Solução de HCL, Solução Tampão 8,1 e o solvente Acetonitrila. Podemos observar que o NanoED teve maior rompimento das partículas no meio básico do que com relação aos demais. Entretanto não podemos dizer o mesmo para a amostra NanoSilo, visto que para seu rompimento a melhor resposta foi com o solvente acetonitrila, ou seja, podemos destacar que o NanoSilo seja mais resistente aos meios do que o NanoED. Desta forma o estudo de eficiência de encapsulação nos possibilitou a entender o comportamento do sistema de liberação após a encapsulação dos antirretrovirais, em que o estudo de liberação *in vitro* foi realizado em função do pH simulando o meio entérico (tampão 8,1) e meio gástrico (HCL 0,1M) ocorrendo num período de 2 horas. E os resultados deste estudo com a zidovudina e lamivudina em diferentes meios de dissolução estão apresentados nas **Figuras 18 a 20**.

O perfil de liberação apresentado na **Figura 168**, demonstra a diferença entre os fármacos encapsulados e o não encapsulado. Conforme foi discutido no estudo de eficiência de encapsulação, é possível observar que os polímeros promovem a liberação da ZDV de uma forma contida e controlada em função do tempo, entretanto quando comparamos os dois polímeros conseguimos observar uma pequena diferença entre eles, o NanoSilo apresentou mais resistência a liberação em meio tampão do que o NanoED, mas isso não quer dizer que foi liberado todo o fármaco que contem na nanoestrutura, desta forma o tempo de estudo nos limitou a enxergar até que momento a matriz liberaria todo o fármaco.

Figura 168. Perfil de liberação da zidovudina em solução tampão com pH 8,1.

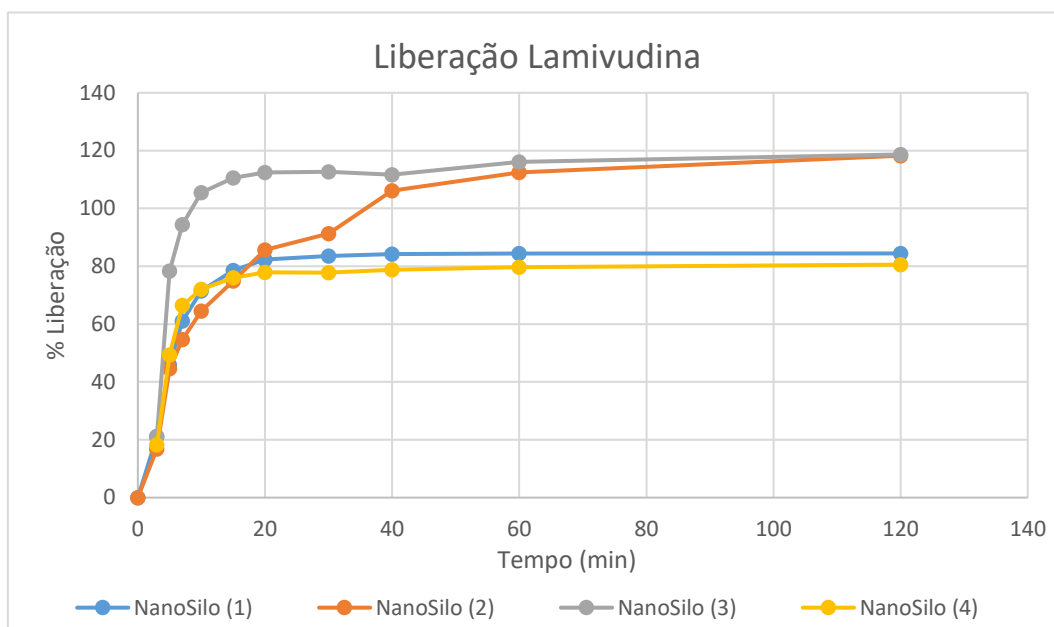
Desta mesma forma conseguimos observar na **Figura 179** o perfil de liberação em tampão ácido (HCL 0,1M) , onde se observa que existe diferença entre os encapsulados com o não encapsulado. Em relação aos nanoencapsulados podemos observar que o NanoED liberou um pouco a mais o fármaco em função do tempo do que o NanoSilo, isso relacionado ao estudo realizado através da eficiência de encapsulação nos demonstra que o polímero Silicone[®] é mais resistente aos meios do que o Eudragit[®], ou seja é necessário uma ruptura mecânica para o sua total quebra (partícula), mas isso também não significa que ao longo do tempo o mesmo pode continuar liberando, nesse caso é possível em trabalhos futuros um estudo a ser avaliado com tempo maior. Através desses resultados conseguimos direcionar o estudo da Lamivudina, com o polímero NanoSilo.

Figura 179. Perfil de liberação da zidovudina em solução HCl 0,1 M.



O ensaio realizado com a lamivudina apresentado na **Figura 20** demonstrou alguns resultados semelhantes, em relação a zidovudina. Nesse estudo avaliamos a mudança de pH no preparo da solução antes da secagem para avaliar seu comportamento durante a liberação. Desta forma podemos observar que a amostra preparada com pH mais alto (NanoSilo 1 pH 11,36 e NanoSilo 4 pH 11,36) consegue segurar melhor o fármaco independente do meio que esteja, ou seja, encapsular mudando o pH da solução para mais básico antes da secagem possibilita uma melhor segurança no controle da liberação do fármaco para o meio de interesse. Do mesmo modo permitindo uma encapsulação de maior concentração de fármaco. Além disso observamos que mesmo em meio tampão básico tivemos uma melhor contribuição para a liberação do fármaco em função do tempo. Como em comparativo das amostras (NanoSilo 2 pH 10,74 e NanoSilo 3 pH 10,74) apresentaram liberação semelhante nos meios estudados demonstrando a diferença entre a amostra com pH 10, e através desse resultado conseguimos concluir que a nanoencapsulação foi eficiente e tem diferença na mudança de pH do meio antes da secagem pelo *nanospray dryer*.

Figura 20. Perfil de liberação da Lamivudina em diferentes meios de pH. NanoSilo 1 (preparado em pH 11,36 e avaliado o perfil de liberação em tampão HCL0,1M); NanoSilo 2.(perarado em pH 10,74 e avaliado em perfil de liberação em tampão HCL 0,1M); NanoSilo 3 (preparado em pH 10,74 e avaliado em perfil de liberação em tampão 8,1) e NanoSilo 4 (preparado em pH 11,36 e avaliado em tampão 8,1).



6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível obter nanopartículas com fármacos antirretrovirais encapsulados, através da técnica de secagem empregando *NanoSpray Dryer B90*. Os resultados obtidos nos permitiram identificar as condições adequadas para realização do processo, desde tipo de polímero, concentração do polímero e viscosidade.

Foi possível obter taxas de encapsulação da ordem de 60 a 70%, o que se configura como valores adequados para desenvolvimento de medicamentos, conforme outras referências de literatura.

Os perfis de liberação dos ativos zidovudina e lamivudina encapsulados demonstraram que foi eficaz a nanoencapsulação dos fármacos através dos polímeros Silicone® e Eudragit®RS100, contudo o polímero Silicone® é mais indicado para o controle do processo de liberação para produtos gastrorresistentes. No entanto através do ensaio de citotoxicidade não foi possível avaliar se o mesmo possui alguma toxicidade, ainda que o Eudragit® RS100 tenha se mostrado seguro e eficaz.

Com as respostas desses estudos aconselha-se que a utilização desta tecnologia de encapsulação em *Nanospray Dryer* seja aplicável a outros fármacos em fase de estudos pré-clínicos, não exclusivamente para terapias anti-HIV, como para outros tipos de tratamentos que são usualmente utilizados e possuem grande dificuldade em evitar efeitos adversos e a adesão do paciente ao tratamento.

Para estudos futuros visando que a zidovudina ainda é o fármaco que mais precisa de estudos visando melhoria na sua toxicidade, é necessário avaliar o efeito terapêutico das nanopartículas aqui desenvolvidas, avaliando seu efeito citogenético, assim como dar continuidade no desenvolvimento farmacotécnico de medicações sólidas orais com foco na definição das dosagens a serem empregadas.

7 REFERENCIAS

- ABIA - Associação Brasileira Interdisciplinar de AIDS. Folhas informativas série C parte 1. Disponível em <http://www.abiaids.org.br/_img/media/Folha%20serie%20C01.pdf>. Acesso fev. /2014.
- ANEXO-III-Monografia-ZIDOVUDINA-.pdf., [s.d.].
- AZEVEDO, S. G. Desenvolvimento, caracterização e estabilidade de um sistema de nanopartículas bicamadas para liberação controlada do óleo essencial da *Piper nigrum*. 2021.
- BEI, D; MENG, J; YOUAN, BI-BOTTI C. Engineering nanomedicines for improved melanoma therapy: progress and promises. *Nanomedicine*. v 5, p. 1385-1399, 2010.
- BECK, R. C. R. *et al.* Validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação da lamivudina e zidovudina em comprimidos. *Quimica Nova*, v. 30, n. 5, p. 1225–1228, 2007.
- BIZERRA, A.; SILVA, V. Sistemas de liberação controlada: mecanismos e aplicações. *Revista Saúde e Meio Ambiente-RESMA*, n. 2, p. 1–12, 2016.
- CARVALHO, P. P. *et al.* Factors associated with antiretroviral therapy adherence in adults: An integrative review of literature. *Ciencia e Saude Coletiva*, v. 24, n. 7, p. 2543–2555, 2019.
- CERIZE, N. ET AL. Advanced Drug Delivery Systems in the Management of Cancer. *Advanced Drug Delivery Systems in the Management of Cancer*, 2021.
- CUNICO W.; GOMES, C. R. B.; JUNIOR, W. T. V. HIV - recentes avanços na pesquisa de fármacos. *Química Nova*, v.31, n.8, 2008.
- DE, A. caracterização térmica (tg / dtg, dta, dsc, dsc- foto visual) de hormônios bioidênticos (estriol e estradiol). ufrn, n. dissertação de mestrado, p. 104, 2013.
- Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Disponível em <<http://www.aids.gov.br/pt-br/publico-geral/hiv/tratamento>> acesso em Abril 2022.
- FELIPPE, Arlindo Cristiano. Complexos supramoleculares formados por associação do biossurfactante colato de sódio e do surfactante dodecil sulfato de sódio com o polímero neutro poli(óxido de etileno) e o

- polieletrólito poli(etilenoimina). Florianópolis, 2011. 156 p; Tese Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina.
- GALLETI, S. Introdução à microscopia eletrônica. *Biológico*, São Paulo, p. 33–35, 2003.
- KUMAR, P. N.; SWEET, D. E.; MCDOWELL, J. A.; SYMONDS, W.; LOU, Y.; HETHERINGTON, S., LAFON, S. Safety and pharmacokinetics of abacavir (1592U89) following oral administration of escalating single doses in human immunodeficiency virus type 1-infected adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 43, p. 603–608, 1999.
- LEE, S.-H.; HENG, D. N.G.; W. K.; HARK-CHAN, K.; TAN, R. B. H. Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 403, p.192-200, 2011.
- LETCHFORD, K; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.65, p. 259–269, 2007.
- LI, X.; ANTON, N.; ARPAGAUS, C.; BELLETEIX, F.; VANDAMME, T. F.; Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *Journal of Controlled Release*, v.147, p. 304-310, 2010.
- LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 2, p. 143–154, 2005.
- MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C. C.; CINTO P. O.; CHAUD, M. V.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Liposomes and micro/nanoparticles as colloidal carriers for nasal drug delivery. *Current Drug Delivery*, v. 3, p. 275-285, 2006.
- MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C. C.; CINTO, P. O.; KHALIL, N. M.; CHAUD, M. V.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Colloidal carriers for ophthalmic drug delivery. *Current Drug Targets*, v. 6, n. 2, p. , 2005.
- Microscopia e Microanálise. Disponível em <<https://sites.google.com/a/unifei.net/emt/pratica#TOC-Solu-o-de-problemas:-efeito-de-borda-carregamento-danos-amostra>>. Acesso em fev./2021.

- NARISHETTY, S. T. K.; PANCHAGNULA, R. Transdermal delivery system for zidovudine: in vitro, ex vivo and in vivo evaluation. *Biopharm. Drug Disposition*, v. 25, p. 9–20, 2004.
- NOMURA, D. A.; Enoki, Thais A; Goldman, Carla; Lamy, M. Teresa . Espalhamento dinâmico de luz. Apostila para a 2a Escola de Colóides da USP, p. 1–18, 2014.
- OH, S. Y.; JEONG, S. Y.; PARK, T. G.; LEE, J. H. Enhanced transdermal delivery of AZT (zidovudine) using iontophoresis and penetration enhancer. *Journal of Controlled Release*, v.51, p.161-168, 1998.
- OLIVEIRA, A. M. *et al.* Nano Spray Drying as an Innovative Technology for Encapsulating Hydrophilic Active Pharmaceutical Ingredients (API). *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, v. 4, n. 6, 2013.
- OJEWOLE, E.; MACKRAJ, I.; NAIDOOA, P.; GOVENDER, T. Exploring the use of novel drug delivery systems for antiretroviral drugs. *European. Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.*, 2008. DOI 10.1016/j.ejpb.2008.06.020
- ONEDA, F.; RE, M. I. The effect of formulation variables on the dissolution and physical properties of spray-dried microspheres containing organic salts. *Powder Technology*, v. 130, n. 1–3, p. 377–384, 2003.
- PEREIRA, T. M. Avaliação da solubilidade e da permeabilidade intestinal de fármacos antirretrovirais. *Aplicações na Classificação Biofarmacêutica*. p. 151, 2011.
- PINTO NETO, L. F. DA S. *et al.* Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: infecção pelo HIV em adolescentes e adultos. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 30, n. spe1, p. 1–16, 2021.
- PIMENTEL, L. F.; TAVARES, A. J. J.; FURTADO, V. V. M.; SANTOS, N. S. M. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, p. 1-14, 2007.
- PROMISSORAS, T. NANOTECNOLOGIA APLICADA A NANOFÁRMACOS: VANTAGENS, DESAFIOS E. p. 1–17, 2022.
- RÉ, M. I. Microencapsulação em busca de produtos inteligentes. *Ciência Hoje*, v. 27, p. 24-29, 2000.
- RE, M. I. Formulating drug Delivery by spray drying. *Drying Technology*, v. 24, p. 433-446, 2006.

- SEGAT, G. C. Avaliação Da Atividade Citotóxica E Antitumoral De Acetohidroxamatos Sintéticos Em Modelos in Vitro E in Vivo. p. 117, 2017.
- SEM, A. Z. T. A. B. C. Classe Anti-retroviral. Folhas Informtivas, 2003.
- SOUZA, J. DE; STORPIRTIS, S. Atividade anti-retroviral e propriedades farmacocinéticas da associação entre lamivudina e zidovudina. Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 40, n. 1, p. 9–19, 2004.
- THOMAS, N. S.; PANCHAGNULA, R. Transdermal delivery of zidovudine: effect of vehicles on permeation across rat skin and their mechanism of action. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 18, p. 71-79, 2003.
- UNIAIDS. Disponível em <<http://www.unaids.org.br/>>. Acesso em jan./2014.
- UNIAIDS. Estatísticas. Disponível em <<https://unaids.org.br/estatisticas/>>. Acesso em nov. /2020.
- Virus de Animais e Humanos. Disponível em< <https://pt.khanacademy.org/science/biology/biology-of-viruses/virus-biology/a/animal-viruses-hiv> > Acesso em Out/2021.
- YOUAN, Bi-Botti. Celestin, Impact of nanoscience and nanotechnology on controlled drug delivery. Nanomedicine, v. 3, n. 4, p. 401-406, 2008.