

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO COMPARATIVO DA DIFUSÃO DO ÉSTER ETÍLICO DE
INDOMETACINA ASSOCIADO A NANOCÁPSULAS, NANOESFERAS OU
NANOEMULSÃO ATRAVÉS DE SUA HIDRÓLISE ALCALINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LEONARDO UHLMANN SOARES

PORTO ALEGRE, 2003.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO COMPARATIVO DA DIFUSÃO DO ÉSTER ETÍLICO DE
INDOMETACINA ASSOCIADO A NANOCÁPSULAS, NANOESFERAS OU
NANOEMULSÃO ATRAVÉS DE SUA HIDRÓLISE ALCALINA**

LEONARDO UHLMANN SOARES

T.
547.07
S676e

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Mestre em Química.

PORTO ALEGRE, 2003.

O trabalho descrito na presente dissertação foi realizado inteiramente pelo autor entre maio/2001 e maio/2003, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Laboratório K-202 e Laboratório de Instrumentação e Dinâmica Molecular (LINDIM) do Instituto de Química, e Laboratório 405 e Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, com a orientação da Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann e co-orientação da Profa. Dra. Nádyá Pesce da Silveira e colaboração da Profa. Dra. Sílvia Stanisquaski Guterres e Profa. Dra. Teresa Dalla Costa.

“Aos amores da minha vida:
Lucia, Gisele e Geovana.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Adriana Pohlmann pela orientação intensamente dedicada durante toda a realização deste trabalho, além da atenção e dos ensinamentos transmitidos sobre ciência.

à Profa. Dra. Sílvia Guterres, pertencente à Faculdade de Farmácia, pela colaboração muito importante durante todo o trabalho, além das relevantes discussões dos resultados.

À Profa. Nádyá Pesce da Silveira pela co-orientação e auxílio importante nos experimentos de espalhamento de luz e na discussão dos resultados de cinética de reação.

À Profa. Amélia T. Henriques (FF-UFRGS) pelo empréstimo do equipamento de cromatografia líquida no início dos experimentos.

Aos meus pais, Irene e Waldiomar pelo amor, carinho, compreensão e doação. Este trabalho é um presente de agradecimento.

Aos colegas farmacêuticos do laboratório 405 pelo auxílio, discussões e noites de experimento.

Aos colegas químicos do laboratório K202 pela convivência e aprendizado.

Aos grandes amigos Thunder, Maurício, Mauro e Mário, pelas alegrias e angustias compartilhadas. "*Sit vis nobiscum*"

Agradeço ao apoio financeiro da FAPERGS e do CNPq, assim como da REDE DE NANOBIOTECNOLOGIA – CNPq/MCT.

Agradeço à bolsa concedida pela CAPES.

“O cientista não estuda a natureza porque ela é útil; estuda-a porque se delicia com ela, e se delicia com ela porque ela é bela. Se a natureza não fosse bela, não valeria a pena conhecê-la e, se não valesse a pena conhecer a natureza, não valeria a pena viver.”

H.Poincaré.

RESUMO

Para este estudo, o éster etílico de indometacina foi preparado através de condições clássicas de esterificação e associado às suspensões coloidais de nanocápsulas (NC), nanoesferas (NS) e nanoemulsão (NE) preparadas pelo método da nanoprecipitação (NC e NS) ou pelo método da emulsificação espontânea (NE), objetivando associar um derivado lipofílico de um fármaco modelo a estas nanopartículas e utilizar sua reação de hidrólise alcalina como sonda para o estudo das supraestruturas destes sistemas. A caracterização físico-química dos sistemas após preparação, foi realizada através da determinação de pH, do diâmetro de partícula e da taxa de associação. Um método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido e validado para as determinações quantitativas do éster etílico de indometacina.

Comprovou-se a estabilidade química do éster etílico de indometacina frente a hidrólise enzimática em plasma e em meios gástrico e intestinal simulados. Por outro lado, a reação de hidrólise alcalina desta substância ocorreu de maneira apreciável, mostrando um consumo total do substrato em menos de 10 minutos, quando a reação foi realizada em solução de acetonitrila. Para as reações do éster de indometacina associado aos colóides o consumo total de substrato ocorreu entre 8 horas (nanoesferas) e 24 horas (nanocápsulas). O consumo de éster de indometacina quando associado aos colóides é dependente de um processo difusivo, uma vez que os dados experimentais se correlacionam com os modelos de Higuchi e Korsmeyer-Peppas. Com esta modelagem clássica pode-se constatar que os fenômenos estudados são dependentes de uma difusão Fickiana. A modelagem matemática dos perfis de consumo do éster de indometacina permitiu descrever os processos através de uma equação monoexponencial para a reação do éster associado a nanoesferas e através de uma equação biexponencial para o consumo do éster associado a nanocápsulas e a nanoemulsão. A velocidade de consumo de éster de indometacina é determinada pela difusão do éster da partícula para a interface partícula-água.

Pela medida do diâmetro efetivo das nanopartículas contendo éster de indometacina em meio alcalino foi observada a manutenção do diâmetro inicial dos colóides, evidenciando que uma possível erosão do polímero das estruturas de nanocápsulas e nanoesferas não ocorre, e desta forma o revestimento destas estruturas pode ser considerado muito poroso, permitindo os processos difusivos observados.

ABSTRACT

For this study, the indomethacin ethyl ester was prepared through classical conditions of esterification and was associated to colloidal suspensions of nanocapsules (NC), nanospheres (NS) and nanoemulsion (NE), which are prepared by nanoprecipitation method (NC and NS) or by spontaneous emulsification (NE), with the aim of associating a lipophilic derivative of a model drug to these nanoparticles and to use its alkaline hydrolysis reaction as probe for the study of their suprastructures. The physicochemical characterization of the systems, after preparation, was obtained through pH determination, particle sizes and the encapsulation rate. An analytical method of high performance liquid chromatography was developed and validated to quantify the indomethacin ethyl ester.

The chemical stability of indomethacin ethyl ester was determined face to enzymatic hydrolysis in simulated gastric and intestinal media. On the other hand, the total alkaline hydrolysis of this substance in acetonitrile solution was observed after 10 minutes. For the reactions of indomethacin ethyl ester associated with colloids the total disappearance of the substrate was observed after 8 hours (nanospheres), 12 hours (nanoemulsion), and 24 hours (nanocapsules). The disappearance of indomethacin ethyl ester associated with colloids is dependent on a process diffusive, once the experimental data were correlated with the Higuchi and Korsmeyer-Peppas models. Applying these classical models, it was possible to verify that the studied phenomena are dependent on a Fickian diffusion. The mathematical modeling of the profiles of the indomethacin ethyl ester disappearance has allowed describing the process as a monoexponential equation for the reaction carried out with the ester associated with nanospheres and as a biexponential equation when the ester was associated with nanocapsules or nanoemulsion. The indomethacin ester disappearance rate is determined by the diffusion of the ester from the particle to the particle-water interface.

The maintenance of the initial diameters of the colloids was observed by the effective diameter measurements of each suspension added into the alkaline medium. In this way, a possible erosion of the particle structure was refuted, so the polymeric wall in the nanocapsules is a barrier but porous allowing the diffusion of the ester.

ÍNDICE GERAL

1. Introdução	1
1.1. Apresentação.....	1
1.2. Objetivos.....	3
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1. Preparação e caracterização de nanopartículas.....	4
2.1.1. Obtenção de nanopartículas a partir de polímeros pré-formados.....	5
2.1.2. Obtenção de nanopartículas através da polimerização <i>in situ</i>	6
2.1.3. Caracterização físico-química de nanopartículas.....	7
2.2. Cinética e dinâmica das reações químicas interfaciais.....	9
2.3. Liberação controlada de fármacos por difusão.....	11
2.3.1. A primeira lei de Fick.....	11
2.3.2. A equação de Noyes-Whitney.....	14
2.3.3. A difusão passiva.....	14
2.3.4. A Segunda lei de Fick.....	15
2.3.5. O modelo de Higuchi.....	15
2.3.6. A Lei da Potência.....	17
2.4. Estudos comparativos de nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão.....	19
3. Parte Experimental	26
3.1. Síntese do éster etílico de indometacina.....	26
3.2. Procedimento analítico.....	27
3.3. Coeficientes de Partição.....	27
3.4. Preparação dos colóides.....	28
3.5. Caracterização físico-química dos sistemas coloidais.....	28
3.5.1. Medidas de pH.....	28
3.5.2. Determinação do teor total e do teor associado.....	28
3.5.3. Determinação do raio hidrodinâmico.....	29
3.5.4. Medidas de densidade.....	29
3.6. Reações de hidrólise.....	29
3.6.1. Hidrólise do éster etílico de indometacina em meios gástrico e intestinal artificiais.....	29
3.6.2. Hidrólise do éster etílico de indometacina em plasma.....	30

3.6.3. Hidrólise do éster etílico de indometacina em meio alcalino.....	30
3.7. Medidas de diâmetro de partícula durante reação de hidrólise alcalina.....	31
3.8. Análise dos dados.....	32
3.8.1. Validação Analítica.....	32
3.8.2. Modelagem matemática.....	32
4. Resultados.....	34
4.1. Síntese do éster etílico de indometacina.....	34
4.2. Procedimento analítico.....	34
4.3. Coeficientes de Partição.....	37
4.4. Suspensões coloidais.....	39
4.4.1. Sistemas coloidais contendo indometacina.....	39
4.4.2. Sistemas coloidais contendo éster etílico de indometacina.....	39
4.5. Reações de Hidrólise.....	41
4.5.1. Hidrólise do éster etílico de indometacina em meios gástrico e intestinal artificiais.....	42
4.5.2. Hidrólise do éster etílico de indometacina em plasma.....	43
4.5.3. Hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina.....	45
4.5.4. Hidrólise alcalina da indometacina associada aos sistemas coloidais.....	51
4.5.5. Análise dos resultados cinéticos.....	53
4.5.6. Diâmetro de nanopartículas durante reação de hidrólise alcalina.....	57
4.5.7. Modelagem matemática dos perfis de hidrólise alcalina.....	60
5. Conclusões.....	70
6. Anexos.....	72
7. Bibliografia.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Estruturas químicas do diclofenaco e da indometacina.....	1
2. Modelos das formas de associação de fármacos às nanopartículas poliméricas.....	4
3. Método de deposição interfacial do polímero pré-formado ou nanoprecipitação.....	5
4. Estruturas dos polímeros acrílicos.....	6
5. Modelo de troca iônica de pseudo-fase.....	10
6. Modelos de sistemas nanoparticulados sugeridos para estudos comparativos.....	24
7. Estrutura química do éster etílico de indometacina.....	26
8. Mecanismo clássico de hidrólise de éster, ilustrado para o éster etílico de indometacina.....	42
9... Concentração de éster etílico de indometacina associado a NC, NS e NE nos meios enzimáticos.....	43
10. Hidrólise do éster etílico de indometacina associado a NC, NS ou NE frente a plasma humano.....	44
11. Representação esquemática dos colóidescontendo éster etílico de indometacina adicionado aos meios enzimáticos.....	45
12. Cromatograma de hidrólise de éster etílico de indometacina associado a nanocápsulas.....	46
13. Espectro de RMN de ^1H do produto 1 obtido na hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina	47
14. Espectro de RMN de ^1H do produto 2 obtido na hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina	48
15. Espectro de RMN de ^1H do produto 3 obtido na hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina.....	48
16. Estruturas das substâncias envolvidas na hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina	50
17. Perfil cinético da hidrólise do éster etílico de indometacina associado a nanopartículas.....	51
18. Representação esquemática do equilíbrio ácido-base da indometacina na interface partícula (gotícula)/água.....	53
19. Tratamento de Higuchi para a hidrólise do éster etílico de indometacina (NC).....	54
20. Ajuste dos dados experimentais da hidrólise de IndOEt para NS ao modelo da Lei da Potência.....	56

21. Ajuste dos dados experimentais da hidrólise de IndOEt para NE ao modelo da Lei da Potência.....	56
22. Ajuste dos dados experimentais da hidrólise de IndOEt para NC ao modelo da Lei da Potência.....	57
23. Diâmetro efetivo (nm) e polidispersão das partículas para NC durante 24 horas da hidrólise alcalina.....	58
24. Diâmetro efetivo (nm) e polidispersão das partículas para NE durante 12 horas da hidrólise alcalina.....	58
25. Diâmetro efetivo (nm) e polidispersão das partículas para NS durante 8 horas da hidrólise alcalina.....	59
26. Diâmetro efetivo (nm) e polidispersão para NE de indometacina por 30 minutos em meio alcalino.....	59
27. Diâmetro efetivo (nm) e polidispersão para NS de indometacina por 30 minutos em meio alcalino.....	60
28. Diâmetro efetivo (nm) e polidispersão para NC de indometacina por 30 minutos em meio alcalino.....	60
29. Modelagem de equações mono e biexponencial para éster etílico de indometacina associado a nanoesferas (ordenadas em mg/mL de IndOEt e respectivos log conc.).....	62
30. Modelagem de equações mono e biexponencial para nanoemulsão.....	65
31. Modelagem de equações mono e biexponencial para nanocápsulas.....	66
32. Representação esquemática dos processos difusivos envolvidos na hidrólise do éster de indometacina associado a nanocápsulas (NC), nanoesferas (NS) e nanoemulsão (NE)...	67
33. Modelo de nanoesfera preparada com PCL e monoestearato de sorbitano.....	68

ÍNDICE DE TABELAS

1. Mecanismos de liberação de substâncias por difusão a partir de sistemas micrométricos.....	18
2. Coeficientes de correlação (r) para curvas de calibração de indometacina.....	35
3. Coeficientes de correlação (r) para curvas de calibração do éster etílico de indometacina....	35
4. Exatidão do método analítico de CLAE para a indometacina frente as amostras controle....	35
5. Exatidão do método analítico de CLAE para o éster etílico de indometacina frente as amostras controle.....	36
6. Variações intra-dia e inter-dia para curvas de calibração da indometacina.....	36
7. Variações intra-dia e inter-dia para curvas de calibração do éster etílico de indometacina.....	37
8. Coeficientes de Partição da indometacina e de seu éster etílico.....	38
9. Parâmetros físico-químicos dos sistemas coloidais contendo indometacina logo após Preparação.....	39
10. Parâmetros físico-químicos dos sistemas coloidais contendo éster etílico de indometacina.	40
11. Comparação dos deslocamentos químicos (δ / ppm) das substâncias envolvidas na hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina.....	50
12. Parâmetros da modelagem matemática utilizando a Lei da Potência para a hidrólise alcalina em nanoesferas.....	55
13. Parâmetros da modelagem matemática utilizando a Lei da Potência para a hidrólise alcalina em nanoemulsão.....	55
14. Parâmetros da modelagem matemática utilizando a Lei da Potência para a hidrólise alcalina em nanocápsula.....	56
15. Parâmetros a e b , constantes cinéticas k_1 e k_2 para o estudo cinético de IndOEt associado a nanoesferas.....	61
16. Parâmetros a e b , constantes cinéticas k_1 e k_2 para o estudo cinético de IndOEt associado a nanoemulsão.....	63
17. Parâmetros a e b , constantes cinéticas k_1 e k_2 para o estudo cinético de IndOEt associado a nanocápsula.....	64

1. INTRODUÇÃO

1.1. APRESENTAÇÃO

Nanopartículas poliméricas têm recebido considerável atenção como sistemas carreadores de fármacos nas últimas duas décadas¹⁻³. Em diversos estudos, a associação de anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs), dentre eles o diclofenaco (1) e a indometacina (2) (Figura 1), a nanopartículas poliméricas foi estudada com o objetivo de diminuição da sua toxicidade gastrointestinal⁴⁻⁷. Por outro lado, modificações químicas da indometacina (2) em seus derivados éster, amida ou anidrido, foram propostos como metodologia alternativa para diminuir seus efeitos colaterais⁸⁻¹⁰. Além disso, a indometacina, ácido 1-(*p*-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metilindol-3-acético (2), também tem sido empregada como fármaco modelo em estudos de caracterização de sistemas coloidais poliméricos⁵.

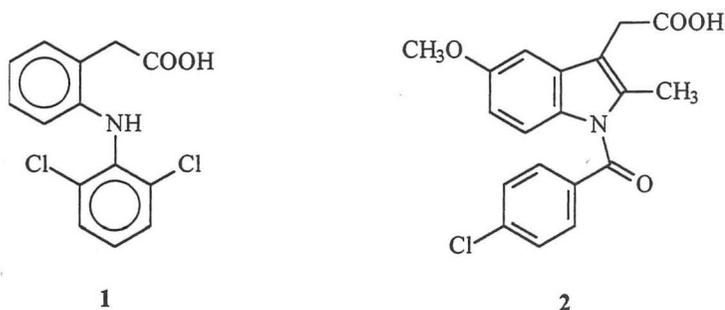


Figura 1. Estruturas químicas do diclofenaco (1) e da indometacina (2).

Dentre os vários sistemas carreadores submicrométricos, define-se três tipos que serão objeto de estudo neste trabalho: nanoemulsões (NE) que são compreendidas como emulsões submicrômicas, onde uma dispersão líquido-líquido é estabilizada por agregados de surfactantes¹¹, nanocápsulas (NC) que são propostas como vesículas nanométricas organizadas com uma fina parede polimérica que separa duas fases líquidas não miscíveis, e ainda nanoesferas (NS) que são consideradas partículas submicrômicas de polímero dispersas em uma fase líquida¹².

Os sistemas coloidais poliméricos submicrométricos podem ter tamanho entre 10 e 1000 nm² e podem ser preparados por vários métodos, incluindo a polimerização *in situ*², emulsificação-difusão¹³, nanoprecipitação e deposição interfacial de polímeros pré-formados¹⁴. As emulsões

submicrônicas, nanoemulsões, são preparadas pela emulsificação espontânea dos dois líquidos na presença de surfactantes. O mecanismo de associação do fármaco aos sistemas nanoestruturados não pode ser proposto utilizando-se um único método analítico, mas uma caracterização físico-química de cada sistema pode fornecer informações suficientes que permitam a proposição de modelos para as supraestruturas das nanopartículas, assim como para a partição do fármaco nestes sistemas^{7,15}.

Em trabalhos prévios, nosso grupo tem relatado a preparação de suspensões de NC de poliéster contendo indometacina¹⁶⁻¹⁷ ou diclofenaco⁷, usando diferentes fases oleosas (óleo mineral ou Miglyol 810[®], um triglicerídeo de cadeia média) para formação do núcleo. Em todos os casos, foram determinadas taxas de associação de 100% dessas substâncias aos colóides, mesmo quando o óleo mineral foi utilizado, no qual indometacina (2) é insolúvel. Estes AINEs também foram associados às correspondentes formulações de NS (sem fase oleosa), apresentando taxas de associação de 100% do teor total.

Tanto a indometacina (2) como o diclofenaco (1) são derivados aromáticos de ácidos carboxílicos, que podem interagir com triglicerídeos ou poliésteres por forças de van der Waals e ligações de hidrogênio. Deste modo, estes ácidos podem estar distribuídos entre o óleo (núcleo) de NC e o polímero, quando um triglicerídeo é utilizado, ou somente adsorvido ao polímero, quando nenhum óleo (NS) ou óleo mineral (NC) é empregado. Além disso, a presença de partículas de NS ou NE misturadas em formulações de NC não pode ser detectada por espectroscopia de correlação de fótons, uma vez que o diâmetro médio das partículas para estes sistemas é da mesma ordem de grandeza (100 a 300 nm). Desta maneira, o tipo e a concentração dos componentes das formulações para preparar estes sistemas foram empiricamente estabelecidos. Usando análises de potencial zeta, e comparando NC, NS e NE, alguns trabalhos descrevem comportamentos similares para formulações de NC e NE¹⁸ ou suspensões de NC e NS^{7,15}. Nestes casos, o mecanismo de associação do fármaco a qualquer destes sistemas, poderia ser similar ou os sistemas poderiam ser equivalentes.

Com o objetivo de diferenciar NC, NS e NE, neste trabalho é proposto o estudo da difusão de um composto lipofílico, não ionizável em água pura, associado a esses colóides. Para alcançar este objetivo, o éster etílico de indometacina (3) foi sintetizado e associado aos colóides e a sua reação de hidrólise é proposta como sonda para diferenciar NC, NS e NE através do estudo cinético do consumo de éster, seguido da modelagem matemática dos dados experimentais.

1.2. OBJETIVOS

O trabalho tem como principal objetivo o estudo da difusão de uma substância lipofílica associada aos colóides nanocápsulas, nanoesferas ou nanoemulsão, através da determinação do perfil cinético da hidrólise do éster etílico de indometacina (3). Trata-se, portanto, de um estudo comparativo que visa demonstrar diferenças entre os três sistemas coloidais, empregando a reação de hidrólise de ésteres, como ferramenta de estudo. Os objetivos específicos são relacionados abaixo:

→ Preparar o éster etílico de indometacina (3), a partir da indometacina (2), empregando-se condições clássicas de esterificação.

→ Validar os métodos analíticos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação de indometacina (2) e de seu éster etílico (3).

→ Determinar os coeficientes de partição da indometacina (2) e do seu éster etílico (3) em solução de Miglyol 810[®] frente a água, tampão fosfato pH 4,0 e tampão fosfato pH 7,4.

→ Preparar os sistemas coloidais, nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão, contendo indometacina (IndOH) (2) ou seu éster etílico (IndOEt) (3), através do método de nanoprecipitação de polímero pré-formado (NC e NS) ou emulsificação espontânea (NE).

→ Caracterizar os sistemas coloidais através da determinação do pH das suspensões ou emulsão, da determinação do diâmetro médio e distribuição das nanopartículas em suspensão aquosa através de espalhamento de luz dinâmico, da determinação da concentração total de indometacina (2) ou de seu éster (3) em cada formulação através de CLAE, da determinação da taxa de associação de indometacina (2) ou de seu éster (3) em cada formulação através de ultrafiltração-centrifugação e CLAE.

→ Determinar a estabilidade do IndOEt nos meios gástrico e intestinal simulados e no plasma humano.

→ Determinar e efetuar o ajuste matemático dos perfis cinéticos de hidrólise alcalina do IndOEt (3) associado aos colóides.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

Nanopartículas são sistemas coloidais poliméricos com dimensões situadas entre 10 nm e 1000 nm¹⁹, podendo ser classificadas em dois tipos principais e distintos, nanocápsulas e nanoesferas, cuja obtenção depende da composição das formulações². As nanoesferas são compreendidas como sistemas matriciais poliméricos com estrutura interna porosa, enquanto que nanocápsulas apresentam organização vesicular semelhante a lipossomas, com um núcleo líquido, mas revestido com uma camada polimérica, estabilizada por surfactantes na interface com a água^{20,21}.

No campo farmacêutico, estes sistemas podem carrear substâncias biologicamente ativas²²⁻²⁴, sendo empregados para alterar a distribuição do fármaco em áreas específicas do corpo, com a intenção de aumentar a sua ação farmacológica, diminuir os seus efeitos colaterais, ou ainda para mascarar propriedades físico-químicas do fármaco, diminuindo sua toxicidade e/ou aumentando sua biodisponibilidade oral. O comportamento *in vivo* destes colóides é profundamente dependente de suas características físico-químicas. Embora ainda pouco estudado, o estabelecimento dos mecanismos de associação de substâncias aos colóides é fundamental para compreensão do comportamento biológico desses. Desta forma, alguns mecanismos de associação de fármacos a estes sistemas têm sido propostos²⁵, como no caso de nanocápsulas, na qual a substância estaria localizada no núcleo oleoso ou adsorvida ao polímero; no caso de nanoesferas, estaria retida ou adsorvida ao polímero²⁰ (Figura 2).

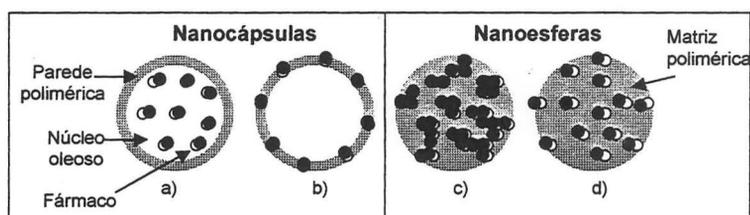


Figura 2. Modelos das formas de associação de fármacos às nanopartículas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido ao polímero das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas²⁰.

2.1.1. Obtenção de Nanopartículas a partir de Polímeros Pré-Formados

Duas técnicas principais de preparação de nanopartículas, baseadas na precipitação de polímeros pré-formados, e suas variações podem ser utilizadas na preparação destas suspensões coloidais (Figura 3). A primeira delas é o método da deposição interfacial¹⁴, onde um polímero pré-formado deposita-se em uma interface óleo-água. O procedimento consiste em preparar uma fase orgânica constituída de um óleo, surfactante lipofílico e um solvente adequado, misturando-a com uma fase aquosa contendo um surfactante hidrofílico. Após a adição da fase orgânica à fase aquosa, o polímero difunde com o solvente orgânico e é abandonado na interface óleo-água. Neste caso, obtém-se nanocápsulas onde o polímero é insolúvel em ambas as fases óleo e água.

No caso das suspensões de nanoesferas, a precipitação de polímeros pré-formados segue a mesma metodologia, descrita para nanocápsulas como deposição interfacial, omitindo-se o óleo na formulação. Tal método é chamado de nanoprecipitação.

O segundo processo, denominado método da emulsificação-difusão está fundamentado na formação de uma emulsão contendo um óleo, um polímero e um fármaco no solvente orgânico não miscível com a água, e uma solução aquosa contendo surfactantes utilizados como agentes estabilizantes. Posteriormente, o solvente orgânico é deslocado com um excesso de água e eliminado sob pressão reduzida²⁶.

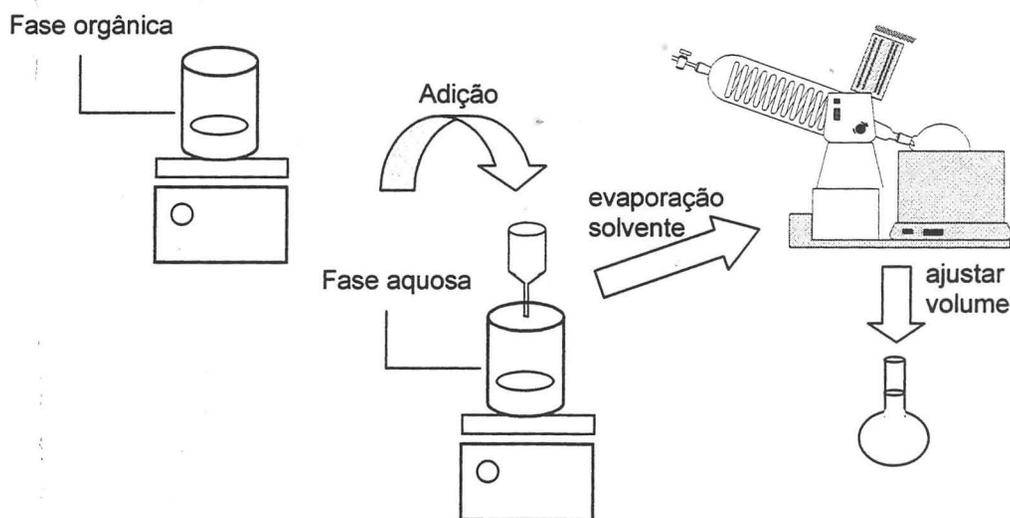


Figura 3. Método de deposição interfacial de polímero pré-formado (NC) ou nanoprecipitação (NS).

2.1.2. Obtenção de Nanopartículas através da Polimerização *In Situ*

Muitos dos métodos para preparação de nanopartículas baseados na polimerização de monômeros consistem em introduzir um monômero na fase dispersada de uma emulsão, ou numa microemulsão inversa, ou ainda, dissolvê-lo em um não-solvente do polímero². A reação de polimerização nestes sistemas ocorre em duas etapas: uma etapa de nucleação e outra etapa de crescimento. Em um trabalho pioneiro, Kreuter e Speiser²⁷ desenvolveram nanopartículas de polímero acrílico, preparadas por dispersão e polimerização do metacrilato de metila (4). O monômero é dissolvido em um meio aquoso e, então, polimerizado. Este método foi proposto por permitir o uso de grandes quantidades de solvente orgânico e surfactantes aniônicos. No entanto, foram sistemas indesejáveis na utilização como carreadores de fármacos, devido à baixa biodegradabilidade do polímero.

Para contornar este problema, Crouveur e colaboradores²⁸ desenvolveram nanoesferas de poli(cianoacrilatos de alquila) (5), polímeros que sofrem bioerosão. A mais significativa vantagem dos cianoacrilatos de alquila (5) sobre os outros derivados acrílicos, anteriormente utilizados, é a etapa de polimerização, uma vez que em contraste com outros derivados acrílicos, que necessitam quantidade considerável de energia para o início da polimerização, o que pode afetar a estabilidade da substância ativa associada, cianoacrilatos de alquila (5) podem ser facilmente polimerizados sem esta contribuição.

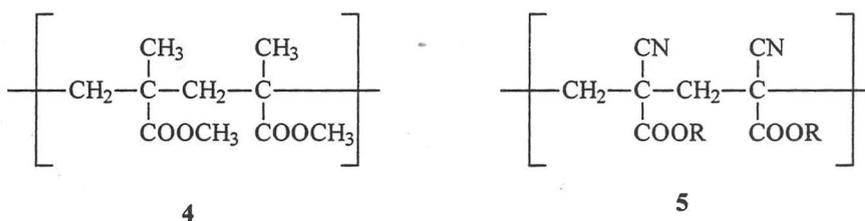


Figura 4. Estrutura dos polímeros acrílicos (4,5).

2.1.3. Caracterização Físico-Química de Nanopartículas

A determinação de parâmetros físico-químicos das suspensões de nanopartículas é de fundamental importância para a proposição dos modelos das supraestruturas de nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões. Tal caracterização é realizada, em geral, através de estudos de microscopia eletrônica, medidas do tamanho e da distribuição de partículas, teor de fármaco associado e determinação de potencial zeta¹⁹, sendo efetuados para cada sistema, ou ainda em estudos comparativos destes sistemas^{15,18}.

Neste sentido, o método mais simples para a análise morfológica e determinação de tamanho de micropartículas (maiores que 10 μm) é a observação através de microscopia óptica²⁰. Entretanto, a observação direta de partículas submicrométricas em microscópio óptico é impossível, e por isso são empregados métodos de microscopia eletrônica, tais como a microscopia eletrônica de varredura, utilizada como instrumento para descrever a topografia da superfície de micropartículas²⁹, podendo ser também avaliados tamanho da partícula, morfologia, e porosidade, e ainda a microscopia eletrônica de transmissão, extensivamente utilizada na determinação da morfologia de nanopartículas e também espessura da parede polimérica em nanocápsulas³⁰.

A distribuição do tamanho de partículas é uma das características físico-químicas mais importantes na descrição de suspensões coloidais³¹, e para esta determinação é muito útil e empregada a técnica da espectroscopia de correlação de fótons (PCS). Esta técnica, também denominada de espalhamento de luz dinâmico, fornece o coeficiente de difusão das partículas nas suspensões coloidais, e seu emprego dominante nesta área é na determinação do tamanho e distribuição de partículas submicrométricas.

As medidas de PCS estão intimamente relacionadas com o movimento browniano sendo que influências induzidas por surfactantes adsorvidos e camadas de hidratação podem afetar medidas de tamanhos fornecidas por outros métodos³². Além disso, comparações de raios de partículas obtidos por PCS (raio hidrodinâmico) com aqueles obtidos utilizando microscopia eletrônica (raio *hard core*) podem fornecer informações úteis relacionadas à hidrofobicidade de nanopartículas, adsorção de surfactantes e interações com o solvente³³.

Outra avaliação físico-química de grande relevância no estudo de nanopartículas é a medida referente ao potencial zeta, sendo que nanopartículas usualmente conduzem a um potencial eletrostático em suas superfícies, provenientes da dissociação de grupos funcionais do polímero

ou da adsorção preferencial de espécies iônicas presentes e/ou adicionadas (KCl) no meio dispersante. A caracterização do potencial superficial de nanopartículas pode ser efetuada por titulação³⁴ ou por medidas do potencial zeta através de técnicas de eletroforese capilar^{35,36}.

A determinação do teor de fármaco, contido em nanopartículas, é dificultada pela necessidade de separação da fração livre de substância daquela parcela incorporada e a técnica de separação amplamente empregada é a ultrafiltração-centrifugação³⁷. O teor total de fármaco é medido após a dissolução de todos os componentes das suspensões coloidais através do uso de um solvente apropriado³⁸. Alguns autores consideram o teor associado como sendo igual ao teor total, o que pode gerar algumas imprecisões, quando o fármaco não está totalmente associado³⁹ e, por isso, o mais coerente é calcular o teor de substância associada através da diferença entre o teor total (experimental) e o teor livre verificado no ultrafiltrado⁴⁰.

Uma caracterização da cinética de liberação do fármaco associado a nanopartículas constitui em etapa importante na caracterização completa dos sistemas nanoestruturados, uma vez que diferentes comportamentos cinéticos de liberação são esperados para um fármaco dissolvido no núcleo oleoso de uma nanocápsula ou simplesmente disperso ou adsorvido na matriz polimérica de uma nanopartícula. Duas técnicas são disponíveis para a elucidação do perfil de liberação de fármacos *in vitro*: a técnica de difusão e diálise e a técnica de ultrafiltração-centrifugação. Na primeira, um certo volume da suspensão coloidal, contendo o fármaco, é disposto em um recipiente de diálise, hermeticamente vedado e mergulhado em uma solução adequada. O sistema é mantido à temperatura de 37 °C com contínua agitação da solução. Em seguida, amostras são retiradas em compartimentos receptores em intervalos de tempo pré-determinados e o conteúdo de fármaco destas amostras é avaliado através de métodos analíticos adequados⁴¹. Na segunda técnica é empregado um tubo de centrifuga separado de um tubo interno por uma membrana de ultrafiltração, a qual permite a separação de nanopartículas de um volume da dispersão aquosa após centrifugação⁴².

Excetuando-se as reações ácido-base de fármacos ionizáveis em meio aquoso, que são dependentes da diluição empregada durante os estudos de liberação, não há relatos na literatura sobre estudos cinéticos de reações químicas de substratos associadas a nanopartículas poliméricas ou a nanoemulsões, cujos equilíbrios possam estar quase totalmente deslocados para a formação dos produtos. Estes estudos são relevantes, uma vez que a cinética destas reações seria profundamente influenciada pela localização do fármaco na nanoestrutura, bem como pela

natureza das suas interações com as nanopartículas. Neste sentido, poderiam ser observados comportamentos distintos para a reação de uma substância molecular adsorvida à matriz polimérica de uma nanopartícula e para a reação dessa substância dissolvida no núcleo oleoso de uma nanocápsula ou de uma nanoemulsão.

2.2. CINÉTICA E DINÂMICA DE REAÇÕES QUÍMICAS INTERFACIAIS

A melhor aproximação para o estudo cinético de uma reação química de substâncias associadas a nanopartículas reside nas reações denominadas interfaciais, onde a velocidade de uma reação específica, que ocorre em uma interface, pode ser diferente da velocidade da mesma reação quando esta ocorre em solução⁴³.

Reações bimoleculares nas quais um dos reagentes está localizado em uma interface, enquanto o outro reagente está molecularmente disperso na fase homogênea podem ocorrer por dois caminhos principais: um envolve a interação direta do reagente no meio homogêneo em uma reação localizada preferencialmente na interface, e o outro ocorre através de uma adsorção inicial do reagente homogêneo seguida de uma difusão superficial para que ocorra a reação⁴⁴. Porém, a completa compreensão dos mecanismos físico-químicos de reações que ocorrem em interfaces é um problema de difícil resolução, tanto que a comparação entre reações interfaciais com reações homogêneas levanta aspectos contraditórios na literatura⁴⁴, onde algumas reações interfaciais são relatadas como mais rápidas que as reações homogêneas, enquanto que, para outros sistemas, o contrário parece ser verdadeiro.

Neste sentido alguns pesquisadores⁴⁵⁻⁴⁶ têm abordado o estudo cinético de reações de substâncias orgânicas, ocorrendo em sistemas interfaciais (microemulsões), e para reações bimoleculares entre um substrato orgânico e um íon univalente de carga oposta àquela da interface. O modelo da troca-iônica de pseudo-fase (TIPF) tem sido aplicado a micelas iônicas aquosas⁴⁷ e microemulsões⁴⁸. Tal abordagem teórica foi originalmente desenvolvida para o tratamento de perfis cinéticos para a concentração do surfactante⁴⁷ e, portanto, ignora detalhes da estrutura micelar. Considerando a micela como uma fase homogênea, permite o tratamento da distribuição de espécies em termos da partição do substrato orgânico e da espécie iônica neste suposto sistema homogêneo.

O tratamento teórico dos dados cinéticos, por este modelo, considera a microemulsão como um sistema de pseudo-fases⁴⁸, sendo estas: a fase oleosa, a fase aquosa e a interface (Figura 5).

As micelas atuam como uma fase separada, e a superfície comporta-se como uma resina trocadora de íons onde a distribuição das espécies iônicas é descrita por uma constante de troca iônica. Desta maneira, as seguintes aproximações são necessárias: a) os surfactantes estão localizados preferencialmente na interface, b) a reação pode ocorrer em qualquer uma das três pseudofases, sendo a contribuição relativa de cada fase governada pela distribuição dos reagentes e c) esta última aproximação reconhece a impossibilidade do substrato orgânico, hidrofóbico, estar presente na fase aquosa, e da espécie iônica estar presente na fase oleosa, assumindo que a reação apenas ocorre na interface.

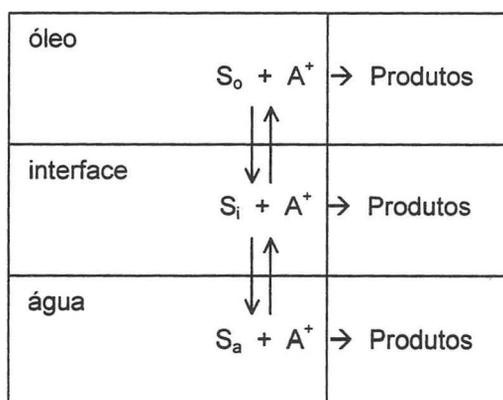
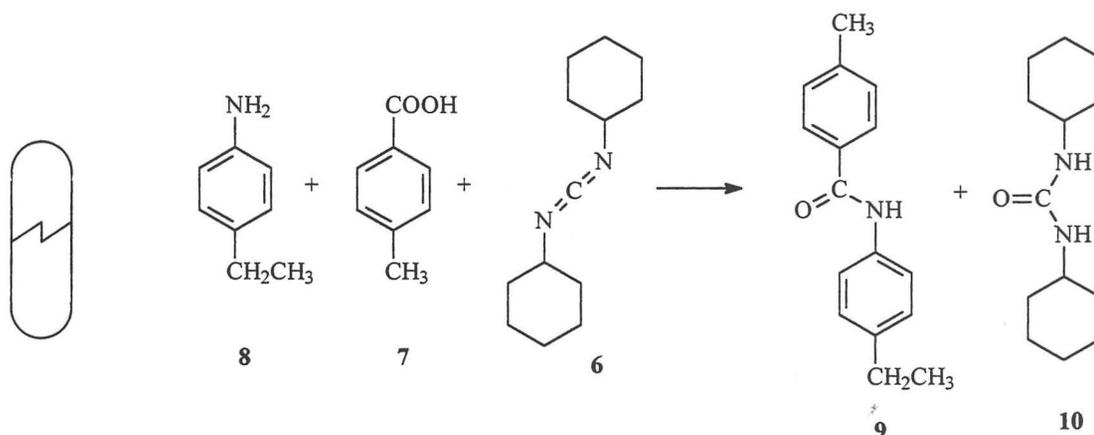


Figura 5. Modelo da troca iônica de pseudo-fase (S_o = substrato presente na fase oleosa; A^+ = espécie reagente iônica; S_i = substrato presente na interface; S_a = substrato presente na água).

Chen e colaboradores⁴⁹, em trabalho recente, estudaram reações químicas de substratos associados a nanossistemas, evidenciando que reações químicas podem ter suas velocidades aumentadas sem a presença de um auto-catalisador, obtendo assim um novo método de controle da reatividade química. O grupo de Chen realizou a reação na presença de nanocápsulas diméricas, semelhantes a duas semi-esferas que podem ser unidas ao redor de moléculas reagentes, sequestrando-as do meio reacional. Neste estudo, as moléculas encapsuladas foram de ciclohexilcarbodiimida (DCC) (6), um dos reatantes, que em contato com moléculas de ácido 4-metilbenzóico (7) e *p*-etilnilina (8), reagem para formar uma molécula de amida (9) e uma molécula de cicloexiluréia (10) (Esquema 1). Observaram ainda que, quando as moléculas de

DCC (6) são misturadas primeiro com as nanocápsulas, a reação procede de maneira mais lenta, uma vez que a nanoencapsulação efetivamente reduz a concentração de DCC (6) na reação.



Esquema 1

2.3. LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS POR DIFUSÃO

2.3.1. A Primeira Lei de Fick

As substâncias dissolvidas difundem de uma região de alta concentração para uma região de menor concentração, sendo este um processo espontâneo acompanhado por uma diminuição na energia livre. O processo de difusão está intimamente relacionado ao movimento browniano e, de fato, pode-se considerar que as moléculas ou partículas de uma substância somente difundem devido ao movimento browniano.

A tendência de uma substância à difusão pode ser expressa através do coeficiente de difusão D (Equação 1), o qual é definido pelo tratamento clássico da primeira lei de Fick. Fick demonstrou que para a difusão ocorrendo em uma direção, o fluxo J de uma substância através do plano perpendicular à direção da difusão é diretamente proporcional à taxa com a qual a concentração muda com a distância, dc/dx , ou seja, o gradiente de concentração.

$$J = -D \left(\frac{dc}{dx} \right) \quad (\text{eq. 1})$$

O sinal negativo indica que o fluxo está na direção oposta daquela na qual a concentração aumenta. Se um sistema não está em equilíbrio ele irá mover-se em direção ao equilíbrio e o

gradiente negativo do potencial químico pode ser considerado como a força dirigente da difusão, somente quando o gradiente negativo do potencial total é a força dirigente em um campo gravitacional ou elétrico.

Considerando-se a difusão em uma célula retangular, na qual não existe convecção e o fluxo permite difusão somente na direção x (Equação 2), a força F por mol da substância é:

$$F = -\frac{d\mu}{dc} \frac{dc}{dx} = -\frac{RT}{c} \frac{dc}{dx} \quad (\text{eq. 2})$$

A equação 2, onde μ é o potencial químico da substância, é válida considerando-se a equação 3 para soluções ideais.

$$\mu = \mu_0 + RT \ln c \quad (\text{eq. 3})$$

Agora, de acordo com a hidrodinâmica, a velocidade de uma partícula em um meio contínuo é diretamente proporcional à força aplicada (Equação 4) e, por definição, o coeficiente friccional f é a força necessária para conferir à partícula velocidade unitária e N é o número de partículas.

$$\frac{F}{N} = fv \quad (\text{eq. 4})$$

Portanto, substituindo-se a equação 2 na equação 4 obtém-se a relação da velocidade v com o gradiente da concentração (Equação 5).

$$v = \frac{F}{Nf} = -\frac{RT}{Nfc} \frac{dc}{dx} \quad (\text{eq. 5})$$

A primeira lei de Fick é definida pela equação 6 e,

$$J = vc = -D \frac{dc}{dx} \quad (\text{eq. 6})$$

substituindo v pela equação 5 obtém-se a equação 7.

$$J = -\frac{RT}{Nf} \frac{dc}{dx} = -D \frac{dc}{dx} \quad (\text{eq. 7})$$

Portanto, obtém-se a equação 8, chamada relação de Einstein,

$$D = \frac{RT}{Nf} \quad (\text{eq. 8})$$

e no caso de moléculas ou partículas esféricas, a lei de Stokes define na equação 9 o coeficiente friccional f como sendo

$$f = 6\pi\eta r \quad (\text{eq. 9})$$

onde η , é a viscosidade do solvente, e r é o raio da molécula ou partícula.

Assim, o coeficiente de difusão D pode ser obtido através da substituição da equação 9 na equação 8, fornecendo a equação 10.

$$D = \frac{RT}{N6\pi\eta r} \quad (\text{eq. 10})$$

Uma vez que é mais usual relacionar tamanho em termos da massa molecular, a relação entre o coeficiente de difusão e a massa molecular de uma molécula esférica pode ser derivada da equação 10, introduzindo-se a relação da equação 11

$$\frac{M\bar{v}}{N} = \frac{4}{3}\pi r^3 \quad (\text{eq. 11})$$

onde M é a massa molar e \bar{v} , é o volume específico parcial.

É claro que se moléculas não são esféricas, alguns desvios serão observados no cálculo do coeficiente de difusão. A equação 12 fornece a importante conclusão de que o coeficiente de

difusão D , e conseqüentemente o processo difusivo, é inversamente proporcional à raiz cúbica da massa molecular da espécie difundida tendo, assim, espécies moleculares de menor massa, uma difusão mais rápida, quando comparadas com espécies de maior massa.

$$D = \frac{RT}{N6\pi\eta} \sqrt[3]{\frac{4\pi N}{3Mv}} \quad (\text{eq. 12})$$

2.3.2. A Equação de Noyes-Whitney

Ainda relacionado à Lei de Fick está o fenômeno da dissolução em função do tempo, no qual as moléculas ou íons de uma substância difundem a partir da superfície do seu sólido. Este processo gera um gradiente de concentração, no qual a concentração sobre a superfície corresponde à concentração de saturação (c_s), ou seja, a solubilidade da substância no determinado solvente. No limite externo da camada de solvatação, cuja espessura é (x), característica de cada sistema soluto-solvente, a concentração torna-se constante. A expressão que descreve a dissolução, derivada da primeira lei de Fick, é conhecida como equação de Noyes-Whitney (Equação 13) e afirma que a velocidade de difusão é proporcional à diferença entre a solubilidade da substância (c_s) e a concentração dissolvida da substância no tempo t (c).

$$\frac{dc}{dt} = v_d = -kA(c_s - c) \quad (\text{eq.13})$$

Onde v_d é a velocidade de dissolução, k é a constante intrínseca de dissolução, e A é a área de superfície do sólido.

2.3.3. A Difusão Passiva

Importante ainda é a difusão passiva, a qual descreve a passagem de moléculas através de uma membrana inerte, que não participa do processo difusivo, sendo este processo considerado espontâneo ($\Delta G < 0$). Tal processo é dirigido pelo gradiente de concentração existente na membrana, sendo que a passagem de moléculas por esta ocorre principalmente do lado de maior concentração da substância para o de menor concentração da mesma. A equação 14, derivada da

primeira lei de Fick, descreve a proporcionalidade entre este gradiente ($C_1 - C_2$) e a velocidade de difusão ($v = -dc/dt$). A igualdade é obtida levando-se em consideração o coeficiente ou constante de permeabilidade (P) a qual depende do coeficiente de difusão da substância, da espessura e da área da membrana, e da permeabilidade da membrana para essa substância em particular.

$$v = -dc/dt = P (C_1 - C_2) \quad (\text{eq. 14})$$

Modelos matemáticos para sistemas carreadores de fármacos providenciam uma base científica adequada para o estudo dos mecanismos de transporte de massa que estão relacionados com a liberação controlada do fármaco⁵⁰. Vários mecanismos podem ser levantados com o intuito de explicar tal liberação, entre os mais importantes figuram a difusão, dissolução pelo solvente, degradação/erosão da estrutura carreadora, assim como, fenômenos osmóticos, magnéticos e elétricos podem estar envolvidos.

2.3.4. A Segunda Lei de Fick

A segunda lei da difusão de Fick pode ser expressa conforme a equação 15.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D \frac{\partial c}{\partial x} \right) \quad (\text{eq. 15})$$

Esta equação 15 pode ser derivada da equação da primeira lei (Equação 6) com a introdução de um enunciado de conservação da massa.

Entretanto, não existe um modelo matemático que explique todos os processos físico-químicos que podem ocorrer. Desta maneira, em muitos casos, a literatura descreve o uso de simples modelos empíricos ou semi-empíricos os quais não são suficientes para descrever o comportamento exato destes sistemas.

2.3.5. O Modelo de Higuchi

Higuchi⁵¹ em 1961 escreveu a equação matemática mais frequentemente estudada para descrever a velocidade de liberação de substâncias a partir de um sistema matricial macroscópico. Inicialmente empregada para sistemas planares, foi depois modificada para considerar diferentes

geometrias dos sistemas matriciais, sendo aplicada até mesmo a estruturas porosas e micropartículas. A equação clássica de Higuchi (Equação 16) foi derivada da segunda lei de Fick, utilizando-se a aproximação de um pseudo-estado-estacionário.

$$\frac{M_t}{A} = \sqrt{D(2c_0 - c_s)c_s t} \quad (\text{eq. 16})$$

Onde M_t é a quantidade absoluta da substância liberada no tempo t , A é a área superficial do sistema de liberação exposta ao meio de liberação, D é o coeficiente de difusão da substância no polímero (micropartículas), c_0 é a concentração inicial da substância e c_s é a solubilidade da substância no polímero. De outra maneira, a equação 16 pode ser expressa como mostrado na equação 17.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_H \sqrt{t} \quad (\text{eq. 17})$$

Onde K_H , constante de Higuchi, é uma constante que reúne parâmetros do sistema, M_∞ é a quantidade de substância liberada em um tempo infinito, o qual deve ser igual à quantidade absoluta da substância incorporada, e t é o tempo. Um novo rearranjo pode ser feito, substituindo-se M_t/M_∞ pelo fator ft (Equação 18).

$$ft = 1 - \frac{W_t}{W_0} = K_H \sqrt{t} \quad (\text{eq. 18})$$

Onde W_t é a concentração da substância presente na matriz no tempo t e W_0 é a concentração da substância inicialmente presente na matriz. A interpretação da equação de Higuchi demonstra que a fração da substância liberada é linearmente proporcional à raiz quadrada do tempo. Para a aplicação do modelo de Higuchi alguns postulados devem ser assumidos: i) a concentração inicial da substância no sistema deve ser muito maior que sua solubilidade (aproximação do estado-estacionário). ii) a análise matemática é baseada em uma difusão uni-dimensional, iii) a

substância é considerada em estado molecularmente disperso, com partículas muito menores em diâmetro que a espessura do sistema. iv) a dissolução do polímero carreador é negligenciável, e v) a difusibilidade da substância é constante⁵¹.

As principais vantagens do modelo de Higuchi residem na simplicidade do modelo e na possibilidade de elucidação do mecanismo de liberação do fármaco, enquanto algumas desvantagens estariam relacionadas com a simultaneidade de fatores diferentes, que podem influenciar na forma de liberação das substâncias. Entretanto, pode-se afirmar que a difusão é o mecanismo dominante em sistemas que obedecem o modelo de Higuchi, e freqüentemente, a proporcionalidade entre a quantidade da substância liberada e a raiz quadrada do tempo é comumente relacionada como um indicador de liberação de substâncias controlada por difusão.

2.3.6. A Lei da Potência

Korsmeyer⁵² e colaboradores desenvolveram um modelo simples e semi-empírico, sendo juntamente com o modelo de Higuchi, um dos modelos mais utilizados para descrever a liberação de substâncias a partir de formas poliméricas. Tal modelo relaciona exponencialmente a liberação de uma substância com o tempo.

$$f_t = at^n \quad (\text{eq. 19})$$

onde a é uma constante que incorpora características estruturais e geométricas do sistema de liberação, n é o expoente de liberação, indicativo do mecanismo de liberação da substância, e a função de t é M_t / M_∞ a liberação fracional do fármaco, ou seja,

$$\frac{M_t}{M_\infty} = at^n \quad (\text{eq. 20})$$

Este modelo matemático, também conhecido como Lei da Potência, tem sido empregado com freqüência para descrever a liberação de substâncias a partir de diversos tipos de matrizes poliméricas. Peppas⁵⁰ utilizou o valor de n para caracterizar vários mecanismos de liberação, e considerou que para esta equação ser utilizada é necessário que a liberação ocorra de modo unidimensional e este modelo é utilizado para a liberação de substâncias a partir de sistemas

poliméricos microparticulados, quando o mecanismo de liberação não é bem conhecido ou quando podem estar envolvidos mais de um tipo de mecanismos de liberação (Tabela 1).

Como pode ser visto, a equação clássica de Higuchi (Equação 17) representa um caso especial da Lei da Potência, quando $n = 0,5$. Peppas e colaboradores⁵⁰ foram os primeiros a indicar o uso e as limitações deste modelo. A Lei da Potência pode ser vista como uma generalização da observação que a sobreposição de dois mecanismos aparentemente independentes de transporte de fármacos, difusão Fickiana ou transporte caso-II, descreve em muitos casos o inchamento dinâmico do polímero e a liberação do fármaco.

É evidente na Equação 20, que quando o expoente n assume o valor de 1,0, a taxa de liberação da droga é independente do tempo. Este caso corresponde a uma cinética de reação de ordem-zero. O mecanismo que gera a liberação de ordem-zero é conhecido como transporte caso-II. Neste caso, o processo de relaxação das macromoléculas do sistema de liberação na presença de água é a etapa determinante do processo.

Portanto, a Lei da Potência apresenta duas interpretações físicas distintas nos dois casos especiais de $n = 0,5$ (indicando liberação da substância controlada por difusão) e $n = 1,0$ (indicando liberação da substância controlada pelo inchamento do sistema). Valores de n entre 0,5 e 1,0 podem estar relacionados com a sobreposição de ambos fenômenos (transporte anômalo). Deve ainda ser salientado que os valores extremos para o expoente n , 0,5 e 1,0 são somente válidos para a geometria planar. Para esferas e cilindros têm sido obtidos diferentes valores⁵³, também listados na tabela 1.

Tabela 1. Mecanismos de liberação de substâncias por difusão a partir de sistema micrométricos

Expoente de liberação (n)			Mecanismo de liberação da substância
Filmes	Cilíndrico	Esférico	
0,5	0,45	0,43	Difusão Fickiana
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Transporte anômalo
1,0	0,89	0,85	Transporte caso-II

Uma forma modificada da equação 20 foi desenvolvida⁵⁴ (equação 21) para considerar o tempo de espera l no início da liberação do fármaco a partir da matriz polimérica.

$$\frac{M_{(t-l)}}{M_{\infty}} = a(t-l)^n \quad (\text{eq. 21})$$

Os sistemas coloidais nanométricos têm como característica uma grande área superficial que pode levar, em alguns casos, a uma liberação parcial abrupta. Quando existe a possibilidade de um efeito de liberação abrupta inicial b a equação 21 transforma-se na equação 22.

$$\frac{M_{(t-l)}}{M_{\infty}} = at^n + b \quad (\text{eq. 22})$$

2.4. ESTUDOS COMPARATIVOS DE NANOCÁPSULAS, NANOESFERAS E NANOEMULSÃO.

Os sistemas coloidais poliméricos, nanocápsulas e nanoesferas, por sua natureza, são complexos e sua caracterização físico-química é dificultada devido às diferenças de tamanho de ordem nanométrica entre os agregados e as espécies moleculares. Desta forma, a realização de estudos comparativos entre sistemas coloidais pode levar à proposição de modelos que descrevem cada sistema.

Um dos primeiros estudos comparativos de sistemas nanoestruturados foi realizado por Losa e colaboradores⁵⁵ onde foram preparadas nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) e poli(cianoacrilato de *iso*-butila), bem como nanoemulsão correspondente, contendo o fármaco metilpranolol, sendo utilizada a razão óleo:polímero de 1:0,250 (mL/g). Os objetivos do estudo foram determinar os parâmetros da formulação que influenciam as propriedades físicas das nanocápsulas e investigar o mecanismo de liberação do fármaco a partir destas nanocápsulas lipofílicas. Em primeiro lugar foi verificado que o tamanho das partículas de nanocápsulas depende do tipo de óleo empregado na formulação, mas não da razão óleo/água empregada, e que nanocápsulas apresentam um menor diâmetro de partícula do que nanoemulsão. Estes resultados foram interpretados como um efeito de estabilização do polímero, onde a precipitação do polímero ao redor da nanopartícula

oleosa previne sua coalescência durante o processo de evaporação do solvente, conseqüentemente diminuindo o tamanho de nanocápsulas em relação às partículas da nanoemulsão correspondente.

A influência do tipo de óleo foi explicada em termos do caráter hidrofóbico, onde o óleo mais hidrofílico é dispersado em maior extensão, e portanto, um menor tamanho de partícula foi obtido. Considerando-se semelhanças entre nanocápsulas e nanoemulsão nas medidas de potencial zeta, independente da natureza do polímero, os autores concluíram que o revestimento polimérico formado ao redor do núcleo oleoso de nanocápsulas não seria contínuo, sendo a natureza do óleo o fator mais importante na determinação do potencial zeta de nanocápsulas.

Quanto aos resultados de liberação do fármaco, o estudo indicou uma pequena, mas não significativa, contribuição do revestimento polimérico na liberação do fármaco a partir destes sistemas coloidais, quando comparados com a nanoemulsão correspondente. Para conseguir uma interpretação e um comparação mais efetiva dos perfis de liberação, os dados de liberação foram transformados de acordo com o modelo proposto por Gupta e colaboradores, que foi desenvolvido especificamente para analisar as etapas envolvidas nos processos de liberação de um sistema multiparticulado e a subsequente difusão através de uma membrana de diálise.

Quando aplicado este modelo cinético, um gráfico linear com duas inclinações são obtidos para cada perfil de liberação. Neste estudo, os perfis de liberação indicaram um período, durante a primeira hora, que foi relacionado à difusão da quantidade de fármaco não associado à nanopartícula. Foi observada também a liberação total do fármaco em tampão fosfato pH 6,0, o que evidenciou que o caráter lipofílico da substância não é a etapa limitante do processo de liberação. A interpretação das constantes cinéticas calculadas dos experimentos de liberação permitiram a distinção de dois períodos, um associado à difusão do fármaco não-encapsulado, e outro associado a liberação e difusão do fármaco encapsulado. Foi ainda conclusão desse trabalho que a solubilidade do fármaco na fase oleosa é o fator mais relevante na liberação deste a partir dos sistemas coloidais, e que mesmo a parede polimérica apresentando uma importante estabilização, essa não controla a liberação do metilpranolol do núcleo de nanocápsulas.

Outro trabalho, comparando nanocápsulas com nanoemulsão, foi realizado por Santos-Magalhães e colaboradores⁵⁶, no qual foram preparadas nanocápsulas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) e nanoemulsão contendo penicilina G, sendo estes sistemas comparados em termos de estabilidade do fármaco e perfis cinéticos de liberação *in vitro*. A razão óleo:polímero empregada foi de 1:0,500 (mL/g). A nanoemulsão, empregada para fins de comparação, foi

preparada pelo método da emulsificação espontânea, onde um fosfolípido, surfactante lipofílico, foi inicialmente dissolvido em metanol, sendo óleo de soja ou Miglyol 812[®] (triacilglicerol de cadeia média) adicionados à solução orgânica fosfolipídica e penicilina G dissolvida na mesma fase. A fase aquosa consistiu de tampão fosfato (pH 7,4) com poloxamer, surfactante hidrofílico. As suspensões de nanocápsulas foram preparadas pelo método da deposição interfacial do polímero pré-formado, sendo formadas por benzoato de benzila ou óleo de girassol. A influência do tipo de óleo na estabilidade de nanocápsulas foi analisado. Quanto à natureza do óleo foi verificado que o óleo de girassol permitiu nanocápsulas mais estáveis que aquelas com benzoato de benzila.

Ainda como resultado importante pode ser destacado que a liberação de penicilina G foi aproximadamente duas vezes mais rápida para nanocápsulas com óleo de girassol em comparação com nanoemulsão com Miglyol 812[®] no intervalo de 5 a 60 minutos. Neste intervalo a cinética foi assumida como de ordem zero, e as constantes cinéticas obtidas pelo método dos mínimos quadrados foram 0,008 min⁻¹ (nanoemulsão) e 0,017 min⁻¹ (nanocápsulas). A quantidade global do fármaco foi praticamente liberada em 120 minutos para nanoemulsão e 180 minutos para nanocápsulas. A diferença de liberação mais lenta da penicilina G, associada à nanoemulsão, quando comparada com nanocápsulas, foi atribuída à diferença da natureza da fase oleosa de nanoemulsão (Miglyol 812[®]) em relação ao óleo de girassol utilizado em nanocápsulas, assumindo-se que o processo cinético é governado pelo coeficiente de partição óleo-água, pela diferença da força-iônica e diferenças nas constantes dielétricas desses óleos.

Mosqueira e colaboradores⁵⁷ avaliaram a influência da concentração dos componentes empregados na preparação de nanocápsulas do poli(ácido láctico) pelo método da deposição interfacial do polímero pré-formado, através de medidas no tamanho de partículas, polidispersibilidades, potencial zeta e características estruturais do sistema. A razão óleo:polímero empregada foi de 1:0,240 (mL/g). Como conclusões foram levantadas que a natureza do óleo desempenha uma importante função na determinação das propriedades físico-químicas e na estabilidade dos sistemas de nanocápsulas e nanoemulsão. Sob as condições experimentais nenhuma diferença significativa foi observada nos valores de potencial zeta em função da natureza do núcleo oleoso (Miglyol 810, 812, 829, 840, óleo mineral, dodecano, oleato de etila).

Contrariamente aos resultados e interpretação de Calvo⁵⁸, Losa⁵⁵ e Santos-Magalhães⁵⁶, Mosqueira⁵⁷ e colaboradores sugeriram que o óleo deve estar alojado no interior da cápsula polimérica e não disponível na interface. Os autores⁵⁷ observaram ainda, que o parâmetro que influencia o tamanho das nanocápsulas é a velocidade de difusão da fase orgânica (cetona e óleo) na fase aquosa durante a preparação de nanocápsulas, sendo esta velocidade de difusão dependente das propriedades físicas do óleo, tais como viscosidade e tensão interfacial. Pode ser observado que a miscibilidade de um solvente orgânico ou óleo em fase aquosa diminui com o aumento de sua tensão interfacial, o que aumenta o tamanho das nanocápsulas. Outra informação obtida foi a existência de lipossomas, contaminando a suspensão de nanocápsulas, devido à utilização de fosfolípídeo como surfactante, o que foi estudado através do uso de uma sonda hidrofílica fluorescente.

Thioune⁵⁹ e colaboradores verificaram como o efeito do aumento da constante dielétrica do meio dispersante final pode alterar as propriedades de nanoesferas de poli(ftalato de hidroxipropilmetilcelulose), promovendo a precipitação do polímero na forma de agregados. As interações entre cadeias poliméricas na fase orgânica são influenciadas pela natureza do polímero e determinam o tamanho das partículas. Foi evidenciado que existe uma relação diretamente proporcional entre a concentração de polímero na fase orgânica e a quantidade de polímero precipitado na forma de agregados. Substituindo-se, ainda, uma parte do solvente orgânico (acetona) por água na fase orgânica, obteve-se uma maior proporção de água na dispersão final, e sob estas condições a constante dielétrica do meio dispersante foi diferente, o que diminuiu a precipitação de polímero na forma de agregados.

Calvo⁵⁸ e colaboradores determinaram as propriedades físico-químicas de nanocápsulas e nanoesferas de poli(ϵ -caprolactona) e de nanoemulsão contendo indometacina, com o principal objetivo de comparar o comportamento *in vivo* destes sistemas carreadores e determinar suas capacidades de aumentar a biodisponibilidade ocular da indometacina. A formulação de nanocápsulas foi preparada com 0,5 mL de Miglyol 840 e 100 mg de polímero, correspondendo a uma razão óleo:polímero de 1:0,200 (mL/g). As medidas de tamanho de partícula foram estatisticamente semelhantes para os três sistemas, nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão, e situaram-se entre 200 a 250 nm. Nanocápsulas e nanoemulsão exibiram um potencial zeta mais negativo do que nanoesferas, evidenciando semelhanças estruturais nas superfícies de nanocápsulas e nanoemulsão e diferença quanto à superfície de nanoesferas.

Lamprecht⁶⁰ e colaboradores realizaram estudos de caracterização físico-química com o fármaco amiodarone associado a nanocápsulas e nanoesferas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico). As nanopartículas preparadas tiveram tamanhos nanométricos entre 20 e 110 nm, sendo nanocápsulas lipídicas aproximadamente duas vezes menores do que nanoesferas. Quanto ao estudo de liberação do fármaco por diálise foi observado um perfil de liberação típico para nanocápsulas e nanoesferas, sendo que para nanoesferas ocorreu a liberação de cerca de 40 % do fármaco nas duas primeiras horas, sendo este fato interpretado pelos autores como uma imediata dissolução do fármaco adsorvido na parte externa destas partículas, ou ainda um acúmulo da substância próximo da superfície da partícula, o que seria promovido pelas características anfifílicas do fármaco. No entanto, isto não foi confirmado pelas medidas de potencial zeta, que exibiram valores para nanoesferas com o fármaco ($\zeta = 0,63$ mV) muito próximos dos valores para nanoesferas sem fármacos ($\zeta = 0,26$ mV).

Nanocápsulas de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) foram preparadas como carreadores de enzimas por Baran⁶¹ e colaboradores. Um estudo da variação na concentração dos componentes e diminuição da massa molecular do polímero foi realizado. Como resultados mais relevantes observou-se que um aumento na quantidade de polímero aumenta o conteúdo de proteína encapsulada (L-asparaginase, catalase ou glicoseoxidase) e conseqüentemente, sua atividade enzimática. Um aumento de 1 % a 4 % na concentração de surfactante resultou em uma diminuição do tamanho de partícula de 450 nm para aproximadamente 200 nm. O uso de um polímero de menor massa molecular também conduziu a formação de nanocápsulas de menor tamanho. O uso do polímero de menor massa molecular aumentou a atividade enzimática da substância encapsulada, sem aumentar significativamente a quantidade de enzima encapsulada. Estes resultados sugeriram que a velocidade de difusão através da parede polimérica de nanocápsulas preparadas com polímero de menor massa molecular é maior, pois a barreira difusional ao substrato é diminuída. O menor tamanho de nanocápsulas preparadas com polímero de menor massa molecular também facilitou a difusão do substrato para dentro das nanocápsulas, aumentando a atividade específica.

Desta forma, de maneira geral, a caracterização físico-química e a conseqüente proposição de modelos para sistemas nanoparticulados depende amplamente da natureza dos constituintes das suspensões, do método de preparação envolvido e da razão dos componentes empregados. Na dependência dessas variáveis, alguns autores consideram nanocápsulas como sistemas vesiculares

revestidos com uma fina parede polimérica de aproximadamente 20 nm de espessura, ou até mesmo com parede polimérica descontínua⁵⁵, sendo que estes modelos são sugeridos baseados em semelhanças entre nanocápsulas e nanoemulsão correspondente, enquanto que nanocápsulas apresentam comportamento semelhante ao de nanoesferas frente a experimentos de liberação quando o fármaco encontra-se totalmente adsorvido à parede polimérica de nanocápsulas (Figura 6).

No entanto, estudos de liberação de substâncias associadas a estes sistemas demonstram diferenças quanto aos perfis e velocidades de liberação, sugerindo que o processo de liberação da substância depende, dentre outros fatores, de um processo difusivo através de uma parede polimérica em nanocápsulas⁵⁸, enquanto que para nanoesferas este processo é facilitado pela disposição da substância adsorvida à matriz polimérica⁶⁰.

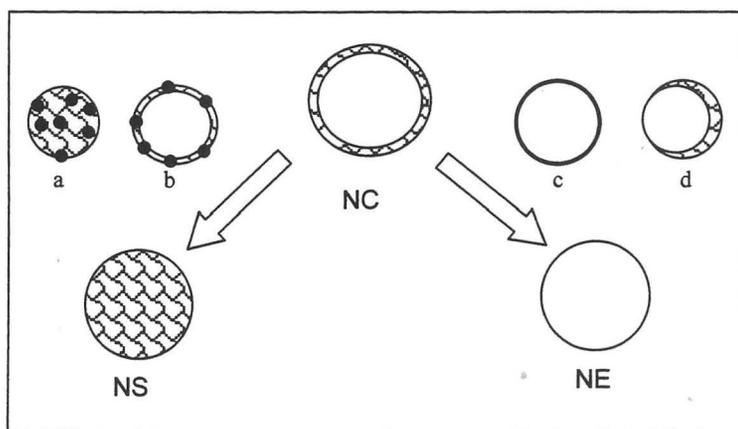


Figura 6. Modelos de sistemas nanoparticulados sugeridos por estudos comparativos. NC = nanocápsula; NS = nanoesfera; NE = nanoemulsão. a = nanoesfera com fármaco retido na matriz polimérica; b = nanocápsula com fármaco adsorvido à parede polimérica; c = nanocápsula com parede muito fina; d = nanocápsula com parede descontínua.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho é diferenciar nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão, preparadas com poli(ϵ -caprolactona) (NC, NS), triglicerídeo de cadeia média (NC, NE) e os surfactantes monoestearato de sorbitano e polissorbato 80, através do estudo da difusão de uma substância lipofílica associada a esses colóides, empregando a hidrólise alcalina do substrato lipofílico como sonda.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. SÍNTESE DO ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA⁹

Foi adicionado 0,2 mmol de 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (DMAP) a uma solução de indometacina (**2**) (Sigma) (5,0 mmol) em etanol (20 mL). Em um balão sob argônio, a solução foi então resfriada a 0 °C e, após 10 minutos, foi adicionado diciclohexilcarbodiimida (DCC) (**6**) (5,0 mmol). A reação permaneceu à temperatura de 0 °C por mais 30 minutos e, à temperatura ambiente, por 16 horas, acompanhando-se através de cromatografia em camada delgada.

Ao final da reação evaporou-se o excesso de solvente sob pressão reduzida (Büchi V-500/R-114/B-480). O resíduo foi retomado em diclorometano (30 mL) e a suspensão foi filtrada. O precipitado de dicicloexiluréia (**10**) foi descartado e o filtrado foi lavado com solução aquosa saturada de NaHCO₃ (3 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄ anidro, filtrada e o solvente evaporado. O produto foi purificado através de coluna cromatográfica (sílica-gel 60, 70-230 mesh), usando acetato de etila e ciclohexano (1:1 v/v) como eluente. O éster (Figura 7) foi obtido com 80% de rendimento.

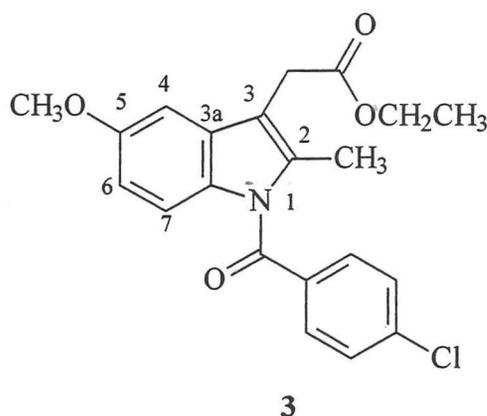


Figura 7. Estrutura química do éster etílico de indometacina (**3**).

O ponto de fusão do produto purificado foi determinado em equipamento de ponto de fusão em bloco (Reichert), apresentando-se o éster etílico de indometacina (**3**) um sólido cristalino com ponto de fusão de 82 – 83 °C.

RMN do ^1H 200 MHz (δ , ppm) CDCl_3 : 7,66 e 7,46 (AB, 2H + 2H, ArH *p*-clorobenzoila), 6,97 (d, 1H $J = 2,5$ Hz, H-4); 6,87 (d, 1H $J = 9,0$ Hz, H-7); 6,67 (dd, 1H $J = 9,0$ e 2,5 Hz, H-6); 4,16 (q, 2H $J = 7,1$ Hz, OCH_2), 3,84 (s, 3H, OCH_3); 3,65 (s, 2H, CH_2); 2,38 (s, 3H, CH_3); 1,27 (t, 3H $J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$).

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

Os espectros de RMN da indometacina (2) e de seu éster etílico (3) são apresentados nos anexos 1 e 2.

3.2. PROCEDIMENTO ANALÍTICO

O sistema para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) consistiu de um cromatógrafo Perkin-Elmer S-200 com injetor S-200, detector UV-VIS, pré-coluna (C_{18}) e coluna (Nova-Pak C_{18} , 150 mm, 3,9 mm, 4 μm , Waters). A fase móvel para a quantificação do éster etílico de indometacina (3) foi preparada com acetonitrila/ H_2O (70:30) (v/v) ajustada com pH $5,0 \pm 0,5$ com solução de ácido acético 10 % medido em potenciômetro. O fluxo empregado foi de 0,7 mL/min e o volume de injeção da curva de calibração e das amostras foi de 20 μL . O éster etílico de indometacina (3) foi detectado em comprimento de onda de 267 nm.

Para a quantificação da indometacina (2) foi utilizado o mesmo sistema de CLAE, sendo que para este fármaco a fase móvel foi constituída de acetonitrila e tampão fosfato pH 5,0 (1:1) (v/v), eluída com fluxo de 0,7 ml/min e também detectada em 267 nm.

Os espectros de varredura no UV da indometacina e de seu éster etílico são apresentados nos anexos 3 e 4, respectivamente.

3.3. COEFICIENTES DE PARTIÇÃO

Indometacina (2) ou seu éster etílico (3) foram adicionados (15 mg), separadamente, em 3 mL de Miglyol 810[®]. A mistura foi agitada em vórtex (agitador Certomat MV) durante 15 minutos à temperatura ambiente, permaneceu em repouso por 60 minutos, e foi agitada em vórtex por mais 15 minutos. Cada mistura foi então centrifugada a 3000 rpm (centrífuga

Sigma 4k15) e a concentração total de indometacina (2) e do éster etílico (3) foi quantificada por CLAE em cada sobrenadante, segundo método descrito no item 3.2. Cada sobrenadante (500 µL) foi adicionado a diferentes meios aquosos (500 µL) constituídos de água destilada ou tampão fosfato (pH 4,0 ou pH 7,4). Cada frasco foi agitado durante 15 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas e cada composto foi analisado por CLAE tanto na fase aquosa como na fase oleosa. Os doseamentos foram feitos em triplicata.

3.4. PREPARAÇÃO DOS COLÓIDES

As suspensões de NC foram preparadas pelo método de deposição interfacial¹⁴. A 40 °C, o éster etílico de indometacina (3) (0,010 g), a poli(ε-caprolactona) (0,100 g), o triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico (Miglyol 810[®]) (0,33 mL) e o surfactante lipofílico monoestearato de sorbitano (Span 60[®]) (0,077 g) foram dissolvidos em acetona (27 mL). Em um frasco separado, o polissorbato 80 (Tween 80[®]) (0,077g) foi adicionado em 53 mL de água. A solução orgânica foi então adicionada à fase aquosa sob agitação magnética à temperatura ambiente. Após 10 minutos, a acetona foi eliminada e a fase aquosa concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotatório, ajustando-se o volume final em balão volumétrico de 10 mL. As suspensões de NS e a nanoemulsão (NE) foram preparadas da mesma maneira descrita acima (nanoprecipitação ou emulsão espontânea), omitindo-se o óleo e o polímero, respectivamente. As formulações foram preparadas em triplicata.

3.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SISTEMAS COLOIDAIIS

3.5.1. Medidas de pH

Após a preparação das suspensões coloidais, os valores de pH foram determinados para cada formulação, utilizando-se um potenciômetro (Micronal B-474).

3.5.2. Determinação do Teor Total e do Teor Associado

A concentração total do éster nas formulações foi determinado pelo método de CLAE descrito no item 3.2. Cada suspensão teve um volume de 100 µL diluídos até 10 mL com acetonitrila, que dissolve todos os constituintes das formulações. Esta solução diluída foi

filtrada através de membrana de 0,45 μm (Millipore) e teve 20 μL injetados no cromatógrafo. A concentração do éster não associado às nanopartículas foi determinada através de ultrafiltração-centrifugação (5 min a 12000 rpm), empregando-se filtros MC (10 kDa, Millipore), sendo a concentração livre determinada no ultrafiltrado por CLAE. A concentração do éster associado aos colóides foi então calculada, pela diferença entre os teores total e livre da substância nos sistemas. Estas determinações foram realizadas para todas as formulações imediatamente após o preparo.

3.5.3. Determinação do Raio Hidrodinâmico

O raio hidrodinâmico (R_h) dos colóides, de amostras de suspensões diluídas 500 vezes, foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons, por análise da luz espalhada em ângulo fixo de 90° . As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, utilizando-se um instrumento Brookhaven (goniômetro BI-200M, correlador digital BI-9000 AT, e um sistema de detecção BI-9863). Um laser Spectra Physics He-Ne, modelo 127, $\lambda_0 = 632,8$ nm foi usado como fonte de luz. As análises foram realizadas em duplicata.

3.5.4. Medidas de Densidade

As densidades dos principais componentes das formulações foram determinadas através de picnômetro, como no caso do Miglyol 810[®] e do Tween, e no caso da poli(ϵ -caprolactona) a densidade foi determinada através da medida do volume de água deslocado por uma massa de aproximadamente 1,5 g deste polímero medida em balança analítica.

3.6. REAÇÕES DE HIDRÓLISE

3.6.1. Hidrólise do Éster Etilico de Indometacina em Meios Gástrico e Intestinal Artificiais

As reações com catálise enzimática foram realizadas à temperatura de 37°C (Ika – EH4) por adição de 1 mL de solução analítica do éster em acetonitrila (1 mg/mL) ou de suspensões de NC, NS e NE, todas na concentração de 1 mg/mL, em 4 mL de meios gástrico ou intestinal simulados⁵⁰. A hidrólise enzimática também foi realizada utilizando-se o éster de indometacina (**3**) na sua forma sólida. O meio gástrico simulado foi preparado dissolvendo-se 2,0 g de NaCl e 3,2 g de pepsina em 7,0 mL de HCl concentrado e água

suficiente para completar 1 L, sendo 1,2 o pH da solução. O meio intestinal simulado foi preparado dissolvendo-se 6,8 g de KH_2PO_4 em 250 mL de água. Misturando-se e adicionando-se 190 mL de NaOH 0,2 N e 400 mL de água, em seguida adicionou-se 10,0 g de pancreatina, misturando-se e ajustando-se o pH da solução resultante com NaOH 0,2 N até $7,5 \pm 0,1$. Diluiu-se com água até o volume de 1 L, obtendo-se um valor de pH igual a 6,8 para a solução final.

Alíquotas de 300 μL do meio reacional foram coletadas entre 10 e 770 minutos. Todas as alíquotas foram tratadas com 1,2 mL de acetonitrila com o objetivo de realizar a precipitação das proteínas. Após centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos, os sobrenadantes foram analisados por CLAE, observando-se a concentração do éster em função do tempo. As reações foram realizadas em triplicata.

3.6.2. Hidrólise do Éster Etilico de Indometacina (3) em Plasma

O estudo das reações de hidrólise do éster etílico de indometacina (3) em plasma humano foi realizado de maneira semelhante às reações anteriormente descritas, também procedendo na temperatura de 37 °C, sendo que 1 mL das suspensões NC, NS e NE foi adicionado à 4 mL de solução de plasma humano (Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre) em tampão fosfato pH 7,4 (8:2) (v/v), também previamente termostatizada. As reações também foram acompanhadas em plasma de rato, segundo o mesmo procedimento. Alíquotas de 300 μL do meio reacional foram coletadas entre 10 e 1440 minutos. Todas as alíquotas foram tratadas com 1,2 mL de acetonitrila com o objetivo de realizar a precipitação das proteínas plasmáticas. Após centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos, os sobrenadantes foram analisados por CLAE, observando-se a concentração do éster em função do tempo. As reações foram realizadas em triplicata.

3.6.3. Hidrólise do Éster Etilico de Indometacina em Meio Alcalino

As reações de hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina (3) foram realizadas à temperatura de 37 °C (Ika – EH4) por adição de 1 mL de solução analítica do éster em acetonitrila (1 mg/mL) ou de suspensões de NC, NS e NE, todas na concentração de 1 mg/mL, em 4 mL de solução aquosa de NaOH 0,05 M.

Reações comparativas da hidrólise alcalina da indometacina (2) foram realizadas segundo a mesma metodologia para o seu éster, incluindo reação do fármaco em solução de acetonitrila e associado aos sistemas nanoestruturados.

Para todas as reações foram coletadas alíquotas de 300 μ L do meio reacional entre os tempos de 10 e 1440 minutos. Todas as alíquotas foram tratadas com 1,2 mL de acetonitrila e 5 μ L de HCl 2,5 M. Após centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos, os sobrenadantes foram analisados por CLAE, observando-se o desaparecimento do éster. As reações foram realizadas em triplicata.

Para a extração e identificação estrutural dos produtos da hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina (3) foi realizada reação em grande quantidade do éster de indometacina (3) em solução de acetonitrila. Para tanto foi preparado 100 mL de uma solução de éster de indometacina (3) em acetonitrila na concentração de 1 mg/mL. Esta solução foi diluída até 500 mL com solução de NaOH 0,05 M. A reação foi acompanhada por HPLC até o consumo total do substrato.

Procedeu-se então a neutralização do meio reacional com HCl (2,5 M) até pH 1,5. Um precipitado branco foi obtido e filtrado sob pressão reduzida, realizando-se sua posterior análise por cromatografia e por RMN. O filtrado foi extraído com 50 mL de acetato de etila, sendo realizado uma posterior secagem com $MgSO_4$ anidro e evaporação do solvente em evaporador rotatório. O produto obtido apresentou-se sólido e com coloração escura e após secagem em dessecador foi realizada a análise de RMN.

3.7. MEDIDAS DE DIÂMETRO DE PARTÍCULA DURANTE REAÇÃO DE HIDRÓLISE ALCALINA

As reações de hidrólise do éster etílico de indometacina (3) associado a NS, NE e NC também foram acompanhadas em função do tempo, quanto à variação do diâmetro das nanopartículas em função do tempo, sendo as medidas realizadas por espectroscopia de correlação de fótons.

Das reações de hidrólise (item 3.6.3) foram coletadas alíquotas de 100 μ L, retiradas em intervalos de tempo pré-estabelecidos e diluídas até o volume de 10 mL com água, procedendo-se então as medidas conforme item descrito no item 3.5.3.

3.8. ANÁLISE DOS DADOS

3.8.1. Validação Analítica

A validação da metodologia analítica contou com o tratamento estatístico das curvas padrão obtidas em triplicata. Para tanto, foram avaliados parâmetros como a linearidade, a qual fornece a relação entre a resposta experimental do equipamento e a concentração conhecida do analito, a precisão, que avalia o grau de concordância entre os resultados das análises individuais, quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas análises, e a exatidão, que avalia o grau de concordância entre os valores determinados e o valor real. Foram ainda avaliados a sensibilidade, que permite determinar a habilidade do método analítico em diferenciar e quantificar somente a substância de interesse, e o limite de quantificação, que corresponde à menor concentração do analito que pode ser mensurada com um nível mínimo de exatidão e precisão.

3.8.2. Modelagem Matemática

O modelo de Korsmeyer-Peppas foi verificado para os perfis cinéticos obtidos para todos os sistemas coloidais através da equação 20, onde os parâmetros a e n foram obtidos como resultados da modelagem matemática.

A descrição matemática adequada para as curvas cinéticas constitui tratamento importante para a obtenção dos parâmetros cinéticos com respeito aos fenômenos observados. Os ajustes foram testados para modelos monoexponencial (equação 23) e biexponencial (equação 24).

$$C = C_0 e^{-kt} \quad (\text{eq. 23})$$

Onde C é concentração do éster de indometacina (3) no tempo t , C_0 é a concentração inicial de éster de indometacina (3) e k é a constante cinética observada.

$$C = a e^{-k_1 t} + b e^{-k_2 t} \quad (\text{eq. 24})$$

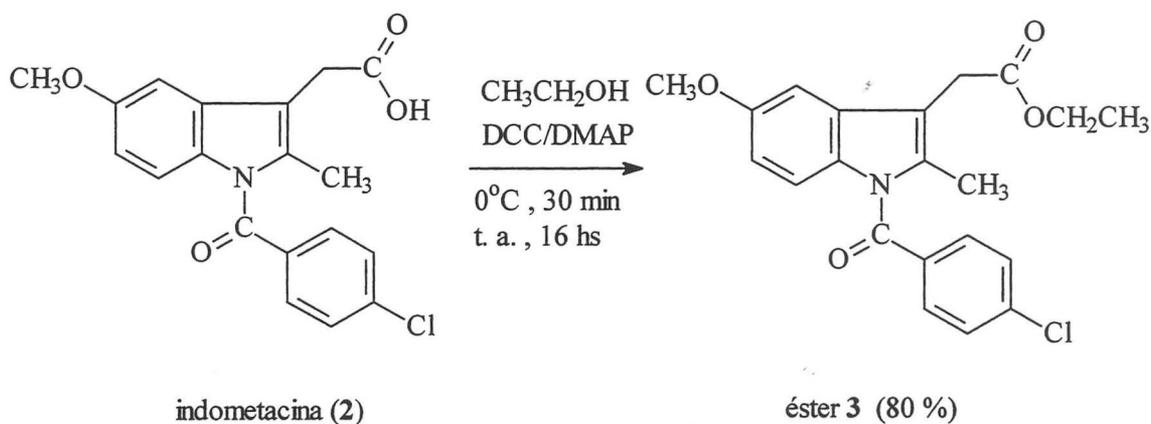
Onde C é concentração do éster de indometacina no tempo t , a e b são parâmetros constantes, e k_1 e k_2 são constantes cinéticas observadas.

Tanto a aplicação do modelo de Korsmeyer-Peppas como a modelagem dos perfis cinéticos experimentais foi realizada através do programa MicroMath[®] Scientist[®], comparando-se os modelos entre si com base nos seguintes parâmetros: o critério de seleção do modelo (MSC), o maior coeficiente de correlação e o melhor ajuste gráfico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SÍNTESE DO ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA

O éster etílico de indometacina foi obtido pela condensação clássica de etanol com indometacina, sendo o ácido carboxílico ativado com diciclohexilcarbodiimida (DCC) (Esquema 2). O rendimento do produto purificado foi de 80 % e a pureza foi avaliada por CLAE, tendo sido estimada em $99,24 \pm 0,04$ %. O espectro de RMN do ^1H evidenciou sinais em 4,16 e 1,27 ppm, correspondentes ao grupo etoxila, e no espectro de RMN de ^{13}C (APT), foram observados sinais em 170,9 ppm, 61,0 ppm e 13,3 ppm atribuídos a C=O do éster e ao grupo OCH_2CH_3 .



Esquema 2

4.2. PROCEDIMENTO ANALÍTICO

Os parâmetros que foram avaliados para a validação do método analítico cromatográfico foram: a) a linearidade, observada pelos coeficientes de correlação da regressão linear de todas as curvas através do método dos mínimos quadrados, b) a precisão, avaliada através da repetibilidade (intra-dia) e da precisão intermediária (inter-dia), c) a exatidão, avaliada através de amostras controle, e também d) o limite de detecção, utilizando-se como referência os parâmetros preconizados pelo International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)⁶².

Estes parâmetros foram determinados através da preparação e análise de três curvas de calibração e respectivas amostras controle a cada dia, durante três dias consecutivos, totalizando 9 curvas. A curva de calibração linear pode ser obtida na faixa de 1,00 a 25,00 $\mu\text{g/mL}$, com coeficientes de correlação acima de 0,9980 para a indometacina (2) (Tabela 2) e acima de 0,9995 para o éster etílico (Tabela 3).

Tabela 2. Coeficientes de correlação (r) para curvas de calibração da indometacina (2).

DIA	Curva 1	Curva 2	Curva 3
1	0,9989	0,9996	0,9994
2	0,9994	0,9989	0,9980
3	0,9987	0,9990	0,9984

Tabela 3. Coeficientes de correlação (r) para curvas de calibração do éster etílico de indometacina (3).

DIA	Curva 1	Curva 2	Curva 3
1	0,9998	0,9999	0,9990
2	0,9999	0,9995	0,9999
3	0,9997	0,9998	0,9994

A exatidão foi avaliada através da injeção de amostras controle, com concentrações de 1,75, 3,00, 12,00 e 17,00 $\mu\text{g/mL}$, preparadas a partir de soluções-mãe distintas daquela da curva de calibração. As exatidões são apresentadas nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Exatidão do método analítico de CLAE para indometacina (2) frente a amostras controle.

Controles $\mu\text{g/mL}$	Dia 1 $\mu\text{g/mL}$ (exatidão%)	Dia 2 $\mu\text{g/mL}$ (exatidão%)	Dia 3 $\mu\text{g/mL}$ (exatidão%)
1,75	$1,87 \pm 0,01$ (107,29 \pm 0,81)	$1,72 \pm 0,01$ (98,39 \pm 0,93)	$1,87 \pm 0,13$ (106,94 \pm 7,89)
3,00	$2,96 \pm 0,12$ (98,68 \pm 3,94)	$2,80 \pm 0,07$ (93,46 \pm 2,36)	$2,82 \pm 0,14$ (94,09 \pm 4,76)
12,00	$12,08 \pm 0,31$ (100,70 \pm 2,65)	$12,24 \pm 0,68$ (101,98 \pm 5,73)	$11,84 \pm 0,36$ (98,68 \pm 3,04)
17,00	$17,02 \pm 0,09$ (100,11 \pm 0,56)	$17,08 \pm 0,02$ (100,49 \pm 0,14)	$16,97 \pm 0,18$ (99,84 \pm 0,14)

Tabela 5. Exatidão do método analítico de CLAE para éster etílico de indometacina (3) frente a amostras controle.

Controles µg/mL	Dia 1 µg/mL (exatidão%)	Dia 2 µg/mL (exatidão%)	Dia 3 µg/mL (exatidão%)
1,75	1,83 ± 0,05 (104,94 ± 2,53)	1,76 ± 0,05 (100,75 ± 3,33)	1,86 ± 0,10 (106,39 ± 5,78)
3,00	3,08 ± 0,04 (102,69 ± 1,65)	3,14 ± 0,09 (104,88 ± 3,00)	3,21 ± 0,11 (106,89 ± 3,90)
12,00	12,16 ± 0,30 (101,36 ± 2,51)	11,77 ± 0,49 (98,11 ± 4,09)	11,86 ± 0,12 (98,92 ± 1,00)
17,00	17,07 ± 0,54 (100,44 ± 2,39)	16,72 ± 0,54 (98,35 ± 3,20)	17,31 ± 0,47 (101,81 ± 2,79)

Os coeficientes de variação (CV%) intra-dia e inter-dia também foram avaliados e, para concentrações acima de 1 µg/mL, não excederam o valor de 6,18% para a indometacina (Tabela 6) e o valor de 6,82 % para o éster etílico de indometacina (Tabela 7).

Tabela 6. Variações intra-dia e inter-dia para curvas de calibração da indometacina (2).

Concentração (µg/mL)	CV% (dia 1)	CV% (dia 2)	CV% (dia 3)	CV% (interdia)
0,50	7,27	29,19	23,79	11,92
1,00	2,92	5,44	4,20	6,18
2,00	4,66	2,93	3,68	5,20
5,00	0,90	2,72	3,35	1,13
10,00	4,73	3,69	1,01	2,36
15,00	2,87	2,64	1,12	3,44
20,00	5,05	2,81	1,67	2,31
25,00	5,30	2,54	1,06	2,38

Tabela 7. Variações intra-dia e inter-dia para curvas de calibração do éster etílico de indometacina (3).

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	CV% (dia 1)	CV% (dia 2)	CV% (dia 3)	CV% (interdia)
0,50	5,58	3,43	4,33	20,81
1,00	0,95	4,28	3,62	4,22
2,00	1,96	2,81	0,45	2,67
5,00	1,89	3,16	4,17	2,12
10,00	1,98	0,61	3,61	6,51
15,00	0,61	2,97	4,07	6,71
20,00	2,34	1,56	1,37	6,82
25,00	2,84	2,57	2,95	6,46

Os valores determinados de linearidade, precisão e exatidão para a quantificação de indometacina (2) e de seu éster 3 são adequados para este trabalho, considerando-se validados os métodos analíticos. Os limites de quantificação para a indometacina (2) e seu éster etílico (3) foram estabelecidos em $1,00 \mu\text{g/mL}$, uma vez que o ponto de $0,50 \mu\text{g/mL}$ de cada curva não apresentou coeficientes de variação aceitáveis para as necessidades deste trabalho (superiores a 10 %).

4.3. COEFICIENTES DE PARTIÇÃO

Para estimar-se a lipofilicidade da indometacina (2) e de seu éster (3), os coeficientes de partição Miglyol 810[®]/fase aquosa da IndOH (2) e do IndOEt (3) foram determinados empregando-se as fases aquosas: tampão pH 4,0, água e tampão pH 7,4. Estes meios aquosos foram escolhidos com base no valor da constante de dissociação ácida da indometacina (2) ($pK_a = 4,5$)⁶³.

Após a adição de tampão pH 4,0, água ou tampão pH 7,4 na fase oleosa saturada de IndOH (2) ($2,246 \text{ mg/mL}$), as fases apresentaram as concentrações de indometacina (2) descritas na Tabela 8. Calculando-se os respectivos log P para IndOH (2) obteve-se os valores de 1,60, 1,51 e 0,55, respectivamente, que estão de acordo com a formação de íons carboxilato com o aumento do pH da fase aquosa e, conseqüentemente, aumento da sua solubilidade.

Por outro lado, quando a solução oleosa saturada de éster etílico de indometacina (**3**) (4,131 mg/mL) foi adicionada às mesmas fases aquosas, a recuperação deste éster **3** nas respectivas fases oleosas foi de 97 ± 4 % para todos os casos, e as correspondentes fases aquosas diretamente analisadas (CLAE) não evidenciaram a presença de éster **3** dentro do limite de quantificação do método, ou seja, 1 $\mu\text{g/mL}$. Desta forma, considerando-se o limite de quantificação de IndOEt como limite máximo de solubilidade nas fases aquosas, o valor de log P seria no mínimo igual a 3,62 (Tabela 8).

Tabela 8. Concentrações da IndOH (**2**) e do IndOEt (**3**) no óleo (inicial) nas diferentes fases: água, tampão 4,0 e 7,4 após mistura das fases oleosa e aquosa. Logaritmo do coeficiente de partição (log P) dos correspondentes sistemas.

Substâncias	conc. Inicial no óleo mg/mL	conc. no tampão 4,0 mg/mL (log P)	conc. na água mg/mL (log P)	conc. no tampão 7,4 mg/mL (log P)
IndOEt	4,131	< 0,001 (> 3,62)	< 0,001 (> 3,62)	< 0,001 (> 3,62)
IndOH	2,246	0,067 (1,60)	0,055 (1,51)	0,494 (0,55)

Os resultados confirmam a lipofilicidade mais pronunciada do éster **3** em relação ao ácido carboxílico **2** correspondente, uma vez que quanto maior log P, menor a afinidade da substância pela fase aquosa experimentada. Tal observação é importante, uma vez que a determinação do coeficiente de partição de uma substância passível de encapsulação está correlacionado com a partição desta entre uma fase oleosa e uma fase aquosa⁴¹. Como o derivado éster da indometacina (**3**) apresenta uma maior solubilidade em óleo do que o ácido carboxílico **2**, 4,131 mg/mL e 2,246 mg/mL, respectivamente, e uma partição maior nas fases oleosas, o éster etílico de indometacina (**3**) pode ser considerado uma sonda lipofílica não ionizável adequada para o estudo dos sistemas.

4.4 SUSPENSÕES COLOIDAIS

4.4.1. Sistemas Coloidais Contendo Indometacina (2)

Os colóides contendo indometacina (2) apresentaram aspecto macroscopicamente homogêneo, apresentando diâmetros de partículas inferiores a 300 nm. Estes parâmetros, as medidas de pH e a concentração de indometacina (2) associada são apresentados na Tabela 9.

As concentrações de indometacina (2) associada aos sistemas NC, NS e NE foram consideradas correspondentes às concentrações totais (teores totais), uma vez que nos trabalhos anteriores⁶⁴ do grupo foi demonstrado que 100% da indometacina (2) está associada aos colóides.

Tabela 9. Parâmetros físico-químicos dos sistemas coloidais contendo indometacina (2) logo após preparação.

Formulação	Diâmetro ^a (nm) ± DP ^b	pH	[indometacina] (mg/mL) ± DP ^c
NC	264 ± 12	5,52 ± 0,31	1,012 ± 0,010
NS	186 ± 9	5,29 ± 0,16	0,995 ± 0,019
NE	236 ± 17	5,25 ± 0,20	0,976 ± 0,028

^a Amplitude de distribuição < 67 nm. ^b Desvio padrão de triplicata de alíquotas. ^c Desvio padrão de triplicata de alíquotas.

4.4.2. Sistemas Coloidais Contendo Éster Etilico de Indometacina (3)

Para todos os sistemas coloidais preparados com éster etílico de indometacina (3) também foram obtidas formulações macroscopicamente homogêneas. Os diâmetros de partículas determinados por PCS foram inferiores a 300 nm (Tabela 10). Os valores de pH após preparação se apresentaram entre 5,63 e 6,30, diminuindo, após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente para valores compreendidos entre 3,75 a 4,66.

Tabela 10. Parâmetros físico-químicos dos sistemas coloidais contendo éster etílico de indometacina (3).

Formulação	Diâmetro ^a (nm) ± DP ^b	pH		[éster] ± DP ^c (mg/mL)	
		t = 0	t = 30 dias	t = 0	t = 30 dias
NC	278 ± 29	6,30 ± 0,22	4,66 ± 0,16	0,963 ± 0,022	0,963 ± 0,016
NS	208 ± 9	5,74 ± 0,15	4,49 ± 0,11	0,985 ± 0,009	0,981 ± 0,024
NE	250 ± 9	5,63 ± 0,20	3,75 ± 0,32	0,992 ± 0,012	0,989 ± 0,021

^a Amplitude de distribuição < 58 nm. ^b Desvio padrão de triplicata de lotes. ^c Desvio padrão de triplicata de alíquotas.

A medida do pH é importante na avaliação da estabilidade das suspensões coloidais, uma vez que alterações deste parâmetro podem estar relacionadas a degradação de algum componente da formulação, a degradação do polímero ou até mesmo a difusão da substância ativa para o meio aquoso⁶. Valores de pH ácidos foram observados para todas as formulações, entre 5,52 e 5,25 para os colóides contendo indometacina (2), e 5,63 e 6,30 para os colóides contendo éster etílico de indometacina (3), valores estes que diminuíram após 30 dias de armazenamento para 3,75 a 4,66. Segundo Calvo e colaboradores¹⁸ uma diminuição desta natureza no pH poderia ser explicada pela hidrólise do poliéster ou pela presença de impurezas ácidas (ácidos graxos) provenientes do óleo (triacilglicerol) presentes na fase oleosa de NC e NE. No caso de NC, a parede polimérica seria suficientemente permeável, permitindo a localização desses ácidos na interface partícula/água. No caso de hidrólise do polímero, o declínio de pH foi atribuído por Calvo e colaboradores¹⁸ à presença de ácido ϵ -hidroxicapróico na solução, diminuindo os valores de pH.

Entretanto, Mallin e colaboradores⁶⁵ demonstraram que a hidrólise da poli(ϵ -caprolactona) é uma reação lenta que depende primeiramente do inchamento do polímero. Os testes de inchamento da poli(ϵ -caprolactona) em água ou tampão fosfato (pH 7,4), realizados nas temperaturas de 25 °C ou 37 °C, demonstraram que a poli(ϵ -caprolactona) não sofre inchamento durante 60 dias de experimento. Por outro lado, Lopes¹⁵ e colaboradores consideraram que os abaixamentos nos valores de pH de nanopartículas de poli(metacrilato de metila-co-ácido metacrílico) poderiam estar relacionados à relaxação das cadeias poliméricas, propiciando a dissociação de grupos carboxílicos na interface partícula/água. Desta forma, a diminuição dos

valores de pH observados após 30 dias da preparação dos sistemas NC, NS e NE (Tabela 10) poderiam estar relacionados à presença de impurezas ácidas no Miglyol 810[®], que em função do tempo se colocassem à interface partícula ou gotícula/água, assim como à relaxação das cadeias da poli(ϵ -caprolactona) e exposição de maior número de grupamentos carboxílicos na interface.

As concentrações de éster de indometacina (**3**) associado aos sistemas NC, NS e NE poderiam ser consideradas correspondentes às concentrações totais (teores totais), uma vez que a solubilidade do éster etílico de indometacina (**3**) em água é menor do que 1 $\mu\text{g/mL}$. Para avaliar a possibilidade da existência simultânea de nanocristais de éster nas suspensões, estabilizados pelos surfactantes, foi preparada uma dispersão aquosa de éster **3** nos dois surfactantes, que levou a uma dispersão instável, ocorrendo a formação de um precipitado. Após isolamento deste precipitado através de filtração, foi determinado seu ponto de fusão, cujo valor situou-se entre 82-94 °C, o que levou à conclusão da composição do precipitado sendo o éster etílico de indometacina (**3**) (82 °C). Desta forma, pode-se inferir que, nas NC, NS e NE, o IndOEt (**3**) deva estar totalmente associado aos colóides, não havendo formação de nanocristais estabilizados pelos surfactantes. Os teores de éster **3** permaneceram constantes, após 30 dias de armazenagem à temperatura ambiente.

4.5. REAÇÕES DE HIDRÓLISE

A hidrólise alcalina de ésteres de álcoois primários segue um mecanismo bimolecular, havendo formação de um intermediário tetraédrico como ilustrado na Figura 8 para a hidrólise do éster etílico de indometacina (**3**). A formação do íon carboxilato é deslocada no sentido direto, devido ao excesso de íons hidroxila no meio reacional.

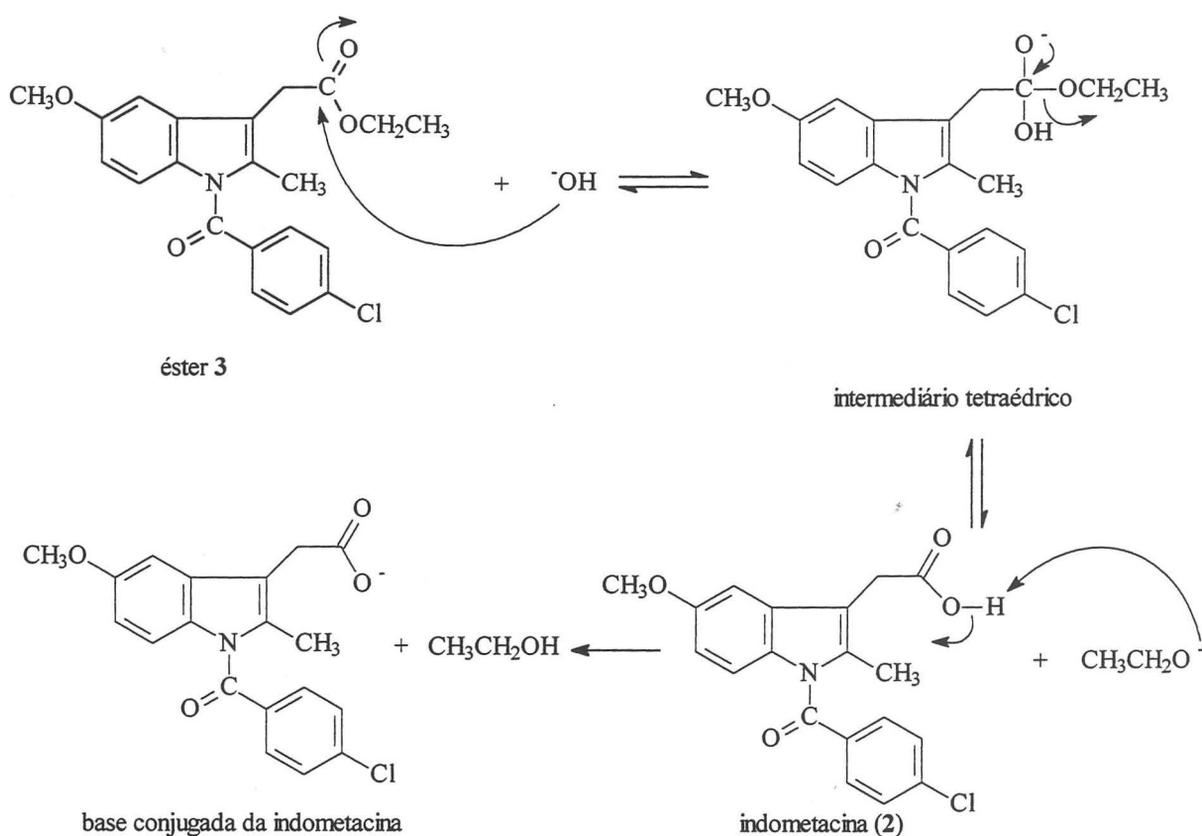


Figura 8. Mecanismo clássico de hidrólise de éster ilustrado para o éster etílico de indometacina.

4.5.1 Hidrólise do Éster Etilico de Indometacina (3) em Meios Gástrico e Intestinal Artificiais

A hidrólise enzimática do éster etílico de indometacina (3) associado aos colóides foi realizada empregando-se meio intestinal simulado e meio gástrico simulado. As reações foram acompanhadas durante um período de 12 horas, sendo que em nenhum dos meios testados observou-se consumo do éster em função do tempo. O éster 3 associado aos colóides se mostrou estável frente aos meios gástrico (pH 1,2) e intestinal (pH 6,8) em presença de enzimas (pepsina e pancreatina, respectivamente). Os resultados são apresentados na figura 9 abaixo.

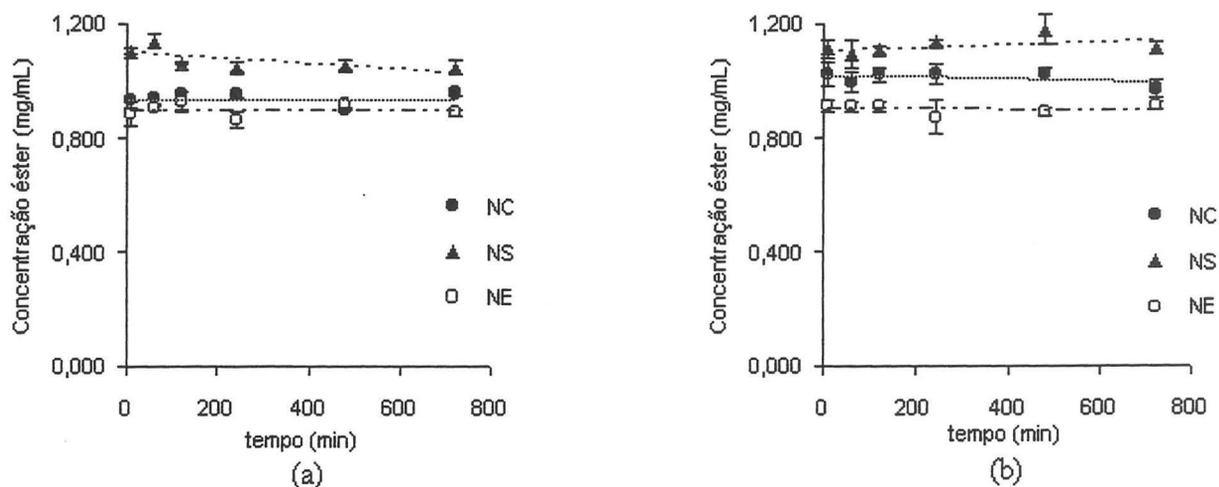


Figura 9. Concentração do éster etílico de indometacina (3) associado a NC, NS e NE nos meios enzimáticos: (a) gástrico e (b) intestinal.

4.5.2. Hidrólise do Éster Etilico de Indometacina (3) em Plasma

Baseado nos estudos desenvolvidos por Bonina⁸ e colaboradores, nos quais foram descritas as reações de hidrólise enzimática em plasma humano de dois derivados ésteres de indometacina (derivados da 1-etilazacicloalcan-2-ona), realizou-se experimento de hidrólise do éster etílico de indometacina (3) em plasma humano, com o intuito de estudar o perfil do consumo do éster em função do tempo. Desta forma, foram acompanhadas reações em plasma do éster etílico de indometacina (3) em solução de acetonitrila, em solução de metanol, bem como a reação em plasma do éster associado às nanopartículas (NC, NS) e à nanoemulsão (NE).

Em todos os casos observou-se uma manutenção da concentração inicial do éster etílico de indometacina (3) por um período de 24 horas (Figura 10), evidenciando a estabilidade deste substrato no meio plasmático. Para descartar a possibilidade de uma baixa concentração de enzimas frente ao éster etílico de indometacina (3), a reação foi realizada empregando-se as mesmas condições empregadas por Bonina⁸, as mesmas proporções de substrato-enzima. O substrato foi, então, adicionado ao meio reacional em solução de metanol. Neste experimento também não foi observado o consumo do éster de indometacina (3) no período de 24 horas. Uma segunda possível explicação para a não ocorrência da reação seria o fato de que os solventes orgânicos utilizados na dissolução do substrato estivessem desnaturando as enzimas plasmáticas. Para eliminar esta possibilidade, a reação foi realizada utilizando-se o éster sólido, adicionado

diretamente no meio plasma/tampão fosfato (pH 7,4) (4:1 v/v). No entanto, nestas condições experimentais o éster é pouco solúvel, optando-se pelo acompanhamento da reação através da análise do aparecimento de indometacina (2) (CLAE), o produto da reação de hidrólise do éster. Contudo, não foi observada a formação de indometacina (2) após 12 horas de experimento.

Uma outra possível explicação para a estabilidade do éster 3 seria o fato da velocidade de hidrólise ser muito lenta em plasma humano, o que conduziu a um estudo da estabilidade do éster etílico de indometacina (3) frente ao plasma de rato, uma vez que Bonina e colaboradores⁸ demonstraram que as reações de hidrólise dos derivados de indometacina em plasma de rato apresentavam maior velocidade quando comparadas às reações em plasma humano. Foi, então, realizada reação do éster etílico de indometacina (3), associado à nanoemulsão, em plasma de rato. Após 24 horas de reação, não foi observada diminuição significativa na concentração inicial do substrato.

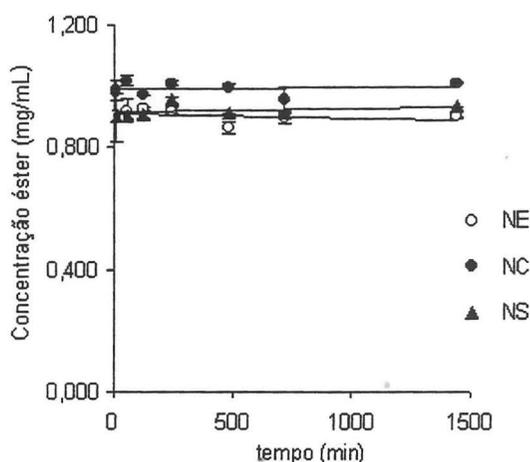


Figura 10. Hidrólise do éster etílico de indometacina (3) associado a NC, NS ou NE frente a plasma humano.

A interpretação desses resultados foi, então, relacionada à proteção do éster etílico de indometacina (3), quando associado aos colóides, frente a ação enzimática. Ou seja, o éster 3 encapsulado não difundiria para o meio aquoso, onde estão presentes as enzimas que catalisariam a hidrólise (Figura 11). Assim como no estado sólido, devido à baixa solubilidade, o éster 3 não propicia a hidrólise, uma vez que a formação do complexo de encontro substrato-enzima deve ser amplamente favorável em solução.

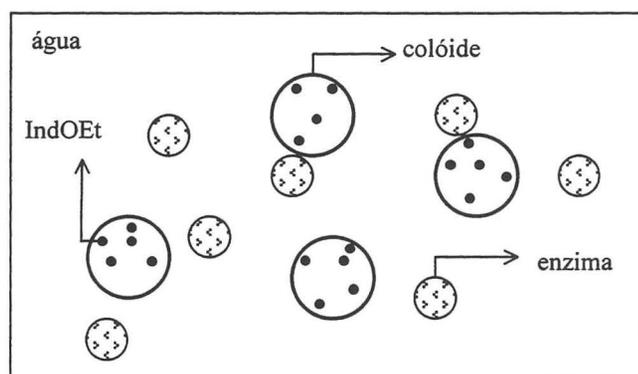


Figura 11. Representação esquemática dos colóides contendo éster etílico de indometacina (3) adicionados nos meios enzimáticos.

4.5.3. Hidrólise Alcalina do Éster Etílico de Indometacina (3)

As reações de hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina (3) associado às NC, NS e NE foram acompanhadas entre 10 e 1440 minutos, e os resultados dos experimentos são relativos às respectivas triplicatas. A primeira etapa do acompanhamento da reação consistiu em observar o consumo do éster etílico de indometacina (3) em função do tempo através da diminuição na área do pico com tempo de retenção de aproximadamente 7,57 minutos (Figura 12). Além da diminuição observada na área do pico do éster (3), pode-se observar a formação de 4 outros picos, os quais foram identificados como produto 1 (P_1 , tempo de retenção $\cong 2,01$ min), produto 2 (P_2 , tempo de retenção $\cong 2,39$ min), produto 3 (P_3 , tempo de retenção $\cong 2,90$ min) e, produto 4 (P_4 , tempo de retenção $\cong 3,57$ min). Realizou-se o mesmo experimento de hidrólise alcalina (NaOH 0,05 M) com o éster de indometacina (3) em solução de acetonitrila (1mg/mL), observando-se o total desaparecimento do éster em 10 minutos de reação.

Realizou-se, então, a co-injeção de uma amostra padrão de indometacina (2), observando-se o aumento da área do pico do P_4 , o que evidenciou que o P_4 é indometacina (2), sendo originada da hidrólise da função éster no éster etílico de indometacina (3). Para a identificação dos demais produtos, foi realizada uma nova reação com éster etílico de indometacina (3) em solução de acetonitrila, guardada as mesmas concentrações de éster e de NaOH do experimento de cinética, com o objetivo de realizar a extração dos demais produtos presentes no cromatograma. Após 20 minutos de reação, o consumo total do éster etílico foi observado, e então procedeu-se a neutralização do meio reacional com HCl até pH 1,5. Um precipitado branco foi obtido,

realizando-se posterior filtração e injeção no sistema cromatográfico, evidenciando tratar-se do P₂ (tempo de retenção = 2,39 min). (Figura 12).

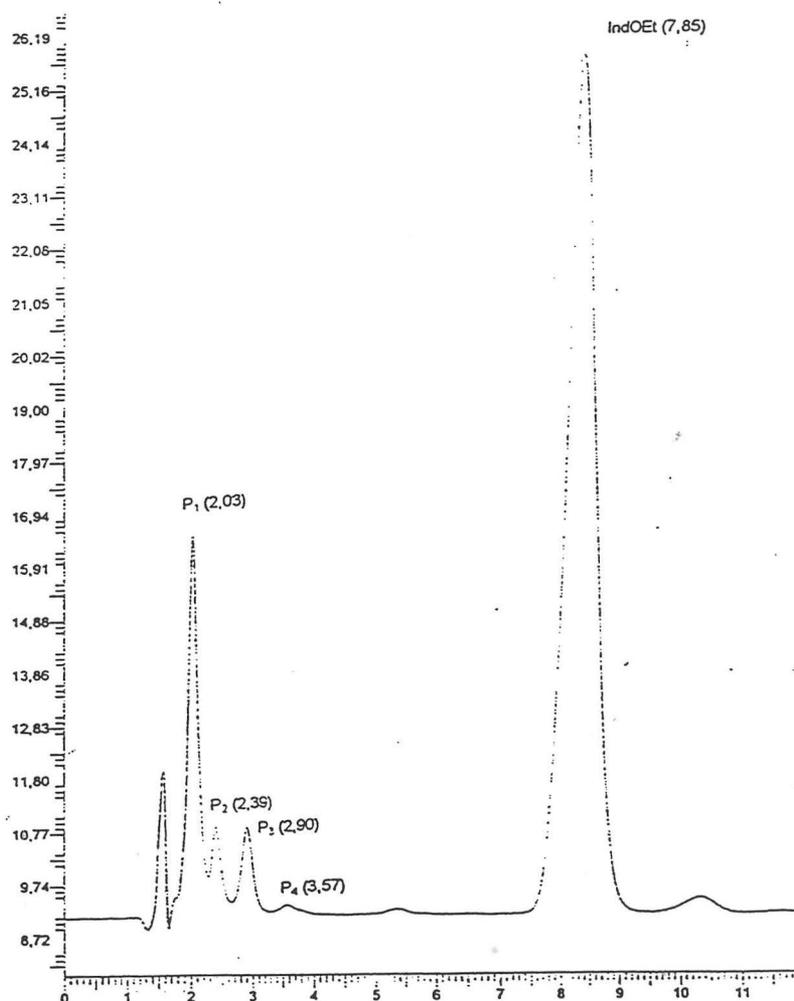


Figura 12. Cromatograma da hidrólise do éster etílico de indometacina associado a nanocápsulas. (tempo de reação 150 minutos).

O filtrado foi extraído com acetato de etila, sendo realizado uma posterior secagem e evaporação do solvente. O produto obtido, de coloração amarelo-escuro, foi analisado no sistema cromatográfico, apresentando os 4 picos observados anteriormente no cromatograma da reação, sendo que em maior proporção. Tanto o produto obtido do filtrado (majoritariamente P₁) como o precipitado branco (P₂) foram analisados por RMN de ¹H. O espectro de RMN de ¹H do P₁, extraído da reação do éster etílico de indometacina (3) em meio alcalino, evidenciou sinais característicos do ácido 5-metoxi-2-metilindol-3-acético (11) (Figura 13), com dupletos em 7,12 ppm e 7,08 ppm e um duplo-duplete em 6,68 ppm, referentes ao sistema indólico. Um singletto

em 3,78 ppm indicou os prótons da metoxila, e outros dois singletos em 3,76 e 2,34 ppm indicaram os prótons da metila e do metileno do grupo acetila, respectivamente, apresentando ainda sinais do ácido *p*-clorobenzóico (12) como impureza (Figura 13). O espectro de RMN de ^1H do P₂ apresentou um sinal característico de sistema AB aromático com deslocamentos de 8,05 ppm e 8,50 ppm, podendo-se atribuir-lhe a estrutura do ácido *p*-clorobenzóico (12), produto da hidrólise da função amida do éster etílico de indometacina (3) (Figura 14).

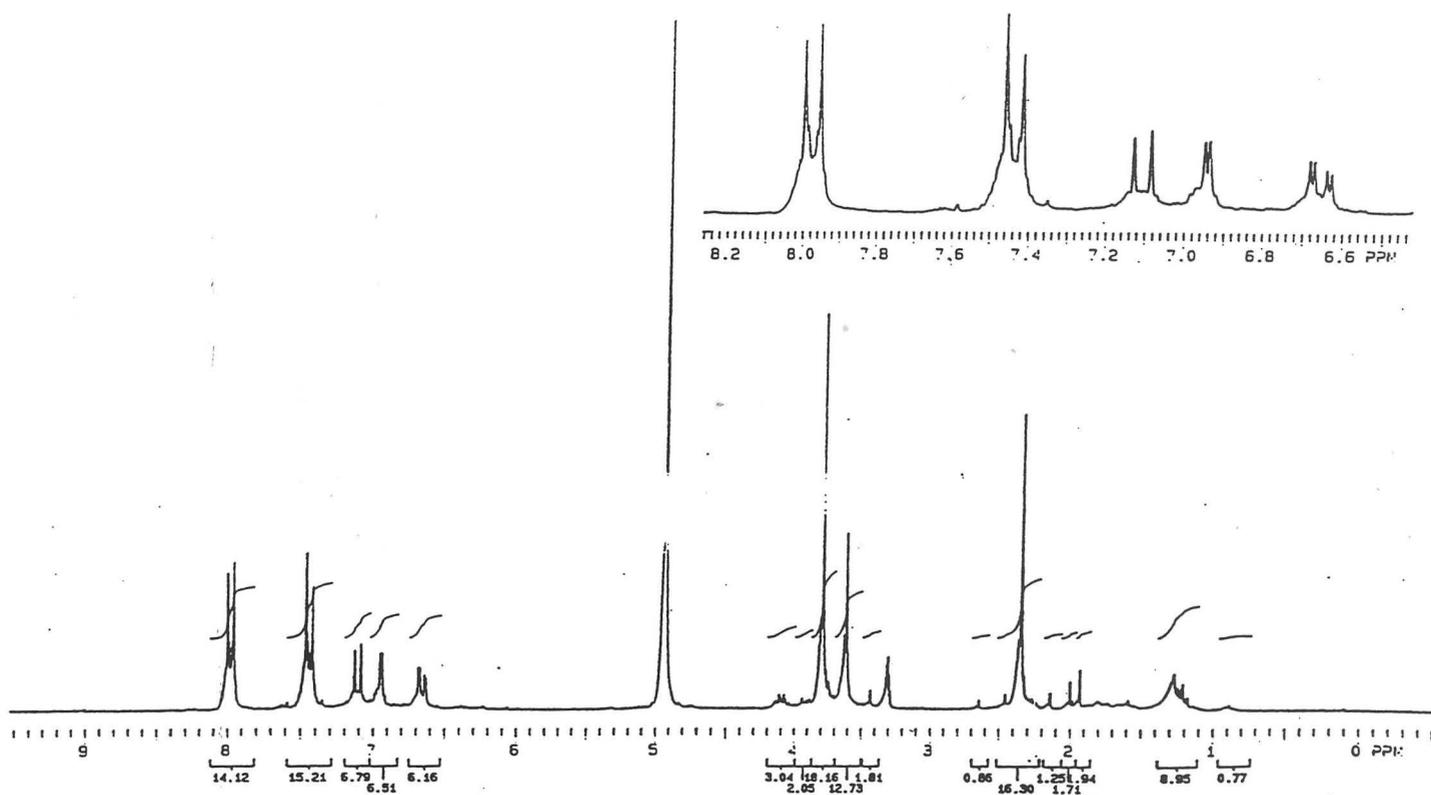


Figura 13. Espectro de RMN de ^1H do produto 1 obtido na hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina (200 MHz / CD_3OD).

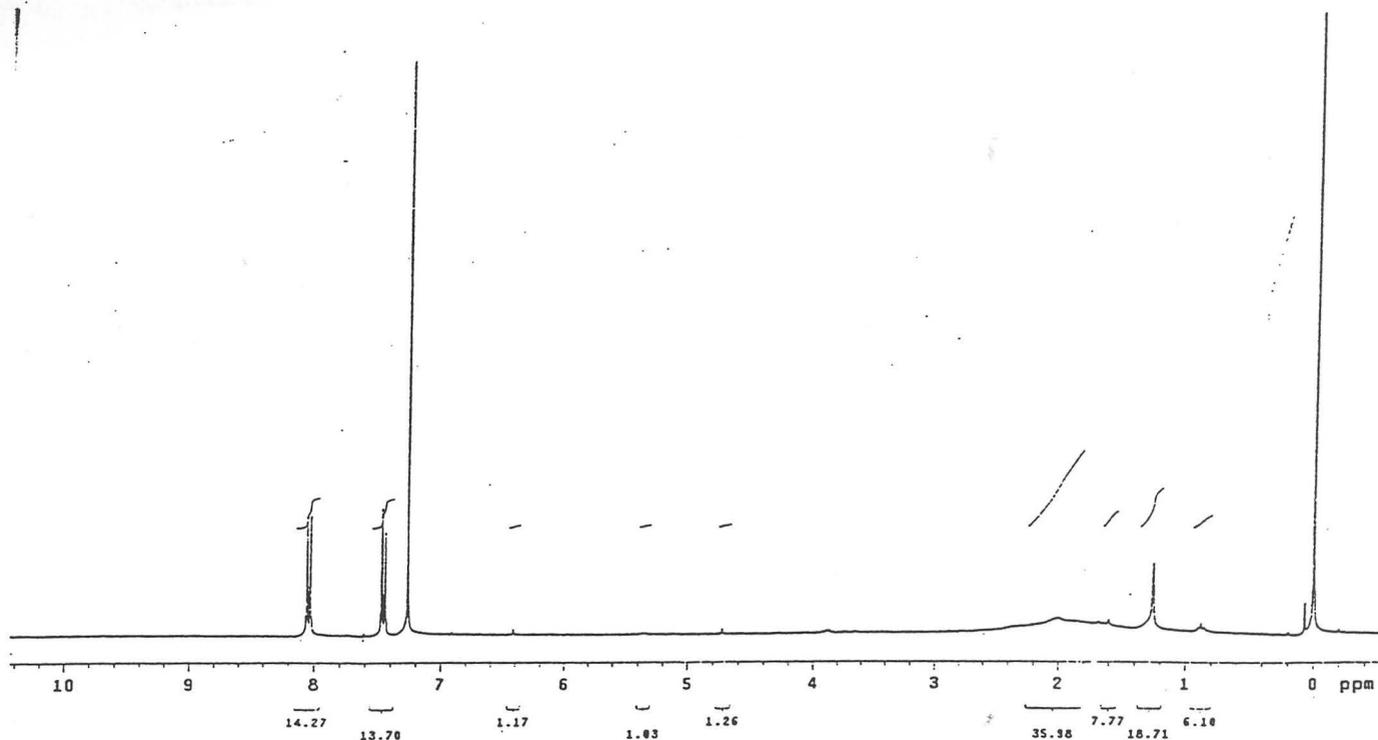


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H do produto 2 obtido na hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina (200 MHz / CD_3OD).

O produto 3 foi analisado por RMN de ^1H a partir de uma amostra que o continha em maior concentração. Foram observados dupletes em 7,11 ppm e 6,94 ppm e um duplo-duplete em 6,63 ppm referentes ao sistema indólico. Um quadruplete em 3,60 ppm e um triplete em 1,16 ppm caracterizaram o grupo etila da função éster, sendo, então, o espectro atribuído ao 5-metoxi-2-metilindol-3-acetato de etila (13) (Figura 15).

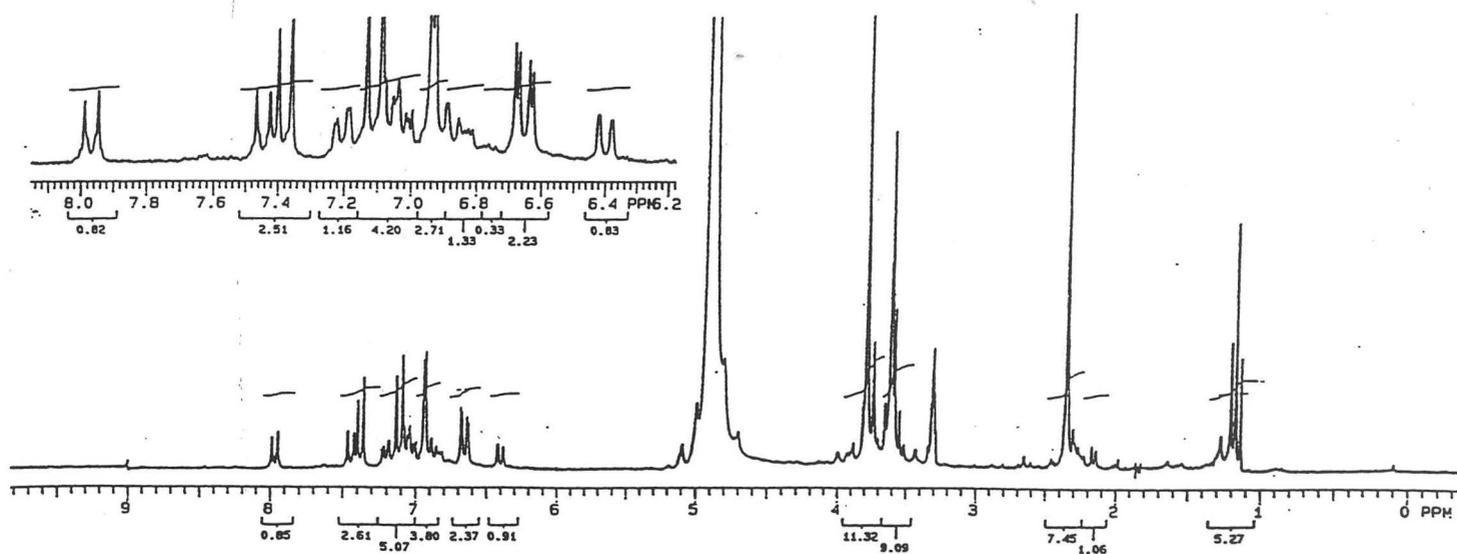
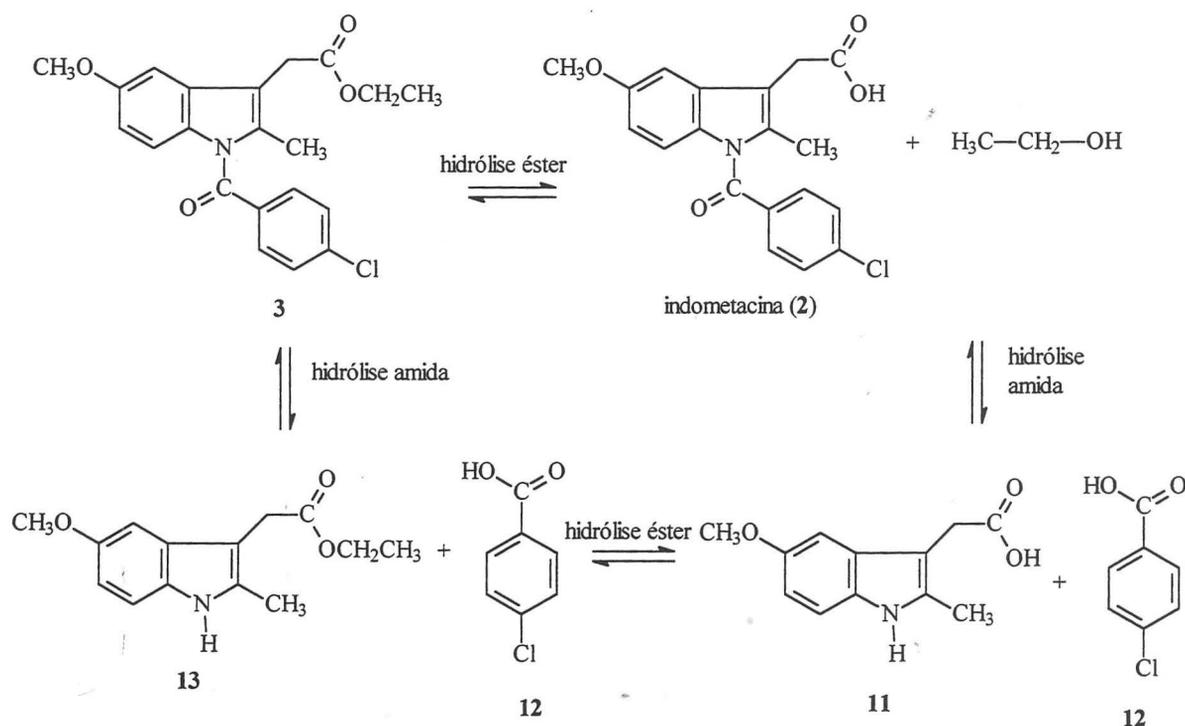


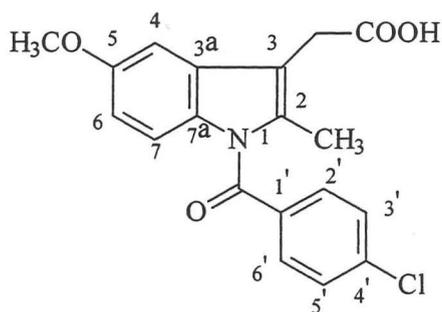
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H do produto 3 obtido na hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina (3).

Desta maneira pode-se constatar que a reação que ocorre com o éster etílico de indometacina (3) não é apenas a reação de hidrólise da função éster, produzindo etanol e indometacina (2), mas também a hidrólise da função amida. O esquema 3 mostra o esquema das substâncias geradas na reação de hidrólise do éster etílico de indometacina (3), salientando-se que os produtos em solução no meio reacional que apresentam função ácido carboxílico estarão ionizados nas correspondentes formas carboxilatos de sódio.

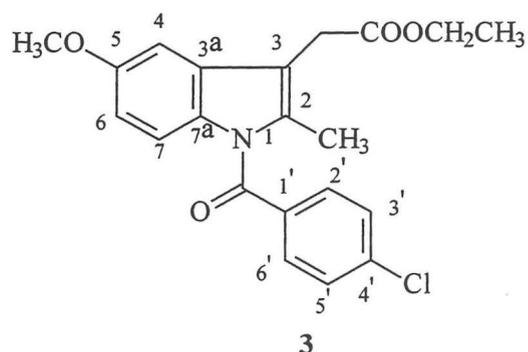


Esquema 3.

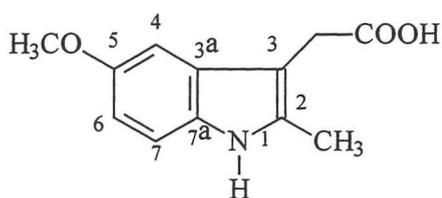
Todos os espectros de RMN de ^1H foram comparados entre si e com os espectros do padrão de indometacina (2) (Anexo 1) e do éster etílico de indometacina (3) (Anexo 2). A Tabela 11 reúne os deslocamentos químicos dos espectros de RMN de ^1H da indometacina (2), do éster etílico de indometacina (3) e dos produtos obtidos na hidrólise alcalina do éster etílico. Na figura 17 são apresentadas as estruturas das substâncias envolvidas na hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina (3), bem como a numeração utilizada na identificação dos sinais na Tabela 11.



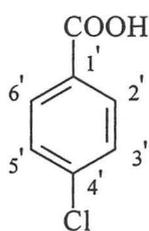
Produto 4 = 2



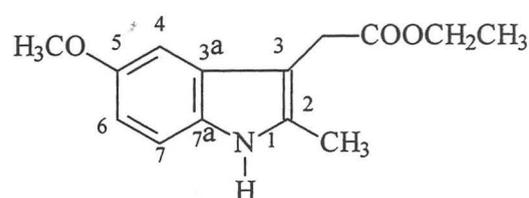
3



Produto 1 = 11



Produto 2 = 12



Produto 3 = 13

Figura 16. Estruturas das substâncias envolvidas na hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina.

Tabela 11. Comparação dos deslocamentos químicos (δ / ppm) das substâncias envolvidas na hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina (3).

Substância	Sistema AB									
	H-2'/6'	H-3'/5'	H-4	H-7	H-6	OCH ₂	OCH ₃	CH ₂	CH ₃	OCH ₂ CH ₃
IndOH	7,64	7,54	6,98	6,87	6,65	-	3,78	3,67	2,28	-
IndOEt	7,66	7,46	6,97	6,87	6,67	4,16	3,84	3,65	2,38	1,27
Produto 1	-	-	7,12	7,08	6,68	-	3,78	3,76	2,34	-
Produto 2	8,05	7,50	-	-	-	-	-	-	-	-
Produto 3	-	-	7,11	6,94	6,63	3,60	3,61	3,76	2,34	1,16

Os resultados para o consumo do éster etílico de indometacina (3) associado a nanopartículas frente a reação de hidrólise alcalina apresentaram diferentes decaimentos para nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão em função do tempo (Figura 17).

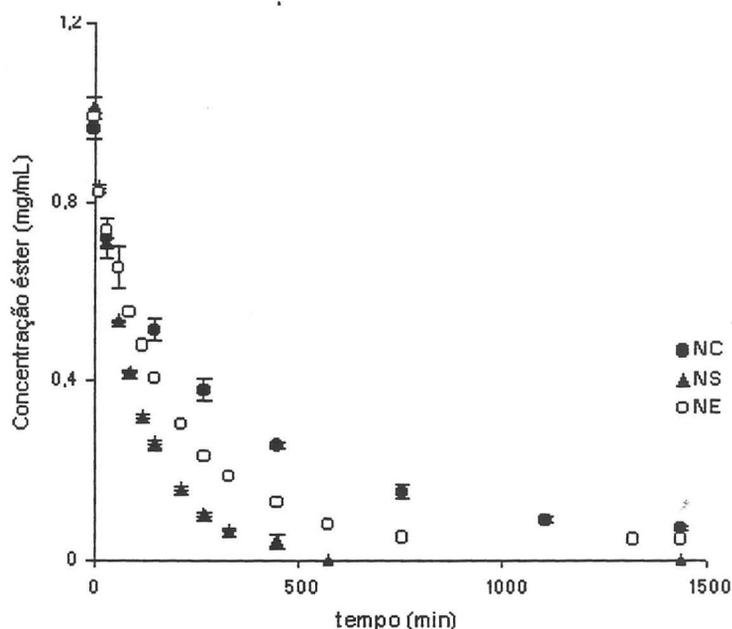


Figura 17. Perfil cinético da hidrólise do éster etílico de indometacina associado a nanopartículas.

Pelos perfis cinéticos do consumo de éster etílico (3) na hidrólise alcalina pode-se observar diferenças entre os três sistemas coloidais estudados, uma vez que para nanoesferas o consumo total de éster ocorreu nos 500 minutos, enquanto que para nanoemulsão este consumo foi até cerca de 800 minutos e para nanocápsulas, que apresentou o consumo de éster mais lento, foi até 1100 minutos.

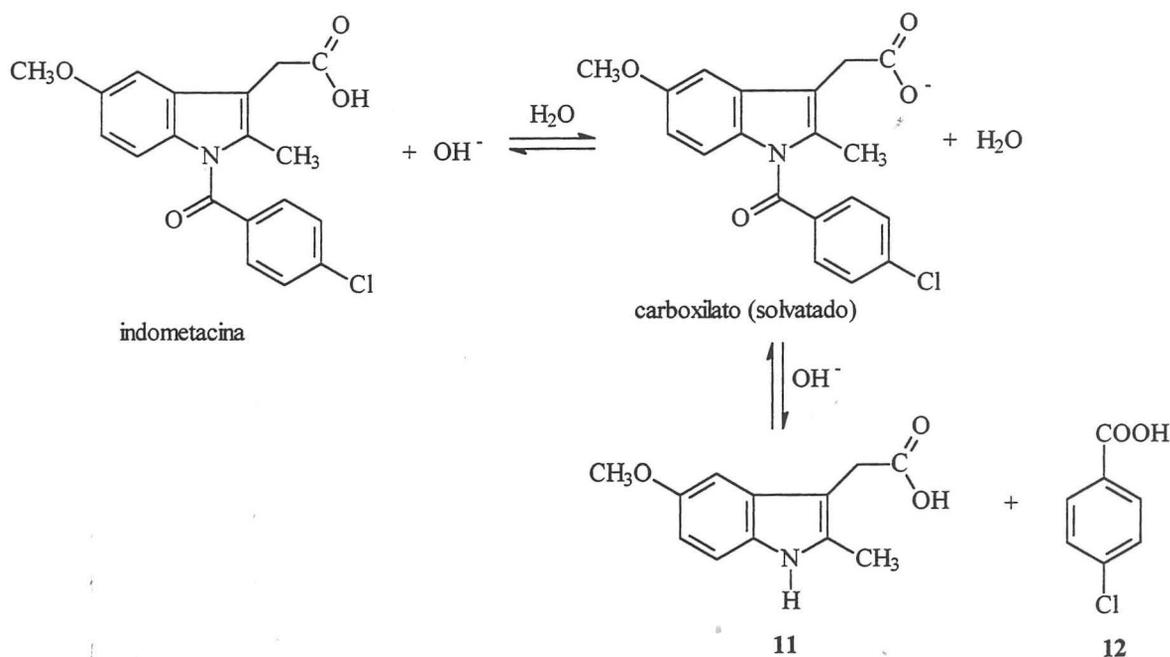
4.5.4. Hidrólise Alcalina da Indometacina (2)

Uma vez que a hidrólise de éster etílico de indometacina (3) forneceu os produtos correspondentes às cisões das ligações éster e amida, decidiu-se verificar o comportamento da indometacina (2) frente ao tratamento com NaOH aquoso (0,05 M).

A reação da indometacina (2) em solução de acetonitrila, tratada com uma solução aquosa de NaOH (0,05 M), ocorreu com consumo total do fármaco em menos de 10 minutos. A análise do cromatograma, obtido após 10 minutos da adição de base, evidenciou a formação de dois produtos, um com tempo de retenção de 2,05 minutos e outro com tempo de retenção de 2,40 minutos. Os tempos de retenção observados para estes produtos de hidrólise foram similares àqueles observados para os produtos P₁ (11) (t = 2,03 min) e P₂ (12) (t = 2,39 min) da hidrólise do éster etílico de indometacina (3). Com a finalidade de verificar a correspondência entre os

resultados da hidrólise de indometacina (2) foram realizadas duas análises: a) co-injeção dos produtos P₁ (11) e P₂ (12) isolados da reação do éster de indometacina (3) com o bruto da reação de indometacina (2) (CLAE); b) separação dos produtos da hidrólise de indometacina (2) seguida da análise dos mesmos através de RMN de ¹H.

As análises demonstraram que os dois picos, observados através de CLAE, referentes aos produtos da hidrólise alcalina de indometacina (2) correspondem a P₁ (ácido 5-metoxi-2-metilindol-3-acético) (11) e a P₂ (ácido *p*-clorobenzóico) (12) (Esquema 4).



Esquema 4

O acompanhamento, através de CLAE, da reação de hidrólise alcalina da indometacina (2) associada a NC, NS ou NE, mostrou o consumo total de indometacina (2) em 10 minutos para todas as formulações. Estes resultados sugerem que a localização da indometacina (2) nas nanopartículas ou nanoemulsão seja na interface da partícula (gotícula)/água (Figura 18). Quando os colóides aquosos, contendo indometacina (2) (localizada na interface), são tratados com NaOH (0,05 M), a reação ácido-base da indometacina (2) é deslocada para a formação do íon

carboxilato, propiciando a solubilização do fármaco no meio aquoso e conseqüentemente sua hidrólise rápida da função amida.

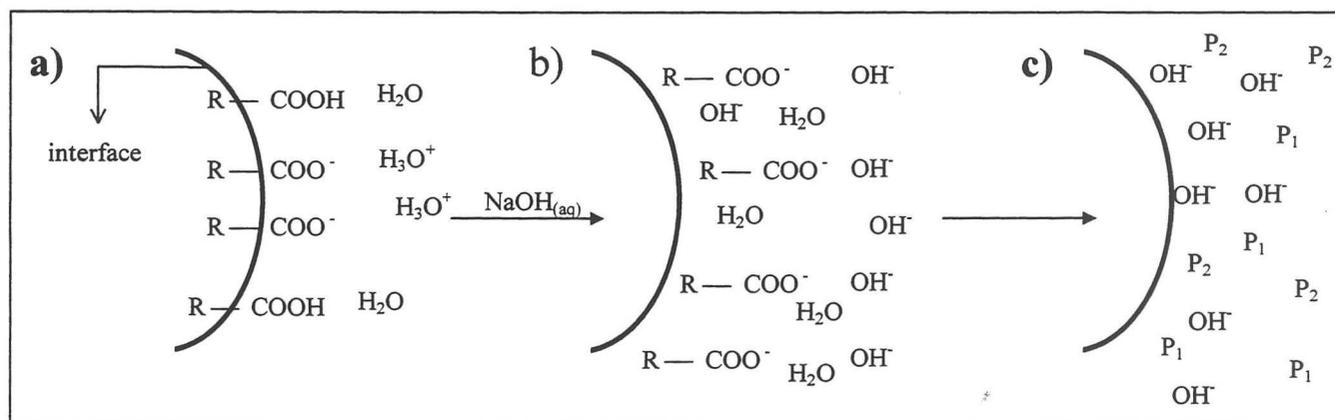


Figura 18. Representação esquemática a) Equilíbrio ácido-base da indometacina na interface partícula (gotícula)/água de NC, NS e NE; b) tratamento dos colóides aquosos com NaOH (0,05 M) e conseqüente deslocamento da reação ácido-base de indometacina (2) para a formação de ânions carboxilatos solvatados no meio aquoso; c) hidrólise da função amida do carboxilato de indometacina (2) solvatado com formação dos sais sódicos de P1 (11) e P2 (12).

4.5.5. Análise dos Resultados Cinéticos

Realizando-se o experimento de hidrólise alcalina (NaOH 0,05 M) com o éster de indometacina (3) em solução de acetonitrila (1mg/mL), observou-se o total desaparecimento do éster em 10 minutos de reação, enquanto que na reação de hidrólise deste substrato associado com os colóides pode-se observar perfis cinéticos de consumo diferentes para cada colóide, com um tempo de reação para o consumo total de 500 minutos (NS) até 1110 minutos (NC). Este resultado indicou que a velocidade de hidrólise do éster associado aos colóides pudesse ser determinada pela difusão das espécies químicas envolvidas na reação. Para a verificação desta hipótese, os resultados experimentais foram avaliados à luz do modelo matemático de difusão de Higuchi, que determina uma curva linear de f_t (Equação 18) contra raiz quadrada do tempo t para os fenômenos difusivos (Figura 19).

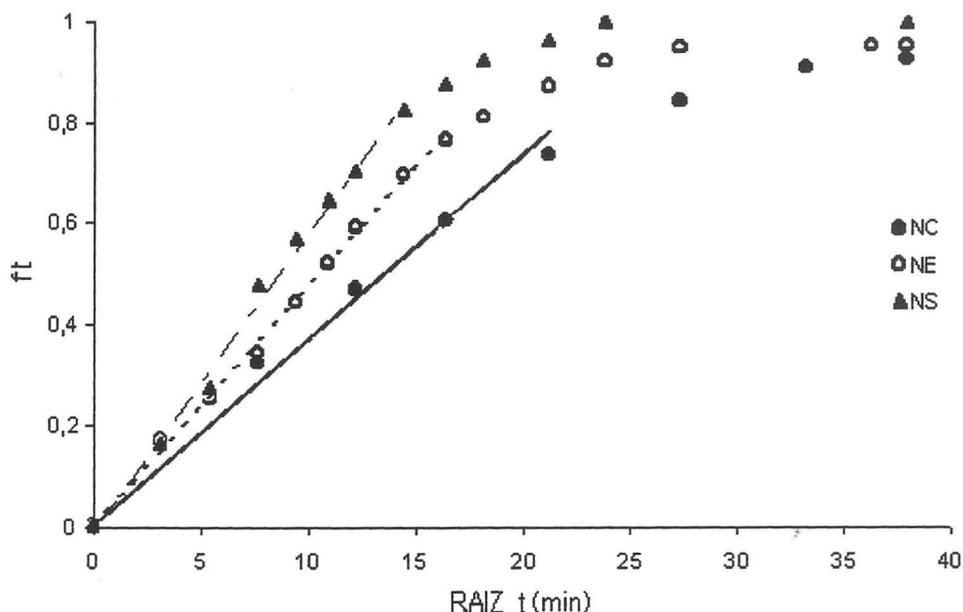


Figura 19. Tratamento de Higuchi para a hidrólise do éster etílico de indometacina (2) (NC)

A curva de Higuchi para o experimento de hidrólise em nanoesferas evidenciou linearidade até o tempo de 210 minutos, o qual corresponde a uma concentração de éster consumido de $0,813 \pm 0,021$ mg/mL. Para o experimento de nanoemulsão, a linearidade ocorreu até o tempo de 270 minutos, até que $0,759 \pm 0,019$ mg/mL do éster fossem consumidos, e para nanocápsulas a linearidade foi comprovada até o tempo de 450 minutos, apresentando um consumo de éster de $0,708 \pm 0,017$ mg/mL. Nos três sistemas observou-se um comportamento difusivo, seguindo o modelo de Higuchi, para o consumo de éster de indometacina (3) entre 70 % e 80 %. Além disso, tal processo de difusão é mais lento para nanocápsulas do que para nanoemulsão, e mais rápido para nanoesferas, evidenciando diferenças nestes sistemas. Tal diferença pode ser explicada, considerando-se o IndOEt associado ao polímero nas NS, dissolvido no óleo na NE e nas NC, sendo que nestes sistemas o polímero pode ser poroso.

O fenômeno estudado pode ser ainda observado a luz da Lei da Potência, onde a equação do modelo ($f_t = a t^n$ Equação 19), pode ser modelada para a obtenção das curvas f_t em função do tempo para os três sistemas, bem como a obtenção dos parâmetros a e n . Para o sistema contendo nanoesferas a curva calculada até o ponto de 450 minutos teve um bom ajuste aos pontos experimentais, sendo o coeficiente de correlação $r = 0,992 \pm 0,001$ e o critério de seleção do modelo $MSC = 3,86 \pm 0,20$. Os parâmetros obtidos para nanoesferas foram $a = 0,078 \pm 0,010$ e n

= $0,436 \pm 0,022$. Para a nanoemulsão o ajuste também foi adequado, apresentando um coeficiente de correlação $r = 0,992 \pm 0,001$ e $MSC = 3,88 \pm 0,17$, enquanto que os parâmetros obtidos para estes sistema foram $a = 0,070 \pm 0,008$ e $n = 0,414 \pm 0,020$. Finalmente, para nanocápsulas, o ajuste apresentou $r = 0,998 \pm 0,001$ e $MSC = 5,25 \pm 0,38$, enquanto os parâmetros $a = 0,0739 \pm 0,019$ e $n = 0,373 \pm 0,040$. Os valores individuais para a modelagem em triplicata e os gráficos obtidos para as médias são apresentados na tabelas 12, 13 e 14 e nas figuras 20, 21 e 22, respectivamente. Através do coeficiente de correlação (r), e do critério de seleção do modelo observa-se o ajuste muito adequado dos pontos experimentais ao modelo da Lei da Potência, e para os três sistemas foram obtidos expoentes de liberação (n) próximos do valor teórico de 0,43, o qual descreve um fenômeno de transporte Fickiano da sonda molecular a partir de um sistema de liberação com geometria esférica⁵⁰.

Tabela 12. Parâmetros da modelagem matemática utilizando a Lei da Potência para a hidrólise alcalina em nanoesferas.

parâmetro	NS ₁	NS ₂	NS ₃	MD ^a NS	DP ^b NS
r	0,994	0,992	0,992	0,992	0,001
MSC	4,100	3,740	3,760	3,860	0,200
a	0,090	0,072	0,092	0,078	0,010
n	0,411	0,451	0,398	0,436	0,022

^a MD = média; ^b DP = desvio padrão

Tabela 13. Parâmetros da modelagem matemática utilizando a Lei da Potência para a hidrólise alcalina em nanoemulsão.

parâmetro	NE ₁	NE ₂	NE ₃	MD ^a NE	DP ^b NE
r	0,993	0,991	0,993	0,992	0,001
MSC	3,980	3,675	3,980	3,880	0,170
a	0,060	0,073	0,077	0,070	0,008
n	0,438	0,408	0,398	0,414	0,020

^a MD = média; ^b DP = desvio padrão

Tabela 14. Parâmetros da modelagem matemática utilizando a Lei da Potência para a hidrólise alcalina em nanocápsula.

parâmetro	NC ₁	NC ₂	NC ₃	MD ^a NC	DP ^b NC
r	0,998	0,999	0,998	0,998	0,001
MSC	5,040	5,690	5,020	5,250	0,380
a	0,060	0,065	0,096	0,073	0,019
n	0,402	0,390	0,327	0,373	0,040

^a MD = média; ^b DP = desvio padrão

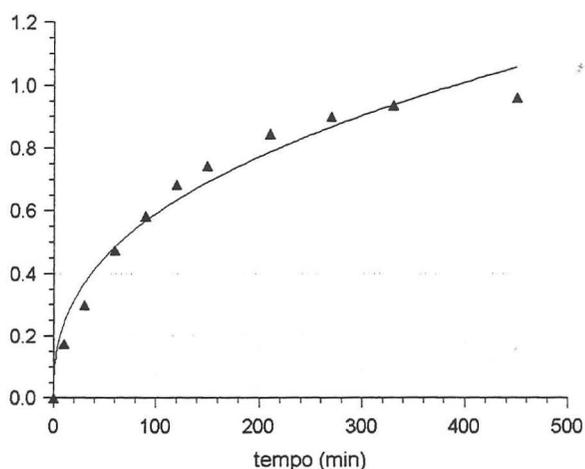


Figura 20. Ajuste dos dados experimentais da hidrólise de IndOEt para NS ao modelo da Lei da Potência.

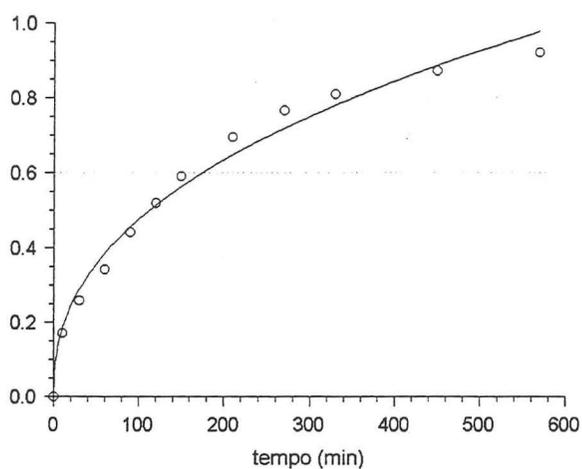


Figura 21. Ajuste dos dados experimentais da hidrólise de IndOEt para NE ao modelo da Lei da Potência.

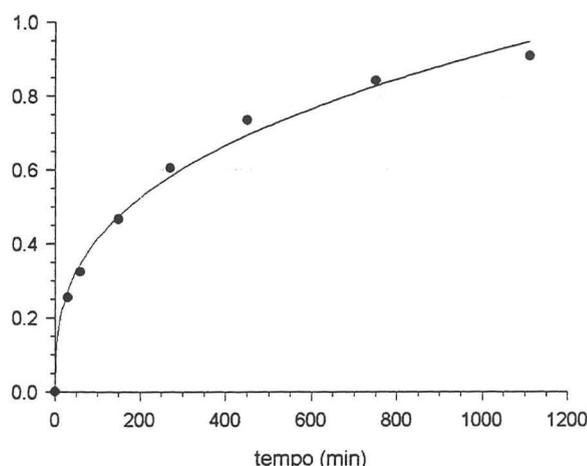


Figura 22. Ajuste dos dados experimentais da hidrólise de IndOEt para NC ao modelo da Lei da Potência.

4.5.6. Diâmetro de Nanopartículas Durante Reação de Hidrólise Alcalina

O processo de hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina (3) associado a nanopartículas é governado por um processo difusivo. A sobreposição de dois mecanismos aparentemente independentes (Fickiana e Transporte caso-II) descreve em muitos casos o inchamento dinâmico do polímero e a liberação do fármaco⁵⁰, e assim poderia-se levantar a hipótese de ocorrência de inchamento das estruturas durante a reação. Para responder esta questão, os diâmetros dos três sistemas (NC, NE e NS) foram medidos por espalhamento de luz dinâmico durante a reação com hidróxido de sódio.

Tal experimento demonstrou a manutenção do diâmetro efetivo das nanoestruturas durante o tempo de consumo total do éster etílico de indometacina (3) nos colóides, sendo este tempo de 8 horas para nanoesferas, 12 horas para nanoemulsão e 24 horas para nanocápsulas. Nas figuras 23, 24 e 25, são apresentados os diâmetros efetivos das partículas. As curvas de polidispersão indicam ainda que todos os sistemas são monodispersos, e se mantêm monodispersos durante todo o tempo da reação. Sendo assim, este experimento a serviu de base para descartar a hipótese de ocorrência de inchamento ou ainda erosão dos nanosistemas poliméricos, nanocápsulas ou nanoesferas, durante a reação de hidrólise alcalina, sugerindo que a difusão determina a velocidade da reação.

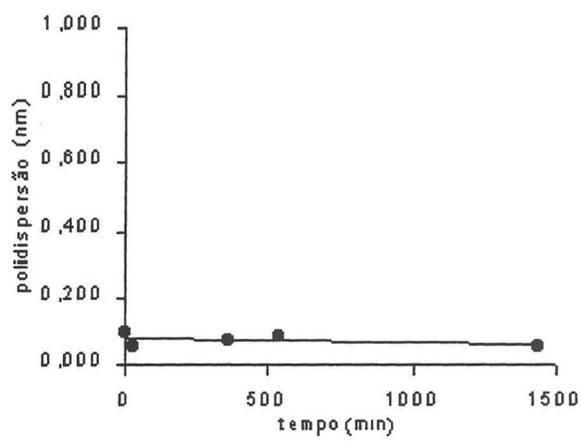
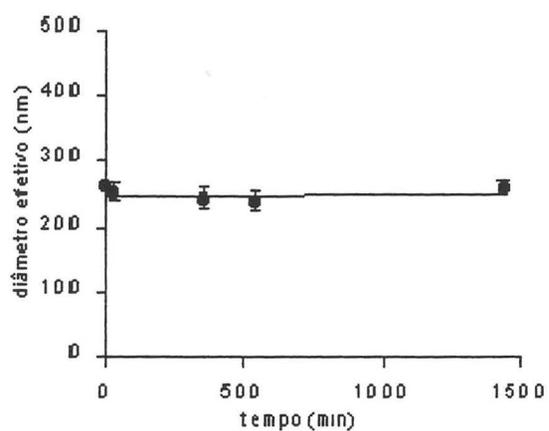


Figura 23. Diâmetro efetivo (nm) e polidispersão das partículas para NC durante 24 horas da hidrólise alcalina.

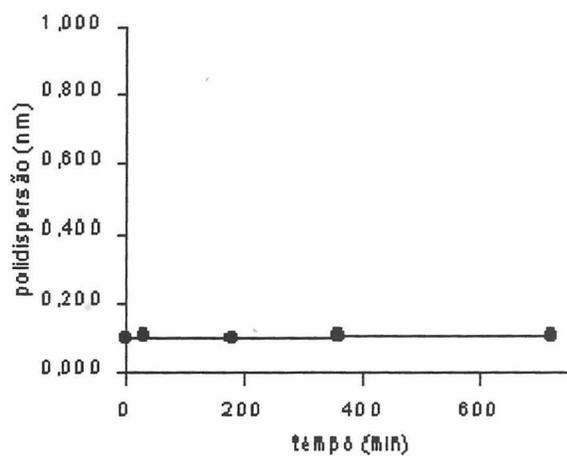
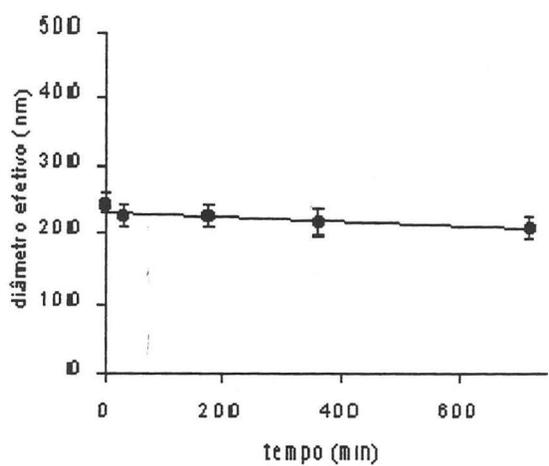


Figura 24. Diâmetro efetivo (nm) e polidispersão das gotículas para NE durante 12 horas da hidrólise alcalina.

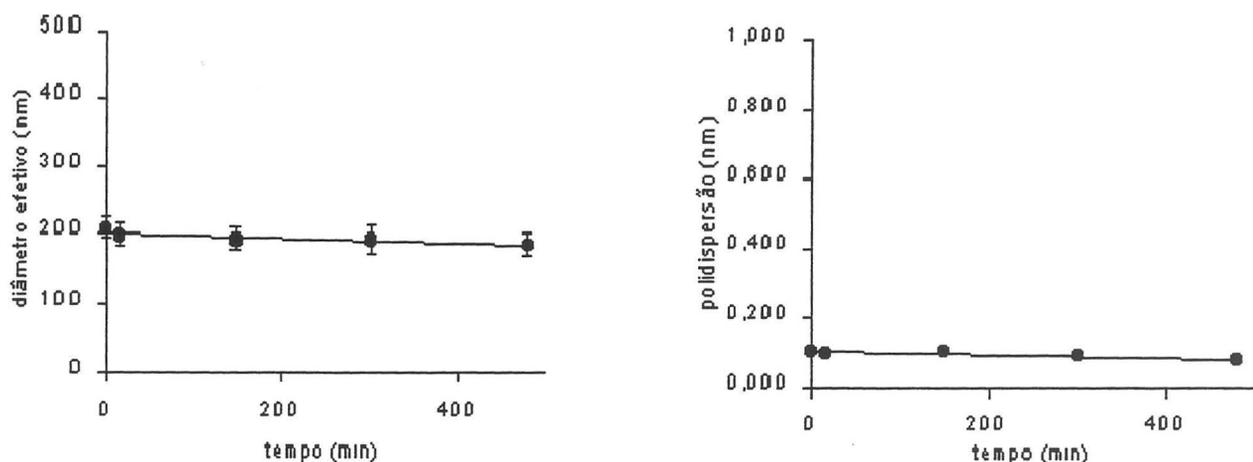


Figura 25. Diâmetro efetivo (nm) e polidispersão das partículas para NS durante 8 horas da hidrólise alcalina.

O mesmo experimento de medida de diâmetro de partícula durante a reação de hidrólise alcalina foi realizado para nanosferas, nanoemulsão e nanocápsulas contendo indometacina (2). Como a reação de indometacina (2) em meio alcalino foi muito rápida nos três sistemas, conduziu-se o experimento de medida de diâmetro por até 30 minutos, não sendo observadas alterações no diâmetro efetivo e na polidispersão para nenhum dos sistemas. A manutenção do diâmetro de partícula nestes sistemas é evidenciado nas Figuras 26,27 e 28.

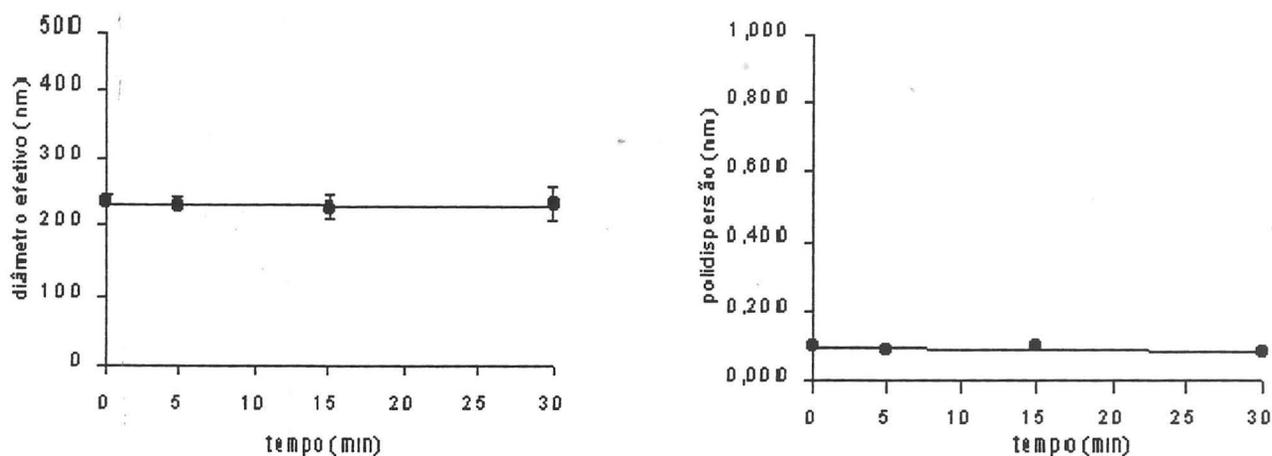


Figura 26. Diâmetro efetivo (nm) e polidispersão para NE de indometacina por 30 minutos em meio alcalino.

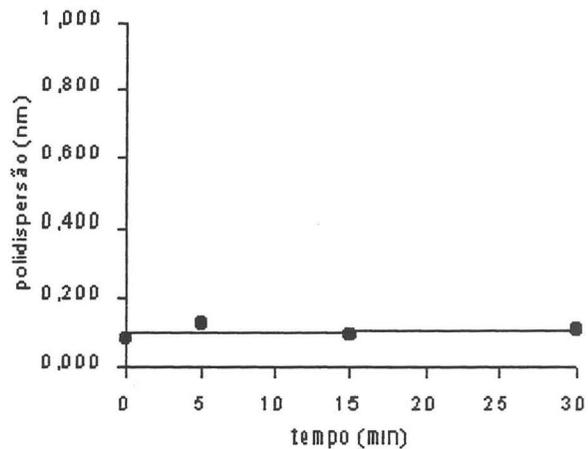
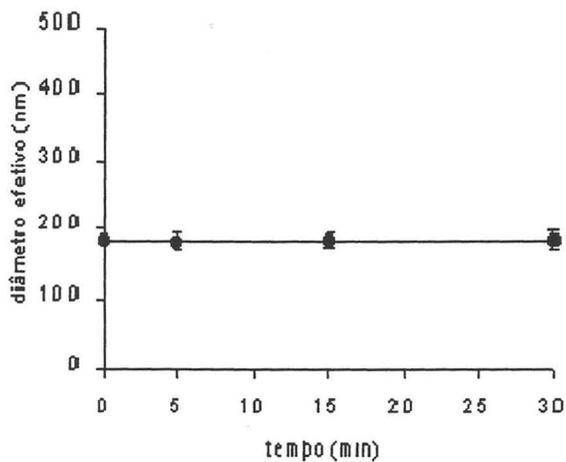


Figura 27. Diâmetro efetivo (nm) e polidispersão para NS de indometacina por 30 minutos em meio alcalino.

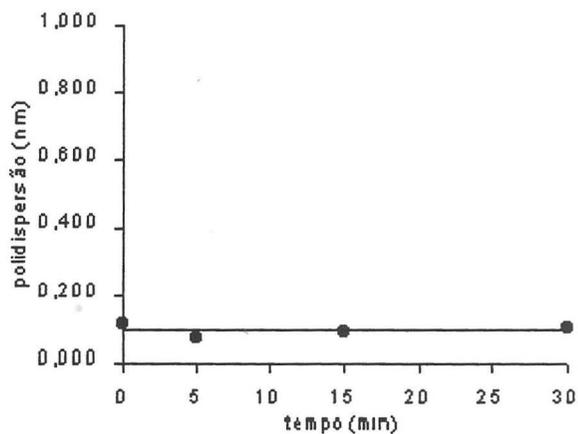
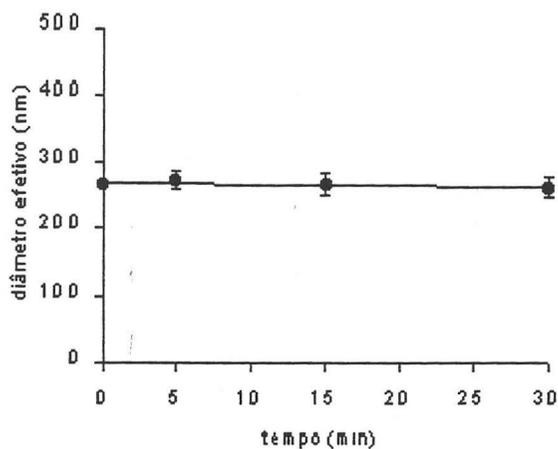


Figura 28. Diâmetro efetivo (nm) e polidispersão para NC de indometacina por 30 minutos em meio alcalino.

4.5.7. Modelagem Matemática dos Perfis de Hidrólise Alcalina

Com base nos resultados obtidos nas reações de hidrólise do éster etílico de indometacina associado aos colóides realizou-se o ajuste dos pontos experimentais a uma equação monoexponencial, que fornece apenas uma constante cinética para o processo, ou ainda a uma equação biexponencial, constituídas pela adição de dois termos monoexponenciais, a qual fornece duas constantes cinéticas.

Para o experimento com nanoesferas, modelou-se todos os pontos obtidos até o tempo de 450 minutos, enquanto que para os experimentos com nanoemulsão e com nanocápsulas utilizou-se todos os pontos até 750 e 1440 minutos, respectivamente, uma vez que os pontos além destes tempos apresentaram concentrações próximas ao consumo total de éster e menores que o limite de quantificação do método analítico. As constantes cinéticas e os parâmetros calculados para o experimento de hidrólise do éster etílico de indometacina (3) associado a nanoesferas estão reunidos na tabela 15.

Tabela 15. Parâmetros a e b, e constantes cinéticas k_1 e k_2 para estudo cinético de IndOEt (3) associado a NS.

1 ° experimento (n=3)					
Nanoesferas I (biexponencial)	1	2	3	Média calculada	SD
k_1 (min ⁻¹)	0,0164	0,0763	0,0262	0,0396	0,0321
k_2 (min ⁻¹)	0,0061	0,0069	0,0065	0,0065	0,0040
a (mg/mL)	0,4452	0,1751	0,2345	0,2849	0,1419
b (mg/mL)	0,5310	0,8197	0,7498	0,7001	0,1506
r	0,998	0,988	0,995	0,994	0,005
MSC	4,979	2,976	3,965	3,973	1,002
Nanoesferas I (monoexponencial)	1	2	3	Média calculada	SD
k (min ⁻¹)	0,0089	0,0081	0,0081	0,0084	0,0005
r	0,993	0,984	0,992	0,990	0,0050
MSC	1,500	2,702	3,505	2,569	1,0090
2 ° experimento (n=3)					
Nanoesferas II (biexponencial)	1	2	3	Média calculada	SD
k_1 (min ⁻¹)	0,1345	0,0099	0,0159	0,0534	0,0703
k_2 (min ⁻¹)	0,0079	2,6.10 ⁻¹⁸	0,0063	0,0047	0,0042
a (mg/mL)	0,1821	0,9187	0,3987	0,4998	0,3786
b (mg/mL)	0,8588	0,0387	0,5654	0,4876	0,4155
r	0,998	0,995	0,997	0,997	0,002
MSC	4,790	4,088	4,443	4,440	0,351
Nanoesferas II (monoexponencial)	1	2	3	Média calculada	SD
k (min ⁻¹)	0,0089	0,0088	0,0088	0,0088	0,0001
r	0,990	0,989	0,994	0,991	0,003
MSC	3,080	2,610	3,017	2,902	0,255

Os experimentos de hidrólise do éster associado a NS foram repetidos no intuito de diminuir os erros verificados nos parâmetros calculados para equação biexponencial. Para a escolha do modelo matemático deve-se também analisar graficamente os ajustes, sendo os gráficos correspondentes ao experimento de hidrólise do éster associado a nanoesferas apresentados na figura 29.

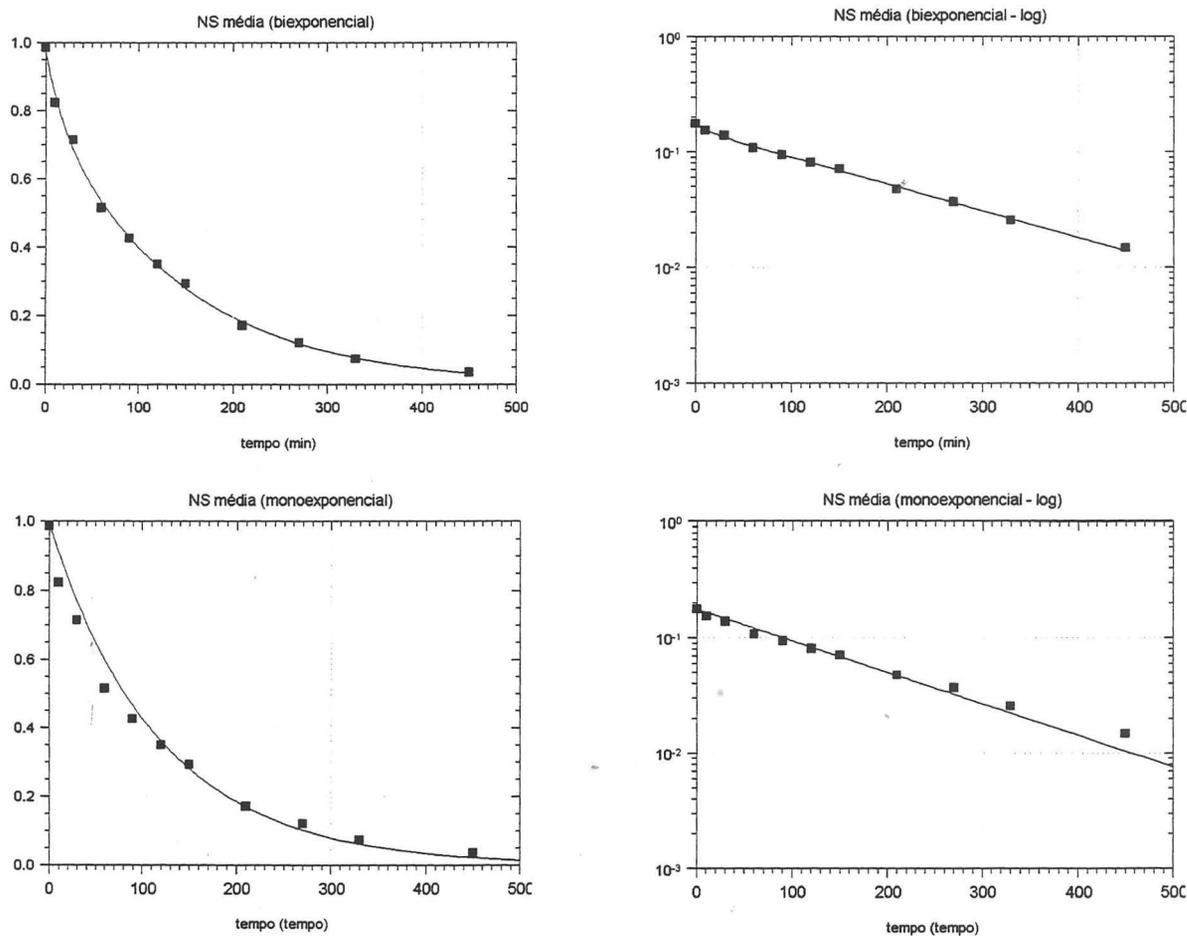


Figura 29. Modelagem de equações mono e biexponencial para éster etílico de indometacina (3) associado a nanoesferas (ordenadas em mg/mL de IndOEt e respectivos log conc.).

Pela análise dos ajustes nos gráficos, dos coeficientes de correlação e dos parâmetros MSC poderia-se escolher o modelo biexponencial para descrever a cinética de hidrólise do éster nas nanoesferas, no entanto, observando-se os erros descritos em k_1 e nos parâmetros a e b , verifica-se que o experimento não tem resolução para tempos inferiores a 15 minutos, o que seria

necessário para melhor descrever este perfil cinético. Desta forma, optou-se descrever o perfil cinético monoexponencial para a hidrólise alcalina do éster de indometacina (3) associado a nanoesferas, que apresentou coeficiente de correlação de 0,99.

Para a escolha do modelo matemático dos perfis cinéticos da hidrólise alcalina do éster associado a NE e NC observou-se o ajuste gráfico dos pontos experimentais ao modelo calculado, assim como os parâmetros calculados (Tabelas 16 e 17 e figuras 30 e 31). Os pontos representam os valores experimentais e as linhas correspondem ao modelo calculado. Todas as curvas são referentes à média dos experimentos, e ao lado são apresentadas as curvas com o logaritmo da concentração.

Tabela 16. Parâmetros a e b, e constantes cinéticas k_1 e k_2 para estudo cinético de IndOEt associado a NE.

Nanoemulsão (biexponencial)	1	2	3	Média Calculada	SD
k_1 (min^{-1})	0,0095	0,0095	0,0086	0,0092	0,0004
k_2 (min^{-1})	0,0032	0,0026	0,0028	0,0029	0,0003
a (mg/mL)	0,5419	0,5659	0,5304	0,5460	0,018
b (mg/mL)	0,3712	0,3801	0,3826	0,3779	0,0059
r	0,989	0,994	0,990	0,991	0,003
MSC	3,277	3,910	3,356	3,514	0,345

Nanoemulsão (monoexponencial)	1	2	3	Média calculada	SD
k (min^{-1})	0,0050	0,0053	0,0052	0,0052	0,0001
r	0,987	0,985	0,988	0,987	0,002
MSC	1,500	1,490	1,507	1,499	0,009

Tabela 17. Parâmetros a e b, e constantes cinéticas k1 e k2 para estudo cinético de IndOEt associado a NC.

Nanocápsulas (biexponencial)	1	2	3	Média Calculada	SD
k_1 (min ⁻¹)	0,0102	0,0254	0,0255	0,0204	0,0088
k_2 (min ⁻¹)	0,0015	0,0018	0,0015	0,0016	0,0002
a (mg/mL)	0,4040	0,3055	0,3809	0,3635	0,0514
b (mg/mL)	0,5387	0,6357	0,5544	0,5763	0,0521
r	0,990	0,985	0,987	0,987	0,003
MSC	3,034	2,561	2,767	2,787	0,237

Nanocápsulas (monoexponencial)	1	2	3	Média calculada	SD
k (min ⁻¹)	0,0028	0,0030	0,0031	0,0030	0,0002
r	0,975	0,978	0,961	0,971	0,009
MSC	1,018	0,720	0,110	0,616	0,463

Para os sistemas de nanocápsulas e nanoemulsão o modelo escolhido foi o biexponencial, pois estes apresentaram valores maiores MSC (Critério de Seleção do Modelo) e maiores coeficientes de correlação. Ainda apresentaram um melhor ajuste gráfico e constantes cinéticas médias com baixos desvios padrões para as modelagens individuais.

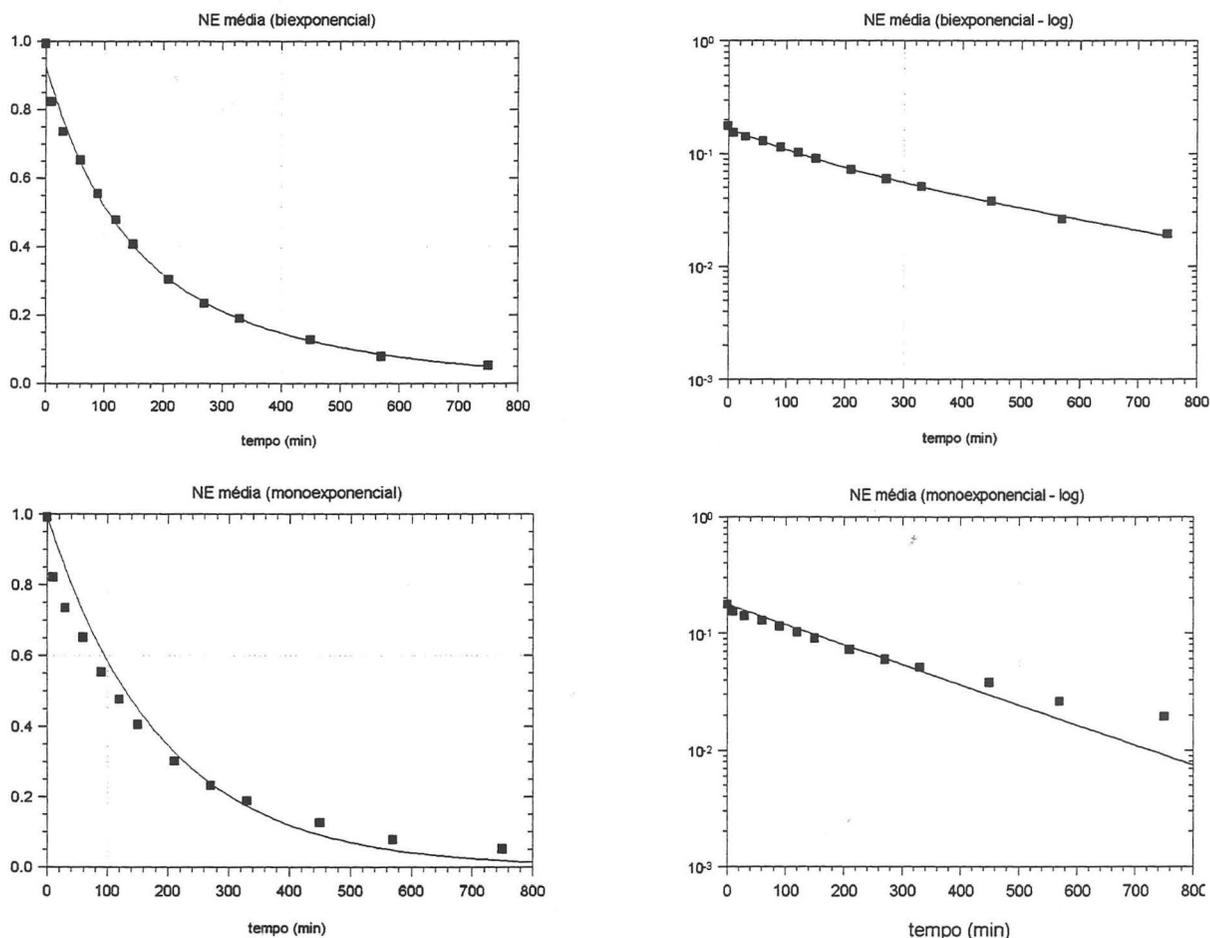


Figura 30. Modelagem de equações mono e biexponencial para nanoemulsão. (ordenadas em mg/mL de IndOEt e respectivos log conc.)

Desta forma, para nanocápsulas e nanoemulsão, são obtidas duas constantes cinéticas observadas k_1 e k_2 , enquanto para nanoesferas obteve-se uma única constante cinética observada k . O processo difusivo, evidenciado pelo modelo da Lei da Potência, deve reunir contribuições de dois processos difusivos, uma vez que a cinética química desta transformação não é a velocidade determinante do consumo do substrato. Ainda, segundo o tratamento clássico de Fick, processos difusivos são dependentes da massa molecular da espécie difundida, bem como da constante de permeabilidade da membrana de difusão.

Desta maneira poder-se-ia atribuir a constante cinética k_1 (NC ou NE) à etapa de difusão da espécie de menor massa molecular presente no sistema, ou seja, ao ânion hidroxila, que difunde do meio contínuo para a interface das partículas. Também pode ser observado que este processo de difusão do ânion hidroxila é mais rápido em nanocápsulas ($k_1 = 0,0204 \pm 0,0088$) do que em

nanoemulsão ($k_1 = 0,0095 \pm 0,0004$). Esta diferença pode estar relacionada com a porosidade da parede polimérica, permitindo a rápida difusão da hidroxila para o seu interior. Quando compara-se estes resultados com aqueles obtidos para a formulação de NS, observa-se que a difusão de hidroxila é mais rápida nas NS, tanto que o experimento não tem resolução para determiná-la.

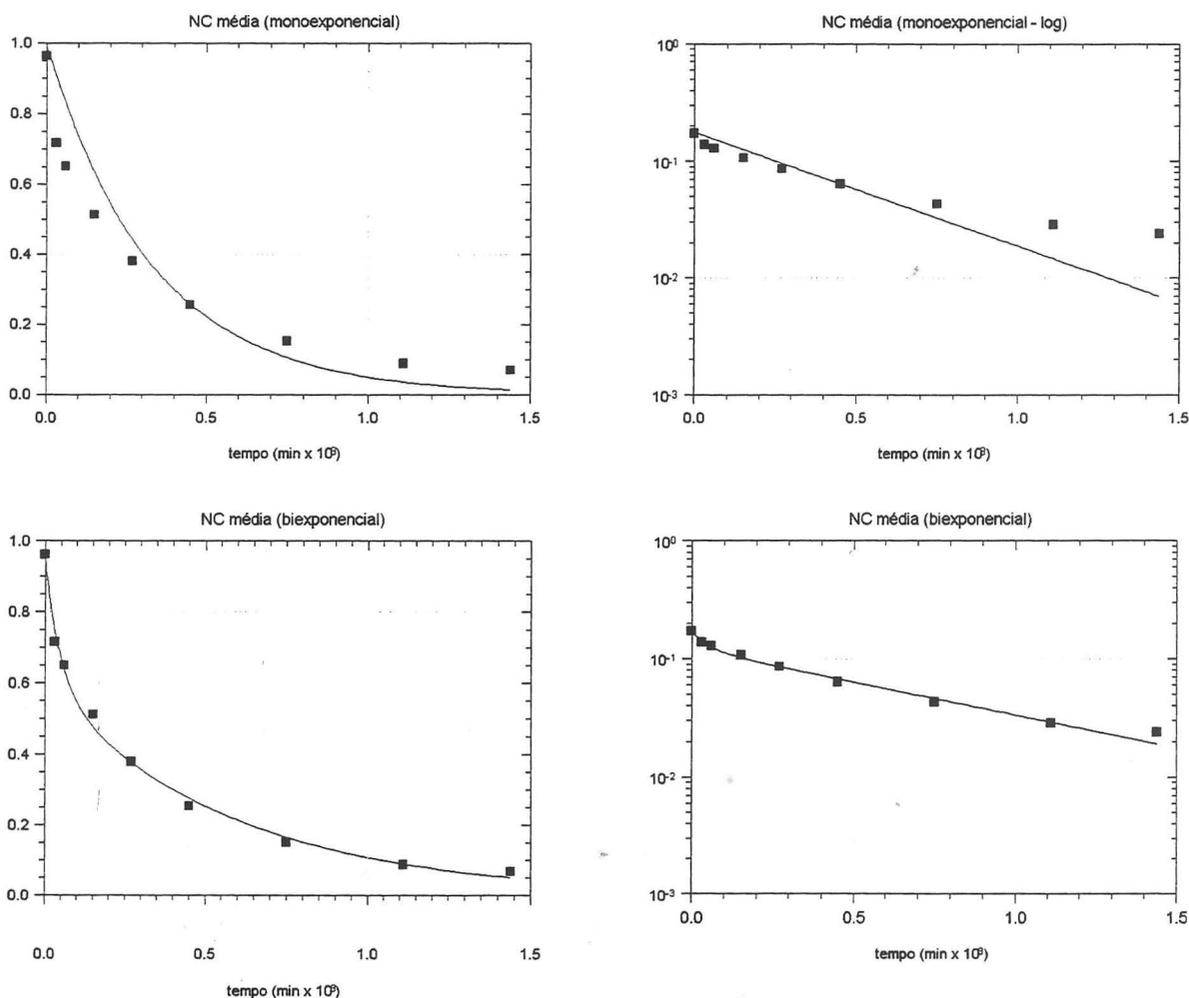


Figura 31. Modelagem de equações mono e biexponencial para nanocápsulas. (ordenadas em mg/mL de IndOEt e respectivos log conc.)

Da mesma forma, tanto para nanocápsulas como para nanoemulsão, k_2 deve estar relacionada ao processo difusivo do éster de indometacina (3). (Figura 32).

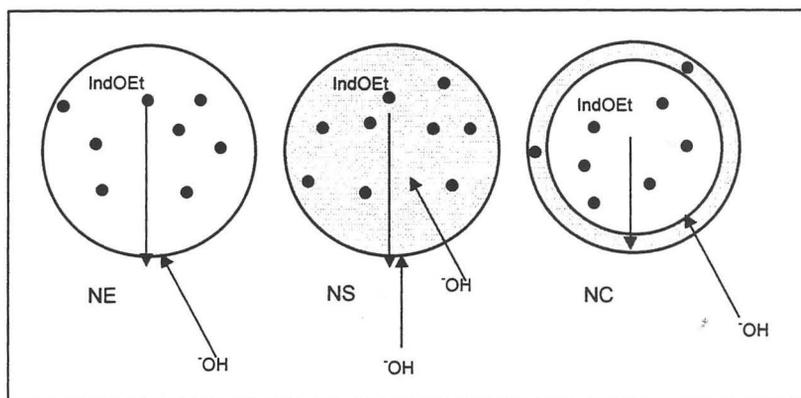


Figura 32. Representação esquemática dos processos difusivos envolvidos na hidrólise do éster de indometacina associado a nanocápsulas (NC), nanoesferas (NS) e nanoemulsão (NE).

Quanto à interpretação para os parâmetros a e b , pode-se admitir que correspondam às concentrações de éster etílico de indometacina (3) nas pseudo-fases em cada sistema. Para nanoemulsão, cujo sistema foi modelado pela equação biexponencial, observa-se dois parâmetros a e b ($a = 0,5460 \pm 0,018$ e $b = 0,3779 \pm 0,0059$), presumindo-se uma localização do éster etílico de indometacina distribuída por toda a gotícula, sendo a concentração inicial de éster etílico na interface gotícula/água de 0,55 mg/mL. Por outro lado, para nanocápsulas os parâmetros calculados a e b foram $a = 0,3635 \pm 0,0514$ e $b = 0,5763 \pm 0,0521$, sugerindo uma concentração inicial de éster de indometacina (3) na interface partícula/água de 0,36 mg/mL e a concentração inicial de éster de indometacina (3) na interface óleo/polímero de 0,58 mg/mL. No caso de nanoesferas, para o modelo monoexponencial, a velocidade de difusão da hidroxila, sendo muito rápida, não é determinante da velocidade do consumo de IndOEt (3) e depende apenas da concentração de IndOEt (3) e da área superficial do sistema. Este experimento não possibilita fazer-se uma distinção da interface polímero/água em NS, sugerindo que estas nanoesferas são altamente porosas, proporcionando uma grande área superficial ao sistema.

Em trabalho anterior¹⁷, foi proposto que nanoesferas preparadas com PCL e monoestearato de sorbitano são estruturas nanométricas, nas quais o polímero e este surfactante formam um sistema bifásico (figura 33a). Tal modelo foi proposto através de análises de DSC⁷, nas quais observou-se

as temperaturas de fusão de ambos os componentes (monoestearato de sorbitano e PCL), adicionado dos dados de um estudo comparativo de espalhamento de luz dinâmico¹⁷, demonstrando que a interface de NS e NC, compostas de PCL, monoestearato de sorbitano e óleo mineral (núcleo das NC) são semelhantes quanto às suas características de interação com o solvente (água). Estes estudos haviam sido realizados para explicar as diferenças de comportamento na secagem por aspersão de suspensões de NC e de NS, nas quais havia-se observado através de microscopia eletrônica de varredura para as NS a diminuição do tamanho de partícula de NS (60-90 nm), quando comparado com o diâmetro hidrodinâmico determinado por PCS (180-200 nm). Com este dado, associado à grande difusão do éster etílico de indometacina (3) em nanoesferas, poder-se-ia supor uma estrutura (33b) na qual várias nanopartículas menores (de 60 a 90 nm) constituiriam a nanoesfera de diâmetro hidrodinâmico de aproximadamente 200 nm.

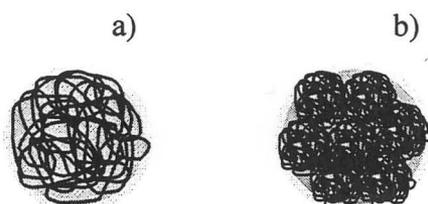


Figura 33. a) modelo de nanoesfera, preparada com PCL e monoestearato de sorbitano estabilizada com polissorbato 80¹⁷, b) modelo do agregado de nanopartículas poliméricas (PCL) estabilizado com monoestearato de sorbitano e polissorbato 80.

Tal hipótese pode ser refutada com base nos experimentos de medida de diâmetro efetivo durante a hidrólise alcalina, uma vez que o diâmetro efetivo de nanoesferas permaneceu constante durante a hidrólise, e ainda não foi constatado o surgimento de uma população de partículas com diâmetro menor, sendo desta forma aceita como mais provável a estrutura a da Figura 34.

Assim, este trabalho é pioneiro no estudo da difusão de uma sonda lipofílica associada a sistemas nanoparticulados a partir do acompanhamento de uma reação de hidrólise. Sendo tais reações de hidrólise muito rápidas em solução, o presente estudo evidenciou o mecanismo difusivo como mecanismo predominante no consumo do éster etílico de indometacina associado

aos sistemas nanométricos, sendo descrita pela primeira vez a modelagem destes perfis de difusão (consumo de sonda) em termos das equações clássicas de Higuchi e da Lei da Potência para sistemas nanoparticulados. As constantes e os parâmetros cinéticos sugerem que a difusão Fickiana da sonda é o mecanismo principal pelo qual o substrato é consumido (reação), e, ainda, que este mecanismo ocorre a partir de estruturas perfeitamente esféricas. O emprego dessa reação de hidrólise também propiciou a diferenciação dos comportamentos dos sistemas estudados: nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão, assim como possibilitou a proposição dos modelos de associação da indometacina e de seu éster etílico às partículas (NC, NS) ou gotículas (NE).

5. CONCLUSÕES

A preparação do éster etílico de indometacina, empregando-se condições clássicas de esterificação, foi realizada com rendimento de 80 % e alto grau de pureza (99,24 %, CLAE), tendo sido o produto caracterizado por métodos espectroscópicos usuais.

O método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência foi validado, obtendo-se curvas de calibração lineares na faixa de 1,00 a 25,00 $\mu\text{g/mL}$, com coeficientes de correlação acima de 0,9980 para a indometacina e acima de 0,9995 para o éster etílico. A exatidão do método, avaliada frente a amostras controle, situou-se entre $107,29 \pm 0,81$ % a $93,46 \pm 2,36$ % para a indometacina, e $106,89 \pm 3,90$ % a $98,11 \pm 4,09$ % para o éster. Os coeficientes de variação (CV %) intra-dia e inter-dia não excederam o valor de 6,18 % para a indometacina e o valor de 6,82 % para o éster etílico.

A estimativa dos coeficientes de partição da indometacina e de seu éster etílico mostraram a lipofilicidade do éster etílico em relação à indometacina, uma vez que o mesmo apresentou maior log P frente às fases água, tampão 4,0 e tampão 7,4, o que corresponde a uma menor afinidade da substância pelas fases aquosas experimentadas.

A preparação dos sistemas coloidais, nanocápsulas (NC), nanoesferas (NS) e nanoemulsão (NE), contendo indometacina ou seu éster etílico, através do método da nanoprecipitação de polímero pré-formado ou emulsificação espontânea, foram alcançadas com êxito, apresentando diâmetro de partícula inferior a 400 nm. As concentrações totais do éster de indometacina situaram-se entre 0,963 mg/mL e 0,992 mg/mL e as concentrações do éster de indometacina associado aos sistemas NC, NS e NE, correspondem às concentrações totais, uma vez que as concentrações de éster livre foram menores que $1\mu\text{g/mL}$ para todas as formulações.

O éster etílico de indometacina se mostrou estável por 12 horas frente aos meios intestinal e gástrico simulados, e por 24 horas frente ao plasma humano, uma vez que não foi observado diminuição da concentração inicial do éster durante estes intervalos de tempo.

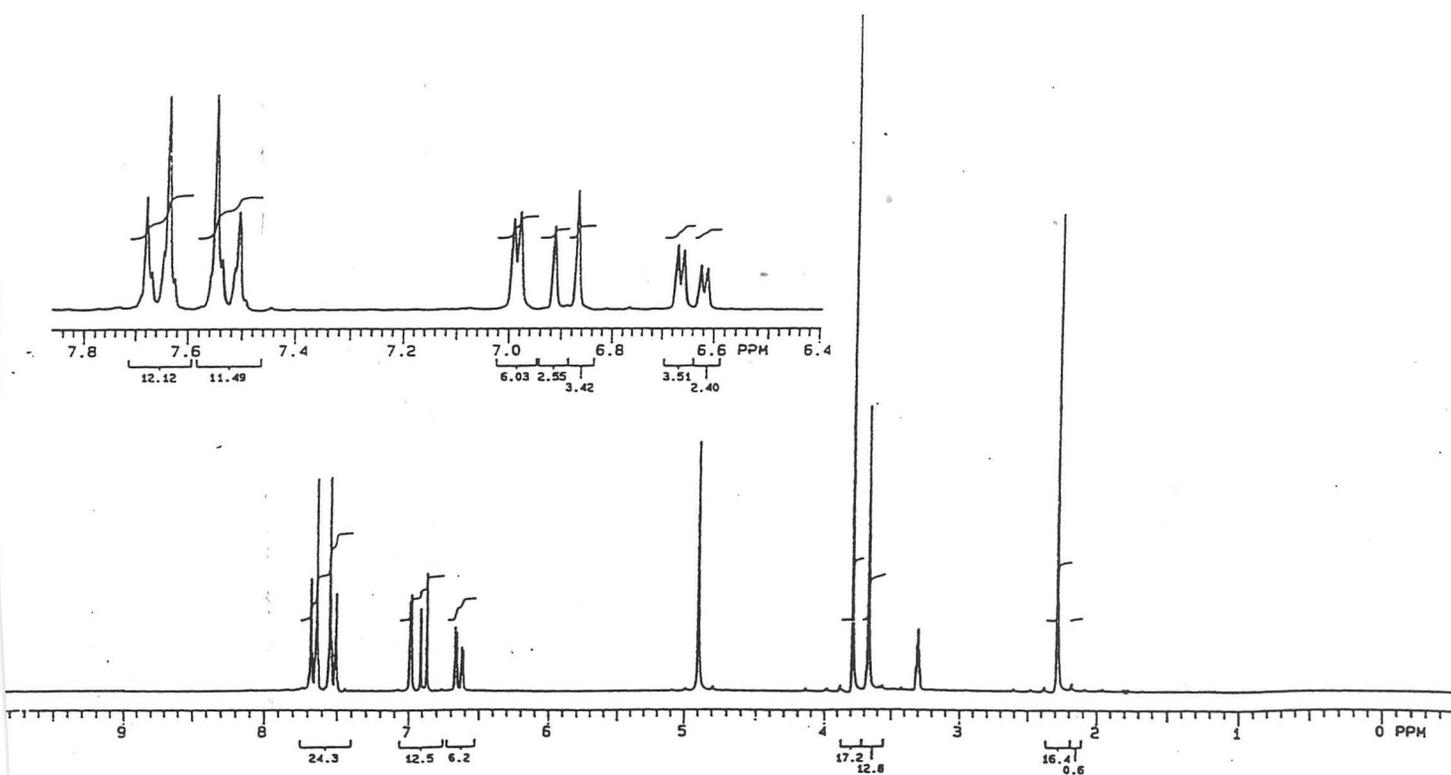
O estudo cinético da hidrólise alcalina do éster etílico associado a nanopartículas demonstrou evidente diferença entre as velocidades de reação para NC, NS e NE, demonstrando ser uma sonda apropriada para pesquisar a supraestrutura destes sistemas. Através da pesquisa cinética pode-se levantar várias conclusões, tais como, o fato de que a reação de hidrólise (NaOH 0,05 M) em nanopartículas, nas condições empregadas, pode ser acompanhada de 10 a 1440 minutos, enquanto que em solução de acetonitrila a totalidade do éster foi consumida em menos de 10

minutos. O isolamento e análise (RMN do ^1H) dos produtos de reação evidenciaram a formação de quatro produtos correspondentes ao ácido *p*-clorobenzoico, o ácido 5-metoxi-2-metilindol-3-acético, o 5-metoxi-2-metilindol-3-acetato de etila e a indometacina. Desta forma, foi possível estabelecer que ambas funções éster e amida são hidrolizadas durante a reação.

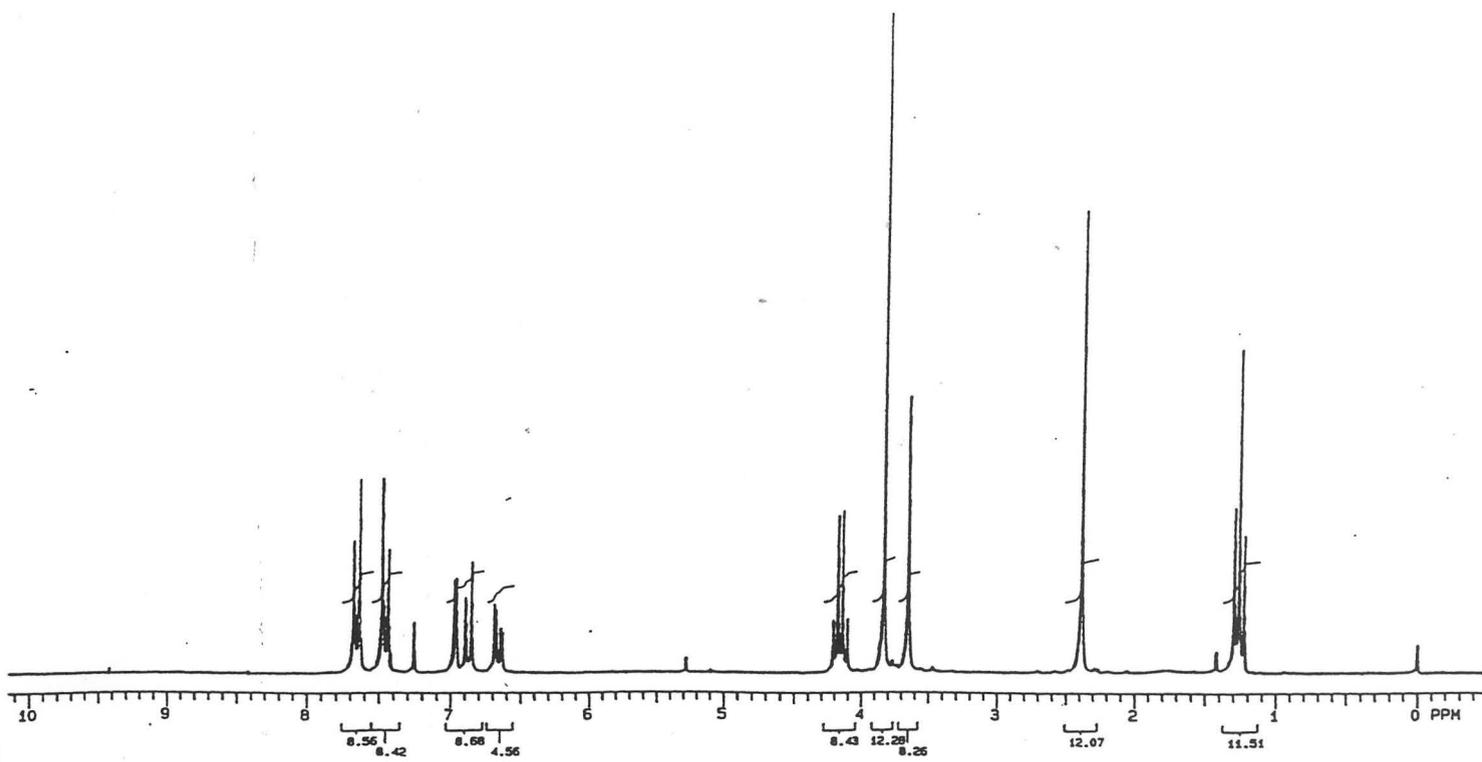
Como a velocidade da reação química envolvida no processo é muito rápida foi levantada a hipótese de que o mecanismo da hidrólise do éster associado a nanopartículas deveria ser governado por uma etapa lenta de difusão das espécies reatantes. Tal hipótese foi confirmada pela aplicação dos modelos de Higuchi e da Lei da Potência, através dos quais foram obtidas curvas lineares para o fator de concentração f em função da raiz quadrada do tempo e a determinação do coeficiente de liberação (n) muito próximo de 0,43 que também evidenciou o processo difusivo de liberação da sonda molecular a partir de uma matriz de geometria esférica. Uma modelagem matemática foi realizada, onde os pontos experimentais de cada sistema foram ajustados a equações mono e biexponenciais. Conclui-se, através da modelagem, que as cinéticas acompanhadas para os sistemas NC e NE são descritas por um processo biexponencial, e portanto o processo difusivo é controlado por duas constantes cinéticas k_1 e k_2 , sendo que para os dois sistemas k_1 é maior que k_2 (NC $k_1 = 0,0240 \pm 0,0088 \text{ min}^{-1}$ $k_2 = 0,0016 \pm 0,0002 \text{ min}^{-1}$, enquanto que para NE $k_1 = 0,0092 \pm 0,0004 \text{ min}^{-1}$ e $k_2 = 0,0029 \pm 0,0003 \text{ min}^{-1}$). Pode-se propor que a constante cinética k_1 para NC e NE corresponde à difusão da espécie de menor massa presente no meio reacional, ou seja, o ânion hidroxila, enquanto a constante k_2 nestes sistemas corresponde à difusão do éster de indometacina. Para NS o modelo mais adequado para descrever os dados experimentais foi a equação monoexponencial, fornecendo apenas uma constante cinética $k = 0,0089 \pm 0,0001 \text{ min}^{-1}$, que corresponde a difusão do éster de indometacina.

Finalmente, os dados experimentais das reações de hidrólise de indometacina associada a NC, NS ou NE mostraram o consumo total do fármaco, através da hidrólise da função amida, após o tempo de 10 minutos de reação. Desta forma, foi possível propor os modelos de forma de associação da indometacina e de seu éster etílico aos colóides. A indometacina estaria preferencialmente localizada na interface partícula ou gotícula/água, enquanto que o seu éster estaria disperso ou dissolvido nas partículas ou gotículas dos colóides.

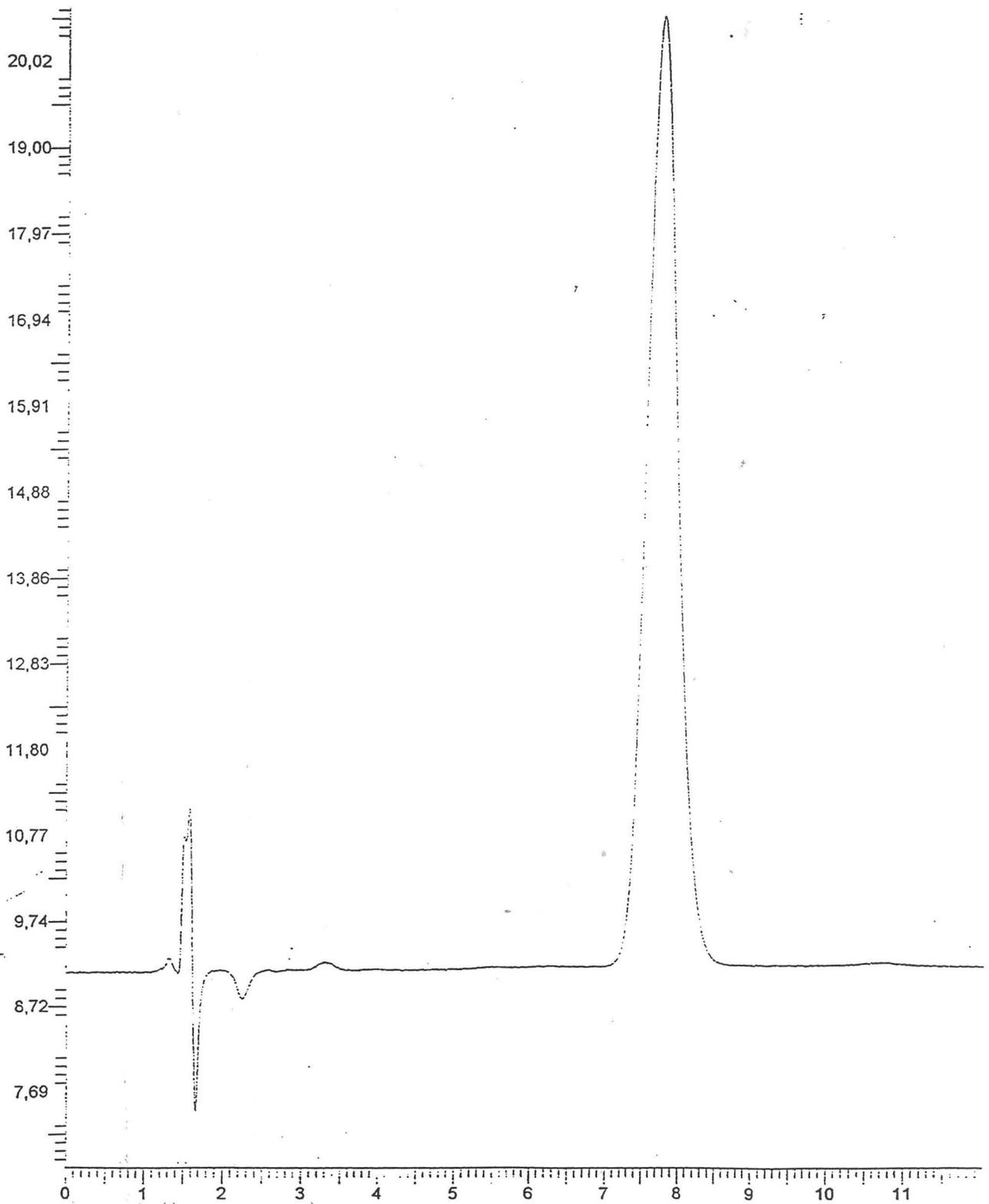
6 ANEXOS



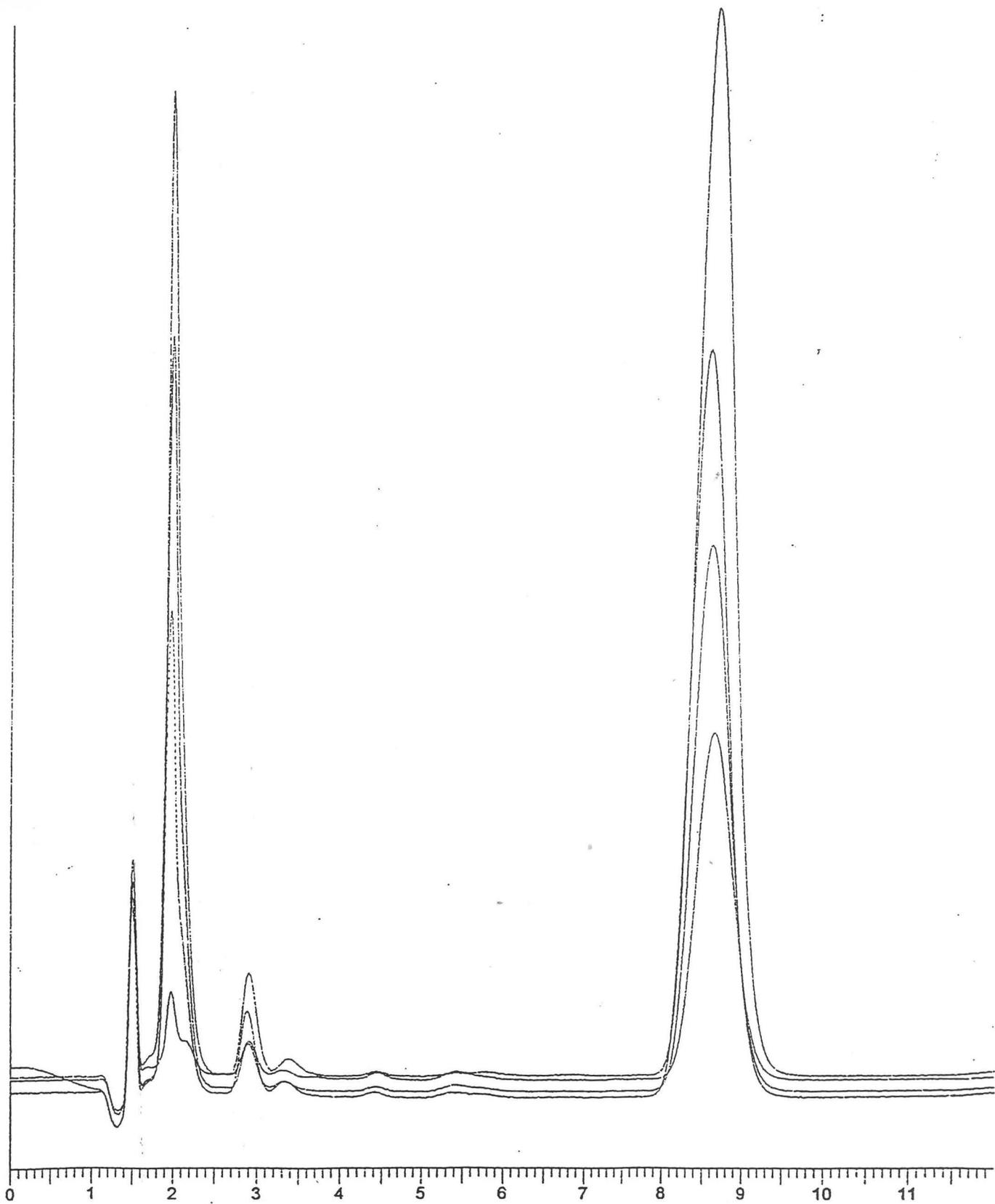
Anexo 1. Espectro de RMN de ^1H do padrão de indometacina.



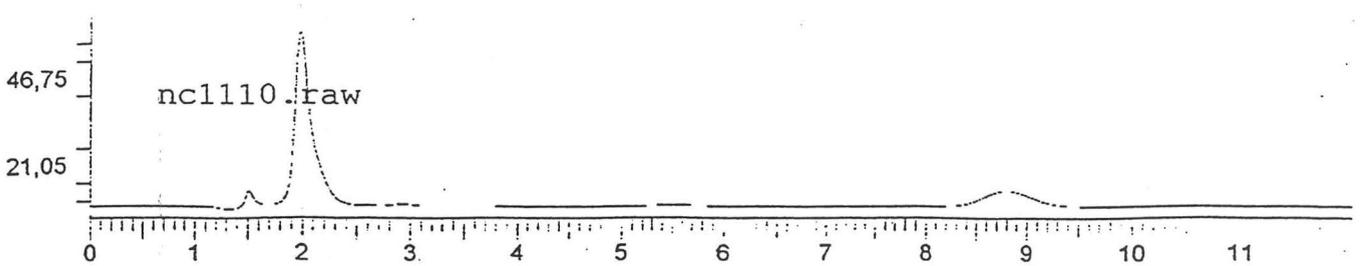
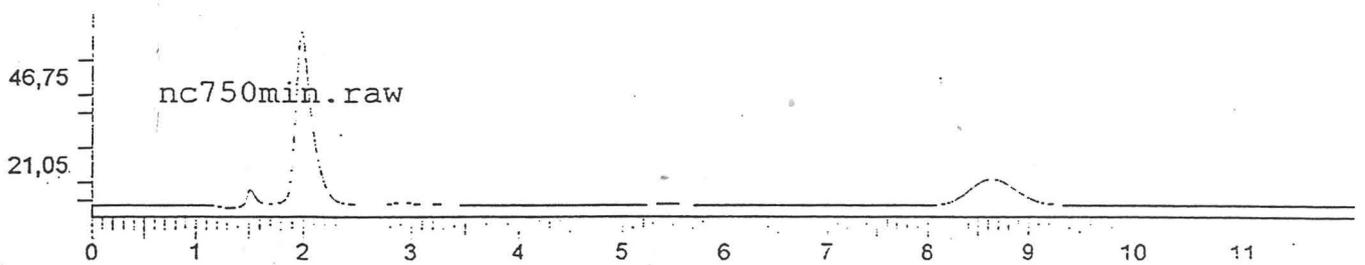
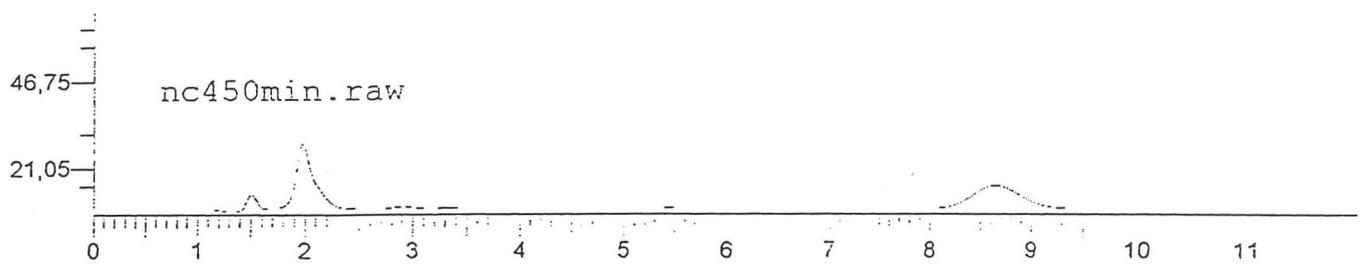
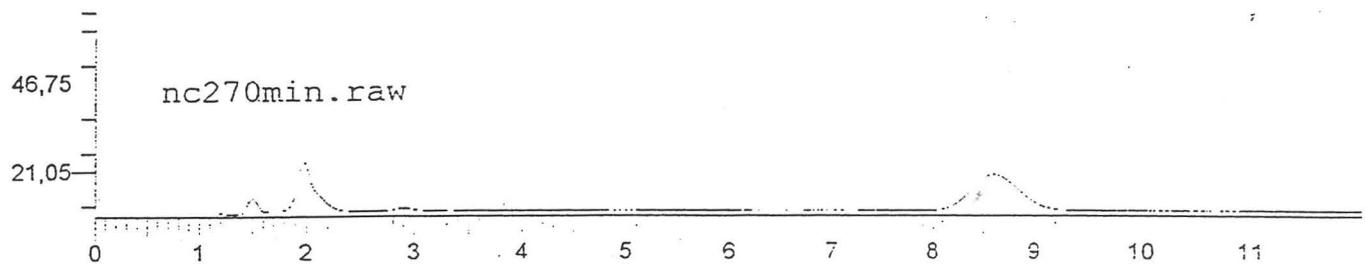
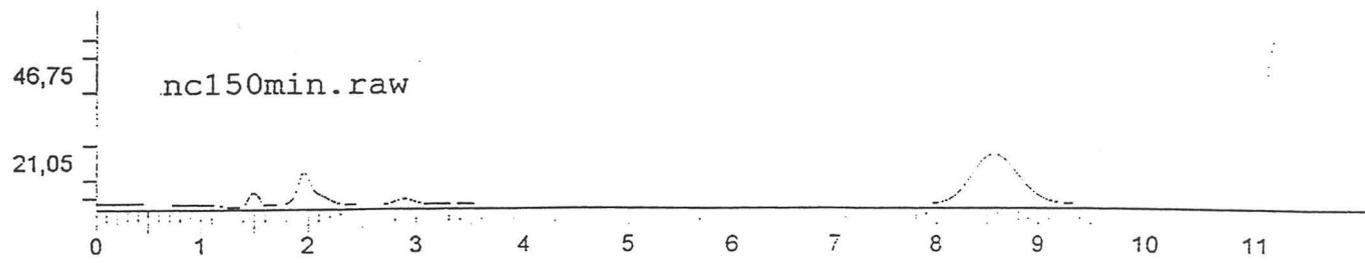
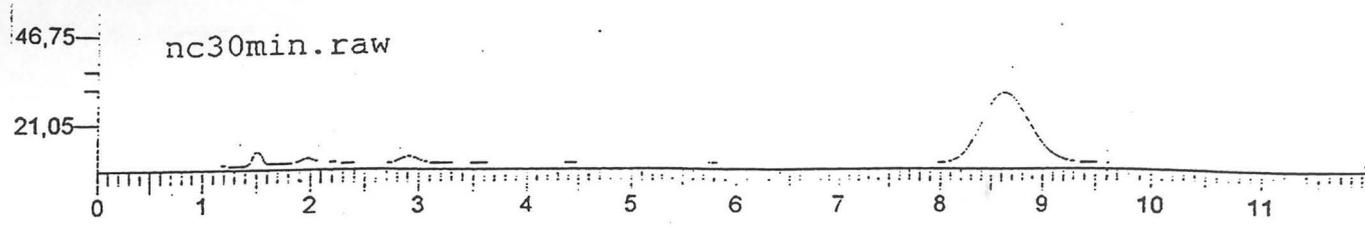
Anexo 2. Espectro de RMN de ^1H do éster etílico de indometacina



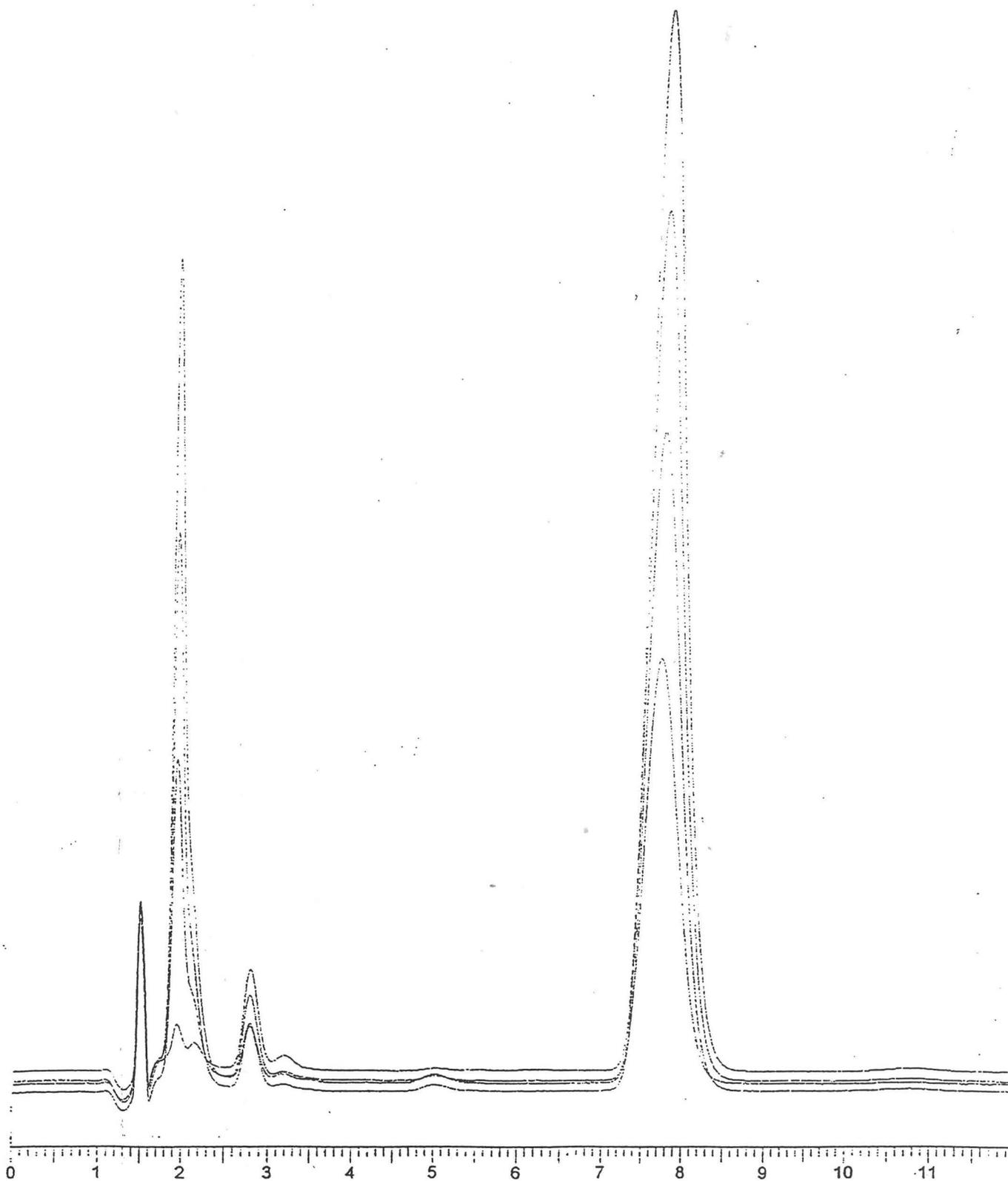
Anexo 3. Cromatograma referente à curva padrão do éster etílico de indometacina (concentração 10 µg/mL)



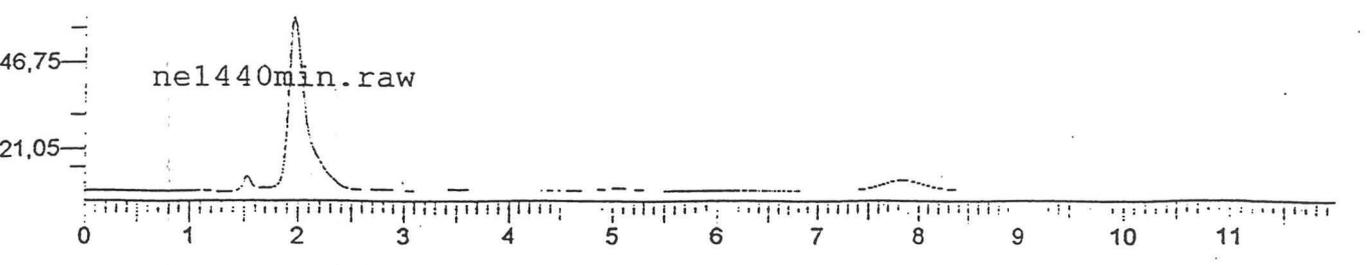
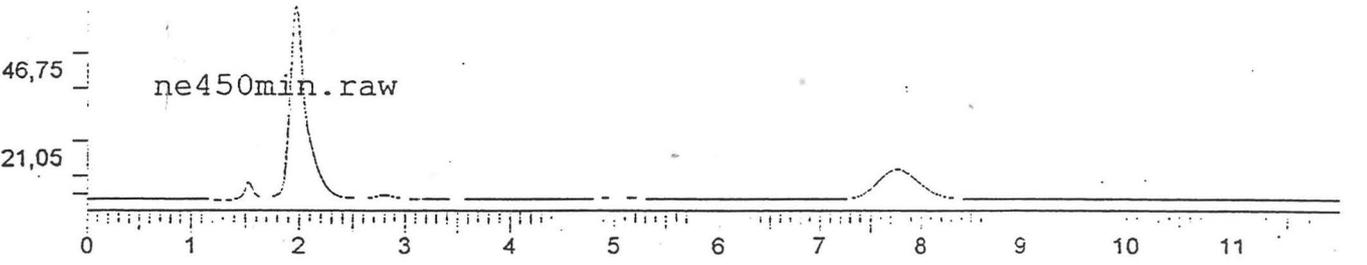
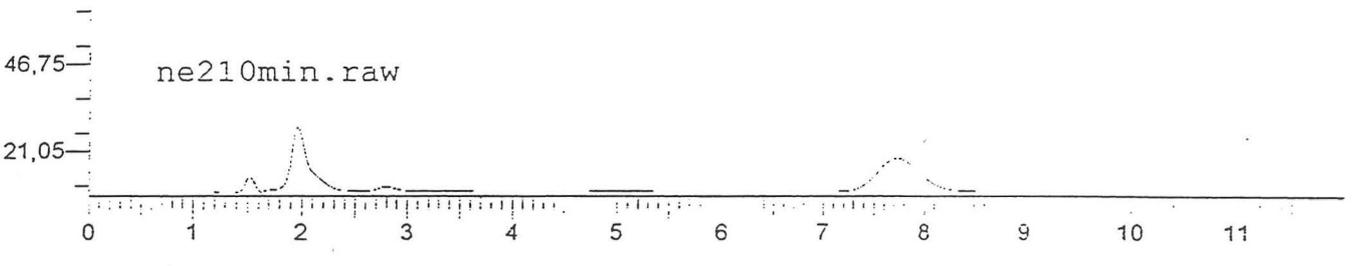
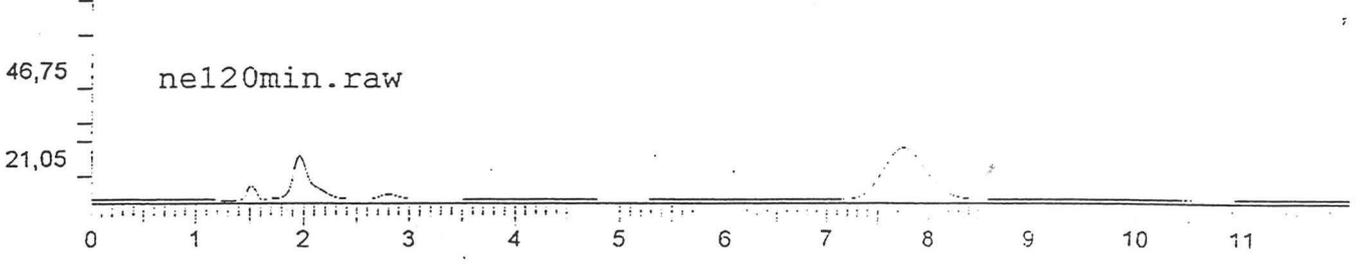
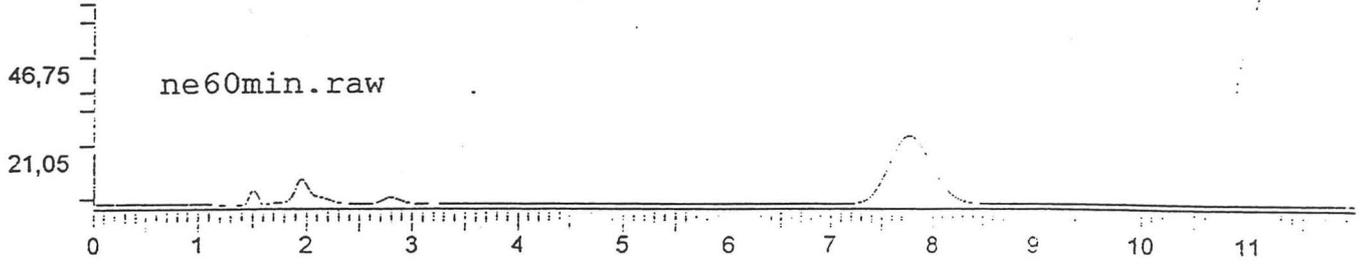
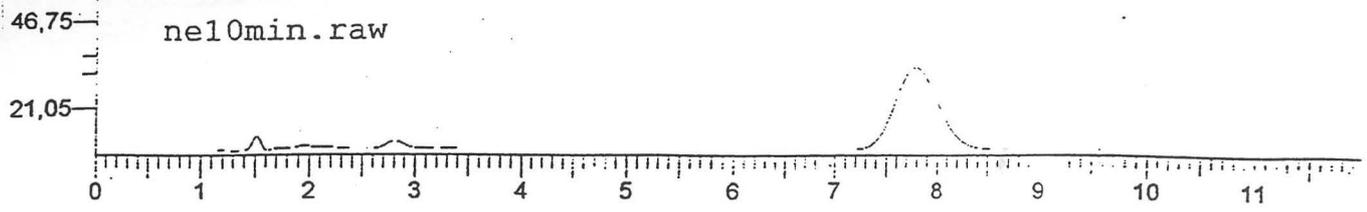
Anexo 4. Cromatograma da hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina associado à nanocápsulas (30, 150, 270 e 450 minutos).



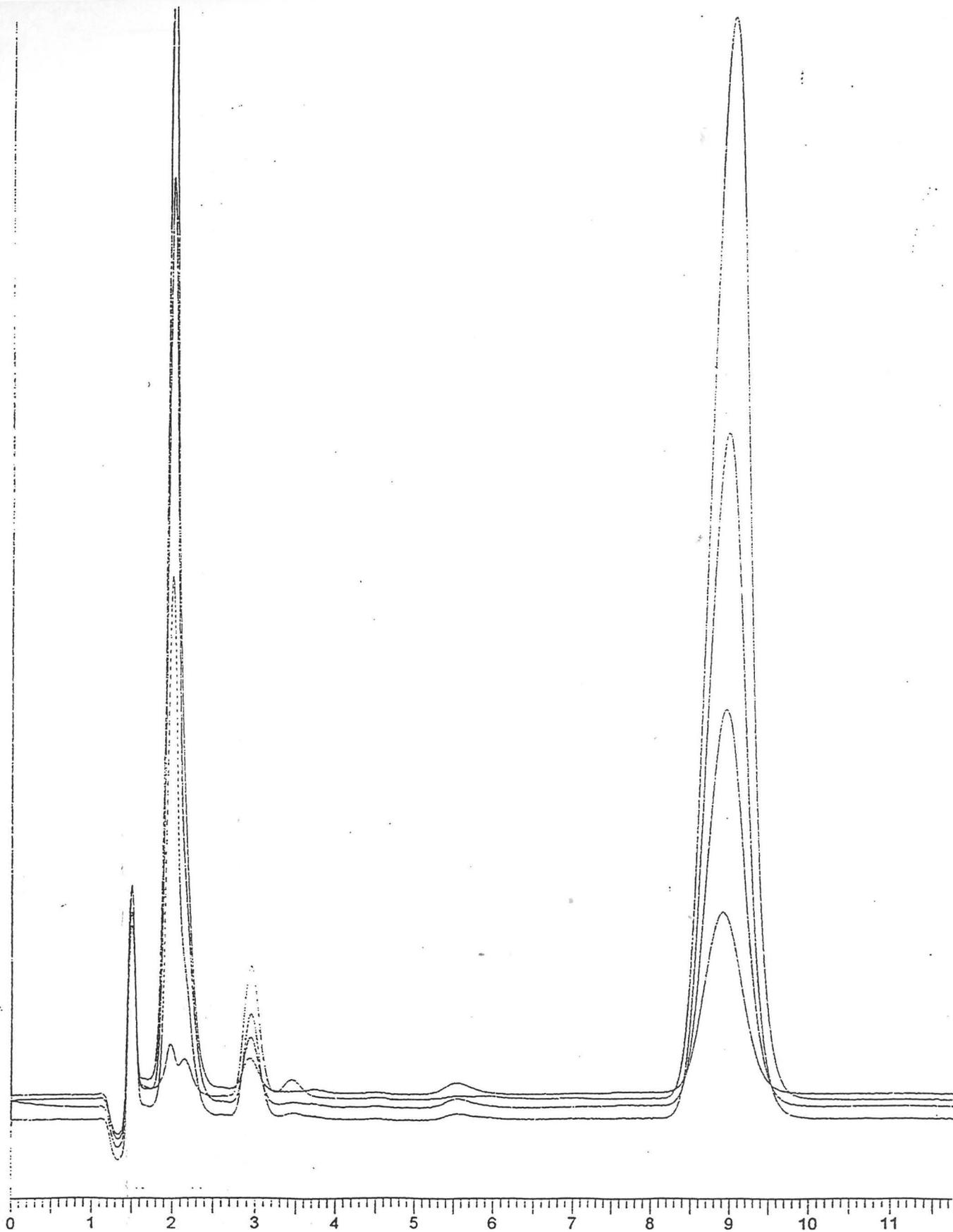
Anexo 5. Cromatogramas da hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina associado à nanocápsulas (30, 150, 270, 450, 750, 1110 minutos).



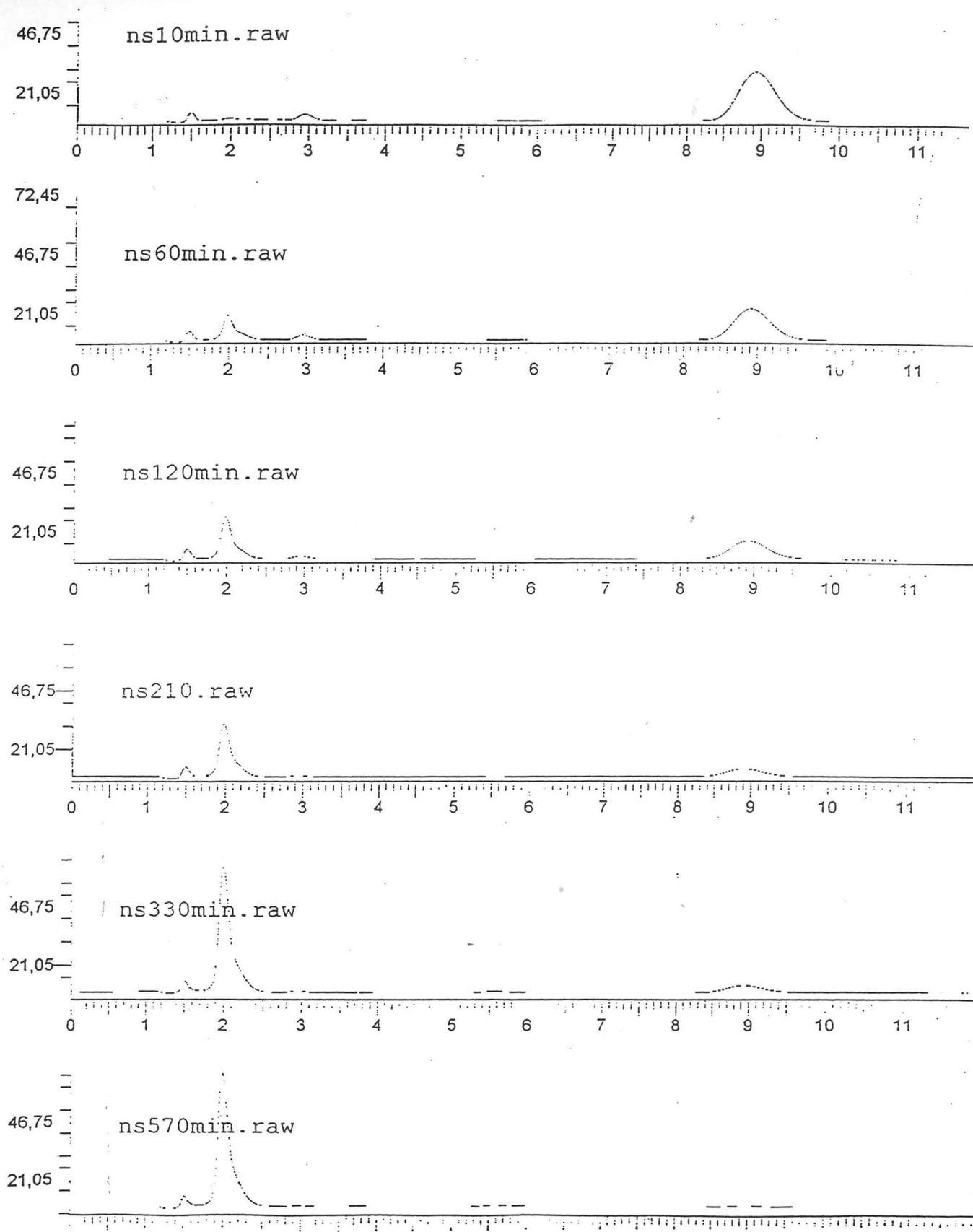
Anexo 6. Cromatogramas da hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina associado à nanoemulsão (10, 60, 120 e 210 minutos).



Anexo 7. Cromatogramas da hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina associado à nanocápsulas (0, 60, 120, 210, 450, 1140 minutos).



Anexo 8. Cromatogramas da hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina associado à nanoesferas (10, 60, 120 e 210 minutos).



Anexo 9. Cromatogramas da hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina associado à nanocápsulas (0, 60, 120, 210, 330, 570 minutos).

7 BIBLIOGRAFIA

1. Magenheimer, B., Benita, S. 1991. *STP Pharma Sciences*. **4**, 221-241.
2. Couvreur, P., Dubernet, C., Puisieux, F. 1995. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **41**, 2-13.
3. Brannon-Peppas, L. 1995. *Int. J. Pharm.* **116**, 1-9.
4. Amoury, N., Dubrsquet, M., Fessi, H., Devissaguet, J. P., Puisieux, F., Benita, S. 1993. *Clin. Materials* **13**, 121-130.
5. Chasteigner, S., Fessi, H., Cavé, G., Devissaguet, J. P., Puisieux, F. 1995. *S. T. P. Pharma Sciences* **5**, 242-246.
6. Guterres, S. S., Fessi, H., Barrat, G., Devissaguet, J. P., Puisieux, F. 1995. *Int. J. Pharm.* **113**, 57-63.
7. Müller, C. R., Schaffazick, S. R., Pohlmann, A. R., Dalla Costa, T., Pesce da Silveira, N., de Lucca Freitas, L., Guterres, S. S. 2001. *Pharmazie*. **56**, 864-867.
8. Bonina, F., Trombetta, D., Borzi, A., De Pasquale, A. 1997. *Int. J. Pharm.* **156**, 245-250.
9. Kalgutkar, A. S., Marnett, A. B., Crews, B. C., Remmel, R. P. 2000. *J. Med. Chem.* **43**, 2860-2870.
10. Lele, B. S., Hoffman, A. S. 2000 *J. Control. Release* **69**, 237-248.
11. Langevin, D. 1992. *Annu. Rev. Phys.Chem.* **43**, 341-369.
12. Couvreur, P. 1988. *Crit. Rev. Ther.Drug.Carrier Syst.* **5**, 1-20.
13. Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Doelker, E., Fessi, H. 1997. *Colloid Polym. Sci.* **275**, 640-647.
14. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Amoury, N., Benita, S. 1989. *Int. J. Pharm.* **113**, R1-R4.
15. Lopes, E., Pohlmann, A. R., Bassani, V., Guterres, S. S. 2000. *Pharmazie*. **55**, 527-530.
16. Guterres, S. S., Weiss, V., de Lucca Freitas, L., Pohlmann, A. R.. 2000. *Drug Delivery*. **7**, 195-199.
17. Pohlmann, A. R., Weiss, V., Mertins, O., Pesce da Silveira, N., Guterres S. S. 2002. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **16**, 305-312.
18. Calvo, P., Vila-Jato, J. L., Alonso M. J. 1996. *J. Pharm. Sciences*. **85**, 530-536.
19. Montasser, I., Briançon, S., Lieto, J., Fessi, H. 2000. *J. Pharm. Belg.* **55**, 155-167.
20. Schaffazick, S. R., Guterres, S. S., Freitas, L. L., Pohlmann, A. R. 2002. *Química Nova*.(aceito)
21. Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudziski, W. E. 2001. *J. Controlled. Rel.*, **70**, 1.
22. Duffy, C. P., Elliot, C. J., O'Connor, R. A. 1998. *Eur. J. Cancer*. **34**, 1250-1259.

23. Orhan, H., Inanici F., Arslan S. 1999. *Exp. Toxicol. Pathol.* **51**, 403-408.
24. Wenkers, B. P., Lippold, B. C. 2000. *Arzneimittel-Forsch.* **50**, E275-E280.
25. Vauthier-Holtzscherer, C., Benabbou, S., Spenlehauer, G., Veillard, M., Couvreur, P. 1991. *STP Pharma Sciences.* **1**, 109-116.
26. Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Doelker, E., Allemann, E. 1998. *Pharm. Res.* **15**, 1056-1062.
27. Kreuter, J., Speiser, P. 1976. *J. Pharm. Sci.* **65**, 1624-1627.
28. Crouveur, P., Kante, B., Roland, M., Guito, P., Baudhuim, P., Speiser, P. 1979. *J. Pharm. Pharmacol.* **31**, 331-332.
29. Ratner, B. D., Johnston, A. B., Lenk, T. J. 1987. *J. Biomed. Mat. Res. Appl. Biomat.* **21**, 59-90.
30. Phillies, G. D. J. 1990. *Analyt. Chem.* **62**, 1049A-1057A.
31. Kreuter, J. 1983. *Int. J. Pharm.* **14**, 43-58.
32. Cichocki, B., Felberhof, B. U. 1991. *J. Chem. Phys.* **94**, 556-562.
33. Cichocki, B., Felberhof, B. U. 1991. *J. Chem. Phys.* **94**, 563-568.
34. Rolland, A., Merdrignac, G., Gouranton, J., Le Verger, R., Genetet, B. 1987. *J. Immunol. Methods.* **96**, 185-193.
35. Lenaerts, V., Raymond, P., Juhasz, J., Simard, M. A., Jolicoeur, C. 1989. *J. Pharm. Sci.* **78**, 1051-1052.
36. Alonso, M. J., Losa, C., Calvo, P., Vila Jato, L. 1991. *Int. J. Pharm.* **68**, 69-76.
37. Guise, V., Drouin, J. Y., Benoit J., Mahuteau, J., Dumont, P., Couvreur, P. 1990. *Pharm. Res.* **7**, 736-741.
38. Brasseur, N., Brault, D., Couvreur, P. 1991. *Int. J. Pharm.* **70**, 129-135.
39. El Samaligy, M. S., Rohdewald, P. 1986. *J. Pharm. Pharmacol.* **38**, 216-218.
40. Li, V. H. K., Wood R. W., Kreuter, J. Harmia, T., Robinson, J. R. 1986. *J. Microencapsulation.* **3**, 213-218.
41. Ammoury, N., Fessi, H., Devissagut, J. P., Puisieux, F., Benita, S. 1990. *J. Pharm. Sci.* **79**, 763-767.
42. Ammoury, N., Fessi, H., Devissagut, J. P., Puisieux, F., Benita, S. 1989. *Sci. Techn. Pract. Pharm.* **5**, 647-651.
43. Astumian, R. D., Schelly, Z. A. 1984. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 304-308.
44. Tondre, C., Hebrant, M., Watarai, H. 2001. *J. Coll. Interf. Sci.* **243**, 1-10.
45. Menger, F. M., Elrington, A. R. 1991. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 9621-9624.
46. Pereira, R. R., Zanette, D., Nome, F., 1990. *J. Phys. Chem.* **94**, 356-361.
47. Quina, F. H., Chaimovich, H. 1979. *J. Phys. Chem.* **83**, 1884.

48. Stadler, E., Zanette, D, Rezende, M. C. 1984. J. Phys. Chem. **88**, 1892.
49. Chen, J., Korner, S., Stephen, L. C., Rudkevich, M. D., Rebek, J. 2002. Nature, **415**, 385-386.
50. Siepmann, J., Peppas, N. A. 2001. Adv. Drug Del. Rev. **48**, 139-157.
51. Higuchi, T. 1961. J. Pharm. Sci. **50**, 874-875.
52. Korsmeyer, R. W., Peppas, N. A. 1989. J. Membrane Sci. 211-227.
53. Peppas, N. A. 1985. Pharm. Acta. Helv. **60**, 110-111.
54. El Arini (1998)
55. Losa, C., Marchal-Heussler, L., Orallo, F., Vila Jato, J. L., Alonso, M. J. 1993. Pharm. Research. **10**, 80-87.
56. Santos-Magalhães, N. S., Pontes, A., Pereira, V. M. W., Caetano, M. N. P. 2000. Int. J. Pharm. **208**, 71-80.
57. Mosqueira, V. C. F., Legrand, P., Pinto-Alphandary, H., Puisieux, F., Barrat, G. 2000. J. Pharm. Sci. **89**, 614-626.
58. Calvo, P., Alonso, M. J., Vila-Jato, J. L., Robinson, J. R. 1996. J. Pharm. Pharmacol. **48**, 1147-1152.
59. Thioune, O., Fessi, H., Devissaguet, J. P., Puisieux, F. 1996. Int. J. Pharm. **146**, 233-238.
60. Lamprecht, A., Bouligand, Y., Benoit, J. P. 2002. J. Control. Rel. **84**, 59-68.
61. Baran, E. T., Özer, N., Hasirch, V. 2002. J. Microencapsulation, **19**, 363-376.
62. The United States Pharmacopeia. 24 ed, Rockville: United States U.S. Convention, 2000.
63. O'Brien, M., McCauley, J., Cohen, E. 1984. Analytical Profiles of Drug Substances, **13**, 211-238.
64. O'Bach, E. S. 2002. Avaliação dos Perfis de Liberação *In Vitro* e da Toxicidade Gastrointestinal *In Vivo* de Indometacina a partir de Nebulizados de Nanopartículas. Dissertação de Mestrado.
65. Mallin, M., Hiljanen-Vainio, T., Karjalainen, T., Seppälä, J. 1996. J. Appl. Polym. Sci. **59**, 1289-1298.