

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

Desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico multiparede complexadas com Zn^{2+} contendo captopril e furosemida e avaliação farmacológica em ratos espontaneamente hipertensos

CECÍLIA BOHNS MICHALOWSKI

Porto Alegre, RS, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico multiparede complexadas com Zn^{2+} contendo captopril e furosemida e avaliação farmacológica em ratos espontaneamente hipertensos

Tese de Doutorado apresentada por **Cecília Bohns Michalowski** ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Stanisçuaski Guterres

Co-orientadora: Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Porto Alegre, RS, 2016.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30 de maio de 2016, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Rosane Michele Duarte Soares da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Tiago Veiras Collares da Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dr. Valquiria Linck Bassani da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Bohns Michalowski, Cecília

Desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico multiparede complexadas com Zn²⁺ contendo captopril e furosemida e avaliação farmacológica em ratos espontaneamente hipertensos / Cecília Bohns Michalowski. -- 2016.

138 f.

Orientadora: Silvia Stanisçuaski Guterres.

Coorientadora: Adriana Raffin Pohlmann.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Nanocápsulas. 2. Hipertensão. 3. Eficácia. 4. Toxicidade. I. Stanisçuaski Guterres, Silvia, orient. II. Raffin Pohlmann, Adriana, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos à Capes, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, ao Laboratório de Sistemas Nanoestruturados para Administração de Fármacos e ao Instituto de Cardiologia que disponibilizaram equipamentos e material necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente tese

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVO.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
3.1 Nanopartículas poliméricas.....	24
3.2. Quitosana.....	27
3.3 Nanocápsulas multiparede complexadas com metal.....	30
3.3.1 Zinco.....	32
3.4 Captopril.....	33
3.4.1 Formas de liberação modificada contendo captopril.....	35
3.5 Hipertensão.....	37
3.5.1 Modelos de hipertensão <i>in vivo</i>	38
3.5.1.1 Ratos espontaneamente hipertensos.....	38
3.5.2 Tratamento da hipertensão.....	39
3.6 Furosemida.....	40
3.6.1 Formas de liberação modificada contendo furosemida.....	42
3.7 Estudos de toxicidade.....	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1 Materiais.....	48
4.2 Preparação das nanocápsulas.....	48
4.3 Caracterização das nanocápsulas multiparede.....	49
4.3.1 Determinação do diâmetro médio e da polidispersão.....	49
4.3.2 Determinação do potencial zeta.....	50
4.3.3 Determinação do pH.....	50

4.3.4	Análise morfológica das nanocápsulas multiparede por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	51
4.3.5	Análise morfológica das suspensões por microscopia de força atômica (AFM)	51
4.3.6	Determinação da estabilidade física dos sistemas	51
4.3.7	Avaliação da manutenção do tamanho de partícula em meio gástrico e intestinal simulado	52
4.3.8	Avaliação da presença de nanocristais	52
4.3.9	Fármaco encapsulado ou complexado.....	52
4.3.10	Análise comparativa da difusão de captopril ou zinco por saco de diálise ..	53
4.4	Análise de teor de captopril e furosemida	54
4.5	Análise da estabilidade química dos fármacos na formulação	54
4.6	Estudos <i>in vivo</i>	54
4.6.1	Animais.....	54
4.6.2	Tratamento	55
4.6.3	Medida da pressão sanguínea	56
4.6.4	Amostragem de sangue	56
4.6.5	Amostragem de urina.....	57
4.6.6	Peso relativo dos órgãos.....	58
4.7	Análise Estatística	58
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	Avaliação da presença de nanocristais de furosemida nas formulações de nanocápsulas	60
5.2	Análise comparativa da difusão de captopril em saco de diálise utilizando diferentes concentrações de revestimento de zinco	61
5.3	Avaliação do percentual de fármaco adsorvido/encapsulado por ultrafiltração/centrifugação	66
5.4	Análise comparativa da difusão de captopril em saco de diálise utilizando diferentes concentrações de captopril	67
5.5	Análise comparativa da difusão de zinco e captopril em saco de diálise	73
5.6	<i>Caracterização das nanocápsulas multiparede</i>	74
5.6.1	Determinação do diâmetro médio, polidispersão e potencial zeta	74

5.6.2	Análise de pH	83
5.6.3	Avaliação da estabilidade física da formulação	83
5.6.4	Análise da estabilidade do tamanho de partícula em meio gástrico e intestinal simulado.	85
5.6.5.	Análise morfológica das nanocápsulas por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	88
5.6.6	Análise morfológica das nanocápsulas por Microscopia de Força Atômica (MFA)	89
5.7	Análise da estabilidade química do captopril	93
5.8	Estudos in vivo	98
5.8.1	Medida da pressão sanguínea	98
5.8.2	Gaiola metabólica e coleta de urina e sangue.....	103
6.	CONCLUSÃO	117
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
9.	APÊNDICE A.....	135
9.1	Validação parcial.....	136

RESUMO

As nanopartículas podem proteger o fármaco do meio externo, melhorar a sua absorção e modificar a farmacocinética aparente, sendo uma boa escolha como carreador de fármacos que tenham uma meia-vida curta e uma absorção modificada pela presença de alimentos. O captopril (inibidor da enzima conversora de angiotensina) e a furosemida (um diurético de alça) são utilizados para o tratamento da hipertensão e têm as suas biodisponibilidades reduzidas na presença de alimentos, bem como curtas meias-vidas. Por ser um fármaco lipofílico, a furosemida pode ser utilizada no desenvolvimento de nanocápsulas, visando seu encapsulamento no núcleo oleoso, entretanto, para se veicular um fármaco hidrofílico juntamente neste tipo de supraestrutura, necessita-se de uma estratégia diferenciada. Neste trabalho é proposto um modelo constituído pela adição de lecitina na formulação promovendo um aumento do potencial zeta negativo da partícula, sendo após revestida com quitosana, por esta apresentar uma carga positiva. A presença de elétrons livres na estrutura da quitosana permite a ligação a metais que por sua vez podem se ligar a uma substância que também apresente elétrons livres em sua estrutura, como é o caso do captopril. Desta forma, o objetivo desta tese é desenvolver e caracterizar nanocápsulas multiparede contendo furosemida no núcleo lipofílico e captopril complexado ao metal na superfície, como uma estratégia inovadora de veiculação de dois fármacos em uma nanoestrutura e testar a sua ação farmacológica em ratos espontaneamente hipertensos após administração oral. Foram desenvolvidas as seguintes formulações: contendo furosemida em seu núcleo oleoso [(LNC-Fur(0,5)], após adicionado o revestimento de quitosana [(MLNC-Fur(0,45)] e, por fim, com a adição do metal, neste caso o zinco, e do captopril, obteve-se a formulação Capt(0,5)-Zn-MLNC-Fur(0,45), sendo que ao lado dos fármacos, entre parênteses, encontram-se as concentrações em mg/mL e ao lado do zinco a concentração do metal em $\mu\text{g/mL}$. Para a LNC-Fur(0,5), a eficácia de encapsulação da furosemida foi de aproximadamente 81%. Diferentes concentrações de zinco foram testadas e se observou que, para a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ de Zn^{2+} , a menor utilizada, a liberação de captopril foi mais sustentada do que para concentrações mais elevadas e que na ausência do metal [Capt(0,5)-MLNC-Fur(0,45)] apresentava um perfil semelhante. Os perfis de liberação com diferentes concentrações de captopril nas formulações demonstraram que, quanto maior a concentração de captopril, maior a percentagem de liberação do fármaco. A análise físico-química das três etapas de formulação demonstrou, por diferentes técnicas, diâmetros de partículas nanométricos inferiores a 200 nm. Como esperado, o potencial zeta se modificou de uma carga negativa para LNC-Fur(0,5) (-14,3 mV) para uma carga positiva [(MLNC-Fur(0,45)] (+18,3 mV) e a formulação apresentou baixos índices de polidispersão. A análise morfológica da suspensão mostrou uma partícula esférica nanométrica por microscopia eletrônica de transmissão (MET), confirmada por microscopia de força atômica. Avaliando os estudos realizados *in vivo* em relação ao controle da solução branco, obteve-se um aumento da

diurese para o grupo Capt(0,5)-Zn(25)-MLNC, entretanto não houve diferença significativa dos grupos comparado ao controle quando da relação diurese e consumo de água. Quanto aos marcadores de dano renal analisados na urina, verificou-se uma redução dos valores de microalbuminúria para Capt(0,5)-Zn(25)-MLNC, o que indica uma proteção renal para esta formulação frente ao crescente desenvolvimento da hipertensão. A análise da atividade de NAG, demonstrou uma tendência à proteção ao dano renal, não significativo, para todos os grupos tratados com exceção do Capt(0,5)-MLNC-Fur(0,45) que mostrou um aumento nos valores de NAG, mostrando uma tendência à lesão renal, bem como um aumento nos valores de MDA mostrando um aumento no estresse oxidativo. Os marcadores de dano renal no plasma não demonstraram valores significativos diferentes do controle e nem uma tendência, provavelmente por serem marcadores tardios de lesão renal. Também não foram detectadas diferenças dos íons sódio, potássio e cloro entre os grupos, provavelmente devido à coleta após 24 horas quando não existia um efeito anti-hipertensivo significativo entre elas. Os marcadores de dano hepático não demonstraram alterações significativas em relação ao controle. Referente aos estudos de farmacodinâmica, avaliando a pressão sistólica, observou-se que no primeiro dia todos os tratamentos apresentaram efeito anti-hipertensivo e que as formulações demonstraram um tempo de efeito mais prolongado que as suas soluções. Observou-se também um efeito na associação dos fármacos, prolongando o tempo de efeito hipotensor. No quinto dia para todos os tratamentos houve uma redução do tempo de efeito com exceção da Capt(0,5)-Zn(25)-MLNC-Fur(0,45), entretanto, manteve-se um perfil de maior duração de efeito para as formulações em relação às soluções. Para a pressão diastólica, não se observou diferença entre as formulações e soluções, somente para Capt(0,5)-Zn(25)-MLNC-Fur(0,45), no primeiro dia e no quinto dia tanto a formulação Capt(0,5)-MLNC-Fur(0,45) como Capt(0,5)-Zn(25)-MLNC-Fur(0,45) apresentaram uma duração de efeito até 24 horas. Avaliando o conjunto de dados de toxicidade e efeito anti-hipertensivo, pode-se concluir que a formulação Capt(0,5)-Zn(25)-MLNC-Fur(0,45) mostrou-se mais adequada para o tratamento da hipertensão.

Palavras-chave: nanocápsulas multicamada, hipertensão, captopril e furosemida

ABSTRACT

Nanoparticles can protect the drug from the media, improve its absorption and modify the pharmacokinetics, being a good choice as a carrier for drugs that have a short half-life and their absorption modified by the presence of food. Captopril (an angiotensin-converting enzyme inhibitor) and furosemide (a loop diuretic) are used for the treatment of hypertension and have their bioavailability reduced in the presence of food as well as a short half-life. Being furosemide a lipophilic drug, it can be used in the development of nanocapsules, aiming its entrapment on the lipophilic core, however, to deliver hydrophilic drugs together on this kind of superstructure, it should be needed a different strategy. On this work, it is proposed a model composed by the addition of lecithin on the formulation increasing the negative zeta potential of the particle and after coating with chitosan, as it presents a positive charge. The presence of free electrons in the chitosan structure enables binding metals, which in turn can bind to a drug that also have free electrons present in its structure, as captopril. So, the aim of this dissertation is to develop and characterize multiwall lipid core nanocapsules containing furosemide on the lipophilic core and captopril complexed to metal on the surface, as a new strategy for carrying two drugs in one nanostructure and test its pharmacological effect in spontaneous hypertensive rats after oral administration. The formulations developed were: lipid core nanocapsules containing furosemide [LNC-Fur(0.5)], the formulation coated with chitosan [MLNC-Fur(0.45)] and for last, the Zn^{2+} was added and captopril right after, obtaining Capt(0.5)-Zn(25)-MLNC-Fur(0.45), wherein the side of the drugs in brackets can be seen the concentrations in mg/ml and zinc-side concentration in $\mu\text{g/mL}$. For LNC-Fur(0,5), the entrapment efficiency of furosemide was around 81%. Different concentrations of Zn^{2+} were tested and it was observed that for the concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$ of Zn^{2+} , which was the lowest one, the release of captopril were more sustained than for higher concentrations of metal and the same profile was obtained in the absence of Zn^{2+} . The release profile with different concentrations of captopril in the formulations showed that the higher the concentration of captopril, the greater the percentage of drug released. The physicochemical analysis of the three steps of the formulation showed a nanometric particle size (below 200 nm) by different techniques. As expected, the zeta potential changed from a negative charge for LNC-Fur(0,5) (-14,3 mV) to a positive charge when coated with chitosan (+18,3 mV) and also the formulation showed a low polydispersity index. The morphological analysis showed a nanometric spherical particle by transmission electronic microscopy (TEM) confirmed by atomic force microscopy. Evaluating the studies *in vivo* compared to control, it was obtained an increase in diuresis for Capt(0.5)-Zn(25)-MLNC, however there was no significant difference ($p < 0.05$) between the groups when the diuresis and water consumption relation was compared to control. The kidney damage markers were analyzed in urine and it was observed a decrease in microalbuminuria values for Capt(0.5)-Zn(25)-MLNC, there may be a kidney protection for this formulation against the increasing development of

hypertension. The analysis of NAG activity showed a tendency to protect against the kidney injury, however it was not significant for all treated groups except for Capt(0.5)-MLNC-Fur(0.45), which showed an increase in the amounts of NAG, demonstrating a tendency to renal damage, as well as an increase in MDA levels showing an increase in oxidative stress. The markers of kidney injury in plasma showed no significant different values of the control, probably because they are late markers of kidney damage. It was also not detected differences between the sodium, potassium and chlorine values among the groups, most likely due to sampling after 24 hours when there was no significant anti-hypertensive effect between them. The liver damage markers showed no significant changes compared to the control. Regarding the pharmacodynamics studies and the systolic pressure, it was observed that on the first day, all treatments showed antihypertensive effect and that the formulations demonstrated a longer effect than their solutions. There was also a synergistic effect of drugs, prolonging the anti-hypertensive effect. On the fifth day for all treatments there was a reduction of time effect with the exception of Capt(0.5)-Zn(25)-MLNC-Fur(0.45), however, it was still remained a longer effect profile for the formulations compared to the solutions. For diastolic pressure, no difference was observed between the formulations and solutions on the first day, only to Capt(0.5)-Zn(25)-MLNC-Fur(0.45) and on the fifth day both the formulation Capt(0.5)-MLNC-Fur(0.45) as Capt (0.5)-Zn(25)-MLNC-Fur (0.45) had an effect lasting up to 24 hours. Evaluating the data set of toxicity and anti-hypertensive effect, it can be concluded that the formulation Capt(0.5)-Zn(25)-MLNC-Fur(0.45) proved to be more suitable for the treatment of hypertension .

Keywords: multiwall nanocapsules, hypertension, furosemide, captopril.

1. INTRODUÇÃO

Na terapêutica as nanopartículas são reconhecidas pelas suas vantagens, tais como promover um perfil mais sustentado na liberação do fármaco (Yan *et al*, 2011; Musumeci *et al*, 2006; Kim e Martin, 2006), modificar a farmacocinética aparente e o perfil de distribuição tecidual do fármaco (Nakada *et al*, 1996; Manjunath e Venkateswarlu, 2005), proteger o mesmo frente ao meio externo (Ourique *et al*, 2008, Nakada *et al*, 1996), reduzindo sua degradação, e aumentar a absorção do fármaco pela difusão facilitada pelo epitélio (Gulyaev *et al*, 1999; Fernández-Urrussuno *et al*, 1999; Pan *et al*, 2002; Li *et al*, 2009).

Entre as nanopartículas, encontram-se as nanocápsulas que são sistemas formados por um núcleo oleoso circundado por uma fina parede polimérica, na qual um fármaco lipofílico pode se encontrar dissolvido, disperso, adsorvido ou quimicamente ligado à matriz (Soppimath *et al*, 2001; Mohanraj e Chen, 2006; Couvreur *et al*, 2002). Para o desenvolvimento destes *delivery systems* se faz necessário o uso de polímeros biodegradáveis, tal como a poli(ϵ -caprolactona) (Oppenheim, 1981).

A promoção da absorção destas estruturas no trato gastrointestinal ainda pode ocorrer com a presença de modificadores de superfície, tal como a quitosana (Takeuchi, 1996; Dodane, Khan e Merwin, 1999). A incorporação da quitosana na superfície das partículas apresenta algumas vantagens, como a mudança de carga negativa para positiva, sendo que estudos demonstraram que sistemas catiônicos interagem mais intensamente com o epitélio ou a mucosa do trato gastrointestinal, levando a uma melhor absorção do fármaco encapsulado (Calvo *et al*, 1997). Nanocápsulas produzidas com lecitina como estabilizante e revestidas com quitosana podem ser administradas por via oral, pois as mesmas se mostram estáveis não somente no estômago como também no intestino delgado devido às forças de hidratação (Santander-Ortega, 2010).

Em 2012, Bender e colaboradores utilizaram este princípio para o desenvolvimento de nanocápsulas multiparede, onde se utilizou a lecitina para o aumento do potencial zeta negativo, proporcionando a possibilidade de um revestimento com quitosana por interação eletrostática. Mais recentemente, os mesmos autores funcionalizaram a superfície da partícula adicionando metais, Zn II e Fe II, formando complexos, como um quelato, por coordenação com os íons oxigênio e nitrogênio presentes na quitosana (Bender *et al.*, 2014). Este

metal ligado à superfície foi ligado a um anticorpo ou à fenilalanina como ligante modelo. Os resultados demonstraram que o fragmento anti-LDL eletronegativo de cadeia simples variável [scFv anti-LDL (-)], ligados à superfície de nanocápsulas, teve sua capacidade de reconhecer LDL(-) preservada. A reatividade e especificidade de scFv anti-LDL(-) foi mantida após a formação do complexo organometálico na superfície da nanocápsulas. Mayer e colaboradores (2015) utilizaram o mesmo conceito utilizando Fe II e laronidase como ligante de superfície para o tratamento da Mucopolissacaridose tipo I. Ensaio biológico *in vitro* e *in vivo* demonstraram uma eficiência catalítica da laronidase mais elevada para a formulação em comparação com a enzima livre em solução (produto comercial). Quando em solução, a laronidase forma agregados em água e a sua ligação à superfície de nanocápsulas poderia expor um maior número de sítios ativos, conduzindo a uma eficiência catalítica mais elevada. Os ensaios *in vivo* mostraram uma atividade catalítica mais elevada no fígado, rins e coração para as nanocápsulas de núcleo lipídico multicamada funcionalizadas com laronidase em comparação com o produto comercial. Os resultados mostraram uma redução provável da dose do tratamento e no uso de antipiréticos e anti-histamínicos antes da infusão enzima.

Até o presente momento, somente macromoléculas protéicas foram testadas como ligantes na superfície dessas partículas, não havendo sido testada a utilização de fármacos moleculares. O captopril é um fármaco que possui enxofre e oxigênio como heteroátomo em sua estrutura, além de ser hidrofílico, o que possibilita a sua utilização neste modelo. É um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), possui uma curta meia-vida (Giudicelli *et al*, 1987) e há uma redução de 35 a 40% em sua biodisponibilidade quando na administrada com de alimentos (Singhvi *et al*, 1982; Yimin, 2006; Nur, 2000). Além disto, o captopril promove uma depleção nas concentrações de zinco (Golik *et al*, 1998).

O captopril é utilizado no tratamento da hipertensão que é uma doença crônica de alta prevalência em nossa população atingindo cerca de 20% da população adulta, com idade maior ou igual a 20 anos (Ministério da Saúde, 2002). Doenças como cardiopatias, doenças renais, retinopatia hipertensivas, bem como doenças aterotrombóticas (Fuchs *et al*, 1994) podem ser originadas da hipertensão, sendo que a mesma possui elevada relação com os casos de

acidente vascular encefálico (80%) e com os de doença isquêmica do coração (60%) (Ministério da Saúde, 2002).

Entre os medicamentos indicados para o tratamento da hipertensão arterial, estão os diuréticos e os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) (Hackam *et al*, 2010, Rabi *et al*, 2011), que, em associação, demonstram um aumento no potencial hipotensor (Toussaint *et al*, 1989). Nos trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa com as nanocápsulas de núcleo lipídico multiparede funcionalizadas o seu núcleo oleoso não foi aproveitado para encapsular fármacos lipofílicos. Considerando esta possibilidade, no presente trabalho se objetiva a encapsulação simultânea de um fármaco diurético lipofílico além do captopril, vislumbrando-se um efeito anti-hipertensivo combinado.

A furosemida é um diurético que também possui como desvantagens uma curta meia-vida, uma diminuição da sua biodisponibilidade na presença de alimentos (Beermann e Midskov, 1986; McCrindle *et al*, 1996; Grahnen *et al*, 1989), uma absorção errática (Grahnen *et al*, 1989) e também uma reabsorção de água e sódio entre as doses, devido à regulação neuro-humoral. A manutenção da diurese e excreção de sódio para este fármaco foi verificada em alguns estudos quando administrado em infusão contínua, devido à manutenção das concentrações de furosemida no plasma (Adin *et al*, 2003, Dormans *et al*, 1996).

Desta forma, este trabalho visa desenvolver, de forma inédita, nanocápsulas com revestimento de quitosana e zinco contendo uma associação de fármacos para o tratamento da hipertensão, estando a furosemida em seu núcleo oleoso e o captopril complexado com zinco de superfície (Figura 1). Esta estratégia busca aumentar o tempo de ação destes fármacos e melhorar sua absorção por via oral, bem como proteger contra a interferência de alimentos na biodisponibilidade.

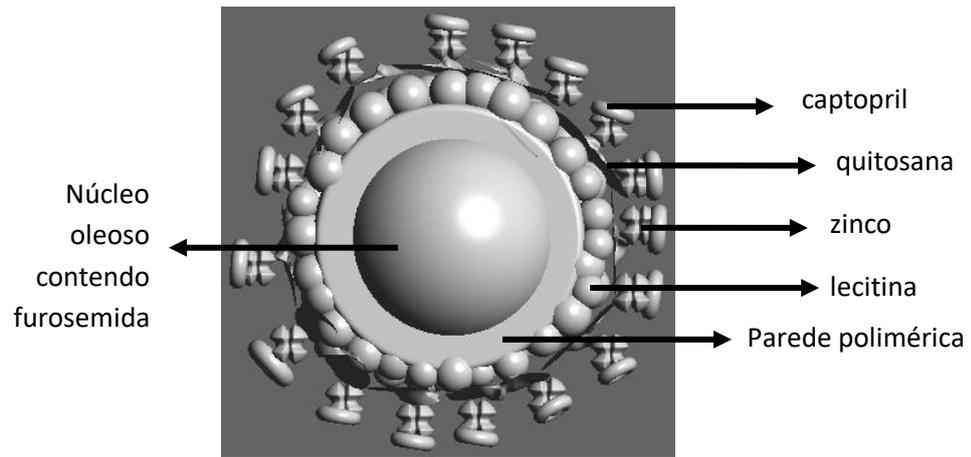


Figura 1. Estrutura das nanocápsulas multiparede

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta tese de doutorado é desenvolver nanocápsulas multiparede estáveis contendo furosemida em seu núcleo oleoso e captopril complexado ao zinco externamente, realizar a caracterização físico-química das formulações e ensaios biológicos comparando a ação e duração do efeito sobre a pressão sanguínea de ratos espontaneamente hipertensos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar pela técnica de deposição de polímero pré-formado, seguida de técnicas de revestimento, nanocápsulas multicamada de núcleo lipídico contendo 0,5 mg/mL de furosemida e a mesma concentração de captopril complexado em sua superfície;
- Realizar a caracterização físico-química do sistema, verificando os teores dos fármacos, eficiência de encapsulação e complexação, pH, diâmetro de partícula, polidispersão, potencial zeta e análise morfológica através de microscopia eletrônica de transmissão.
- Avaliar a morfologia das nanocápsulas através de microscopia de força atômica;
- Estudar a farmacologia (alteração da pressão arterial com a medida por pletismografia de cauda) de uma formulação de nanocápsulas multiparede contendo furosemida e captopril, das formulações com os fármacos isolados e as comparando com soluções dos fármacos em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) no primeiro e quinto dias de administração;
- Realizar estudos toxicológicos após 5 dias de administração por via oral;
- Realizar coleta de urina e verificar consumo de água utilizando gaiola metabólica e verificar a função renal no 5º dia de administração por 12 horas, após 12 horas de administração.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Nanopartículas poliméricas

As formas farmacêuticas convencionais têm como vias principais a via oral, intravenosa ou subcutânea, entretanto as mesmas promovem um controle da razão de liberação de fármaco limitado, geralmente associado com uma liberação imediata do mesmo. Desta forma, para atingir níveis terapêuticos estendidos ao longo do tempo, a concentração inicial do fármaco no corpo precisa ser alta causando picos (geralmente ajustados para não atingir níveis tóxicos) que diminuem ao longo do tempo para um nível não efetivo. Assim, o tempo de duração do efeito terapêutico depende da frequência da administração da dose e da meia-vida do fármaco (Manmode, Sakarkar e Mahajan, 2009).

Entre as formulações atualmente desenvolvidas estão as nanopartículas, que são dispersões de partículas ou partículas sólidas com tamanhos que variam entre 100-1000 nm, não necessariamente poliméricas, onde os fármacos podem se encontrar dissolvidos, dispersos, adsorvidos ou quimicamente ligados à matriz (Soppimath *et al*, 2001; Couvreur *et al*, 2002; Mohanraj e Chen, 2006).

Estas formas de administração trazem como vantagem: a proteção do fármaco do meio externo, reduzindo a degradação do mesmo (Ourique *et al*, 2008; Nakada *et al*, 1996); o aumento da absorção do fármaco, através da difusão facilitada através do epitélio (Gulyaev *et al*, 1999; Fernández-Urrussuno *et al*, 1999; Pan *et al*, 2002; Li *et al*, 2009); a modificação da farmacocinética aparente e da distribuição tecidual do fármaco (Nakada *et al*, 1996; Manjunath e Venkateswarlu, 2005); a promoção de um perfil mais sustentado na liberação do fármaco (Yan *et al*, 2011; Musumeci *et al*, 2006; Kim e Martin, 2006) e o aumento da penetração intracelular e distribuição do fármaco (Maysinger *et al*, 2007; Hillaireau e Couvreur, 2009).

As nanopartículas como um *drug delivery system* ideal, devem seguir alguns critérios de comportamento: acumular ou permanecer no sítio de ação desejado; liberar o fármaco em uma razão adequada no sítio de ação; ser farmacologicamente aceitável quanto à estabilidade e facilidade de administração; caso o uso desejado seja parenteral, ser esterilizável e, por último, o material estruturante deve ser não tóxico e biodegradável (Oppenheim, 1981).

Entre os polímeros biodegradáveis, encontra-se a poli(ϵ -caprolactona), que vem sendo utilizada no desenvolvimento de nanopartículas para diversos usos, tais como ocular (Yenice *et al*, 2008; Marchal-Heussler *et al*, 1993), tópico (Lboutounne *et al*, 2002; Frušić-Zlotkin *et al*, 2012), oral (Frozza *et al*, 2010; Damgé, Maincent, Ubrich, 2007; Guterres *et al*, 2001), etc.

Entre os métodos de obtenção das nanopartículas a partir da poli(ϵ -caprolactona), encontra-se o método de deposição do polímero pré-formado (Fessi *et al*, 1989) e o método de emulsificação-difusão (Quintanar-Guerrero *et al*, 1997), sendo o primeiro, o mais utilizado. Este é realizado utilizando duas fases, a fase orgânica contendo os constituintes das nanopartículas e a fase aquosa, contendo um tensoativo. Após a solubilização dos constituintes, a fase orgânica é vertida sobre a fase aquosa, remove-se a fase orgânica e a formulação é concentrada sob evaporação à pressão reduzida.

Deste processo, podem ser geradas nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões que se diferenciam pela composição das formulações. Para as nanoesferas o óleo se encontra ausente, desta forma, forma-se uma estrutura matricial. Por sua vez, para as nanocápsulas, tanto o óleo como o polímero estão presentes em sua composição, formando uma estrutura bifásica, onde se obtém um núcleo oleoso revestido por uma fina camada de polímero (Couvreur *et al*, 2002; Schaffazick e Guterres, 2006).

Venturini e colaboradores estudaram, em 2011, a obtenção de nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) em suspensões aquosas, variando as proporções das matérias-primas a fim de se obter uma formulação. Foram avaliadas diferentes concentrações de monoestearato de sorbitano, triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico, tensoativo e polímeros nas suspensões. Estas formulações foram desenvolvidas devido a sua maior capacidade de encapsulação de fármacos frente às nanocápsulas preparadas somente com o óleo. Avaliando as formulações obtidas com diferentes concentrações do monoestearato de sorbitano, todas se mostraram estáveis apresentando uma leve tendência a sedimentação e cremagem, que foi reduzida com o aumento da concentração. Em relação à concentração de triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico, houve uma tendência à sedimentação em menores concentrações e nas maiores concentrações houve uma variação de

retroespalhamento positivo demonstrando uma tendência à cremagem, além de apresentarem perfis com picos assimétricos que demonstram uma tendência à coalescência, sugerindo que nanoemulsão também possa estar sendo simultaneamente formada. A utilização do tensoativo é importante para a estabilização da superfície da partícula, evitando a coalescência devido a um efeito estérico; as maiores concentrações testadas neste estudo promoveram esta estabilidade. Por último, foram testadas as concentrações de polímero. Para se obter somente LNC, foram utilizadas as menores concentrações de monoestearato de sorbitano e triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico para as quais se testou três concentrações de polímero, sendo que as duas menores apresentaram perfis de distribuição de tamanho de partícula abaixo de 200 nm. O aumento na concentração de polímero levou a um aumento do tamanho de partícula e a maior concentração apresentou um pico micrométrico. Através deste estudo, pode-se obter uma proporção mássica ideal entre as matérias-primas monoestearato de sorbitano e o triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico e polímero para se obter somente LNC, sendo ela 1:4,1:2,6.

Mais recentemente, Jornada e colaboradores (2012) realizaram estudos de pré-formulação para determinar a influência dos parâmetros do processo no tamanho e polidispersão das partículas utilizando a técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado. Foram testadas formulações com concentrações variadas de óleo, monoestearato de sorbitano e polímero (fase orgânica), bem como de polissorbatato 80 (fase aquosa). Pôde ser observado que a variação das concentrações dos componentes da fase orgânica não alterou a tensão superficial, enquanto que o polissorbatato afetou diretamente a mesma, reduzindo conforme o aumento em sua concentração. Entretanto, a alteração na tensão superficial não influenciou no tamanho de partícula para esta técnica, sugerindo que não há água presente no núcleo da dispersão. Foram determinadas as viscosidades cinéticas das fases orgânicas e aquosas, sendo que para esta última, independente da concentração de polissorbatato 80 não houve uma variação da viscosidade. Por sua vez, a fase orgânica apresentou viscosidades crescentes com o aumento das concentrações das matérias-primas e o tamanho de partícula se mostrou diretamente proporcional ao aumento da viscosidade. Este fator foi considerado o mais importante e uma faixa estreita de distribuição de tamanho pode ser obtida selecionando a

concentração das matérias-primas na fase orgânica e mantendo sua proporção otimizada.

As nanopartículas poliméricas são do ponto de vista farmacêutico interessantes para a administração oral, pois as mesmas são mais estáveis no trato gastrointestinal frente a outros carreadores coloidais, tal como os lipossomas, e podem proteger o fármaco encapsulado do meio gástrico. Além disto, o uso de diferentes materiais poliméricos permite que as características físico-químicas possam ser moduladas (por exemplo, hidrofobicidade e potencial zeta), as propriedades de liberação de fármaco e o comportamento biológico das nanopartículas, tal como a bioadesão e o aumento da recaptação celular (Galindo-Rodriguez *et al*, 2005).

3.2. Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo catiônico de alto peso molecular obtido pela desacetilação da quitina (Fig.4). Este biopolímero possui muitas características úteis, tais como a hidrofilia, a biocompatibilidade, a biodegradabilidade e a afinidade com muitas proteínas. Quando em meio ácido, seus grupos glucosamina ficam protonados e este polímero é conhecido pela sua capacidade de se ligar a íons metálicos, visto que seus grupos amina na cadeia de quitosana servem como sítios quelantes para os metais (Kumar, 1999; Austin *et al* 1981).

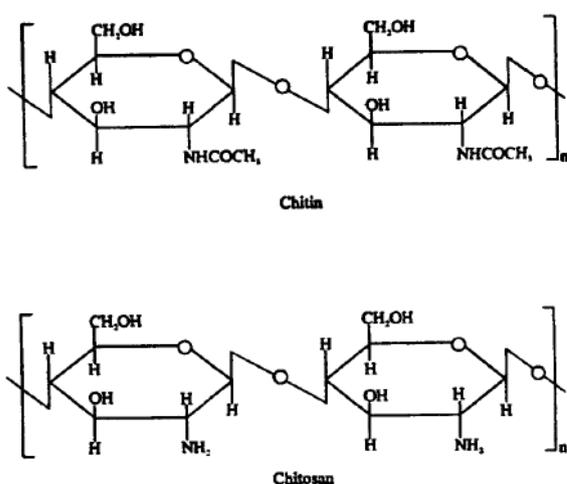


Figura 4. Obtenção da quitosana a partir da reação de desacetilação da quitina (Kumar, 1999).

Alguns estudos têm reportado que a quitosana aumenta o transporte de substâncias através de barreiras mucosas. Illum e colaboradores, em 1994, utilizaram uma solução de quitosana para aumentar a absorção de insulina pela via nasal de ratos e ovelhas, que permaneceu aumentada até 30 – 45 minutos após a administração da solução e decaiu após 60 minutos de administração, aparentemente retomando as propriedades normais de permeabilidade da mucosa. É possível que as cargas positivas da quitosana tenham um efeito transitório na função canal das *tight junctions*, visto que não foi encontrada nenhuma alteração morfológica frente ao grupo controle.

Dodane, Khan e Merwin, em 1999, buscaram melhor compreender os mecanismos envolvidos na barreira mucosa, utilizando células Caco-2 como modelo *in vitro* de sistema de transporte para a barreira celular intestinal. O efeito da quitosana em diferentes tempos e concentrações na permeabilidade e morfologia das células Caco-2 foi estudado. A quitosana causou um rápido efeito dose-dependente quanto ao decréscimo na resistência elétrica trans-epitelial (TEER), quando aplicada apicalmente. Mesmo na menor concentração, em 15 minutos, já houve uma redução da TEER. Para testar a reversibilidade da influência da quitosana na modulação da permeabilidade das membranas, comparou-se a TEER de células incubadas somente com meio e sem quitosana frente à presença em uma hora de quitosana apical. Observou-se um decréscimo dose-dependente da TEER, que progressivamente retomou o nível basal através das 24 horas remanescentes. O efeito foi confirmado pelo aumento do coeficiente de transporte do manitol quando as células eram tratadas com uma solução de quitosana 0,1–0,5% p/v por 60 minutos quando comparadas às células controle. O envolvimento das *tight junctions* foi visualizado por microscopia de varredura confocal utilizando ocludina e ZO-1 (proteínas das *tight junctions*) que foram marcadas e, ao incubar com 0,01 e 0,1 % de quitosana, variaram sua localização e reduziram a sua intensidade de fluorescência na periferia da célula.

Em 2004, Smith, Wood e Dornish também relataram que a quitosana promoveu uma redução da TEER de uma forma dose-dependente nas monocamadas de células Caco-2. Além disso, também avaliaram por imunofluorescência a localização de ZO-1, corroborando a perda da ZO-1 associada à membrana em algumas áreas. Analisando as frações celulares,

observou-se uma perda de ZO-1 e ocludina, dose-dependente, das frações citosólicas e de membrana para a fração do citoesqueleto. Desta forma, este estudo concluiu que o rompimento é causado por uma translocação das proteínas das *tight junctions* das membranas para o citoesqueleto.

Mais recentemente, em 2016, Jin e colaboradores estudaram a influência da quitosana e nanopartículas de quitosana com diferentes pesos moleculares sobre a TEER, verificando que o aumento do peso da quitosana levava a uma maior redução da TEER, sendo que os valores se estabilizaram após 4 horas de incubação. Com a retirada da quitosana ou das nanopartículas havia um aumento progressivo da TEER, sendo desta forma, um efeito reversível. A absorção do ácido saliviano B (SalB) veiculado com a quitosana (SalB-CS) ou com nanopartículas de quitosana (SalB-NP) também foi estudada, tendo sido observado um aumento da absorção do ácido com o aumento do peso molecular da quitosana para SalB-CS e um aumento da absorção quando havia uma redução do peso molecular da quitosana para SalB-NP. Este resultado é provavelmente devido ao seu menor tamanho, demonstrando uma maior absorção do SalB-NP em comparação à SalB-CS devido provavelmente a um efeito de transporte paracelular somado um efeito da endocitose para as nanopartículas.

Em 2013, Guo e colaboradores estudaram a modificação de superfície de nanopartículas de PLGA adicionando quitosana e estudaram o efeito na absorção de 7-etil-10-hidroxi camptotecina (SN-38). O mecanismo de absorção destas estruturas foi estudado pela marcação com 6-cumarina, tendo sido comprovado que as nanopartículas eram internalizadas via endocitose. Além disto, observaram que havia um sinergismo na inibição do processo de efluxo via glicoproteína-P (Pgp) quando da associação da quitosana com PLGA. O aumento na absorção celular e uma redução no efluxo do fármaco contribuíram para um aumento da concentração intracelular do mesmo.

Quanto às nanocápsulas, alguns estudos com revestimento de quitosana mostraram resultados promissores, tal como o uso de docetaxel em carreadores coloidais de quitosana consistindo de um núcleo oleoso e de um revestimento de quitosana. Tais carreadores foram desenvolvidos por Lozano e colaboradores em 2008 para facilitar a entrega controlada intracelular de docetaxel. Os sistemas apresentaram tamanho médio de partícula menor que 200 nm e uma

superfície de carga positiva. A cobertura de quitosana em torno do núcleo oleoso se realizou devido às interações iônicas entre as cargas negativas do agente tensoativo (lecitina) e a carga positiva da quitosana. A análise de citometria de fluxo mostrou que os carreadores foram rapidamente internalizados pelas células tumorais. Mais recentemente, em 2015, Alqathani e colaboradores estudaram o efeito do revestimento de quitosana na permeabilidade de nanocápsulas de ácido poli(lático co-glicólico) (PLGA) contendo α -tocoferol ou γ -tocotrienol em cultura de células Caco-2 e verificaram que a presença do revestimento na nanocápsula aumentava a captação celular dos fármacos em cerca de 3 vezes. As nanocápsulas foram marcadas com isotiocianato de fluoresceína e também se observou um aumento da captação significativo para as nanocápsulas revestidas em relação às não revestidas. A captação se mostrava reduzida cerca de 10 vezes quando o experimento era realizado a 4 °C, sugerindo um mecanismo de endocitose.

Em 2012, nanocápsulas de núcleo lipídico estabilizadas com polissorbato 80 e lecitina, recobertas ou não com quitosana, tiveram sua hemocompatibilidade testada (Bender *et al*, 2012), bem como foram caracterizadas físico-quimicamente. Foi verificada a alteração de potencial zeta de negativo para positivo após o revestimento com quitosana e o tamanho das partículas se situou em torno de 130 nm. Para o teste de hemocompatibilidade, utilizou-se 2 e 10% v/v da formulação. O tempo de pró-trombina não se mostrou alterado, independente da concentração de formulação ou presença de revestimento. Quanto ao tempo de coagulação, somente as concentrações de 10% mostraram uma redução, mas que ainda estava dentro dos valores de normalidade. Para o teste de hemólise, as formulações a 2% se mostraram adequadas.

3.3 Nanocápsulas multiparede complexadas com metal

Mais recentemente, em 2014, Bender e colaboradores propuseram, um complexo lecitina-quitosana-metal-ligante para a funcionalização da superfície de nanocápsulas. Este desenvolvimento foi realizado a partir de nanocápsulas de núcleo lipídico estabilizadas com polissorbato 80 e lecitina. A lecitina por apresentar cargas negativas proporciona uma ligação eletrostática com a

quitosana, que possui grupamento amônia, que pode ser complexado com metais que, por sua vez, complexam com moléculas ou macromoléculas que possuam heteroátomos como oxigênio, nitrogênio, enxofre ou fósforo. Estas partículas foram denominadas nanocápsulas multiparede complexadas com metal. Neste trabalho foi utilizado como ligante a fenilalanina, como modelo, ou um fragmento de cadeia simples anti-eletronegativo [scFv anti-LDL(-)]. Dois metais foram testados, o ferro e o zinco, e após foi adicionada a fenilalanina em uma proporção 3:1 mol/mol para passivação da superfície. Foi verificada uma distribuição unimodal e nanométrica para concentrações de metal de 50 e 25 µg/mL, de ferro e zinco, respectivamente, acima das quais era verificado um favorecimento da agregação das partículas. Os sistemas também foram avaliados na ausência de fenilalanina e apresentaram perfis granulométricos polimodais, desta forma, observou-se que a nanocápsula multiparede complexada com metal é altamente reativa, se combinando facilmente com partículas ao redor e formando micropartículas. O processo se mostrou mais evidente com o aumento da concentração dos metais. Considerando a alta reatividade da superfície da nanocápsula multiparede, a passivação se mostrou crucial para a estabilidade das suspensões coloidais. Os resultados também demonstraram que o fragmento anti-LDL eletronegativo de cadeia simples variável [scFv anti-LDL (-)], ligado à superfície de nanocápsulas teve sua capacidade de reconhecer LDL(-) preservada, bem como a reatividade e especificidade de scFv anti-LDL(-) mantidas após a formação do complexo organometálico na superfície da nanocápsulas.

Mayer e colaboradores, 2015, seguiram o mesmo conceito de partícula e utilizaram o Fe II como metal para complexação e substituíram o ligante, agente passivante de superfície, pela laronidase (L-MLNC) utilizada no tratamento da Mucopolysaccharidosis tipo I. O estudo comprovou que a eficiência catalítica da laronidase foi maior na formulação quando comparada a enzima livre, o que pode ser explicado pela capacidade da mesma em se agregar e a nanoestruturação permitiria que as unidades de enzima fossem expostas em maior número para os sítios de ação, por prevenir a agregação da mesma, levando a uma maior eficiência catalítica. Os testes *in vivo* foram realizados em uma concentração na qual a concentração permitiu uma viabilidade celular de 100% *in vitro* e foi observada uma atividade catalítica mais alta para a L-MLNC no fígado, coração

e rins, entretanto, as partículas não conseguiram cruzar a barreira hematoencefálica, por possuírem seu mecanismo de internalização por transporte passivo. A limitação do uso de altas doses de laronidase, como o uso de antipiréticos e anti-histamínicos antes da infusão da enzima, pode ser superada pelo uso da L-MLNC, permitindo uma maior atividade da enzima em menores doses e também reduzindo o custo do tratamento.

3.3.1 Zinco

O zinco é um elemento essencial para a manutenção das funções celulares e fisiológicas e é o mais abundante metal depois do ferro (Little *et al*, 2010). Este metal possui uma atividade biológica multidirecional, estando correlacionado a cerca de 80 enzimas, influenciando, inclusive, a atividade da enzima conversora de angiotensina I. Sua presença é indispensável para criar uma estrutura correta para muitas proteínas regulatórias e receptores hormonais, incluindo a aldosterona, o que é necessário para a interação com DNA. É um elemento essencial das estruturas dos ácidos nucléicos e faz parte do seu metabolismo. O crescimento de células e a divisão dependem do conteúdo de zinco nas células e do seu transporte para dentro das mesmas (Tubek, 2001).

Alguns estudos relacionando hipertensão e zinco foram realizados. Em 2002, ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tiveram uma alimentação padrão ou deficiente em zinco por 4 semanas, a fim de se avaliar se a deficiência de zinco afetaria os níveis de pressão sanguínea em um estado geneticamente hipertensivo através da queda da atividade da superóxido dismutase Cu/Zn. Observou-se que os animais com uma dieta deficiente em zinco tiveram um aumento progressivo na pressão arterial sistólica (Sato *et al*, 2002). Já em animais normotensos, a mesma dieta não proporcionou alterações na pressão sanguínea (Sato *et al*, 2003), sendo que uma dieta rica em zinco levou a um aumento da pressão arterial (Yanagisawa *et al*, 2004).

Em 1995, Davydenko e colaboradores relacionaram a ingestão de Ca, Mg, P, Fe, Cu e Zn com os níveis de pressão sanguínea arterial, para isto, 1556 homens que moravam em Kiev com idades entre 20 – 59 anos foram avaliados. Verificou-se que a ingestão alta de Ca e Zn eram relacionadas com altas taxas

de pressão arterial. Em 2005, Tubek realizou um estudo com 10 pacientes hipertensos, não tratados, de ambos os sexos, que não eram diabéticos ou obesos. Os valores de excreção de zinco por 24 horas foram significativamente diferente entre pacientes hipertensos e saudáveis, $7,46 \pm 3,01 \mu\text{mol}$ e $5,19 \pm 2,19 \mu\text{mol}$ ($p < 0.025$), respectivamente. Após um mês de tratamento com 4 mg de perindopril por dia, um decréscimo do zinco na urina foi observado até atingir níveis que não mais eram significativamente diferentes dos pacientes saudáveis ($5,98 \pm 2,13 \mu\text{mol}$). O decréscimo foi significativamente diferente dos valores antes do tratamento ($p < 0.05$).

Inibidores da enzima conversora de angiotensina, como o captopril, têm sido associados com uma excreção renal excessiva e sustentada de zinco, bem como a baixos níveis séricos de zinco (Golik *et al*, 1998). Diferentemente do ferro, o zinco não pode ser mobilizado dos estoques corporais quando a ingestão é inadequada ou a perda do zinco se torna mais pronunciada. Desta forma, o uso crônico do fármaco pode levar eventualmente a uma depleção de zinco, que pode levar a inúmeros efeitos adversos (Braun e Rosenfeldt, 2013).

Em 1988, Abu-Hamdan e colaboradores mediram os níveis de zinco plasmático e a excreção urinária de zinco em 17 pacientes hipertensos que recebiam captopril. 11 pacientes foram descritos como usuários de alta dose ($266 \pm 34 \text{ mg/dia}$) e uso crônico (mais de 6 meses), enquanto os demais utilizavam baixa dose e por pouco tempo (menos que 6 meses com uma dose em torno de $104 \pm 40 \text{ mg/dia}$). Comparado com o grupo controle não usuário de captopril, os usuários de longo tempo apresentaram uma baixa concentração plasmática e alta perda urinária de zinco, enquanto não houve diferença significativa para usuários de baixa dose e curto tempo. Golik e colaboradores, em 1990, verificaram que para o uso crônico de captopril (75 mg/dia), houve um aumento significativo da perda renal de zinco, bem como uma redução significativa de zinco nas células vermelhas do sangue.

3.4 Captopril

O captopril (D-2-metil-3-mercaptopropanol-L-prolina) é um inibidor ativo oral da enzima conversora de angiotensina (ECA) e demonstra uma efetividade clínica excelente no tratamento da hipertensão arterial. É o primeiro da classe a

apresentar três funções: um grupo mercapto, amida e carboxila em sua estrutura. Tem sido reportado que o captopril se liga ao íon zinco localizado no sítio ativo da ECA tanto pelo grupo mercapto em uma forma monodentada ou de uma maneira bidentada pelos grupos carboxila ou carbonil amida. O captopril aumenta desta forma a perda urinária de zinco e depleta os estoques do mesmo (Golik *et al*, 1998). A estabilidade do fármaco decai quando em contato com íons metálicos.

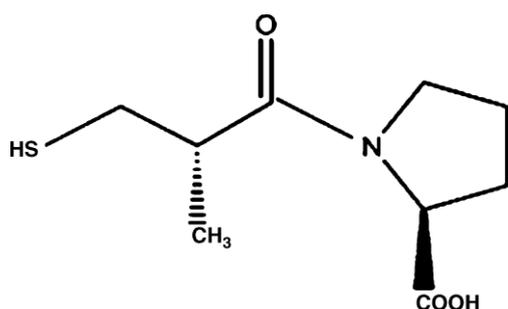


Figura 2. Estrutura química do captopril.

O captopril é livremente solúvel em água (125 – 160 mg/mL em pH 1,9) com pKa de 3,64 a 25°C e seu coeficiente de partição é pH-dependente (Seta *et al*, 1988). Além do pKa do grupo carboxil, a função tiol apresenta um pKa de 9,8 (Remko, 2007).

Segundo estudo de Giudicelli e colaboradores em 1987, a meia-vida de eliminação do captopril livre variou de $0,79 \pm 0,10$ a $0,96 \pm 0,03$ horas, sendo que os níveis plasmáticos de captopril livre não foram mais detectados após 6 horas de tratamento, tanto em uso agudo como crônico.

A eficácia do captopril como fármaco de primeira escolha com ação anti-hipertensiva após dose oral é de 6 a 8 horas e o uso clínico requer uma dose de 37,5 – 75,0 mg a serem administradas 3 vezes ao dia. Desta forma, formas farmacêuticas de ação prolongada podem ser benéficas devido à diminuição na frequência de administração, o que leva a um aumento na adesão ao tratamento, sendo esperado que sejam minimizadas as flutuações das concentrações no sangue diminuindo os efeitos adversos (Ho, 1997; Yimin, 2006).

O captopril é estável em pH 1,2 e o mesmo fica instável à medida que o pH aumenta, quando passa para o pH alcalino no intestino e quando sofre

metabolismo de primeira passagem. Além disso, o mesmo reflete reação proeminente com alimentos e diminuição da biodisponibilidade na presença dos mesmos (Yimin, 2006; Nur, 2000). Um estudo em 1982, realizado por Singhvi e colaboradores, verificou, baseado nos dados de concentração plasmática e excreção urinária, que em um estado alimentado havia uma diminuição de 35 – 40% da biodisponibilidade do fármaco.

O desenvolvimento de formas de liberação controlada de captopril é bastante difícil devido à alta instabilidade tanto *in vivo* como *in vitro* (Azevedo, 2011), sendo degradado em vários metabólitos *in vivo* e sofrendo degradação tipo pseudo-primeira ordem devido a pequenas mudanças de faixa de pH *in vitro*. Além disto, o fármaco sofre elevado *dose dumping* e *burst phenomenon* por ser livremente solúvel (Nur, 2000).

3.4.1 Formas de liberação modificada contendo captopril

Devido à baixa meia-vida e ao curto tempo de duração de ação do captopril, microesferas que formam uma matriz polimérica de captopril em quitosana e gelatina foram desenvolvidas (Li, 2007). As mesmas apresentaram tamanhos entre 220 – 280 μm e demonstraram uma liberação retardada do captopril quando comparadas a um comprimido de captopril, podendo ser correlacionada à formação de um gel e dissolução e difusão do fármaco. Para evitar o *burst effect* foi adicionada celulose microcristalina e se verificou um atraso na liberação do fármaco, demonstrando que a celulose microcristalina pode ser utilizada para alterar a velocidade de liberação.

Em outro estudo, foram desenvolvidas micropartículas de albumina contendo captopril em quatro diferentes proporções de polímero e fármaco, com diâmetros médios variando de 2 a 11 μm . Verificou-se que o aumento da quantidade de polímero aumentou o tempo de liberação do fármaco, também havendo liberação de fármaco imediata, provavelmente pela adesão do mesmo à superfície da partícula ou retenção imprópria do captopril. A eficiência de distribuição das micropartículas *in vivo* apresentando fármaco foi de 11,74% no fígado, 7,69% nos pulmões, 5,67% no baço e 8,50% nos rins após 24 horas, onde o acúmulo de fármaco livre no fígado é de 7,69%, de 4,86% nos pulmões,

de 2,02% no baço e de 2,63% nos rins, da dose injetada após 2 horas de administração (Dandagi, 2006).

Micropartículas de propionato de celulose (CP) contendo captopril foram preparadas pela técnica de evaporação de solvente. O efeito anti-hipertensivo da formulação foi testado frente a uma solução aquosa contendo o fármaco utilizando ratos hipertensos. A formulação continha uma mistura fármaco:polímero 1:1,5 (1:1 baixo:alto peso molecular de CP), tendo sido selecionada devido à alta encapsulação (75,1%), propriedades de fluxo, empacotamento e características de liberação. A rápida liberação inicial foi devida principalmente à dissolução e difusão do fármaco próximo ou na superfície das micropartículas. A segunda e mais lenta fase de liberação envolve a difusão do fármaco dentro da parte interna da matriz polimérica por canais aquosos ou pelos poros da rede. Não houve efeito significativo ($p > 0,05$) na pressão sanguínea sistólica (PSS) após administração de micropartículas sem fármaco. Houve um rápido decaimento na PSS após 2 horas de administração de uma solução aquosa de captopril (6,75 mg/Kg), entretanto, em 3 horas a pressão voltou a aumentar. Por outro lado, uma redução mais gradual e sustentada da PSS até 24 horas foi verificada após administração das micropartículas com fármaco (El-Kamel, 2006).

Em 2011, Azevedo e colaboradores realizaram a inclusão do captopril em α -CD e β -CD e, para assegurar a complexação da molécula hidrofílica e CDs, quatro tipos de processos foram realizados: liofilização (FD), nebulização (SD), evaporação à vácuo (VE) e *kneading* (KM). O captopril livre causou uma resposta inibitória máxima à resposta pressora induzida por angiotensina I após 30 minutos de injeção, mostrando uma redução no seu efeito inibitório após 75 minutos de administração. Todos os complexos apresentaram efeitos inibitórios mais prolongados que o fármaco ($p < 0,05$), entretanto duas formulações, CAP/ α -CD:KM e CAP/ β -CD:SD, demonstraram os melhores resultados, tendo apresentado seu maior efeito inibitório em 30 minutos. Entretanto, um decaimento deste efeito foi observado entre 60 a 90 minutos para CAP/ β -CD:SD. Para CAP/ α -CD:KM o efeito inibitório se mostrou estável até o final do período de observação (2 horas) e este efeito ainda foi detectável após 22 horas, indicando um efeito pressor sustentável da angiotensina I e como se o captopril estivesse protegido da degradação sendo liberado em partes durante o

monitoramento da pressão arterial. A formulação que mostrou melhor grau complexação foi a CAP/ α -CD:KM (superior a 34%).

3.5 Hipertensão

As doenças cardiovasculares são responsáveis por 65% do total de óbitos na faixa etária de 30 a 69 anos, atingindo a população adulta em plena fase produtiva. Haja visto o seu caráter crônico e incapacitante, podendo deixar sequelas para o resto da vida, as mesmas são de grande importância. Dados do Instituto Nacional de Seguridade Social (INSS) demonstram que 40% das aposentadorias precoces decorrem destas. Na faixa etária de 30 a 60 anos, as doenças cardiovasculares são responsáveis por cerca de 14% da totalidade de internações, sendo 17,2% por acidente vascular encefálico (AVE) ou infarto agudo do miocárdio (IAM), resultando em gastos na ordem de 25,7% do total. Em nosso meio, a hipertensão arterial (HA) tem prevalência estimada em cerca de 20% da população adulta (maior ou igual a 20 anos) e forte relação com 80% dos casos de AVE e 60% dos casos de doença isquêmica do coração. Constitui, sem dúvida, o principal fator de risco para as doenças cardiovasculares, cuja principal causa de morte, o AVE, tem como origem a hipertensão não-controlada (Ministério da Saúde, 2002).

No Rio Grande do Sul, um estudo demonstrou uma prevalência de hipertensão arterial sistêmica referente aos diferentes critérios de classificação de 20,4% (187 indivíduos, IC=17,8-23,1%) para pressão arterial \geq 160/95 ou inferior em uso de anti-hipertensivos e 33,7% (309 indivíduos, IC=30,6-36,8%) para pressão arterial \geq 140/90 ou inferior em uso de anti-hipertensivos. Destes 33,7% foram classificados como hipertensos e 49,2% desconheciam esta condição; 10,4% tinham conhecimento de ser hipertensos, mas não seguiam o tratamento; 30,1% seguiam o tratamento, mas não apresentavam controle adequado e 10,4% seguiam tratamento anti-hipertensivo com bom controle. Considerando a condição para pressão arterial de \geq 160/95 mmHg, se observou: 187 (20,4%) indivíduos classificados como hipertensos, sendo que 24,60% ignoravam esta condição, 8,6% tinham conhecimento de ser hipertensos, mas não seguiam o tratamento; 32,1% seguiam o tratamento, mas não apresentavam controle adequado e 34,7% seguiam tratamento anti-hipertensivo com bom controle (Gus, 2004).

Kearney e colaboradores realizaram um estudo de revisão em 2005 para verificar a prevalência mundial e o peso absoluto da doença em 2000 e prever o impacto da mesma em 2025. Para isto, os autores pesquisaram na literatura de 01 de janeiro de 1980 até 31 de dezembro de 2002. Em geral, 26,4% da população adulta em 2000 tinha hipertensão (26,6% dos homens [26%-27,2%] e 26,1% das mulheres [25,5%-26,5%]) e 29,2% (28,8%-29,7%) projetado para ter hipertensão para 2025 (29,0% de homens [28,6–29,4%] e 29,5% para mulheres [29,1–29,9%]). O total estimado de adultos com hipertensão em 2000 foi 972 milhões (957–987 milhões); 333 milhões (329–336 milhões) em países economicamente desenvolvidos e 639 milhões (625–654 milhões) em países economicamente em desenvolvimento. O número de adultos com hipertensão em 2025 foi estimado para aumentar em cerca de 60% para um total de 1,56 bilhões (1,54–1,58 bilhões).

3.5.1 Modelos de hipertensão *in vivo*

Existem diferentes modelos para avaliar a hipertensão em ratos, sendo eles genéticos como ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e as cepas de ratos sensíveis à ingestão de sódio (Dahl) e modelos de hipertensão induzidas como o bloqueio da formação do óxido nítrico pela L-NAME e do tratamento com deoxicorticosterona associado à ingestão alta de sódio.

3.5.1.1 Ratos espontaneamente hipertensos

Entre os modelos mais estudados de hipertensão em animais estão os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) desenvolvidos por Okamoto e Aoki, em 1963 que obtiveram pelo cruzamento entre irmãos e irmãs 100% de animais portadores de hipertensão. Devido à similaridade da fisiopatogenia com a hipertensão primária do homem, estes animais são reconhecidos como um excelente modelo de hipertensão experimental (Fazan Jr, da Silva e Salgado, 2001) começando a desenvolver a hipertensão com 5 semanas de vida e apresentando uma hipertensão já considerada espontânea entre a 10^a e 15^a semanas (Okamoto e Aoki, 1963).

3.5.2 Tratamento da hipertensão

Segundo as recomendações em 2010 do programa de educação para hipertensão do Canadá, modificações do estilo de vida devem ocorrer para indivíduos hipertensos, tais como, restrição de sódio, exercícios aeróbios moderados de 30 – 60 min de 4 à 7 dias por semana, manutenção do peso corporal (índice de 18.5 kg/m² a 24.9 kg/m²) e circunferência de cintura (menor que 102 cm para homens e menor que 88 cm para mulheres); limite de consumo de álcool, bem como uma dieta que tenha ênfase em frutas, vegetais, produtos com baixo quantidade de gordura, presença de fibras solúveis, grãos e proteínas de fonte vegetal e que contenham pouca quantidade de gordura saturada e colesterol, além de considerar a administração do estresse (Hackam *et al*, 2010, Rabi *et al*, 2011, Daskalopoulou *et al*, 2012, Hackam *et al*, 2013).

A pressão arterial deve ser reduzida para menos de 140/90 mmHg em todos os pacientes, e menos que 130/80 mmHg em pacientes com *diabetes mellitus* ou doenças crônicas do rim. Muitos pacientes necessitam mais de um agente para atingir estas pressões sanguíneas. A terapia inicial indicada deve incluir diuréticos tiazídicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), bloqueadores de canais de cálcio de longa duração, bloqueadores de receptores de angiotensina II ou beta-bloqueadores. Uma combinação de dois agentes de primeira linha pode ser considerada como tratamento inicial da hipertensão se a pressão sistólica ficar 20 mmHg acima da pressão alvo ou se a diastólica ficar 10 mmHg acima (Hackam *et al*, 2010, Rabi *et al*, 2011).

A combinação de inibidores da ECA com diuréticos está bem estabelecida no tratamento da hipertensão e tem um efeito aditivo na potência de redução da pressão sanguínea de ambos os grupos de fármacos (Toussaint *et al*, 1989). Em 1998, um estudo foi realizado por Beaulieu, Dufresne e Leblanc para avaliar as medicações mais prescritas evidenciou que os diuréticos são os mais prescritos (45,9%), seguidos pelos inibidores da enzima conversora de angiotensina (28,4%), bloqueadores dos canais de cálcio (26,2%) e beta-bloqueadores (18,0%). Em São Paulo, um estudo em 2001 realizado por Junior, Pierin e Guimarães também demonstrou que os medicamentos mais utilizados são diuréticos (53%) e inibidores da ECA (24%).

Segundo as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial VI, evidências provenientes de estudos de desfechos clinicamente relevantes, com duração relativamente curta, de três a quatro anos, demonstram redução de morbidade e mortalidade em estudos com diuréticos, betabloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina, bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina e antagonistas dos canais de cálcio.

3.6 Furosemida

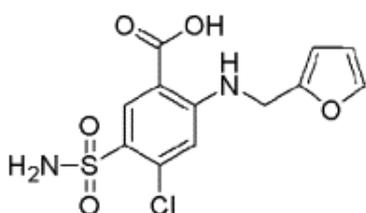


Figura 3. Estrutura molecular da furosemida

A furosemida ou ácido 4-cloro-n-furfuril-5-sulfamoilantranílico (Figura 3) é um fármaco de baixo peso molecular com baixa solubilidade em água, utilizado como diurético para tratar insuficiência cardíaca congestiva e edema devido a sua atividade diurética potente (Lindenberg, Koop e Dressman, 2004). É praticamente insolúvel em água e em diclorometano e é solúvel ou livremente solúvel em acetona (Martindale, 1999).

A furosemida é um fármaco classe IV segundo a Classificação Biofarmacêutica. Embora tenha uma boa permeabilidade no estômago e na região superior do trato gastrointestinal, a sua biodisponibilidade é baixa, variável e errática, devido à baixa solubilidade no fluido gástrico (5-20 µg/mL) (Lindenberg, Koop e Dressman, 2004, Ponto e Schoenvald, 1990). A meia-vida é de até 2 horas sendo prolongada em neonatos e em pacientes com insuficiência renal e hepática. A absorção após dose oral tem grande variação inter e intra-individual e é influenciada pela forma de dosagem, processos de doença e pela presença de alimentos (Beermann e Midskov, 1986; McCrindle *et al*, 1996; Grahnen *et al*, 1989). A absorção é reduzida em 43 a 46% em pacientes com doença renal na fase terminal e é provavelmente reduzida em pacientes

com intestino edematoso causado por insuficiência cardíaca congestiva ou síndrome nefrótica (Keller, Hoppe-Seyler e Schollmeyer, 1982; Korolkovas, 2008/2009).

Alguns estudos foram realizados comparando a administração de furosemida por via intravenosa *bolus* intermitente frente à infusão contínua. Os resultados demonstram que o efeito após cada administração *bolus* dura cerca de 1 a 2 horas, voltando a reter água e sódio devido à ativação neuro-humoral entre as doses. A infusão contínua tem demonstrado, em humanos, uma diurese mais intensa com menores alterações de volume intravascular do que uma dose equivalente cumulativa de 24 horas administrada *in bolus*, presumivelmente resultando em uma menor ativação neuro-humoral. Altas doses de furosemida administradas *in bolus* podem resultar também em concentrações sanguíneas tóxicas, o que pode resultar em ototoxicidade. A administração por infusão contínua sobressai esta preocupação por levar concentrações contínuas ao néfron com menor variação no soro e no tubo renal (Adin *et al*, 2003, Dormans *et al*, 1996).

Dormans e colaboradores (1996) avaliaram a eficácia de altas doses de furosemida em infusão contínua por 8 horas precedida de uma dose de ataque (20% da dose total) frente a uma única injeção *in bolus* em uma dose equivalente em 20 pacientes com insuficiência cardíaca grave. Verificou-se que o volume urinário e a excreção de sódio foram significativamente mais altos para os pacientes tratados por infusão contínua, embora houvesse uma menor excreção urinária de furosemida. A concentração plasmática máxima de furosemida foi maior para a injeção *in bolus*. Uma perda reversível e de curta duração da capacidade auditiva foi reportada para cinco pacientes que receberam injeção *in bolus*.

A furosemida é frequentemente utilizada em pacientes pediátricos após cirurgia cardíaca para aumentar a saída de urina, devido à sobrecarga de volume. Um estudo realizado em 2001 por Vorst e colaboradores com crianças, após cirurgia cardíaca que eram hemodinamicamente instáveis, utilizando infusão contínua de furosemida, demonstrou que foi possível a manutenção da concentração do fármaco abaixo dos níveis ototóxicos.

3.6.1 Formas de liberação modificada contendo furosemida

Em 2005, Jia, Yujun e Guangsheng produziram um novo sistema de nanoemulsão A/O utilizando Triton X-100 como tensoativo, ciclohexano como fase oleosa, n-hexanol como cotensoativo e uma solução diluída de ácido acético contendo quitosana como fase aquosa. Ao sistema foi adicionado glutaraldeído ou uma solução de hidróxido de sódio, fazendo com que a quitosana se reticulasse e as nanopartículas se formassem a partir do sistema de nanoemulsão. As partículas obtidas com hidróxido de sódio ficaram bem dispersas e com tamanho de partícula entre 30 e 150 nm, enquanto para o glutaraldeído ficaram em 22 nm. A partir disto, foi avaliada a capacidade de adsorção das partículas com a furosemida. A capacidade de adsorção máxima para as nanopartículas preparadas com hidróxido de sódio alcançou 270 mg/g.

Sahu e Das, em 2014, desenvolveram uma nanosuspensão contendo furosemida estabilizada com polivinil acetato a fim de melhorar a biodisponibilidade oral do fármaco. Os estudos *in vivo* em ratos revelaram um aumento da absorção oral da furosemida das nanosuspensões em comparação ao fármaco livre. Os valores de ASC_{0-24} e o C_{max} foram de aproximadamente 1,38 e 1,68 vezes maiores que a do fármaco livre. A nanosuspensão mostrou uma redução da pressão arterial de $20,06 \pm 0,02\%$ comparada a $13,37 \pm 0,02\%$ da suspensão de furosemida. A melhora da biodisponibilidade e do efeito farmacodinâmico pode ser devido à melhora evidenciada na dissolução *in vitro* da furosemida em meio gástrico simulado, o que resulta em um aumento da absorção da furosemida na região do estômago onde a mesma possui a maior permeabilidade.

3.7 Estudos de toxicidade

Biomarcadores de toxicidade permitem identificar processos fisiológicos, farmacológicos ou de doenças em animais e humanos, indicando processos biológicos e respostas como efeitos adversos de fármacos e eficácias de tratamentos. Preferencialmente, devem ser medidos nos líquidos corporais de uma forma não invasiva e sensível para serem aplicados no monitoramento de toxicidades potenciais (Buness *et al*, 2014)

Mudanças nas propriedades estruturais e físico-químicas de nanopartículas podem levar a mudanças nas atividades biológicas, incluindo geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo uma das toxicidades mais frequentemente relatadas associadas às nanopartículas. O estresse oxidativo induzido por nanopartículas é devido a fatores acelulares tal como a superfície da partícula, de tamanho, composição e a presença de metais, enquanto que as respostas celulares, tais como a respiração mitocondrial, interação célula-nanopartícula e ativação de células imunes responsáveis por danos mediados por ROS. As respostas ao estresse oxidativo induzido por nanopartículas são responsáveis por outros efeitos patológicos incluindo genotoxicidade, inflamação e fibrose, como demonstrado pela ativação de vias de sinalização celular associadas. Como o estresse oxidativo é um fator determinante da lesão induzida por nanopartículas, é necessário caracterizar a resposta de ROS (Manke, Wang, e Rojanasakul, 2013).

O estresse oxidativo está relacionado com a etiopatogenia de uma série de doenças crônicas, como diabetes, aterosclerose e doença renal, e dentre os muitos alvos biológicos estão os lipídeos que são a classe de biomoléculas mais envolvidas. A oxidação lipídica leva a um número de produtos secundários e entre eles estão os aldeídos, com a habilidade de exacerbar o dano oxidativo. O malondialdeído (MDA) é o principal e mais estudado produto da peroxidação de ácidos graxos polinsaturados (Del Rio, Stewart e Pellegrini, 2005). Os métodos mais utilizados para a detecção do MDA foram desenvolvidos utilizando uma reação com ácido tiobarbitúrico (TBA), entretanto, têm recebido inúmeras críticas devido a sua falta de especificidade. Desta forma, Grotto e colaboradores, 2007, desenvolveram uma metodologia de análise por CLAE após uma hidrólise alcalina e extração com n-butanol.

A alanina aminotransferase (ALT) desempenha um papel importante no metabolismo e gliconeogênese de aminoácidos. A ALT e a aspartato aminotransferase (AST) catalisam a transferência redutiva de um grupo amino de alanina ou aspartato, respectivamente, para a alfa-cetoglutarato originando glutamato e piruvato ou oxaloacetato, respectivamente. Hepatócitos danificados liberam os seus conteúdos, incluindo a ALT e AST, para o espaço extracelular, estas enzimas entram em circulação e assim aumentam os seus níveis sérico sem comparação aos controles. A AST está localizada no coração, cérebro,

músculo esquelético e tecido do fígado, enquanto a ALT está localizada primariamente no fígado, com menor atividade enzimática encontrada no músculo esquelético e no coração. Aumentos nos níveis séricos de ALT e AST também podem surgir a partir de lesões extra-hepática, particularmente do músculo esquelético. A medida de AST no soro é considerado um biomarcador da função hepática menos específico em comparação com a atividade da ALT, já que o AST é liberado de miócitos danificados, bem como hepatócitos (Ozer *et al.*, 2008).

O rim é um dos principais alvos da toxicidade de fármacos, mas a detecção precoce do dano é muitas vezes difícil. Durante décadas, a avaliação da nefrotoxicidade se baseou principalmente na detecção da função renal prejudicada por um aumento no soro de creatinina ou uréia (BUN). No entanto, tem sido reconhecido que devido à reserva funcional do rim, estes marcadores clínicos comumente utilizados aparecem mais tarde e, portanto não são indicadores confiáveis de lesão renal aguda. O BUN é uma medida amplamente utilizada da função renal, mas não é uma medida confiável de lesão renal, porque muitos fatores podem afetar sua concentração. É filtrado livremente pelo glomérulo, mas a uréia é então reabsorvida em diferentes graus por outras partes do néfron. Por conseguinte, um aumento no BUN pode ser visto com depleção de volume na ausência de qualquer lesão tubular. Além disso, o aumento dos níveis de BUN pode ser observado quando a produção de ureia é aumentada, como ocorre por cargas de proteínas exógenas (suplementação de proteína) ou endógenas (estados catabólicos ou sangue no trato gastrointestinal) (Bonventre *et al.*, 2010).

A necessidade de uma detecção prematura e com maior precisão da toxicidade renal, tanto na clínica como na avaliação de segurança pré-clínica, tem estimulado intensa investigação para desenvolver novos biomarcadores com a capacidade de medir efeitos sutis sobre a integridade dos túbulos renais em vez da sua função reduzida (Hoffmann *et al.*, 2010).

A N-acetil- β -glucosaminidase (NAG), uma enzima lisossômica do túbulo proximal, tem sido extensivamente estudada e se tem provado que a mesma é um indicador sensível, persistente e robusto para a detecção do dano tubular. As vantagens da utilização de da NAG são (a), a sensibilidade às alterações sutis nas células epiteliais na borda em escova dos túbulos proximais resultando em

desprendimento de NAG na urina e a quantidade de enzima pode ser diretamente correlacionada com a lesão tubular; e (b) de quantificação, ensaios enzimáticos simples e reprodutíveis são bem estabelecido para medir o analito colorimetricamente utilizando um espectrofotómetro. A desvantagem é que a atividade da NAG urinária pode ser inibida pela ureia endógena (Vaidya, Ferguson e Bonventre, 2008)

A microalbuminúria, definida como a excreção de albumina urinária patológica em níveis (30 a 300 mg/L) abaixo do limite de detecção por vareta urinária convencional, tem sido estabelecido como um marcador útil do desenvolvimento e progressão da doença renal, especialmente a nefropatia diabética. A microalbuminúria resulta de alterações na filtração glomerular secundária a alterações na pressão intraglomerular e/ou das mudanças estruturais do podócito ou membrana basal glomerular. A microalbuminúria pode vir a ser um marcador útil de dano agudo dos rins e danos às células tubular proximal concomitante (Vaidya, Ferguson e Bonventre, 2008).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

O polímero poli(ϵ -caprolactona) ($M_w \cong 80\text{KDa}$), o monoestearato de sorbitano e o triglicerídeo do ácido cáprico/caprílico (TCM) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O polissorbato 80 (Tween80[®]) foi adquirido da Henrifarma (São Paulo, Brasil) e o captopril e a furosemida da Delaware (Porto Alegre, Brasil). A lecitina de soja (Lipoid S75[®]) foi obtida da Lipoid (Alemanha). Os solventes e reagentes utilizados são de grau farmacêutico ou analítico.

4.2 Preparação das nanocápsulas

Para a preparação das nanocápsulas, foi utilizada a metodologia desenvolvida por grupo de pesquisa, processo já patenteado, substituindo os fármacos por captopril e furosemida.

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado (Venturini *et al*, 2011), através da utilização de duas fases: orgânica e aquosa. A fase orgânica constitui-se de: furosemida, polímero (poli- ϵ -caprolactona), monoestearato de sorbitano, triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico e acetona, que serão solubilizados sob agitação e aquecimento (40 °C). Em paralelo, uma solução etanólica de Lipoid S75[®] foi preparada e adicionada à solução orgânica após a dissolução dos componentes. A fase aquosa, por sua vez, constitui-se de um tensoativo de elevado EHL (polissorbato 80). Após a dissolução de todos os componentes de ambas as fases, a fase orgânica foi vertida continuamente através de um funil sobre a solução aquosa. A suspensão resultante foi mantida sob agitação na temperatura de 40 °C por 10 min, após, o solvente orgânico foi removido e a suspensão concentrada sob pressão reduzida a fim de ajustar o volume final para 10,0 mL. Esta formulação é chamada **LNC-Fur(0,5)**.

Para o revestimento das nanocápsulas, uma solução de quitosana 1,0%, em meio contendo ácido acético 1%, foi preparada. Após solubilizar, a solução foi filtrada utilizando unidade filtrante com diâmetro de poro de 0,45 μm (Millipore[®]) para evitar a presença de aglomerados. 1,0 mL dessa solução foi lentamente adicionado sobre 9,0 mL da **LNC-Fur(0,5)** sob agitação magnética moderada. O meio reacional permaneceu sob agitação por 2 h na temperatura

ambiente. Esta formulação é chamada de suspensão de nanocápsulas multiparede [MLNC-Fur(0,45)], agora diluída em função da adição da quitosana.

Para a complexação de captopril na superfície, uma solução aquosa de acetato de zinco (dissolução por 1h a 37 °C) foi adicionada sobre a suspensão MLNC-Fur(0,45) com agitação moderada. O meio reacional foi, então, adicionado de uma solução de 1-[(2S)-3-mercaptopropionil]-L-prolina [Capt(0,5)-Zn-MLNC-Fur(0,45)] e permaneceu sob agitação por vinte e quatro horas.

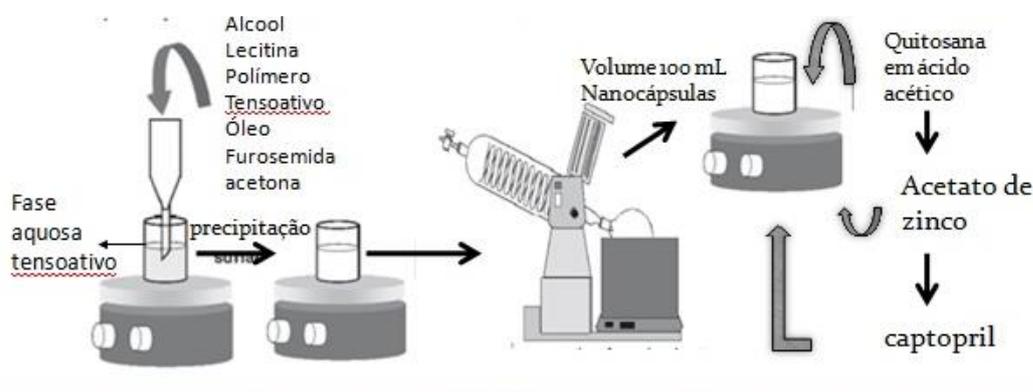


Figura 5. Esquematização da metodologia de preparação das nanocápsulas multiparede (Pohlmann *et al*, 2011).

4.3 Caracterização das nanocápsulas multiparede

As caracterizações foram realizadas para as formulações com concentrações dos fármacos de 0,5 mg/mL e concentração de zinco de 25 µg/mL [Capt(0,5)-Zn(25)-MLNC-Fur(0,45)].

4.3.1 Determinação do diâmetro médio e da polidispersão

As formulações de nanocápsulas multiparede foram avaliadas considerando o diâmetro médio em relação ao volume da esfera equivalente $D_{(4,3)}$, utilizando difração de laser (Malvern® 2000 Mastersizer®, Malvern Instruments, Reino Unido). A distribuição de tamanho é expressa pelo valor de SPAN, expressa na equação 1:

$$SPAN = \frac{D(0,9) - D(0,1)}{D(0,5)} \quad (1)$$

onde $D(0,9)$, $D(0,1)$ e $D(0,5)$ correspondem respectivamente aos volumes cumulativos em 90%, 10% e 50%.

Para outra análise, as amostras foram diluídas 500 vezes (v:v) em água ultrapura previamente filtrada ($0,45 \mu\text{m}$) à temperatura ambiente e o tamanho das partículas foi analisado utilizando-se espalhamento de luz dinâmico (ZetaSizer® ZS, Malvern Instruments, Reino Unido).

A análise de rastreamento das nanocápsulas multiparede foi realizada através do equipamento NanoSight LM20 (NanoSight®, Amesbury, Reino Unido). Foi feita uma diluição entre 1000 e 5000 vezes em água MilliQ® e as amostras diluídas foram injetadas na câmara de amostra. Um feixe de luz laser à 640 nm incidiu sobre as amostras e o espalhamento foi captado durante um tempo pré-determinado utilizando-se obturador e ajustes de ganho manuais. Os dados foram coletados e analisados através do software NTA 2.0 Build 127 que identifica e rastreia nanopartículas individuais que se deslocam em movimento browniano, relacionando o movimento com um determinado tamanho de partícula. Os resultados corresponderam à média aritmética dos valores calculados com os tamanhos de todas as partículas analisadas pelo equipamento.

4.3.2 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta foi determinado utilizando-se ZetaSizer ZS (Malvern, Reino Unido), cujo princípio baseia-se na mobilidade eletroforética de sistemas coloidais. As diferentes formulações foram diluídas 500 vezes em solução aquosa de cloreto de sódio 10 mM, previamente filtrada ($0,45 \mu\text{m}$), e depois foram analisadas.

4.3.3 Determinação do pH

Foi utilizado um potenciômetro DM-22 (Digimed, Brazil) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ previamente calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0, imerso diretamente nas suspensões coloidais após a sua preparação. As análises foram realizadas em triplicatas.

4.3.4 Análise morfológica das nanocápsulas multiparede por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Foi utilizada microscopia eletrônica de transmissão (MET) para analisar a morfologia das nanocápsulas multiparede. As suspensões foram diluídas em água na proporção de 1:10 (suspensão:água ultrapura) e depositadas sobre *grids* de cobre (400 *mesh*) com revestimento de *formvar*/carbono (Electron Microscopy Sciences), sendo utilizado como contraste negativo o acetato de uranila. As amostras foram mantidas em dessecador à vácuo até a realização da microscopia em microscópio eletrônico de transmissão operando a 80 kV, no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

4.3.5 Análise morfológica das suspensões por microscopia de força atômica (AFM)

Uma pequena quantidade da amostra foi coletada com um capilar de vidro e depositada em mica, previamente fixada no porta-amostra com auxílio de uma fita adesiva de dupla face. Esperou-se a amostra secar completamente e esta foi levada ao microscópio de força atômica para se iniciar as análises. Para a leitura das superfícies em AFM, o modo de operação *tapping* foi empregado e a área analisada foi de 1 x 1 μm^2 , cada área com 256 pontos varridos, com velocidade de 0,5003 Hz e escala (eixo z) de 50nm. As medidas foram realizadas em ar e temperatura ambiente (23°C). O microscópio de força atômica utilizado foi um Nanoscope IIIa Multimode, fabricado pela Digital Instruments, Santa Bárbara – CA. Para a análise das imagens de altura (planas e tridimensionais) e de fase, utilizou-se o software Nanoscope v5.31r1, Bruker, Santa Bárbara, EUA.

4.3.6 Determinação da estabilidade física dos sistemas

Foi utilizada a metodologia de espalhamento múltiplo de luz através de Turbiscan *LAB*[®] (Formulacion Co., França). As amostras (cerca de 20 mL) foram colocadas em uma cubeta cilíndrica de vidro e inseridas no equipamento a 25 °C. A varredura foi feita por uma fonte de luz no infravermelho próximo ($\lambda = 880$ nm) sendo a cubeta varrida a cada 40 μm do fundo ao topo da cubeta (55 mm) durante 1 h em intervalos de 5 min. A transmissão e o retroespalhamento receberam luz em ângulos de, respectivamente, 180° e 45° em relação ao feixe de luz incidente, e foram detectados simultaneamente por dois detectores.

4.3.7 Avaliação da manutenção do tamanho de partícula em meio gástrico e intestinal simulado

Para esta avaliação, 1,0 mL de formulação [Cap(0,5)-Zn(25)-MLNC-Fur(0,45)] foi colocada em 9,0 mL de meio e mantida sob agitação magnética à 37 °C. Dois meios foram utilizados, um meio gástrico simulado composto por uma solução de ácido clorídrico com NaCl pH 1,2 com 0,32% de pepsina e um meio intestinal simulado contendo tampão fosfato pH 7,5 com 1% de pancreatina (Roger, Lagarce e Benoit, 2009). Em 0, 1, 2 e 3 horas de ensaio foi retirada uma alíquota para análise pela técnica de difração de laser (Malvern® 2000 Mastersizer®, Malvern Instruments, Reino Unido). O meio também foi analisado para verificar se haveria alguma interferência do mesmo.

4.3.8 Avaliação da presença de nanocristais

Para avaliar a formação de nanocristais de furosemida na formulação de nanocápsulas, quantificou-se por HPLC por 28 dias o teor de furosemida, comparando-se a formulação parada e sob agitação (Pohlmann *et al.*, 2008). Para o estudo, utilizou-se concentrações de 0,30 a 0,50 mg/mL do fármaco.

4.3.9 Fármaco encapsulado ou complexado

Para análise do percentual de fármaco encapsulado (furosemida) ou complexado (captopril), foi utilizada a técnica de ultrafiltração/centrifugação. A concentração total do fármaco foi calculada pela diferença entre a concentração total dos fármacos na formulação e a concentração no filtrado. Para isto, a concentração total foi medida através da extração dos fármacos na formulação analisada e após foi feita análise por HPLC conforme metodologia a seguir. A quantidade não encapsulada ou adsorvida foi quantificada no filtrado.

Foram realizadas as análises para a furosemida na LNC sem revestimentos e para o captopril e a furosemida utilizando a LNC multicamada. Analisou-se também uma solução contendo quitosana e polissorbato 80 contendo captopril, bem como uma solução de zinco contendo polissorbato e

captopril e a LNC revestida com quitosana, sem zinco, sendo adicionado o captopril para verificar se haveria algum tipo de interferência na análise.

Para a extração, 500 µL da formulação foram adicionados a um balão volumétrico de 25,0 mL. 10,0 mL de acetonitrila foram acrescentados e sonificados por 10,0 minutos. Após o volume foi completado com ácido ortofosfórico 0,11% e novamente sonificado por 10 minutos. Em seguida, foi feita a filtração por membrana de 0,45 µm e a análise realizada por HPLC.

A concentração do fármaco encapsulado foi calculada pela diferença entre o conteúdo de fármaco na formulação, ou seja, concentração (Ct) e a concentração na fase aquosa (Caq) e a eficiência de encapsulação (EE%) foi obtida dividindo esta diferença pelo total e multiplicando por 100 (Eq. 2).

$$EE(\%) = \frac{(Ct - Caq) \times 100}{Ct} \quad (2)$$

4.3.10 Análise comparativa da difusão de captopril ou zinco por saco de diálise

Três experimentos foram realizados, a difusão de captopril em uma concentração de 0,5 mg/mL com diferentes concentrações de zinco (25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL). Após a determinação ideal da concentração de zinco, uma nova difusão em diferentes concentrações de captopril (0,1, 0,25 e 0,5 mg/mL) na formulação e a diálise analisando a difusão do zinco para a formulação selecionada foi realizada tendo uma solução de zinco como controle. A difusão através de saco de diálise (membrana de 10 – 12 kDa, 25 mm (Sigma-Aldrich ®)) foi realizada adicionando 4,0 mL da formulação ou da solução de captopril dentro do saco de diálise e 40,0 mL de água dentro de um béquer, o saco foi colocado sob agitação constante dentro do béquer em um banho à 37 °C por 6 ou 10 horas, sendo as coletas realizadas em 30 min; 1; 2; 4; 6; 8 e 10 horas, retirando-se toda a água contida no béquer e a repondo.

Para a quantificação dos íons zinco foi realizada uma reação colorimétrica com ditizona em metanol (1,3 µg/mL) e as leituras foram realizadas em um espectrômetro de ultravioleta em um comprimento de onda de 514 nm (UV-1800 PC Pró-Análise, Brasil).

Os dados foram expressos em porcentagem em relação ao teor da formulação ou solução. Os resultados foram obtidos a partir de triplicatas.

4.4 Análise de teor de captopril e furosemida

Para as análises de teor de captopril e de furosemida foi utilizado o método descrito por Azevedo e colaboradores, em 2008, modificado. Estas análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção a 215 nm, vazão de 1 mL/min e uma coluna de 250x4,6 mm, 5,0 μ m (Phenomenex®). Para a preparação da fase móvel (FM), fez-se uma mistura de ácido fosfórico 0,11% (v/v), metanol e acetonitrila (50:25:25) e se filtrou através de membrana de celulose regenerada, com porosidade de 0,45 μ m, sob vácuo, sendo os tempos de retenção para o captopril e a furosemida de 5 e 11 minutos, respectivamente.

A curva foi realizada nas seguintes concentrações 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 μ g/mL.

Para avaliação de pureza do pico foi utilizado o equipamento Agilent 1200 series LC com detector de foto-diodo (Santa Clara, USA) nas mesmas condições de análise.

4.5 Análise da estabilidade química dos fármacos na formulação

Considerando a necessidade de administração futuramente nos animais experimentais da formulação por 5 dias de experimento, foram analisados os teores dos fármacos na formulação e em uma solução de captopril, por este ser considerado um fármaco instável em solução, durante este período. Foi verificada também a área dos produtos de degradação.

4.6 Estudos *in vivo*

4.6.1 Animais

Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) adultos e machos foram adquiridos do Instituto de Cardiologia (Porto Alegre, Brasil) e foram aclimatados no biotério de experimentação por pelo menos duas semanas antes do início dos

ensaios biológicos. As condições ambientais do local foram controladas e adequadas ao abrigo dos animais, com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 horas (07:00-19:00), umidade relativa em torno de 40 -60% e sanitização conforme a rotina da Laboratório de Experimentação Animal (LEA). Os animais tiveram livre acesso à água e alimentação (ração padrão LEA) e foram mantidos em caixas de polipropileno de 49X34X16cm, cada uma com capacidade para 4/5 ratos no máximo.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com legislação vigente no Brasil, Lei 11.794/08, chamada Lei Arouca (Cobea, 2009), regulamentada em 8 de outubro de 2008, Portaria 1250/2009 de 07 de outubro de 2009 e com as normas do Código de Ética da Medicina Veterinária, de 2002 (Brasil, 21 de junho de 2002) e Resoluções Normativa 12 e 13 de 20 de setembro de 2013. Os procedimentos de anestesia, eutanásia e descarte das carcaças foram supervisionados por responsável técnico do LEA. Imediatamente após a finalização dos experimentos os ratos foram anestesiados por via inalatória com isoflurano 4% em 0,5 L/min e após a coleta de sangue da veia cava (em torno de 10 mL) a eutanásia ocorreu pela diminuição da pressão sanguínea acompanhada de exsanguinação sob anestesia profunda. Logo após a finalização dos experimentos, foi realizada a eutanásia, os animais foram acondicionados em sacos plásticos identificados e descartados conforme a rotina do LEA. Os materiais perfuro-cortantes utilizados foram descartados em recipientes adequados de descarte especial.

4.6.2 Tratamento

Os animais foram aleatoriamente divididos em grupos de seis animais cada e os tratamentos ou controles administrados por gavagem em uma dose de furosemida de 3,6 mg/kg e/ou captopril de 4,0 mg/Kg a cada 24 horas por 5 dias. Como a concentração da furosemida na formulação era de 0,45 mg/mL e a de captopril de 0,5 mg/mL, o volume administrado foi de 8,0 mL/Kg. Os grupos eram constituídos por dois grupos controle (solução branco e MLNC branco), tratados com fármacos em associação [solução contendo furosemida e captopril, Capt(0,5)-Zn(25)-MLNC-Fur(0,45) e Capt(0,5)-MLNC-Fur(0,45)] e tratados com o fármaco isolado [solução captopril e Capt(0,5)-Zn(25)-MLNC)]. Para a solução de furosemida e captopril, 12,5 mg da furosemida foi solubilizada em 15,0 mL de

propilenoglicol, após foi adicionada água (10,0 mL) até a obtenção de uma concentração final de 0,45 mg/mL de furosemida, a mesma obtida para a formulação após a adição da solução de quitosana (9,0 mL de formulação com adição de 1,0 mL de solução de quitosana 1%) e depois adicionado o captopril da mesma forma que para a formulação. O grupo controle recebeu a mesma proporção de propilenoglicol e água como solução, sem fármacos.

4.6.3 Medida da pressão sanguínea

A pressão sanguínea foi medida utilizando pletismografia de cauda (Pletismógrafo de Cauda V.2.11 – Insight®), um método não invasivo de medida indireta. Primeiramente, os animais foram ambientados às condições experimentais (bioaquecedor e pletismografia) por cinco dias para minimizar erros de análise. Nos dias dos experimentos, os animais foram previamente mantidos a 40 °C em um contensor de acrílico por 15 minutos, a fim de tornar as pulsações da artéria da cauda detectáveis, e no primeiro dia a pressão foi medida em 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas após a administração oral. Após 5 dias de administração, realizou-se o mesmo procedimento e a pressão foi medida em 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas após a administração oral.

Um “cuff” foi colocado nas caudas dos animais, inflado e o pulso arterial captado pelo transdutor. A partir de uma escala de calibração prévia, é possível se determinar o valor referente ao primeiro pulso captado e este valor é considerado valor de pressão arterial sistólica. Quando a pressão é lentamente liberada, o sangue passa através do “cuff” inchando a cauda. A pressão arterial diastólica é considerada quando a cauda para de inchar e de certa forma estas medias são tomadas como menos confiáveis pelo método indireto.

4.6.4 Amostragem de sangue

No quinto dia de administração, após a última medida de 24 horas, os animais foram mantidos sob anestesia com isoflurano e o sangue foi coletado pela veia cava em um tubo contendo EDTA sódico para o plasma e um tubo sem anticoagulante para o soro. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1500 g por 10 minutos e o sobrenadante foi removido e armazenado a -80°C até a

análise. A eutanásia ocorreu acompanhada pelo exsanguinação e decaimento da pressão sanguínea sob anestesia profunda.

4.6.4.1 Avaliação do estado oxidativo

A peroxidação lipídica foi avaliada através da quantificação do malondialdeído (MDA) nas amostras de plasma. Os níveis de MDA foram determinados pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com um detector visível (WellChrom HPLC-VIS, Knauer, Alemanha), como descrito anteriormente por Grotto e colaboradores(2007). Antes da injeção das amostras no CLAE, foi realizada a etapa de hidrolização com NaOH a 60 °C por 30 minutos, seguida de extração desproteinizante com n-butanol. Tióis não protéicos foram medidos nos eritrócitos após centrifugação seguindo protocolo desenvolvido por Ellman (1959) com modificações. Resumidamente, alíquotas de eritrócitos (0,3 mL) foram adicionadas a um tampão fosfato 0,3 mol/L (0,85 mL), pH 7.4 e a reação foi medida em espectrofotômetro a 412 nm após a adição de 10 mM de ácido 5-5'-ditio-*bis*(2-nitrobenzóico) (DTNB) (0,05 mL).

4.6.4.2 Marcadores de dano tecidual no sangue

Alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ácido úrico (UA), uréia e creatinina (Cr) foram analisados no soro utilizando kits comerciais (ADVIA 1800 Siemens Healthcare DiagnosticsInc., Tarrytown, USA). Sódio, cloro e potássio foram determinados por um eletrodo íon seletivo ADVIA 1800 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown EUA).

4.6.5 Amostragem de urina

No quinto dia de administração, após 12 horas da gavagem, os animais foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas com água e alimentação controladas, de acordo com as condições de cuidado animal pelo Conselho Canadense de Cuidados Animais. As amostras de urina foram mantidas sob refrigeração até o momento da análise. Foram analisados o pH, utilizando uma fita de urina (Multistix 10 SG Siemens, Bayer), e a gravidade específica.

4.6.5.1 Marcadores de dano renal na urina

Para comparar a função dos rins entre os grupos, os níveis de creatinina (Cr-U) foram avaliados através de um kit laboratorial comercial (Doles Reagents, Goiânia, GO, Brazil). A atividade da N-acetil-beta-D-glucosaminidase (NAG) foi verificada utilizando um método espectrofotométrico (UV-VIS Hitachi spectrophotometer model U-1800®) segundo Horak e colaboradores (1981). A microalbumina foi analisada utilizando um método imunoturbidimétrico (ADVIA 1800 Siemens Healthcare DiagnosticsInc., Tarrytown, USA).

4.6.6 Peso relativo dos órgãos

Após a eutanásia dos animais, o cérebro, o coração, o baço, os rins (esquerdo e direito), o fígado, e o pulmão foram coletados, lavados com uma solução salina e pesados.

O peso relativo dos órgãos foi calculado considerando o peso do corpo do animal pela equação 3:

$$\text{Peso relativo do órgão (\%)} = \frac{\text{Peso do órgão} \times 100}{\text{Peso do corpo}} \quad (3)$$

4.7 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando SPSS 18.0 para Windows e GraphPad Prism 5 Project software systems (La Jolla, CA, EUA). Os dados foram expressos com média \pm desvio padrão. O nível de significância foi tomado como $p < 0.05$ ou $p < 0.01$ e determinado utilizando análise de variância de uma via (ANOVA) ou ANOVA de medidas repetidas seguida de testes “post hoc” de comparação múltipla (Teste de Tukey).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O texto completo do capítulo 5, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 60 – 116, foi suprimido por conter dados ainda não publicados. Consta da descrição do desenvolvimento da formulação, caracterização e avaliação da estabilidade, eficácia e toxicidade *in vivo* em ratos espontaneamente hipertensos. Parte dos resultados podem ser encontrados na publicação a seguir:

MICHALOWSKI, C.B., ARBO, M.D., ALTKNECHT, L., ANCIUTI, A.N., ABREU, A.S.G., L.M.R., POHLMANN, A.R., GARCIA, S.C., GUTERRES, S.S. Oral Treatment of spontaneously Hypertensive Rats with Captopril Surface Functionalized Furosemide-Loaded Multi-Wall Lipid-Core Nanocapsules. *Pharmaceutics* (2020), 12(1), 80, 23 páginas.

Durante esta tese, foram desenvolvidas nanocápsulas multiparede contendo furosemida (0,45 mg/mL) em seu núcleo lipídico e captopril ligado em sua superfície (0,5 mg/mL). Diferentes concentrações de zinco foram testadas frente a um perfil de difusão de captopril em água e se observou melhores perfis com as menores concentrações, desta forma, a menor concentração de zinco foi utilizada (25 µg/mL).

A técnica de ultrafiltração/centrifugação foi utilizada para verificar os percentuais de encapsulação da furosemida que variou de 81,16% para 97,47% após a adição dos revestimentos.

Utilizou-se a técnica de diálise para comparar perfis de difusão de captopril frente a diferentes concentrações do fármaco e para se verificar a interferência dos diferentes componentes da formulação. Observou-se que, mesmo sem o zinco, a formulação apresenta um perfil sustentado de liberação de captopril, provavelmente devido a grupos carboxila carregados negativamente (pKa 3,7), já que a formulação apresenta um pH em torno de 4,05.

Quanto à caracterização físico-química da formulação Capt(0,5)-Zn(25)-MLNC-Fur(0,5), em todas as etapas de preparação foi demonstrado que a distribuição das partículas foi monomodal. A técnica de difração a laser evidenciou partículas nanométricas (em torno de 150 nm) e um valor de SPAN em torno de 1,0,0 que indica uma baixa polidispersão. Por espalhamento de luz dinâmico, o tamanho médio das partículas foi em torno de 150 nm e o PDI observado situou-se em torno de 0,2. O potencial zeta foi negativo para a LNC-Fur(0,5) que passou a ser positivo após o revestimento com quitosana, conforme esperado. A técnica de rastreamento de partículas apresentou maiores diâmetros, provavelmente devido ao menor limite de análise, não detectando partículas menores, o que leva a um aumento da média.

A análise por espalhamento múltiplo de luz apresentou baixos valores de alteração no fundo e na parte superior da cubeta (<2%), o que indica que não há uma instabilidade no sistema.

As análises por microscopia eletrônica de transmissão de força atômica permitiram observar a presença de cápsulas nanométricas esféricas. As

imagens obtidas por microscopia de força atômica permitiram estimar a espessura do filme polimérico da nanocápsula em torno de núcleo lipídico (50,80 nm) para uma partícula de 363.41 nm em diâmetro. Após o revestimento, pôde-se observar o mesmo em torno da partícula.

Quando analisada a estabilidade física das nanocápsulas em um meio gástrico simulado e meio intestinal simulado, pode-se verificar que a formulação se mostra estável em meio gástrico, tanto em uma análise por volume como por número pela metodologia de difração a laser. Por sua vez, em meio intestinal, a formulação mostra uma leve alteração do perfil em uma análise por volume, mas que se mantém em uma análise por número.

Os estudos de avaliação da pressão arterial em ratos SHR permitiram verificar que as formulações apresentaram um tempo de efeito anti-hipertensivo mais prolongado do que as soluções dos mesmos fármacos e que os fármacos em associação prolongavam ainda mais este efeito. Para a pressão sistólica, observou-se um efeito mais prolongado no primeiro dia de administração em relação ao quinto para a maioria dos tratamentos, com exceção da formulação Capt(0,5)-Zn(25)-MLNC-Fur(0,45), que manteve sua ação por 24 horas. Para a pressão diastólica, não se observou diferença entre as formulações e soluções, somente para as formulações com os fármacos em associação para as quais o efeito durou até 24 horas.

Avaliando os estudos de toxicidade, a presença do zinco se mostrou adequada na formulação com os fármacos em associação, visto que a formulação Capt(0,5)-MLNC-Fur(0,45) mostrou valores aumentados de NAG o que indica uma tendência à lesão renal, sendo este um marcador precoce do dano renal, bem como um aumento dos valores de MDA, mostrando um aumento no estresse oxidativo. Já a formulação Capt(0,5)-Zn(25)-MLNC-Fur(0,45), não apresentou alterações nos marcadores de dano tecidual e de estresse oxidativo se mostrando desta forma segura quando da administração por 5 dias.

Referente às demais análises, não se verificou uma diferença significativa entre os grupos, com exceção dos marcadores de dano renal analisados na urina, onde se verificou uma redução dos valores de microalbuminúria para Capt(0,5)-Zn(25)-MLNC, demonstrando uma proteção renal para esta formulação frente ao crescente desenvolvimento da hipertensão.

O conjunto dos resultados experimentais obtidos na presente tese indica a viabilidade da produção de uma formulação nanoestruturada inovadora baseada em nanocápsulas multiparede estáveis contendo furosemida em seu núcleo oleoso e captopril complexado ao zinco externamente. Esta estratégia mostrou-se eficiente na redução da pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos e também foi capaz de prolongar significativamente o efeito farmacológico. Os estudos toxicológicos indicam que a formulação é segura, pois não causou alterações significativas nos marcadores de danos analisados. Adicionalmente, os resultados demonstram pela primeira vez a possibilidade de administrar as nanocápsulas multiparede pela via oral, o que é um resultado promissor do ponto de vista da expansão da aplicabilidade destes novos carreadores, pois esta rota de administração de medicamentos, a mais usual e aceita pelos pacientes, ainda é bastante desafiadora para a nanotecnologia. Diferentemente do que foi observado neste trabalho, muitos dos nanocarreadores não alcançam sucesso administrados pela via oral, por sofrerem agregação, desestruturando-se ou, ainda, não permitindo a absorção correta dos fármacos.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-HAMDAN, D.K. *et al.* Taste acuity and zinc metabolism in captopril-treated hypertensive male patients. **Am J Hypertens**, v. 3, p. 303S–8S, 1988.

ADIN, D.B. *et al.* Intermittent Bolus Injection versus Continuous Infusion of Furosemide in Normal Adult Greyhound Dogs. **J Vet Intern Med**, v.17, p.632–636, 2003.

ALI, B.H. Plasma pharmacokinetics of intravenous e intramuscular furosemida in the camel (*Camelus dromedarius*). **Research in Veterinary Science**, v.64, p.69-72, 1998.

ALQAHTANI, S. *et al.* Cellular uptake, antioxidant and antiproliferative activity of entrapped α -tocopherol and γ -tocotrienol in poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) and chitosan covered PLGA nanoparticles (PLGA-Chi). **Journal of Colloid and Interface Science**, v.445, pág. 243–251, 2015.

AMINI, M. ZARGHI, A. VATANPOUR, H. Sensitive high-performance liquid chromatographic method for determination of captopril in plasma. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v.73, p. 303-306, 1999.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, volume 2. 5ª Ed. Brasilia, 2010b.

ARAUJO, B. V, *et al.* Free renal levels of voriconazole determined by microdialysis in healthy and *Candida* sp.-infected Wistar rats. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n.2, pág. 154-159, 2009.

AUSTIN, P.R., *et al.* Chitin: New Facets of Research. **Science**, v.212 p. 749-753, 1981.

AZEVEDO, R.C.P, RIBEIRO, G.P., ARAÚJO, M.B. Desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução para captopril em cápsulas magistrais por CLAE. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**.v. 44, n. 2, abr/jun, 2008.

AZEVEDO, M.B.M. *et al.* New formulation of an old drug in hypertension treatment: the sustained release of captopril from cyclodextrin nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v.6, p. 1005 – 1016, 2011.

BHARATI, M. *et al.* Preparation and *in vitro* & *in vivo* characterization of valsartan loaded eudragit nanoparticles. **Der Pharmacia Sinica**, v. 3, n. 5, p. 516-525, 2012.

BAUMANS, V., PEKOW, C., 2010. Common Nonsurgical Techniques and Procedures, **Handbook of Laboratory Animal Science**, Volume I, Third Edition. CRC Press, pp. 401-445.

BEAULIEU, M.D.; DUFRESNE, L.; LEBLANC, D. Treating hypertension. Are the right drugs given to the right patients? **Can Farm Physician**, v. 44: p. 294-298, 1998.

BEERMANN, B.; MIDSKOV, C. Reduced Bioavailability and Effect of Furosemide Given with Food. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 29, p. 725-727, 1986.

BENDER, E.A. *et al.* Hemocompatibility of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v.426, p. 271– 279, 2012.

BENDER, E.A. *et al.* New strategy to surface functionalization of polymeric nanoparticles: one-pot synthesis of scFv anti-LDL (-) -functionalized nanocapsules. **Pharmaceutical Research**, v. 31, p. 2975–2987, 2014.

BIANCHIN, M.D. *et al.* Radar charts based on particle sizing as an approach to establish the fingerprints of polymeric nanoparticles in aqueous formulations. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.30, pág. 180-189, 2015.

BIOLLAZ, J.; WAEBER, B.; BRUNNER, H.R. Hypertensive Crisis Treated with Orally Administered Captopril. **Eur J Clin Pharmacol** v. 25, pág.145-149, 1983.

BONVENTRE *et al.* Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. **Nat Biotechnol**. May ; v.28, n. 5, pág.: 436–440,2010.

BOYD R.D., PICHAIMUTHU, S. K., CUENAT A. New approach to inter-technique comparisons for nanoparticle size measurements; using atomic force microscopy, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v.387, p. 35– 42, 2011.

BUNESS, A. *et al.* Identification of Metabolites, Clinical Chemistry Markers and Transcripts Associated with Hepatotoxicity. **Plos one**, v. 9, n. 5, pág 1-10.

CALVO, P. *et al.* Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. **Colloid Polym Sci**, v.275, p. 46-53, 1997.

CARDA-BROCH, S. *et al.* Use of a three-factor interpretive optimisation strategy in the development of an isocratic chromatographic procedure for the screening of diuretics in urine samples using micellar mobile phases. **Journal of Chromatography A**, v. 893, p. 321–337, 2000.

CARVALHO, G.D. *et al.* Avaliação clinica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. **Revista Ceres**, v. 56, n. 1, p. 51-57, 2009.

CATTANI, V.B., POHLMANN, A.R., DALLA COSTA, T. Pharmacokinetic evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanoencapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363,n. 1–2, pág. 214–216, 2008.

CELIA, C. *et al.* Turbiscan Lab® Expert analysis of the stability of ethosomes® and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.72, p. 155–160, 2009.

COUVREUR, P., VAUTHIER, C. Nanotechnology: Intelligent design to treat Complex Disease. **Pharmaceutical Research**, v. 23, No. 7, p. 1417-1450, July 2006.

CUNHA, H.C. *et al.* Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic fraction of the essential oil of *Alpinia zerumbet*. **Vascular Pharmacology**, v. 58, n. 5-6, pág. 337-345, 2013.

DAMGE, C.; MAINCENT, P.; UBRICH, N. Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. **Journal of Controlled Release**, v.117, n.2, p.163-170, 2007.

DANDAGI, P.M *et al.* Biodegradable microparticulate system of captopril. **International Journal of Pharmaceutics** v. 307, p. 83-88, 2006.

DASKALOPOULOU, S.S *et al.* The 2012 Canadian Hypertension Education Program Recommendations for the Management of Hypertension: Blood Pressure Measurement, Diagnosis, Assessment of Risk, and Therapy. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 28, n. 3, p. 270–287, 2012.

DAVYDENKO, N. V., *et al.* Interrelationship between dietary intake of minerals and prevalence of hypertension. **Vopr. Pitan**, v. 6, p. 17–19, 1995.

DEL RIO, D. STEWART, A.J., PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.15, pág. 316-328, 2005.

DODANE, V.; KHAN, M. A.; MERWIN, J.R. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. **International Journal of Pharmaceutics**. v.182, p. 21–32, 1999.

DORMANS, T.P.J.*et al.* Diuretic Efficacy of High Dose Furosemide in Severe Heart Failure: Bolus Injection Versus Continuous Infusion. **JACC**, v. 28, n. 2, p. 376-382, 1996.

EKAMBARAM, P.; ABDUL, H.S.A. Formulation and Evaluation of Solid Lipid Nanoparticles of Ramipril. **J Young Pharm**, v. 3, n.3, p. 216–220, 2011.

EL-KAMEL, A.H.; AL-SHORA, D.H; EL-SAYED, Y.M. Formulation and pharmacodynamic evaluation of captopril sustained release microparticles. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n.4, p; 389–404, 2006.

ELLMANN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, pág. 70-77, 1959.

FAZAN Jr. R., SILVA, V. J. D., SALGADO, H.C. Modelos de hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, pág. 19-29, 2001

FDA, 2011. Inactive Ingredient Database, in: Department of Health and Human Services, C.D.E.R. (Ed.). Food and Drug Administration, FDA, Silver Spring, MD.

FERNÁNDEZ-URRUSUNO, R. *et al.* Enhancement of Nasal Absorption of Insulin Using Chitosan Nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n.10, p. 1576-1580, 1999

FESSI, H., *et al.* Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. R1-R4, 1989.

FILIPPE, V.; HAWES, A.; JISKOOT, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, 2010.

FROZZA, R.L. *et al.* Characterization of trans-Resveratrol-Loaded Lipid-Core Nanocapsules and Tissue Distribution Studies in Rats. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.6, n.6, p.694-703, 2010.

FRUŠIĆ-ZLOTKIN, M. *et al.* Penetration and biological effects of topically applied cyclosporin A nanoparticles in a human skin organ culture inflammatory model. **Experimental Dermatology**, v. 21, n. 12, p. 938–943, 2012.

FUCHS *et al.* Prevalência de Hipertensão Arterial Sistêmica e Fatores Associados na Região Urbana de Porto Alegre. Estudo de Base Populacional. **Arq Bras Cardiol**, v. 63,n. 6, p. 473-479, 1994.

GALINDO-RODRIGUEZ, S.A. *et al.* Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of in vivo studies, **Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.** V.22, p. 419–464, 2005.

GAUMET, M. *et al.* Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.69, p.1–9, 2008.

GIUDICELLI J.F.; RICHER C.; MATTEI, A. Pharmacokinetics and biological effects of captopril and Hydrochlorothiazide after acute and chronic administration either alone or in combination in hypertensive patients. **Br.J.clin.Pharmac.**, v. 23, p. 51S-63S, 1987.

GOLIK, A *et al.* Zinc metabolism in patients treated with captopril versus enalapril. **Metabolism**, v. 39, p. 665–7, 1990.

GOLIK, A *et al.* Effects of Captopril and Enalapril on Zinc Metabolism in Hypertensive Patients. **Journal of the American College of Nutrition.**, v. 17, n. 1, p. 75-78, 1998.

GRAHNEN, A., HAMMARLUND, M. LUNDQVIST, T. Implications of intraindividual variability in bioavailability studies of furosemide. **Eur. J. Clin. Pharmacol.** v.27, p. 595-602, 1984.

GRANERO, G.E. *et al.* Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Furosemide. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, pág. 2544–2556, 2010

GROTTO, D. *et al.* Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, pág. 619–624, 2007

GULYAEV, A.E. *et al.* Significant Transport of Doxorubicin into the Brain with Polysorbate 80-Coated Nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 10, 1999.

GUO, M. *et al.* Mechanisms of chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for improving oral absorption of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin. **Nanotechnology**, v. 24, pág 1 -15, 2013.

GUS, I. *et al.* Prevalência, Reconhecimento e Controle da Hipertensão Arterial Sistêmica no Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.5, n.83, p. 424-428, 2004.

GUTERRES, S.S. *et al.* Gastro-intestinal tolerance following oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. **STP Pharma Sciences**, v. 11, n. 3, p. 229-233, 2001.

HACKAM, D.G. *et al.* The 2010 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: Part 2 – therapy. **Canadian Journal of Cardiology**. v.26, n.5, p. 249-258, 2010.

HACKAM, D.G. *et al.* The 2013 Canadian Hypertension Education Program Recommendations for Blood Pressure Measurement, Diagnosis, Assessment of Risk, Prevention, and Treatment of Hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**. v.29, n.5, p. 528–542, 2013.

HILLAERT, S. VAN DEN BOSSCHE, W. Determination of captopril and its degradation products by capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v..21, pag. 65–73, 1999.

HILLAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: Relevance to drug delivery. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 17, p. 2873-2896, 2009.

HO, H-O, WANG, H-Y, SHEU, M-T. The evaluation of granulated excipients as matrix material for controlled delivery of captopril. **Journal of Controlled Release**, v. 49, p. 243-251, 1997.

HOFFMANN, D. *et al.* Evaluation of a urinary kidney biomarker panel in rat models of acute and subchronic nephrotoxicity. **Toxicology**, v. 277, pág.49–58, 2010.

HOM, S. *et al.* Comparative changes in the blood-brain barrier and cerebral infarction of SHR and WKY rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, pág. R1881–R1892, 2007.

ILLUM, L., *et al.* Chitosan as a Novel Nasal delivery system for peptide drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 8, 1994.

ITO, D. *et al.* Effects of exercise training on nitric oxide synthase in the kidney of spontaneously hypertensive rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 40, pág. 74–82, 2013.

JAFARINEJAD, S., *et al.* Development of chitosan-based nanoparticles for pulmonary delivery of itraconazole as dry powder formulation. **Powder Technology**, v. 222, p. 65–70, 2012

JIA, Z.; YUJUN, W.; GUANGSHEN, L. Adsorption of diuretic furosemide onto chitosan nanoparticles prepared with a water-in-oil nanoemulsion system. **Reactive & Functional Polymers**, v. 65, p. 249–257, 2005.

JIU, X. *et al.* Influence of chitosan nanoparticles as the absorption enhancers on salivianolic acid B *In vitro* and *In vivo* evaluation. **Pharmacognosy Magazine**, v.12, n.45, pág. 57-63, 2016.

JORNADA, D. S. *et al.* Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. **Soft Matter**, v.8, p. 6646-6655, 2012.

KALLINTERI, P., *et al.* Novel Functionalized Biodegradable Polymers for Nanoparticle Drug Delivery Systems. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1885-1894, 2005.

KECK, C.M.; MULLER, R.H. Size analysis of submicron particles by laser diffractometry—90% of the published measurements are false. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, p. 150–163, 2008.

KELLER, E., HOPPE-SEYLER, G., SCHOLLMEYER, P. Disposition and diuretic effect of furosemide in the nephrotic syndrome. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.32, p. 442–449, 1982.

KIM, Y.I. *et al.* The antihypertensive effect of orally administered nifedipine-loaded nanoparticles in spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, n. 120, p. 399 – 404, 1997.

KIM, D-H.; MARTIN, D.C. Sustained release of dexamethasone from hydrophilic matrices using PLGA nanoparticles for neural drug delivery. **Biomaterials**, v. 27, n.15, p. 3031–3037, 2006

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara ed. 2008/2009**, 15 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinc, oxidative stress and physical activity. **Rev. Nutr**, v. 16, n.4, pág.433-441, 2003.

KUMAR, M.N.V.R., Chitin and chitosan fibres: A review. **Bull. Mater. Sci.**, v. 22, n. 5, , p. 905-915, 1999.

LI, H. *et al.* Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v.133, n.3, p.238-244, 2009.

LI, X. *et al.* Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. **Journal of Controlled Release** v.147, pág. 304–310, 2010.

LI, Z. *et al.* Preparation and *in vitro* Release Performance of Sustained-release Captopril/Chitosan-gelatin Net-polymer Microspheres. **Journal of Ocean University of China**, v.3, n. 6, p. 249-254, 2007.

LIMA, E.Q. *et al.* Technological development of 40 mg furosemide tablets: equivalence and bioavailability study in dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n. 11, p. 462-466, 2007.

LINDENBERG, M.; KOOP, S.; DRESSMAN, J.B. Classification of orally administered drugs in World Health Organization Model List of Essential Medicines according to the Biopharmaceutics Classification System. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.58, n.2, p. 265–278, 2004.

LIU, Z. *et al.* Enhanced plasmon resonance light scattering signals of colloidal gold resulted from its interactions with organic small molecules using captopril as an example. **Analytica Chimica Acta** v.577, p. 244–249, 2006.

LBOUOUNNE, H. *et al.* Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(ϵ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. **Journal of Controlled Release**, v. 82, n. 2–3, p.319–334, 2002.

LOZANO, M.V. *et al.* Highly Efficient System To Deliver Taxanes into Tumor Cells: Docetaxel-Loaded Chitosan Oligomer Colloidal Carriers. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2186–2193, 2008.

MAYSINGER, D. *et al.* Fate of micelles and quantum dots in cells. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, p. 270–281, 2007.

MANDAL, A.S. *et al.* In vitro–in vivo correlation and bioavailability studies of captopril from novel controlled release donut shaped tablet. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 421, pág 145– 150, 2011.

MANJUNATH, K.; VENKATESWARLU, V. Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration. **Journal of Controlled Release**, v.107, n. 2, p. 215–2283, 2005.

MANKE, A.; WANG, L.; ROJANASAKUL, Y. Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. **BioMed Research International**, v. 2013, pág. 1-15, 2013.

MANMODE, A.S.; SAKARKAR, D.M.; MAHAJAN, N.M., Nanoparticles-tremendous Therapeutic Potential: a Review. **International Journal of Pharm Tech Research**, v. 1, n.4, p. 1020-1027, 2009

MARTINDALE: The complete drug reference, 32 ed. London: Pharmaceutical Press, 1999. XII, 2315 páginas.

MATHEW, M. J. *et al.* Folate conjugated carboxymethyl chitosan–manganese doped zinc sulphide nanoparticles for targeted drug delivery and imaging of cancer cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 442–448, 2010.

McCRINDLE, J.L. *et al.* Effect of food in the absorption of frusemide and bumetanide in man. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.42, n.6, 2003.

MENGUAL, O. *et al.* TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. **Talanta**, v. 50, p. 445–456, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Hipertensão arterial e Diabetes *mellitus*, Plano de reorganização da atenção à hipertensão arterial e ao diabetes *mellitus*, v. 59, 102 páginas, 2002.

MION, Jr D., D.M.; PIERIN, G.; GUIMARÃES, A. Tratamento da hipertensão arterial – respostas de médicos brasileiros a um inquérito. **Rev Ass Med Brasil**, v. 47, n. 3, p. 249-54, 2001.

MOHANRAJ, V.J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n.1, p. 561-573, 2006.

MOTWANI, J.G. *et al.*; Furosemide-induced natriuresis is augmented by ultra-low-dose captopril but not by standard doses of captopril in chronic heart failure. **Circulation**. v.86, pág. 439-445, 1992.

MULLER, C.R. *et al.* Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. **Química Nova**, v. 27, n. 4, pág 555-560, 2004.

MUSUMECI, T. *et al.* PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, n. 1–2, p. 172–179, 2006.

NAKADA, Y. *et al.* Pharmacokinetics and Biodistribution of Oligonucleotide Adsorbed onto Poly(isobutylcyanoacrylate) Nanoparticles After Intravenous Administration in Mice. **Pharmaceutical Research**, v. 113, n.1, 1996.

NUR, A. O.; ZHANG, J.S. Recent progress in sustained controlled oral delivery of captopril: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 194, p. 139-146, 2000.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese Circulation Journal**, v. 27, pág 282-293, 1963.

OPPENHEIM, R.C. Solid Colloidal Drug Delivery Systems: Nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.8, p. 217-234, 1981.

OURIQUE, A.F., *et al.* Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v.352, p. 1-4, 2008.

OZER, J. *et al.* The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v.245, pág. 194–205, 2008.

PAN, Y. *et al.* Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, n. 1–2, p.139–147, 2002.

POHLMANN, A. R. ;GUTERRES S.S.; BENDER, E. A. ; CAVALCANTE, M. F. ; ABDALLA D.S.P. . Processo sintético para a produção e uso de nanocápsulas multiparedes complexadas com íons metálicos. 2011. Depósito de patente - Instituto Nacional da Propriedade Intelectual - INPI nº 016110005557

POHLMANN, A.R. *et al.* Determining the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-loaded polymeric nanocapsule aqueous suspensions: A relation between light scattering and drug content. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 359, p. 288–293, 2008.

PONTO, L.L.B.; SCHOENVALD, R.B. Furosemide – A Pharmacokinetic/ Pharmacodynamic Review – Part I. *Clin. Pharmacokinetics*, v. 18, n.5, p. 381-408,1990.

QI, L. *et al.* Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Research**, v.339, n. 16,, p. 2693–2700, 2004.

QUINTANAR-GUERRERO, D., *et al.* Preparation and Characterization of Nanocapsules from Preformed Polymers by a New Process Based on Emulsification-Diffusion Technique. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n.7 p. 1056–1062, 1997.

RABI, D.M. *et al.* The 2011 Canadian Hypertension Education Program Recommendations for the Management of Hypertension: Blood Pressure Measurement, Diagnosis, Assessment of Risk, and Therapy. **Canadian Journal of Cardiology**, v.27,n.4, p.415–433, 2011.

REMKO, M. Acidity, Lipophilicity, Solubility, Absorption, and Polar SurfaceArea of Some ACE Inhibitors. **Chem. Pap.**,v.61, n.2, p. 133—141, 2007.

ROWE, R.C., SHESKEY, P.J., OWEN, S.C. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 5th ed. Pharmaceutical Press., 2006.

SCHAFFAZICK, S.; GUTERRES, S.S. Caracterização e Estabilidade Físico-química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados para Administração de Fármacos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p.726-737, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Diretrizes Brasileiras De Hipertensão VI. **J Bras Nefrol.** v. 32, p.S29-S43, 2010.

SAHU, B.P.; DAS, M.K. Formulation, optimization, and in vitro/in vivo evaluation of furosemide nanosuspension for enhancement of its oral bioavailability. **J Nanopart Res**, v. 16, p. 2360-2376, 2014.

SANTANDER-ORTEGA, M.J. *et al.* Novel core-shell lipid-chitosan and lipid-poloxamer nanocapsules: stability by hydration forces. **Colloid Polym Sci**, v.288, p.159 – 172, 2010.

SARAVANAKUMAR, M.; RAJA, B. Veratric acid, a phenolic acid attenuates blood pressure and oxidative stress in L-NAME induced hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v.671, n1-3, p.87-94,2011.

SATO, M. *et al.* Zn deficiency aggravates hypertension in spontaneously hypertensive rats: possible role of Cu/Zn-superoxide dismutase. **Clin Exp Hypertens**, v. 24, p.355–370, 2002.

SATO, M *et al.* Dietary Zn deficiency does not influence systemic blood pressure and vascular nitric oxide signaling in normotensive rats. **Biol Trace Elem Res** , v.91,p.157–172, 2003.

SAVEYN, H. *et al.* Accurate particle size distribution determination by nanoparticle tracking analysis based on 2-D Brownian dynamics simulation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 352, p. 593–600, 2010.

SCHAFFAZICK, S.R. *et al.* Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, n. 3, pág.562-569, 2006.

SCHUCK, P. *et al.* Drying by desorption: A tool to determine spray drying parameters. **Journal of Food Engineering**, n. 94 pág. 199–204, 2009.

SETA, Y.*et al.* Design and preparation of captopril sustained-release dosage and their biopharmaceutical properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 41, n. 3, p. 245-254, 1988.

SHARGEL, L., WU-PONG, S., YU, A.B.C. Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics. **Appleton & Lange Reviews/McGraw-Hill**, Medical Pub. Division, 2005

SINGHVI, S.M *et al.* Effect of food on the bioavailability of captopril in healthy subjects. **Journal of Clin Pharmacol**; v. 22, n. 2-3: p. 135-40. Feb-Mar 1982.

SMITH, J.; WOOD, E.; DORNISH, M.; Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 1, 2004.

SOPPIMATH, K.S. *et al.* Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1–20, 2001.

- SUMBALOVÁ, Z.; KUCHARSKÁ, J.; KRISTEK, F. Losartan improved respiratory function and coenzyme Q content in brain mitochondria of young spontaneously hypertensive rats. **Cell Mol Neurobiol**, vV. 30, pág.751–758, 2010.
- TAJIMA, A. *et al.*, Smaller Local Brain Volumes and Cerebral Atrophy in Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**v.21, n.1, 1993
- TAKEUCHI, H. *et al.* Enteral Absorption of Insulin in Rats from Mucoadhesive Chitosan-Coated Liposomes. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 6, 1996.
- TAN, Q. *et al.* Preparation and evaluation of quercetin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for topical delivery. **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 1621–1630, 2011.
- TERROSO, T. *et al.* Development of semi-solid cosmetic formulations containing coenzyme Q10-loaded nanocapsules. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 28 n.6, pág. 819-826, 2009.
- TEWA-TAGNE, P.; BRIANÇON, S.; FESSI, H. Spray-dried microparticles containing polymeric nanocapsules: Formulation aspects, liquid phase interactions and particles characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, v.325, pág.63–74, 2006.
- TIMMINS, P.; JACKSON, I.M; WANG, Y.J. Factors affecting captopril stability in aqueous solution, *International Journal of Pharmaceutics*; v.11, p.329-336, 1982.
- TOUSSAINT, C. *et al.* Interference of Different ACE-Inhibitors with the Diuretic Action of Furosemide and Hydrochlorothiazide. **Klin Wochenschr**, v. 67, p.1138-1146, 1989.
- TUBEK, S. Increased Absorption of Zinc from Alimentary Tract in Primary Arterial Hypertension. *Biological Trace Element Research*,v. 83, p.31-38, 2001.
- TUBEK, S. Urinary Zinc Excretion Is Normalized in Primary Arterial Hypertension After Perindopril Treatment. *Biological Trace Element Research*, v. 114, p.127-133, 2005.
- TSOUNAPI, P. *et al.* Fasudil improves the endothelial dysfunction in the aorta of spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 691, n 1-3, pág 182- 189, 2012.
- VAIDYA, V.S.; FERGUSON, M.A.; BONVENTRE, J.V. Biomarkers of Acute Kidney Injury. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**; v. 48, pág. 463–493 2008.
- VENTURINI, C.G., *et al.* Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects** v. 375, p. 200–208, 2011.
- VERGER, M, L-L, *et al.* Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 46, p. 137–143, 1998.

VORST, M.J.J. *et al.* Continuous intravenous furosemide in haemodynamically unstable children after cardiac surgery. *Intensive Care Med*, v. 27 p. 711-715, 2001.

YANAGISAWA, H. *et al.* Excessive zinc intake elevates systemic blood pressure levels in normotensive rats—potential role of superoxide-induced oxidative stress. *J Hypertens*, v.22, p.543–550, 2004

WIELING, J. *et al.* Rational experimental design for validation bioanalytical methods. Illustration using an assay method for total captopril in plasma. **Journal of Chromatography A**, v. 730, pág. 381-394, 1996.

WILCOX, C.S. *et al.* Na⁺, K, and BP homeostasis in man during furosemide: Effects of prazosin and captopril. **Kidney International**, v. 31, pág. 135—141, 1987.

YAN, S. *et al.* Layer-by-layer assembly of poly (L-glutamic acid)/chitosan microcapsules for high loading and sustained release of 5-fluorouracil. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 78, p. 336–345, 2011.

YENICE, I. *et al.* Hyaluronic acid coated poly-ε-caprolactone nanospheres deliver high concentrations of cyclosporine A into the cornea. **Experimental Eye Research**, v.87,n.3, p.162–167, 2008.

YIMIN, S. *et al.* Preparation and Characterization *in vitro* of Sustained-release Captopril/ Chitosan-gelatin Net-polymer Microspheres (Cap/CGNPMs) **Journal of Wuhan University of Technology**, v.3, n.21, p.35-40, 2006.

www.cfmv.gov.br/portal/_doc/guiabbbp_eutanásia_animal.pdf, acessado em: 03/04/2014 às 14:10.

[http://golik.co.il/Data/ABasicGuidtoParticleCharacterization\(2\)_1962085150.pdf](http://golik.co.il/Data/ABasicGuidtoParticleCharacterization(2)_1962085150.pdf), acessado em 13/12/2014 às 13:30.

9.1 Validação parcial

Para as análises a serem realizadas para a diálise e teor das formulações, bem como estabilidade, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência e o método de Azevedo e colaboradores, em 2008, modificado. A validação parcial, que verifica a competência analítica de um método anteriormente desenvolvido, pode ser realizada segundo a RDC nº 31 de 11 de agosto de 2010 utilizando como parâmetros a especificidade, linearidade, exatidão, precisão (repetibilidade e intermediária) e intervalo. O comprimento de detecção foi de 215 nm, vazão de 1 mL/min e uma coluna de (250 x 4,6 mm, 5,0 µm) (Phenomenex ®). A fase móvel (FM), constituiu-se de uma mistura de ácido fosfórico 0,11% (v/v), metanol e acetonitrila (50:25:25) que foi filtrada através de membrana de celulose regenerada, com porosidade de 0,45 µm, sob vácuo e após sonicada.

As curvas de captopril e furosemida foram realizadas nas seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 µg/mL e se mostraram lineares neste intervalo (Figura 43 e 44).

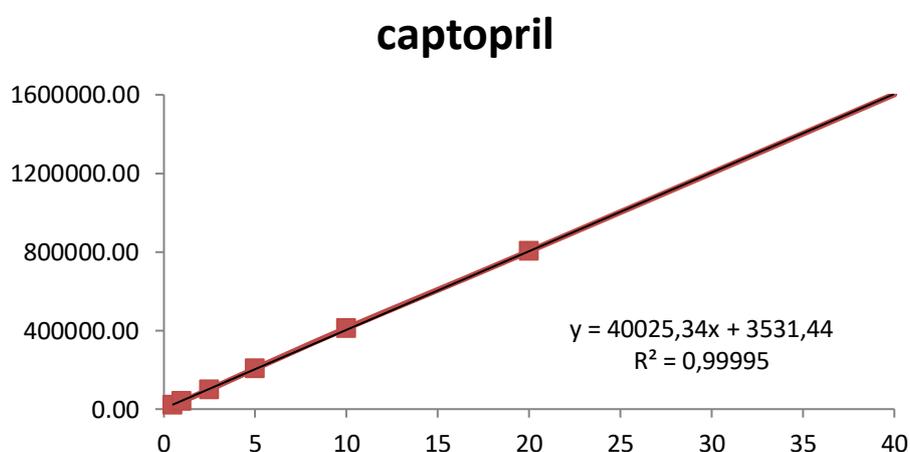


Figura 43. Curva de 0,5 a 40,0 µg/mL de captopril, equação da reta e R-quadrado.

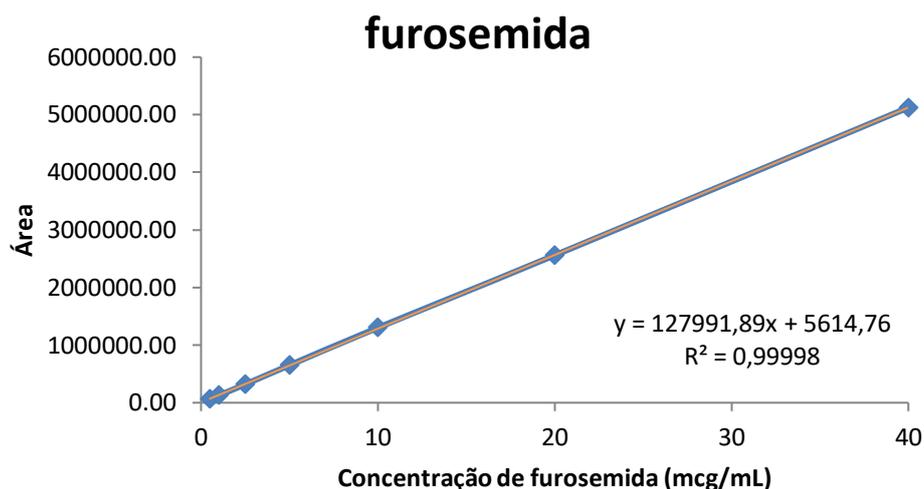


Figura 44. Curva de 0,5 a 40,0 $\mu\text{g/mL}$ de furosemida, equação da reta e R-quadrado.

Baseado na Figura 46 referente à extração da formulação não contendo fármaco e na Figura 45 que apresenta a extração dos fármacos, pode-se concluir que o método é específico, pois não há interferência dos componentes da formulação e nem dos produtos de degradação nos tempos de retenção dos fármacos a serem analisados (captopril e furosemida).

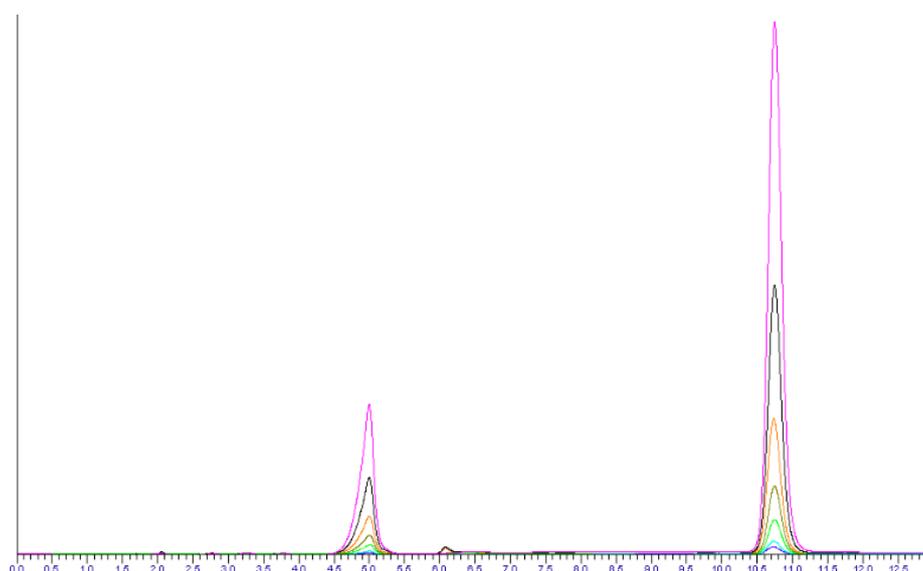


Figura 45. Sobreposição das concentrações da curva, tempo de retenção de captopril aos 5,0 minutos e furosemida em torno de 11,0 minutos.

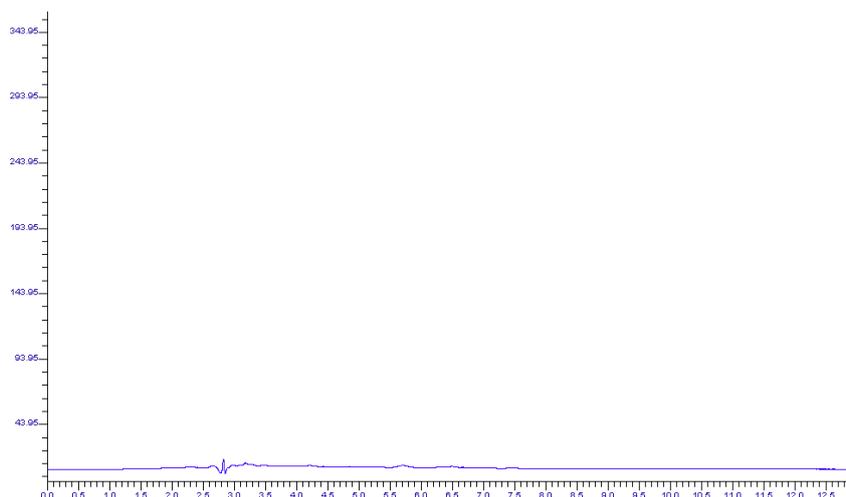


Figura 46. Extração da formulação em branco e verificação da especificidade da formulação.

Quanto à extração, verificou-se uma repetibilidade de 2,24% e uma precisão intermediária de 2,22% para a furosemida e, para o captopril, 1,33% de repetibilidade e 1,37% de precisão intermediária.