

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Controle da liberação do éster etílico de indometacina a partir de nanocápsulas poliméricas através da variação da concentração do monoestearato de sorbitano.

ELIÉZER JÄGER

PORTO ALEGRE, 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Controle da liberação do éster etílico de indometacina a partir de nanocápsulas poliméricas através da variação da concentração do monoestearato de sorbitano

Dissertação apresentada por **Eliézer Jäger**
para obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Raffin Pohlmann

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 21.05.08, pela Comissão Examinadora formada por:

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Vanessa Carla Furtado Mosqueira

Universidade Federal de Ouro Preto

J24c	Jäger, Eliézer Controle da liberação do éster etílico de indometacina a partir de nanocápsulas poliméricas através da variação da concentração do monoésterato de sorbitano / Eliézer Jäger – Porto Alegre : UFRGS, 2008. – xvi, 113 p. : il. Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. 1. Nanocápsulas poliméricas. 2. Monoestearato de sorbitano. 3. Éster etílico de indometacina. 4. Turbidimetria. 5. Gradiente de densidade. 6. Permeabilidade relativa. I. Pohlmann, Adriana Raffin. II. Título. CDU: 615.4
------	---

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB10/480

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório K 204 do Instituto de Química da UFRGS e no laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da UFRGS, na cidade de Porto Alegre, com bolsa de estudos da Coordenação de Ensino do Nível Superior e com financiamento do CNPq/MCT.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Adriana R. Pohlmann, primeiramente pela oportunidade concedida e pela confiança em mim depositada nos 4 anos de convivência. Também por sua orientação dedicada, pelos conhecimentos compartilhados e pelo exemplo pessoal e profissional e principalmente pela paciência comigo e com a minha dissertação.

À Prof^a. Dr^a. Sílvia S. Guterres pelos valiosos auxílios e pela atenção dispensada ao longo deste trabalho. Também agradeço pelas análises de diâmetro de partículas polidispersão e potencial zeta.

À Prof^a. Dr^a. Ana M. O. Battastini pelos auxílios e pela atenção dispensada e pelas discussões ao longo dos estudos de gradiente de densidade e pela uso da ultracentrifuga.

A doutoranda Letícia M. Colomé pelo auxílio durante a validação do método analítico e durante as hidrólises.

A doutoranda Andressa Bernardi pela total abdicação de seu trabalho durante o auxílio a mim prestado nos estudos de densidade.

A doutoranda Cristina de Garcia Venturini pela dedicação e principalmente a atenção reservada a mim para a execução deste trabalho e por ter me aturado durante os longos experimentos.

A doutoranda Fernanda S. Poletto pela colaboração, dedicação e principalmente pelas discussões científicas.

Aos colegas do laboratório 405: Scheila, Lali, Leandro, Moacir, Sandra, Letícia Cruz, Letícia Sias, Bibiana, Vitória, Clarissa, Rodrigo Freddo, Luana, Francine, Evelise, Franceline, Irene, Denise, Thatiana, Manuela, Cristiane, Ângelo, Ludmila, Renata Raffin, Renata Contri, Karina, Nataly, Cândice, Bruna. Agradeço pelas colaborações, pela amizade e pelo carinho de todos.

Aos colegas do laboratório K204: Fabiano, Leandra, Pierre, Fábio, Umberto, Renata, Marcelo, Guilherme, Monique, Gisele, Nalva e Rosane. Agradeço pela amizade e bons momentos de descontração.

Aos meus pais, Eldo e Alzira, pela formação que me propiciaram e por todas as oportunidades que me concederam.

Ao meu irmão e colega Alessandro pela amizade e discussões científicas.

A Alessandra pela motivação constante, pelo apoio incondicional e pela compreensão nos momentos de dificuldade, e também pelas noites passadas comigo durante as hidrólises. E a sua Família por terem me acolhido.

À CAPES, órgão financiador da bolsa de estudos. À Rede Nanocosméticos CNPq/MCT pelo apoio financeiro concedido ao longo deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	03
2 OBJETIVOS	07
2.1 Objetivo geral	07
2.2 Objetivos específicos	07
3 REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1 Nanopartículas.....	11
3.1.1 Definições.....	11
3.1.2 Características das suspensões de nanocápsulas poliméricas.....	16
3.2 Liberação de fármacos a partir de nanocápsulas.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Materiais	35
4.1.1 Matérias-primas	35
4.1.2 Aparelhos e equipamentos	35
4.1.3 Solventes, reagentes e outros materiais	37
4.2 Métodos	37
4.2.1 Preparação do éster etílico e indometacina.....	37
4.2.2 Procedimento analítico.....	38
4.2.3 Preparação das suspensões.....	38
4.2.4 Caracterização físico-química das suspensões.....	39
4.2.5 Reação de hidrólise.....	39
4.2.6 Modelagem Matemática.....	40
4.2.7 Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	41
4.2.8 Análises de espalhamento múltiplo.....	41
4.2.9 Turbidimetria.....	42
4.2.10 Determinação da área superficial.....	43
4.2.11 Estudos de densidade.....	43
4.2.12 Determinação da massa das nanopartículas.....	44
4.2.13 Medidas de Viscosidade.....	45
4.2.14 Fluxo e permeabilidade.....	45
4.2.15 Análise estatística.....	46
4.2.16 Descarte dos resíduos.....	46

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas.....	49
5.1.1 pH, diâmetro de partícula, polidispersão e potencial zeta.....	49
5.1.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	50
5.1.3 Estudos de estabilidade.....	51
5.2 Influencia da variação da concentração de monoestearato de sorbitano no perfil de consumo do éster etílico de indometacina.....	55
5.2.1 Perfis de consumo do éster etílico de indometacina a partir das diferentes suspensões de nanocápsulas.....	55
5.2.2 Cinética de consumo do éster etílico de indometacina reação de hidrólise interfacial.....	56
5.2.3 Determinação do mecanismo de liberação do éster etílico de indometacina.....	59
5.3 Turbidimetria.....	63
5.4 Determinação da área superficial.....	66
5.5 Permeabilidade relativa e fluxo.....	68
5.6 Estudos de densidade.....	70
5.7 Preparação de uma suspensão otimizada.....	84
6 CONCLUSÕES	89
7 REFERÊNCIAS	93
8 ANEXOS	103

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Modelos de mecanismo de associação do fármaco
- Figura 2** Principais métodos de preparação de nanopartículas
- Figura 3** Distribuição de intensidade, volume e número das suspensões IC a VC
- Figura 4** Fotomicrografias das nanocápsulas por MET
- Figura 5** Dados de BS da suspensão IC
- Figura 6** Dados de BS das suspensão IIC
- Figura 7** Dados de BS das suspensão IIIC
- Figura 8** Dados de BS das suspensão IVC
- Figura 9** Dados de BS das suspensão VC
- Figura 10** Diâmetros e polidispersões em função do tempo
- Figura 11** Consumo do éster etílico de indometacina a partir das nanocápsulas IC a VC
- Figura 12** Correlação entre tempo de meia-vida *versus* concentração do monoestearato de sorbitano
- Figura 13** Diâmetro efetivo durante hidrólise da suspensão IC
- Figura 14** Diâmetro efetivo durante hidrólise da suspensão IIC
- Figura 15** Diâmetro efetivo durante hidrólise da suspensão IIIC
- Figura 16** Diâmetro efetivo durante hidrólise da suspensão IVC
- Figura 17** Diâmetro efetivo durante hidrólise da suspensão VC
- Figura 18** Correlação entre concentração de monoestearato de sorbitano *versus* número de partículas
- Figura 19** Correlação entre número de partículas *versus* tempo de meia-vida
- Figura 20** Correlação entre permeabilidade *versus* tempo de meia-vida
- Figura 21** Ultracentrifugação de nanoemulsão, nanoesferas e nanocápsulas
- Figura 22** Ultracentrifugação da nanodispersão
- Figura 23** Ultracentrifugação das suspensões IC a VC
- Figura 24** Distribuição do diâmetro de partículas do Percoll
- Figura 26** Alíquotas retiradas das nanoesferas para determinação do diâmetro das bandas
- Figura 27** Alíquotas retiradas das nanocápsulas para determinação do diâmetro das bandas

- Figura 28** Alíquotas retiradas da nanodispersão para determinação do diâmetro das bandas
- Figura 29** Alíquotas retiradas da suspensão IC para determinação do diâmetro das bandas
- Figura 30** Alíquotas retiradas da da suspensão IIC para determinação do diâmetro das bandas
- Figura 31** Alíquotas retiradas da da suspensão IIIC para determinação do diâmetro das bandas
- Figura 32** Alíquotas retiradas da da suspensão IVC para determinação do diâmetro das bandas
- Figura 33** Alíquotas retiradas da da suspensão VC para determinação do diâmetro das bandas
- Figura 34** Distribuição de intensidade, volume e número da suspensão de NC-otimizada
- Figura 35** Ultracentrifugação da NC-otimizada
- Figura 36** Dados de BS das suspensão NC-otimizada
- Figura 37** Alíquotas retiradas da da suspensão NC-otimizada para determinação do diâmetro das bandas

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Quantidades unificadas dos componentes utilizados para a preparação de nanocápsulas poliméricas
- Tabela 2** Quantidade de monoesterato de sorbitano usada nas formulações
- Tabela 3** Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas
- Tabela 4** Constantes cinéticas de consumo do éster etílico de indometacina
- Tabela 5** Tempos de meia-vida de consumo do éster etílico de indometacina
- Tabela 6** Parâmetros da modelagem matemática das suspensões IC a VC
- Tabela 7** Diâmetro, α , K, N.W e número de partículas das suspensões IC a VC
- Tabela 8** Diâmetro, número de partículas e área superficial
- Tabela 9** Parâmetros da determinação do fluxo steady-state das suspensões
- Tabela 10** Permeabilidade aparente para as suspensões IC a VC
- Tabela 11** Suspensões coloidais, suas composições e suas características
- Tabela 12** Determinação do diâmetro médio e polidispersão das nanopartículas preparadas sem éster etílico de indometacina
- Tabela 13** Composição da suspensão NC-otimizada
- Tabela 14** Características físico-químicas da suspensão NC-otimizada
- Tabela 15** Número de partículas e área superficial das suspensão NC-otimizada

RESUMO

O trabalho tem como objetivo determinar a influencia da concentração de monoestearato de sorbitano, componente do núcleo oleoso das nanocápsulas, na cinética de liberação do éster etílico de indometacina a partir de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL). Com este propósito o éster etílico de indometacina foi associado a cada sistema e sua hidrólise alcalina foi realizada para simular uma condição *sink*. A velocidade de consumo do éster etílico de indometacina foi menor conforme o aumento da concentração do monoestearato de sorbitano. O tempo de meia-vida do consumo do éster etílico de indometacina associado as nanocápsulas foi relacionado com a concentração do monoestearato de sorbitano, sendo maior, enquanto maior a concentração do monoestearato. O mecanismo de liberação foi determinado como sendo transporte anômalo. Foi observada uma relação linear direta entre o aumento da concentração do monoestearato de sorbitano e a concentração de partículas nas suspensões de nanocápsulas ($R^2=0,9711$). Mistura de outras nanopartículas que não as nanocápsulas, foram observadas e caracterizadas. O fluxo difusional do éster a partir das nanocápsulas foi determinado e diminuiu significativamente com o aumento da concentração do monoestearato, devido a mudanças na viscosidade do núcleo das nanocápsulas com o aumento da concentração do monoestearato de sorbitano. Por fim, os resultados demonstraram que o principal fator que contribui para o retardo no tempo para o consumo do éster etílico de indometacina é a relação direta entre a concentração do monoestearato de sorbitano e a permeabilidade das nanocápsulas ($R=0,9894$).

Palavras-chave: nanocápsulas poliméricas, monoestearato de sorbitano, éster etílico de indometacina, hidrólise alcalina, turbidimetria, gradiente de densidade, permeabilidade relativa

ABSTRACT

Controlled release of indomethacin ethyl ester from polymeric nanocapsules with the variation of the concentration of sorbitan monostearate.

The aim of this work was to evaluate the influence of the sorbitan monoestearate concentration, one of the components of the oil core of the nanocapsules, in the release kinetic of the indomethacin ethyl ester-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules. In this way, the indomethacin ethyl ester was entrapped within each system and its alkaline hydrolysis was carried out to simulate a *sink* condition. The rate for the indomethacin ethyl ester consumption decreased with the increase in sorbitan monostearate concentrations. The indomethacin ethyl ester half-life was related to the sorbitan monostearate concentration, increasing as the sorbitan monostearate concentration increased. The drug release mechanism was determined as anomalous transport. Linear correlations were obtained between the increase in the sorbitan monostearate concentration and the particles concentration in the suspensions ($R^2 = 0.9711$). Mixture of different nanoparticles that are not nanocapsules were observed by density gradient and characterized. The indomethacin ethyl ester fluxes from the nanocapsules were determined and presented a decrease of the flux as the sorbitan monostearate concentration increased. This result was related to changes in the oil core viscosity caused by the variation of the sorbitan monostearate concentration. Finally, the results demonstrated that the main factor that contributes for the delaying in the time for the indomethacin ethyl ester consumption was the direct relation between the sorbitan monostearate concentration and the apparent permeability of the nanocapsules ($R^2 = 0.9894$).

Key-words: polymeric nanocapsules, sorbitan monostearate, indomethacin ethyl ester, alkaline hydrolysis, turbidimetry, density gradient, apparent permeability.

INTRODUÇÃO

Nanopartículas poliméricas têm atraído grande atenção no campo das ciências farmacêuticas por oferecerem um apropriado sistema para a liberação de vários agentes terapêuticos no local desejado ou tecido de interesse (BARRAT, 2000). Essas nanopartículas podem ser preparadas em uma gama de tamanhos, a partir de polímeros biodegradáveis. Dependendo do método de preparação, a substância ativa poderá estar adsorvida, encapsulada, dissolvida ou retida nas partículas (SOPPIMATH e col., 2001; MU e col., 2004). O termo nanopartículas engloba nanoesferas e nanocápsulas que podem ser matrizes poliméricas ou vesículas, respectivamente (MAGENHEIM e BENITA, 1991). Nos últimos quinze anos, diversas formulações de nanopartículas em suspensão aquosa têm sido utilizadas em estudos fundamentais e aplicados, que procuram investigar a potencialidade de sua utilização como carreadores de diferentes substâncias biologicamente ativas. Pela capacidade de carrear fármacos lipofílicos (GUTERRES e col., 1995a; SCHAFFAZICK e col., 2003; LOSA e col., 1993) ou hidrofílicos (ABOUBAKAR e col., 1999), as nanopartículas têm sido estudadas para controlar a liberação de fármacos (SOPPIMATH e col., 2001), para reduzir efeitos adversos (MU e col., 2004; GUTERRES e col., 1995b), para proteger o fármaco da inativação antes de alcançar o local de ação (VAUTHIER e col., 2003) ou ainda aumentar a sua penetração intracelular (JIMÉNEZ e col., 2004) aumentando a sua atividade (SCHAFFAZICK e col., 2006).

A composição quali-quantitativa dos sistemas, como a natureza e concentração do polímero, do tensoativo, do núcleo oleoso podem influenciar a cinética de liberação da substância ativa ou a sua ação *in vivo* (MU e col., 2004). Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que o comportamento físico-químico de nanoesferas, nanocápsulas e nanoemulsão é diferente (SOARES, 2003; POHLMANN e col., 2004; CRUZ e col., 2006a) e, ainda, que a variação da concentração do polímero nas nanocápsulas influenciou os perfis de liberação do éster etílico de indometacina a partir desses sistemas (CRUZ e col., 2006b). O éster etílico de indometacina é um modelo adequado, pois sua hidrólise alcalina pode ser empregada como ferramenta para a simulação de uma condição “sink” de liberação, pois a reação é interfacial e produz produtos ionizáveis, solúveis no meio de reação (SOARES, 2003).

O comportamento *in vivo* das nanocápsulas está relacionado com suas características físico-químicas e o perfil de liberação do fármaco a partir deste sistema é influenciado pela sua localização na nanoestrutura. Desta forma, podem ser observados diferentes comportamentos cinéticos para um fármaco dissolvido no núcleo oleoso de uma nanocápsula ou simplesmente retido ou adsorvido em sua parede polimérica (SCHAFFAZICK e col., 2003; SOARES, 2003). Além disso, a parede polimérica que constitui as nanocápsulas também pode influenciar no perfil de liberação, uma vez que processos de difusão do fármaco através da parede polimérica e/ou erosão do polímero podem estar envolvidos (SCHAFFAZICK e col., 2003; CRUZ e col., 2006b; POLETTO e col., 2008).

Desta forma, o presente estudo será dedicado à avaliação da influência da concentração do monoestearato de sorbitano nos perfis de liberação do éster etílico de indometacina a partir de nanocápsulas. Os estudos anteriores (MULLER e col., 2001, CRUZ e col., 2006a) mostraram que o monoestearato de sorbitano está localizado no núcleo das nanocápsulas, disperso no triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico. Desta forma, a variação da concentração do monoestearato de sorbitano na formulação poderia influenciar a difusão do éster de indometacina do núcleo para a interface partícula água, permitindo o controle e modulação do perfil de liberação do éster a partir das nanocápsulas.

2.1 Objetivo geral

O presente projeto tem como objetivo determinar a influencia da concentração de monoestearato de sorbitano na cinética de liberação do éster etílico de indometacina a partir de nanocápsulas preparadas com poli(ϵ -caprolactona) (PCL).

2.2 Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar suspensões de nanocápsulas contendo o éster etílico de indometacina, empregando diferentes concentrações de monoestearato de sorbitano através do método de deposição interfacial;
- Determinar a velocidade de consumo do éster etílico de indometacina frente a sua reação de hidrólise e determinar os tempos de meia-vida da liberação;
- Determinar o mecanismo de liberação através da modelagem matemática dos dados experimentais;
- Determinar a concentração de partículas de cada suspensão por turbidimetria para calcular a área superficial das nanocápsulas;
- Determinar a permeabilidade relativa do éster de indometacina empregando modelos matemáticos baseados na 1^o Lei de Fick;
- Determinar a composição qualitativa dos coloides após variação da concentração de monoestearato de sorbitano através de gradiente de densidade por ultracentrifugação;
- Obter uma formulação otimizada em nanocápsulas após análise da variação da concentração do monoesterato e avaliação da estabilidade relativa desta suspensão por retroespalhamento no Turbiscan.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Nanopartículas

3.1.1 Definições

Nos últimos anos um considerável interesse tem sido dado aos materiais biodegradáveis nanoestruturados para aplicações nas diversas áreas biomédicas, não somente como carreadores de fármacos, mas também como biossensores, biomarcadores e imagens moleculares (SAHOO e col., 2003; EMERICH e THANOS, 2006). Nas áreas farmacêuticas de liberação de fármacos, os principais objetivos dos estudos com carreadores concentram-se em aumentar o controle da liberação, a especificidade e a seletividade ao local de ação do fármaco, bem como a diminuição da dose e de seus efeitos colaterais (BARRAT e col., 2000; COUVREUR e col., 2002).

Os sistemas carreadores nanoestruturados apresentam dimensões situadas entre 10 e 1000 nm e diferem entre si de acordo com a composição qualitativa e organização em nível molecular (COUVREUR e col., 2002). As Nanocápsulas são carreadores de fármacos formados por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo lipofílico, podendo o fármaco estar disperso ou dissolvido no núcleo lipofílico e/ou adsorvido a parede polimérica (Figura 1). As nanoesferas, por sua vez, não possuem óleo em sua composição, estando o fármaco retido e/ou adsorvido a matriz polimérica (Figura 1), já as nanoemulsões, são emulsões submicrométricas, nas quais uma dispersão líquido-líquido é estabilizada por agregados de tensoativo (GUTERRES e col., 2007).

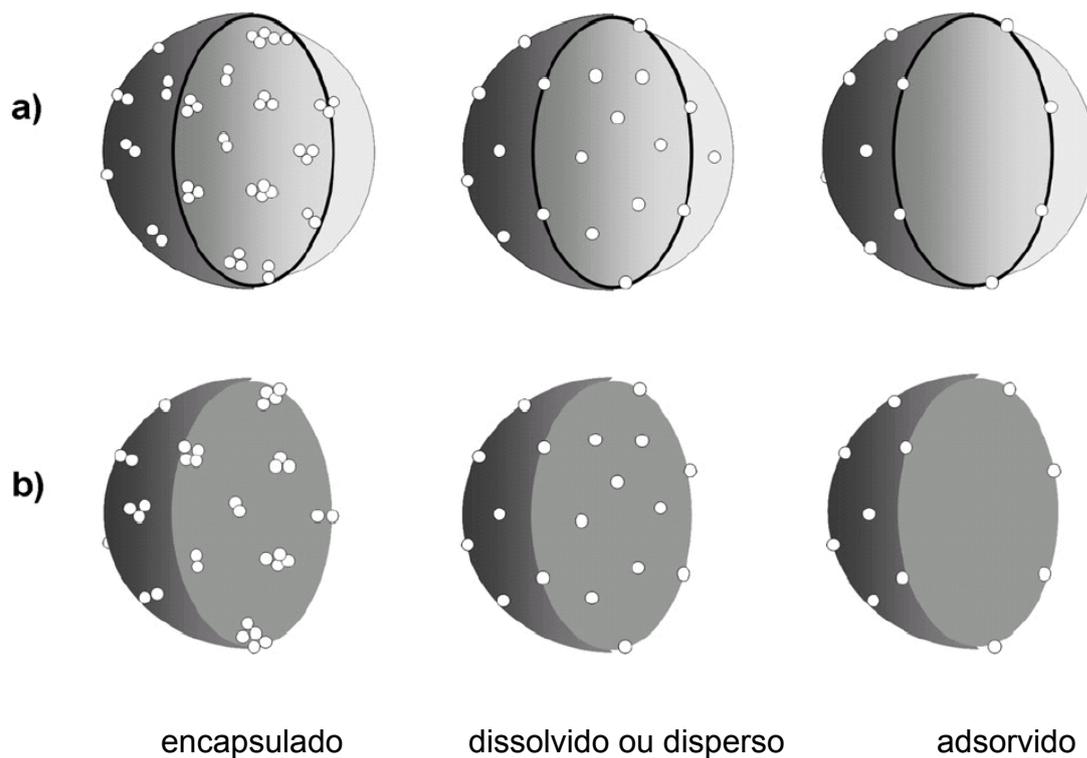


Figura 1. Modelos de mecanismo de encapsulação: fármaco encapsulado em, dissolvido ou disperso dentro, e adsorvido as: **a)** nanocápsulas e **b)** nanoesferas. (GUTERRES e col., 2007)

As vantagens dos sistemas nanoestruturados, por terem um reduzido tamanho, permitem a distribuição diferenciada do fármaco, aumentando suas concentrações no local de ação. As vantagens também estão relacionadas a uma maior biodisponibilidade oral e a possibilidade de serem administrados pela via parenteral (LAVELLE e col., 1995; SAHOO e col., 2003), prevenindo a degradação gastrintestinal dos fármacos.

As nanopartículas poliméricas podem ser preparadas a partir de inúmeros métodos desenvolvidos nos últimos 30 anos (SOPPIMATH e col., 2001; FATTAL e VAUTHIER, 2002; PINTO REIS e col., 2006). De uma forma geral, esses métodos podem ser classificados em duas categorias principais, levando-se em consideração se a formação das nanopartículas requer uma reação de polimerização (polimerização *in situ*) ou se estas são formadas diretamente utilizando-se um polímero pré-formado (COUVREUR e col., 1995; COUVREUR e col., 2002; SCHAFFAZICK e col., 2003; SOPPIMATH e col., 2001; PINTO REIS e col., 2006).

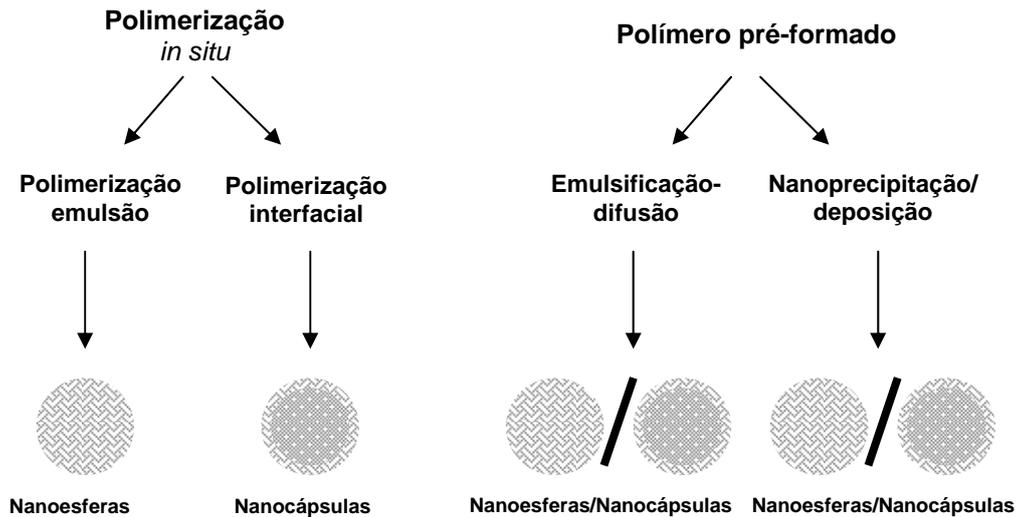


Figura 2. Representação esquemática dos principais métodos de preparação de nanopartículas poliméricas.

A Figura 2 apresenta resumidamente os principais métodos de preparação de nanopartículas utilizados (COUVREUR e col., 1995; COUVREUR e col., 2002; SCHAFFAZICK e col., 2003; SOPPIMATH e col., 2001; MOINARD-CHECOT e col., 2006; QUINTANAR-GUERRERO e col., 1998; FATTAL e VAUTHIER, 2002). Independente do método de preparação os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas (FATTAL e VAUTHIER, 2002; SCHAFFAZICK e col., 2003).

Tabela 1. Quantidades unificadas dos componentes utilizados para a preparação de nanocápsulas poliméricas.

Método	Polímero	Óleo	Tensoativo	d (g.cm ⁻³)	Diferentes estruturas	Solvente	Referência
Emulsificação-difusão	PLA, 0,1-3% (m/v)	Mygliol 812, Óleo Mineral 2,5% (v/v)	PVA 26000 5% (m/v) 40mL	ND	Não observadas, provavelmente NE em de NC de baixa concentração de PLA	20 mL Acetato de Etila	QUINTANAR-GUERRERO e col., (1998)
Polimerização interfacial	IBCA e IHCA 0,5 % (v/v)	Miglyol 829 1,5 % (v/v)	Poloxamer 188, 238, 407 0,25% (m/v) 10 mL	1,63 NS 1,018 -1,033 NC	Ausência de NS em preparação de NC.	Etanol (2 mL)	CHOUINARD e col., (1994)
Polimerização interfacial	IBCA 0,2-0,6% (v/v)	Mygliol 812 2% (v/v)	Poloxamer 188 0,25 % (m/v) 50 mL	ND	Ausencia de NS em preparação de NC	25 mL Etanol	ROLLOT e col., 1986
Deposição interfacial	PLA 9, 16, 42, 91, 109, 251 kDa 0,6% (m/v)	Miglyol 810, 812, 829, 840, Oleato de Etila, Óleo de Soja, óleo mineral, dodecanol 2,5% (m/v)	Poloxamer 188 0-0,75% (m/v) Span 80 0,5% (v/v) 20 mL ----- Epikuron (170 e 200), fosfatidilco-lina de soja, fosfolipon 90, dimiristoil- fosfatidilcolina 0-0,75% (m/v) 10 mL	NC entre 1,015 e 1,052 NS 1,102 e 1,119 Lipossomas entre 1,018 e 1,035 NE menor que 1,018	Lipossomas (devido a lecitina) NS NE	Acetona (2+8 mL)	MOSQUEIRA e col., (2000)
Polimerização interfacial	IBCA 0,5 % (v/v)	Miglyol 812 4% (v/v)	Poloxamer 188 0,25% (m/v) 50 mL	ND	NS	Etanol (25 mL)	COURNARIE e col., (2004)
Polimerização interfacial	IBCA e IHCA 0,5 a 2,0% (v/v)	Miglyol 810, 829 0,5 a 8% (v/v)	Poloxamer 407 0,031 a 0,5% (m/v) 10 mL	1,01	Ausencia de NS em preparação de NC.	Etanol (5 mL)	CHOUINARD e col., (1991)
Deposição interfacial	PCL 0,19-0,56% (m/v)	Miglyol 810 0,6-1,8% (v/v)	Span 60 0,14-0,43% (m/v) 133,5 mL ----- Tween 80 0,07-0,21% (m/v) 266,5mL	ND	Diferentes nanoestruturas	Acetona (133,5mL)	RAFFIN e col., (2003)
Deposição interfacial	PLA 0,25% (m/v)	Benzoato de benzila 2% (v/v)	Fosfolipideos 1% (m/v) 25 mL ----- Poloxamer 188 1% (m/v) 50 mL	ND	Lipossomas	Acetona (25mL)	AMMOURY e col., (1993)
Polimerização interfacial	IBCA 0,1-1% (v/v)	Miglyol 812 0,5- 3% (v/v)	Poloxamer 188 0,25% (m/v) 25 mL	ND	Nanoesferas	Etanol (10 mL)	VALERO e col., (1996)
Polimerização em miniemulsão	Poli(acrilato de butila)	Hexadecanol 3-7% (v/v)	Dodecil sulfato de sodio 0,1 – 2 % (m/v) 40 mL	ND	micelas	Metanol (7mL)	VAN ZYL e col., 2004

Dentre estas técnicas de preparação de nanopartículas poliméricas destaca-se a técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado seguida da evaporação do solvente proposta por FESSI e colaboradores (1988), considerado um método simples, baseado na precipitação de polímeros, evitando a presença de monômeros residuais na formulação obtida. Os princípios gerais da preparação de nanopartículas por nanoprecipitação são baseados na indução de uma separação de fases pela adição da solução de polímero em um não solvente para o mesmo (FESSI e col., 1986). Para a formação da dispersão coloidal das partículas de polímero e a indução da separação de fases é utilizado um sistema solvente/não-solvente totalmente miscíveis. Desta forma, as partículas formam-se espontaneamente e praticamente instantaneamente. Este método é conhecido como nanoprecipitação para a obtenção de nanoesferas e como deposição interfacial para a preparação de nanocápsulas. No processo, o polímero, o fármaco e opcionalmente um tensoativo lipofílico (por ex., fosfolípidos) são dissolvidos em um solvente semi-polar solúvel em água, como acetona ou etanol. Esta solução é vertida ou injetada em uma solução aquosa contendo um tensoativo (PVA, poloxamers ou polissorbato, entre outros) sob agitação magnética. As nanopartículas são formadas instantaneamente pela rápida difusão do solvente, o qual é então eliminado da suspensão sob pressão reduzida. O mecanismo de formação das nanopartículas por esta técnica é ainda pouco compreendido, teorias têm sido propostas mas a mais elaborada até o momento seria a baseada no processo clássico de crescimento e nucleação (VITALE e KATZ, 2003; GANACHAUD e KATZ, 2005). Para a formação de nanocápsulas (FESSI e col., 1989), a solução de polímero é vertida na fase aquosa, o óleo (mistura de triacilgliceróis de cadeia média) está disperso em finas gotículas na mistura solvente não solvente e o polímero deposita-se ao redor da gotícula formada. As nanocápsulas podem ser de grande utilidade para o encapsulamento de fármacos lipossolúveis (SCHAFFAZICK e col., 2003). Neste caso, os fármacos encontram-se geralmente dissolvidos na fase interna oleosa ou adsorvidos ao polímero (COUVREUR e col., 2002). Estes métodos têm sido aplicados a vários polímeros como PLA (NÉMATI e col., 1996), PLGA (BARICHELLO e col., 1999), PCL (MOLPECERES e col., 1996), poli(metacrilato de metila) (PMMA) (JAGER e col., 2007) dentre outros. Exemplos de fármacos empregados são a indometacina (AMMOURY e col., 1990; Cruz e col., 2006b), ciclosporina A (MOLPECERES e col.,

1996), vancomicina (BARICHELLO e col., 1999), doxorubicina (NÉMATI e col., 1996), taxol (FESSI e col., 1989), dentre outros.

A evolução dos métodos de preparação são marcados pela necessidade da utilização de solventes menos tóxicos, pela simplificação das etapas de preparação para permitir o escalonamento e a otimização dos parâmetros experimentais para melhorar o rendimento e a eficiência de encapsulamento (FATTAL e VAUTHIER, 2002; PINTO REIS e col., 2006).

3.1.2 Características das suspensões de nanocápsulas poliméricas

De um modo geral as nanopartículas obtidas através dos diferentes métodos, após a preparação, apresentam uma distribuição de tamanho de partículas unimodal com um baixo índice de polidispersão (CHOUINARD e col., 1994; SOPPIMATH e col., 2001; SCHAFFAZICK e col., 2003; MOINARD-CHECOT e col., 2006; POLETTO e col., 2008). As nanopartículas são obtidas como suspensões coloidais aquosas com faixas de distribuição de tamanho estreitas. Dificuldades podem ser encontradas para a caracterização físico-química destas partículas devido a sua natureza coloidal (COUVREUR e col., 2002; SCHAFFAZICK e col., 2003). A caracterização das suspensões engloba a avaliação morfológica, a distribuição do tamanho de partícula, a distribuição de massa molar do polímero, a determinação do potencial zeta e do pH, a determinação do teor e taxa de encapsulamento do fármaco, a cinética de liberação do fármaco, a avaliação da estabilidade em função do tempo e, ainda, a avaliação do tipo de sistema nanoparticulado (MAGENHEIM e BENITA, 1991; CHOUINARD e col., 1991; AMMOURY e col., 1993; LOSA e col., 1993; MOSQUEIRA e col., 2000; SOPPIMATH e col., 2001; SCHAFFAZICK e col., 2003). A tabela 1 lista a quantidade unificada dos componentes utilizados para a preparação de nanocápsulas poliméricas e as diferentes estruturas observadas na preparação das suspensões descritas anteriormente.

ROLLOT e colaboradores (1986) prepararam nanocápsulas pelo método de polimerização interfacial utilizando diferentes quantidades do monômero

cianoacrilato de *iso*-butila (50, 75, 100, 125 ou 150 μL), Miglyol 812 (0,5 mL), como núcleo oleoso, e uma solução de poloxamer 188 (0,25% p/p). Os autores observaram uma redução significativa no tamanho médio de partículas e na polidispersão com o aumento da concentração do monômero. Estas observações demonstraram que a adição do monômero na emulsão óleo em água, reduz a energia interfacial livre do sistema, provavelmente pela existência de um filme polimérico na interface. Isto é consistente com a hipótese de uma estrutura capsular formada de um envelope polimérico circundando o núcleo oleoso. Os autores realizaram ultracentrifugação (78.600 x g) para determinar a presença simultânea de nanocápsulas e de nanoesferas nas suspensões. Uma vez que as nanocápsulas contêm núcleo oleoso, sua densidade deveria ser próxima da do óleo utilizado no experimento (0,94 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Por outro lado, as nanoesferas, sendo matriciais, deveriam apresentar densidade próxima ao do polímero (1.01 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Após ultracentrifugação (78.600 x g) por 2 h foi possível distinguir o comportamento de nanocápsulas e de nanoesferas. Enquanto as nanoesferas formaram um depósito no fundo do tubo, as nanocápsulas permaneceram na superfície do tubo, similarmente à emulsão pura. Pela inexistência de depósito no fundo do tubo de ultracentrifugação das nanocápsulas, os autores constataram a ausência de nanoesferas na formulação.

CHOUINARD e colaboradores (1991) prepararam nanocápsulas pelo método de polimerização interfacial utilizando como monômeros cianoacrilato de *iso*-butila e cianoacrilato de *iso*-hexila. Os autores não observaram a variação do tamanho das nanocápsulas com o aumento da concentração do tensoativo utilizado (poloxamer 407), e o que influenciou diretamente no tamanho das gotículas formadas foi a concentração de óleo utilizada (Miglyol[®] 810 e 829) e em menor extensão a concentração do monômero e do inibidor da polimerização (dióxido de enxofre). O tamanho das nanocápsulas foi idêntico ao tamanho das gotículas da emulsão preparada sem o polímero. Como não houve alteração do volume utilizado das fases aquosa e orgânica, os autores inferiram que o número de nanocápsulas por unidade de volume é constante. Utilizando ultracentrifugação (55.000 x g) por 2 h, foi observado que o aumento da concentração do monômero levou ao aumento da densidade das nanocápsulas. Os resultados confirmaram que a quantidade de polímero por nanocápsulas está diretamente relacionada à concentração de

monômero na fase orgânica. Além disso, a ausência de qualquer sobrenadante ou sedimento no gradiente de densidade indicou que somente nanocápsulas foram formadas. Com isso, os autores inferiram que as nanocápsulas preparadas com o aumento da concentração do monômero tiveram uma maior ou menor espessura da parede polimérica circundante. Mais recentemente, WOHLGEMUTH e colaboradores (2000) verificaram um significativo aumento do diâmetro das nanocápsulas preparadas a partir de cianoacrilato de *n*-butila e Miglyol decorrente do aumento da concentração do óleo e da diminuição da concentração do monômero.

AMMOURY e colaboradores (1993) obtiveram nanocápsulas de PLA como polímero, fosfolípidos como tensoativo e benzoato de benzila como núcleo oleoso pelo método de deposição interfacial, e observaram a presença clara de lipossomas misturados nas suspensões de nanocápsulas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). A estabilidade máxima da suspensão foi observada quando fosfolípidos e poloxamer 188 foram utilizados, em combinação, com tensoativos. Quando somente um dos tensoativos foi utilizado, as nanocápsulas apresentaram sedimentação de material em função do tempo, formando um aglomerado de difícil redispersão. Entretanto, em um trabalho realizado por Weiss e colaboradores (2000), foi demonstrado que o benzoato de benzila não é apropriado para formular nanocápsulas de PCL ou PLA, pois através de testes de inchamento/dissolução de filmes destes polímeros foi comprovado que o benzoato de benzila é capaz de dissolver ambos os polímeros.

LOSA e colaboradores (1993) avaliaram a influência de alguns parâmetros, dentre eles, diferentes óleos na preparação de nanocápsulas contendo metipranolol obtidas tanto por polimerização interfacial usando cianoacrilato de *iso*-butila quanto por deposição interfacial a partir de poli(ϵ -caprolactona). Duas variáveis independentes foram analisadas, o tipo de óleo e o volume da fase oleosa. Os óleos utilizados foram o Labrafil[®] 1944 CS e o Miglyol[®] 840, ambos na razão de 1/20 ou 1/40 óleo/água. Os autores constataram que o tamanho de partículas foi significativamente afetado pelo tipo e não pela quantidade de óleo utilizado, inferindo que com o aumento do volume de óleo, mais nanocápsulas seriam formadas. O óleo mais hidrofílico (Labrafil[®] 1944 CS) estaria disperso em maior extensão e conseqüentemente menores partículas foram formadas. Também constataram que a

presença do polímero reduz o tamanho das nanocápsulas em relação a emulsão previamente formada. Adicionalmente, verificaram que o tipo e a quantidade de óleo utilizado afetaram a eficiência de encapsulamento do metipranolol, estando relacionada com a solubilidade do fármaco no óleo, tendo sido maior para o Labrafil® 1944 CS.

CHOUINARD e colaboradores (1994), utilizando gradiente de centrifugação, mostraram que nanocápsulas de Miglyol® 829, preparadas por polimerização interfacial de cianoacrilatos de alquila estabilizadas com poloxamer 188, 238 ou 407, têm densidade intermediária entre as nanoesferas desse polímero e a emulsão do óleo. Os autores determinaram que somente nanocápsulas foram obtidas. No entanto, descreveram uma etapa de purificação empregando dupla centrifugação antes do ensaio com o gradiente de densidade, o que pode ter eliminado outras estruturas presentes. O potencial de superfície das nanocápsulas e das nanoesferas foi relacionado à massa molar do polímero: potenciais maiores de -42 mV foram obtidos para nanocápsulas preparadas com polímero de massa molar igual a 1.000 g.mol⁻¹ comparados com valores de -10 mV, obtidos para a emulsão, e para as nanocápsulas preparadas com polímero de alta massa molar (100.000 g.mol⁻¹).

CALVO e colaboradores (1996) observaram os efeitos da composição de diferentes sistemas coloidais (nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão) sobre os valores de potencial zeta. Foi verificado que a presença da fase oleosa (Miglyol® 840) nas nanocápsulas e na nanoemulsão, conferiu um potencial mais negativo em relação à ausência da mesma, como no caso das nanoesferas. Após 6 meses de armazenamento à temperatura ambiente, as nanocápsulas e as nanoesferas permaneceram visualmente sem alterações. Nenhum sinal de coalescência, cremagem ou sedimentação foram observados. No entanto, para a nanoemulsão, após 6 meses foi observada cremagem, mas facilmente redispersável com agitação. O pH de todas as suspensões diminuiu durante o armazenamento. Este declínio foi devido à degradação do polímero que produziu ácido hidroxicapróico livre na suspensão, confirmado por cromatografia por exclusão de tamanhos.

Com o objetivo de avaliar as propriedades físicas e químicas de nanocápsulas contendo triamcinolona, obtidas por polimerização interfacial, VALERO e colaboradores (1996) prepararam formulações utilizando diferentes concentrações

de cianoacrilato de *iso*-butila (10 a 100 $\mu\text{L}/10\text{mL}$), fármaco (0,1 a 2,4 mg/mL), Miglyol[®] 812 (0,5 a 3%) e, como tensoativo, poloxamer (0,25 %). Os resultados mostraram que o aumento no percentual de Miglyol[®] conduziu ao aumento no tamanho de partículas. Também, um aumento no tamanho de partículas foi observado quando maiores concentrações de monômero foram empregadas (50 $\mu\text{L}/10\text{mL}$). Também pode ser observado que para diferentes concentrações de Miglyol[®] variações na concentração do monômero resultavam em diferentes diâmetros de nanocápsulas. Tal fato poderia ser explicado pela existência de dois tipos de partículas com densidades diferentes no sistema coloidal preparado. Por ultracentrifugação (40.000 rpm), foi observada a existência de nanoesferas (≈ 85 nm) nas suspensões de nanocápsulas (≈ 170 nm). O resultado mostrou que a população secundária de nanoesferas na suspensão de nanocápsulas poderia conduzir à diminuição do tamanho médio da suspensão coloidal final.

A influência do tipo e da massa molar do polímero sobre o tamanho de partícula e a eficiência de encapsulamento foi observada por MARCHAIS e colaboradores (1998) a partir de nanocápsulas de PCL, PLA e PLGA contendo fenilbutazona. Análises de distribuição de tamanho de partícula e eficiência de encapsulamento mostraram que a massa molar e o tipo de polímero são os principais fatores que afetam estas propriedades. Foram analisadas nanocápsulas de PLA ($150.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), nanocápsulas de PLGA 75:25 ($75\text{-}120.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), nanocápsulas de PLGA 65:35 ($40\text{-}75.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e nanocápsulas de PCL ($64.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Nanocápsulas preparadas com PLA e com seus copolímeros (PLGA) demonstraram menores tamanhos de partícula em relação a nanocápsulas preparadas com PCL. Ainda, o menor tamanho de partícula foi obtido independente do polímero utilizado, mas dependente do aumento da massa molar do polímero. Para todos os poliésteres utilizados, um aumento da concentração do polímero não afetou o tamanho de partícula. Em relação à eficiência de encapsulamento, as nanocápsulas de PLA e as de copolímeros de PLGA mostraram valores próximos a 100%. A eficiência de encapsulamento para a fenilbutazona em nanocápsulas de PCL também foi elevada. No entanto, para quantidades de PCL acima de 80mg, a eficiência de encapsulamento foi significativamente menor em comparação aos três outros polímeros, PLA, PLGA 75:25 e PLGA 65:35. De forma geral, o PLA foi o

polímero que forneceu maiores eficiências de encapsulamento e resultados reprodutíveis.

Pelo método de emulsificação-difusão, QUINTANAR-GUERRERO e colaboradores (1998) prepararam uma série de formulações de nanocápsulas de poli(lactídeo) (20, 30, 50, 80, 100, 125, 150, 200, 400 e 600 mg), utilizando quantidades fixas de Miglyol[®] 812 (0,5 mL) e de poli(álcool vinílico) (PVA) (5%). Todas as suspensões foram submicrométricas sem aparecimento de precipitado de polímero ou de gotículas de óleo macroscópicos. A maioria foi estável por no mínimo um mês, com exceção da suspensão preparada com 600 mg de PLA. Após ultracentrifugação (45.000 x g, 30 min) em gradiente de densidade de Percoll[®], não foram observados sedimentos nas suspensões preparadas com 20, 30 e 50 mg de PLA, revelando a associação do polímero com o óleo. No entanto, os autores acreditam que, devido à densidade das nanocápsulas ser muito próxima a da nanoemulsão, esta também possa ter se formado simultaneamente nas formulações com baixa concentração de polímero. Quando a quantidade de PLA (125, 150, 200, 400 e 600 mg) foi suficiente para formar nanocápsulas de maior densidade, foi determinado um sedimento sem cremagem ou turbidez no sobrenadante de densidade intermediária entre as densidades de nanoesferas e de nanoemulsão, indicando que nanocápsulas com núcleo oleoso foram formadas. A densidade da nanocápsulas e a espessura da banda aumentaram com o aumento da razão polímero/óleo, com isso os autores inferiram que é possível controlar a espessura da parede polimérica das nanocápsulas obtidas pelo método de emulsificação-difusão.

MOSQUEIRA e colaboradores (2000) avaliaram a influência da composição de nanocápsulas de PLA nas suas características físico-químicas e estruturais. Para avaliar a influência da natureza da fase oleosa, formulações de nanocápsulas foram preparadas com os seguintes óleos: Miglyol[®] 810, Miglyol[®] 812, Miglyol[®] 829, Miglyol[®] 840, oleato de etila, óleo de soja, óleo mineral e dodecano. Os valores de potencial zeta (-55 ± 6 mV) não mudaram significativamente em função da natureza do núcleo oleoso. Foi observado um aumento no tamanho das nanocápsulas com o aumento da fração de óleo na fase orgânica. O aumento na razão óleo/lecitina conduziu ao aumento no tamanho das nanocápsulas. Para os autores o fator determinante para o tamanho das nanocápsulas é a tensão interfacial do óleo

utilizado. Quanto menor a tensão interfacial do óleo, menor o tamanho das nanocápsulas formadas. A influência da concentração e do tipo dos tensoativos Epikuron[®] 170, Epikuron[®] 200, fosfatidilcolina de soja, poloxamer 188, fosfolipon[®] 90, dimiristoil-fosfatidilcolina e span[®] 80, também foi avaliada. Foi observada uma diminuição do tamanho das nanocápsulas quando uma concentração de até 30 mg/mL de Epikuron[®] 170 foi utilizada. Foi observado que uma quantidade de Lecitina de 0,3% é necessária para a obtenção de nanocápsulas estáveis com diâmetro ao redor de 180 nm e com uma concentração de óleo de 2,5%. Nanocápsulas estáveis foram também obtidas sem a utilização de poloxamer e com 0,75% de Epikuron[®]. Os autores inferiram que um aumento na concentração de lecitina aumenta o potencial de superfície até que se alcance um platô, provavelmente quando as gotículas de óleo das nanocápsulas já estão cobertas pela lecitina, ao redor de 0,4%. Adicionalmente, determinaram que o poloxamer tende a reduzir o potencial de superfície até uma concentração de 0,35%, na ausência de lecitina. Concentrações de poloxamer acima de 0,35% ocasionariam pouca variação no potencial de superfície. O poloxamer teve pouco efeito no potencial de superfície das nanocápsulas na presença de lecitina, o que confirmou a hipótese de que os componentes da lecitina são responsáveis pelo potencial de superfície das nanocápsulas, preparadas utilizando estes componentes. Por fim, nesse estudo foi realizada a ultracentrifugação (20.800 x g) por 90 min das nanocápsulas em um gradiente de densidade de Percoll[®] com o objetivo de confirmar sua formação, baseado nas diferenças de densidade dos sistemas formados. Os resultados mostraram que lipossomas foram obtidos concomitantemente com nanocápsulas e nanoemulsão, quando lecitina foi utilizada como tensoativo, e que nanoesferas foram obtidas nas suspensões de nanocápsulas. A influência da massa molar do polímero nos valores de potencial zeta foi também avaliada (MOSQUEIRA e col., 2000). Utilizaram-se dois tipos de formulações preparadas com e sem lecitina. Na ausência de lecitina, os grupos carboxila terminais das cadeias de PLA contribuíram para valores de potencial zeta menores quanto menor a massa molar do polímero (PLA_{9KDa}, -27 mV; PLA_{91KDa}, -17 mV; PLA_{251KDa}, -7 mV), devido ao número de grupamentos terminais do polímero. Por outro lado, os resultados indicaram que a massa molar do polímero exerceu pouca influência nos valores de potencial zeta de nanocápsulas preparados com lecitina (PLA_{9KDa}, -40 mV; PLA_{91KDa}, -39 mV; PLA_{251KDa}, -38 mV). Estes resultados levaram os autores a concluir que

provavelmente o polímero está encoberto por lecitina (fosfatidilcolina com 1-2% de ácido fosfatídico) e que seus grupos negativamente carregados determinam o potencial de superfície da nanocápsulas.

RAFFIN e colaboradores (2003) planejaram uma matriz 2^3 para preparar nanocápsulas pelo método de deposição interfacial partindo de 500 mg de polímero (PCL), 383 mg de nonoestearato de sorbitano, 1,65 mL de óleo (Miglyol[®] 810) e 383 mg de polissorbatato 80. Foram preparadas suspensões contendo 50% e 150% das quantidades de polímero, tensoativos e óleo, mantendo-se constantes a acetona, indometacina e a água. No estudo foram observados grumos nas paredes do frasco de acondicionamento para as suspensões que apresentaram a menor concentração dos tensoativos concomitantemente com a maior concentração do polímero e/ou de óleo. Pela análise do ponto de fusão destes grumos foi determinado que esses correspondiam ao polímero (PCL). A suspensão na qual as concentrações de polímero, óleo e tensoativos foram as menores, apresentaram-se estáveis e sem a presença de grumos. As análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV), indicaram a possibilidade de mistura de partículas nas suspensões preparadas após a secagem com SiO₂. Diferentes tamanhos de nanoestruturas na superfície do SiO₂ foram observadas para o pó preparado a partir das nanocápsulas, que não foram observadas pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons (PCS). Foi preparada, então, uma mistura de nanocápsulas e de nanoesferas (1:1 v/v), que apresentou tamanho de partículas de 210 nm por PCS e por MEV mostrou dois tamanhos de nanoestruturas distintos na superfície das partículas do pó, confirmando a mistura de nanoestruturas.

A presença de outras nanoestruturas em suspensões de nanocápsulas não evidenciadas por PCS, mas que estavam presentes nas formulações, foi também evidenciado por YEGIN e LAMPRECHT (2006). Os autores determinaram o tamanho de nanocápsulas lipídicas por dois métodos de determinação diferentes, por PCS e por cromatografia hidrodinâmica (HDC) e observaram que para amostras diluídas 100 vezes o diâmetro de partícula nos dois métodos era semelhante ($26,6 \pm 3,3$ nm por PCS e $22,5 \pm 3,1$ nm por HDC). No entanto, quando a suspensão de nanocápsulas foi determinada sem nenhuma diluição por HDC, um pico além do já observado anteriormente e com um tamanho de partícula menor (≈ 10 nm) foi observado. Baseado em determinações anteriores os autores inferiram que este pico

representa diâmetro similar a micelas e com isso sugeriram a presença de micelas nesta preparação de nanocápsulas lipídicas.

COURNARIE e colaboradores (2004) prepararam nanocápsulas pelo método de polimerização interfacial de cianoacrilato de *iso*-butila. Os autores avaliaram a influencia da fase orgânica sob dois parâmetros, a ordem de introdução dos componentes e a velocidade de agitação. A ordem de adição do monômero ou do Miglyol[®] não alterou o diâmetro nem a recuperação do fármaco, insulina (100%), quando este foi adicionado por último à fase orgânica. No entanto, quando a insulina foi adicionada antes do monômero, as nanocápsulas foram menores e a eficiência de encapsulamento não pode ser determinada. O tamanho das nanocápsulas formadas foi influenciado pela velocidade de agitação da fase orgânica, sendo menor quando a velocidade de agitação da fase orgânica foi intermediária. O trabalho também avaliou a influencia da velocidade de injeção da fase orgânica na aquosa. Os resultados demonstraram que enquanto mais rápido o fluxo de injeção, menor as nanocápsulas e mais estreita sua distribuição. No entanto, a velocidade de injeção não alterou a eficiência de encapsulamento ($\approx 58\%$). A influencia do método de adição da fase orgânica sob a aquosa (vertida ou injetada com uma cânula de silicone) também foi determinada. Os resultados mostraram que a presença de uma interface ar/água, quando a fase orgânica é vertida sobre a aquosa, promove a formação de agregados, o que não é observado quando a fase orgânica é injetada sobre a fase aquosa, utilizando-se um cateter de silicone evitando a presença da interface água/ar. Os autores ainda inferiram que uma pequena quantidade de nanoesferas é sempre formada em preparação de nanocápsulas. A observação baseou-se na presença de um pellet após a ultracentrifugação. A formação das nanoesferas pode ser devido a algum processo de fragmentação do filme polimérico interfacial, o qual não contém gotículas de óleo (GALLARDO e col., 1993), ou devido ao núcleo de polimerização já estar formado no solvente orgânico (PUGLISI e col., 1995).

A influencia da variação da concentração de dodecil sulfato de sódio (tensoativo) no tamanho de partículas e na estabilidade de nanocápsulas, preparadas por polimerização em miniemulsão, foi determinado por VAN ZYL e colaboradores (2004). Os autores demonstraram que o tamanho de partículas pode diminuir com o aumento na concentração do tensoativo (0,1 a 2%) até uma

concentração crítica, onde o aumento na concentração do tensoativo poderia não necessariamente levar a redução no tamanho de partículas, mas à presença de micelas livres desse na suspensão.

Nanocápsulas de PCL e triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico foram preparadas por deposição interfacial utilizando concentrações decrescentes do polímero (10,0; 8,0; 6,0; 4,0 e 2,0 mg/mL) (CRUZ e col., 2006b; POLETTO e col., 2008). Os autores não observaram diferenças entre os diâmetros e a polidispersão das nanocápsulas que se mantiveram entre 232 e 261 nm e menor que 0,24, respectivamente. Também não observaram mudanças significativas no pH e no teor do éster etílico de indometacina encapsulado. Por microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar que a presença do polímero diminuiu a tendência à coalescência, observado para nanoemulsão preparada sem PCL por emulsificação espontânea (CRUZ e col., 2006b). O número de partículas foi determinado (POLETTO e col., 2008) com o objetivo de avaliar se o aumento da concentração do polímero levaria a um maior número de nanocápsulas na suspensão ou ao aumento da espessura da parede polimérica. Os resultados demonstraram que o número de partículas foi similar para todas as suspensões e que a liberação de fármaco foi mais lenta quanto maior a concentração de polímero, demonstrando que quanto maior essa concentração mais espessa é a parede das nanocápsulas.

3.2 Liberação de fármacos a partir de nanocápsulas

A liberação de fármacos a partir de sistemas nanoparticulados poliméricos é dependente da dessorção do fármaco da superfície das nanopartículas, da difusão do fármaco através da matriz das nanoesferas, da difusão através da parede polimérica das nanocápsulas, da erosão da matriz polimérica ou da combinação dos processos de erosão e difusão (SOPPIMATH e col., 2001). No caso de nanocápsulas, o fármaco, teoricamente dissolvido no núcleo oleoso, seria liberado desta estrutura vesicular mediante a sua difusão através da parede polimérica descrevendo uma cinética de ordem zero (SOPPIMATH e col., 2001; SCHAFFAZICK e col., 2003).

A rápida liberação de diferentes fármacos a partir de nanocápsulas tem sido previamente relatada por diferentes autores (LOSA e col., 1993; MARCHAIS e col., 1998; CALVO e col., 1996). FRESTA e colaboradores (1996) observaram que os perfis de liberação de três fármacos anticonvulsivantes, carbamazepina, etosuximida e fenitoína associadas a nanocápsulas de PECA seguiram cinética de ordem zero, atribuindo que a liberação destes fármacos corresponderia principalmente à difusão dos mesmos a partir do núcleo oleoso em direção à parede polimérica. WATNASIRICHAIKUL e colaboradores (2002) também observaram cinética de ordem zero na liberação da insulina a partir de nanocápsulas de PECA. E segundo FRESTA e colaboradores (1996) e WATNASIRICHAIKUL e colaboradores (2002), a rápida liberação inicial dos fármacos carbamazepina, etosuximida, fenitoína e insulina poderia ser atribuída a uma fração dos mesmos adsorvida à superfície das nanopartículas.

FERRANTI e colaboradores (1999) compararam os perfis de liberação da primidona a partir de nanocápsulas de PCL, contendo álcool benzílico como núcleo oleoso com os perfis de dissolução do padrão de primidona em álcool benzílico, como controle. As amostras de nanocápsulas foram colocadas em meio gástrico simulado (pH 1,25) ou em tampão fosfato, pH 7,4. Após 8 horas do início do experimento, 100 % da primidona contida na solução controle foi liberada. Para o mesmo tempo, a taxa de primidona liberada a partir das nanocápsulas foi de $76,0 \pm 1,4$ % (pH 7,4) e de $83,0 \pm 4,5$ % (pH 1,25). A quantidade de primidona liberada das nanocápsulas foi significativamente menor em comparação ao controle. Os autores sugeriram que uma interação entre o fármaco e o polímero possa ocorrer.

TEIXEIRA e colaboradores (2005) observaram que para a liberação de xantona e 3-metoxixantona, nanocápsulas e nanoemulsão de PLGA, forneceram diferentes perfis. Apesar da importante liberação inicial observada para ambos os sistemas nos 30 primeiros minutos, para NC e NE contendo 3-metoxixantona, não foram observadas diferenças sugerindo, o autor, que pela semelhança nos perfis, a camada polimérica não influenciou o processo de liberação, e sim, a partição do fármaco entre a fase oleosa e o meio aquoso externo, como já relatado para outros fármacos (CALVO e col., 1996; MARCHAIS e col., 1998; SANTOS-MAGALHÃES e col., 2000). Por outro lado, para nanocápsulas contendo xantona, uma diferença

significativa após os 30 primeiros minutos do experimento foi observada em comparação a nanoemulsão. As diferenças nos perfis de liberação sugerem que outro fator além da partição da xantona entre o núcleo oleoso e o meio aquoso influencia a sua liberação a partir das nanocápsulas. Como anteriormente relatado para outros fármacos (FERRANTI e col., 1999), a diminuição da quantidade liberada a partir de nanocápsulas pode ser atribuída a uma interação entre a substância e a parede polimérica das nanocápsulas.

CALVO e colaboradores (1996) obtiveram perfis de liberação similares da indometacina após a penetração através da córnea a partir de nanoemulsão e nanocápsulas (utilizando Migliol 840[®] como fase oleosa). A liberação do fármaco foi afetada pela partição do fármaco entre o óleo e o meio aquoso externo. Entretanto, essas interpretações foram criticadas recentemente (CRUZ e col., 2006a) pela demonstração de que perfis de liberação similares, entre nanocápsulas e nanoemulsão, podem demonstrar que o fármaco está adsorvido às partículas e não retido no núcleo oleoso.

LOSA e colaboradores (1993) avaliaram a influência de diferentes óleos na cinética de liberação de metipranolol a partir de nanocápsulas de PIBCA e de PCL. Foram variados, além do tipo de polímero, PCL ou PIBCA, o tipo de óleo Migliol[®] 840 ou Labrafil[®] 1944 e a razão dos óleos empregados na formulação, 1/20 ou 1/40 (O/W). A liberação inicial do metipranolol foi constante e similar para todas as formulações, estando relacionada à dissolução do fármaco não encapsulado. Por outro lado, diferenças foram observadas para a liberação final do metipranolol. Para nanocápsulas contendo Migliol[®] como óleo uma maior taxa de liberação final foi observada e está relacionada a menor solubilidade do metipranolol neste óleo, comparado com Labrafil[®] 1944, e conseqüentemente, a sua partição para a fase aquosa.

Através da técnica de polimerização interfacial, VALERO e colaboradores (1996) prepararam nanocápsulas de PIBCA contendo Miglyol 812[®] como núcleo oleoso. O perfil de liberação da triamcinolona a partir da formulação preparada foi avaliado pela técnica de difusão em saco de diálise, em pH 7,4. Os resultados mostraram um perfil de liberação bifásico que apresentou uma liberação inicial rápida, seguida de uma segunda etapa de liberação mais lenta. Com fins

comparativos, foi avaliado o perfil de liberação da triamcinolona a partir da nanoemulsão correspondente, o qual também apresentou uma curva experimental bifásica. Entretanto, a liberação do fármaco a partir desta formulação apresentou-se significativamente mais lenta. Os valores das constantes de liberação de primeira ordem calculados foram $0,1221 \text{ h}^{-1}$ para nanoemulsão e $0,1006 \text{ h}^{-1}$ para nanocápsulas.

O perfil de liberação do 4-nitroanisol a partir de nanocápsulas de PLA, contendo hexano como núcleo oleoso, foi avaliado através da técnica de difusão em saco de diálise em pH 7,0 (ROMERO-CANO e VINCENT, 2002). As nanocápsulas foram formuladas por emulsão múltipla onde o PLA (1,5 ou 2,5 g) e o 4-nitroanisol, foram dissolvidos em uma mistura de diclorometano e hexano. Pequena quantidade de acetona, foi também adicionada para ajudar na emulsificação. Após, uma solução aquosa de PVA a 2% foi adicionada à emulsão e mantida sob agitação por uma hora. Por fim esta solução foi adicionada a uma solução contendo PVA 2%. O diclorometano e acetona foram removidos sob pressão reduzida e, então, ocorreu a precipitação do polímero ao redor da gota de hexano. As formulações apresentaram um perfil bifásico, sendo a liberação do fármaco explicada pelo mecanismo de difusão. A liberação do 4-nitroanisol seguiu uma relação linear com a raiz quadrada do tempo na primeira metade da curva de liberação, demonstrando um bom ajuste dos dados ao modelo de Higuchi. Através da determinação do coeficiente de difusão D , foi observada uma liberação mais rápida do fármaco a partir das nanocápsulas preparadas com menor quantidade de polímero (1,5 g). Os autores relacionaram esta diferença com a espessura da parede das nanocápsulas, considerando que uma maior concentração de polímero conduz à formação de uma parede mais espessa, o que torna a difusão mais lenta.

SANTOS-MAGALHÃES e colaboradores (2000) observaram perfis de liberação similares para nanocápsulas de PLGA e nanoemulsão contendo penicilina G benzatina. A liberação do fármaco a partir das nanocápsulas foi aproximadamente duas vezes mais rápida no intervalo de 5-60 min, fornecendo constantes de liberação de primeira ordem de $0,008 \text{ min}^{-1}$ para nanoemulsão e de $0,0017 \text{ min}^{-1}$ para nanocápsulas. A totalidade do fármaco foi liberada em 120 e 180 minutos, respectivamente. A diferença nos perfis de liberação das duas formulações foi atribuída a diferenças na natureza da fase oleosa das nanoestruturas. Na

preparação das nanocápsulas foi usado óleo de girassol e na nanoemulsão foi usado Miglyol 812[®]. Assumindo que o processo cinético é governado pela partição óleo/água, os autores sugeriram que a diferença nos valores de força iônica e constante dielétrica dos óleos poderia explicar as diferenças observadas nos perfis de liberação da penicilina G benzatina a partir das nanocápsulas e da nanoemulsão.

LI e colaboradores (2005) demonstraram que a massa molar do poli(cianocrilato de butila) (PBCA) preparado por polimerização *in situ* influenciou a liberação da albumina sérica bovina (BSA) em nanocápsulas. Para nanocápsulas de PBCA com baixa massa molar (4.000 g.mol⁻¹), um perfil bifásico foi observado, enquanto para nanocápsulas preparadas a partir do polímero de maior massa molar (10.000 g.mol⁻¹), um perfil sigmoidal foi observado. De acordo com os autores, o mecanismo de liberação da BSA foi dependente da erosão da parede polimérica. Dessa forma, nanocápsulas com uma densa parede polimérica necessitaram de um maior período de tempo para a degradação e erosão da parede polimérica. Por isso, a taxa de liberação da BSA foi menor para as nanocápsulas obtidas a partir de polímero de maior massa molar e com densa parede polimérica, se comparada a nanocápsulas obtidas com polímero de baixa massa molar e fina parede polimérica. Paralelamente, LU e colaboradores (1999) demonstraram também que a massa molar do polímero influenciou a liberação da BSA encapsulada em nanocápsulas de PLLA. Para nanocápsulas preparadas com maior massa molar do polímero (51.000 g.mol⁻¹), a taxa de liberação foi menor do que para nanocápsulas preparadas a partir do polímero com menor massa molar (16.000 g.mol⁻¹).

MARCHAIS e colaboradores (1998) analisaram a liberação da fenilbutazona a partir de nanocápsulas preparadas com PLA, PCL e PLGA 75:25 e PLGA 65:35. Dados experimentais demonstraram que a quantidade de fenilbutazona liberada das nanocápsulas é diferente conforme o pH do meio de liberação e a razão de diluição (1/5; 1/10; 1/50; 1/100 v/v). Em pH 7,4, a diluição não teve efeito para nenhuma das nanocápsulas analisadas. No entanto, em condições mais ácidas e com maior volume de diluição (1/50 e 1/100 v/v), a liberação inicial do fármaco a partir das nanocápsulas aumentou consideravelmente, com exceção das nanocápsulas de PCL, cujo fármaco foi liberado em aproximadamente 14% nos primeiros 10 min em meio gástrico simulado. Para polímeros cristalinos ou semi-

cristalinos, como a PCL, a água torna-se inacessível a fase cristalina e portanto, pouco hidrolizáveis (ZHANG e col., 2006). A degradação do PLA e dos copolímeros PLGA demonstrou ser pH dependente acelerando em condições ácidas. Outro fator importante para a rápida liberação inicial foi a presença da enzima pepsina, que poderia aumentar a solubilidade da fenilbutazona no meio gástrico simulado, visto que o fármaco liga-se mais de 90% à enzima e é pouco solúvel em água. Com base nos resultados, as nanocápsulas de PCL contendo fenilbutazona demonstraram uma menor liberação inicial.

Com o objetivo de determinar a forma de associação da indometacina a partir de nanocápsulas preparadas com PCL, POHLMANN e colaboradores (2004) realizaram experimentos de hidrólise alcalina para a diferenciação dos perfis cinéticos da indometacina e do seu éster etílico. O consumo total da indometacina associada às nanocápsulas foi de 2 min, enquanto para o éster etílico de indometacina associado às nanocápsulas foi de 1440 min. O consumo do éster foi dependente de sua difusão do interior das nanocápsulas para a interface partícula/água, enquanto que o consumo da indometacina foi devido à hidrólise alcalina em solução, sendo a adsorção sua forma de associação.

Para diferenciar os sistemas nanocápsulas, nanoemulsão e nanoesferas CRUZ e colaboradores (2006a) avaliaram os perfis cinéticos obtidos através de hidrólise alcalina da indometacina e de seu éster etílico. Os perfis cinéticos do consumo da indometacina foram similares para nanocápsulas, nanoemulsão, e nanoesferas e sugerem que o mecanismo de associação da indometacina nas nanoestruturas é a adsorção. O melhor ajuste para as nanoestruturas no caso da indometacina foi o modelo monoexponencial, e as constantes cinéticas observadas foram $1,2880 \pm 0,0636 \text{ min}^{-1}$ (NC), $1,5380 \pm 0,0128 \text{ min}^{-1}$ (NE) e $1,5620 \pm 0,0874 \text{ min}^{-1}$ (NS). Para as nanoestruturas associadas ao éster etílico de indometacina o melhor ajuste foi o biexponencial, e as constantes cinéticas observadas para a fase rápida de liberação foram $0,1176 \pm 0,0132 \text{ min}^{-1}$ (NC), $0,2528 \pm 0,0768 \text{ min}^{-1}$ (NE) e $0,1581 \pm 0,0552 \text{ min}^{-1}$ (NS) e para a fase de liberação sustentada foram $0,0024 \pm 0,0002 \text{ min}^{-1}$ (NC), $0,0047 \pm 0,0001 \text{ min}^{-1}$ (NE) e $0,0079 \pm 0,0006 \text{ min}^{-1}$ (NS). As concentrações iniciais do éster etílico de indometacina para a fase rápida de liberação também foram calculados e compreendem valores entre 0,05 mg/mL e 0,16 mg/mL, enquanto os valores para as concentrações iniciais da fase de

liberação sustentada variaram de 0,84 mg/mL a 0,93 mg/mL. Estes valores demonstraram que o éster está disperso de 84% a 93% no interior dos nanocarreadores. Os tempos de meia-vida para a hidrólise do éster associado aos nanocarreadores também foram calculados para a fase rápida de liberação e para a fase sustentada. A presença do polímero aumentou a meia-vida da fase rápida e a presença do óleo aumentou a meia-vida da fase de liberação sustentada.

CRUZ e colaboradores (2006b) determinaram que a concentração do polímero (PCL) influencia o processo de liberação do éster etílico da indometacina encapsulado em nanocápsulas. A hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina foi utilizada para determinar o consumo do éster encapsulado em formulações de nanocarreadores (nanoemulsão e nanocápsulas) contendo diferentes concentrações de PCL, partindo de 10mg/mL até 0 mg/mL (0, 2, 4, 6, 8 e 10 mg/mL). O aumento na concentração do polímero aumentou também o tempo para o consumo total do éster. A modelagem matemática dos perfis mostrou que o melhor ajuste dos dados seguiu o modelo biexponencial. No geral, as constantes cinéticas observadas diminuíram conforme a concentração do polímero aumentou (k_1 variou de $0,2528 \pm 0,078 \text{ min}^{-1}$ a $0,1176 \pm 0,0132 \text{ min}^{-1}$ e k_2 de $0,0047 \pm 0,0002 \text{ min}^{-1}$ a $0,0024 \pm 0,0002 \text{ min}^{-1}$). O tempo de meia-vida calculado para a fase sustentada mostrou que a parede polimérica foi importante para retardar a difusão do éster a partir do núcleo lipofílico para a interface. O tempo de meia-vida variou de 147 min a 289 min, quando a concentração do polímero variou de 0 a 10 mg/mL, respectivamente. Recentemente, POLETTO e colaboradores 2008 determinaram que o polímero (PCL), atuando como uma barreira à difusão do éster etílico de indometacina, diminui a permeabilidade relativa de $6,20 \times 10^{-13} \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ para $4,52 \times 10^{-13} \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ com o aumento de sua concentração (2 a 10 mg.mL⁻¹). Adicionalmente, o coeficiente de difusão (D) do éster etílico de indometacina foi maior quanto menor a concentração de polímero nas nanocápsulas.

Finalmente, o sistema nanoestruturado composto de óleo, polímero e tensoativos poderia ser desenhado para controlar a liberação de fármacos lipofílicos através da variação da viscosidade do núcleo, além do controle já relatado decorrente da variação da espessura da parede. Uma vez que o monoestearato de sorbitano é um tensoativo de baixo EHL e se encontra

majoritariamente no núcleo de nanocápsulas de PCL com triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (MULLER e col., 2001; CRUZ e col., 2006b), a hipótese de trabalho consiste da verificação da influência da concentração de monoestearato de sorbitano nas nanocápsulas sobre o perfil de liberação do éster etílico de indometacina.

4.1 Materiais

4.1.1 Matérias-primas

- Indometacina (Sigma - St. Louis, EUA);
- Poli(*epsilon*-caprolactona) (PCL) MM = 60 KDa (Aldrich, França);
- Monoestearato de sorbitano (Span[®] 60) (Delaware - Porto Alegre, Brasil);
- Polissorbato 80 (Tween 80[®]) (Delaware - Porto Alegre, Brasil);
- Triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico (Delaware - Porto Alegre, Brasil);

4.1.2 Aparelhos e equipamentos

- Evaporador rotatório Büchi RE120 (Suíça) - IQ/UFRGS;
- Espectrofotômetro na região do UV-Visível feixe duplo Shimadzu UV-1601PC, utilizado com cubetas de quartzo de 1 cm de percurso óptico (Japão) - IQ/UFRGS;
- Placa de agitação magnética com 15 pontos Velp (Europa) - IQ/UFRGS;

- Dispositivo de aquecimento e circulação de água acoplado a termostato IKA EH4 (Alemanha) - IQ/UFRGS;
- As fotomicroscopias eletrônicas foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS através de Microscópio Eletrônico de Transmissão, JEOL JEM 1200 ExII, operando a 80 KV (Japão) - UFRGS;
- A desestabilização das suspensões foi avaliada através de espalhamento múltiplo utilizando o Turbiscan Lab (Formulacion, Toulouse, France) - IQ/UFRGS;
- Estudos de densidade foram realizados em centrífuga modelo Hitachi CP70 MX, e rotor PS28T. (Japão) - Departamento de Bioquímica/UFRGS;
- Análise do diâmetro de partícula, polidispersão e potencial zeta, foram realizados utilizando um Zetasizer[®] Nanoseries, (Malvern, Reino Unido) - Faculdade de Farmácia/UFRGS;
- Medidas de pH foram realizadas utilizando-se potenciômetro Micronal B-474 (São Paulo, Brasil) - Faculdade de Farmácia/UFRGS;

- As determinações de viscosidade foram realizadas utilizando-se viscosímetro rotacional Brookfield, modelo DV-II + Pro, spindle ULA (Brookfield Engineering, Estados Unidos) - Faculdade de Farmácia/UFRGS;

4.1.3 Solventes e outros materiais

- Acetona p.a (Nuclear - Brasil)
- Acetonitrila grau HPLC (Merck - Alemanha)
- Etanol Absoluto (Merck - Alemanha)
- Diciclohexilcarbodiimida (DCC) (Sigma - Estados Unidos)
- 4-(N,N-dimetil) aminopiridina (DMAP) (Sigma - Estados Unidos)

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação do éster etílico de Indometacina

O éster etílico de Indometacina foi sintetizado como descrito por KALGUTKAR e colaboradores (2000). A uma solução de indometacina em etanol foi adicionado DMAP sob argônio e após agitação por 10 minutos foi adicionado DCC. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada e, após 16 horas, o solvente

foi evaporado sob pressão reduzida, sendo o resíduo dissolvido em diclorometano e filtrado. Extraíu-se o filtrado com solução aquosa saturada de NaHCO_3 . Em seguida, a fase orgânica foi seca com MgSO_4 anidro, filtrada e o solvente evaporado. Purificou-se o produto em coluna cromatográfica (sílica-gel 60, 70-230 mesh), empregando uma mistura de ciclohexano e acetato de etila (2:1 v/v) como eluente. O éster foi obtido com 65% de rendimento, apresentando um ponto de fusão de 99°C (não corrigido). A identidade química do produto foi confirmada por RMN (anexo 1).

4.2.2 Preparação das suspensões

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas por deposição interfacial (FESSI e col., 1986). Uma solução de PCL (100 mg), triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico (312 mg), monoestearato de sorbitano (Tabela 2) e éster etílico de indometacina (10 mg) em acetona (27 mL) foi injetada na fase aquosa (53 mL) contendo polissorbato 80 (77 mg), na temperatura ambiente sob agitação magnética. Cada suspensão foi mantida sob agitação por 10 min. A seguir, procedeu-se à evaporação de cada suspensão de nanocápsulas em evaporador rotatório, eliminando a acetona e concentrando a um volume final de 10 mL.

Tabela 2. Quantidade de monoestearato de sorbitano usada nas formulações de nanocápsulas.

	Formulação				
	IC	IIC	IIIC	IVC	VC
Monoestearato de sorbitano (mg)	38	58	77	96	115

4.2.3 Procedimento Analítico

O sistema de CLAE consistiu de um cromatógrafo Perkin Elmer S-200 com injetor S-200, detector UV-VIS, pré-coluna e coluna (LiChrospher[®] 100 RP₁₈, 250mm, 4mm, 5 μm , Waters). A fase móvel (1,2 mL.min⁻¹) consistiu de acetonitrila/água (70:30 v/v), pH 5,0 \pm 0,5 ajustado com ácido acético 10% (v/v).

Após a injeção de 20 µL de amostra, o éster etílico de indometacina foi detectado a 267 nm com um tempo de retenção de 9,6 min. O método de CLAE foi validado considerando a linearidade ($r=0,9994$), repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e limite de quantificação. As amostras de controle de qualidade nas concentrações de 12, 15 e 20 µg.mL⁻¹ apresentaram exatidão de 99,92%, 97,18% e 100,18%, respectivamente. Os dados de repetibilidade e de precisão intermediária apresentaram coeficientes de variação abaixo de 0,2% (Anexo 2).

A concentração do éster etílico de indometacina nas formulações foi determinada por CLAE como descrito acima. Uma alíquota de 100µL da suspensão foi retirada e tratada com 10 mL de acetonitrila. Esta solução foi filtrada (Millipore 0,45µm) e injetada no CLAE.

4.2.4 Caracterização físico-química das formulações

O tamanho de partícula e a polidispersão das formulações foram determinados após prévia diluição das amostras em água (Milli-Q[®]), usando um Zetasizer[®]. Para evitar qualquer seleção da amostra, apenas o meio de diluição foi filtrado. Determinou-se o potencial zeta das suspensões após a prévia diluição das amostras em NaCl 10 mM.

Os valores de pH foram determinados usando um potenciômetro (Micronal B-474).

4.2.5 Reação de Hidrólise

As reações de hidrólise alcalina foram realizadas à temperatura de 37 °C por adição de 2 mL de cada formulação, contendo a sonda, em 8 mL de solução aquosa de NaOH 0,05 M. Alíquotas de 300 µL do meio reacional foram retiradas em intervalos regulares (entre 10 e 1440 minutos) e tratadas com HCl 2,5 M

seguido de acetonitrila. Após centrifugação a 13.500 x *g* por 5 minutos, os sobrenadantes foram analisados por CLAE, observando-se o desaparecimento do substrato. As reações foram realizadas com 3 lotes diferentes de suspensões. (n=3)

4.2.6 Modelagem matemática

O modelo de KORSMEYER-PEPPAS foi utilizado para determinar o mecanismo de liberação para todos os sistemas nanoestruturados através da equação 1, onde os parâmetros *a* e *n* serão obtidos como resultados da modelagem matemática.

$$ft = \frac{Mt}{M_{\infty}} = at^n \quad (\text{Equação 1})$$

onde *a* é uma constante que incorpora características estruturais e geométricas do sistema de liberação, *n* é o expoente de liberação, indicativo do mecanismo de liberação da substância, e a função de *t* é Mt/M_{∞} , corresponde a liberação fracional do fármaco.

Este modelo matemático, também conhecido como Lei da Potencia, tem sido empregado com frequência para descrever a liberação de substâncias a partir de diversos tipos de matrizes. Os pontos modelados correspondem a uma fração liberada de até 60% (PEPPAS, 1985).

Os perfis também foram ajustados ao modelo monoexponencial (equação 2). Esse modelo descreve a constante cinética aparente da liberação, podendo-se acessar os tempos de meia-vida do consumo do éster.

$$C = C_0 e^{-kt} \quad (\text{Equação 2})$$

onde *C* é concentração do éster de indometacina no tempo *t*, *C*₀ é a concentração inicial do éster etílico de indometacina e *k* é a constante cinética observada.

As modelagens foram realizadas com o emprego do programa MicroMath[®] Scientist[®], comparando-se os seguintes parâmetros: o critério de seleção de modelo (MSC), o maior coeficiente de correlação (r) e o melhor ajuste gráfico.

Para os experimentos, modelaram-se todos os pontos obtidos a partir das diferentes suspensões até o tempo de 1440 minutos a fim de que as correlações fossem estabelecidas com o mesmo número de pontos para cada série de nanocápsulas preparadas. Este tempo correspondeu a mais de 80% do consumo do éster a partir dos diferentes sistemas.

4.2.7 Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A análise foi realizada com Microscópio Eletrônico de Transmissão (TEM; JEM 1200 ExII), operando a 80 kV. As suspensões previamente diluídas foram depositadas em um *grid* (Formvar-Carbon support film, Electron Microscopy Sciences) e contrastadas com acetato de uranila (2% p/v).

4.2.8 Análises de Espalhamento Múltiplo

As suspensões de nanocápsulas foram avaliadas por um Turbiscan Lab (Formulation, França). O sistema de detecção do Turbiscan Lab é composto por um feixe de luz no infravermelho próximo ($\lambda=880\text{nm}$) e dois detectores: um de transmissão (T) e outro de *backscattering* (BS). O detector (T) recebe a luz que atravessa a amostra (a 180° do feixe incidente), enquanto o detector BS, recebe a luz espalhada e refletida pela amostra (a 45° do feixe de luz incidente). O sistema detector realiza uma varredura do fundo ao topo da cubeta, que contém a amostra, adquirindo dados de transmissão (T) e *backscattering* (BS) (DIHANG e col., 2005). O princípio da medida baseia-se na variação de fração volumétrica ou diâmetro da partícula, resultando em uma variação dos sinais de T e BS. Para partículas que não absorvem luz no comprimento de luz utilizado (880nm), a intensidade de

transmissão e *backscattering* é essencialmente dependente da concentração de partículas, diâmetro de partícula e índice de refração da mistura.

As formulações foram colocadas dentro de uma cubeta de vidro transparente (20 mL) e analisadas a 25 °C. Cada amostra foi analisada por 24 horas.

4.2.9 Turbidimetria

A turbidimetria, τ (cm^{-1}) (Equação 3), foi calculada a partir do método descrito por ZATTONI e colaboradores (2003, 2004). As suspensões foram diluídas em água MilliQ® e analisadas utilizando-se um espectrofotômetro de UV-1601PC (Shimadzu, Japão).

$$\tau = \frac{1}{b} \ln(10) \cdot A \quad (\text{Equação 3})$$

onde b (cm) é caminho óptico da cubeta e A é o sinal da absorbância. Em uma amostra diluída de partículas esféricas, τ , é em função do diâmetro de partícula, d (cm), da concentração das partículas, N (partículas. cm^{-3}), e a grandeza W , adimensional, a qual é coeficiente de extinção (Equação 4).

$$\tau = \frac{\pi}{4} d^2 \cdot N \cdot W \quad (\text{Equação 4})$$

W é uma função do tipo $W(x, m)$, onde x é o parâmetro de diâmetro definido como $x = \pi d / \lambda$, na qual λ (cm) é o comprimento de onda de luz incidente do meio de dispersão, e o parâmetro m é o índice de refração relativo da partícula. Há um índice de refração relativo fixo, W pode ser obtido pela relação abaixo (equação 5).

$$W = \frac{K \cdot 2 \ln(10) \cdot \alpha \cdot d}{3} \quad (\text{Equação 5})$$

onde, d (cm) é o diâmetro de partícula, α ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) é a densidade da partícula e, K ($\text{cm}^2\cdot\text{g}^{-1}$) é o coeficiente de extinção, que pode ser calculado utilizando-se a equação 6.

$$\tau = \ln(10).K.c \text{ (Equação 6)}$$

onde, c ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) é a concentração da amostra.

As suspensões foram diluídas (MilliQ[®]) para obter concentrações que obedecessem a lei de Lambert-Beer. As suspensões diluídas foram analisadas a 380 nm, pois nesse comprimento de onda o éster etílico de indometacina não absorve energia. Os diâmetros, d , (equação 5) foram determinados experimentalmente conforme descrito no item 4.2.4.

4.2.10 Determinação da área superficial

A área superficial (S) das suspensões de nanocápsulas foi calculada usando a equação 7:

$$S = \frac{4}{3} \pi r^2 . N \text{ (Equação 7)}$$

onde N é o número de partículas por unidade de volume, π é o conhecido número irracional e vale 3,1416 e r é o raio médio das partículas em centímetros.

4.2.11 Estudos de densidade

Separação das partículas empregando gradiente de densidade foi realizada utilizando sílica coloidal (Percoll[®] 54% em NaCl 0,15 M, densidade inicial do

marcador: 1,021g/cm³) formado *in situ* durante ultracentrifugação em rotor modelo PS28T (Hitachi CP70 MX, Japão) a 20 °C e 30.000 x *g* por 90 min. O Percoll[®] (19,6 mL) foi adicionado a 0,4 mL das suspensões. Em tubo separado, marcadores de diferentes densidades pré-determinadas (*Density marker beads*[®]) foram adicionados sob as mesmas condições e usados para calibração externa das bandas.

A distancia do menisco até o limite de cada banda foi medida utilizando-se papel milimetrado. A densidade das partículas foi calculada através da curva plotando-se a distância do menisco *versus* a densidade de cada banda do marcador.

Para a análise do diâmetro médio e distribuição de diâmetro das bandas após a ultracentrifugação, as mesmas foram coletadas e o diâmetro das suspensões correspondentes as bandas foi determinado experimentalmente conforme descrito no item 4.2.4.

4.2.12 Determinação da massa das nanopartículas

A determinação da massa das nanoestruturas foi realizada empregando-se a equação 8:

$$d = \frac{m}{V} \text{ (equação 8)}$$

onde *d* é a densidade das nanopartículas determinada por ultracentrifugação em gradiente de densidade, *V* é o volume da partícula ($\frac{4}{3}\pi r^3$), onde *r*, raio das suspensões correspondentes as bandas determinado experimentalmente conforme descrito no item 4.2.4.

4.2.13 Medidas de viscosidade

As determinações de viscosidade foram realizadas utilizando-se um viscosímetro rotacional. Três determinações de viscosidade do triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico contendo 5, 15 e 25 mg·mL⁻¹ de monoestearato de sorbitano foram realizados a 25 °C.

4.2.14 Fluxo e Permeabilidade Relativa

Para se acessar o fluxo do éster etílico de indometacina no estado estacionário (J) decorrente de sua liberação a partir das nanocápsulas **IC** a **VC**, a teoria de HIGUCHI (1963) foi empregada. Os valores de J (mol·s⁻¹·cm⁻²) foram determinados a partir do coeficiente angular da reta obtida plotando-se a fração liberada do éster, M_t , (mol) em função do tempo, t , (s) (Equação 9).

$$M_t = M_0 - SJ \cdot t \quad (\text{Equação 9})$$

onde, M_0 (mol) é quantidade total do ester etílico de indometacina quando $t = 0$ e S (cm²) é área superficial das NC, calculada como $N \pi d^2$ (VAUTHIER e col., 2001). A permeabilidade aparente, P_{app} , (cm·s⁻¹) foi então obtida (Equação 10).

$$P_{app} = \frac{J}{Cm_0} \quad (\text{Equação 10})$$

onde Cm_0 (mol·cm⁻³) é a concentração inicial do éster etílico de indometacina na suspensão. Os ajustes dos perfis cinéticos, equações 9 e 10, foram avaliados usando o método dos mínimos quadrados.

4.2.15 Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) e teste-*t*. O nível de significância foi de 0,05%.

4.2.16 Descarte de resíduos

Todos os resíduos químicos gerados durante a preparação e caracterização de nanocápsulas, foram segregados, acondicionados e identificados segundo normas do Plano de Gerenciamento de Resíduos implementado pela Resolução COSAT 01/07, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química das formulações de nanocápsulas

5.1.1 pH, diâmetro de partícula, polidispersão e potencial zeta

As nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI e col., 1986). Após a obtenção, as suspensões de nanocápsulas preparadas com diferentes concentrações do monoestearato de sorbitano, **IC** a **VC**, apresentaram-se macroscopicamente homogêneas, brancas e opalescentes. O pH das suspensões variou entre 5,12 e 5,93 e o potencial zeta entre -8,58 e -12,6 mV (Tabela 3). Os resultados corroboraram com os obtidos por outros autores para nanocápsulas preparadas por deposição interfacial empregando os mesmos materiais (SCHAFFAZICK e col., 2006; WEISS e col., 2007).

O diâmetro médio de partículas para as suspensões **IC** a **VC** não variou mantendo-se entre 246 e 265 nm (Tabela 3). O índice de polidispersão das suspensões **IC** a **VC** foi inferior a 0,2 (Tabela 3) e a distribuição de tamanhos de partículas por intensidade, volume e número, foi monomodal (Figura 3).

Tabela 3. Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas preparadas com concentrações crescentes (3,85 a 11,5 mg/mL) de monoestearato de sorbitano (n=3).

Suspensões*	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	pH	Teor (mg/mL)
IC	265 ± 19	0,19 ± 0,07	-12,6 ± 0,4	5,42 ± 0,09	0,952 ± 0,005
IIC	256 ± 17	0,17 ± 0,06	-8,58 ± 0,2	5,74 ± 0,03	0,991 ± 0,003
IIIC	246 ± 17	0,18 ± 0,04	-8,77 ± 0,6	5,12 ± 0,08	1,027 ± 0,016
IVC	252 ± 22	0,15 ± 0,06	-11,1 ± 0,5	5,82 ± 0,12	0,967 ± 0,001
VC	249 ± 21	0,14 ± 0,04	-9,6 ± 0,5	5,93 ± 0,03	0,967 ± 0,031

* ± desvio padrão.

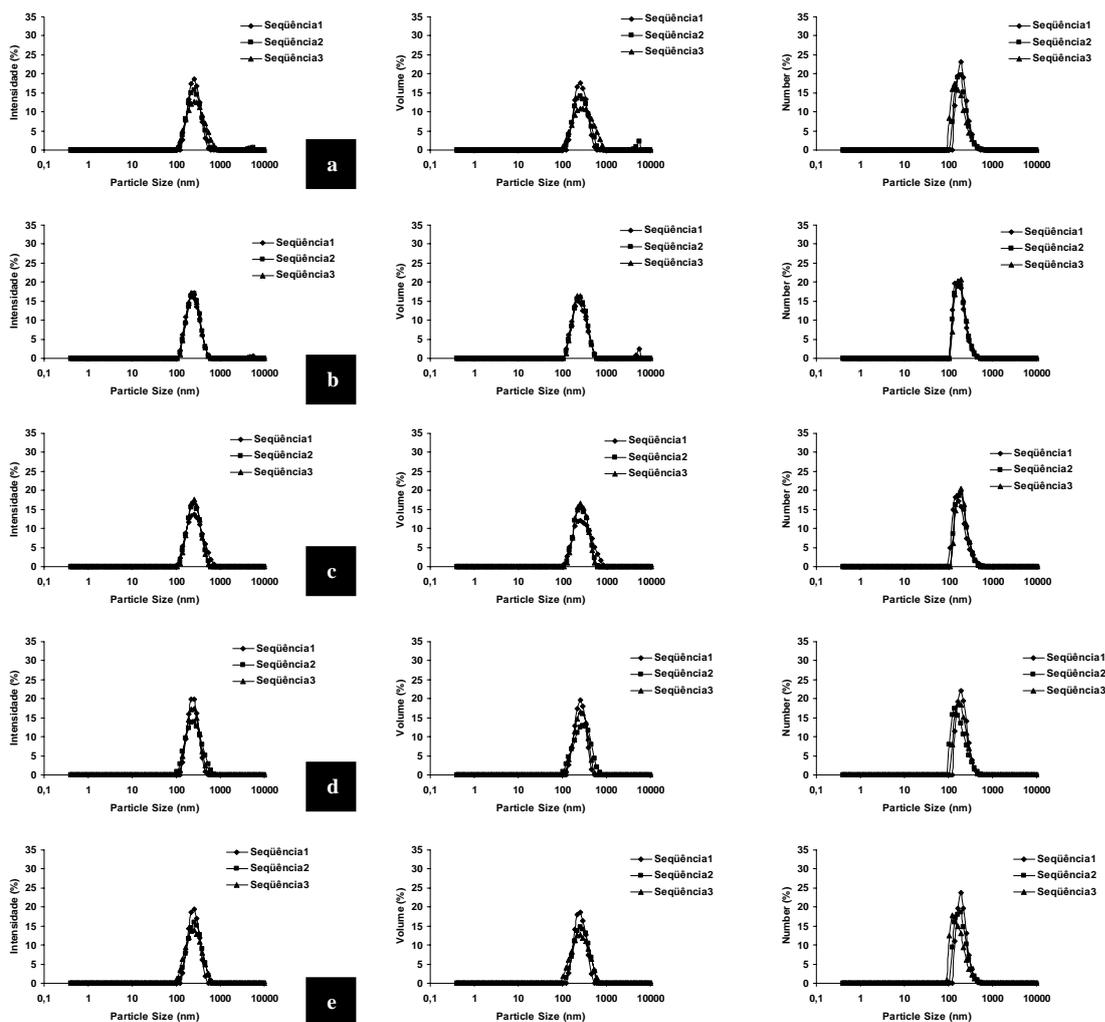


Figura 3. Distribuição de intensidade, volume e número de partícula das suspensões de nanocápsulas. (a) IC, (b) IIC, (c) IIC, (d) IVC, (e) VC.

Para as suspensões preparadas variando-se a concentração de monoestearato de sorbitano, o diâmetro das nanocápsulas permaneceu constante conforme a concentração de monoestearato foi aumentada.

5.1.2 Microscopia eletrônica de transmissão

A Figura 4 mostra a forma esférica das nanocápsulas das formulações IC a VC, preparadas variando-se a concentração de monoestearato de sorbitano.

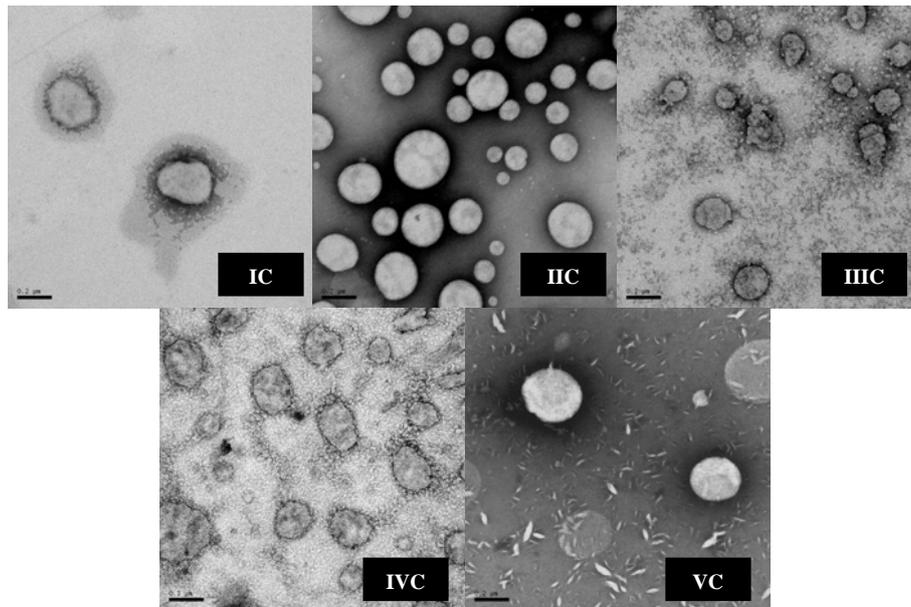


Figura 4. Fotomicrografias das suspensões obtidas com a variação da concentração do monoestearato de sorbitano, IC a VC.

5.1.3 Estudos de estabilidade

Para avaliar o comportamento das suspensões **IC** a **VC** frente aos fenômenos físico-químicos de desestabilização que afetam a homogeneidade de sistemas dispersos, as suspensões foram submetidas ao Turbiscan. Em todas as formulações analisadas a transmissão foi nula, portanto os resultados analisados estão relacionados aos perfis de BS. As análises de espalhamento múltiplo das duplicatas de cada suspensão estão reunidas no anexo 3.

Todos os perfis de retroespalhamento mostram suspensões altamente estáveis, visto que a intensidade relativa em função do tempo não variou mais de 10%, independentemente da variação da concentração de monoestearato de sorbitano nas formulações (Figuras 5 a 9).

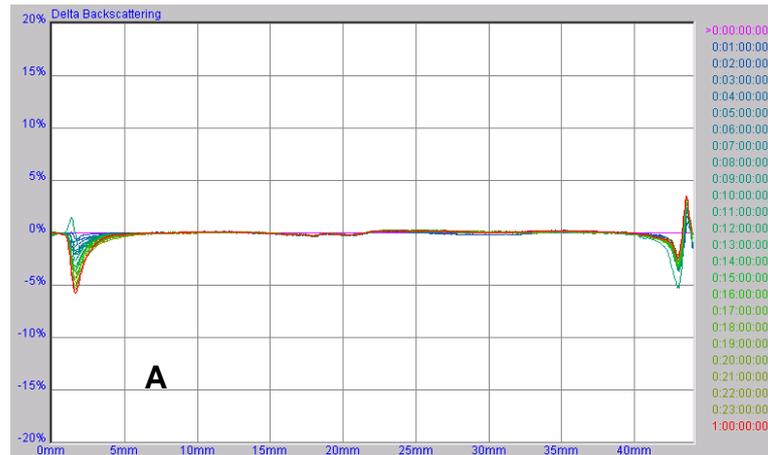


Figura 5. Dados de BS da suspensão **IC-I** (A). Os dados são representados em função do tempo (0:00 até 24:00 horas) e altura da amostra.

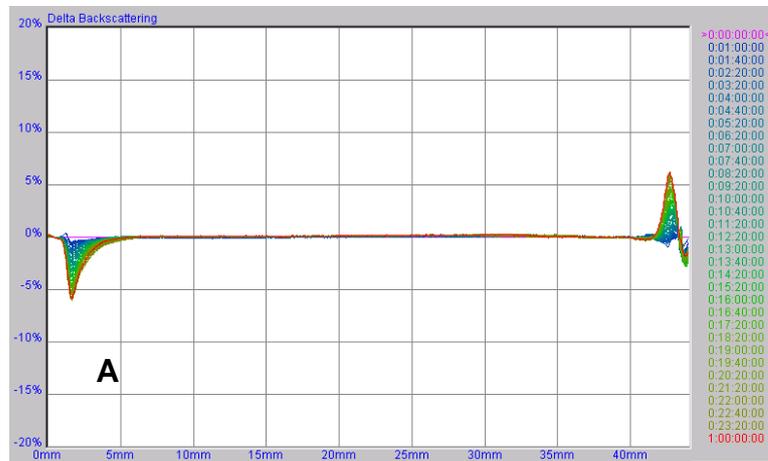


Figura 6. Dados de BS da suspensão **IIC-I** (A). Os dados são representados em função do tempo (0:00 até 24:00 horas) e altura da amostra.

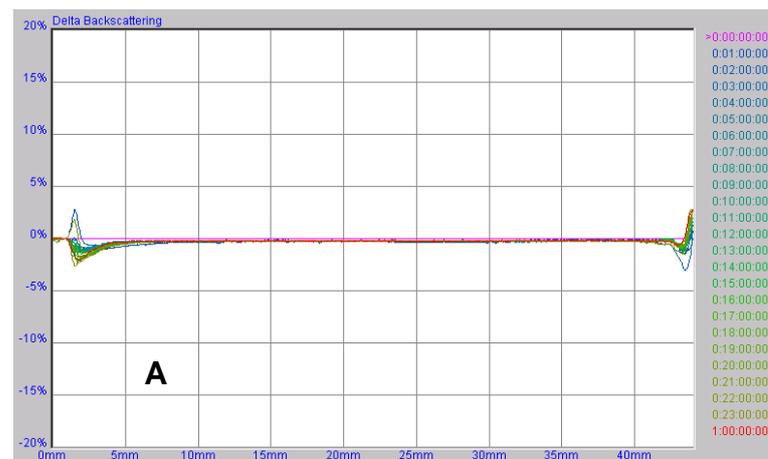


Figura 7. Dados de BS da suspensão **IIIC-I** (A). Os dados são representados em função do tempo (0:00 até 24:00 horas) e altura da amostra.

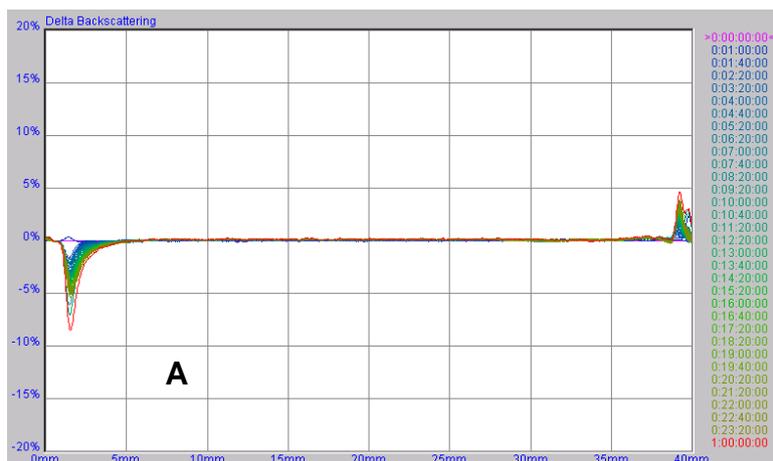


Figura 8. Dados de BS da suspensão **IVC-I** (A). Os dados são representados em função do tempo (0:00 até 24:00 horas) e altura da amostra.

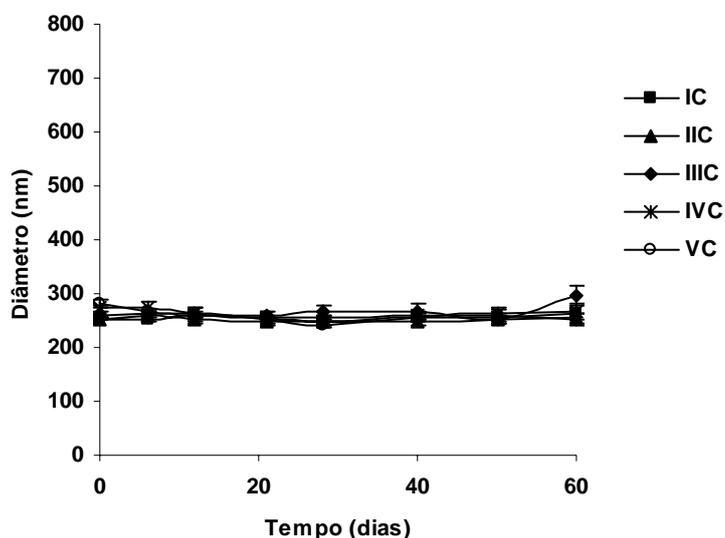


Figura 9. Dados de BS da suspensão **VC-I** (A). Os dados são representados em função do tempo (0:00 até 24:00 horas) e altura da amostra.

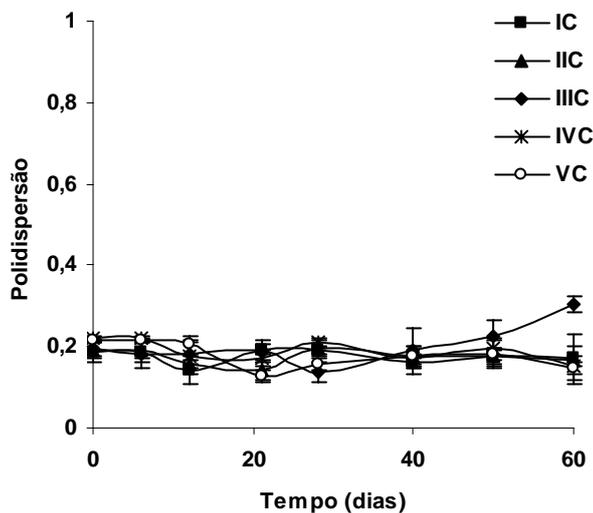
Os fenômenos de instabilidade relatados na literatura para dispersões analisadas pelo Turbiscan mostram variação de intensidade relativa em função do tempo acima de 10% (MENGUAL e col., 1999, LEMARCHAND e col., 2003; VIE e col., 2007). Dessa forma, pode-se inferir que as suspensões **IC** a **VC** são estáveis.

As suspensões de nanocápsulas preparadas com diferentes concentrações do monoestearato de sorbitano, **IC** a **VC**, que foram submetidas a análise por espalhamento múltiplo, foram também analisadas ao longo de 60 dias de armazenagem em relação ao diâmetro médio e a polidispersão utilizando espalhamento de luz dinâmico.

Ao longo dos 60 dias, pôde-se observar que não ocorreram alterações no diâmetro médio das nanopartículas para as formulações **IC** a **VC** (Figura 10a). Os diâmetros obtidos situaram-se entre 240 ± 2 e 296 ± 17 nm. Os sistemas apresentaram polidispersão entre $0,12 \pm 0,02$ e $0,30 \pm 0,02$ (Figura 10b).



(a)



(b)

Figura 10. Gráficos obtidos dos diâmetros (a) e das polidispersões (b) das suspensões IC a VC em função do tempo de armazenagem (n=3).

Com base nos resultados de diâmetro foi possível observar que com a variação da concentração de monoestearato de sorbitano, as suspensões mantiveram seu diâmetro médio durante os 60 dias de armazenamento, indicando que a preparação de nanocápsulas com a variação da concentração do monoestearato de sorbitano não levou à variação da distribuição do diâmetro e a aumentos significativos na polidispersão das nanopartículas.

Baseando-se nos resultados de espalhamento múltiplo e de posse dos resultados das análises de diâmetro acompanhadas por 60 dias, nós podemos observar que as análises de espalhamento múltiplo corroboram com os dados de diâmetro em função do tempo, demonstrando que variações de intensidade relativa de BS em 24h se correlacionam com estabilidade física de no mínimo 60 dias.

5.2 Influência da variação da concentração de monoestearato de sorbitano no perfil de consumo do éster etílico de indometacina

5.2.1 Perfis de consumo do éster etílico de indometacina a partir das diferentes suspensões de nanocápsulas.

Para avaliar a influência da concentração do monoestearato de sorbitano no comportamento de liberação do modelo de fármaco lipofílico a partir das diferentes suspensões de nanocápsulas, a reação interfacial de hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina foi acompanhada entre 5 e 1440 min. Através da análise dos perfis cinéticos, foi possível observar diferenças nos sistemas estudados. Os resultados demonstraram que quanto maior a concentração de monoestearato de sorbitano mais tempo foi necessário para o consumo total do éster etílico de indometacina (Figura 11).

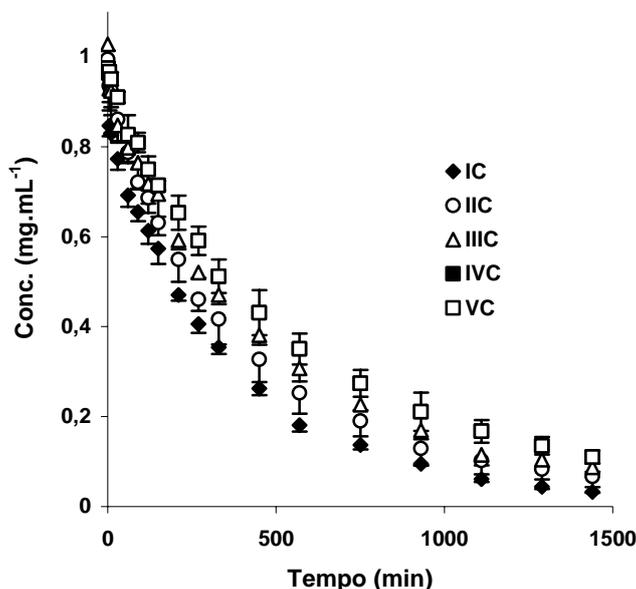


Figura 11. Consumo do éster etílico de indometacina a partir de nanocápsulas preparadas com diferentes concentrações de monoestearato de sorbitano (IC a VC).

5.2.2 Cinética do consumo do éster etílico de indometacina na reação de hidrólise interfacial

Com base nos resultados obtidos nas reações de hidrólise interfacial do éster etílico de indometacina associado aos colóides, realizou-se o ajuste dos pontos experimentais a uma equação monoexponencial, com a qual se pode acessar os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) do consumo do éster. As constantes cinéticas e os parâmetros calculados para o experimento de hidrólise do éster etílico de indometacina associado às nanocápsulas a partir das suspensões **IC** a **VC** estão reunidos na Tabela 3.

A variação da concentração de monoestearato de sorbitano levou a diferenças nas constantes cinéticas (Tabela 4). Foi observado que o aumento da concentração de monoestearato de sorbitano diminuiu a velocidade de consumo do éster etílico de indometacina, de $0,0035 \text{ min}^{-1} \pm 0,0002$ (**IC**) para $0,0018 \text{ min}^{-1} \pm$

0,0000 (**VC**), demonstrando que com a variação da concentração do monoestearato de sorbitano foi possível modular a velocidade do consumo do éster.

Tabela 4. Constantes cinéticas observadas (k) de consumo do éster etílico de indometacina a partir das suspensões IC a VC.

Parâmetro	IC - 1	IC - 2	IC - 3	Média	Desvio padrão
k (min^{-1})	0,0036	0,0033	0,0036	0,0035	0,0002
R	0,9944	0,9955	0,9947	0,9949	0,0006
MSC	2,2572	2,8177	2,7363	2,7088	0,1250
	IIC - 1	IIC - 2	IIC - 3	Média	Desvio padrão
k (min^{-1})	0,0028	0,0022	0,0030	0,0027	0,0004
R	0,9987	0,9953	0,9975	0,9972	0,0017
MSC	3,9531	3,8105	3,4311	3,7316	0,2698
	IIIC - 1	IIIC - 2	IIIC - 3	Média	Desvio padrão
k (min^{-1})	0,0024	0,0021	0,0020	0,0022	0,0002
R	0,9942	0,9957	0,9969	0,9956	0,0013
MSC	3,2531	3,2057	4,4601	3,6396	0,7109
	IVC - 1	IVC - 2	IVC - 3	Média	Desvio padrão
k (min^{-1})	0,0017	0,0020	0,0020	0,0019	0,0002
R	0,9984	0,9983	0,9974	0,9980	0,0005
MSC	4,1687	3,9410	4,1120	4,0739	0,1185
	VC - 1	VC - 2	VC - 3	Média	Desvio Padrão
k (min^{-1})	0,0018	0,0019	0,0018	0,0018	0,0000
R	0,9958	0,9968	0,9945	0,9957	0,0012
MSC	4,4790	4,7678	4,1495	4,4654	0,3094

A partir das constantes cinéticas obtidas, o tempo de meia-vida do consumo do éster etílico de indometacina liberado a partir das suspensões **IC** a **VC** foi determinado (Tabela 5).

Tabela 5. Tempos de meia-vida de consumo do éster etílico de indometacina a partir das suspensões IC a VC.

Parâmetro	IC - 1	IC - 2	IC - 3	Média	Desvio padrão
$t_{1/2}$ (min)	192	210	192	198	10
	IIC - 1	IIC - 2	IIC - 3	Média	Desvio padrão
$t_{1/2}$ (min)	247	315	231	264	44
	IIIC - 1	IIIC - 2	IIIC - 3	Média	Desvio padrão
$t_{1/2}$ (min)	289	330	346	322	29
	IVC - 1	IVC - 2	IVC - 3	Média	Desvio padrão
$t_{1/2}$ (min)	408	346	346	367	35
	VC - 1	VC - 2	VC - 3	Média	Desvio Padrão
$t_{1/2}$ (min)	385	365	385	378	12

Após acessar-se o tempo de meia-vida do consumo do éster etílico de indometacina para as suspensões **IC** a **VC**, foi observado que com o aumento da concentração do monoestearato de sorbitano mais lento tornou-se o consumo do éster. Traçando-se a concentração de monoestearato de sorbitano *versus* o tempo de meia-vida, o melhor ajuste dos pontos é obtido através de uma correlação logarítmica com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9898 (Figura 12).

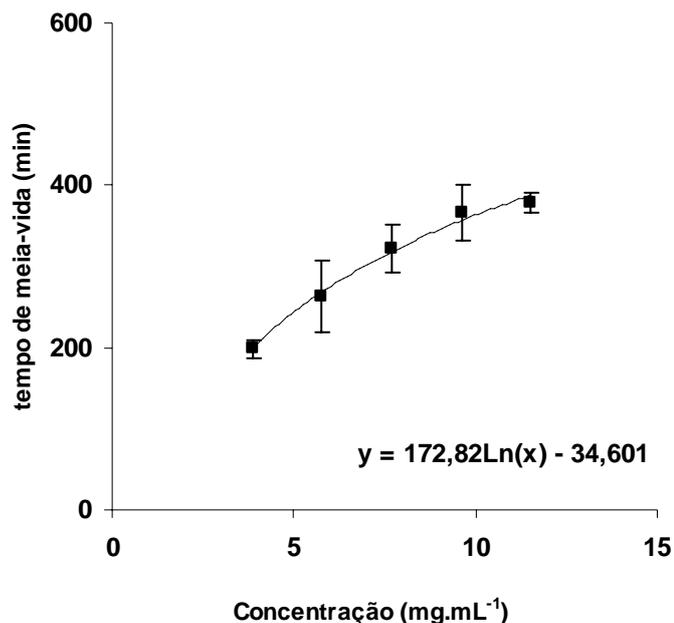


Figura 12. Gráfico da correlação logarítmica obtida entre o tempo de meia-vida *versus* a concentração de monoestearato de sorbitano utilizada na preparação das suspensões IC a VC (n=3).

5.2.3 Determinação do mecanismo de liberação do éster etílico de indometacina

Métodos empíricos para descrever a liberação de fármacos são direcionados por observações experimentais e baseados em considerações teóricas (WASHINGTON, 1990). KORSMEYER e colaboradores (1983) propuseram um modelo semi-empírico simples desenvolvido com base nas leis de Fick para estudar a liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos.

Os perfis cinéticos da hidrólise interfacial do éster etílico de indometacina associado às suspensões **IC** a **VC** foram avaliados segundo este modelo através da modelagem matemática dos dados experimentais. A modelagem permitiu a obtenção das curvas ft em função do tempo e os parâmetros a e n . Os parâmetros calculados segundo a lei da potência para o experimento de hidrólise do éster etílico de indometacina associado às suspensões de nanocápsulas **IC** a **VC**, estão reunidos na Tabela 6.

Para todos as suspensões estudadas obteve-se um ajuste satisfatório dos dados experimentais ao modelo da Lei da Potência, uma vez que os coeficientes de correlação foram superiores a 0,9946 e os MSC maiores que 4,32. Os expoentes de liberação, n , obtidos para as suspensões **IC** a **VC** variaram entre 0,51 e 0,67, caracterizando o fenômeno de transporte anômalo para sistemas de geometria esférica, o que indica que o mecanismo de liberação para estes sistemas esta relacionado com a sobreposição dos fenômenos de difusão do fármaco e inchamento do polímero.

Tabela 6. Parâmetros da modelagem matemática das suspensões IC a VC utilizando o modelo da lei da potência.

Parâmetro	IC - 1	IC - 2	IC - 3	Média	Desvio padrão
<i>a</i>	0,032	0,028	0,033	0,031	0,003
<i>n</i>	0,51	0,53	0,50	0,51	0,01
R	0,9979	0,9949	0,9963	0,9964	0,0015
MSC	5,15	4,22	4,54	4,64	0,47
	IIC - 1	IIC - 2	IIC - 3	Média	Desvio padrão
<i>a</i>	0,029	0,017	0,015	0,020	0,007
<i>n</i>	0,53	0,61	0,61	0,58	0,05
R	0,9976	0,9984	0,9933	0,9964	0,0027
MSC	4,96	5,39	3,91	4,75	0,76
	IIIC - 1	IIIC - 2	IIIC - 3	Média	Desvio padrão
<i>a</i>	0,042	0,027	0,019	0,030	0,012
<i>n</i>	0,45	0,51	0,57	0,51	0,06
R	0,9972	0,9961	0,9905	0,9946	0,0036
MSC	4,81	4,53	3,62	4,32	0,62
	IVC - 1	IVC - 2	IVC - 3	Média	Desvio padrão
<i>a</i>	0,011	0,014	0,013	0,013	0,001
<i>n</i>	0,63	0,61	0,62	0,62	0,01
R	0,9957	0,9956	0,9948	0,9954	0,0005
MSC	4,41	4,39	4,23	4,34	0,10
	VC - 1	VC - 2	VC - 3	Média	Desvio Padrão
<i>a</i>	0,007	0,012	0,007	0,009	0,003
<i>n</i>	0,69	0,62	0,69	0,67	0,04
R	0,9958	0,9968	0,9945	0,9957	0,0012
MSC	4,48	4,77	4,15	4,46	0,31

Os resultados demonstraram que a técnica de PCS não tem resolução para determinar a variação do diâmetro de partículas decorrente do inchamento da parede, pois os diâmetros e a polidispersão observados durante a hidrólise mantiveram-se constantes ($p < 0,05$) (Figuras 13, 14, 15, 16 e 17).

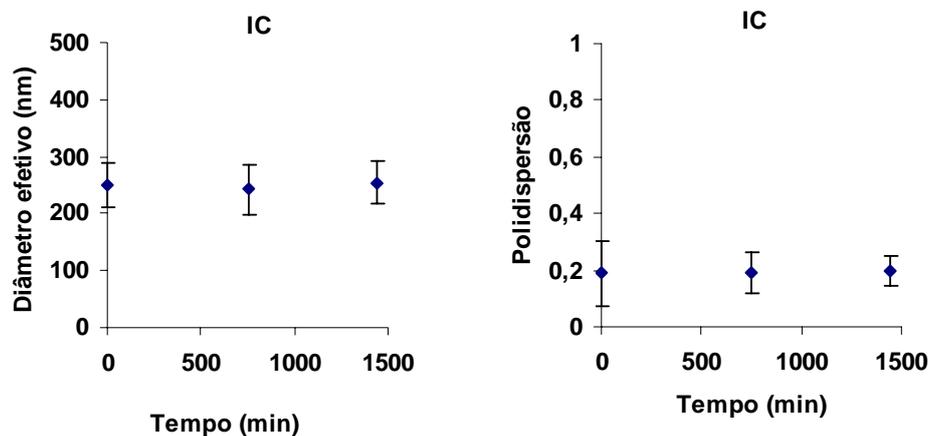


Figura 13. Diâmetro efetivo e polidispersão das suspensões IC durante a hidrólise alcalina ($n=3$).

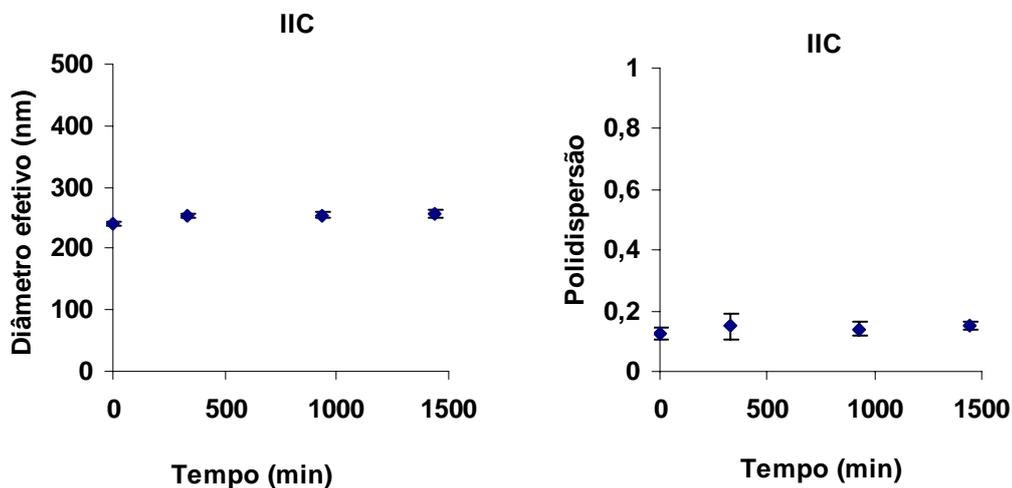


Figura 14. Diâmetro efetivo e polidispersão das suspensões IIC durante a hidrólise alcalina ($n=3$).

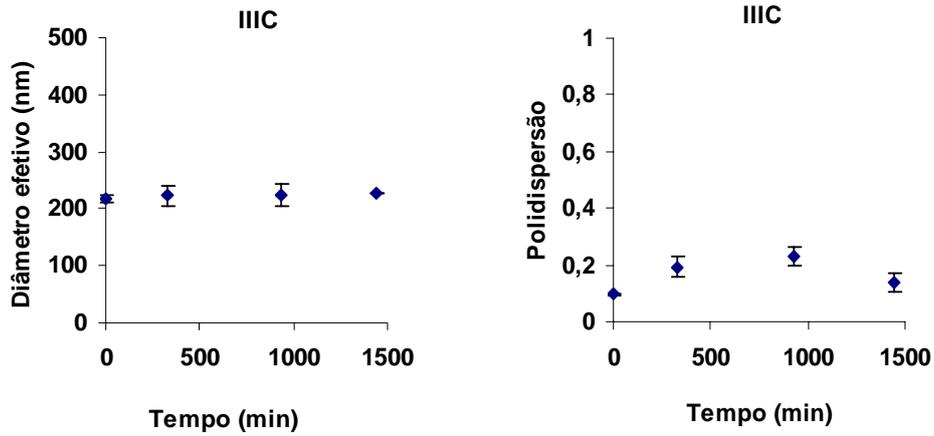


Figura 15. Diâmetro efetivo e polidispersão das suspensões IIC durante a hidrólise alcalina (n=3).

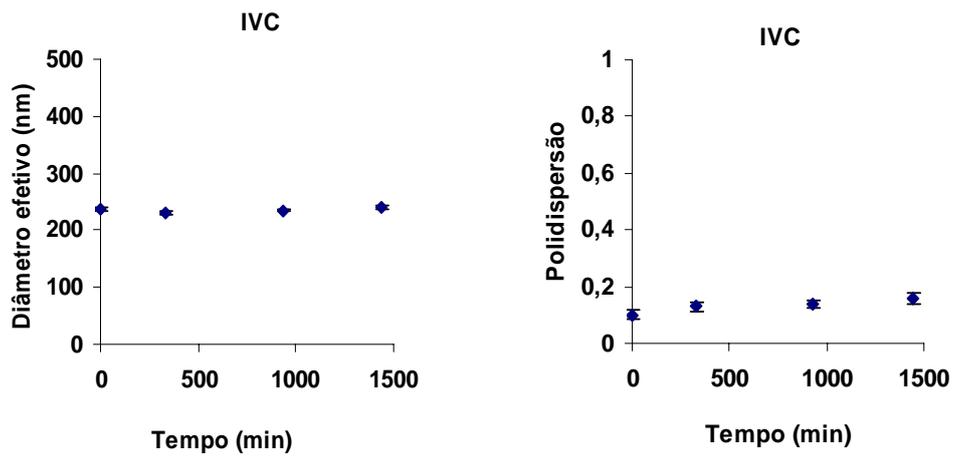


Figura 16. Diâmetro efetivo e polidispersão das suspensões IVC durante a hidrólise alcalina (n=3).

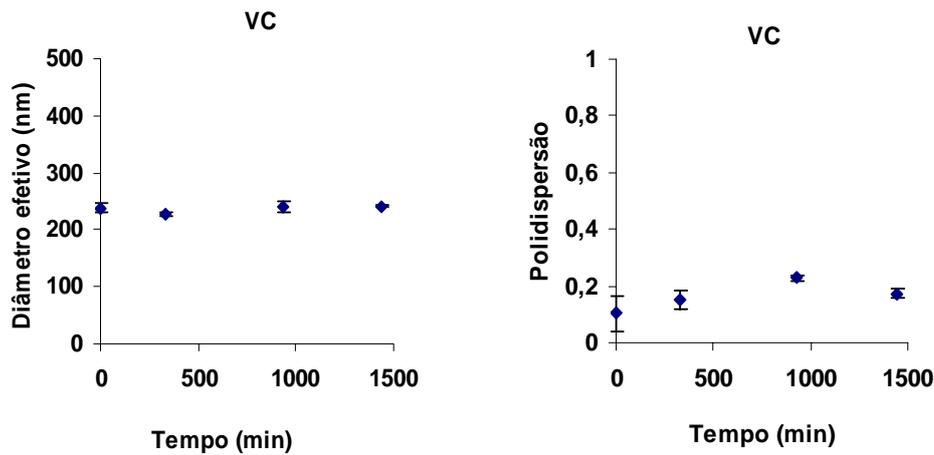


Figura 17. Diâmetro efetivo e polidispersão das suspensões VC durante a hidrólise alcalina (n=3).

5.3 Turbidimetria

A determinação do número de partículas é importante na caracterização de nanopartículas (EPSTEIN e col., 2006). Além do tamanho, o número de partículas pode afetar a absorção, clearance e a distribuição de fármacos (JURKIEWICZ e col., 2003). Além disso, conhecendo-se o número de partículas pode-se determinar a área superficial do sistema (VAUTHIER e col., 1999), um parâmetro importante para considerações a respeito do comportamento de liberação de ativos.

Para as suspensões **IC** a **VC** com o aumento da concentração de monoestearato de sorbitano de 3,85 a 11,5 mg.mL⁻¹, o diâmetro das nanocápsulas foi constante entre 249 ± 21 nm e 265 ± 19 nm. Dessa forma, a concentração de partículas em suspensão deve ser diferente e provavelmente maior conforme o aumento da concentração do monoestearato de sorbitano.

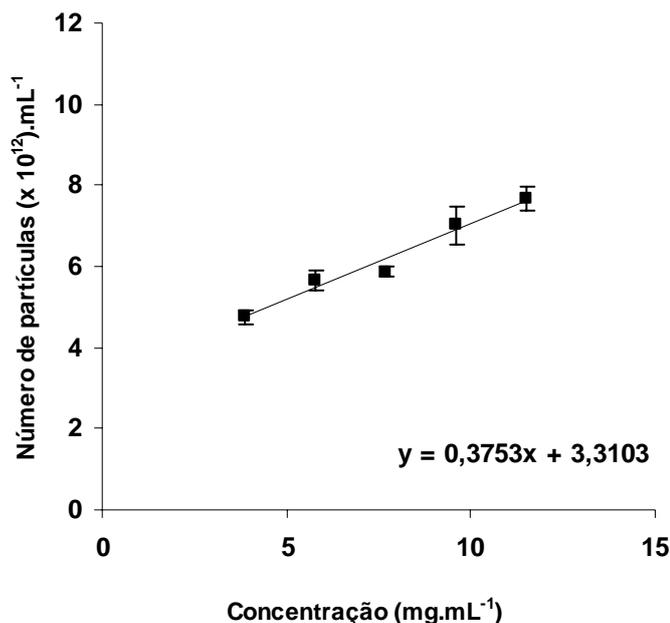
Para avaliar se o aumento da concentração do monoestearato de sorbitano influenciou o número de partículas por unidade de volume, um ensaio de

turbidimetria foi realizado para a determinação da concentração de partículas nas suspensões (POLETTO e col., 2008).

Foi observado que com o aumento da concentração do monoestearato de sorbitano (3,85 a 11,5 mg/mL) o número de partículas por unidade de volume variou de $4,76 \times 10^{12}$ partículas.mL⁻¹ a $7,68 \times 10^{12}$ partículas.mL⁻¹ (Tabela 7). Plotando-se a concentração de monoestearato de sorbitano *versus* o número de partículas obteve-se correlação linear com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9711 (Figura 18).

Tabela 7. Diâmetro, α , k , NW e número de partículas por unidade de volume para nanocápsulas preparadas com aumento da concentração de monoestearato de sorbitano (n=3).

Suspensões	Diâmetro (nm)	α (g.cm ⁻³)	k (cm ² .g ⁻¹)	NW (partículas.cm ⁻³) x 10 ¹¹	N (partículas.cm ⁻³) x 10 ¹²
IC	265 ± 19	0,9924	4960 ± 185	9,65 ± 0,37	4,76 ± 0,18
IIC	256 ± 18	0,9927	4810 ± 345	10,7 ± 0,04	5,66 ± 0,24
IIIC	246 ± 17	0,9930	4386 ± 116	9,6 ± 0,19	5,87 ± 0,11
IVC	251 ± 22	0,9932	3913 ± 199	10,3 ± 0,69	7,01 ± 0,49
VC	249 ± 21	0,9935	3634 ± 302	9,96 ± 0,35	7,68 ± 0,28

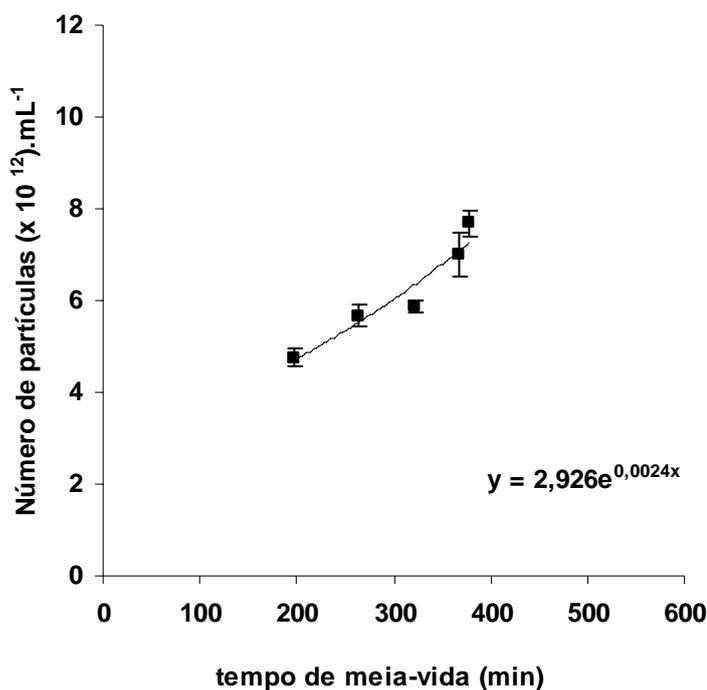


(a)

Figura 18. Gráfico da correlação obtida entre a concentração e o número de partículas das nanocápsulas preparadas com a variação do monoestearato de sorbitano (n=3).

A hipótese acima levantada foi validada. A variação da concentração de monoestearato de sorbitano levou à formação de partículas com média e distribuição de tamanhos semelhantes, mas com concentrações diferentes, o que pode também ser devido a formação de outras nanoestruturas que não as nanocápsulas. Foi possível observar ainda que, quanto maior a concentração de monoestearato maior a concentração de partículas na suspensão.

Adicionalmente, verificou-se que o número de partículas por unidade de volume e o tempo de meia-vida se correlacionaram exponencialmente ($R^2 = 0,9288$) (Figura 19). Quanto maior o número de partículas mais lenta foi a liberação. O aumento da concentração do tensoativo de baixo EHL pode ter levado à formação concomitante de micelas de tensoativo, conforme proposto por outros autores (PINTO-ALPHANDARY e col., 1995; MOSQUEIRA e col., 2000; VAN ZIHL e col., 2004).



(a)

Figura 19. Gráfico da correlação obtida entre o número de partículas das nanocápsulas *versus* tempo de meia-vida para as suspensões preparadas com a variação do monoesterato de sorbitano (n=3).

5.4 Determinação da área superficial

Tendo em vista que o número e o diâmetro médio de partículas foram determinados para as suspensões **IC** a **VC**, a área superficial de cada sistema poderia explicar diferenças na cinética de consumo do éster etílico de indometacina.

Para as suspensões **IC** a **VC** a área superficial aumentou de $1,05 \times 10^4$ cm².cm⁻³ a $1,50 \times 10^4$ cm².cm⁻³ (Tabela 8) com o aumento da concentração do monoestearato de sorbitano.

Tabela 8. Diâmetro, número de partículas e área superficial para nanocápsulas preparadas com aumento da concentração de monoestearato de sorbitano (n=3).

Suspensões	Diâmetro (nm)	N (partículas.cm ⁻³) x10 ¹²	S (cm ² .cm ⁻³) x 10 ⁴
IC	265 ± 19	4,76 ± 0,18	1,05 ± 0,04
IIC	256 ± 18	5,66 ± 0,24	1,16 ± 0,05
IIIC	246 ± 17	5,87 ± 0,11	1,12 ± 0,02
IVC	251 ± 22	7,01 ± 0,49	1,39 ± 0,09
VC	249 ± 21	7,68 ± 0,28	1,50 ± 0,05

Para as suspensões **IC** a **VC** o diâmetro médio das partículas não variou, e o número de partículas por unidade de volume, assim como a área superficial, aumentaram conforme foi aumentada a concentração do monoestearato de sorbitano. Mesmo com o aumento da área superficial, o consumo do éster etílico de indometacina foi retardado. Considerando que o monoestearato está disperso no núcleo das nanocápsulas (MULLER e col., 2001; CRUZ e col., 2006b), poder-se-ia levantar a hipótese de que a difusão do éster etílico de indometacina seria influenciada pelo aumento da concentração de monoestearato de sorbitano no núcleo das nanocápsulas. Desta forma, a viscosidade do núcleo estaria influenciando a liberação do éster etílico de indometacina. Para verificar esta hipótese, um experimento foi realizado, misturando-se quantidades crescentes de monoestearato de sorbitano no óleo e medindo-se a viscosidade da mistura. Os resultados mostraram que variando-se a concentração de monoestearato em óleo de 5 a 25 mg.mL⁻¹ a viscosidade aumentou de 23 a 32 cP. Considerando todos os resultados, o fluxo e a permeabilidade relativa do éster de indometacina deveriam variar conforme o aumento da concentração de monoestearato.

5.5 Fluxo e permeabilidade aparente

Para as suspensões preparadas com a variação da concentração do monoestearato de sorbiano **IC** a **VC**, o J calculado para as nanocápsulas diminuiu de $10,50 \times 10^{-10} \text{ mol.s}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ (IC) até $6,37 \times 10^{-10} \text{ mol.s}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ (VC) com o aumento da concentração do monoestearato de sorbitano (Tabela 9).

Tabela 9. Parâmetros da determinação do fluxo steady-state (J) das suspensões IC a VC (n=3).

Parâmetro	IC - 1	IC - 2	IC - 3	Média	Desvio padrão
$-SJ (x 10^{-5} \text{ mol.s}^{-1})$	2,203	2,182	2,226	2,204	0,002
R	0,9564	0,9651	0,9601	0,9605	0,0044
$J (x 10^{-10} \text{ mol.s}^{-1}.\text{cm}^2)$	10,50	10,40	10,60	10,50	0,1
	IIC - 1	IIC - 2	IIC - 3	Média	Desvio padrão
$-SJ (x 10^{-5} \text{ mol.s}^{-1})$	2,236	2,061	2,176	2,157	0,009
R	0,9651	0,9583	0,9644	0,9626	0,0038
$J (x 10^{-10} \text{ mol.s}^{-1}.\text{cm}^2)$	9,60	8,85	9,34	9,26	0,38
	IIIC - 1	IIIC - 2	IIIC - 3	Média	Desvio padrão
$-SJ (x 10^{-5} \text{ mol.s}^{-1})$	1,925	1,828	2,009	1,920	0,009
R	0,9564	0,9658	0,9708	0,9643	0,0073
$J (x 10^{-10} \text{ mol.s}^{-1}.\text{cm}^2)$	8,63	8,19	9,00	8,61	0,40
	IVC - 1	IVC - 2	IVC - 3	Média	Desvio padrão
$-SJ (x 10^{-5} \text{ mol.s}^{-1})$	1,796	1,954	1,999	1,916	0,011
R	0,9820	0,9774	0,9768	0,9787	0,0028
$J (x 10^{-10} \text{ mol.s}^{-1}.\text{cm}^2)$	6,48	7,04	7,21	6,91	0,38
	VC - 1	VC - 2	VC - 3	Média	Desvio Padrão
$-SJ (x 10^{-5} \text{ mol.s}^{-1})$	1,923	1,964	1,830	1,906	0,007
R	0,9839	0,9834	0,9840	0,9838	0,0003
$J (x 10^{-10} \text{ mol.s}^{-1}.\text{cm}^2)$	6,43	6,57	6,12	6,37	0,23

A diminuição dos valores de J demonstra que o aumento da concentração do monoestearato de sorbitano leva ao aumento da resistência a difusão, ou seja, com o aumento da viscosidade do núcleo oleoso, a difusão do éster torna-se menor

conforme o tempo. Este resultado valida a hipótese levantada anteriormente de que o monoestearato estaria influenciando na difusão do éster.

A partir dos dados de J obtidos para as suspensões **IC** a **VC**, a permeabilidade aparente, P_{app} , ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) foi então calculada para as suspensões de nanocápsulas. Para as suspensões preparadas com a variação da concentração do monoestearato de sorbitano, a permeabilidade aparente, diminuiu de $4,26 \times 10^{-7} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ (IC) até $2,54 \times 10^{-7} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ (VC) com o aumento da concentração do monoestearato de sorbitano (Tabela 10). Uma correlação linear ($R^2 = 0,9894$) foi obtida plotando-se P_{app} versus o tempo de meia-vida de consumo do éster etílico de indometacina (Figura 20).

Tabela 10. Permeabilidade aparente (P_{app}) versus a concentração de monoestearato de sorbitano das suspensões IC a VC (n=3).

Parâmetro	IC - 1	IC - 2	IC - 3	Média	Desvio padrão
$P_{app} (x 10^{-7} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$	4,26	4,21	4,30	4,26	0,04
	IIC - 1	IIC - 2	IIC - 3	Média	Desvio padrão
$P_{app} (x 10^{-7} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$	3,75	3,41	3,63	3,60	0,17
	IIIC - 1	IIIC - 2	IIIC - 3	Média	Desvio padrão
$P_{app} (x 10^{-7} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$	3,21	3,13	3,37	3,23	0,13
	IVC - 1	IVC - 2	IVC - 3	Média	Desvio padrão
$P_{app} (x 10^{-7} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$	2,59	2,81	2,82	2,74	0,13
	VC - 1	VC - 2	VC - 3	Média	Desvio Padrão
$P_{app} (x 10^{-7} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$	2,64	2,54	2,48	2,54	0,07

Estes resultados demonstram que a variação da concentração do monoestearato de sorbitano disperso no núcleo das nanocápsulas, controla a velocidade de consumo do éster etílico de indometacina porque altera a permeabilidade aparente das nanocápsulas.

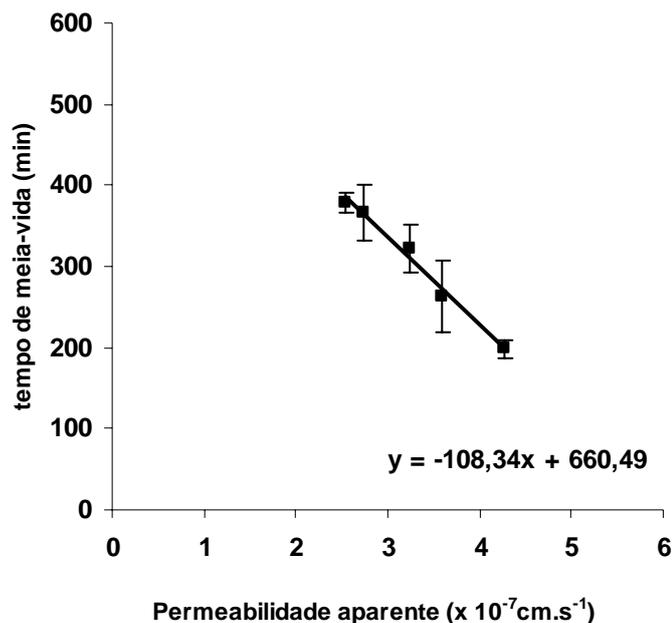


Figura 20. Gráfico da correlação obtida entre a permeabilidade aparente *versus* o tempo de meia-vida das suspensões IC a VC (n=3).

5.6 Estudos de densidade

Nas seções anteriores foi levantada a hipótese de que nas suspensões de nanocápsulas, preparadas com elevadas concentrações do monoestearato de sorbitano, houvesse uma mistura de diferentes tipos de partículas, provavelmente partículas lipídicas concomitantes com nanocápsulas. Desta forma, a ultracentrifugação isopícnica foi realizada em um gradiente de densidade de Percoll[®], primeiramente para confirmar a formação das nanocápsulas e posteriormente para identificar a presença de outras nanoestruturas.

Assim, inicialmente foram preparadas três formulações coloidais diferentes sem adição do éster etílico de indometacina: nanoemulsão, nanoesferas e nanocápsulas (Tabela 11). A Figura 21 mostra uma ilustração dos resultados de ultracentrifugação para cada uma das formulações: nanoemulsão, nanoesferas e nanocápsulas, assim como o resultado observado para o tubo de marcadores de densidade (*Density Marker Beads*).

Tabela 11. Suspensões coloidais, suas composições e suas características físico-químicas (n=3).

Formulações*	PCL (mg)	óleo (mg)	Densidade (g.mL ⁻¹)	Diâmetro** (nm)	Polidispersão
Nanoemulsão	-	312	0,9554	256 ± 34	0,29
Nanoesferas	100	-	1,0770	180 ± 15	0,15
Nanocápsulas	100	312	0,9890	254 ± 12	0,17

* Todas as formulações foram preparadas com 77 mg de monoestearato de sorbitano e 77 mg de Polissorbato 80.

** Diâmetro médio de partículas medido após preparação.

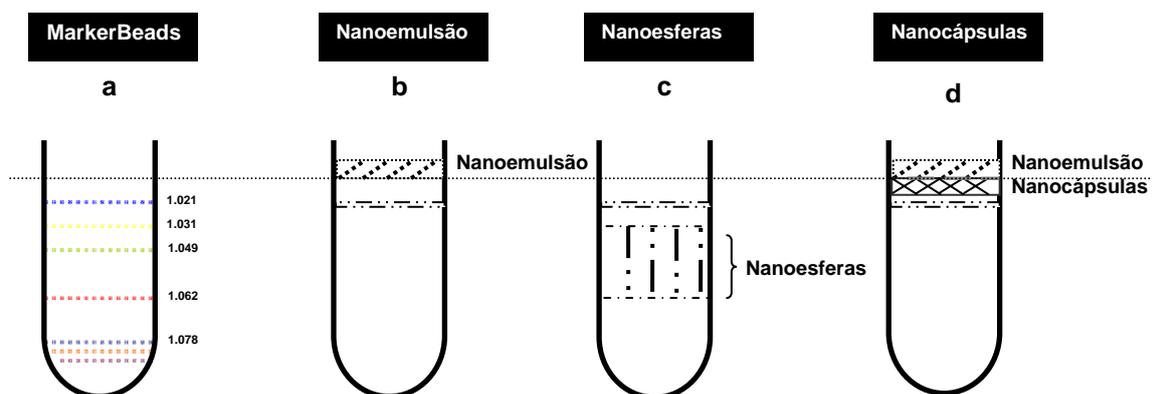


Figura 21. Ilustração dos resultados de ultracentrifugação em presença de gradiente de densidade: a) marcadores e suas densidades (g.mL⁻¹), b) nanoemulsão, c) nanoesferas e d) nanocápsulas.

Os marcadores são comerciais e apresentam diferentes cores para diferentes densidades (Figura 21a). Para a nanoemulsão, observou-se uma banda na altura do menisco (Figura 21b). O resultado é devido à baixa densidade do triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico (0,945 g.mL⁻¹) em comparação à densidade inicial dos marcadores (1,021 g.mL⁻¹). Para essa formulação foi, ainda, observada uma segunda população localizada a 4-5 mm abaixo da primeira, apresentando densidade de 1,021 g.mL⁻¹ (Figura 21b). Para as nanoesferas, uma banda alargada foi observada a 14 mm do menisco. A faixa de densidade para essa banda foi determinada entre 1,031 e 1,063 g.mL⁻¹ (Figura 21c). Esse resultado está

de acordo com relatos anteriores (CHOUINARD e col. 1994 e MOSQUEIRA e col., 2000), confirmando que a densidade das nanoesferas é maior devido à estrutura matricial polimérica. Neste caso, as nanoesferas são maciças e não ocas. Ainda para a formulação de nanoesferas foi observada a banda de densidade de $1,021 \text{ g.mL}^{-1}$, como aquela observada após ultracentrifugação da nanoemulsão (Figura 21c). Finalmente, para as nanocápsulas (Figura 21d), uma banda a 1-3 mm do menisco foi observada, apresentando densidade entre $1,015$ e $1,018 \text{ g.mL}^{-1}$ (Tabela 11). Essa densidade intermediária, entre a da nanoemulsão e das nanoesferas, confirma a presença de estruturas que são constituídas de polímero disposto ao redor do núcleo oleoso (CHOUINARD e col., 1994; MOSQUEIRA e col., 2000). Ainda para a formulação de nanocápsulas, foi observada uma banda na altura do menisco, idêntica à banda observada para a nanoemulsão, indicando a presença concomitante de nanoemulsão nessa formulação preparada nessas condições. Também nessa formulação a banda com densidade de $1,021 \text{ g.mL}^{-1}$ foi observada (Figura 21), indicando que além de nanocápsulas e nanoemulsão existe um outro tipo de nanoestrutura na formulação. A ausência de banda na região de densidade entre $1,031$ e $1,063 \text{ g.mL}^{-1}$ confirmou que não houve formação de nanoesferas durante o processo de preparação e, ainda, que nanoesferas não se equilibram com nanocápsulas e nanoemulsão. Assim, pode-se sugerir que a nanoemulsão foi formada durante a preparação das nanocápsulas. Todo o polímero nessa formulação está depositado na interface gotícula/água, formando as nanocápsulas, sem precipitação simultânea, o que poderia ocasionar a formação de nanoesferas (MOSQUEIRA e col., 2000). Trabalhos anteriores (QUINTANAR-GUERRERO e col., 1998; CHOUINARD e col., 1994) já haviam relatado que nanoesferas não estão presentes em formulações de nanocápsulas. No entanto, tais resultados foram obtidos através de dupla centrifugação antes da ultracentrifugação na presença do gradiente para concentrar as suspensões.

A presença de uma banda fina com mesma densidade para todas as formulações (nanoemulsão, nanoesferas e nanocápsulas) sugere que uma mesma população de nanoestruturas está presente em todas as formulações. Esse contaminante poderia ser uma dispersão de monoestearato de sorbitano estabilizada por polissorbato 80. Desta forma, foi preparada uma formulação contendo apenas os dois tensoativos, chamada de nanodispersão. Após a

ultracentrifugação da nanodispersão, uma banda com densidade de $1,021 \text{ g.mL}^{-1}$ foi observada (Figura 22). O resultado confirmou a hipótese levantada acima. Todas as formulações apresentam nanodispersão (Figura 22).

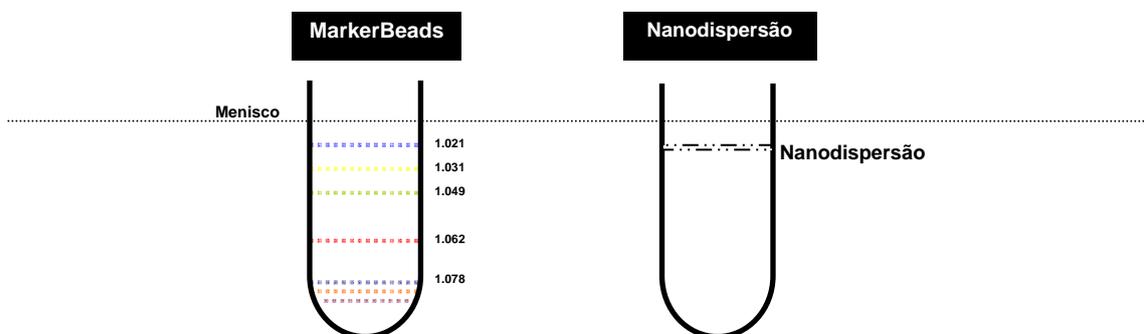


Figura 22. Ilustração dos resultados de gradiente de densidade para a nanodispersão.

Com base nos resultados observados, foi realizada a ultracentrifugação das suspensões preparadas com a variação da concentração do monoestearato de sorbitano (**IC a VC**) em presença de gradiente de densidade. Para estas suspensões foi evidenciado que uma população de nanoemulsão está presente na preparação das nanocápsulas, devido ao aparecimento de uma banda no menisco para todas as formulações (Figura 23). Uma segunda banda com densidade entre $1,015$ e $1,018 \text{ g.mL}^{-1}$, e abaixo da banda de nanoemulsão foi observada e correspondente às nanocápsulas nas formulações. Nenhuma das formulações de nanocápsulas **IC a VC** apresentou banda na região de densidade das nanoesferas. Desta forma, os resultados demonstraram que nem a presença do éster etílico de indometacina nas nanocápsulas, nem a variação da concentração do monoestearato de sorbitano levaram à formação de nanoesferas nas suspensões. Em todas as suspensões, mais evidente para **IIC a VC**, foi observada uma banda fina posicionada abaixo da banda de nanocápsulas com densidade de $1,021 \text{ g.mL}^{-1}$, ou seja semelhante à banda da nanodispersão descrita acima. Assim, é provável que haja um excesso de monoestearato de sorbitano nas suspensões **IIC a VC**, organizado na forma de nanodispersão. Não foram observadas diferenças em relação à intensidade ou distribuição das bandas no gradiente para as suspensões **IC a VC**.

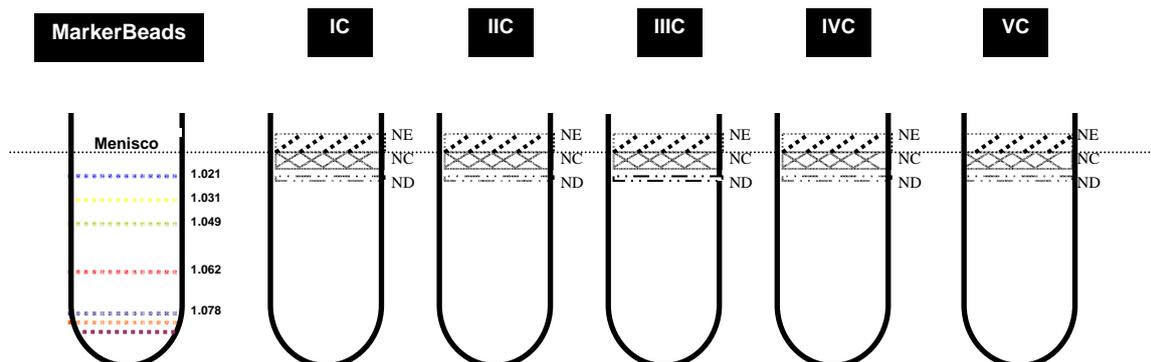


Figura 23. Ilustração dos resultados de ultracentrifugação em presença de gradiente de densidade para as suspensões IC a VC.

Com base nos resultados obtidos, foi possível constatar que a hipótese anteriormente levantada é verdadeira. Nas suspensões de nanocápsulas preparadas com elevadas concentrações do monoestearato de sorbitano há uma mistura de diferentes tipos de partículas.

Com o objetivo de acessar os valores médios de massa das partículas, as bandas após ultracentrifugação foram coletadas e os diâmetros médios das partículas determinados por espalhamento de luz dinâmico. Para as formulações de nanoemulsão, nanoesferas, nanocápsulas e nanodispersão, preparadas sem éster etílico de indometacina, antes da ultracentrifugação, os diâmetros médios de partículas se apresentaram entre 128 e 258 nm e os índices de polidispersão menores que 0,29 (Tabela 12).

Tabela 12. Determinação do diâmetro médio de partículas e polidispersão das formulações preparadas sem éster etílico de indometacina (n=3).

Formulações	Diâmetro (nm)	Polidispersão
Nanoemulsão	256 ± 34	0,29
Nanoesferas	180 ± 15	0,15
Nanocápsulas	254 ± 12	0,17
Nanodispersão	128 ± 3	0,27

Antes da determinação do diâmetro médio de cada banda, foi medido o diâmetro médio das partículas do Percoll[®] 54% (v/v) em NaCl (0,15 M). A distribuição de tamanhos pode ser observada na Figura 24. O valor médio foi de 38 ± 1 nm, estando de acordo com relato anterior, que determinou para o gradiente de Percoll[®] em NaCl 0,15M um diâmetro médio de 30 nm (PERTOFT e col., 2000).

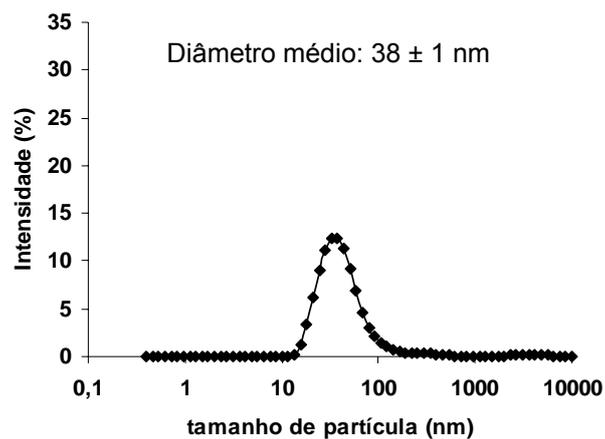


Figura 24. Gráfico da distribuição de diâmetro de partículas do Percoll[®] 54% (v/v) em NaCl (0,15 M).

Uma vez determinado o perfil de distribuição de tamanho das partículas do gradiente de centrifugação, a formulação de nanoemulsão foi analisada (Figura 25a). Desta forma, os perfis de tamanho de partículas das bandas de nanoemulsão e de nanodispersão podem ser observados nas Figuras 25b e 25c. O diâmetro médio de partículas da banda de nanoemulsão foi de 214 ± 18 nm, enquanto que o diâmetro médio da banda de nanodispersão foi de 143 ± 18 nm. O valor médio de massa da nanoemulsão foi calculado conforme item **4.2.11**, compreendeu valor de $4,83 \times 10^{-15}$ g.

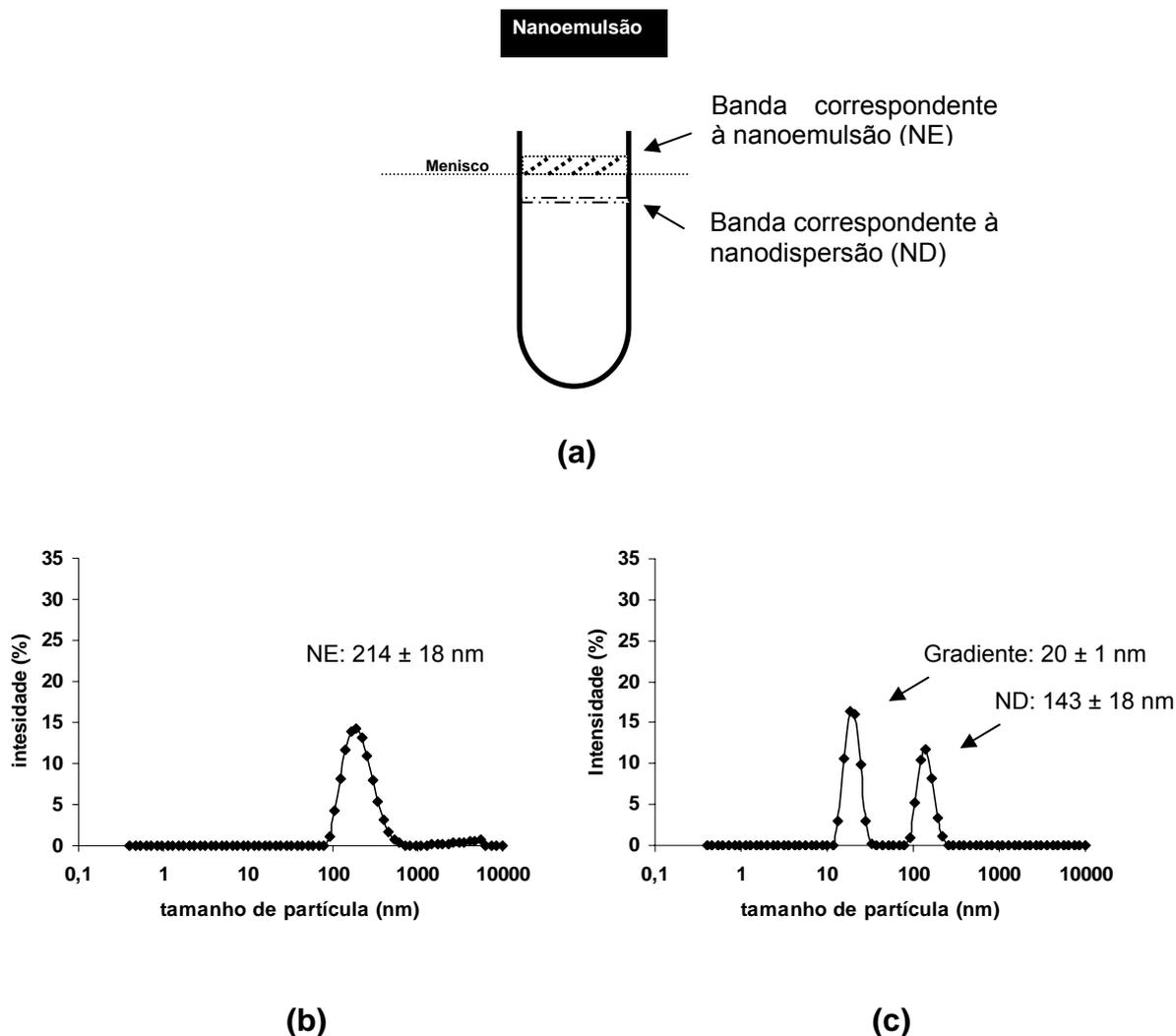


Figura 25. Figura ilustrativa das alíquotas retiradas da formulação de nanoemulsão (a) para a determinação dos perfis de tamanhos de partículas da banda de nanoemulsão (b) e da banda de nanodispersão(c).

Dando continuidade ao estudo, os perfis de tamanho de partículas da formulação de nanoesferas foram determinados (Figura 26). Para isso as alíquotas das bandas de nanoesferas e de nanodispersão foram retiradas e analisadas, apresentando diâmetros médios de partículas de 151 ± 43 nm para as nanoesferas (Figura 26b) e de 180 ± 15 nm para a nanodispersão (Figura 26c). O valor médio de massa das nanoesferas foi calculado e compreendeu valor de $1,88 \times 10^{-15}$ g.

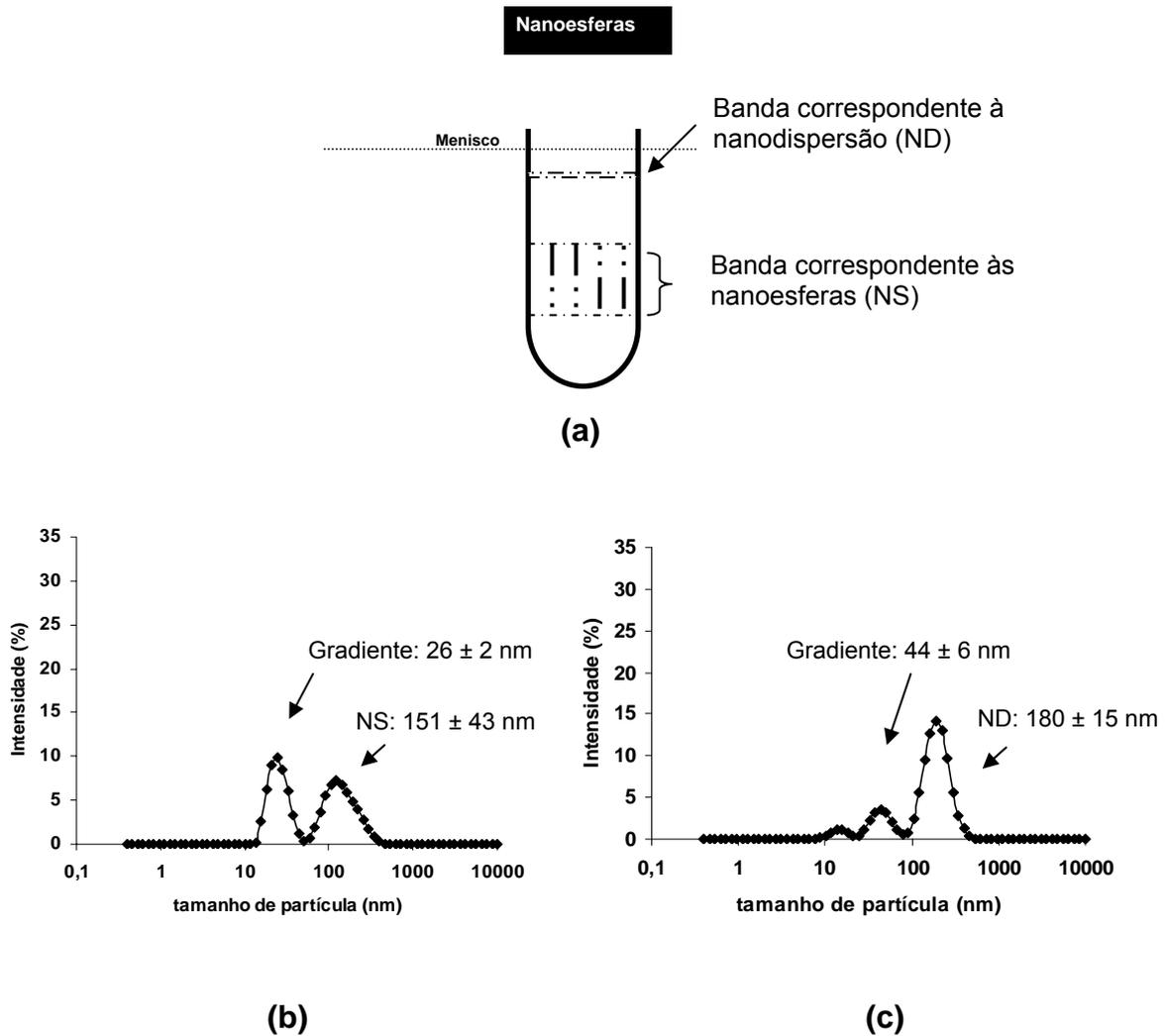


Figura 26. Figura ilustrativa das alíquotas retiradas da formulação de nanoesferas (a) para a determinação dos perfis de tamanhos de partículas da banda de NS (b) e da banda de ND (c).

De maneira semelhante, a formulação de nanocápsulas também foi analisada (Figura 27). Os perfis de tamanhos de partículas das bandas de nanoemulsão, de nanocápsulas e de nanodispersão podem ser observados nas Figuras 27b, 27c e 27d. A banda correspondente às nanocápsulas mostrou diâmetro médio de partículas de 216 ± 24 nm, a banda de nanoemulsão apresentou diâmetro médio de 248 ± 8 nm e, finalmente, a banda da população correspondente à nanodispersão de 219 ± 15 nm. O valor médio de massa das nanocápsulas foi calculado e compreendeu valor de $5,35 \times 10^{-15}$ g.

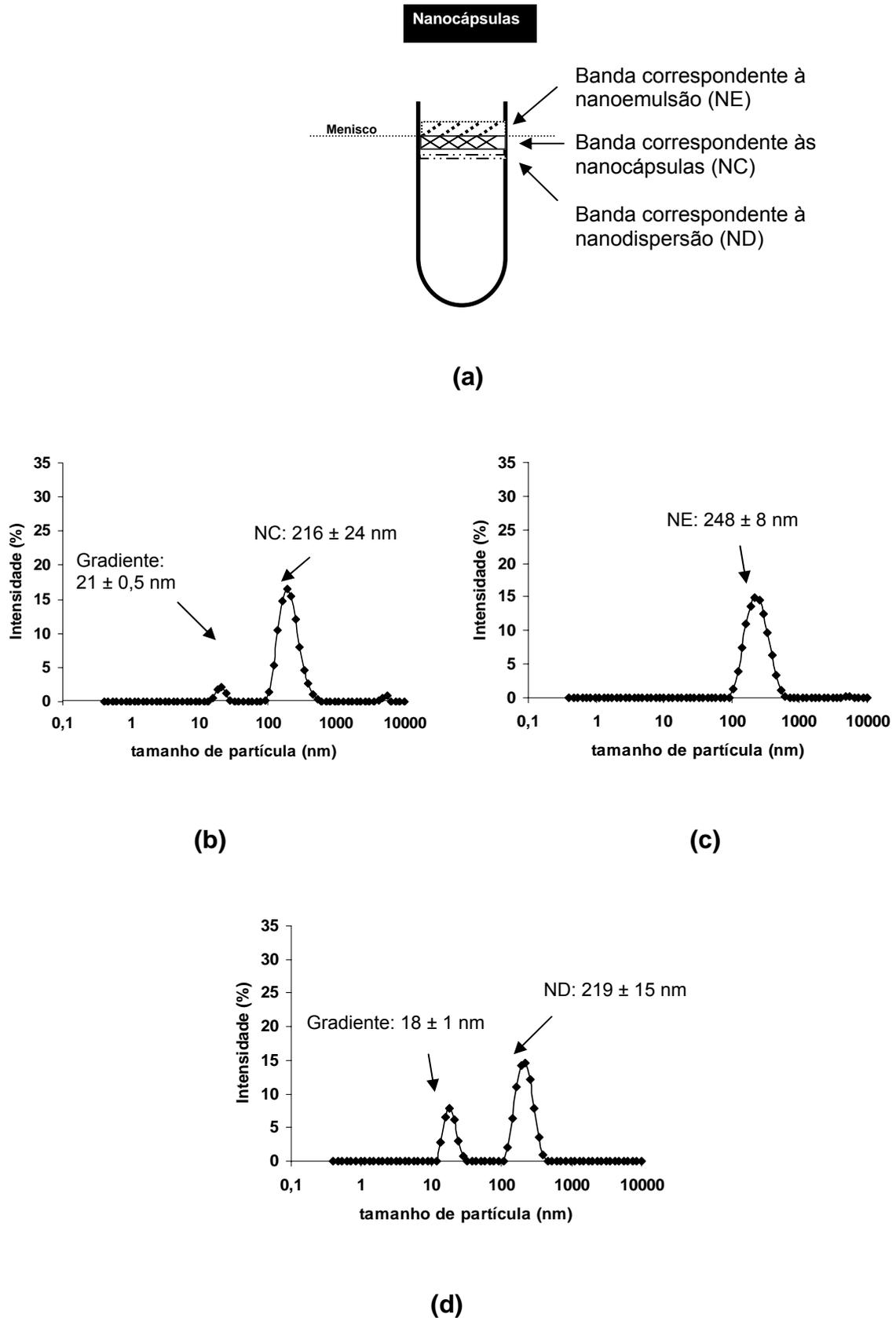


Figura 27. Figura ilustrativa das alíquotas retiradas da formulação de nanocápsulas (a) para a determinação dos perfis de tamanhos de partículas da banda de NC (b), da banda de NE (c) e da banda de ND (d).

Foi realizada a determinação do diâmetro de partícula da banda de nanodispersão padrão, ou seja, da banda da suspensão preparada apenas com polissorbato 80 e monoestearato de sorbitano. Para tal, uma alíquota foi retirada da banda referente a nanodispersão (Figura 28a) e o diâmetro de partícula foi determinado. Para uma nanodispersão preparada utilizando-se estes componentes o tamanho de partícula é de 185 ± 11 nm (Figura 28b). O valor médio de massa da nanodispersão foi calculado e compreendeu valor de $3,37 \times 10^{-15}$ g.

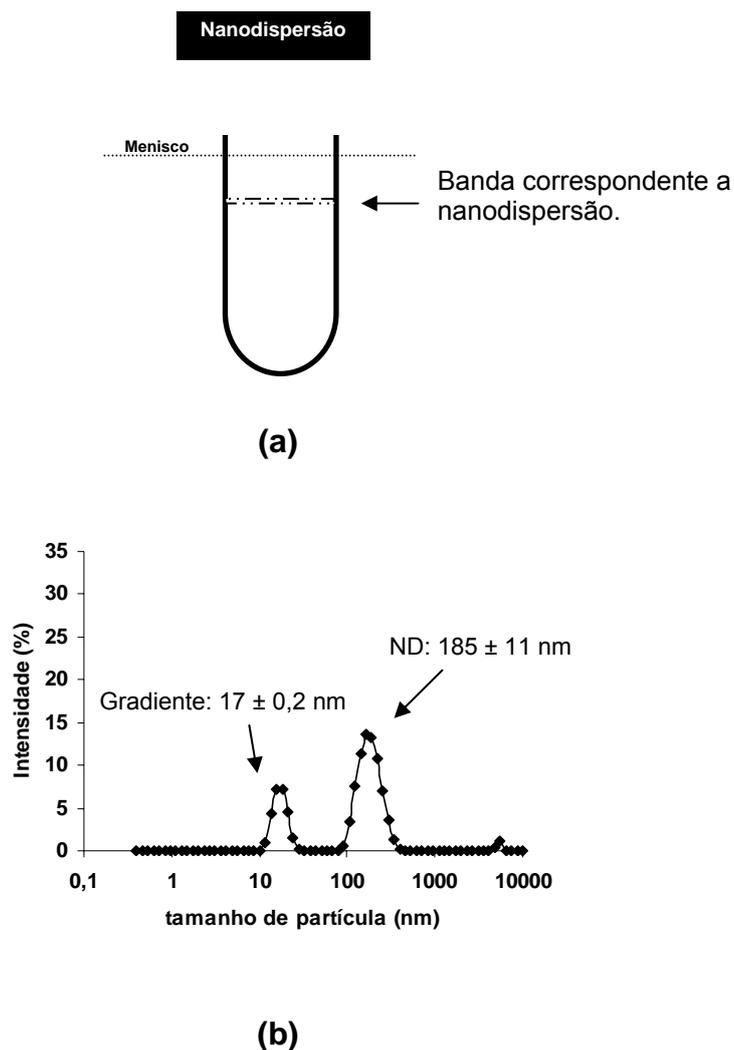


Figura 28. Figura ilustrativa da alíquota retirada da formulação de nanodispersão (a) para a determinação dos perfis de tamanhos de partículas da banda de ND (b).

Com o objetivo de acessar os valores médios de massa das nanocápsulas para a serie formulações **IC** a **VC**, as bandas após ultracentrifugação foram

coletadas e os diâmetros médios das partículas também foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (Figura 29).

Para **IC**, a banda correspondente às nanocápsulas mostrou diâmetro médio de partículas de 280 ± 41 nm, a banda de nanoemulsão apresentou diâmetro médio de 298 ± 15 nm, sendo que a banda referente a nanodispersão não foi observada. O valor médio de massa das nanocápsulas compreendeu valor de $1,16 \times 10^{-14}$ g.

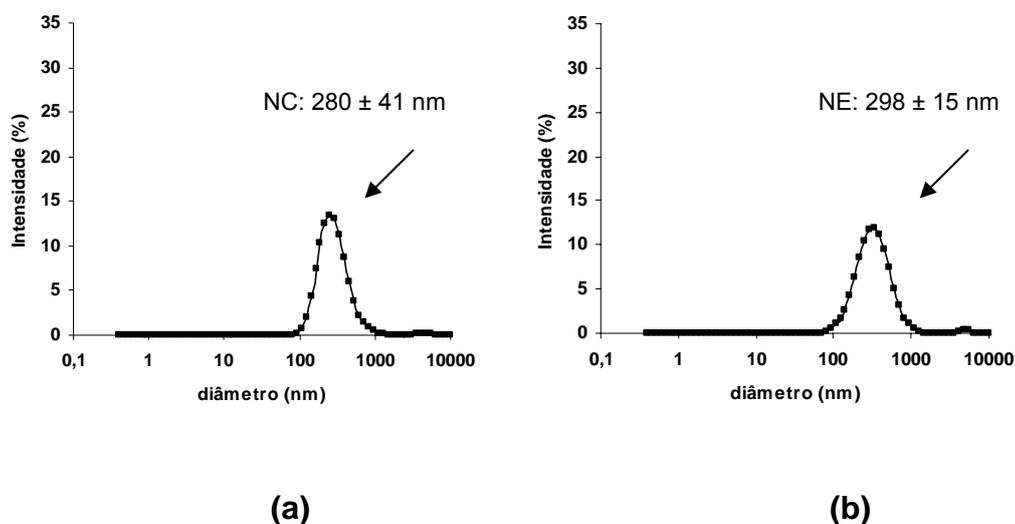


Figura 29. Figura ilustrativa da alíquota retirada da suspensão IC (a) para a determinação dos perfis de tamanhos de partículas da banda de nanocápsulas, (b) para determinação da banda de nanoemulsão.

Os perfis de tamanhos de partículas das bandas de nanoemulsão, de nanocápsulas e de nanodispersão da suspensão **IIC**, podem ser observados nas Figuras 30a, 30b e 30c. A banda correspondente às nanocápsulas mostrou diâmetro médio de partículas de 276 ± 17 nm, a banda de nanoemulsão apresentou diâmetro médio de 298 ± 24 nm e, a banda da população correspondente à nanodispersão mostrou diâmetro médio de 238 ± 7 nm. O valor médio de massa das nanocápsulas compreendeu valor de $1,11 \times 10^{-14}$ g.

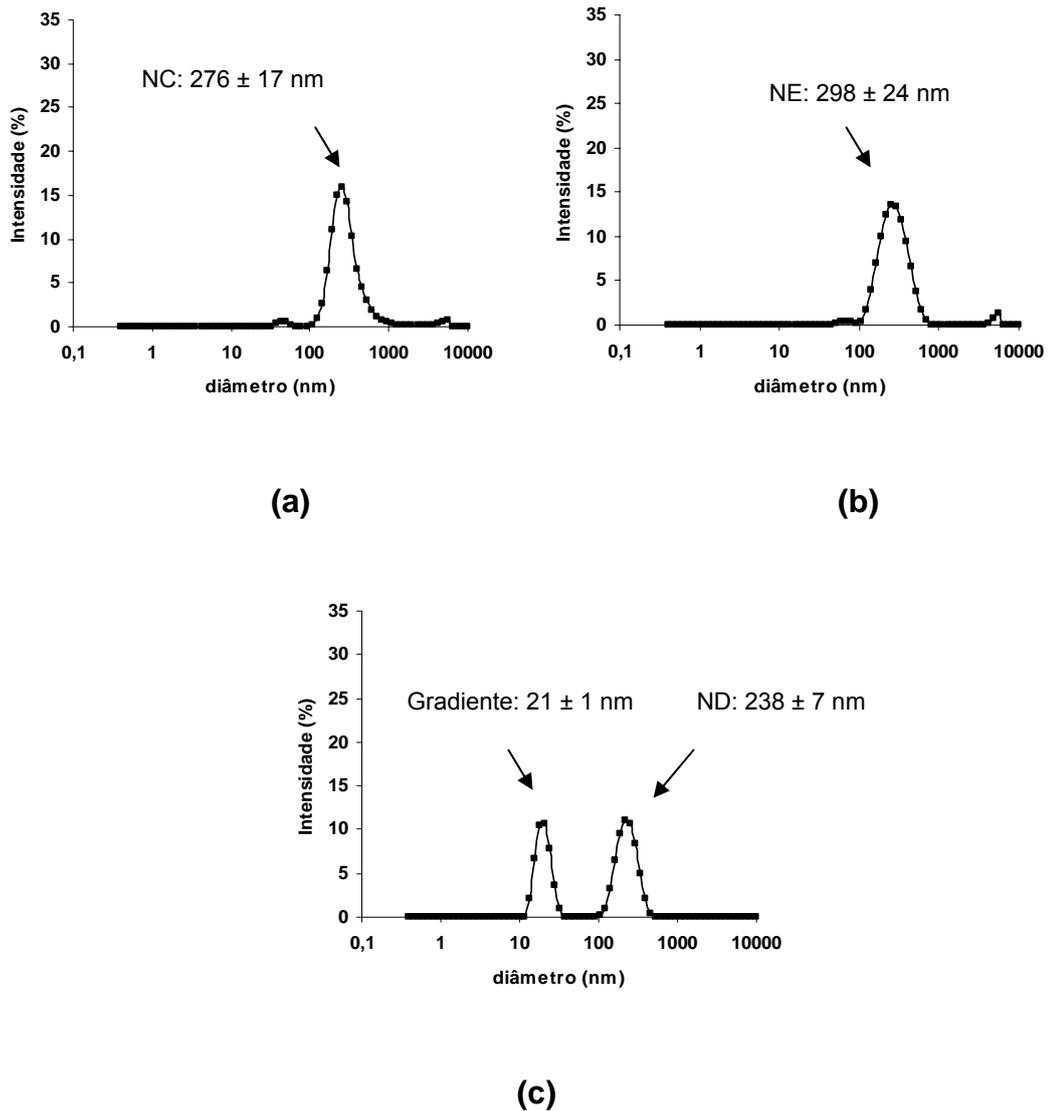


Figura 30. Figura ilustrativa da alíquota retirada da suspensão IIC (a) para a determinação dos perfis de tamanhos de partículas da banda de nanocápsulas, (b) para determinação da banda de nanoemulsão e, (c) de nanodispersão.

Para as suspensões preparadas com a 77 mg de monoestearato de sorbitano IIC, os perfis de tamanhos de partículas das bandas de nanocápsulas, nanoemulsão e de nanodispersão, podem ser observados nas Figuras 31a, 31b e 31c. A banda correspondente às nanocápsulas mostrou diâmetro médio de partículas de 229 ± 56 nm, a banda de nanoemulsão apresentou diâmetro médio de 268 ± 32 nm e, a banda da população correspondente à nanodispersão mostrou diâmetro médio de 193 ± 44 nm. O valor médio de massa das nanocápsulas compreendeu valor de $6,37 \times 10^{-15}$ g.

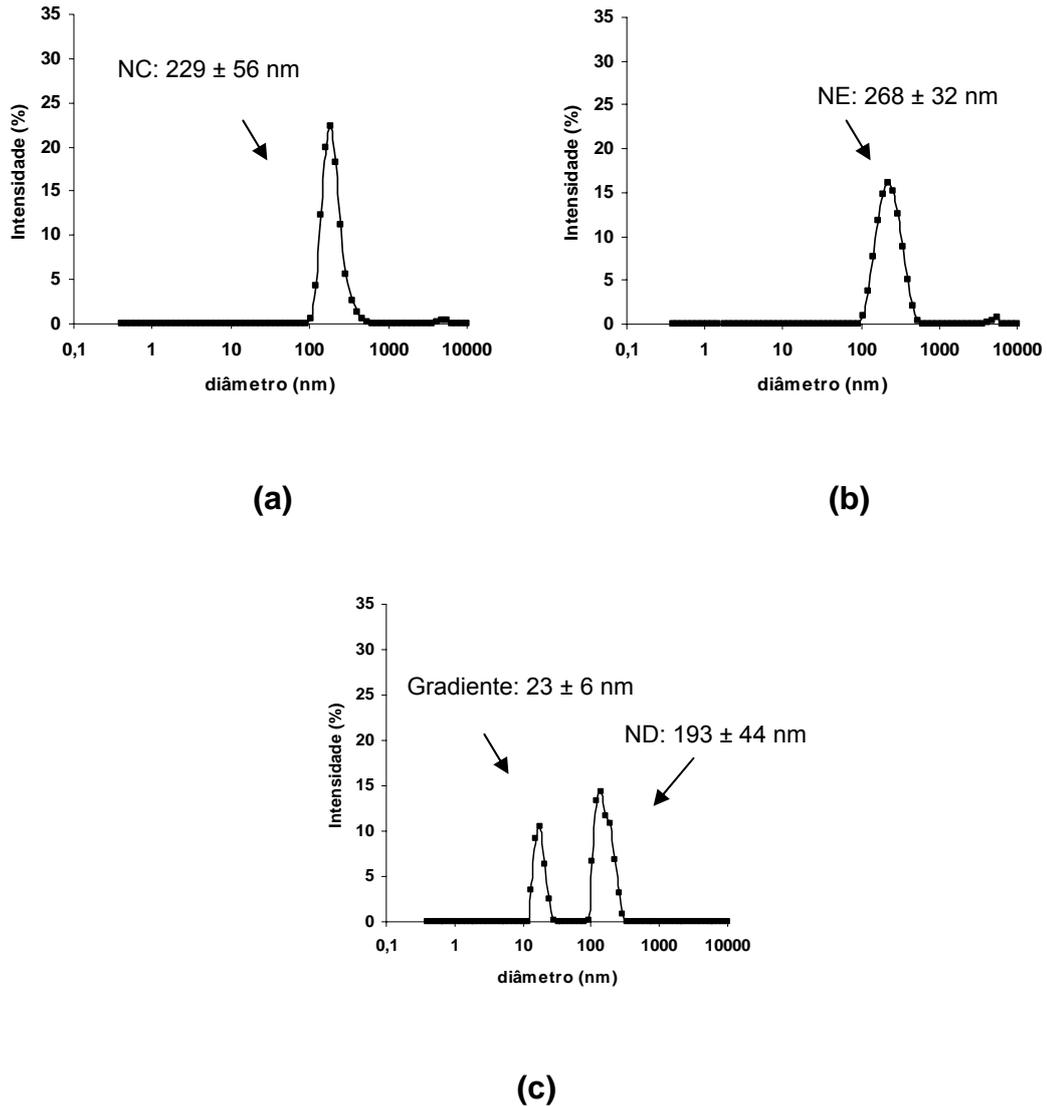


Figura 31. Figura ilustrativa da alíquota retirada da suspensão IIC (a) para a determinação dos perfis de tamanhos de partículas da banda de nanocápsulas, (b) para determinação da banda de nanoemulsão e, (c) de nanodispersão.

Os perfis de tamanhos de partículas das bandas de nanoemulsão, de nanocápsulas e de nanodispersão da suspensão **IVC**, podem ser observados nas Figuras 32a, 32b e 32c. A banda correspondente às nanocápsulas mostrou diâmetro médio de partículas de 250 ± 16 nm, a banda de nanoemulsão apresentou diâmetro médio de 270 ± 22 nm e, a banda da população correspondente à nanodispersão mostrou diâmetro médio de 152 ± 22 nm. Para as nanocápsulas o valor médio de massa compreendeu valor de $8,29 \times 10^{-15}$ g.

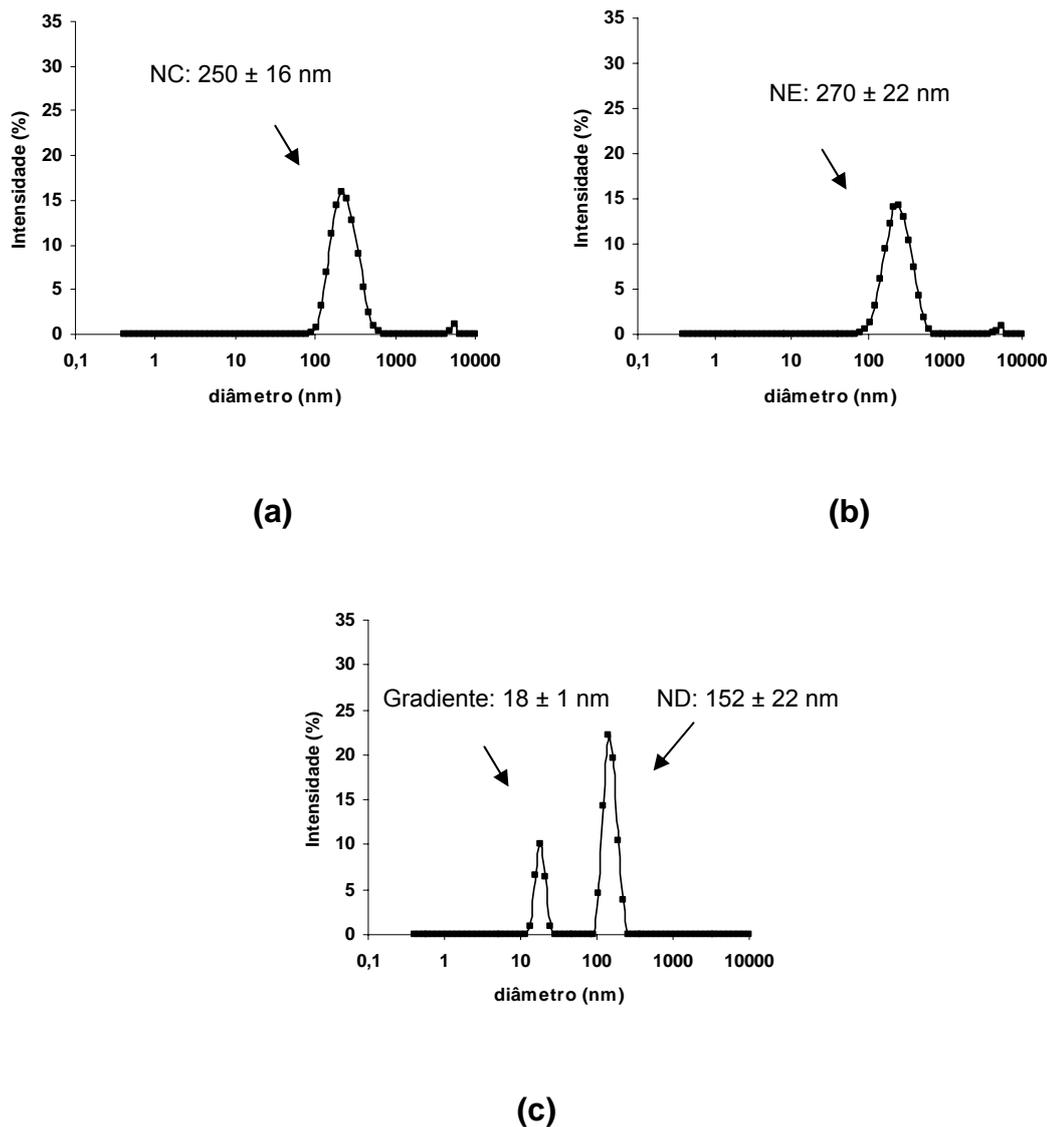


Figura 32. Figura ilustrativa da alíquota retirada da suspensão IVC (a) para a determinação dos perfis de tamanhos de partículas da banda de nanocápsulas, (b) para determinação da banda de nanoemulsão e, (c) de nanodispersão.

Finalmente, para as suspensões preparadas com a 115 mg de monoestearato de sorbitano (VC), os perfis de tamanhos de partículas das bandas de nanocápsulas, nanoemulsão e de nanodispersão, podem ser observados nas Figuras 33a, 33b e 33c. A banda correspondente às nanocápsulas mostrou diâmetro médio de partículas de 252 ± 34 nm, a banda de nanoemulsão apresentou diâmetro médio de 283 ± 27 nm e, a banda da população correspondente à nanodispersão mostrou diâmetro médio de 77 ± 50 nm. Para as nanocápsulas o valor médio de massa compreendeu valor de $8,49 \times 10^{-15}$ g.

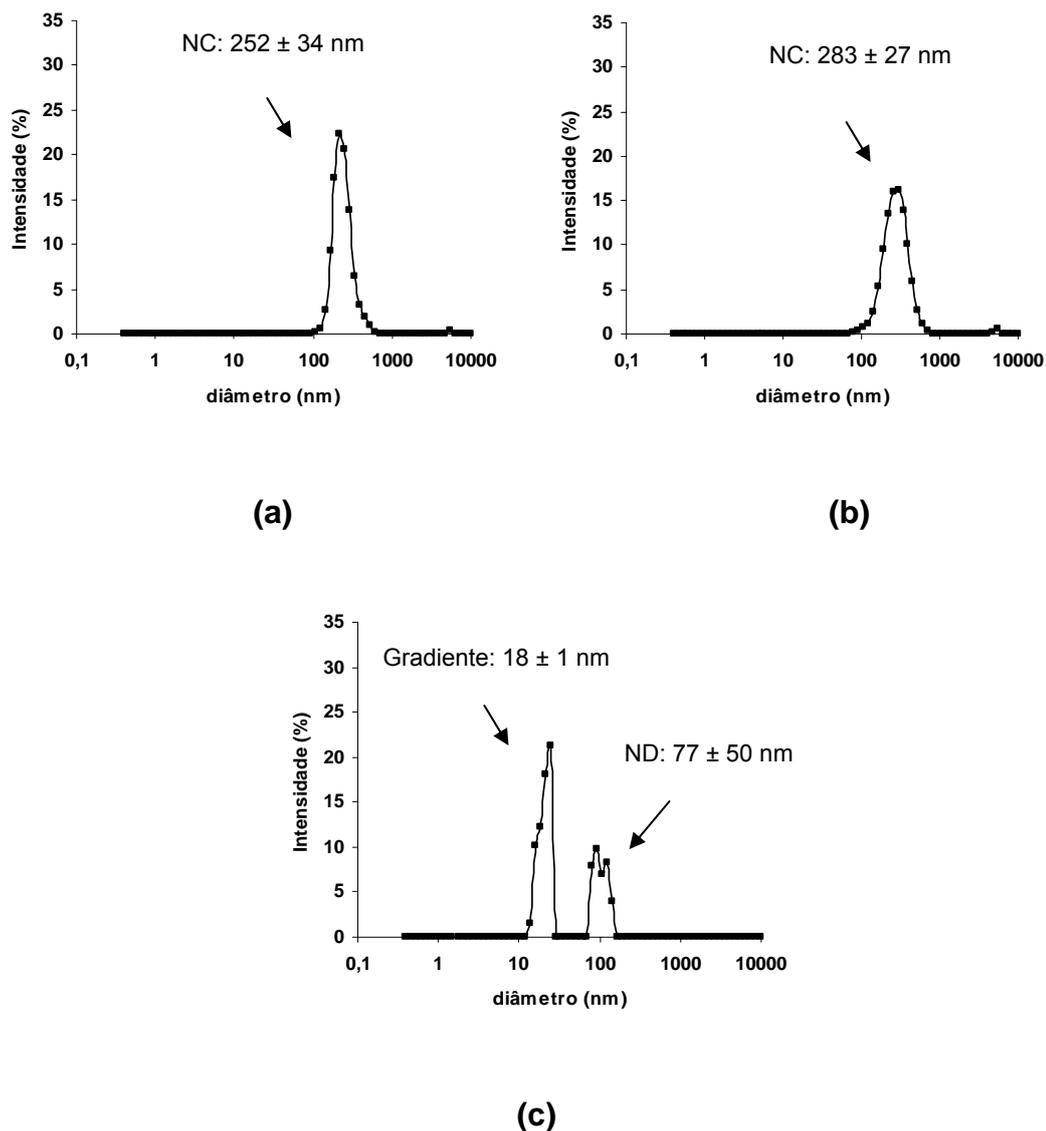


Figura 33. Figura ilustrativa da alíquota retirada da suspensão VC (a) para a determinação dos perfis de tamanhos de partículas da banda de nanocápsulas, (b) para determinação da banda de nanoemulsão e, (c) de nanodispersão.

5.7 Preparação de uma suspensão otimizada

Com base nos resultados do estudo de densidade (item 5.6), onde foi observado que para as suspensões, IIC a VC, havia excesso tanto de monoestearato de sorbitano, quanto do triglicérido dos ácidos cáprico e caprílico, resultando em outras nanoestruturas como nanodispersão e nanoemulsão, e que em

estudo paralelo¹ foi observado que para suspensões de nanocápsulas preparadas diminuindo-se a concentração do triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico, menor também era a banda referente as nanoemulsões nas suspensões, uma suspensão chamada de **NC-otimizada**, foi preparada com o objetivo de otimizar a formulação. A suspensão **NC-otimizada** foi preparada utilizando-se as concentrações expressas na Tabela 13.

Tabela 13. Composição da suspensão NC-otimizada.

Suspensão	PCL (mg)	SM (mg)	Tween 80 (mg)	óleo (mg)	IndOEt (mg)
NC-otimizada	100	38	77	156	10

A suspensão apresentou-se macroscopicamente homogênea, branca e opalescente. O pH da suspensão foi de $5,42 \pm 0,24$ e o potencial zeta mostrou valor de $-9,94 \pm 0,45$ mV. O diâmetro médio de partícula foi 201 ± 12 nm (Tabela 14) e a distribuição de tamanhos de partículas por intensidade, volume e número, foi monomodal (Figura 34), sendo que a polidispersão foi de 0,13.

Tabela 14. Características físico-químicas da suspensão NC-otimizada (n=3).

Suspensão	Diametro (nm)	PDI	pH	Potencial zeta (mV)
NC-otimizada	201 ± 12	$0,13 \pm 0,02$	$5,42 \pm 0,24$	$-9,94 \pm 0,45$

¹Dados obtidos no trabalho de doutorado de Cristina de Garcia Venturini no PPG-Química (UFRGS).

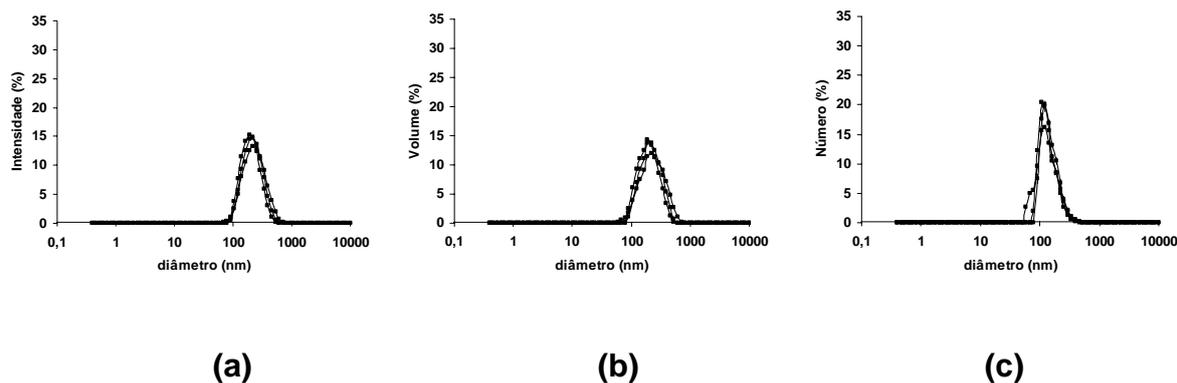


Figura 34. Gráfico da distribuição de intensidade (a), volume (b) e número de partículas (c) da suspensão de nanocápsulas otimizada.

O número de partículas e a área superficial da suspensão **NC-otimizada** foram determinados e mostraram valores de $6,46 \times 10^{12}$ partículas. cm^{-3} e $0,82 \times 10^4$ $\text{cm}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$, respectivamente (Tabela 15).

Tabela 15. Número de partículas e área superficial da suspensão NC-otimizada (n=3).

Suspensão	N (partículas. cm^{-3}) $\times 10^{12}$	S ($\text{cm}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$) $\times 10^4$
NC-otimizada	$6,46 \pm 0,22$	$0,82 \pm 0,03$

Observando o valor do número de partículas e da área superficial para a suspensão **NC-otimizada**, foi possível observar que o número de partículas apresentou valor intermediário em relação as duas series, mas que a área superficial foi muito menor, o que também pode indicar que ocorreu a redução ou eliminação das populações de misturas de partículas.

Para comprovar esta hipótese, a suspensão **NC-otimizada** foi submetida ao gradiente de densidade de Percoll[®], onde foram observadas a ausência da população de nanoesferas, de nanoemulsão na altura do menisco, e da de

nanodispersão (Figura 35). A população de nanocápsulas apresentou densidade entre 1,017 e 1,023 g.cm⁻³.

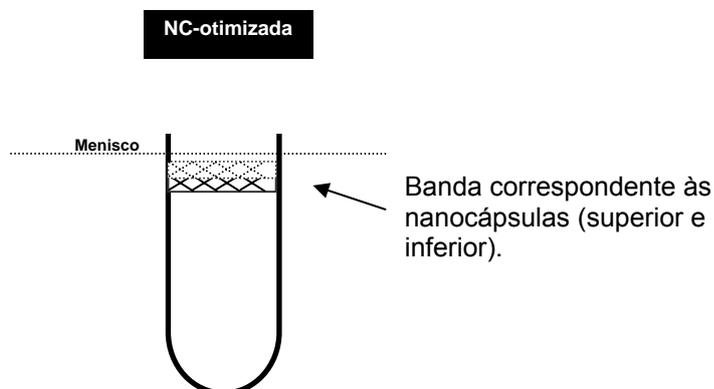


Figura 35. Ultracentrifugação da suspensão NC-otimizada em gradiente de Percoll[®]. Gradiente foi monitorado utilizando-se marcadores de densidade coloridos em NaCl 0.15M. A densidade inicial do marcador foi de 1.021 g.cm³.

Os perfis de tamanhos de partículas das bandas da **NC-otimizada** também foram determinados (Figura 36). A parte inferior da banda de nanocápsulas mostrou diâmetro médio de partículas de 228 ± 10 nm, enquanto que a parte superior da banda de nanocápsulas apresentou diâmetro médio de 180 ± 6 nm. Para as nanocápsulas da banda inferior o valor médio de massa compreendeu valor de $6,34 \times 10^{-15}$ g e para as nanocápsulas da banda superior, $3,12 \times 10^{-15}$ g.

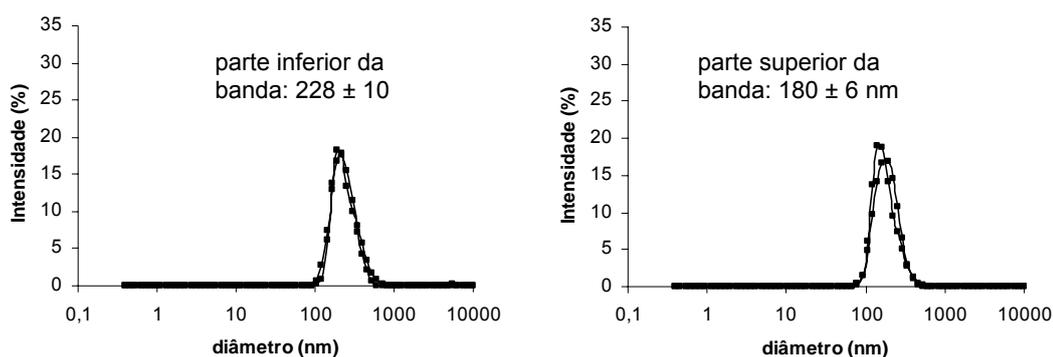


Figura 36. Figura ilustrativa das alíquotas retiradas da após ultracentrifugação da suspensão NC-otimizada (a) para a determinação dos perfis de tamanhos de partículas da banda inferior de nanocápsulas, (b) para a determinação da banda superior de nanocápsulas.

Por fim, com o objetivo de avaliar a estabilidade desta suspensão as análises de espalhamento múltiplo foram realizadas. Para a suspensão **NC-otimizada-I** o perfil de BS mostra uma suspensão altamente estável, visto que a intensidade relativa em função do tempo não variou mais de 10% (Figura 37).

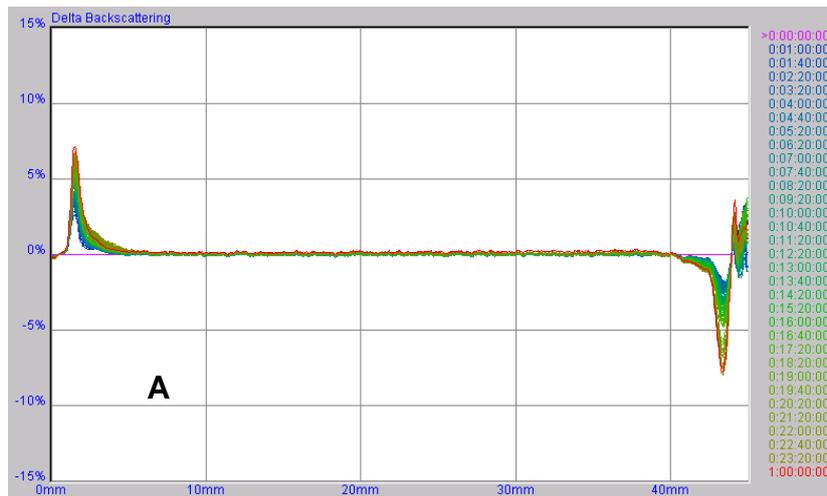


Figura 37. Dados de BS da suspensão NC-otimizada I (A). Os dados são representados em função do tempo (0:00 até 24:00 horas) e altura da amostra.

- ❖ As suspensões de nanocápsulas preparadas variando-se a concentração do monoestearato de sorbitano apresentam diâmetros estáveis por no mínimo 60 dias e baixa tendência de cremagem, sedimentação, floculação, ou coalescência. O diâmetro de partículas foi constante com o aumento da concentração do monoestearato de sorbitano. No entanto, o aumento da concentração do monoestearato de sorbitano foi diretamente proporcional ao número de partículas.
- ❖ O estudo da influencia da concentração do monoestearato de sorbitano no consumo do éster etílico de indometacina demonstrou que quanto maior a concentração do monoestearato empregada, mais lento foi o consumo do éster, sendo que os tempos de meia-vida foram maiores quanto maior a concentração do monoestearato de sorbitano, apesar da área superficial ser maior quanto maior a concentração de monoestearato nas formulações.
- ❖ Para todas as suspensões estudadas observou-se um ajuste satisfatório dos dados experimentais ao modelo empregado, sendo que os coeficientes de liberação mostraram que o mecanismo de liberação é o transporte anômalo.
- ❖ Uma correlação linear indireta foi obtida entre a permeabilidade relativa das nanocápsulas e o tempo de meia-vida de consumo do éster etílico de indometacina. Com isso determinou-se que o controle da velocidade de consumo do éster etílico de indometacina é obtido pela variação da concentração do monoestearato de sorbitano, devido ao aumento da viscosidade do núcleo das nanocápsulas.
- ❖ O estudo de densidade demonstrou que na série **IC** a **VC** nanoemulsões e nanodispersão (menos para **IC**) estão simultaneamente presentes com nanocápsulas, e nanoesferas não se formaram em nenhuma das suspensões analisadas. A análise por espalhamento de luz das bandas após a ultracentrifugação mostrou os diâmetros médios e distribuição de tamanhos de cada população e com isso, foi possível acessar os valores médios de massa das partículas.

- ❖ Uma suspensão otimizada apresentando apenas nanocápsulas foi preparada e caracterizada, demonstrando ser homogênea e estável.
- ❖ O gradiente de densidade mostrou ser um método extremamente útil para a caracterização inicial das suspensões de nanocápsulas.
- ❖ Ao lado de outros parâmetros já estudados e utilizados, observou-se que não só a espessura da parede polimérica das nanocápsulas, mas também a quantidade de monoestearato de sorbitano utilizados alteram a difusão a partir das nanocápsulas.

7 REFERÊNCIAS

ABOUBAKAR, M.; PUISIEUX, F.; COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Physico-chemical characterization of insulin-loaded poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules obtained by interfacial polymerization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 183, p. 63-66, 1999.

ALLÉMAN, E.; GURNY, R.; DOELKER, E. Drug-loaded nanoparticles: preparation methods and drug targeting issues. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 29, n. 5, p. 173-191, 1993.

ALVAREZ-ROMAN, r.; BARRÉ, G.; GUY, R.H. ; FESSI, H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent : preparation and photoprotection. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 191-195, 2001.

AMMOURY, N.; DUBRASQUET, M.; FESSI, H. ; DEVISSAGUET, J-Ph. ; PUISIEUX, F. ; BENITA, S. Indomethacin-loaded poly(D,L-lactide) nanocapsules: protection from gastrointestinal ulcerations and anti-inflammatory activity evaluation in rats. **Clinical Materials**, v. 13, p. 121-130, 1993.

BARRATT G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 3, n. 5, p. 163-171, 2000.

BARICHELLO, J.M.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 4, p. 4714-476, 1999.

BODMEIR, R e MCGINITY, J.W. Solvent selection in the preparation of poly(D,L -lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 43, p. 179- 186, 1988.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules and nanoemulsions, as ocular drug carrier. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 5, p. 530-536, 1996.

CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. **Journal Applied Polymer Science**, v. 63, p. 125-132, 1997.

CHOUINARD, F.; KAN, F.W.K.; LEROUX, J-C.; FOUCHER, C.; LENAERTS, V. Preparation and purification of polyisohexylcyanoacrylate nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v.72, p. 211-217, 1991.

CHOUINARD, F.; BUCZKOWSKI, S.; LENAERTS, V. Poly(alkylcyanoacrylate) nocapsules: physicochemical characterization and mechanism of formation. **Pharmaceutical Research**, v.11, p. 869-874, 1994.

COUVREUR, P.; KANTE, B.; ROLAND, M.; GUIOT, M. ; BAUDUIN, P. ; SPEISER, P. Polycyanocrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation,

morphological and absorptive properties. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v. 31, p. 422-424, 1979.

COUVREUR, P.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 41, p. 2-13, 1995.

COUVREUR, P.; GILLIAN, B.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, V. Nanocapsule technology: A review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.

COURNARIE, F.; CHÉRON, M.; BESNARD, M.; VAUTHIER, C. Evidence for restrictive parameters in formulation of insulin-loaded nanocapsules. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 171-179, 2004.

CRUZ, L.; SOARES, L.U.; COSTA, T.D.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N.P.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, p. 198-205, 2006a.

CRUZ, L.; SCHAFFAZICK, S.R.; COSTA, T.D.; SOARES, L.U.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N.P.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Physico-Chemical characterization and *in vivo* evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules by PCS, TEM, SAXS, interfacial alkaline hydrolysis and anti-inflammatory activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, p. 3154-3162, 2006b.

EMERICH, D. F.; THANOS, C. G. The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis. **Biomolecular Engineering**, v. 23, p. 171-184, 2006.

EPSTEIN, H.; AFRAN, E.; MOISE, T.; RICHTER, Y. ; RUDICH, Y. ; GOLOMB, G. Number –concentration of nanoparticles in liposomal and polymeric multiparticulate preparations: empirical and calculation methods. **Biomaterials**, v. 27, p. 661-659, 2006.

EVANS, D.F. e WENNERSTRÖM, H, in: The Colloidal Domain, VCH Publishers, Cambridge. 1994, pp. 482-485.

FATTAL, E.; VAUTHIER, C.; Nanoparticles as drug delivery systems. In: WARBRICK, J.; BOYLAN, J.C. (Eds.). Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 3th ed. Marcel Dekker, New York, 2002. p. 1874-1892.

FERRANTI, V.; MARCHAIS, H.; CHABENAT, C.; ORECCHIONI, A. M.; LAFONT, O. Primidone-loaded poly- ϵ -caprolactone nanocapsules: incorporation efficiency and *in vitro* release profiles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, p. 107-111, 1999.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. r1-r4, 1989.

FRESTA, M.; PUGLISI, G.; GIAMMONA, G.; CAVALLARO, G.; MICALI, N.; FURNERI, P.M. Pefloxacin mesilate- and ofloxacin-loaded polyethyl cyanoacrylate nanoparticles:

characterization of the colloidal drug carrier formulation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, p. 895-902, 1995.

FRESTA, M.; CAVALLARO, G.; GIAMMONA, G.; WEHRLI, E.; PUGLISI, G. Preparation and characterization of polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules containing antiepileptic drugs. **Biomaterials**, v. 17, p. 751-758, 1996.

GALLARDO, M.; COURRAZE, G.; DENIZOT, B.; TREUPEL, L.; COUVREUR, P.; PUISIEUX, F. Study of the mechanisms of formation of nanoparticles and nanocapsules of polyisobutyl-2-cyanoacrylate. **International Journal of Pharmacy**, v. 100, p. 55-64, 1993.

GANACHAUD, F. e KATZ, L. "Nanoparticles and Nanocapsules Created Using the Ouzo Effect: Spontaneous Emulsification as an Alternative to Ultrasonic and High-Shear Devices", **Chemical Physical Chemistry**, v. 6, p. 209-216, 2005.

GRANGIER, J.L.; PUVGRENIER, M.; GAUTIER, J.C.; COUVREUR, P. Nanoparticles as carriers for growth hormone releasing factor. **Journal of Controlled Release**, v. 15, p. 3-13, 1991.

GRIFFITH, L.G. Polymeric Biomaterials. **Acta Materialia**, v. 48, p. 263-277, 2000.

GÜRSOY, A. ; EROGLU, L. ; ULUTIN, S. ; TASYÜREK, M. ; FESSI, H. ; PUISIEUX, F. ; DEVISSAGUET, J-P. Evaluation of indomethacin nanocapsules for their physical stability and inhibitory activity on inflammation and platelet aggregation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 52, p. 101- 108, 1989.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J-Ph.; PUISIEUX, F. Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, p. 57-63, 1995a.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-P. Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing non-steroidal anti-inflammatory drugs: Gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. **Pharmaceutical Research**, v.12, n.10, p. 1-3, 1995b.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v.2, p. 147-157, 2007.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication: theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 12, p. 1145-1149, 1963.

JAGER, A.; STEFANI, V.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A. R. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, p. 297-305, 2007.

JIMENEZ, M.M.; PELLETIER, J. ; BOBIN, M.F. ; MARTINI, M.C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 272, p. 45-55, 2004.

JURKIEWICZ, P.; OKRUSZEK, A.; HOF, M.; LANGNER, M. Associating oligonucleotides with positively charged liposomes. **Cellular Molecular Biology Letters**, v. 8, n. 1, p. 77-84, 2003.

KALGUTKAR, A. S.; MARNETT, A. B.; CREWS, B. C.; REMMEL, R. P. Ester and amide derivatives of the nonsteroidal anti-inflammatory drug, indomethacin, as selective cyclooxygenase-2 inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 2860-2870, 2000.

KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, p. 25-35, 1983.

KUBIAK C.; MANIL L.; COUVREUR P. Sorptive properties of antibodies onto cyanoacrylic nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 41, p. 181-187, 1988.

LAVELLE, E. C.; SHARIF, S.; THOMAS, N. W.; HOLLAND, J.; DAVIS, S.S. The importance of gastrointestinal uptake of particles in the design of oral delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18, p. 5-22, 1995.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery: a review. **Sciences Techniques et Pratiques Pharmaceutiques**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.

LEMARCHAND, C.; COUVREUR, P.; VAUTHIER, C.; CONSTANTINI, D. ; GREF, R. Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, p. 77-82, 2003.

LEMOINE, D.; FRANÇOIS, C.; KEDZIEREWICZ, F.; PREAT, V.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Stability study of nanoparticles of poly(ϵ -caprolactone), poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide). **Biomaterials**, v. 41, p. 14-18, 1995.

LI, S.; HE, Y.; LI, C.; LIU, X. In vitro release of protein from poly(butylcyanoacrylate) nanocapsules with an aqueous core. **Colloid and Polymer Science**, v. 283, p. 480-485, 2005.

LOPES, E. C.; POHLMANN, A. R.; BASSANI, V.; GUTERRES, S. S. Polymeric colloidal systems containing ethionamide: preparation and physico-chemical characterization. **Pharmazie**, v.55, n.7, p.527-530, 2000.

LOSA, C.; MARCHAL-HEUSSLER, L.; ORALLO, F.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Design of new formulations for topical ocular administration: polymeric nanocapsules containing metipranolol. **Pharmaceutical Research**, v.10, n.1, p.80-87, 1993.

- MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticles characterization: a comprehensive physicochemical approach. **S. T. P. Pharma Sciences**, v.1, n.4, p.221-241, 1991.
- MARCHAIS, H.; BENALI, S.; IRACHE, J.M.; THARASSE-BLOCH, C.; LAFONT, O.; ORECCHIONI, A.M. Entrapment Efficiency and Initial Release of Phenylbutazone from Nanocapsules Prepared from Different Polyesters. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n.9, p. 883-888, 1998.
- MENGUAL, O.; MEUNIER, G.; CAYRE, I.; PUECH, K.; SNABRE, P. Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: the TURBISCAN MA 1000. **Colloids and Surfaces A**, v. 152, p. 113-123, 1999.
- MOINARD-CHECOT, D.; CHEVALIER, Y.; BRIANÇON, S.; FESSI, H.; GUINEBRETIÈRE, S. Nanoparticles for drug delivery : review of the formulation and process difficulties illustrated by the emulsion-diffusion process. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.6, p. 2664-2681, 2006.
- MOLPECERES, J.; CHACÓN, M.; BERGES, L.; ABERTURAS, M.R.; GUZMAN, M. Optimized preparation of poly D-L(lactide-glycolic) microspheres and nanoparticles for oral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 141, p. 81-91, 1996.
- MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRAT, G. Poly(D,L-Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 5, p. 614-626, 2000.
- MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BOURDON, O.; GREF, R.; LABARRE, D.; BARRAT, G. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. **Biomaterials**, v. 22, p. 2967-2979, 2001.
- MU, L.; FENG, S-S. PLGA/TPGS Nanoparticles for Controlled Release of Paclitaxel: Effects of the Emulsifiers and Drug Loading Ratio. **Pharmaceutical Research**, v.20, n.11, p.1864-1872, 2003.
- MU, L.; SEON, P-H.; ANG, S-H.; FENG, S-S. Study on surfactant coating of polymeric nanoparticles for controlled delivery of anticancer drug. **Colloid and Polymer Science**, v. 283, p. 58-65, 2004.
- MÜLLER, C. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; SILVEIRA, N. P.; COSTA, T. D.; GUTERRES, S. S. Spray-dried diclofenac-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. **Pharmazie**, v. 56, n.11, p. 864-867, 2001.
- NEMATI, F.; DUBERNET, C.; COLIN de VERDIÈRE, A.; POUPON, M.F.; TREUPEL-ACAR, L.; PUISIEUX, F.; COUVREUR, P. Cytotoxicity of free doxorubicin and doxorubicin-loaded nanoparticles in sensitive and multidrug resistant leucemic murine cells: incubation time, number of particles per cell. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 102, p. 55-62, 1996.
- PALUMBO, M.; RUSSO, A.; CARDILE, V.; RENIS, M.; PAOLINO, D.; PUGLISI, G.; FRESTA, M. Improved antioxidant effect of idebenone-loaded polyethyl-2-cyanocrylate

nanocapsules tested on human fibroblasts. **Pharmaceutical Research**, v.19, n 1, p. 71-78, 2002.

PINTO-ALPHANDARY, H.; BALLAND, O.; COUVREUR, P. A new method to isolate polyalkylcyanocrylate nanoparticles preparations. **Journal of Drug Targeting**, v. 3, p. 167-169, 1995.

PINTO REIS, C.; NEUFELD, R.; RIBEIRO, A.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, p. 8-21, 2006.

POHLMANN, A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 305-312, 2002.

POHLMANN, A.R.; SOARES, L.U.; CRUZ, L.; SILVEIRA, N.P.; GUTERRES, S.S. Alkaline Hydrolysis as a Tool to Determine the Association form of Indomethacin in Nanocapsules Prepared with Poly(ϵ -Caprolactone). **Current Drug Delivery**, v. 1, p. 103-110, 2004.

POLETTO, F.S.; JÄGER, E. ; CRUZ, L.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, p. 472-478, 2008.

PUGLISI, G.; FRESTA, M.; GIAMMONA, G.; VENTURA, C.A. Influence of the preparation conditions on poly(ethylcyanoacrylate) nanocapsule formation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 125, p. 283-287, 1995.

PUISIEUX, F.; BARRAT, G.; COURRAZE, G.; COUVREUR, P. ; DEVISSAGUET, J-P. ; DUBERNET, C. ; FATTAL, E. ; FESSI, H. ; VAUTHIER, C. ; BENITA, S. **Polymeric Biomaterials**. In : DUMITRIU, S. (ed). Marcel Dekker, New York, 1994, p. 749-794.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 12, p. 1113-1128, 1998.

RAFFIN, R.; OBACH, E.; MEZZALIRA, G.; POHLMANN, A.; GUTERRES, S.S. Nanocápsulas poliméricas secas contendo indometacina: estudo de formulação e de tolerância gastrointestinal em ratos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, n. 2, p. 163-172, 2003.

RAJAONARIVONY, M.; VAUTHIER, C.; COUARRAZE, G.; PUISIEUX, F.; COUVREUR, P. Development of a New Drug Carrier Made from Alginate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, p. 912-918, 1993.

ROLLOT, J.M. ; COUVREUR, P.; ROBLOT-TREUPEL, L.; PUISIEUX, F. Physicochemical and morphological characterization of polyisobutyl cyanocrylate nanocapsules. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n.4, p.361-364, 1986.

ROMERO-CANO, M.S.; VINCENT, B. Controlled release of 4-nitroanilose from poly(lactic acid) nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 82, p. 127-135, 2002.

SAHOO, S. K.; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discovery Today**, v.8, p. 1112-1123, 2003.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. W.; CAETANO, M. N. P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, p. 71-80, 2000.

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

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; MEZZALIRA, G.; GUTERRES, S.S. Development of Nanocapsule Suspensions and Nanocapsule Spray-Dried Powders Containing Melatonin. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 562-569, 2006.

SEIJO, B. ; FATTAL, E. ; ROBLOT-TREUPEL, L. ; COUVREUR, P. Design of nanoparticles of less than 50 nm diameter : preparation, characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 62, p. 1-7, 1990.

SINHA, V.R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMBRIA, R.; TREHAN, A. Poly(ϵ -caprolactone) microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1-23, 2004.

SOARES, L. U. Estudo cinético da hidrólise do éster etílico de indometacina associado a nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona). Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

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

TEIXEIRA, M.; ALONSO, M.J.; MADALENA PINTO, M.M.; BARBOSA, C.M. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3 – methoxyxanthone. **European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, p. 591-500, 2005.

VALERO, J.; EGEEA, M.A.; ESPINA, M.; GAMISANS, F.; GARCIA, M.L. Effect of Polymerization Coadjuvants on Nanocapsule Elaboration and Triamcinolone Entrapment. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 22 (2), p. 167-173, 1996.

VAN ZYL , A.J.P.; WET-ROOS, D.; SANDERSON, R.D.; KLUMPERMAN, B. The role of surfactant in controlling particle size and stability in the miniemulsion polymerization of polymeric nanocapsules. **European Polymer Journal**, v. 40, p. 2717-2725, 2004.

VAUTHIER, C.; SCHMIDT, C.; COUVREUR, P. Measurement of the density of polymeric nanoparticles drug carriers by isopycnic centrifugation. **Journal of Nanoparticles Research**, v. 1, p. 411-418, 1999.

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

VIE, R.; AZEMA, N.; QUANTIN, J.C.; TOURAUD, E. ; FOULETIER, M. Study of suspension settling : a approach to determine suspension classification and particle interactions. **Colloids and Surfaces A**, v. 298, n.3, p. 192-200, 2007.

VITALE, S.A. e KATZ, L. Liquid Droplet Dispersions Formed by Homogeneous Liquid-Liquid Nucleation: "The Ouzo Effect". **Langmuir**, v. 19, p. 4105-4110, (2003).

WATNASIRICHAIKUL, S.; RADES, T.; TRUCKER, I.G.; DAVIES, N.M. Effects of formulation variables on characteristics of poly(ethylcyanoacrylate) nanocapsules prepared from w/o microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 235, p. 237-246, 2002.

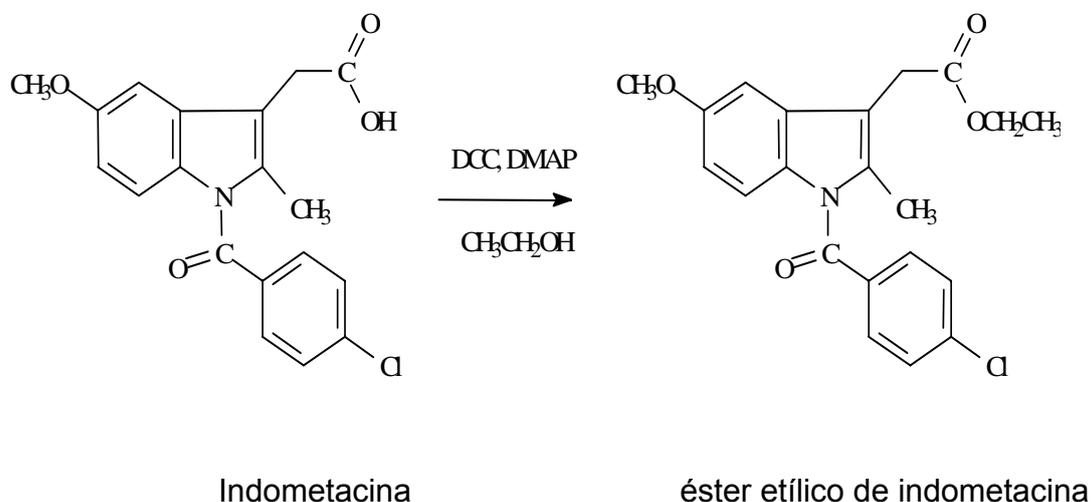
WASHINGTON, C. Drug Release from Microdisperse Systems: a Critical Review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 58, p. 1-12, 1990.

WOHLGEMUTH, M.; MÄCHTLE, W.; MAYER, C. Improved preparation and physical studies of polybutylcyanoacrylate nanocapsules. **Journal of Microencapsulation**, v. 17, n. 4, p. 437-448, 2000.

YEGIN, B. A.; LAMPRECHT, A. Lipid nanocapsule size analysis by hydrodynamic chromatography and photon correlation spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 320, p. 165-170, 2006.

ZAMBAUX, M.F.; BONNEAUZ, F.; GREF, R.; MAINCENT, P.; DELLACHERIE, E.; ALONSO, M.J.; LABRUDE, P.; VIGNERON, C. Influence of Experimental Parameters on the Characteristics of Poly(lactic acid) Nanoparticles Prepared by a Double Emulsion Method. **Journal of Controlled Release**, v. 50, p. 31-40, 1998.

1 Síntese do Éster Etilíco de Indometacina (SOARES, 2003)



Esquema 1-A-1. Síntese do Éster etílico de indometacina.

RMN do ^1H 200 MHz (δ , ppm) CDCl_3 : 7,65 e 7,47 (AB, 2H + 2H, ArH *p*-clorobenzoila), 7,17 (d, 1H $J = 2,5$ Hz, H-4); 7,08 (d, 1H $J = 9,0$ Hz, H-7); 6,67 (dd, 1H $J = 9,0$ e 2,5 Hz, H-6); 4,04 (s, 3H, OCH_3); 4,33 (q, 2H $J = 7,1$ Hz, OCH_2), 3,86 (s, 2H, CH_2); 2,59 (s, 3H, CH_3); 1,45 (t, 3H $J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$).

RMN do ^{13}C 75 MHz (APT, δ , ppm) CDCl_3 : 170,8 (CO-éster); 168,3 (CO-amida); 156,0, 139,2, 135,9, 134,0, 130,8, 130,7 e 112,7 (Cq); 131,1 e 129,1 (CH *p*-clorobenzoila); 114,9, 111,6 e 101,3 (CH indol); 61,0 (OCH_2); 55,7 (OCH_3); 30,4 (CH_2); 14,2 e 13,3 (CH_3 e CH_3CH_2).

2 Validação de metodologia analítica para quantificação do Éster

A validação de uma metodologia analítica deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

Foram selecionados os seguintes parâmetros para a validação das curvas-padrão: linearidade, exatidão, repetibilidade, precisão intermediária e limite de quantificação.

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

A média das nove curvas de calibração do éster etílico de indometacina em acetonitrila, na faixa de concentração de 1,0 a 25,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, pode ser visualizado na Figura 1-A2. O valor de F (9,36) da ANOVA da regressão linear foi maior que o F tabelado (4,74) para $\alpha = 0,01$, indicando a existência de relação linear entre as variáveis relacionadas. Da mesma forma, os coeficientes de correlação (r) das curvas intra e inter-dias apresentaram valores acima de 0,99, estando de acordo com o que é preconizado pela ANVISA (2003) Tabela 1-A2.

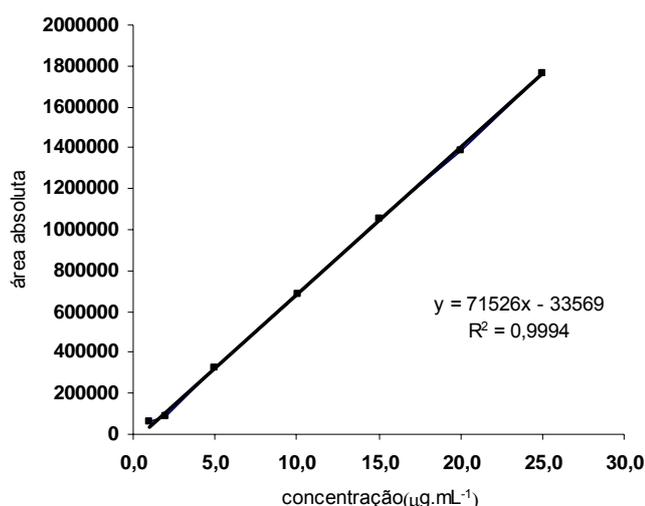


Figura 1-A2. Representação gráfica da media das nove curvas do Éster etílico de indometacina obtida por CLAE em acetonitrila.

Tabela 1-A2. Coeficientes de correlação (r) das curvas de calibração do éster etílico de indometacina.

Dia de validação	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Inter-dias
1	0,9994	0,9996	0,9996	0,9995 ± 0,0001
2	0,9996	0,9995	0,9994	0,9995 ± 0,0001
3	0,9996	0,9995	0,9997	0,9996 ± 0,0001

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor adotado como verdadeiro. Foram preparadas amostras de nanocápsulas acrescidas de 2,0; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para avaliar tal parâmetro.

O método permitiu a recuperação de 99,92 % para concentração final de 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 97,18 % para 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 100,18 % para 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, resultando em uma percentagem média de recuperação de $99,1 \pm 1,7\%$, o que caracteriza o método como exato, segundo preceitos da ANVISA (BRASIL, 2003).

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma serie de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A repetibilidade (precisão intra-dia) é a concordância dos resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes.

Os dados de repetibilidade, expressos pelos coeficientes de variação (CV) intra-dia, e os dados de precisão intermediária, expressos pelos coeficientes de variação inter-dia, foram obtidos através da análise de seis determinações de uma mesma concentração, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, de uma amostra de NC contendo éster etílico de indometacina em três dias diferentes.

Tabela 2-A2. Avaliação dos coeficientes de variação intra e inter-dia do método analítico de doseamento do éster (n=6).

Concentração do éster ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Dia 1 CV%	Dia 2 CV%	Dia 3 CV%	Inter-dias CV%
10	1,84	1,64	1,81	1,76

Para ambos os estudos os valores de coeficiente de variação (CV%) foram inferiores a 2%, demonstrando repetibilidade e precisão intermediária adequada para o método analítico em questão (BRASIL, 2003).

Os resultados referentes aos testes de exatidão, repetibilidade e precisão intermediária e os coeficientes de correlação obtidos das curvas de calibração apresentaram-se adequados, permitindo-se considerar validado o método para doseamento do éster etílico de indometacina na faixa de concentração de 1,0 a 25,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

Com os dados provenientes da avaliação da linearidade foi calculado o limite de quantificação através da Equação 1-A2. O valor obtido foi 0,857 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o limite de quantificação. Então a concentração mais próxima da curva realizada, 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foi considerada como o limite de quantificação do método analítico.

$$LQ = \frac{10DP}{B} \quad (\text{Equação 1-A2})$$

Onde: LQ é o limite de quantificação; DP é o desvio padrão da reta de calibração e B é o coeficiente angular da reta de calibração.

3 Estudos de estabilidade

Este anexo mostra as demais análises para $n=3$ de espalhamento múltiplo realizadas para a serie de formulações **IC** a **VC** e para a **NC-otimizada** (Figuras 1.3a a 6.3a). Em todas as formulações analisadas a transmissão foi nula portanto os resultados analisados estão relacionados aos perfis de BS.

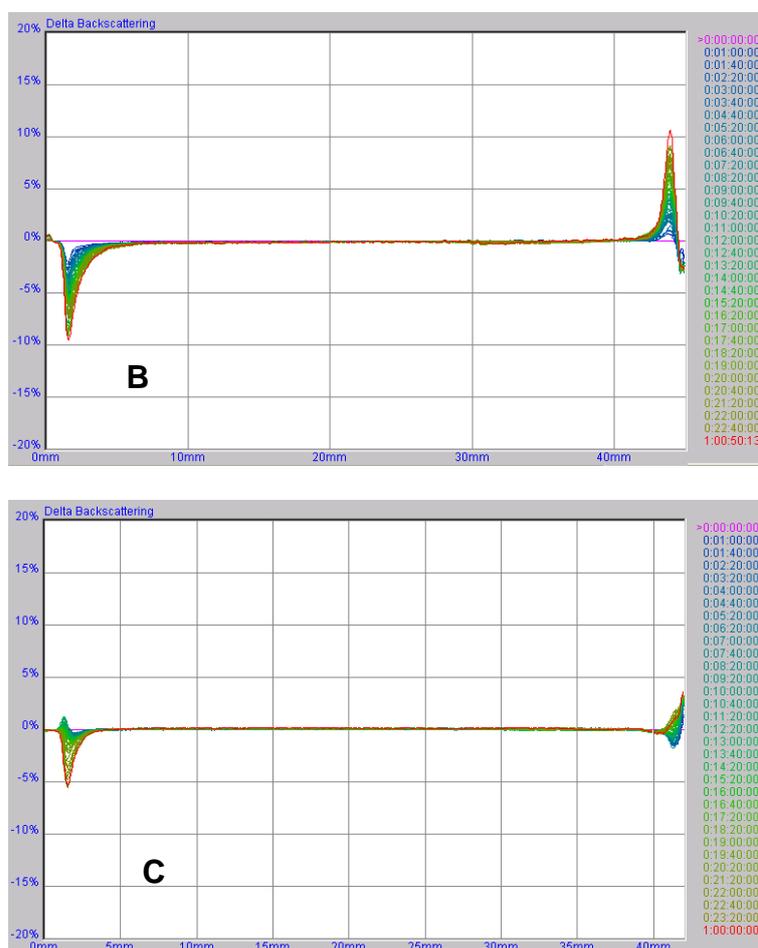


Figura 1.3.A Dados de BS das suspensões **IC-II** (B) e **IC-III** (C). Os dados são representados em função do tempo (0:00 até 24:00 horas) e altura da amostra.

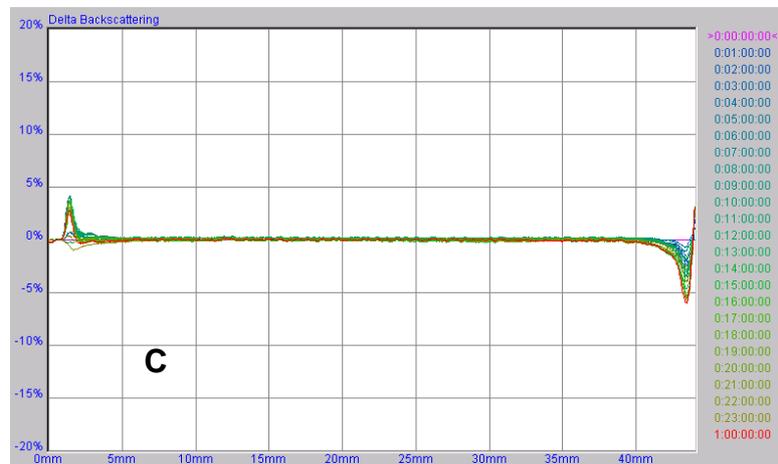
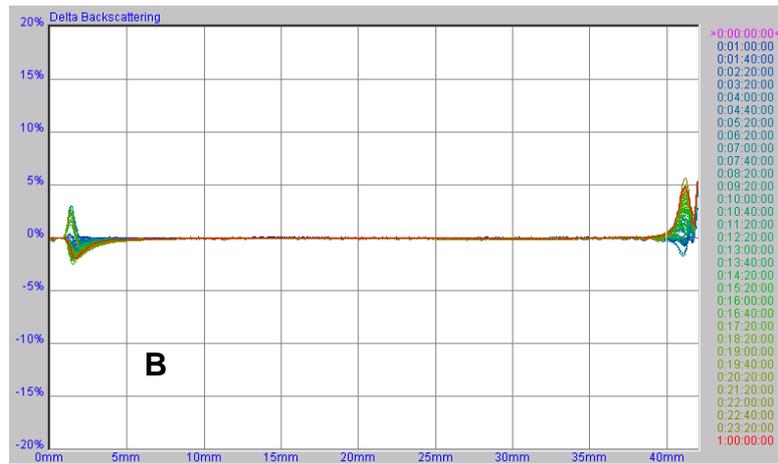
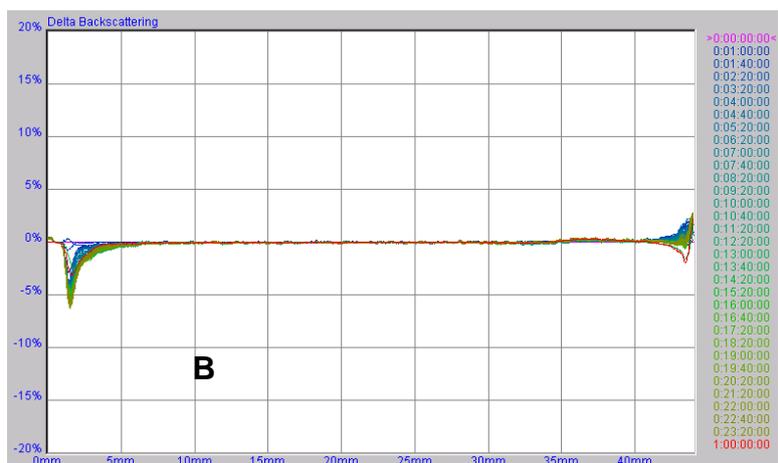


Figura 2.A.3. Dados de BS das suspensões IIC-I (A), IIC-II (B) e IIC-III (C). Os dados são representados em função do tempo (0:00 até 24:00 horas) e altura da amostra (0 até 45 mm).



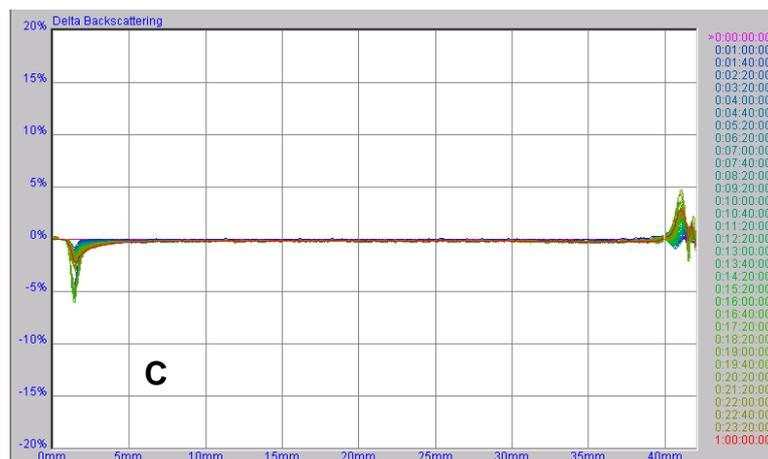


Figura 3.A.3. Dados de BS das suspensões **III C-II** (B) e **III C-III** (C). Os dados são representados em função do tempo (0:00 até 24:00 horas) e altura da amostra.

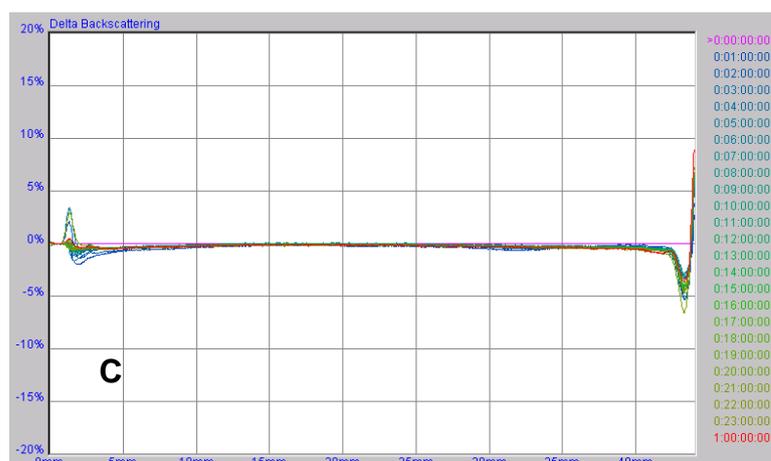
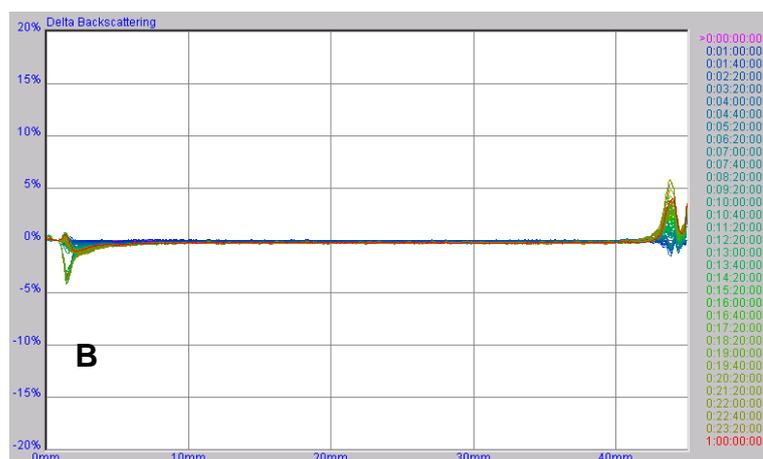


Figura 4.A.3. Dados de BS das suspensões **IV C-II** (B) e **IV C-III** (C). Os dados são representados em função do tempo (0:00 até 24:00 horas) e altura da amostra.

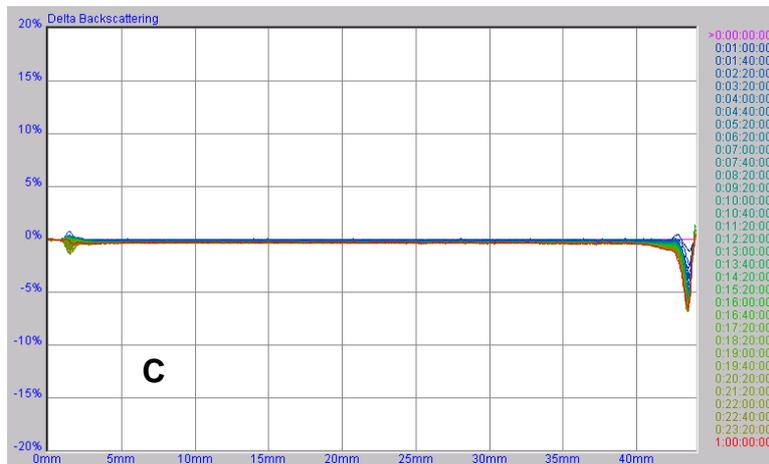
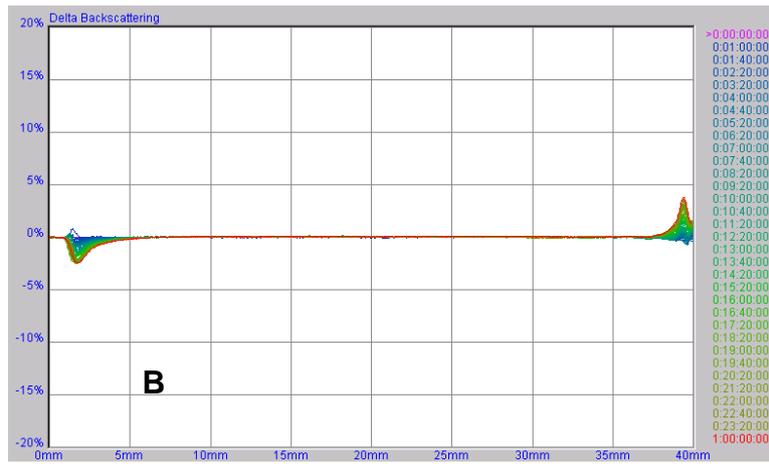
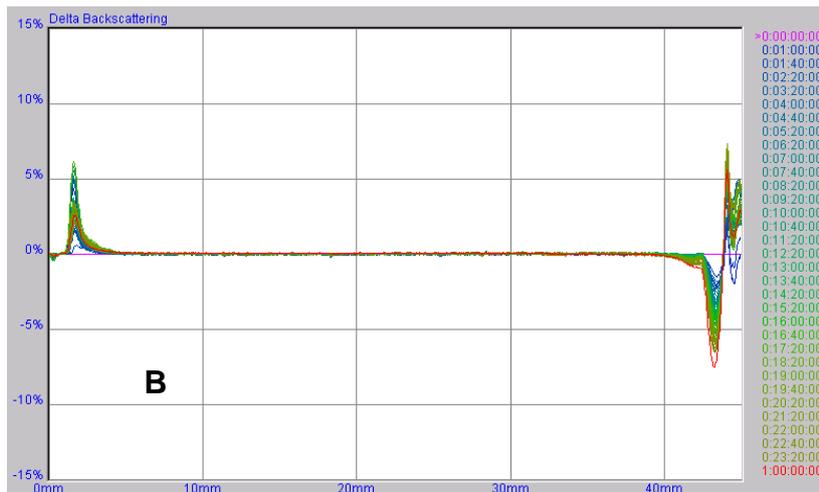


Figura 5.A.3. Dados de BS das suspensões VC-II (B) e VC-III (C). Os dados são representados em função do tempo (0:00 até 24:00 horas) e altura da amostra.



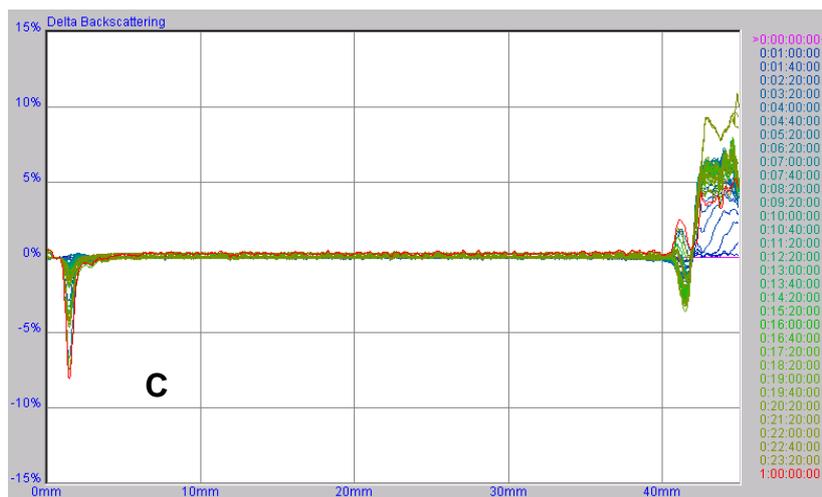


Figura 6.A.3. Dados de BS da suspensão NC-otimizada-II (B) e NC-otimizada-III (C). Os dados são representados em função do tempo (0:00 até 24:00 horas) e altura da amostra.