

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA PARA
LIBERAÇÃO DE ACETATO DE DEXAMETASONA**

**BELO HORIZONTE – MG
17 DE DEZEMBRO DE 2013**

IZABELLA MARIA FERREIRA CAMPOS

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA PARA
LIBERAÇÃO DE ACETATO DE DEXAMETASONA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção de título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Kátia Cecília de Souza Figueiredo

Co-orientador: Prof. Armando da Silva Cunha Júnior

**BELO HORIZONTE – MG
17 DE DEZEMBRO DE 2013**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais por sempre me incentivarem e me apoiarem em todos os momentos e decisões. Por não medirem esforços para me ver realizar meus sonhos. Por me mostrarem que caráter e honestidade são os valores mais importantes que carregamos.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFMG, por me proporcionar a oportunidade de qualificação e desenvolvimento em minha profissão.

À professora Kátia Cecília de Souza Figueiredo, pela dedicação, disponibilidade, orientação, paciência e ensinamentos.

Ao professor Armando da Silva Cunha Júnior, por abrir as portas do laboratório de Farmacologia e Tecnologia Farmacêutica possibilitando o desenvolvimento desta pesquisa.

À Gabriella Cunha pela disponibilidade, ajuda e participação nas análises de HPLC. Por sempre me incentivar, pela convivência e agradável companhia.

À professora Rosana Zacarias Domingues, por facilitar a realização das análises de potencial zeta e à Roberta Viana, pela disponibilidade em analisar as amostras.

Ao professor Wander Luiz Vasconcelos, por conceder a utilização dos laboratórios e equipamentos e ao Eduardo Nunes, por sempre me receber no laboratório e auxílio nas análises.

Ao professor Ricardo Gazzinelle, por conceder a utilização da centrífuga em seu laboratório e ao Rafael Polidoro, pela disponibilidade em ajudar na pesquisa.

Ao Dr. Luiz Guilherme Heneine, por permitir a utilização do liofilizador em seu laboratório na Fundação Ezequiel Dias e a Isabela, Guilherme e Débora, por me receberem no laboratório e ajudarem durante o procedimento.

A Thais Saraiva, da Fundação Ezequiel Dias, pela atenção para a realização da liofilização.

À professora Vanessa Lins, por facilitar as análises de MEV e a Luiza, pela ajuda.

Ao professor Rodrigo Oféfica, pela disponibilidade para realizar as análises de DSC.

A Dra. Vanny Ferraz, do Laboratório de Cromatografia, por conceder a utilização de equipamentos e pela disponibilidade.

Aos colegas do grupo de pesquisa, pela companhia no laboratório, incentivo e ajuda.

Aos colegas do mestrado pela convivência, incentivos e reclamações.

Às minhas tias Cecília e Bete, pela acolhida.

Ao João, meu noivo, pela palavra de consolo nas horas de dificuldade e pelo sempre apoio, mesmo de longe.

Aos meus pais, que sempre me apoiam e me fornecem todo o suporte para continuar estudando e ser motivo de orgulho.

A Deus, que nunca falha. Obrigada por permitir esta etapa.

EPÍGRAFE

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DA LITERATURA	3
1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....	3
1.1 Liberação modificada de fármacos.....	4
2 POLÍMEROS PARA SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....	5
2.1 Polímeros não biodegradáveis	6
2.2 Polímeros biodegradáveis	6
2.3 O poli(ácido lático-co-ácido glicólico)	12
3 CORTICOIDES	15
3.1 A dexametasona	15
4 TÉCNICAS PARA O PREPARO DE NANOPARTÍCULAS.....	16
5 MODELOS CINÉTICOS DE LIBERAÇÃO.....	21
5.1 Modelo de liberação de ordem zero	22
5.2 Modelo de liberação de primeira ordem	23
5.3 Modelo de Higuchi.....	24
5.4 Modelo de Peppas	26
6 EXEMPLO DE APLICAÇÃO: TRATAMENTO DE DOENÇAS OCULARES.....	28
7 PRINCIPAIS TRABALHOS	30
OBJETIVOS	34
1 OBJETIVO GERAL	34
2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
1 REAGENTES	35
2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	35
3 PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS.....	36
4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	37
4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura	38
4.2 Potencial Zeta	38
4.3 Calorimetria Diferencial de Varredura	39
4.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	39
4.4.1 Desenvolvimento e validação do método de análise de acetato de dexametasona por CLAE	40

4.5 Eficiência de encapsulamento.....	43
4.6 Testes de liberação	44
RESULTADOS.....	46
1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	46
1.2 Calorimetria diferencial de varredura	57
2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	59
2.1 Linearidade.....	62
2.2 Precisão	64
2.3 Exatidão	65
2.4 Limite de detecção e quantificação	66
3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO.....	66
4 TESTES DE LIBERAÇÃO.....	67
4.1 Teste de adsorção na membrana.....	67
4.2 Testes preliminares de liberação.....	68
4.3 Teste de liberação.....	70
CONCLUSÃO.....	73
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	74
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXO A.....	86
ANEXO B	100
ANEXO C.....	108

RESUMO

Neste trabalho, o preparo de nanopartículas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA, contendo acetato de dexametasona pela técnica de nanoprecipitação na ausência de solventes organoclorados foi investigado, visando o desenvolvimento de dispositivos de liberação controlada. O sistema estudado pode ser aplicado para o tratamento de doenças oculares, uma vez que o olho humano apresenta características anatômicas e fisiológicas que dificultam o acesso a medicamentos. Normalmente, conduz-se o tratamento destas doenças pelas vias sistêmica e tópica. Porém, estas formas apresentam limitações relativas à concentração e disponibilidade do princípio ativo. A estratégia experimental foi dividida em três etapas. Primeiramente, foi definida a condição de preparo mais favorável das nanopartículas de PLGA por meio de um planejamento experimental. Logo em seguida, estudou-se a incorporação do fármaco e a caracterização das nanopartículas formadas por medidas de tamanho, potencial zeta, análise térmica e microscopia. Na terceira etapa, o perfil de liberação do fármaco foi avaliado através de modelos matemáticos. O doseamento do fármaco foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo o método analítico para o sistema desenvolvido e validado. Os resultados indicaram que o método proposto para o preparo das nanopartículas é viável, sendo que as partículas de PLGA contendo acetato de dexametasona apresentaram um tamanho médio de (540 ± 4) nm com índice de polidispersão, PDI, de $(0,07 \pm 0,01)$ e potencial zeta de $-(2,5 \pm 0,3)$ mV. Além disso, as nanopartículas formadas apresentaram forma esférica. Alcançou-se uma eficiência média de encapsulamento do fármaco de 48%. Os resultados dos testes de liberação *in vitro* mostraram que, em 48 horas, cerca de 25% do fármaco contido nas nanopartículas foi liberado.

PALAVRAS CHAVES: Nanopartículas, poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), liberação controlada.

ABSTRACT

In this work, the preparation of PLGA nanoparticles containing dexamethasone acetate by nanoprecipitation technic, in the absence of organochlorine solvent, was investigated in order to develop controlled release devices. This system can be used in a broad range of applications, such as the treatment of ocular diseases. The human eye has an unique anatomical and physiological characteristics that hinder access to medicines for the treatment of diseases. Typically, these diseases are treated by systemic and topic administration routes of drugs. However, techniques have limitations on the availability and concentration of the active ingredient. The experimental strategy was divided in three stages. First, the most favorable condition for preparation of PLGA nanoparticles was defined by means of an experimental plan. After that, the incorporation of dexamethasone acetate and characterization of these nanoparticles was studied. The characterization techniques comprised size distribution, zeta potential, thermal analysis and scanning electron microscopy. In the third stage, the drug release profile was evaluated. Drug content was quantified by means of high performance liquid chromatography. The method was validated according to ANVISA rules. The results showed that it was possible to prepare nanometric particles by using this methodology. Dexamethasone containing PLGA particles showed an average size of (540 ± 4) nm with PDI (0.07 ± 0.01) and the zeta potential of $-(2.5 \pm 0.3)$ mV. Nanoparticles showed and espherical shape. The encapsulation efficiency was 48%. Tests "in vitro" showed that 25% of the drug was released in 48 hours.

KEY WORDS: Nanoparticles, poly(lactic acid-co-glycolic acid), controlled release.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Perfil de concentração do fármaco.
- Figura 2 Tipos de dispositivos para liberação de fármacos.
- Figura 3 Estruturas químicas dos principais polímeros naturais biodegradáveis.
- Figura 4 Polimerização pela abertura do anel de lactona, sendo: a) PCL; b) PGA; c) PLA.
- Figura 5 Representação esquemática dos mecanismos de erosão de polímeros biodegradáveis.
- Figura 6 Representação esquemática das alterações da matriz polimérica durante a erosão superficial e erosão em massa.
- Figura 7 Estrutura química poli(ácido lático-co-ácido glicólico). Os índices m e n representam os monômeros ácido glicólico e ácido lático, respectivamente.
- Figura 8 Rota metabólica de biodegradação dos polímeros PLA, PGA ou PLGA.
- Figura 9 Estrutura química da dexametasona.
- Figura 10 Estrutura química do acetato de dexametasona.
- Figura 11 Representação esquemática de nanoesferas e nanocápsulas.
- Figura 12 Preparo de nanopartículas pela técnica de evaporação do solvente.
- Figura 13 Fórmula estrutural do polisorbato 80, Tween[®]80.
- Figura 14 Representação esquemática de um sistema de liberação de fármaco de acordo com o modelo de Higuchi.
- Figura 15 Processo de difusão (A) e erosão (B) em matriz polimérica.
- Figura 16 Apresentação esquemática da rota de administração ocular intravítrea. (A) Injeção de micro ou nanopartículas; (B) Introdução cirúrgica de implante; (C) Implante suturado sobre a esclera.
- Figura 17 Perfil de liberação *in vitro* de dexametasona a partir de nanopartículas, sendo (●) para formulação sem lipídio e (◊) para formulação com o lipídio.
- Figura 18 Montagem experimental para gotejamento.
- Figura 19 Montagem utilizada para os testes de liberação.

- Figura 20 Formação de solução turva após o gotejamento.
- Figura 21 Mistura resultante após o tempo de evaporação.
- Figura 22 Resultado obtido de potencial zeta na condição experimental 8.
- Figura 23 Resultado obtido para tamanho de partícula na condição experimental 8.
- Figura 24 Relação entre os valores observados e preditos para diâmetro das partículas com nível de confiança de 95%.
- Figura 25 Relação entre os valores observados e preditos para potencial zeta com nível de confiança de 95%.
- Figura 26 Resultado obtido para tamanho das partículas de PLGA contendo acetato de dexametasona.
- Figura 27 Resultado obtido para potencial zeta das partículas de PLGA contendo acetato de dexametasona.
- Figura 28 Amostras liofilizadas com formação de gel na superfície.
- Figura 29 Micrografias obtidas por MEV para as nanopartículas contendo o fármaco.
- Figura 30 Curva de DSC para amostras, sendo (a) nanopartículas sem o fármaco, (b) nanopartículas contendo o fármaco e (c) PLGA.
- Figura 31 Espectro de varredura do fármaco acetato de dexametasona.
- Figura 32 Cromatograma do padrão acetato de dexametasona.
- Figura 33 Cromatogramas obtidos para o teste de seletividade. (a) Tween[®]80; (b) Acetona; (c) Acetato de dexametasona; (d) Etanol; (e) PLGA.
- Figura 34 Curvas de calibração para análise da linearidade do método proposto.
- Figura 35 Curva analítica obtida.
- Figura 36 Perfil de liberação de acetato de dexametasona na condição experimental do teste 2.
- Figura 37 Perfil de liberação de acetato de dexametasona para teste realizado em 48 horas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Vantagens e desvantagens do uso de sistemas de liberação modificada.
Tabela 2	Valores para o expoente n da Equação de Peppas para diferentes geometrias.
Tabela 3	Vantagens e desvantagens das formas e vias de disponibilização de fármacos para o tratamento de doenças oculares do segmento posterior.
Tabela 4	Proporção da fase móvel e vazões utilizadas nos testes.
Tabela 5	Sequencia de diluições realizadas para construção da curva analítica.
Tabela 6	Condições operacionais investigadas para o preparo de nanopartículas.
Tabela 7	Resultados obtidos para diferentes condições operacionais para o preparo de nanopartículas de PLGA.
Tabela 8	Condições operacionais selecionadas.
Tabela 9	Tamanho e potencial zeta para as nanopartículas de PLGA.
Tabela 10	Comparação dos resultados de tamanho, PDI e potencial para as nanopartículas brancas e contendo o fármaco para avaliação da estabilidade.
Tabela 11	Variação da T_g para as amostras analisadas.
Tabela 12	Variação da fase móvel em função do tempo.
Tabela 13	Parâmetros cromatográficos para a determinação do fármaco.
Tabela 14	Dados para a montagem da curva de calibração.
Tabela 15	Desvios padrão relativos obtidos no teste de precisão.
Tabela 16	Porcentagem de recuperação do acetato de dexametasona na avaliação da exatidão do método.
Tabela 17	Parâmetros de validação do fármaco acetato de dexametasona.
Tabela 18	Eficiência de encapsulamento.
Tabela 19	Resultados obtidos para o teste de adsorção na membrana.
Tabela 20	Condições para os testes preliminares de liberação.
Tabela 21	Comparação dos resultados obtidos para os modelos cinéticos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PVA	Poli(álcool vinílico)
EVA	Poli(etileno-co-acetato de vinila)
POE	Poli(orto-ésteres)
PCL	Poli(caprolactona)
PGA	Poli(ácido glicólico)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PLA	Poli(ácido láctico)
PEO-PLGA	Copolímero em bloco do poli(óxido de etileno) e poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
DEX	Dexametasona
O/A	Emulsão óleo em água
A/O/A	Emulsão água/óleo/água
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
UV-VIS	Espectroscopia no ultravioleta-visível
CM-UFMG	Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
COBEQ/2012	XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química
ACN	Acetonitrila
PBS	Tampão fosfato salino
NMWL	Limite de peso molecular nominal
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
PDI	Índice de polidispersão
D/C	Fases dispersa/contínua

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Área média da superfície do filme exposto à liberação
a	Constante que combina características geométricas e estruturais do dispositivo
C	Concentração
C_0	Concentração inicial do fármaco
C_s	Solubilidade do fármaco
D	Coefficiente de difusão
J	Fluxo difusivo
k_0	Constante cinética de ordem zero
k_1	Constante cinética de primeira ordem
k_H	Constante de Higuchi
M_t	Quantidade liberada no tempo t
N	Expoente de liberação
pH	Potencial hidrogeniônico
R^2	Coefficiente de correlação
T	Tempo
T_g	Temperatura de transição vítrea
Δt	Intervalo de tempo
X	Posição

INTRODUÇÃO

Sistemas de liberação modificada de fármacos tem sido alvo de intensas pesquisas nos últimos anos e o desenvolvimento de materiais poliméricos contribuiu para o progresso de diversas tecnologias nesta área. Estes sistemas permitem a absorção e liberação da substância ativa de maneira controlada, evitando-se doses em concentrações críticas, além de permitir o direcionamento em sítios específicos (UHRICH *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2004; THRIMAWITHANA *et al.*, 2011).

O olho humano é um sistema que apresenta características anatômicas singulares que dificultam o acesso a medicamentos, constituindo um desafio para o desenvolvimento de sistemas de transporte de fármacos mais eficientes e que garantam maior conforto aos pacientes (AMO e URTTI, 2008).

A administração de nanopartículas poliméricas no segmento posterior do olho surge como uma alternativa para o tratamento de doenças, com intuito de aumentar a absorção do fármaco e fornecer proteção ao princípio ativo, permitindo prolongar sua exposição por liberação controlada, além de constituir-se uma técnica de tratamento menos invasiva (AMO e URTTI, 2008; SAHOO *et al.*, 2008).

O poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA, é um polímero biodegradável que tem despertado enorme interesse de pesquisadores para a utilização em sistemas de liberação de fármacos por apresentar biocompatibilidade satisfatória, resistência mecânica e cinética de liberação previsível (KIMURA e OGURA, 2001; YASUKAWA *et al.*, 2005; KIM e MARTIN, 2006).

É prática comum descrita na literatura a utilização de solventes organoclorados, como o diclorometano e o clorofórmio, para a dissolução do polímero (SANTANDER-ORTEGA *et al.*, 2006; GÓMEZ-GAETE *et al.*, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2009; SOUTO *et al.*, 2012). Porém, estes solventes possuem reconhecida toxicidade, são de difícil remoção do sistema e seu descarte inadequado causa danos ambientais. O desenvolvimento de técnicas alternativas que permitam substituí-los é de grande interesse prático para a segurança de pesquisadores e futuras aplicações comerciais. BECK e colaboradores (2003) apresentaram uma técnica de preparo de partículas de PLGA contendo dexametasona sem a utilização de solventes organoclorados. Foram obtidas partículas nanométricas, o que indica a viabilidade da técnica.

O preparo e a caracterização de nanopartículas de PLGA contendo acetato de dexametasona, um corticoide sintético amplamente utilizado para o tratamento de inflamações oculares, bem como o perfil de liberação do fármaco foram avaliados neste trabalho.

O grupo deu início à pesquisa nesta área no ano de 2009, através do Programa Primeiros Projetos da FAPEMIG. Em um trabalho de iniciação científica (SANTOS e FIGUEIREDO, 2012) investigou-se o preparo e a caracterização de nanopartículas de PLGA na ausência de solventes organoclorados e foram obtidos resultados promissores. Estes resultados indicaram a possibilidade de continuidade desta pesquisa pelo grupo. Tendo como ponto de partida os resultados anteriormente obtidos, investigou-se neste trabalho, a metodologia para o preparo de nanopartículas sem a utilização de solventes organoclorados de modo mais sistemático, sendo avaliados tamanho, estabilidade e morfologia do sistema desenvolvido. Desta forma, este trabalho inaugura o estudo nesta linha pesquisa pelo grupo, além de concretizar parcerias com outros grupos da UFMG, o que revela o caráter multidisciplinar da pesquisa.

REVISÃO DA LITERATURA

1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Entende-se por liberação o processo em que um princípio ativo presente em uma forma farmacêutica torna-se disponível para absorção pelo organismo. Assim, um sistema ou dispositivo de liberação de fármaco são termos que definem a forma ou o mecanismo pelo qual o princípio é disponibilizado no organismo, após sua administração (ANSEL *et al.*, 2000).

Podem-se dividir os sistemas de liberação de fármacos em tradicionais e modificados. Nos sistemas de liberação tradicionais, a concentração do fármaco atinge um pico logo após a administração e então declina. Os níveis são dependentes das doses administradas e cada fármaco possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual é ineficaz. Na liberação modificada, busca-se o desenvolvimento de um sistema que mantenha a concentração do medicamento na corrente sanguínea dentro da faixa terapêutica (STAMATIALIS *et al.*, 2008). Estes perfis de liberação são apresentados na Figura 1.

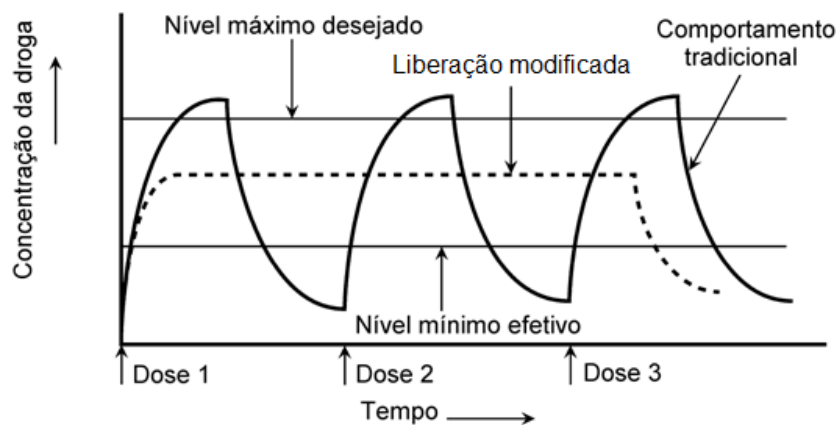


Figura 1: Perfil de concentração do fármaco.

Adaptada de STAMATIALIS *et al.*(2008).

Os sistemas transportadores de fármacos são capazes de compartimentar a substância ativa e direcioná-la para os sítios onde deverá exercer seu efeito farmacológico, além de poder controlar a velocidade de liberação, sem alterar a estrutura química da molécula transportada (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

1.1 Liberação modificada de fármacos

O termo liberação modificada é usado para descrever os sistemas cujas características de liberação do fármaco são selecionadas com fins terapêuticos ou para maior conveniência do paciente, não oferecidos pelas formas tradicionais. Dentre as diferentes condições de liberação modificada, a disponibilização do fármaco pode ocorrer de forma estendida, retardada ou controlada (ARIAS, 1999).

A liberação estendida tem como objetivo manter a liberação do fármaco por um período maior de tempo. Nesta condição, a liberação é suficientemente lenta para que seja possível estender o intervalo entre as doses. Além disso, reduz as oscilações da concentração do fármaco, evitando níveis subterapêuticos ou tóxicos. Os termos liberação prolongada, liberação sustentada e liberação repetida são utilizados para descrever sistemas com este padrão (PEZZINI *et al.*, 2007). Na forma retardada, o início da absorção do princípio ativo se dá após um determinado período de tempo. Já o termo liberação controlada descreve a liberação do princípio ativo baseada em um padrão cinético pré-determinado, de modo que o fármaco seja liberado em taxas semelhantes em cada intervalo de tempo (ARIAS, 1999).

Os sistemas de liberação modificada permitem o monitoramento tanto da massa quanto da taxa com a qual o fármaco é distribuído, proporcionando benefícios terapêuticos significantes, como disponibilização em concentrações elevadas diretamente no local de ação e por um longo período de tempo, minimizando efeitos colaterais e problemas de sobredosagem e subdosagem (BAKER, 2004). Na Tabela 1, são apresentadas as principais vantagens e desvantagens destes sistemas.

Tabela 1: Vantagens e desvantagens do uso de sistemas de liberação modificada.

Vantagens	Desvantagens
A concentração do princípio ativo é continuamente mantida em uma faixa terapêutica adequada.	Toxicidade ou falta de biocompatibilidade do material polimérico utilizado.
Efeitos colaterais prejudiciais podem ser reduzidos e/ou eliminados.	Produção de subprodutos prejudiciais provenientes do polímero biodegradável.
Proteção dos fármacos com tempo de meia vida curta quanto à degradação.	Operações cirúrgicas para implantação em um local apropriado.
Maior comodidade para o paciente quanto à administração da droga.	Custo elevado de desenvolvimento do produto.
Maior seletividade do fármaco no local de ação.	Dificuldade na interrupção do tratamento em caso de intoxicação grave ou intolerância.

Adaptada de SADAHIRA, 2007.

2 POLÍMEROS PARA SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

A pesquisa e desenvolvimento de materiais poliméricos contribuíram para o progresso de diversas tecnologias de sistemas de liberação de fármacos. Nas últimas décadas, houve um considerável aumento no interesse por essa tecnologia, verificado pelo maior número de publicações e patentes na área (STAMATIALIS *et al.*, 2008).

Devido as suas diversas aplicações e funcionalidades, os polímeros estão dentre os excipientes mais utilizados em tecnologia farmacêutica. A escolha de um polímero para um sistema de liberação de fármacos depende de vários fatores que correlacionam propriedades do princípio ativo e do material (OLIVEIRA e LIMA, 2006).

Os polímeros utilizados nos sistemas de liberação controlada de fármacos devem ser quimicamente inertes, não carcinogênicos, hipoalergênicos e não causar resposta inflamatória no local de aplicação (ATHANASIOU *et al.*, 1996).

Os dispositivos de liberação de fármacos podem ser preparados a partir de diferentes polímeros, sendo classificados como: monolítico, reservatório ou hidrogel polimérico (YASUKAWA *et al.*, 2004; BAKER, 2004).

No sistema monolítico, o agente ativo encontra-se homogeneamente disperso ou dissolvido em um polímero inerte, e a sua liberação ocorre principalmente por difusão pelos poros da matriz polimérica. A taxa de liberação depende do polímero utilizado. No sistema do tipo reservatório, o fármaco encontra-se envolto por uma membrana polimérica, a qual controla sua taxa de liberação. Mudanças na natureza e espessura dessa membrana, bem como na forma do dispositivo, promovem alterações na velocidade de liberação do fármaco. Já no modelo de hidrogéis poliméricos, o fármaco encontra-se ligado à matriz por ligação covalente ou interação iônica (YASUKAWA *et al.*, 2004; BAKER, 2004). Na Figura 2, são apresentados modelos para estes sistemas.



Figura 2: Tipos de dispositivos para liberação de fármacos.

Adaptada de YASUKAWA *et al.* (2004).

O preparo destes dispositivos pode ser realizado com a utilização de polímeros não biodegradáveis ou biodegradáveis. A biodegradação do polímero é um processo em que a macromolécula é convertida em produtos mais simples, seja pela ação de enzimas ou microrganismos, ou por hidrólise da cadeia em meio aquoso (OLIVEIRA e LIMA, 2006). Neste ponto, os polímeros biodegradáveis apresentam maior vantagem frente aos não biodegradáveis, já que são totalmente absorvidos pelo organismo, não necessitando de remoção posterior (YASUKAWA *et al.*, 2004).

2.1 Polímeros não biodegradáveis

Os polímeros não biodegradáveis normalmente utilizados em sistemas de liberação de fármaco são o poli(álcool vinílico), PVA, poli(etileno-co-acetato de vinila), EVA e silicone (YASUKAWA *et al.*, 2005; BOURGES *et al.*, 2006 e THRIMAWITHANA *et al.*, 2011).

O dispositivo de polímero não biodegradável não apresenta um perfil de liberação com explosão inicial de fármaco, que é comum em outros sistemas. Dessa forma, sua cinética é mais controlada. Os implantes comerciais utilizados são relativamente grandes, de 4 a 5 mm e requerem uma intervenção cirúrgica para sua implantação. Além disso, por se tratar de um material não biodegradável, o dispositivo vazio deve ser removido por uma segunda cirurgia para implante de outro (YASUKAWA *et al.*, 2005).

2.2 Polímeros biodegradáveis

Uma grande variedade de polímeros biodegradáveis naturais ou sintéticos tem sido estudada para o desenvolvimento de dispositivos para a liberação controlada de fármacos. Dentre os polímeros naturais citam-se quitina, quitosana, alginato, ácido hialurônico e gelatina. Dentre os polímeros sintéticos, os mais comumente encontrados são os polianidridos, poliaminoácidos, poliuretanos, poliacrilamidas, poli(orto-ésteres), POE, poliésteres, como poli(caprolactona), PCL, poli(ácido glicólico), PGA, poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA, e poli(ácido láctico),

PLA, (KOHN e LANGER, 1996; UHRICH *et al.*, 1999; MITTAL *et al.*, 2008; VILLANOVA e ORÉFICE, 2010).

A quitina é um polissacarídeo constituído por um polímero de cadeia longa de N-acetilglicosamina e precursora direta da quitosana. Existem vários relatos sobre o uso destes materiais em aplicações biomédicas, incluindo sistemas de liberação de fármacos, engenharia de tecidos e ortopedia. Sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioatividade, e ausência de toxicidade a torna muito atraente como um biomaterial na indústria farmacêutica e na área médica (MITTAL *et al.*, 2008; LARANJEIRA e FÁVERE, 2009).

O alginato é um copolímero linear constituído de unidades de ácidos gulurônicos e manurônicos e pode ser utilizado devido as suas propriedades espessantes, estabilizantes e gelificantes. Estas características fazem com que este biopolímero encontre aplicações na indústria de alimentos, têxtil e de papel, em cosméticos e na área farmacêutica e médica. Sua principal fonte são algas marrons, entretanto, o alginato pode ser obtido a partir de biossíntese (MITTAL *et al.*, 2008).

O ácido hialurônico é um biopolímero composto por resíduos alternados de ácido glucurônico e N-acetilglucosamina. Trata-se de uma molécula uniforme, linear e não ramificada, encontrada como conector de tecidos e órgãos em animais (MITTAL *et al.*, 2008).

A gelatina é um polímero natural, derivado de colágeno, utilizado para fins industriais, produtos farmacêuticos e aplicações médicas por sua biodegradabilidade e biocompatibilidade (MITTAL *et al.*, 2008). Apresentam-se as estruturas dos polímeros acima descritos na Figura 3.

Os polianidridos estão entre os polímeros mais reativos e hidroliticamente instáveis usados como biomateriais. Devido a sua elevada reatividade, os polianidridos são facilmente degradados sem a necessidade de incorporar catalisadores ou excipientes na formulação do dispositivo (KOHN e LANGER, 1996).

Os poliaminoácidos são utilizados predominantemente para sistemas de liberação de fármacos de baixa massa molecular. Suas cadeias laterais de aminoácidos oferecem locais para a ligação de fármacos ou agentes de ligação cruzada que podem ser usados para modificar as propriedades físicas e mecânicas do polímero. Porém, sua natureza antigênica torna sua utilização ainda não comprovada. Outra preocupação com os poliaminoácidos é a estabilidade intrínseca hidrolítica da ligação amida que deve contar com enzimas de clivagem de ligação. A

dependência de enzimas geralmente resulta em fraca liberação controlada *in vivo* (UHRICH *et al.*, 1999).

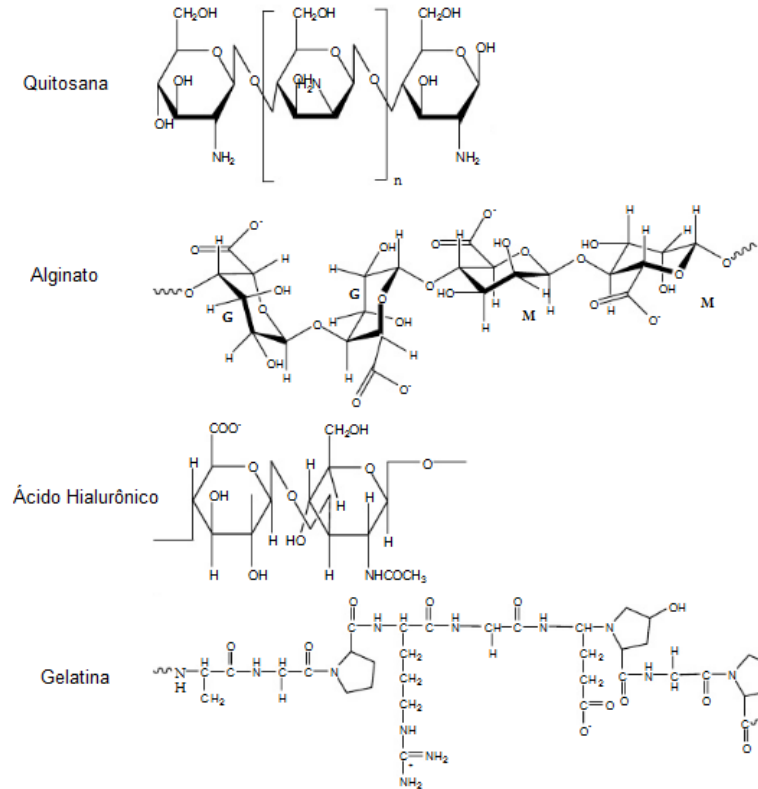


Figura 3: Estruturas químicas dos principais polímeros naturais biodegradáveis. MITTAL *et al.* (2008).

Os poli(orto-ésteres) são úteis para aplicações em sistemas de liberação controlada de fármacos. A motivação para a sua utilização é que estes sistemas permitem a liberação do fármaco somente após a hidrólise das cadeias do polímero na superfície do dispositivo, inibindo a disponibilização por mecanismos de difusão (UHRICH *et al.*, 1999). Os dispositivos a base de poli(orto-ésteres) são formulados de tal modo que suas propriedades podem ser controladas pela escolha dos dióis utilizados na preparo (KOHN e LANGER, 1996).

Os poliésteres são os sistemas mais bem caracterizados e amplamente estudados em processos de liberação de fármacos. A síntese dos polímeros PCL, PGA e PLA é baseada na abertura do anel do monômero cíclico de lactona correspondente, como mostrado na Figura 4. A simples polimerização da lactona normalmente é lenta para a produção de materiais de massa molecular alta, sendo necessária a utilização de um catalisador (UHRICH *et al.*, 1999).

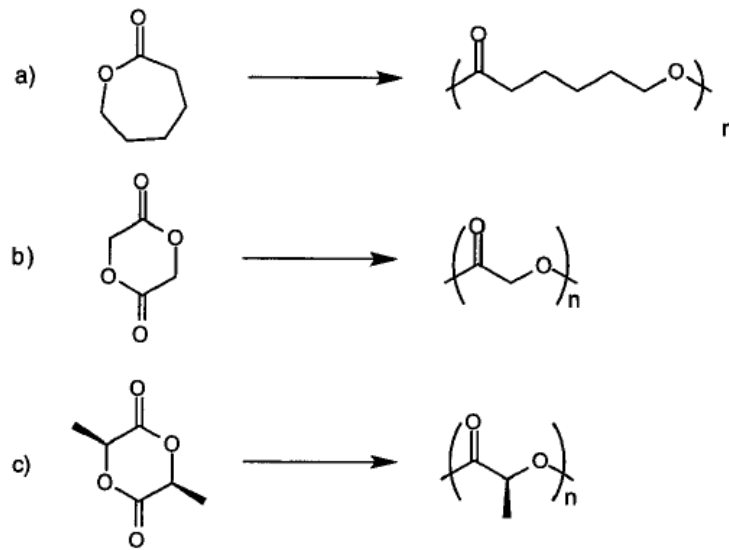


Figura 4: Polimerização pela abertura do anel de lactona, sendo: a) PCL; b) PGA; c) PLA.
UHRICH *et al.* (1999).

O PGA é um poliéster alifático que possui alta cristalinidade, elevado ponto de fusão e baixa solubilidade em solventes orgânicos. Estas características tornam sua utilização geralmente limitada. Com o objetivo de adaptar as propriedades do PGA para maiores aplicações, seus copolímeros vêm sendo investigados. Objeto de grande estudo atualmente é o PLGA, um copolímero formado pelo PGA e PLA (KOHN e LANGER, 1996; ARSETE e SABLIOV, 2006; OLIVEIRA e LIMA, 2006; ALI *et al.*, 2013).

A degradação do polímero por erosão pelo organismo pode ser definida, segundo KIMURA e OGURA (2001), como a conversão de um material inicialmente insolúvel em água para um material solúvel em água, não significando necessariamente uma degradação química.

Para que os dispositivos sejam eliminados, três mecanismos podem ser descritos, como mostrado na Figura 5.

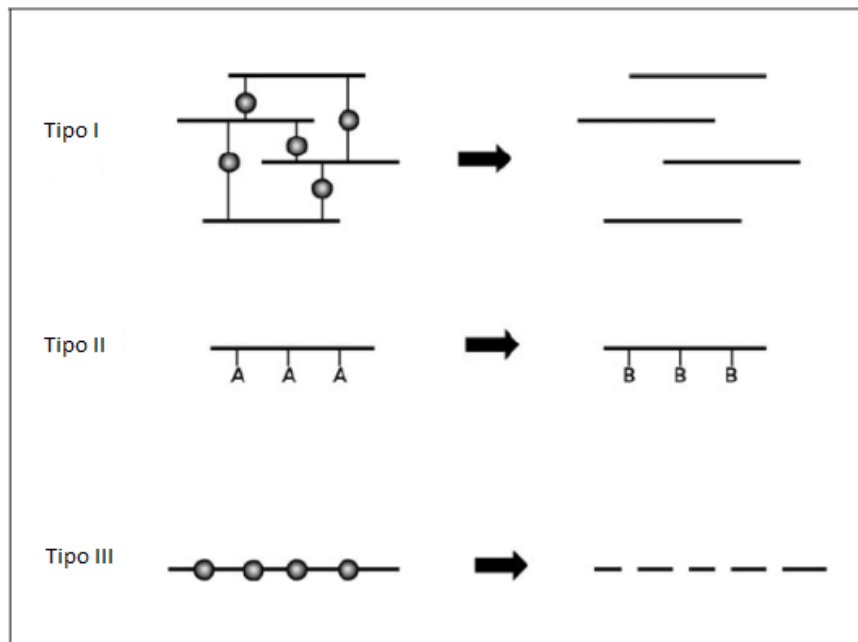


Figura 5: Representação esquemática dos mecanismos de erosão de polímeros biodegradáveis.

KIMURA e OGURA (2001).

O primeiro mecanismo é o de erosão simples, tipo I, relativo aos polímeros solúveis em água e que se tornaram insolúveis por reticulação. O fármaco é mantido ligado à cadeia do polímero por meio do agente de reticulação e a liberação ocorre pela quebra desta ligação em meio aquoso. No mecanismo tipo II, o fármaco é inserido nas extremidades dos radicais do polímero por meio de uma reação de hidrólise ou ionização. A liberação do fármaco ocorre devido a alguma alteração das condições do meio. No tipo III, os polímeros são transformados em moléculas pequenas e solúveis pela clivagem de suas cadeias. Durante este processo de degradação, tem-se a liberação da substância ativa (MERKLI *et al.*, 1998; KIMURA e OGURA, 2001, FIALHO e SILVA-CUNHA, 2007).

A erosão dos polímeros não procede, necessariamente, por um único mecanismo, sendo várias combinações possíveis. Geralmente, a erosão ocorre através de uma reação de hidrólise quando o sistema é colocado em um ambiente biológico aquoso e a presença de enzimas provoca um aumento na taxa de erosão. Esta classificação, porém, fornece uma base conveniente para descrever os sistemas de disponibilização de fármacos (MERKLI *et al.*, 1998).

O processo de erosão do polímero pode ser ainda idealmente dividido em erosão de superfície e erosão volumétrica (TAMADA e LANGER, 1993; YASUKAWA *et al.*, 2004; LAO *et al.*, 2011).

A erosão de superfície é um processo heterogêneo em que o material é perdido a partir da superfície exterior do polímero. Dessa forma, a taxa de erosão é diretamente proporcional à área superficial externa da partícula e essencialmente constante até que o polímero seja completamente degradado. Já o sistema de erosão volumétrica trata-se de um processo homogêneo em que o material é perdido a partir do volume da partícula, ou seja, ocorre em toda a matriz do polímero. A taxa de erosão depende da quantidade total de material e geralmente diminui à medida que o material é esgotado. O tempo de duração do processo pode ser alterado por mudanças na composição química do polímero, mas não por alterações no tamanho ou forma da partícula (TAMADA e LANGER, 1993; YASUKAWA *et al.*, 2004; LAO *et al.*, 2011). A Figura 6 ilustra os dois processos acima descritos.

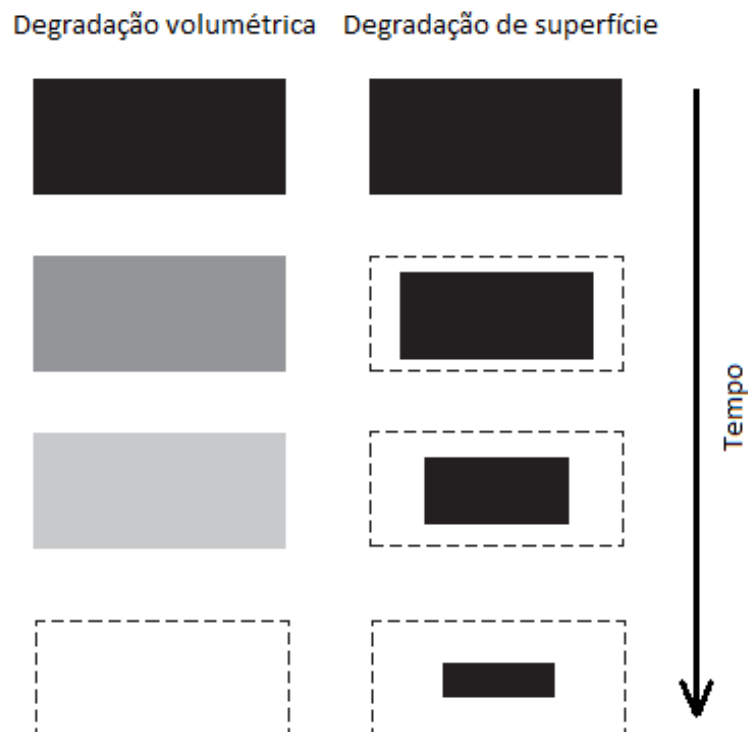


Figura 6: Representação esquemática das alterações da matriz polimérica durante a erosão superficial e erosão em massa.

Adaptada de LAO *et al.* (2011).

Dentre os polímeros biodegradáveis disponíveis, o PLA, o PGA e seus copolímeros, PLGA, têm se apresentado como candidatos promissores para utilização clínica. Os produtos de degradação, ácidos lático e glicólico não são tóxicos e podem ser facilmente eliminados pelo organismo (KIMURA e OGURA, 2001; BARBANTI *et al.*, 2005; ALI *et al.*, 2013).

2.3 O poli(ácido lático-co-ácido glicólico)

O poli(ácido lático-co-ácido glicólico), PLGA, é um copolímero dos monômeros ácido lático e ácido glicólico e tem despertado enorme interesse de pesquisadores para a utilização em sistemas de liberação de fármacos devido às suas propriedades favoráveis, tais como biocompatibilidade, cinética previsível de degradação e resistência mecânica (JAIN, 2000; KIMURA e OGURA, 2001; YASUKAWA *et al.*, 2005; KIM e MARTIN, 2006; CHENG *et al.*, 2008).

A principal característica estrutural do PLGA é a ligação éster presente entre os monômeros, como apresentado na Figura 7. O copolímero apresenta cadeia linear, saturada e comportamento termoplástico, ou seja, é facilmente moldado quando exposto ao aquecimento (MERKLI *et al.*, 1998).

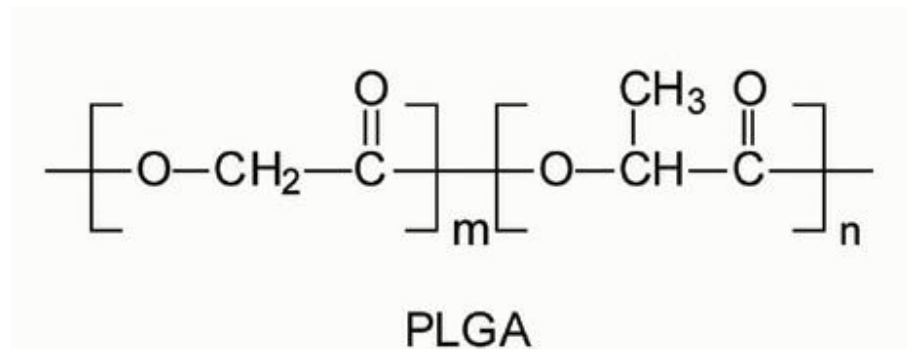


Figura 7: Estrutura química poli(ácido lático-co-ácido glicólico). Os índices m e n representam os monômeros ácido glicólico e ácido lático, respectivamente.

Neste trabalho foi utilizado o polímero PLGA com razão ácido lático:ácido glicólico 75:25.

A hidrofiliicidade e lipofiliicidade do PLGA são determinadas pela proporção de ácidos lático e glicólico na sua constituição. O grupo metila, presente no ácido lático,

confere a este maior hidrofobicidade. Assim, quanto maior a proporção de ácido láctico, maior será a hidrofobicidade do copolímero. Além disso, ao absorver uma menor quantidade de água, sua velocidade de degradação é diminuída. A massa molecular e o grau de cristalinidade também podem influenciar nas propriedades mecânicas, na capacidade de hidrólise e na velocidade de degradação do polímero (FIALHO *et al.*, 2003).

Outra propriedade do PLGA é a sua temperatura de transição vítrea (T_g) que se encontra acima da temperatura corporal (37°C), na faixa de 45 a 50°C , e nessa condição, o mantém na forma vítrea. Desse modo, sua cadeia polimérica apresenta-se como uma estrutura relativamente rígida. Esta característica confere resistência mecânica significativa ao material, permitindo seu uso em sistemas de liberação de fármacos (JAIN, 2000; BARBANTI *et al.*, 2005).

Muitos fatores podem ser responsáveis por alterações no perfil de degradação dos polímeros biodegradáveis. LAO e colaboradores (2011) e FREDENBERG e colaboradores (2011) destacam os principais relacionados ao PLGA:

- (i) Composição: o grupo glicólico degrada-se mais rápido que o grupo láctico. Dessa forma, o perfil de degradação do copolímero pode ser ajustado por modificações na razão dos monômeros.
- (ii) Massa molecular: a taxa de degradação do material aumenta com a diminuição da massa molar, ou seja, a presença de espécies de baixa massa molar e monômeros leva a uma taxa de degradação mais rápida.
- (iii) Cristalinidade: regiões amorfas da matriz polimérica degradam antes do que suas partes cristalinas, pois a penetração da água nestas estruturas é mais difícil.
- (iv) pH do meio de liberação: como a degradação de cadeia dá-se através da hidrólise das ligações éster, ambos os meios alcalino e fortemente ácido podem acelerar a taxa de degradação.

Outros fatores como a natureza do fármaco incorporado, presença de aditivos como sais, surfactantes e agentes plastificantes, tamanho, forma e porosidade dos dispositivos de liberação e condições de temperatura e agitação do meio podem também alterar a cinética de degradação do polímero (LAO *et al.*, 2011).

A literatura classifica a degradação do PLGA como do tipo erosão volumétrica (TAMADA e LANGER, 1993; YASUKAWA *et al.*, 2004; LAO *et al.*, 2011). LAO e colaboradores (2011) descrevem o processo em quatro passos consecutivos. Primeiramente, o polímero absorve água, sofrendo inchamento de sua matriz. A água penetra na região amorfa e altera a sua conformação, antes estabilizada por forças de van der Waals e ligações de hidrogênio. Logo depois, segue a clivagem das ligações covalentes da cadeia do polímero. Cada vez mais são formados grupos terminais carboxílicos que podem catalisar a hidrólise. Observa-se, então, a diminuição da massa molecular e da força mecânica da estrutura. Em terceiro lugar, a clivagem das cadeias continua de forma acentuada, provocando ainda mais perda de massa e integridade mecânica. Por último, o polímero perde significativa massa devido à solubilização de oligômeros para o meio circundante. O polímero decompõe-se em seus monômeros, ácido lático e glicólico.

O ácido lático e glicólico, por serem metabólitos naturais do organismo, são eliminados pelo ciclo de Krebs na forma de gás carbônico e água (MERKLI *et al.*, 1998; BARBANTI *et al.*, 2005), de acordo com a Figura 8.

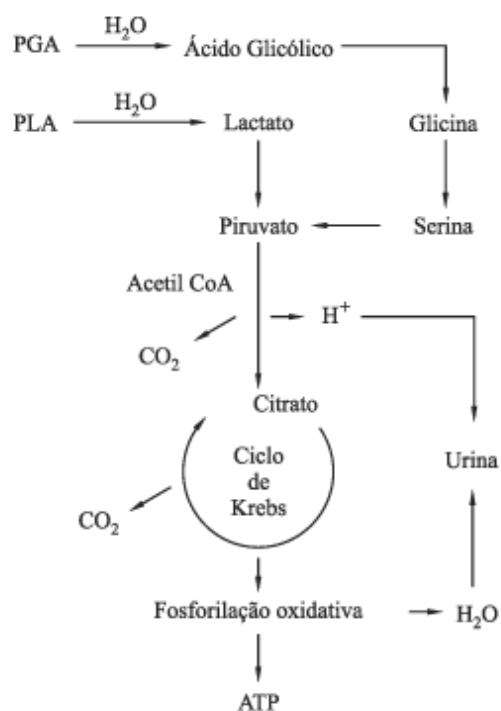


Figura 8: Rota metabólica de biodegradação dos polímeros PLA, PGA ou PLGA. BARBANTI *et al.* (2005).

3 CORTICOIDES

Corticoides, também chamados corticosteroides, são um grupo de hormônios produzidos pelas glândulas suprarrenais. O cortisol, seu principal precursor, e seus derivados naturais cumprem importantes funções no organismo, como assimilação das proteínas, açúcar, gorduras e minerais, além de terem ações anti-inflamatórias e imunossupressoras e exercerem estimulação cerebral (DAMIANI *et al.*, 2001).

Dentre as famílias de corticoides existentes, destacam-se os glicocorticoides, que controlam o metabolismo dos carboidratos, das gorduras e das proteínas e são anti-inflamatórios. Há um grande número de corticoides sintéticos disponíveis, tais como: cortisona, hidrocortisona, betametasona, dexametasona, prednisona e triancinolona, sob a forma de variados preparados farmacológicos. Seu emprego terapêutico abrange um grande número de condições, sendo as anti-inflamatórias, antialérgicas e imunossupressoras as mais visadas usualmente (DAMIANI *et al.*, 2001).

3.1 A dexametasona

A dexametasona, DEX, cuja nomenclatura química é 9- α -fluor-11 β -17- α -21-triidroxi-16- α -metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona, é um corticoide sintético amplamente utilizado para o tratamento de inflamações sistêmicas (BOURGES *et al.*, 2006). A estrutura química da DEX é mostrada na Figura 9.

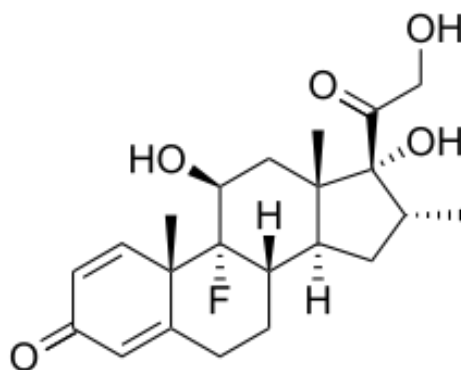


Figura 9: Estrutura química da dexametasona.

Com fórmula molecular $C_{22}H_{29}FO_5$ e massa molar de 392,45 g/mol, a DEX é descrita como um pó cristalino branco e inodoro. Quanto à sua solubilidade, a substância é classificada como insolúvel em água, sendo facilmente solúvel em etanol, acetona e metanol e ainda, levemente solúvel em clorofórmio e éter (COHEN, 1973; ANVISA, 2010).

O efeito principal deste medicamento é a inibição da resposta inflamatória causada por agentes de natureza mecânica, química ou imunológica. Experiências clínicas e de laboratório mostraram que a DEX apresenta maior atividade anti-inflamatória e tempo de meia vida, quando comparada a outros corticoides, sendo cerca de vinte e cinco a trinta vezes mais potente que seu análogo natural, o cortisol (HART, 1960).

Segundo a ANVISA (2010), o doseamento da dexametasona pode ser realizado por cromatografia líquida de alta eficiência, tendo como detector espectrofotômetro UV-VIS em 254 nm. A fase móvel é constituída de uma mistura de metanol em água (75:25).

A DEX pode apresentar-se sob a forma de derivados, como o acetato de dexametasona, cuja estrutura química é mostrada na Figura 10. O fármaco possui massa molar de 435,5 g/mol e fórmula $C_{24}H_{31}FO_6$ (ANVISA, 2010).

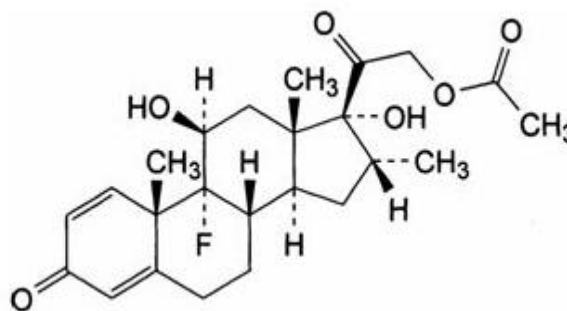


Figura 10: Estrutura química do acetato de dexametasona.

4 TÉCNICAS PARA O PREPARO DE NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas são estruturas sólidas e esféricas preparadas a partir de polímeros naturais ou sintéticos. Encontra-se na literatura uma classificação de tamanho variável para estes sistemas. LE BOURLAIS e colaboradores (1998) e

SOPPIMATH e colaboradores (2001) classificam as nanopartículas como sistemas de tamanhos de 10 nm a 1 μm ; de acordo com HANS e LOWMAN (2002) e SCHAFFAZICK e colaboradores (2003), estes sistemas possuem tamanhos menores que 1 μm ; já DANHIER e colaboradores (2012) as classificam em tamanhos em torno de 100 nm.

As nanopartículas constituem sistemas muito estudados na área farmacêutica nas últimas décadas com o objetivo de prolongar e melhorar o controle da administração de fármacos. Existe uma grande variedade de medicamentos que podem ser disponibilizados a partir de sistemas nanoparticulados, tais como pequenos fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, vacinas e macromoléculas biológicas (HANS e LOWMAN, 2002; DANHIER *et al.*, 2012).

A liberação de fármacos a partir de nanopartículas é uma área de pesquisa interessante e desafiadora. Partículas de dimensão pequena garantem baixa irritação, biodisponibilidade adequada e compatibilidade com os tecidos. O uso da nanotecnologia em sistemas de disponibilização de fármacos pode conduzir à solução de diversas questões relacionadas à solubilidade de medicamentos, prolongamento da exposição ao princípio ativo por liberação controlada e permeação do fármaco. A nanotecnologia pode se tornar a melhor ferramenta para o tratamento de doenças crônicas, em que a administração do fármaco é frequente (SAHOO *et al.*, 2008).

Os problemas associados às nanopartículas poliméricas são devidos aos resíduos de solventes orgânicos gerados durante o processo de produção, a possível toxicidade do polímero e ao aumento da escala para a aplicabilidade industrial. As nanopartículas apresentam alta energia de superfície, o que aumenta a possibilidade de aglomeração, tornando-se instáveis (MEHNERT e MADER, 2012; MELO *et al.*, 2012).

Existem várias técnicas para o preparo de nanopartículas. Dependendo do método utilizado, a organização estrutural pode ser diferente. O fármaco pode ser retido na matriz polimérica, encapsulado em um núcleo, estar quimicamente conjugado ao polímero ou adsorvido em sua superfície (HANS e LOWMAN, 2002).

Dessa forma, podem-se distinguir duas categorias: as nanocápsulas e as nanoesferas, como mostrado na Figura 11.

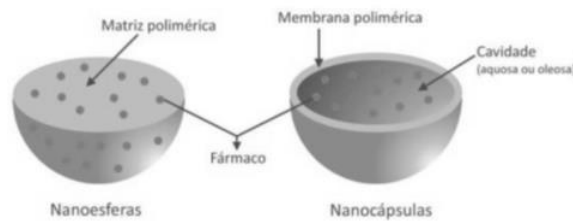


Figura 11: Representação esquemática de nanoesferas e nanocápsulas.
SANTOS e FIALHO (2007).

As nanocápsulas são sistemas vesiculares em que o fármaco encontra-se no interior de uma cavidade oleosa ou aquosa, revestida por uma membrana polimérica. As nanoesferas são sistemas matriciais, onde o fármaco pode estar disperso ou adsorvido. Estes sistemas podem aumentar a solubilidade do fármaco, proteger as substâncias de degradação e ainda modificar seu perfil de distribuição (SANTOS e FIALHO, 2007).

No preparo das nanopartículas, a razão fármaco/polímero deve ser investigada para a obtenção de uma eficiência de encapsulamento elevada e toxicidade reduzida (SOUTO *et al.*, 2012).

Uma técnica comumente utilizada para o preparo de nanopartículas de PLGA é a de evaporação de solvente (KIMURA e OGURA, 2001; CHENG *et al.*, 2008; DANHIER *et al.*, 2012). Esta técnica permite o encapsulamento de fármacos hidrofóbicos e consiste em dissolver o polímero e o fármaco em um solvente orgânico adequado. A emulsão óleo em água, O/A, é preparada pela adição da solução de polímero à solução aquosa, composta por água e um agente tensoativo, utilizado para prevenir a coalescência das gotículas que serão formadas. As gotículas nanométricas são induzidas por sonificação ou homogeneização. A agitação da emulsão é a etapa determinante neste processo. O solvente é então evaporado ou extraído e as nanopartículas recolhidas após centrifugação, sendo lavadas para retirada de resíduos (HANS e LOWMAN, 2002; KIM e MARTIN, 2006; DANHIER *et al.*, 2012). O processo é ilustrado na Figura 12.

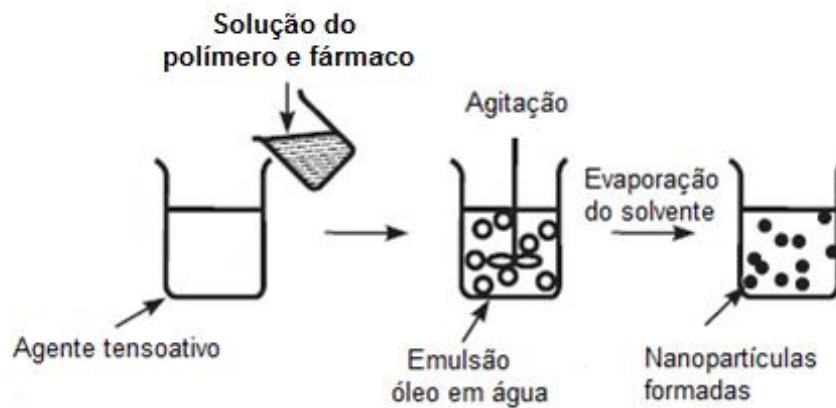


Figura 12: Preparo de nanopartículas pela técnica de evaporação do solvente.

Adaptada de KIMURA e OGURA (2001).

Para incorporar princípios ativos hidrofílicos, utiliza-se uma emulsão múltipla do tipo A/O/A, na qual a fase interna, oleosa, possui gotículas de água dispersas em seu interior (KIMURA e OGURA, 2001).

O método de preparo de nanopartículas por deslocamento de solvente, também denominado nanoprecipitação, é semelhante à técnica descrita acima. Neste caso, o polímero e o fármaco são dissolvidos em solvente polar, constituindo a fase dispersa. A solução é vertida de maneira controlada, por exemplo, por gotejamento, em uma solução aquosa contendo um surfactante, chamada fase contínua. Ocorre então, uma emulsificação espontânea, formando um sistema turvo devido à imiscibilidade de ambas as fases. As nanopartículas são formadas instantaneamente por uma rápida difusão do solvente. Finalmente, o solvente é removido sob pressão reduzida (ARSETE e SABLIOV, 2006; SOUTO *et al.*, 2012).

Tipicamente, este método é usado para o aprisionamento de fármacos hidrofóbicos, mas tem sido adaptado também para moléculas hidrofílicas. Parâmetros importantes a serem considerados são: a relação polímero / surfactante, a concentração de polímero, a natureza e a concentração do surfactante, a natureza do solvente, a viscosidade, a presença ou não de aditivos, a estrutura química do componente ativo e a técnica de injeção da fase dispersa (ARSETE e SABLIOV, 2006).

Outro método também utilizado é o de *salting-out*. Nesta técnica, a fase aquosa é formada por uma solução saturada de um eletrólito e um tensoativo. A emulsão

O/A é preparada sob agitação intensa e, em seguida, diluída em um volume adequado de água deionizada ou de uma solução aquosa, de modo a permitir a difusão do solvente para a fase externa pelo efeito de *salting-out*. Dessa forma, tem-se a separação de fases e a conseqüente formação das nanopartículas. A separação das nanopartículas do excesso de eletrólito e do tensoativo é realizada por ultracentrifugação ou ultrafiltração, obtendo-se ao final uma dispersão aquosa (SOUTO *et al.*, 2012).

Independentemente do método de preparo empregado, os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas. Durante o tempo de armazenamento, podem ocorrer problemas de estabilidade do sistema, como a agregação das nanopartículas no meio (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Os surfactantes são sistemas anfifílicos, amplamente utilizados no estudo de estabilização de emulsões e partículas. A estabilização deve-se ao fato de que as moléculas se adsorvem na interface das gotículas, diminuindo a tensão interfacial e dificultando a coalescência. No preparo das nanopartículas, os tensoativos de alta hidrofília não iônicos, como os polisorbatos, Tween[®], são muito utilizados e a estabilização do sistema é adquirida através do aumento da repulsão estérica (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; SOLANS *et al.*, 2005; FAYAD, 2010). A Figura 13 apresenta a estrutura química do surfactante Tween[®]80.

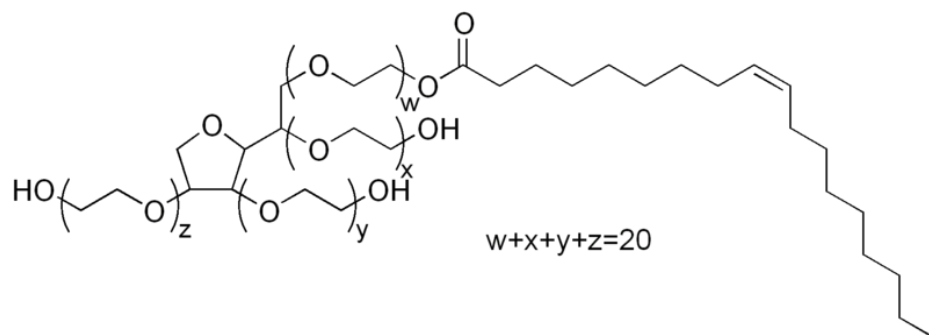


Figura 13: Fórmula estrutural do polisorbato 80, Tween[®]80.

A literatura descreve a utilização de solventes organoclorados, como o diclorometano e o clorofórmio, para a dissolução do polímero. A escolha destes solventes é devido a propriedades como baixa solubilidade em água, baixa temperatura de ebulição e afinidade com um grande número fármacos.

(SANTANDER-ORTEGA *et al.*, 2006; GÓMEZ-GAETE *et al.*, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2009; SOUTO *et al.*, 2012). A remoção destes solventes das formulações é de interesse prático para aplicação dos sistemas e segurança dos pesquisadores, por tratarem-se de substâncias tóxicas. Além disso, geram problemas ambientais quando dispostos de forma incorreta.

5 MODELOS CINÉTICOS DE LIBERAÇÃO

A modelagem matemática dos sistemas de liberação e previsibilidade de disponibilização do fármaco é um campo de cada vez maior importância acadêmica e industrial e apresenta um enorme potencial futuro. Estes modelos visam elucidar o comportamento do material e fornecer mecanismos de previsão da cinética de liberação (LAO *et al.*, 2011).

A grande maioria dos modelos teóricos baseia-se em equações de difusão. O fenômeno da difusão está intimamente ligado à estrutura do material através do qual o processo ocorre, sendo a morfologia dos polímeros levada em consideração no modelo. Inúmeras teorias matemáticas para descrever os sistemas de liberação de fármacos são apresentadas na literatura (SIEPMANN e GÖPFERICH, 2001; BAKER, 2004; SIEPMANN e SIEPMANN, 2008; LAO *et al.*, 2011; SIEPMANN e PEPPAS, 2011).

A difusão pode ser descrita como o movimento espontâneo de moléculas de uma zona de elevada concentração para uma área de baixa concentração em um dado volume. Fick (1855-1995) introduziu uma das primeiras análises deste fenômeno de transporte de massa. Seu trabalho é reconhecido por duas equações fundamentais, chamadas Leis de Fick da difusão (HINES e MADDOX, 1985).

A Primeira Lei é usada para descrever a difusão em estado estacionário, isto é, quando a concentração não se altera em relação ao tempo, dependendo somente da posição. Para o caso unidimensional, a Lei de Fick pode ser escrita como apresentado pela Equação 1.

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (1)$$

onde J é o fluxo difusivo, ou seja, a quantidade de partículas do fármaco que passa através de uma unidade de área por unidade de tempo; C é a concentração da espécie, dependente apenas da posição; D é o coeficiente de difusão do fármaco, dependente da natureza deste; e x é a posição normal ao plano central da membrana / filme. O sinal negativo mostra que a difusão ocorre contra o gradiente de concentração.

A Segunda Lei, representada pela Equação 2, é usada para descrever o sistema em estado transiente, isto é, quando a concentração varia não só com a posição, mas também com o tempo.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (2)$$

Todos os parâmetros possuem o mesmo significado que na Eq. 1, exceto C , que agora representa a concentração da espécie dependente do tempo e da posição.

Ambas as equações formaram a base de vários modelos teóricos e empíricos de liberação de fármacos desenvolvidos nas últimas décadas (SIEPMANN e SIEPMANN, 2008; LAO *et al.*, 2011).

Um modelo é uma simplificação do sistema real, e sua aplicabilidade e adequação são restritas. Um modelo adequado com poder preditivo comprovado é uma ferramenta importante no desenvolvimento de novas tecnologias, permitindo a previsão do mecanismo de liberação do fármaco.

5.1 Modelo de liberação de ordem zero

O modelo de ordem zero pode ser utilizado para descrever a liberação do fármaco a partir de vários tipos de sistemas. A cinética de ordem zero exibe um perfil perfeito, uma vez que descreve a liberação de concentrações iguais de fármaco por unidade de tempo, ou seja, a taxa de liberação é constante e independente da concentração de fármaco (SILVA *et al.*, 2012). A Equação 3 representa o modelo de liberação de ordem zero.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_0 \cdot t \quad (3)$$

sendo $\frac{M_t}{M_\infty}$ a fração do fármaco liberada no tempo t e k_0 a constante cinética de ordem zero.

5.2 Modelo de liberação de primeira ordem

A aplicação do modelo de primeira ordem foi proposta pela primeira vez por Gibaldi e Feldman em 1967. As formas farmacêuticas que seguem o perfil de primeira ordem geralmente são aquelas que contêm fármacos hidrossolúveis em uma matriz porosa. Este modelo caracteriza-se por apresentar a liberação do fármaco de forma proporcional à quantidade remanescente em seu interior, de modo que a quantidade de fármaco liberada por unidade de tempo diminui (MANADAS *et al.*, 2002). Apresenta-se na Equação 4 o modelo matemático utilizado para descrever a cinética de primeira ordem.

$$\frac{dM}{dt} = KS(C_S - C) \quad (4)$$

sendo $\frac{dM}{dt}$ a taxa de passagem do soluto para a solução ao tempo t e K é uma constante. S é área da superfície de liberação, C_S é a concentração de saturação do fármaco no material do núcleo e C é a concentração da substância que se difunde. Após integrar e aplicar logaritmos decimais a Equação 4, obtém-se a Equação 5.

$$\log M_t = \log M_\infty + \frac{k_1 t}{2,303} \quad (5)$$

onde M_t é a quantidade de fármaco liberado no tempo t , M_∞ é a quantidade inicial de fármaco na solução e k_1 é a constante de liberação de primeira ordem.

5.3 Modelo de Higuchi

O pioneiro da modelagem matemática de liberação de fármacos é o professor Takeru Higuchi. Em 1961, ele publicou sua famosa equação permitindo uma descrição simples para a liberação de fármacos a partir de um sistema monolítico, em que as partículas do fármaco estão dispersas uniformemente por toda a matriz. Seu trabalho assume estado estacionário ou pseudoestacionário, de forma que a primeira Lei de Fick pode ser aplicada (SIEPMANN e SIEPMANN, 2008; LAO *et al.*, 2011). Para uma geometria de filme fino e negligenciando efeitos de borda, a equação de Higuchi pode ser simplificada como mostrado pela Equação 6.

$$\frac{M_t}{A} = \sqrt{2DC_0C_s t} \quad (6)$$

onde M_t é a quantidade acumulada de fármaco liberada no tempo t ; A é a área média da superfície do filme exposto à liberação; D é o coeficiente de difusão do fármaco no material de suporte; e C_0 e C_s representam a concentração inicial e a solubilidade do fármaco, respectivamente.

A aplicação deste modelo requer algumas considerações (SIEPMANN e SIEPMANN, 2008; SIEPMANN e PEPPAS, 2011):

- (i) A concentração inicial do fármaco no sistema deve ser muito maior do que a solubilidade do fármaco ($C_0 \gg C_s$). Este aspecto é crucial, porque fornece a base para a justificativa do estado pseudoestacionário aplicada na abordagem do sistema.
- (ii) A geometria do dispositivo é a de uma película fina com efeitos de borda negligenciáveis.
- (iii) O tamanho das partículas do fármaco é muito menor do que a espessura do filme.
- (iv) O material de suporte não incha ou dissolve.
- (v) A difusividade do fármaco é constante, não dependente do tempo ou posição.

Após a exposição a condições de imersão perfeitas, as moléculas do fármaco começam a se difundir. Inicialmente, a difusão ocorre apenas perto da superfície do

material suporte. Como a difusão do fármaco é rápida e um grande excesso de fármaco é fornecido, as moléculas que passaram pela superfície de difusão são rapidamente substituídas por partículas de fármaco não dissolvidas localizadas nesta região. Assim, a concentração de moléculas de fármaco dentro da base permanece constante. Apenas quando todas as partículas de fármaco localizadas na região próxima à superfície finalmente se difundem, a concentração cai abaixo da concentração de saturação. Posteriormente, devido a gradientes de concentração, moléculas de fármaco localizadas mais longe da película também sofrem difusão (SIEPMANN e PEPPAS, 2011).

O perfil de concentração de um fármaco homogeneamente disperso é ilustrado na Figura 14. A linha sólida representa o perfil de concentração após exposição do sistema por um determinado período de tempo t e h é a distância que separa a superfície do filme do excesso de fármaco não dissolvido (frente de difusão). Por esta distância h , o gradiente de concentração é essencialmente constante, desde que a concentração inicial de fármaco no interior do sistema, C_0 , seja muito maior do que a solubilidade do fármaco, C_s ($C_0 \gg C_s$). Após um intervalo de tempo adicional, Δt , o perfil de concentração do fármaco é indicado pela linha pontilhada (SIEPMANN e SIEPMANN, 2008).

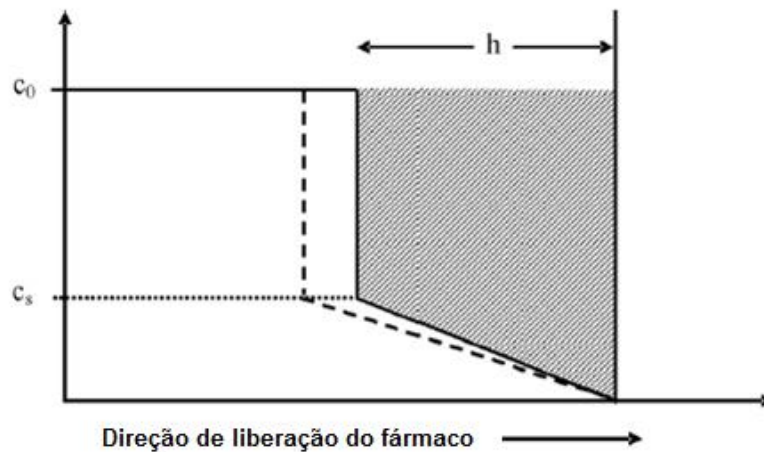


Figura 14: Representação esquemática de um sistema de liberação de fármaco de acordo com o modelo de Higuchi.

Adaptada de SIEPMANN e SIEPMANN (2008).

Genericamente, é possível resumir o modelo de Higuchi como mostrado na Equação 7, obedecendo todas as prerrogativas do modelo anteriormente citadas (COSTA e LOBO, 2001).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \cdot \sqrt{t} \quad (7)$$

onde k_H é a constante cinética de Higuchi, que descreve a liberação do fármaco como um processo de difusão baseado na Lei de Fick. A taxa de liberação é dependente da estrutura química do fármaco.

5.4 Modelo de Peppas

Em 1983, Peppas e colaboradores introduziram um modelo semi-empírico para descrever a liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos. O modelo conhecido como lei de potência é apresentado pela Equação 8 (LAO *et al.*, 2011).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = at^n \quad (8)$$

onde a é uma constante que combina as características geométricas e estruturais do sistema polímero / fármaco; e n é o expoente de liberação, indicativo do mecanismo de transporte.

A lei de potência pode ser vista como uma equação geral útil para descrever vários mecanismos de transporte, incluindo a difusão Fickiana, o transporte não-Fickiano, bem como o comportamento de liberação de ordem zero. Para filmes finos, a difusão Fickiana é o mecanismo de transporte dominante quando $n = 0,5$, enquanto que o transporte não-Fickiano é descrito por $0,5 < n < 1$. Quando $n = 1$, a liberação de ordem zero é obtida. Os valores de n para esferas e cilindros são listados na Tabela 2 (LAO *et al.*, 2011).

Tabela 2: Valores para o expoente n da Equação de Peppas para diferentes geometrias.

Expoente n			Mecanismo de liberação
Filme fino	Cilindro	Esfera	
0,5	0,45	0,43	Difusão Fickiana
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 1,0$	$0,43 < n < 1,0$	Transp. Não-Fickiano
1,0	1,0	1,0	Liberação de ordem zero

LAO *et al.* (2011).

O modelo de Peppas é genericamente utilizado para analisar a liberação de formas farmacêuticas poliméricas, quando o mecanismo de liberação não é bem conhecido ou quando mais de um tipo de mecanismos de liberação podem estar envolvidos (MANADAS *et al.*, 2002).

O tipo de fármaco, sua forma, cristalinidade, tamanho de partícula, solubilidade e quantidade incorporada na forma farmacêutica podem influenciar a cinética de liberação. A forma como a erosão do polímero ocorre condiciona o perfil de liberação do fármaco. Para fármacos muito solúveis, a liberação é determinada principalmente pela difusão e para fármacos pouco solúveis a liberação é controlada pelo processo de erosão (MANADAS *et al.*, 2002). Estes processos de liberação são mostrados na Figura 15.

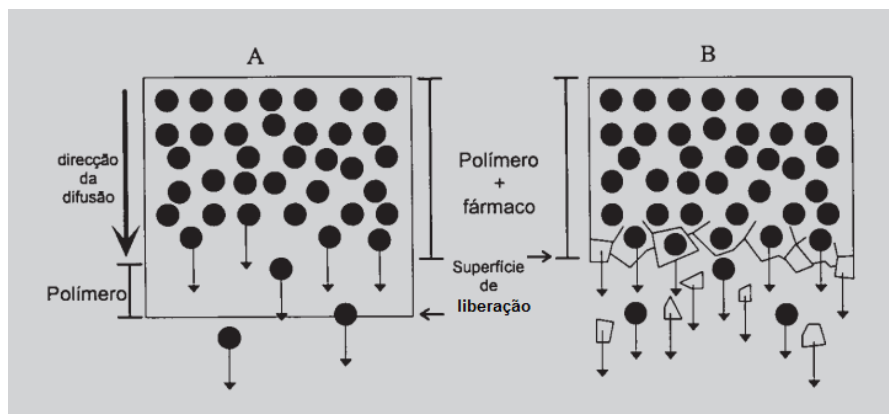


Figura 15: Processo de difusão (A) e erosão (B) em matriz polimérica.

MANADAS *et al.* (2002)

6 EXEMPLO DE APLICAÇÃO: TRATAMENTO DE DOENÇAS OCULARES

O olho humano é um sistema que apresenta características anatômicas singulares que dificultam o acesso a medicamentos. O tratamento de doenças que acometem o segmento posterior do olho, como a uveíte, é dificultado pelas barreiras protetoras oculares existentes, constituindo um desafio para o desenvolvimento de sistemas de transporte de fármacos mais eficientes (AMO e URTTI, 2008; SAHOO *et al.*, 2008).

O tratamento farmacológico de patologias oculares é conduzido, normalmente, pelas vias de administração sistêmica e tópica. A via sistêmica apresenta limitações relacionadas à concentração do princípio ativo nos tecidos oculares, enquanto a biodisponibilidade dos fármacos oftálmicos é afetada pelos eficientes mecanismos de proteção do olho a partir da aplicação tópica (AMO e URTTI, 2008).

A administração de nanopartículas poliméricas na superfície ocular tem sido alvo de intensas pesquisas nos últimos anos, com intuito de aumentar a absorção do princípio ativo e fornecer proteção ao fármaco, permitindo prolongar sua exposição por liberação controlada, além de constituir-se uma técnica de tratamento menos invasiva (SAHOO *et al.*, 2008).

A uveíte é uma doença decorrente da manifestação de processos inflamatórios na porção do trato uveal, que é formado pelo corpo ciliar, íris e coroide (YASUKAWA *et al.*, 2004; SRIVASTAVA *et al.*, 2010).

Estima-se que os casos de uveíte são responsáveis por 3 a 15% de todas as causas de cegueira mundial. Entre os indivíduos que apresentam a doença, pelo menos 35% sofrem graves sequelas, que vão desde o comprometimento da visão até a cegueira plena (HESSENLINK *et al.*, 2004).

Para a administração de fármacos no segmento posterior do olho, a injeção intravítrea constitui melhor alternativa às aplicações tópica e sistêmica. Trata-se da administração direta do medicamento na parte interior do bulbo do olho, na forma de solução, partículas, suspensão ou implantes. A principal desvantagem desta via está relacionada à necessidade de injeções repetidas para manter o nível terapêutico do fármaco, podendo ocasionar endoftalmite, deslocamento da retina, perfuração do olho e aumento da pressão intraocular (AMO e URTTI, 2008; THRIMAWITHANA *et al.*, 2011). A Figura 16 apresenta um esquema da rota de administração intravítrea.

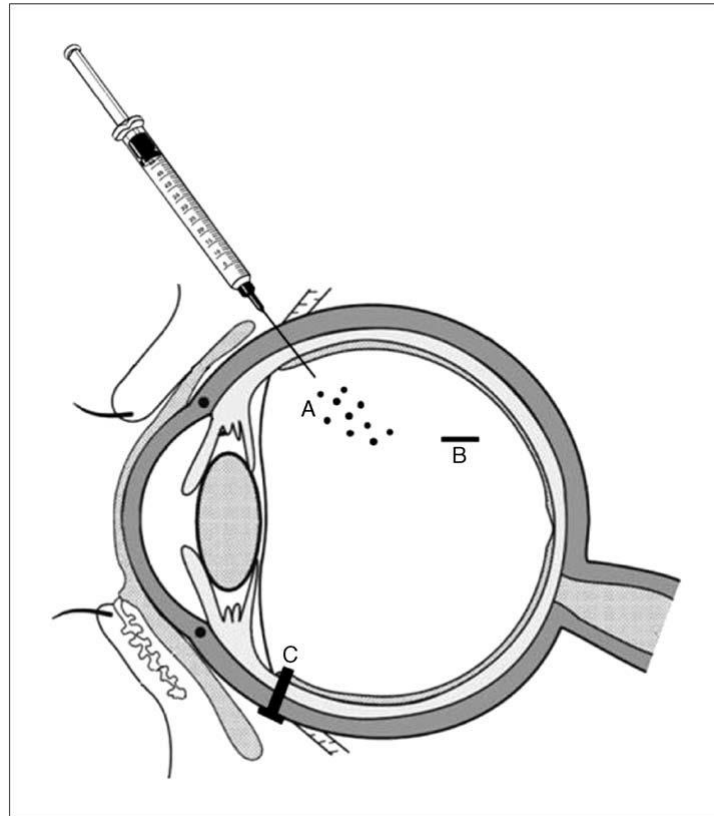


Figura 16: Apresentação esquemática da rota de administração ocular intravítrea.
(A) Injeção de micro ou nanopartículas; (B) Introdução cirúrgica de implante; (C)
Implante suturado sobre a esclera.

THRIMAWITHANA *et al.* (2011).

Com o intuito de minimizar essa dificuldade de disponibilização e os efeitos colaterais do tratamento, novos sistemas para liberação de fármacos têm sido desenvolvidos e estudados. Os implantes, as microesferas e lipossomas são exemplos destes sistemas (AMO e URTTI, 2008). A Tabela 3 apresenta um comparativo entre as vias de administração mais comumente utilizadas.

Os corticoides são a classe de fármacos mais usual para o tratamento de todos os tipos de uveíte, demonstrando-se um eficiente anti-inflamatório (FINAMOR *et al.*, 2002; JAFFE *et al.*, 2006; GÓMEZ-GAETE *et al.*, 2007; TAYLOR *et al.*, 2010).

Tabela 3: Vantagens e desvantagens das formas e vias de disponibilização de fármacos para o tratamento de doenças oculares do segmento posterior.

Via de administração	Vantagens	Desvantagens
Tópica	<ul style="list-style-type: none"> - Fácil aplicação - Método não invasivo - Boa aceitação dos pacientes 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa biodisponibilidade - Ineficaz para o tratamento de doenças no segmento posterior - Altas concentrações são necessárias
Sistêmica	<ul style="list-style-type: none"> - Mais eficiente para o tratamento de doenças no segmento posterior se comparada ao uso de colírios 	<ul style="list-style-type: none"> - Fármacos não atravessam a barreira hemato-ocular - Altas concentrações são necessárias
Injeção intravítrea	<ul style="list-style-type: none"> - Promove melhor absorção do fármaco - Disponibilização no local de ação 	<ul style="list-style-type: none"> - Necessidade de muitas aplicações, devido à rápida eliminação do ativo, podendo levar a outras complicações - Baixa aceitação dos pacientes
Implantes	<ul style="list-style-type: none"> - Estabilização do fármaco - Períodos prolongados de liberação 	<ul style="list-style-type: none"> - Efeitos colaterais - Remoção cirúrgica dos implantes não biodegradáveis - Erosão final não controlada e ocorrência de explosão inicial nos implantes biodegradáveis
Micropartículas, nanopartículas e lipossomas	<ul style="list-style-type: none"> - Estabilização do fármaco e aumento do tempo de meia-vida - Menor possibilidade de explosão devido ao pequeno volume - Melhor adesão do paciente e conveniência 	<ul style="list-style-type: none"> - Riscos relacionados à injeção - Relações Concentração / Volume desfavorável - Opacidade do vítreo

Adaptado de AMO e URTTI (2008).

7 PRINCIPAIS TRABALHOS

Apresentam-se, nesta seção, os principais avanços relatados na literatura para sistemas de liberação semelhantes ao estudado neste trabalho, com o objetivo de delinear uma cronologia dos estudos na área.

BECK e colaboradores (2003) apresentaram uma técnica de preparo de nanopartículas por evaporação de solventes para o estudo da liberação de dexametasona sem a utilização de solventes organoclorados. O polímero PLA foi

dissolvido em acetona, juntamente com Span[®]80 e dexametasona. A solução orgânica foi gotejada lentamente, sob agitação magnética, em uma solução de Tween[®]80 e água. De acordo com os resultados obtidos, as suspensões mostraram-se pouco estáveis, sendo necessários estudos para melhorar esta propriedade.

ZWEERS e colaboradores (2006) avaliaram a aptidão dos copolímeros em bloco do poli(óxido de etileno) e poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), PEO-PLGA, como nanopartículas portadoras das fármacos dexametasona ou rapamicina. As partículas foram preparadas sem estabilizador adicional utilizando o método de *salting out*. A liberação completa foi observada em 5 horas para ambos os fármacos. A taxa de liberação do fármaco foi substancialmente reduzida por tratamento das partículas com gelatina ou albumina após o carregamento de fármaco, resultando em um perfil de liberação linear com o tempo. Foi mostrado também que a taxa de liberação do fármaco estava relacionada com a quantidade de proteína associada. Após o tratamento com gelatina, a liberação de dexametasona ocorreu durante 17 dias e de rapamicina alcançou 50 dias.

GÓMEZ-GAETE e colaboradores (2007) estudaram o encapsulamento de dexametasona em nanopartículas de PLGA, preparadas pelo método de evaporação do solvente. A influência de vários parâmetros foi investigada, como o tipo de solvente orgânico e polímero, a massa de DEX inicial, a taxa de evaporação do solvente, a saturação da fase contínua e a incorporação de um lipídio no polímero. O tamanho das nanopartículas e potencial zeta não foram modificados na presença do fármaco e foram, respectivamente, cerca de 230 nm e -4 mV. Os melhores resultados de liberação foram obtidos usando 100 mg de PLGA 75:25 em 5 mL de solução de acetona-diclorometano 1:1 (v/v) e 10 mg de DEX. O fármaco foi completamente liberado a partir desta formulação após 4 horas de incubação a 37°C. Apresenta-se, na Figura 17, o perfil de liberação obtido neste trabalho para a formulação descrita.

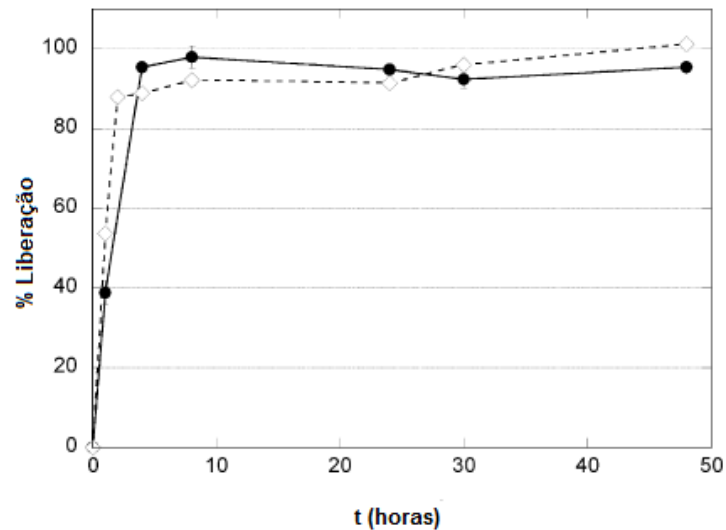


Figura 17: Perfil de liberação *in vitro* de dexametasona a partir de nanopartículas, sendo (●) para formulação sem lipídio e (◊) para formulação com o lipídio.

GÓMEZ-GAETE *et al.* (2007).

KLOSE e colaboradores (2008) mostraram que a liberação de um medicamento em sistemas baseados em PLGA não depende somente das suas próprias propriedades físico-químicas, mas também do tamanho e da forma do dispositivo. Sistemas em forma de partículas e filmes de várias dimensões de PLGA contendo ibuprofeno e lidocaína foram preparados e caracterizados. Os resultados experimentais obtidos foram analisados utilizando modelagem matemática baseada na Segunda Lei de Fick. O tipo de fármaco e a geometria do dispositivo afetaram significativamente a cinética de liberação resultante. A liberação de ibuprofeno foi mais rápida do que a de lidocaína, devido a maiores interações iônicas entre esta e o PLGA, dificultando a difusão. Além disso, a taxa de liberação, para os sistemas particulados, não foi afetada pelo tamanho, mas, para os filmes, mostrou-se dependente da espessura.

Duas formulações de microesferas de PLGA com diferentes massas moleculares foram investigadas por ZOLNIK e BURGESS (2008) para determinar se uma relação *in vitro/in vivo* poderia ser estabelecida para a liberação de dexametasona. Idealmente, métodos *in vitro* devem ser selecionados visando atingir uma correlação de dados com a condição *in vivo*. As formulações exibiram um perfil típico trifásico para o teste *in vitro*, com uma brusca liberação inicial, uma fase estável seguida por uma aparente fase de ordem zero. *In vivo*, as microesferas exibiram um perfil de

liberação bifásico. A falta de uma fase de latência pode ser resultado de uma diferente degradação do polímero pela ação de enzimas presentes no meio.

FECZKÓ e colaboradores (2011) avaliaram a influência das condições de processo no tamanho médio de nanopartículas de PLGA com albumina de soro bovino, uma proteína modelo, preparadas pelo método de emulsão múltipla do tipo A/O/A. Os dados foram analisados através de um planejamento experimental 5^3 . Os resultados mostraram que a concentração de PLGA e o tempo de sonicação são os fatores mais significativos sobre o tamanho médio das nanopartículas. A razão de volume entre as fases aquosa externa e orgânica interna, concentração da proteína e do tensoativo utilizado seguiram em ordem de significância.

SHEN e BURGESS (2012) avaliaram o efeito de condições aceleradas em testes de liberação de dexametasona a partir de sistemas compostos por microesferas de PLGA e hidrogéis de PVA. Os testes em condições extremas de pH e elevada temperatura correlacionaram bem com condições normais de liberação, 37°C e pH 7,4, podendo esses ser empregados como rápido sistema de controle de qualidade.

ALI e colaboradores (2013) apresentaram um estudo para o desenvolvimento e avaliação de nanopartículas de PLGA contendo dexametasona para o transporte de fármacos através da placenta humana. A partir de um planejamento experimental investigou-se a influência dos parâmetros do processo nas características dos sistemas obtidos. As nanopartículas apresentaram forma esférica, tamanhos de 140 a 298 nm e eficiência de encapsulamento entre 52 e 89%.

Para melhorar o tempo de residência e a penetração ocular de fármacos, GUPTA e colaboradores (2013) avaliaram o efeito da combinação de um gel às nanopartículas. Neste caso, as nanopartículas de PLGA foram incorporadas em um gel de quitosana. A formulação combinada foi testada quanto a propriedades físico-químicas e apresentou melhores resultados em relação às nanopartículas simples, permanecendo por mais tempo no olho.

OBJETIVOS

1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo investigar a preparo e a caracterização de nanopartículas de PLGA na ausência de solventes organoclorados contendo acetato de dexametasona, visando o desenvolvimento de sistemas para liberação de fármacos.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos, destacam-se:

- Avaliar o preparo de nanopartículas na ausência de solventes organoclorados pela técnica de nanoprecipitação;
- Caracterizar as nanopartículas de PLGA contendo acetato de dexametasona em relação ao tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, morfologia e temperatura de transição vítrea, utilizando as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espalhamento dinâmico da luz e calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Desenvolver e validar a metodologia analítica para quantificação do fármaco acetato de dexametasona por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Determinar a eficiência de encapsulamento e quantificar a liberação do fármaco por CLAE;
- Determinar a cinética de liberação do fármaco e inferir a respeito do mecanismo do processo.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 REAGENTES

Para o preparo das nanopartículas utilizaram-se os seguintes reagentes:

- PLGA (Sigma Aldrich, L:G 75:25, massa molar de 66 a 107 kDa);
- Tween[®] 80 (Sigma Aldrich);
- Acetato de dexametasona (Tianjin Tianyao Phar - China, pureza de 101,21%);
- Acetona P.A. (Synth);
- Etanol Absoluto P.A. (Synth).

Para o desenvolvimento e validação do método analítico de quantificação do fármaco utilizou-se:

- Acetonitrila (TEDIA[®], grau cromatográfico);
- Metanol (TEDIA[®], grau cromatográfico);
- Água ultra pura (Milli-Q, grau cromatográfico);
- Acetato de dexametadona padrão (Sigma Aldrich, pureza > 99%).

Os ensaios de liberação foram realizados em tampão fosfato salino (PBS), pH = 7,4 no intuito de simular a condição ocular e os demais testes foram realizados em água destilada. Neste trabalho utilizou-se o PLGA em razão L:G 75:25. Esta escolha foi devido a resultados anteriores de trabalhos do grupo de pesquisa com este polímero (SANTOS e FIGUEIREDO, 2012).

2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos:

- Balança Analítica (Mettler Toledo AE200, Brasil);
- Centrífuga (Eppendorf 5514 R, Brasil);
- Potencial Zeta (Malvern Instruments Ltd, Inglaterra);
- MEV (JEOL JSM - 6360LV, Japão);
- DSC (Poly Science – K-A101006731, EUA);
- Liofilizador Modulyo D Freeze Dryer (Thermo Electron Corporation);

- Lavadora Ultrassônica (Unique, Brasil);
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters® - bomba Waters® 515 e auto-injetor Waters® 717 plus, detector Waters® 486 UV-VIS;
- Coluna cromatográfica - Chromolith™ C18, de 4,6 mm de diâmetro, 100 mm de comprimento, partícula de 5 µm (Merk, Alemanha);
- Membrana de filtração de celulose de 0,45 µm (Durapore, Millipore®, Brasil);
- Banho térmico (Frigomix B. Braun Biotech International, Alemanha) com regulador térmico (Thermomix B. Braun Biotech International, Alemanha) acoplado;
- Dispositivo de filtração centrífuga de celulose regenerada Amicon® Ultra 3K — 3000 NMWL (Millipore®, Brasil);

3 PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas de PLGA sem a adição do fármaco foram preparadas pela técnica de nanoprecipitação. Primeiramente, o polímero foi dissolvido em acetona, constituindo a fase dispersa. Esta solução foi transferida, por gotejamento, para uma fase contínua, composta por água e etanol, sob agitação magnética, contendo um tensoativo. O etanol foi utilizado com o intuito de diminuir a possibilidade de hidrólise do polímero.

Neste trabalho, foi investigada a utilização de solventes não organoclorados, como a acetona, minimizando os possíveis efeitos de toxicidade. Já o tensoativo utilizado foi o Tween® 80. A Figura 18 ilustra a montagem utilizada para o gotejamento.

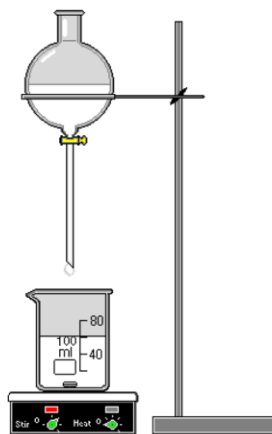


Figura 18: Montagem experimental para gotejamento.

A mistura resultante foi mantida sob agitação magnética por 5 horas em temperatura ambiente para a evaporação dos solventes voláteis. Logo depois, a mistura foi centrifugada a 15700 g por 40 min, para separação das nanopartículas formadas, e lavadas com água destilada, garantindo a retirada de resíduos. A fração sólida foi eluída em 1 mL de água destilada e acondicionada em tubos plásticos para posterior ensaios de caracterização.

As variáveis investigadas durante o preparo das nanopartículas foram: fração volumétrica de etanol na solução etanol/água, que variou de 0,5 a 0,8; concentração de surfactante, sendo avaliada na faixa de 2 a 6 % (m/v); concentração de polímero, variando de 3,7 a 7,4 g/L; e razão volumétrica das fases dispersa/contínua, na proporção de 0,25 a 0,5. A avaliação destes parâmetros foi realizada por meio de um planejamento experimental 2^{4-1} com réplicas no ponto central. Os resultados apontaram a condição mais adequada para o preparo das nanopartículas contendo o fármaco.

O método de preparo das nanopartículas contendo acetato de dexametasona foi semelhante ao descrito acima, sendo o fármaco adicionado à fase contínua, já contendo o PLGA e a acetona. A concentração máxima de acetato de dexametasona foi de 200 µg/mL de suspensão. As nanopartículas formadas, após centrifugação, foram também armazenadas em tubos de plástico e avaliadas.

4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A caracterização das nanopartículas consistiu na avaliação morfológica, distribuição de tamanho de partícula, determinação do potencial zeta, determinação da quantidade de fármaco encapsulado nas nanoestruturas, estudo da cinética de liberação do fármaco e avaliação da estabilidade. O conjunto de informações obtidas pelas técnicas de caracterização dos sistemas pode conduzir à proposição de modelos que descrevam a organização das nanopartículas e o perfil de liberação do fármaco.

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura e calorimetria diferencial de varredura, as amostras de nanopartículas foram previamente liofilizadas, uma técnica de separação baseada na sublimação. Para a liofilização, congelaram-se as amostras em N₂ líquido ou gelo seco. A temperatura foi mantida

em -55 °C e a pressão estável durante o procedimento. A liofilização foi realizada na Fundação Ezequiel Dias, FUNED.

4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Microscopia Eletrônica de Varredura, MEV, foi realizada com o objetivo de visualizar a morfologia das nanopartículas e inferir a respeito da estrutura das amostras. O princípio de funcionamento do MEV consiste na emissão de feixes de elétrons por um filamento de tungstênio, mediante a aplicação de uma diferença de potencial. Este fluxo de elétrons sobre a superfície amostra gera uma imagem da sua topografia. No caso de análises que envolvem materiais sensíveis ao feixe eletrônico, como polímeros, as amostras devem ser previamente metalizadas (DEDAVID *et al.*, 2007). Dessa forma, a amostra obtida foi submetida a um prévio recobrimento por uma fina camada de ouro. A diferença de potencial aplicada durante o procedimento foi de 10 kV.

As análises de MEV foram realizadas no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG (CM-UFMG).

4.2 Potencial Zeta

O potencial zeta consiste no potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Dessa forma, o potencial zeta é a diferença de tensão elétrica entre a superfície da partícula e sua suspensão líquida, permitindo inferir sobre a estabilidade do sistema. No mesmo equipamento, foram avaliados também o tamanho e a distribuição de tamanho das nanopartículas por espalhamento dinâmico da luz.

As amostras foram previamente diluídas em água destilada na razão 1:3 e dispersas em banho de ultrassom. Os resultados foram apresentados como a média de três medidas.

Os ensaios de potencial zeta foram realizados em parceria com a professora Rosana Zacarias Domingues, no Departamento de Química/UFMG.

4.3 Calorimetria Diferencial de Varredura

Análise térmica é um termo que abrange um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou temperatura, enquanto a temperatura da amostra, sob uma atmosfera específica, é submetida a uma programação controlada. Os resultados da análise térmica fornecem dados para a identificação de alterações na conformação e ou no empacotamento das cadeias poliméricas em função das modificações químicas sofridas durante o processo de encapsulamento do fármaco (DENARI e CAVALHEIRO, 2012). As análises térmicas foram conduzidas no Departamento de Metalurgia/UFMG em parceria com o professor Rodrigo Oréfice.

Testes de calorimetria diferencial de varredura, DSC, foram realizados para determinar a temperatura de transição vítrea do PLGA com o objetivo de inferir a respeito das mudanças conformacionais do polímero em função do teor de acetato de dexametasona e também da rota de preparo das nanopartículas. Nestes ensaios, cerca de 10 mg da amostra foram aquecidos de 30 a 80 °C, a uma taxa de 10°C/min e resfriados até 10 °C na taxa de 10 °C/min, para remover a história térmica do polímero. Logo depois, procedeu-se uma nova etapa de aquecimento de 10 a 80 °C, a 10 °C/min, sob atmosfera de N₂ a 30 mL/min. A T_g do material foi obtida a partir da curva do segundo aquecimento.

4.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O objetivo da cromatografia é separar individualmente os constituintes de uma mistura para sua identificação, quantificação ou obtenção da substância pura. A propriedade física envolvida neste processo é a diferença de afinidade das substâncias, sendo que a separação dá-se pela migração da amostra através de

uma fase estacionária por intermédio de um fluido, chamado de fase móvel. Os componentes da amostra se distribuem entre as duas fases e são transportados pela coluna cromatográfica. O equilíbrio de distribuição determina a velocidade em que cada componente migra através do sistema (ARGENTON, 2010).

Na cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE, a amostra é dissolvida em um solvente e introduzida na coluna preenchida com a fase estacionária. A fase móvel é bombeada com vazão constante e desloca os componentes da mistura através da coluna. Estes se distribuem entre as duas fases de acordo com suas afinidades. As substâncias com maior afinidade pela fase estacionária movem-se mais lentamente. Ao sair da coluna, os componentes passam por um detector (ARGENTON, 2010).

As análises de CLAE foram utilizadas para determinar a eficiência de encapsulamento de acetato de dexametasona nas nanopartículas de PLGA, bem como quantificar sua liberação durante os ensaios. Os testes foram realizados no laboratório de tecnologia farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

4.4.1 Desenvolvimento e validação do método de análise de acetato de dexametasona por CLAE

O desenvolvimento do método analítico de análise para o fármaco acetato de dexametasona por CLAE foi realizado por meio de adaptações de métodos já descritos na literatura. A validação do método foi feita de acordo com a resolução nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, e com o Guia de Esclarecimentos sobre a Aplicação da RE Nº 899/2003 (ANVISA, 2008).

Inicialmente, definiu-se o comprimento de onda de absorbância máxima do fármaco acetato de dexametasona, segundo trabalho de CUNHA (2011). A fase móvel utilizada constituiu-se de solução de acetonitrila, ACN, em água. Foram testadas diferentes proporções da fase móvel em vazões variando entre 1,0 e 2,0 mL/min e os modos de operação isocrático e gradiente, como mostrado na Tabela 5. O volume de injeção foi de 20 µL e os ensaios foram realizados em temperatura ambiente de 25 °C. O comprimento de onda de absorbância máxima do fármaco acetato de dexametasona foi 235 nm.

No modo de vazão gradiente a proporção da fase móvel é definida no equipamento por meio de uma programação, como mostrado na Tabela 4. Dessa

forma, tem-se uma corrida mais seletiva, sendo maior a possibilidade de separação do fármaco dos demais constituintes.

Tabela 4: Proporção da fase móvel e vazões utilizadas nos testes.

Modo de vazão	Fase Móvel (ACN/Água)	Tempo (min)	Vazão (mL/min)
Isocrático	35:65	8	1,2 – 2,0
Isocrático	40:60	8	1,2 – 1,5
Gradiente	10:90	3	1,0
	50:50	5	
	90:10	10	
Gradiente	30:70	0	1,0
	70:30	4	
	70:30	5	
	90:10	6	
	90:10	7	
	70:30	10	

Segundo a ANVISA (2003), o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, sendo que todo método desenvolvido e não descrito em farmacopeias ou formulários oficiais deve ser validado. Foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

A seletividade verifica a capacidade de o método medir exatamente um composto na presença de outros componentes, como impurezas, produtos de degradação e demais constituintes do sistema. A seletividade para o fármaco acetato de dexametasona foi avaliada pela análise cromatográfica de todos os componentes do sistema separadamente, sendo os cromatogramas obtidos posteriormente analisados em conjunto.

O estudo da linearidade permite demonstrar que as respostas obtidas são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico. As soluções padrões obtidas para construção da curva analítica foram filtradas em membrana com tamanho de poro de 0,45 µm e injetadas em triplicata no cromatógrafo, registrando-se os respectivos valores das áreas. Os resultados foram tratados estatisticamente pelo teste dos mínimos quadrados, obtendo-se a regressão linear.

A curva analítica foi construída em cinco níveis de concentração, no intervalo de 4 a 80 $\mu\text{g/mL}$. Para tanto, preparou-se uma solução estoque de acetato de dexametasona em ACN de 100 $\mu\text{g/mL}$ e a partir desta, realizou-se diluições conforme descrito na Tabela 5. Para a solução estoque pesou-se exatamente 2,5 mg do padrão acetato de dexametasona e transferiu-se para um balão volumétrico de 25 mL, tendo seu volume aferido com ACN. Com o auxílio de uma pipeta automática retirou-se alíquotas da solução estoque e transferiu-se para balões volumétricos. Foram preparadas soluções para a construção de três curvas.

Tabela 5: Sequência de diluições realizadas para construção da curva analítica.

Alíquota (mL)	Balão volumétrico (mL)	Concentração teórica final ($\mu\text{g/mL}$)
1,0	25	4,0
2,0	10	20,0
4,0		40,0
6,0		60,0
8,0		80,0

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas, sendo neste trabalho, avaliada em dois níveis: precisão intra-corrída e inter-corrída. A primeira permite verificar a repetibilidade dos resultados dentro de um curto período de tempo e a segunda visa confirmar a concordância dos resultados em dias diferentes. Para tal, foram realizadas seis determinações consecutivas de soluções do fármaco na concentração média da curva de linearidade, 40 $\mu\text{g/mL}$. No caso do teste de precisão inter-corrída, a análise foi realizada em dois dias.

A exatidão é calculada como a porcentagem de recuperação de uma quantidade conhecida do fármaco quando presente em solução de todos os constituintes do sistema. A exatidão do método é determinada em três níveis de concentração, sendo elas os pontos mínimo, médio e máximo da curva de linearidade, com três réplicas cada. Assim, o resultado é expresso pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, devendo estes estar entre 80 e 120%. Para o teste de exatidão, 1 mL de solução do padrão acetato de dexametasona nas concentrações de 8, 80 e 160 $\mu\text{g/mL}$ foram adicionadas a tubos plásticos já contendo 1 mL de solução dos constituintes nas concentrações definidas de preparo. Desse modo, a concentração final do padrão

nos tubos foi mantida em 4, 40 e 80 µg/mL, previamente determinadas pela curva de linearidade.

A menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob condições experimentais estabelecidas, constitui o limite de detecção, LD. Ele pode ser expresso pela Equação 9.

$$LD = \frac{3 \cdot DP}{\beta} \quad (9)$$

Sendo DP o desvio padrão do intercepto com o eixo das ordenadas de, no mínimo, três curvas de calibração; e β o coeficiente angular da curva de calibração.

O limite de quantificação, LQ, é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas e pode ser expresso pela Equação 10.

$$LQ = \frac{10 \cdot DP}{\beta} \quad (10)$$

DP e β possuem o mesmo significado que na Equação 9.

4.5 Eficiência de encapsulamento

A determinação da quantidade de fármaco associada a sistemas de nanopartículas é dificultada pelo tamanho reduzido destas. A separação da fração de fármaco livre da fração associada requer técnicas específicas. Segundo SCHAFFAZICK e colaboradores (2003) uma técnica de separação bastante utilizada é a ultracentrifugação, na qual a concentração de fármaco livre, presente na suspensão é determinada no sobrenadante após a centrifugação. A concentração total de fármaco é geralmente determinada pela completa dissolução das nanopartículas em um solvente adequado. A concentração de fármaco associada às nanoestruturas é calculada pela diferença entre a fração livre e total.

Diversos fatores podem influenciar na eficiência de encapsulamento nestes sistemas, dentre os quais destacam-se as características físico-químicas do fármaco

utilizado, o pH do meio, a natureza do polímero e as características da superfície das partículas (SCHAFFAZICK *et. al.*, 2003).

O doseamento do fármaco encapsulado foi realizado baseando-se na quantidade total empregada no preparo das nanopartículas. Uma alíquota do sobrenadante obtido após a centrifugação das nanopartículas foi retirada para análise, por CLAE, da concentração de fármaco livre. A amostra sobrenadante foi previamente diluída em ACN na proporção 1:1, garantindo a faixa de trabalho dentro dos limites do método analítico, e filtrada em membrana 0,45 µm.

A concentração analisada de acetato de dexametasona remanescente na solução foi utilizada para o cálculo da eficiência de encapsulamento, como mostrado pela Equação 11, de acordo com Mainardes (2007) e Ali e colaboradores (2013).

$$Eficiência = \frac{Concentração\ inicial\ de\ Acetato\ de\ DEX - Concentração\ remanescente\ de\ Acetato\ de\ DEX}{Concentração\ inicial\ Acetato\ de\ DEX} \cdot 100 \quad (11)$$

4.6 Testes de liberação

SOPPIMATH e colaboradores (2001) descreveram técnicas para o estudo da liberação *in vitro* de fármacos a partir de nanopartículas. Os métodos mais comumente utilizados são a difusão em sacos de diálise, ultracentrifugação, filtração a baixa pressão ou ultrafiltração/centrifugação. A liberação dos fármacos a partir destes sistemas depende de diferentes fatores como dessorção e difusão através da matriz polimérica ou na parede das partículas, erosão da matriz ou uma combinação dos processos de difusão e erosão. Os testes de liberação foram realizados pela técnica de ultrafiltração/centrifugação, utilizando-se membranas de filtração centrífuga Amicon®.

Os ensaios de liberação foram realizados em solução tampão fosfato salino, pH 7,4 a uma temperatura de 37°C. Em intervalos determinados de tempo foi recolhida uma amostra do meio de liberação para quantificação da concentração de acetato de dexametasona liberada.

As possíveis nanopartículas removidas do sistema pela coleta das alíquotas foram separadas pelo método de ultrafiltração/centrifugação a 1431 g por 10

minutos. O filtrado foi recolhido e a concentração de fármaco livre analisada por CLAE. A cada coleta de amostra, igual volume de meio de liberação foi repostado ao sistema, garantindo que as condições do processo não fossem alteradas. A Figura 19 apresenta o sistema utilizado para o teste de liberação, em banho térmico de 37°C.



Figura 19: Montagem utilizada para os testes de liberação.

Os cálculos da fração de fármaco liberada foram realizados baseando-se na concentração total encapsulada.

Realizaram-se testes preliminares de liberação com duração de 4 horas para definir as condições mais adequadas de diluição e intervalo tempo de liberação para o sistema. A partir destes resultados definiram-se as condições para o teste de liberação.

A possibilidade de adsorção do fármaco na membrana Amicon® foi inicialmente testada. Realizou-se a ultrafiltração/centrifugação de uma amostra de concentração conhecida do fármaco. Após o processo, analisou-se a concentração do filtrado por CLAE.

Os dados obtidos pela análise de cada alíquota foram utilizados para a montagem de gráficos de liberação e ajuste de um modelo matemático. Neste trabalho, quatro modelos cinéticos foram estudados, a fim de selecionar o mais apropriado para descrever o perfil de liberação do sistema. As equações foram linearizadas e o critério de comparação utilizado foi o parâmetro R^2 , coeficiente de correlação da regressão linear, conforme trabalhos de COSTA e LOBO (2001) e SILVA e colaboradores (2012).

RESULTADOS

1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Durante o processo de preparo das nanopartículas, observou-se a formação de uma solução turva, logo após o gotejamento, conforme mostrado na Figura 20, típica da técnica de nanoprecipitação.

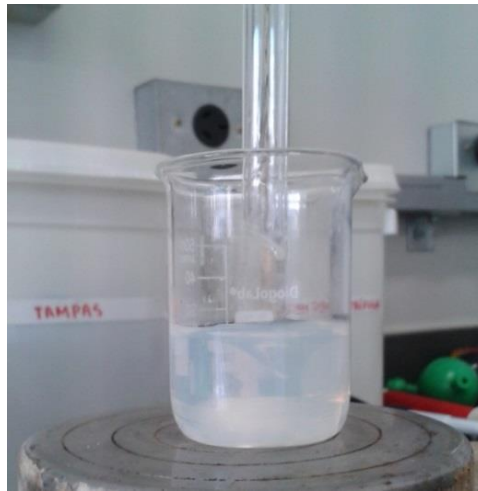


Figura 20: Formação de solução turva após o gotejamento.

Após o tempo de evaporação, notou-se claramente a diminuição do volume da mistura, evidenciando a saída dos solventes voláteis. A mistura final apresentava espuma, devido ao surfactante e turbidez, como mostrado na Figura 21.

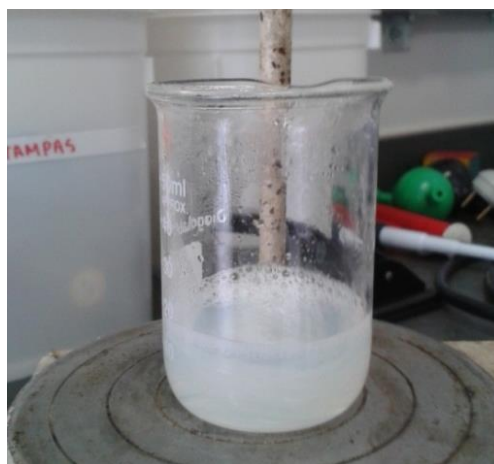


Figura 21: Mistura resultante após o tempo de evaporação.

O aspecto final da mistura, mostrado na Figura 21, é também descrito por SOLANS e colaboradores (2005) para uma nano-emulsão. Em trabalho apresentado no XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, COBEQ, SANTOS e FIGUEIREDO (2012) mostraram resultados interessantes quanto à produção de nanopartículas de PLGA sem a utilização de solventes organoclorados no processo de preparo. Este trabalho é apresentado no Anexo C. Apresentam-se na Tabela 6 as condições operacionais investigadas pelo grupo.

Tabela 6: Condições operacionais investigadas para o preparo de nanopartículas.

Condição	Mínimo	Máximo
Fração volumétrica de etanol na solução etanol/água	0,5	0,8
Concentração de surfactante (% m/v)	2	6
Concentração de polímero (g/L)	3,7	7,4
Razão volumétrica das fases dispersa/contínua	0,25	0,5

Para avaliação destes parâmetros, foi conduzido um planejamento experimental 2^{4-1} , com triplicata no ponto central. A utilização deste tipo de procedimento permite discriminar as variáveis que afetam o sistema de forma significativa, além de permitir a distinção do grau de relevância de cada uma delas. As variáveis foram normalizadas na faixa +1 (maior valor), 0 (ponto central) e -1 (menor valor). Os resultados de diâmetro das partículas e potencial zeta alcançados pelo grupo são apresentados na Tabela 7.

No presente trabalho, as condições experimentais 4, 5, 8 e 9 foram novamente avaliadas e os resultados reportados na Tabela 7.

A análise dos resultados da Tabela 7 mostra que foi possível preparar partículas de dimensão nanométrica, utilizando a metodologia proposta, ou seja, na ausência de solventes organoclorados. Os valores de potencial zeta negativos são devidos à hidrólise do polímero, originando grupos carboxílicos na superfície das partículas. Observa-se que nas condições experimentais 8 e 9, as partículas produzidas apresentaram potencial zeta maior ou igual a 30 mV, em módulo, o que indica estabilidade da suspensão. Nas condições 4 e 5, o resultado de potencial zeta obtido indica sistemas com pouca estabilidade. Com exceção das condições 4 e 5, o índice de polidispersão, que fornece informações sobre a homogeneidade da

distribuição dos tamanhos, foi baixo ($< 0,3$), indicando a formação de sistemas monodispersos.

Tabela 7: Resultados obtidos para diferentes condições operacionais para o preparo de nanopartículas de PLGA.

Teste	Fração volumétrica de etanol	Concentração de surfactante (%m/v)	Concentração de polímero (g/L)	Razão das fases dispersa/contínua	Diâmetro (nm)	Potencial zeta (mV)	PDI
1	1	1	1	1	302.2 ± 0.5	-27 ± 3	0,099
2	1	1	-1	-1	210 ± 8	-15 ± 2	0,212
3	1	-1	1	-1	202 ± 1	-22.0 ± 0.5	0,085
4	1	-1	-1	1	$(36 \pm 3) \times 10$	-9 ± 1	0,330
5	-1	1	-1	-1	$(19 \pm 3) \times 10$	-6.7 ± 0.4	0,545
6	-1	1	1	1	241 ± 4	-25 ± 2	0,127
7	-1	-1	-1	1	528 ± 9	-25 ± 2	0,092
8	-1	-1	1	-1	279 ± 1	-43 ± 2	0,088
9	0	0	0	0	342 ± 3	-30 ± 1	0,082
9	0	0	0	0	217 ± 1	-27 ± 2	0,075
9	0	0	0	0	238 ± 3	-8.5 ± 0.5	0,066

PDI = índice de polidispersão

Na Figura 22, é apresentado o resultado obtido para a análise de potencial zeta para a condição experimental 8, realizado em triplicata.

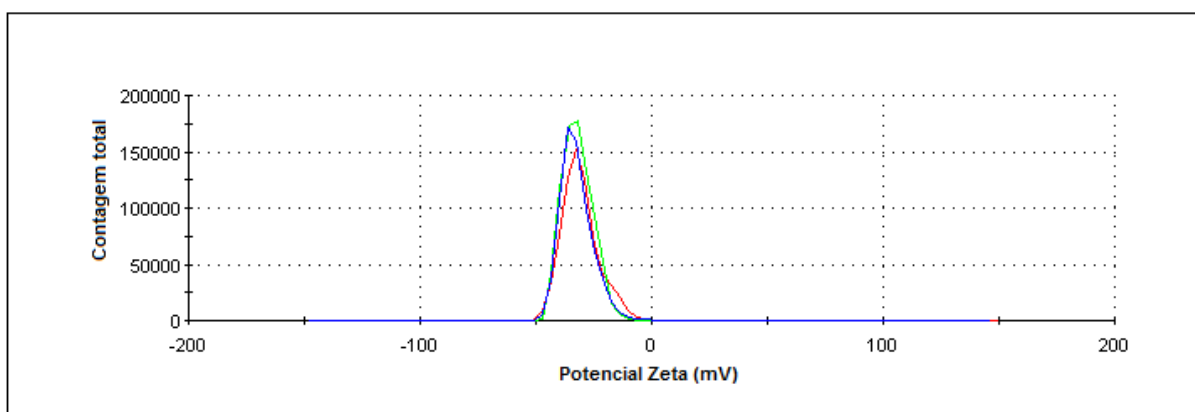


Figura 22: Resultado obtido de potencial zeta na condição experimental 8.

Apresenta-se na Figura 23 o resultado obtido para tamanho de partícula na condição 8, também em triplicata.

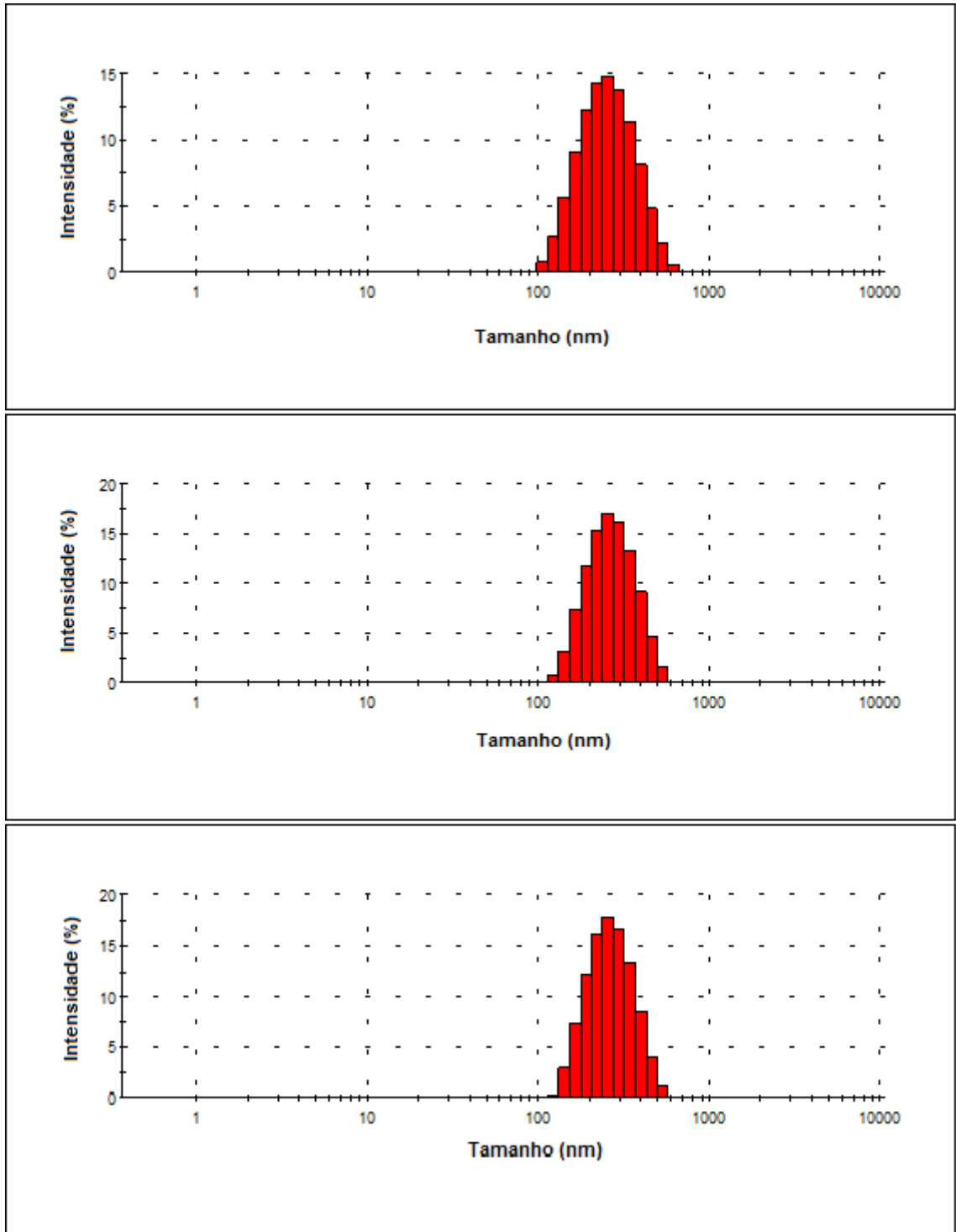


Figura 23: Resultado obtido para tamanho de partícula na condição experimental 8.

Os demais resultados obtidos para tamanho das partículas são apresentados no Anexo A.

Utilizou-se o programa Statistica 10 para ajustar os valores de diâmetro das partículas e potencial zeta a funções polinomiais de 1ª ordem em relação às variáveis investigadas.

A Equação 12 indica que as variáveis concentração de surfactante e razão entre as fases dispersa/contínua, D/C, foram significativas para explicar o tamanho das partículas, com nível de variabilidade de 0,61.

$$\text{Diâmetro} = (28 \pm 2) \times 10^{-3} - (5 \pm 2) \times 10^{-3} \cdot \text{Conc. Surfactante} + (7 \pm 2) \times 10^{-3} \cdot \text{D/C} \quad (12)$$

De acordo com a Equação 12, a variável razão D/C é mais significativa em relação a variável concentração de surfactante. Sendo que, um menor diâmetro é obtido pelo aumento da concentração de surfactante e pela diminuição da razão D/C.

Este resultado é explicado pela maior estabilidade adquirida pelas partículas nestas condições. Os tensoativos são substâncias que modificam a tensão interfacial em uma emulsão, diminuindo a sua energia. O Tween[®] 80 é um surfactante não iônico, muito utilizado para estabilizar formulações aquosas de medicamentos. A utilização de um emulsificante neutro não altera a carga do sistema desenvolvido. A maior concentração desta substância na região superficial das nanopartículas diminui a possibilidade destas se agregarem, garantindo tamanhos menores (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; SOLANS *et al.*, 2005; FAYAD, 2010). O efeito da razão D/C é explicado pela menor frequência de colisões entre as partículas formadas, diminuindo também a possibilidade de agregação.

A Figura 24 apresenta a relação entre os valores observados e preditos pelo modelo ajustado.

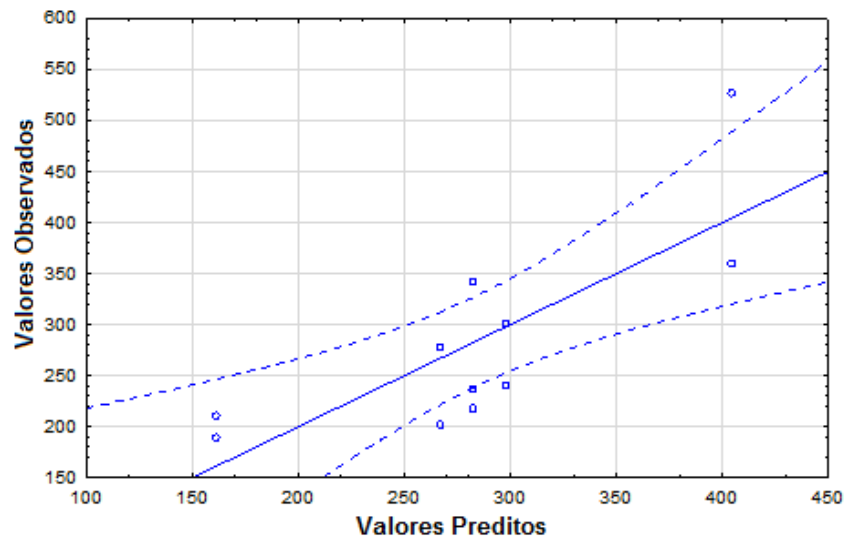


Figura 24: Relação entre os valores observados e preditos para diâmetro das partículas com nível de confiança de 95%.

Como mostrado pela Figura 24, há relação entre os valores observados e preditos, visto que seguem uma tendência crescente. Observa-se aleatoriedade nos dados plotados e a maioria destes situam-se próximos à média, dentro do intervalo de confiança, o que indica validade do modelo.

A Equação 13 apresenta o ajuste obtido para o potencial zeta, com nível de variabilidade de 0,39. Apesar do modelo não explicar satisfatoriamente as variáveis, todos os parâmetros obtidos são confiáveis, visto p-valor obtido $< 0,05$. O p-valor é a probabilidade de se rejeitar a hipótese nula quando ela for verdadeira. Observa-se que somente a variável concentração de polímero mostrou-se significativa.

$$\text{Potencial zeta} = -(22 \pm 3) - (8 \pm 3) \cdot \text{Conc. Polímero} \quad (13)$$

A utilização de uma maior concentração de polímero no preparo das nanopartículas proporciona maior concentração de cargas negativas em sua superfície, o que confere maior estabilidade à emulsão, pela repulsão entre partículas de mesma carga superficial (repulsão eletrostática). A formação de cargas negativas provavelmente é decorrente da hidrólise da ligação éster presente no PLGA durante o processo de erosão do polímero.

A Figura 25 apresenta a relação entre os valores observados e preditos pelo modelo ajustado.

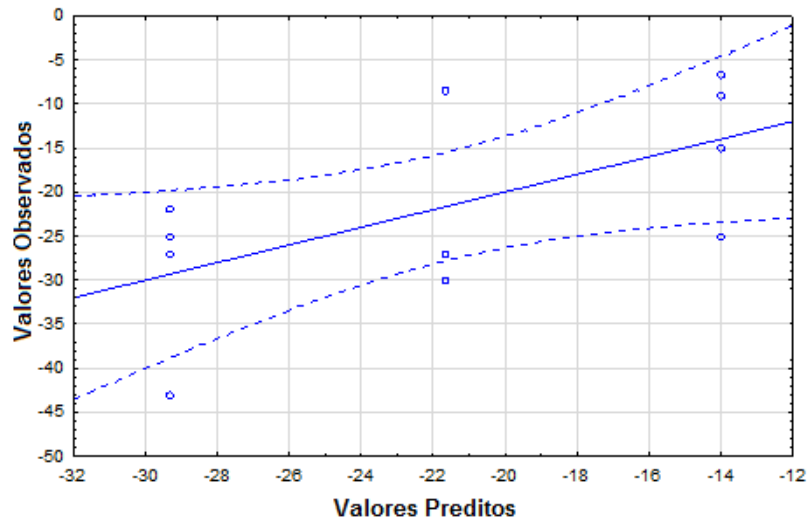


Figura 25: Relação entre os valores observados e preditos para potencial zeta com nível de confiança de 95%.

De acordo com a Figura 25, diferenciam-se, claramente, três faixas de valores de abrangência do modelo. Esta divisão é devido às faixas normalizadas, -1, 0 e +1. É possível que existam outras variáveis, não controladas, como o tempo de evaporação do solvente e velocidade de agitação da mistura, que estejam também atuando no processo.

Os modelos obtidos permitiram distinguir as condições operacionais mais adequadas para o preparo das nanopartículas de PLGA contendo acetato de dexametasona. Como a variável fração volumétrica de etanol não se mostrou significativa a partir dos modelos ajustados, decidiu-se pela utilização do valor mínimo, pela maior facilidade de preparo da solução. Assim, as condições operacionais selecionadas são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8: Condições operacionais selecionadas.

Condição	Valor
Fração volumétrica de etanol na solução etanol/água	0,5
Concentração de surfactante (% m/v)	6
Concentração de polímero (g/L)	7,4
Razão volumétrica das fases dispersa/contínua	0,25

Realizou-se um ensaio nas condições descritas na Tabela 8 em triplicata, com o objetivo de comparar os resultados de tamanho e potencial zeta com aqueles anteriormente obtidos. As nanopartículas preparadas apresentaram um tamanho médio de (208 ± 9) nm, com índice de polidispersão igual a $(0,14 \pm 0,01)$ e potencial zeta médio de $-(10,2 \pm 0,4)$ mV. Estes resultados são mostrados na Tabela 9, sendo o valor calculado a partir da média de três medidas de cada amostra.

Tabela 9: Tamanho e potencial zeta para as nanopartículas de PLGA.

Amostra	Tamanho (nm)	Potencial Zeta (mV)	PDI
1	$(24 \pm 3) \times 10$	$-10,8 \pm 0,2$	$0,157 \pm 0,008$
2	174 ± 1	$-14,4 \pm 0,9$	$0,121 \pm 0,006$
3	216 ± 2	$-5,5 \pm 0,2$	$0,13 \pm 0,02$
Média	208 ± 9	$-10,2 \pm 0,4$	$0,14 \pm 0,01$

As partículas apresentaram tamanho médio semelhante aos das condições experimentais 2 e 3, mostradas na Tabela 7. GÓMEZ-GAETE e colaboradores (2007) alcançaram também um resultado semelhante. As nanopartículas de PLGA apresentaram tamanho médio de 230 nm e potencial zeta igual a -4 mV, utilizando uma mistura de diclorometano e acetona como solvente. Resultado semelhante também foi reportado por ALI e colaboradores (2013) que obtiveram nanopartículas de tamanho de 140 a 298 nm, dependendo das condições operacionais empregadas, utilizando como solvente acetona.

Para o preparo das nanopartículas de PLGA contendo acetato de dexametasona, utilizou-se a condição operacional estabelecida, conforme apresentado na Tabela 9, com o acréscimo de 2 mg do fármaco ao sistema, de modo que a concentração máxima de fármaco foi de 200 $\mu\text{g/mL}$. As nanopartículas contendo acetato de dexametasona apresentaram tamanho médio de (540 ± 4) nm, com índice de polidispersão igual a $(0,07 \pm 0,01)$ e potencial zeta igual a $-(2,5 \pm 0,3)$ mV, como mostrado nas Figuras 26 e 27, respectivamente.

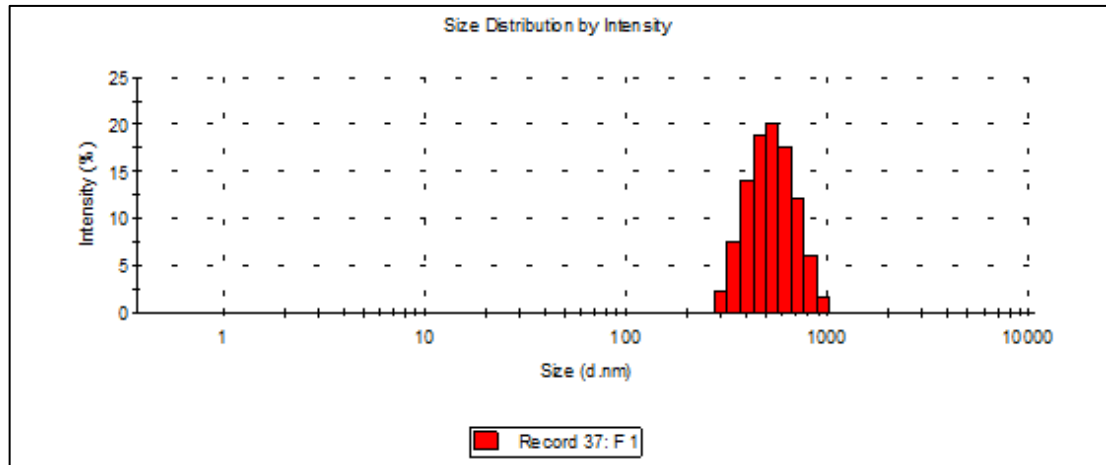


Figura 26: Resultado obtido para tamanho das partículas de PLGA contendo acetato de dexametasona.

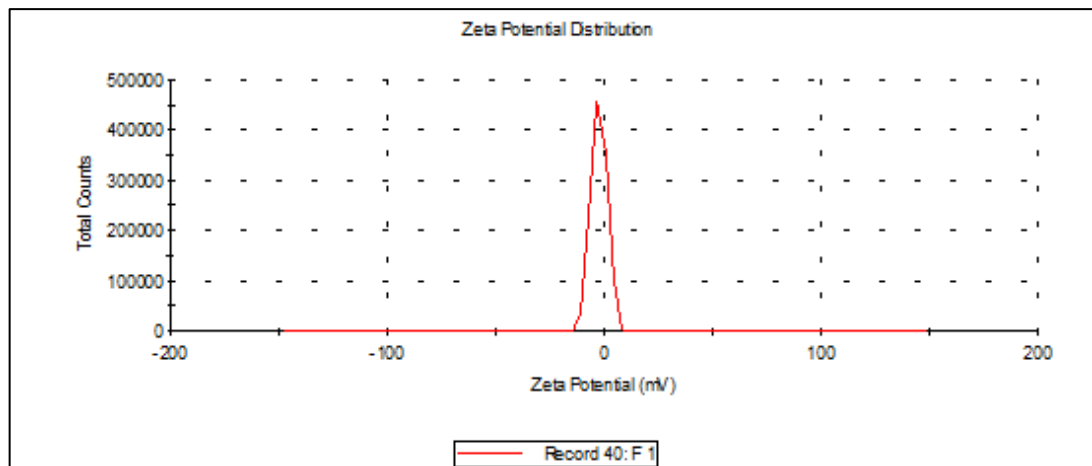


Figura 27: Resultado obtido para potencial zeta das partículas de PLGA contendo acetato de dexametasona.

Comparando-se os resultados das nanopartículas sem acetato de dexametasona com os obtidos para as nanopartículas contendo o fármaco, observa-se que a adição do acetato de dexametasona ao sistema elevou o tamanho das nanopartículas preparadas, provavelmente devido a interações entre o fármaco e as cadeias do polímero. Em relação ao potencial zeta, os valores foram mantidos próximos e ainda abaixo de 30 mV, em módulo.

Com o intuito de inferir a respeito da estabilidade do sistema, foram efetuadas novas medidas de tamanho, PDI e potencial zeta nas amostras descritas anteriormente. A Tabela 10 apresenta a comparação destes resultados, sendo que a segunda medida foi realizada com um intervalo de tempo de sete meses da primeira.

Tabela 10: Comparação dos resultados de tamanho, PDI e potencial para as nanopartículas brancas e contendo o fármaco para avaliação da estabilidade.

Medida	Amostra	Tamanho (nm)	Potencial zeta (mV)	PDI
1	Nanopartículas sem acetato de dexametasona	208 ± 9	-10,2 ± 0,4	0,14 ± 0,01
2		167 ± 1	-13,3 ± 0,4	0,10 ± 0,01
1	Nanopartículas contendo acetato de dexametasona	540 ± 4	-2,5 ± 0,3	0,07 ± 0,01
2		532 ± 6	-0,9 ± 0,1	0,13 ± 0,02

De acordo com os resultados da Tabela 10, os parâmetros avaliados sofreram pequenas alterações após sete meses de armazenamento. Dessa forma, há indício de estabilização do sistema pelo surfactante, impedindo a aglomeração das partículas. Estes resultados indicam que a estabilização do sistema é adquirida pela formação de uma proteção por impedimento estérico pelo surfactante, conforme observado por BOUCHEMAL e colaboradores (2004).

Para as demais caracterizações do sistema, as nanopartículas obtidas foram liofilizadas. Primeiramente, realizou-se uma liofilização por 5 horas. A temperatura foi mantida em -55 °C. Ao final deste processo, observou-se a formação de uma camada de gel nas amostras, mostrando que a liofilização não foi eficiente. A Figura 28 apresenta o aspecto das amostras após a liofilização.



Figura 28: Amostras liofilizadas com formação de gel na superfície.

Com o objetivo de avaliar o tempo de liofilização, realizou-se um novo procedimento por 24 horas com temperatura mantida em -39 °C. O aspecto

gelatinoso das amostras foi observado novamente. A partir deste resultado, acredita-se que ainda exista solvente residual nas amostras, o que impede a sua completa liofilização. Outra questão a se observar seria a concentração de surfactante utilizada no preparo das nanopartículas, conforme descrito por ABDELWAHED e colaboradores (2006).

A literatura descreve também a necessidade do uso de um agente crioprotetor, como glicose, sacarose e manitol, para a liofilização de amostras de nanopartículas na tentativa de manter as suas características iniciais de tamanho de partícula. Este efeito protetor é atribuído à formação de uma camada amorfa ao redor das partículas, promovendo um espaçamento entre as mesmas durante o congelamento e ainda pelas ligações de hidrogênio que os grupos hidroxila dos açúcares podem estabelecer com a água (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; ABDELWAHED *et al.*, 2006; HOLZER *et al.*, 2009). Assim, realizou-se também a liofilização de nanopartículas contendo sacarose como agente crioprotetor. A sacarose foi adicionada à fase contínua para o preparo das nanopartículas na concentração de 5% (m/v). As amostras foram liofilizadas por 24 horas. Mais uma vez, o processo não foi eficiente e as amostras apresentaram o mesmo padrão de comportamento ilustrado na Figura 28.

A aplicabilidade industrial de nanopartículas dispersas em meio aquoso pode ser limitada, devido a problemas de baixa estabilidade físico-química, em períodos de armazenamento prolongado. A estocagem do produto liofilizado é uma alternativa para garantir maior estabilidade (CHACO´N *et al.*, 1999; ABDELWAHED *et al.*, 2006; HOLZER *et al.*, 2009). Diante disto, é interessante procurar meios de tornar possível a liofilização do material. Uma alternativa seria a diálise das amostras antes da liofilização para a remoção de solventes orgânicos. Esta possibilidade não foi verificada neste trabalho.

Parte da amostra liofilizada foi utilizada para as análises de MEV e DSC.

1.1 Microscopia eletrônica de varredura

As análises por MEV da amostra liofilizada de nanopartícula contendo o fármaco possibilitaram a visualização da morfologia do material e também a inferência a

respeito do tamanho das partículas. Na Figura 29, são mostradas as micrografias obtidas.

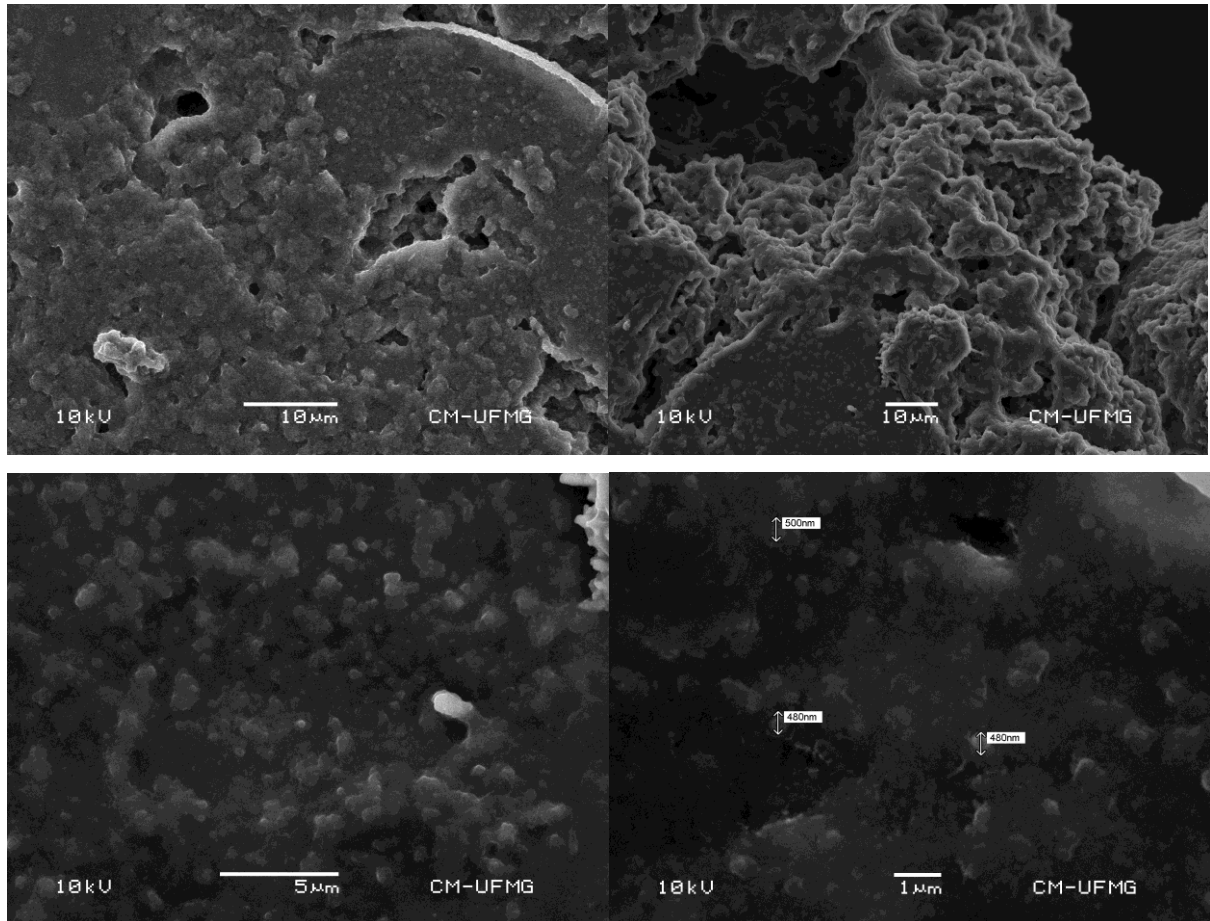


Figura 29: Micrografias obtidas por MEV para as nanopartículas contendo o fármaco.

As imagens obtidas não apresentaram boa qualidade, porém é possível observar partículas esféricas com diâmetro de cerca de 500 nm. Tomando-se em conjunto estes resultados e aqueles obtidos pela técnica de espalhamento dinâmico da luz, é possível aceitar o tamanho médio de 540 nm para as partículas preparadas.

1.2 Calorimetria diferencial de varredura

A caracterização de propriedades térmicas, através da temperatura de transição vítrea, T_g , foi utilizada para avaliar as mudanças conformacionais do material durante o preparo das nanopartículas e inferir sobre o tipo de interação existente nas

cadeias do polímero quando o fármaco é adicionado ao sistema. A Figura 30 apresenta o resultado obtido para o segundo aquecimento das amostras.

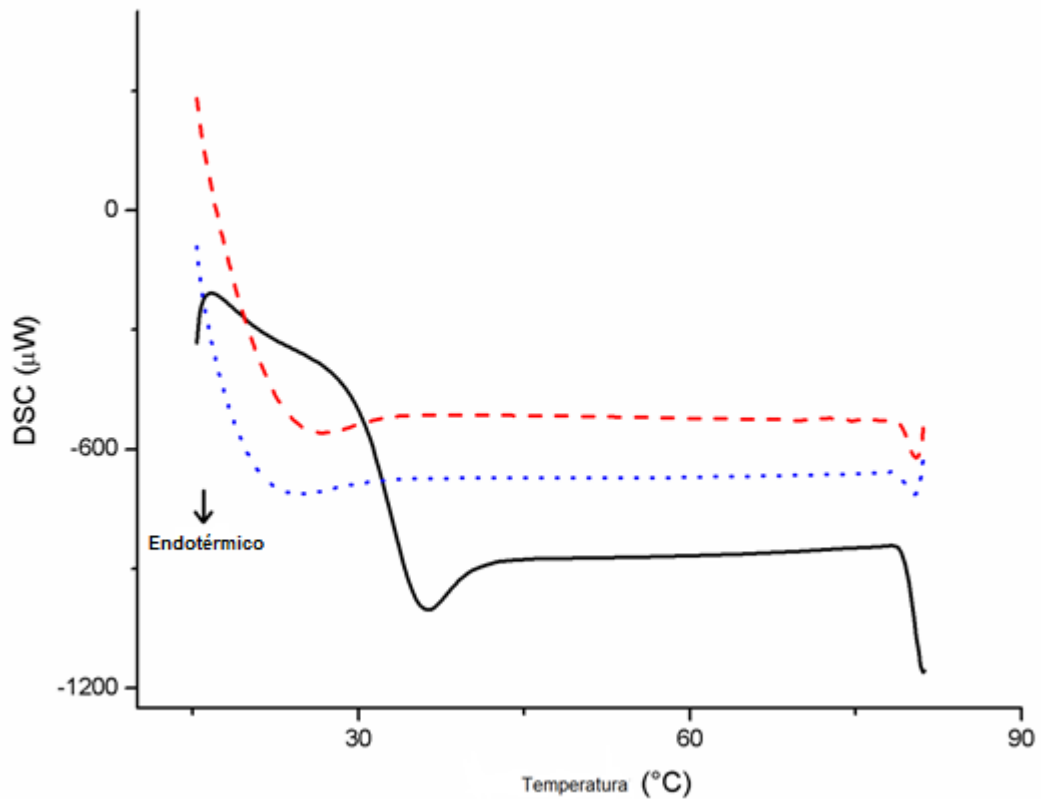


Figura 30: Curva de DSC para as amostras, sendo nanopartículas sem o fármaco (linha tracejada), nanopartículas contendo o fármaco (linha pontilhada) e PLGA (linha cheia).

Observa-se que o perfil de comportamento do PLGA é significativamente diferente dos perfis obtidos para as nanopartículas, com e sem acetato de dexametasona, o que indica que o processamento do polímero altera a conformação da macromolécula.

Os valores das T_g , verificados a partir dos picos endotérmicos resultantes nas curvas de DSC, são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11: Variação da T_g para as amostras analisadas.

Amostra	T_g (°C)
PLGA (75:25)	37
Nanopartículas sem acetato de dexametasona	27
Nanopartículas contendo acetato de dexametasona	25

De acordo com os resultados da Tabela 11, a T_g do polímero encontra-se igual à temperatura de trabalho, 37°C , o que indica maior possibilidade de erosão durante a liberação do fármaco. Ao se comparar o resultado da T_g do polímero com as nanopartículas, observa-se um abaixamento significativo, o que aponta que o processo de preparo provocou uma nova organização das cadeias. Para as nanopartículas sem acetato de dexametasona e aquelas contendo o fármaco, a alteração na T_g é pouco significativa. Este resultado pode ser interpretado de duas formas, conforme descrito por GÓMEZ-GAETE e colaboradores (2007): é possível que a interação entre o fármaco e a matriz do polímero seja somente física, não havendo interação química, ou ainda que, a quantidade de acetato de dexametasona encapsulada é baixa para observar tal diferença. Outra possibilidade, mais plausível considerando os resultados de liofilização, é a presença de solvente residual nas amostras, que plastificou o polímero e provocou a diminuição de cerca de 10°C na T_g .

2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

De acordo com o trabalho de CUNHA (2011), o comprimento de onda de absorvância máxima do fármaco acetato de dexametasona encontra-se em 235 nm, segundo varredura realizada em espectrofotômetro Hewlett Packard® HP 8453. Este resultado é apresentado na Figura 31, sendo que a varredura foi realizada em um intervalo de 200 a 400 nm.

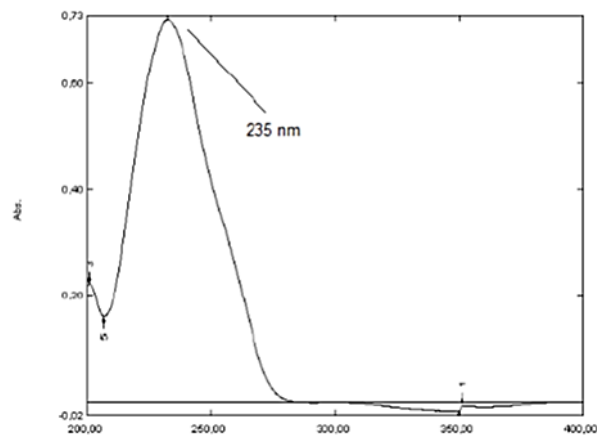


Figura 31: Espectro de varredura do fármaco acetato de dexametasona.
CUNHA (2011)

Foram avaliadas diferentes proporções para fase móvel, composta de acetonitrila em água, até obtenção de uma resolução cromatográfica satisfatória entre o fármaco e os demais constituintes do sistema, sendo eles acetona, etanol, PLGA e Tween[®] 80. Dessa forma, foi selecionado o modo de vazão gradiente, em que a proporção da fase móvel varia em função do tempo segundo uma programação, apresentada na Tabela 12. O tempo de corrida estipulado foi de 10 minutos, sendo que o fármaco acetato de dexametasona apresentou tempo de retenção de 6,8 minutos.

Tabela 12: Variação da fase móvel em função do tempo.

Tempo (min)	ACN (% v/v)	Água (% v/v)	Eluição
0	30	70	Equilíbrio
0 → 4	70	30	Gradiente
4 → 5	70	30	Isocrático
5 → 6	90	10	Gradiente
6 → 7	90	10	Isocrático
7 → 10	30	70	Gradiente

Após cada injeção foi mantida a proporção de equilíbrio por 10 minutos para garantir a estabilidade da coluna. Assim, as condições de análise determinadas são apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13: Parâmetros cromatográficos para a determinação do fármaco.

Fase móvel	Acetonitrila:Água
Vazão	1,0 mL/min
Modo de vazão	Gradiente
Tempo de corrida	10 min
Comprimento de onda	235 nm
Volume de injeção	20 µL
Temperatura aproximada	25 °C

Apresenta-se na Figura 32 o cromatograma obtido para a injeção do padrão acetato de dexametasona na concentração de 200 µg/mL, nas condições estabelecidas pelo método.

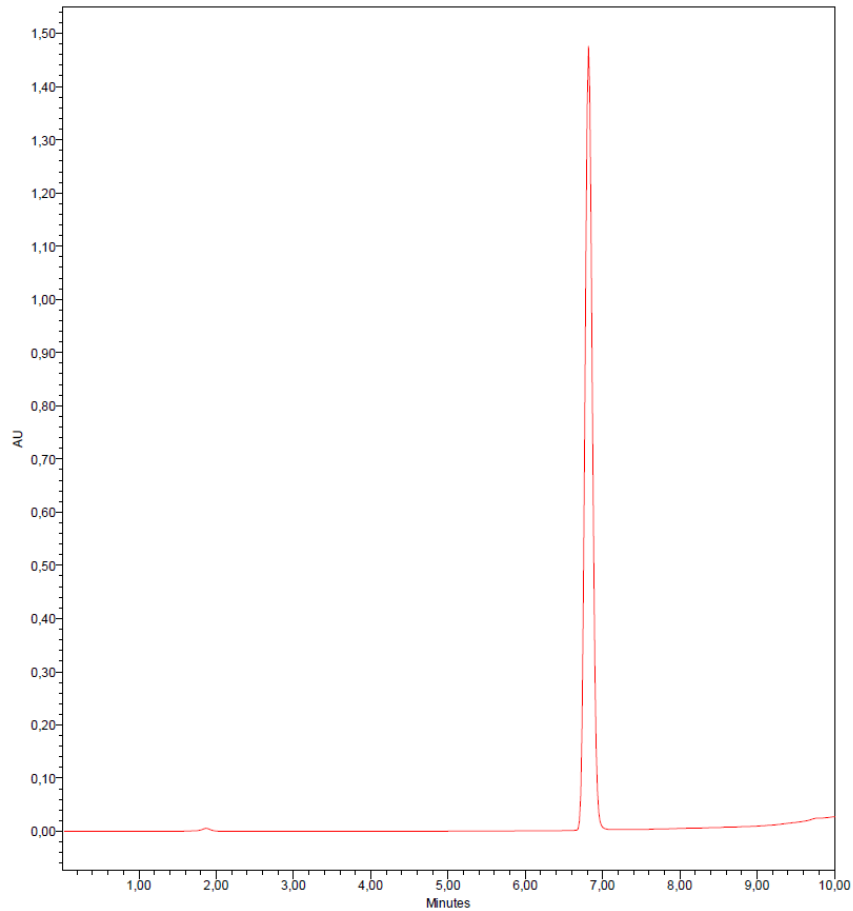


Figura 32: Cromatograma do padrão acetato de dexametasona.

A Figura 33 apresenta os cromatogramas obtidos para os constituintes do sistema, visualizados separadamente.

Como mostrado na Figura 33, os cromatogramas obtidos para acetona e PLGA apresentaram picos em 2 minutos e a intensidade da curva é relativa à concentração da amostra. Assim, o método desenvolvido foi seletivo, uma vez que os demais constituintes não se apresentaram como interferentes, ou seja, não existem picos com o mesmo tempo de retenção que o fármaco. Os produtos de degradação do polímero poderiam atuar como interferentes, devendo estes ser também avaliados.

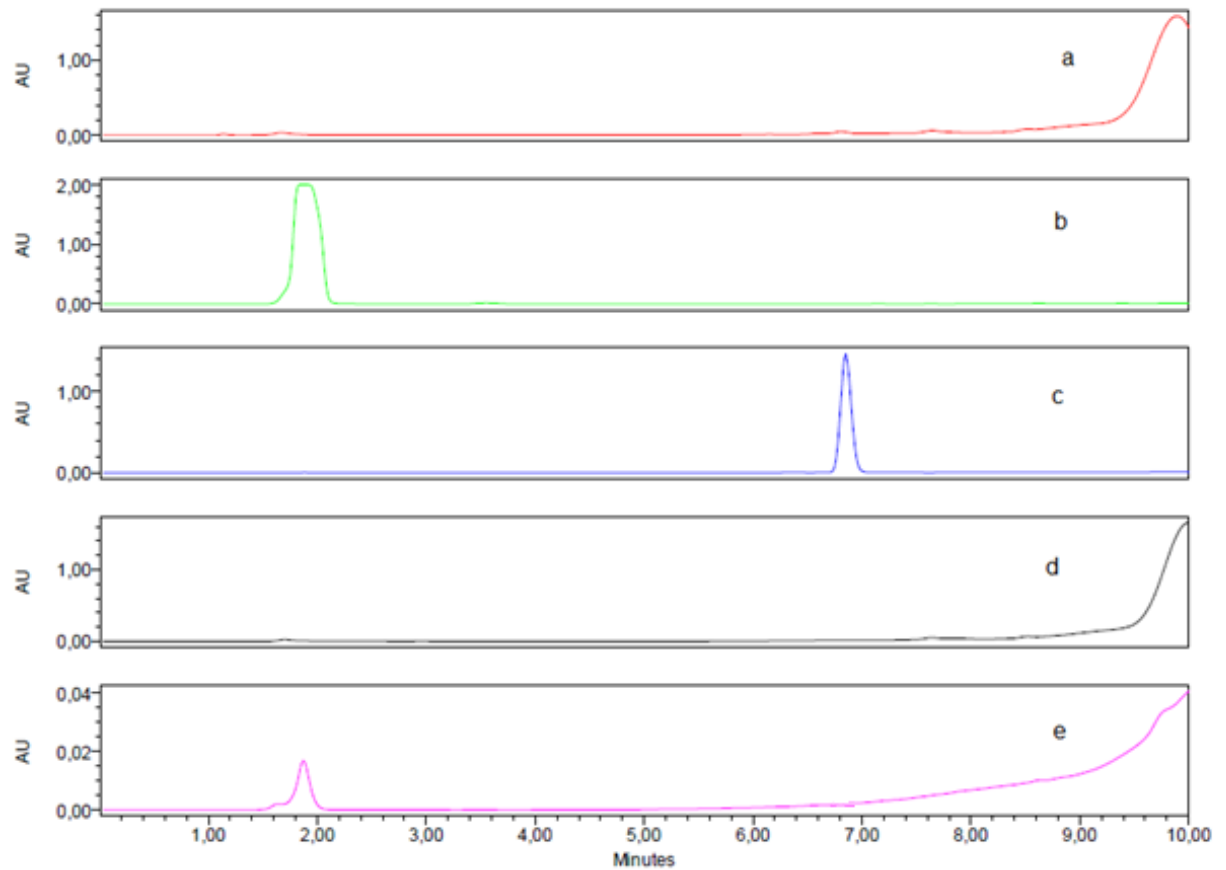


Figura 33: Cromatogramas obtidos para o teste de seletividade. (a) Tween[®] 80; (b) Acetona; (c) Acetato de dexametasona; (d) Etanol; (e) PLGA.

2.1 Linearidade

O método proposto apresentou-se linear para a faixa de concentração (4 – 80 $\mu\text{g/mL}$) definida. A curva de calibração foi montada a partir da média das áreas de três picos obtidos de pesagens diferentes. Na Tabela 14, são apresentados os dados obtidos para a montagem da curva de calibração.

Tabela 14: Dados para a montagem da curva de calibração.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área	Média \pm Desvio padrão
4	178365	$(19 \pm 3) \times 10^4$
	170533	
	231016	
20	922218	$(90 \pm 2) \times 10^4$
	902849	
	885405	
40	1955739	$(20 \pm 1) \times 10^5$
	1897626	
	2155769	
60	2855123	$(29 \pm 2) \times 10^5$
	2733951	
	3090983	
80	3914266	$(40 \pm 3) \times 10^5$
	3706310	
	4243738	

A Figura 34 apresenta as três curvas montadas a partir dos dados obtidos, como forma de comparação.

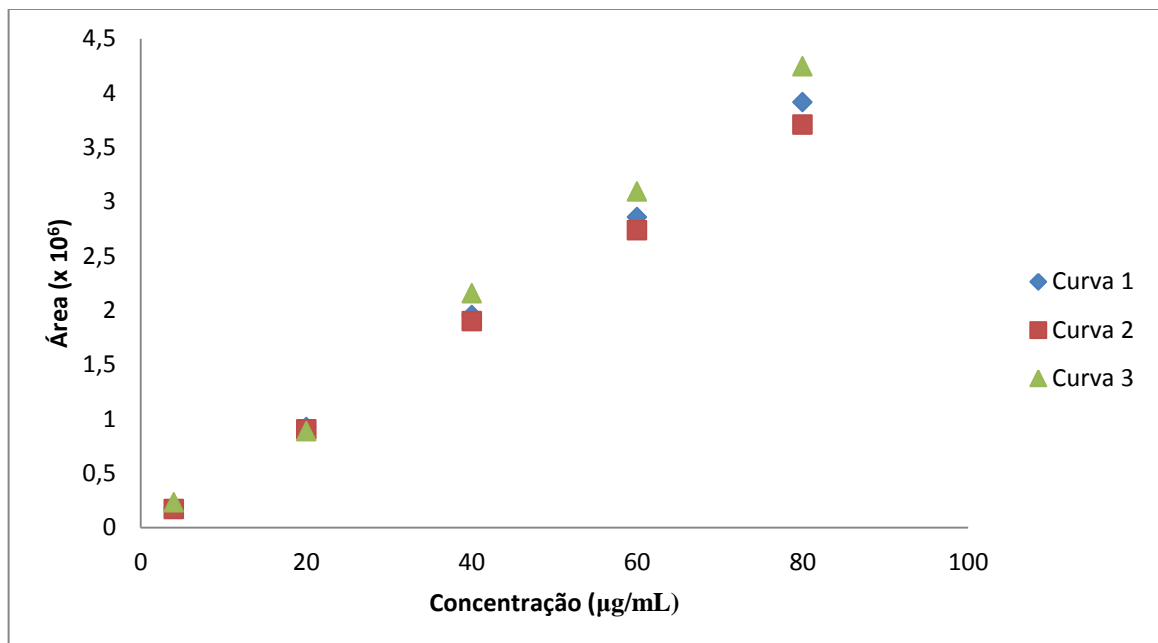


Figura 34: Curvas de calibração para análise da linearidade do método proposto.

A Equação 14 apresenta o ajuste linear obtido a partir dos dados da Tabela 14, sendo $R^2 = 0,999 \pm 0,001$. A análise de variância verificou a regressão significativa e desvio da linearidade não significativo (p -valor $< 0,05$).

$$\text{Área} = (50 \pm 4) \times 10^3 \cdot \text{Concentração} - (33 \pm 2) \times 10^3 \quad (14)$$

Na Figura 35, é apresentado o ajuste linear obtido para os dados.

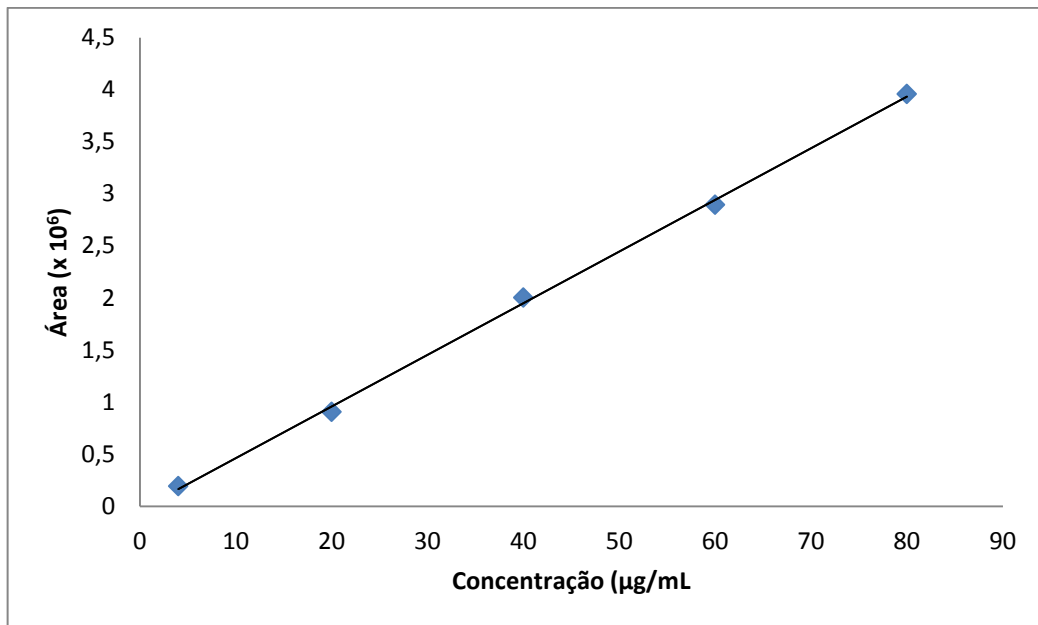


Figura 35: Curva analítica obtida.

2.2 Precisão

A precisão obtida durante os testes foi expressa em termos do desvio padrão relativo (DPR) das seis amostras medidas, não se admitindo valores superiores a 5%. Os resultados foram analisados em termo das concentrações e são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Desvios padrão relativos obtidos no teste de precisão.

Dia 1		Dia 2	
Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
1	40	1	45
2	42	2	42
3	40	3	45
4	44	4	42
5	42	5	46
6	43	6	44
Média \pm DP: 42 \pm 2		Média \pm DP: 44 \pm 2	
DPR: 4 %		DPR: 4 %	

Como observado na Tabela 15, os valores de DPR obtidos encontraram-se abaixo de 5%, garantindo que o método proposto apresenta precisão adequada.

2.3 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada a partir da recuperação do padrão quando este está contido em solução dos demais constituintes do sistema, sendo eles: PLGA, etanol, acetona e Tween[®] 80. Os resultados são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16: Porcentagem de recuperação do acetato de dexametasona na avaliação da exatidão do método.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	4	40	80
Recuperação (%)	89	95	91
	87	99	92
	88	95	91
Média \pm DP	88 \pm 1	96 \pm 2	91,3 \pm 0,6

De acordo com os valores da Tabela 16, o método apresentou exatidão, uma vez que a porcentagem de recuperação de fármaco está de acordo com a requerida, entre 80 e 120%.

2.4 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção foi calculado de acordo com a Equação 9, anteriormente apresentada, obtendo-se um valor de 1,41 µg/mL. Este resultado representa o menor valor em que o pico de eluição do fármaco apresentaria boa aparência.

Para o cálculo do limite de quantificação utilizou-se a Equação 10, obtendo-se o valor de 4,69 µg/mL, sendo esta a menor concentração em que se conhecem a exatidão e a precisão do método.

Apresentam-se, na Tabela 17, os dados da validação da metodologia analítica de modo resumido. Os testes comprovaram a validade do método, possibilitando a sua utilização nos estudos de encapsulamento e liberação do fármaco.

Tabela 17: Parâmetros de validação do fármaco acetato de dexametasona.

Parâmetro	Resultado
Seletividade	Positivo
Linearidade	$R^2 = 0,999$
Precisão	DPR < 5%
Exatidão	88% a 96%
Limite de detecção	1,41 µg/mL
Limite de quantificação	4,69 µg/mL

3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

A eficiência de encapsulamento do fármaco foi avaliada pela análise da concentração, por CLAE, do sobrenadante obtido após processo de centrifugação das nanopartículas preparadas e os resultados são mostrados na Tabela 18. A eficiência de encapsulamento foi calculada a partir da média dos valores obtidos para três amostras.

Tabela 18: Eficiência de encapsulamento.

Amostra	Concentração de acetato de dexametasona remanescente ($\mu\text{g/mL}$)	Eficiência (%)
1	131	34
2	91	55
3	92	54
Média \pm DP	$(10 \pm 2) \times 10$	$(4,8 \pm 1) \times 10$

O cálculo em termos da massa de polímero utilizada no preparo das nanopartículas confere um valor de 96 μg de acetato de dexametasona em 37 mg de PLGA.

Pode-se comparar este resultado com o trabalho de GÓMEZ-GAETE e colaboradores (2007). Os resultados destes autores indicam uma concentração de 230 $\mu\text{g}/100$ mg de PLGA, utilizando uma mistura de diclorometano e acetona como solvente e 10 mg de fármaco. A extrapolação dos valores obtidos neste trabalho para efeito comparativo mostra que é possível encapsular 259 $\mu\text{g}/100$ mg de PLGA, tendo como solvente somente acetona. ALI e colaboradores (2013) também empregaram a técnica de nanoprecipitação para o preparo das nanopartículas, utilizando como solvente acetona, e alcançaram um resultado de encapsulamento de dexametasona que variou de 52 a 89%, dependendo das condições operacionais empregadas.

4 TESTES DE LIBERAÇÃO

4.1 Teste de adsorção na membrana

A possibilidade de adsorção do fármaco na membrana Amicon® Ultra 3K, utilizada para a separação das nanopartículas durante os testes de liberação foi verificada pela análise de uma amostra de concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ de acetato de dexametasona. Esta solução foi obtida a partir da diluição de uma solução estoque de concentração igual a 400 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados da análise por CLAE são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19: Resultados obtidos para o teste de adsorção na membrana.

Amostra	Concentração (µg/mL)
1	33
2	33
3	32
Média ± DP	32,7 ± 0,6

De acordo com os dados apresentados na Tabela 19, o resultado de concentração obtido após o processo de filtração/centrifugação com a membrana foi mais baixo que a concentração conhecida utilizada. Segundo este resultado, cerca de 18% do fármaco é adsorvido na membrana. Apesar desta diferença observada, o dispositivo de filtração centrífuga foi utilizado nos testes de liberação. Todos os resultados dos testes foram condicionados a esta situação, de forma que a análise da tendência dos pontos no gráfico obtido não foi afetada.

4.2 Testes preliminares de liberação

Os testes preliminares de liberação foram realizados com o intuito de definir as condições mais adequadas de diluição e intervalo de liberação para o sistema proposto. A Tabela 20 apresenta as condições operacionais propostas para estes testes.

Tabela 20: Condições para os testes preliminares de liberação.

Teste	Volume de PBS (mL)	Volume da suspensão de nanopartículas (mL)	Diluição	Volume da alíquota para análise (mL)
1	19	1	1/20	1
2	19	1	1/20	2
3	9	1	1/10	2

As alíquotas para análise da concentração de acetato de dexametasona liberada foram retiradas em intervalos determinados de tempo, sendo que os testes foram avaliados por um total de 4 horas. A definição da condição mais adequada foi

verificada pelo estudo de modelos cinéticos de liberação. As equações foram linearizadas e o critério de comparação utilizado foi o parâmetro R^2 da regressão linear. A condição que proporcionou uma melhor correlação linear em relação aos modelos estudados foi selecionada para o ensaio de liberação.

Os resultados indicaram que as condições operacionais do teste 2, com R^2 igual a 0,991 para o modelo de Peppas, foi a mais adequada para o prosseguimento dos ensaios. A Figura 36 apresenta o gráfico obtido para o ensaio de liberação preliminar nas condições do teste 2. Os resultados obtidos para as medidas das concentrações das alíquotas por CLAE e os cálculos realizados para o ajuste dos modelos são mostrados no Anexo B.

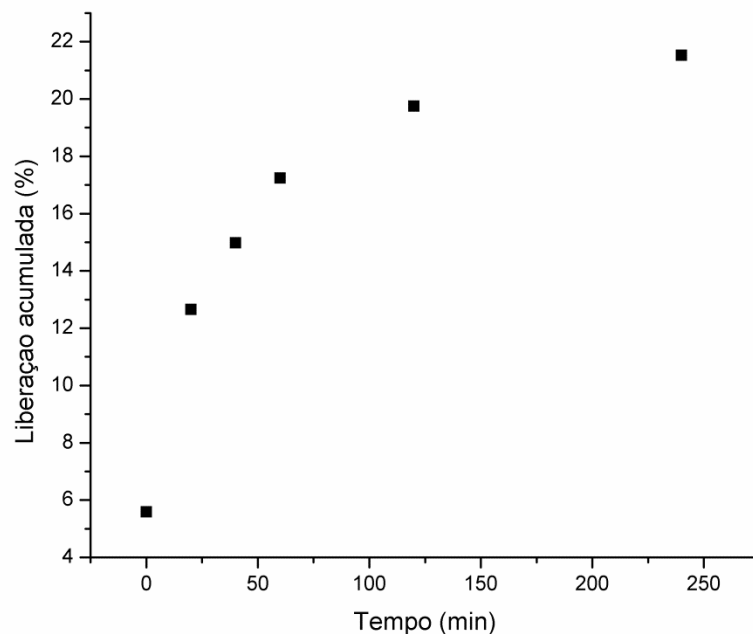


Figura 36: Perfil de liberação de acetato de dexametasona na condição experimental do teste 2.

De acordo com a Figura 36, observa-se que, em 4 horas de teste, foi alcançada a liberação de cerca de 20% do fármaco contido nas nanopartículas. GÓMEZ-GAETE e colaboradores (2007) alcançaram a completa liberação do fármaco neste mesmo tempo, ou seja, em 4 horas. Dessa forma, acredita-se que o sistema de nanopartículas preparado neste trabalho irá sustentar a liberação do fármaco por um tempo maior.

4.3 Teste de liberação

Com base nos resultados obtidos nos testes preliminares de liberação, realizou-se um ensaio, em triplicata, por 48 horas, nas condições de diluição anteriormente determinadas pelo teste 2.

As alíquotas para análise da concentração de fármaco liberado foram retiradas em intervalos de tempo determinados e o perfil de liberação exibido pelo sistema é apresentado na Figura 37. As concentrações obtidas para a montagem do gráfico de liberação são apresentadas no Anexo B.

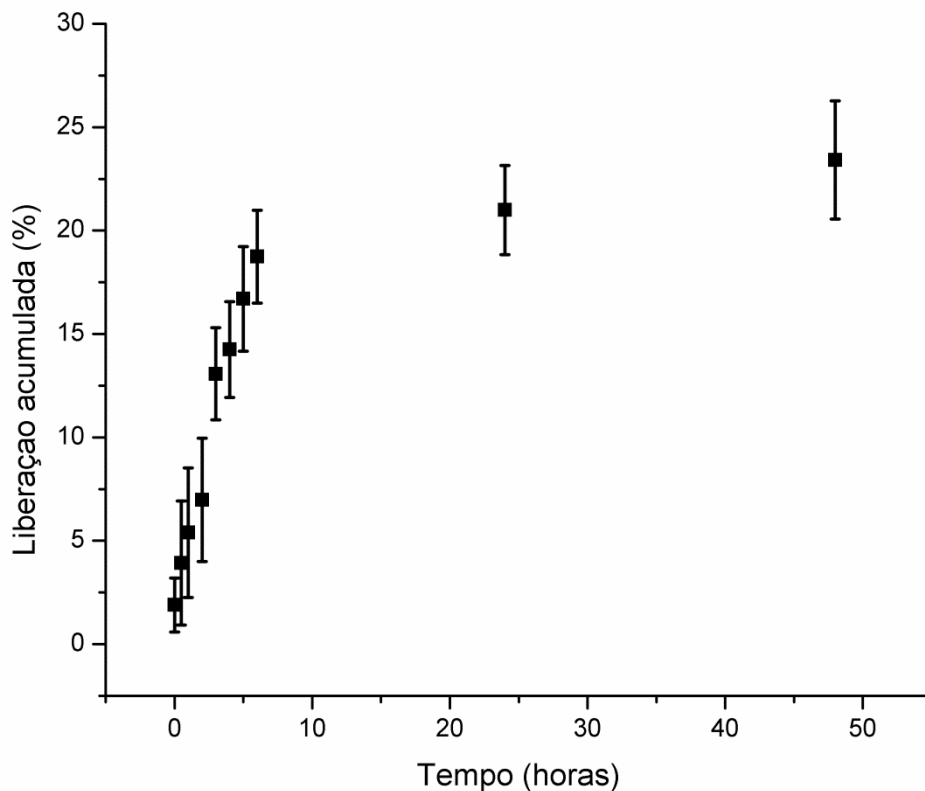


Figura 37: Perfil de liberação de acetato de dexametasona para teste realizado em 48 horas.

O perfil de liberação mostrado pela Figura 37 manteve-se semelhante ao exibido pela Figura 36, sendo nas primeiras horas de teste já observada a liberação de cerca de 20% do fármaco. Ainda de acordo com a Figura 37, em 48 horas de teste alcançou-se a liberação de aproximadamente 25% do fármaco contido nas

nanopartículas. De acordo com estes resultados, acredita-se que as nanopartículas obtidas são candidatas promissoras para a utilização em dispositivos de liberação de fármaco por tempo prolongado.

O resultado obtido mostrou uma baixa liberação do fármaco pelo sistema desenvolvido, porém é importante mencionar a possibilidade de já haver liberação durante o processo de preparo das nanopartículas, sendo esta parte não contabilizada durante a análise. De acordo com a metodologia proposta, após processo de centrifugação, as nanopartículas formadas foram eluídas em água e armazenadas por 12 horas para posterior teste de liberação, o que pode provocar a erosão do polímero e consequente liberação do fármaco.

O sistema exibiu uma liberação inicial mais acentuada nas primeiras 6 horas de teste, como apresentado na Figura 37, comportamento descrito por KIMURA e OGURA (2001) e YASUKAWA e colaboradores (2004) para sistemas que utilizam polímeros biodegradáveis. A degradação do polímero desempenha um papel importante no mecanismo de liberação, uma vez que é responsável pela entrega gradual do fármaco remanescente no interior da matriz.

Os resultados obtidos durante os testes de liberação foram utilizados também para o estudo de modelos cinéticos. A Tabela 21 apresenta os ajustes lineares obtidos para cada modelo, bem como o coeficiente de correlação. Os cálculos realizados para o ajuste dos modelos são mostrados no Anexo B.

Tabela 21: Comparação dos resultados obtidos para os modelos cinéticos.

Modelo	Equação linearizada	Ajuste obtido	R ²
Ordem zero	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_0 \cdot t$	$\frac{M_t}{M_\infty} = (0,006 \pm 0,001) \cdot t + (9 \pm 1)$	0,54 ± 0,07
Primeira ordem	$\log\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = \frac{k_1 t}{2,303}$	$\log\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = (27 \pm 6) \times 10^{-5} \cdot t + (0,8 \pm 0,1)$	0,34 ± 0,05
Higuchi	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \cdot \sqrt{t}$	$\frac{M_t}{M_\infty} = (0,41 \pm 0,08) \cdot \sqrt{t} + (5 \pm 2)$	0,77 ± 0,07
Peppas	$\log\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = n \cdot \log t + \log a$	$\log\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = (0,4 \pm 0,1) \cdot \log t + (0,2 \pm 0,1)$	0,89 ± 0,07

De acordo com os dados da Tabela 21, o modelo mais adequado para explicar a liberação do fármaco pelas nanopartículas foi o modelo de Peppas, conforme R² exibido. Este resultado confirma o modelo anterior ajustado para o teste preliminar de liberação. A equação de Peppas é útil para descrever vários tipos de sistemas e

o expoente de liberação, n , caracteriza o mecanismo de liberação predominante. Neste caso, o valor de n obtido foi de 0,4. De acordo com os parâmetros anteriormente apresentados na Tabela 2, para esferas, este valor é indicativo de um transporte por difusão fickiana. De acordo com o ajuste obtido, o fármaco foi liberado a uma taxa de 1,58 $\mu\text{g/mL}$ por minuto.

CONCLUSÃO

Este trabalho possibilitou o estudo das condições mais favoráveis para o preparo de partículas de PLGA contendo acetato de dexametasona a partir de um planejamento experimental, sendo as seguintes condições selecionadas: a fração volumétrica de etanol na solução de etanol e água foi igual a 0,5, concentração de surfactante foi mantida em 6% (m/v), a concentração de polímero empregada foi de 7,4 g/L e a razão entre as fases D/C foi de 0,25. De acordo com os resultados obtidos, a metodologia proposta, sem a utilização de solventes organoclorados, permitiu o preparo de partículas esféricas, de tamanho nanométrico e estabilizadas pelo surfactante. As nanopartículas preparadas apresentaram um tamanho médio de (540 ± 4) nm, com índice de polidispersão igual a $(0,07 \pm 0,01)$ e potencial zeta de $-(2,5 \pm 0,3)$ mV. A avaliação do sistema por calorimetria diferencial de varredura indicou uma T_g de 25 °C.

Com o objetivo de quantificar o fármaco no sistema para medidas da eficiência de encapsulamento e avaliação do perfil de liberação, a metodologia analítica por CLAE foi desenvolvida e validada. Como fase móvel foi utilizada uma mistura de acetonitrila e água, em modo gradiente. Os resultados indicaram que as nanopartículas obtidas apresentaram cerca de 50% de eficiência de encapsulamento, ou seja, 96 µg de acetato de dexametasona / 37 mg de PLGA. Já os resultados obtidos durante os testes *in vitro* de liberação mostraram que cerca de 25% do fármaco contido nas estruturas é liberado em 48 horas de teste. O perfil obtido apresentou liberação acentuada nas primeiras horas de teste. De acordo com o modelo matemático ajustado aos resultados, o sistema segue o padrão do modelo de Peppas de liberação.

Os resultados obtidos indicam que as nanopartículas de PLGA são candidatas promissoras para a utilização como dispositivos de liberação de fármacos para o tratamento de doenças oculares.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como perspectivas futuras de trabalho sugere-se o estudo da utilização de um rota-evaporador para o preparo das nanopartículas, com o intuito de diminuir o tempo de remoção dos solventes. É necessário garantir que todo o solvente seja removido. Com o objetivo de constatar o mecanismo de transporte do fármaco através do sistema estudado, deve-se ainda realizar uma análise da morfologia das partículas após a liberação.

Com o objetivo de aumentar o tempo de retenção do fármaco no olho, pode-se também avaliar a incorporação das nanopartículas a um gel polimérico, como quitosana.

Para o desenvolvimento de dispositivos para o tratamento de doenças oculares deve-se ainda realizar estudos de toxicidade e testes de liberação *in vivo* para uma completa avaliação do sistema.

REFERÊNCIAS

ABDELWAHED A. W.; DEGOBERT A. G.; STAINMESSE B. S.; FESSI A. H. ; **Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, p. 1688–1713, 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); **Esclarecimentos sobre a aplicação da RE Nº 899 – Validação de Métodos Bioanalíticos.** Brasília, DF, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); **Farmacopeia Brasileira.** v. 2. Brasília, DF, 2010, 808p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); **Resolução nº 899 - Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, 29 de maio de 2003.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2003.

ALI, H.; KALASHNIKOVA, I.; WHITE, M. A.; SHERMAN, M.; RYTTINGA, E.; **Preparation, characterization, and transport of dexamethasone-loaded polymeric nanoparticles across a human placental in vitro model.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 454, p. 149- 157, 2013.

AMO, E.M.; URTTI, A.; **Current and future ophthalmic drug delivery systems: A shift to the posterior segment.** *Drug Discovery Today*, v. 13, p. 135-143, 2008.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G., ALLEN JR. L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.** 6.ed. São Paulo: Premier, 2000. 568 p.

ARGENTON, A.; **Minicurso: Conceitos fundamentais de Cromatografia a líquido de Alto Desempenho (HPLC).** Conselho Regional de Química IV Região – São Paulo, São José do Rio Preto, 2010, 146p.

ARIAS, T. D.; **Glosario de Medicamentos: Desarrollo, Evaluación y Uso.** Washington D.C., Organización Panamericana de la Salud, 1999, 333p.

ARSETE, C. E.; SABLIOV, C. M.; **Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles.** Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, v. 17, p. 247–289, 2006.

ATHANASIOU, K.A.; NIEDERAUER, G. G.; AGRAWAL, C. M.; **Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copo-lymers.** Biomaterials, v. 17, p. 93-102, 1996.

BAKER, R. W.; **Membrane Technology and Applications.** Membrane Technology and Research, Menlo Park, California, 2ª ed., Editora John Wiley & Sons, Ltd, 2004. 545p.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R.; **Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos.** Polímeros: Ciência e Tecnologia, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; FREDDO, R. J.; MICHALOWSKI, C. B.; BARCELLOS, I.; FUNCK, J. A. B.; **Nanoparticles Containing Dexamethasone: Physicochemical Properties and Anti-Inflammatory Activity.** Acta Farm. Bonaerense, v. 22, p. 11-15, 2003.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H.; **Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization.** International Journal of Pharmaceutics, v. 280, p. 241–251, 2004.

BOURGES, J.L.; BLOQUEL, C.; THOMAS, A.; FROUSSART, F.; BOCHOT, A.; AZAN, F.; GURNY, R.; BENEZRA, D.; BEHAR-COHEN, F.; **Intraocular implants for extended drug delivery: Therapeutic applications.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 58, p.1182–1202, 2006.

CALEJO, M. T.; KJONIKSEN, A. L.; MALEKI, A.; NYSTROM, B.; SANDE, S. A.; **Microparticles Based on Hydrophobically Modified Chitosan as Drug Carriers.** Journal of Applied Polymer Science, v. 131, p.1-11, 2014.

CHACO'N, M.; MOLPECERES, J.; BERGES, L.; GUZMA'N, M.; ABERTURAS, M. R.; **Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers.** European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 8, p. 99–107, 1999.

CHENG, F.; WANG, S. P.; SU, C.; TSAI, T.; WU, P.; SHIEH, D.; CHEN, J.; HSIEH, P. C.; YEH, C.; **Stabilizer-free poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for multimodal biomedical probes.** Biomaterials, v. 29, p. 2104-2112, 2008.

COHEN, E. M.; **Dexamethasone.** In: FLOREY, A. (Ed.) Analytical Profiles of Drug Substances. San Diego: Academic, v. 2, p. 167-197, 1973.

COSTA, P.; LOBO, M. S.; **Modeling and comparison of dissolution profiles.** European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 13, p. 123–133, 2001.

CUNHA, G. M. F.; **Determinação do perfil de eliminação e da neuroproteção dos fármacos triancinolona acetona e acetato de dexametasona em olhos vitrectomizados.** Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2011. Dissertação.

DAMIANI, D.; KUPERMAN, H.; DICHTCHEKENIAN, V.; MANNA, T. D.; SETIAN, N.; **Corticoterapia e suas repercussões: a relação custo-benefício.** Revisão e Ensaio – Pediatria, São Paulo, v. 1, p. 71-82, 2001.

DANHIER, F.; ANSORENA, E.; SILVA, J. M.; COCO, R.; LE BRETON, A.; PRÉAT, V.; **PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications.** Journal of Controlled Release, v. 161, p. 505–522, 2012.

DEDAVID, B. A.; GOMEZ, C. I.; MACHADO, G.; **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores.** Porto Alegre, EDIPUCRS, 2007, 60p.

DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, E. T. G.; **Princípios e Aplicações de Análise Térmica – Material de Apoio: Curso Teórico/Prático.** Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2012, 40p.

FAYAD, S. J.; **Obtenção e caracterização de micro e nanopartículas a base de proteína isolada de soja.** Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2010. Dissertação.

FECZKÓ, T.; TOTH, J.; DOSÁ, Gy.; GYENIS, J.; **Influence of process conditions on the mean size of PLGA nanoparticles.** Chemical Engineering and Processing, v. 50, p. 846– 853, 2011.

FIALHO, S. L.; SILVA-CUNHA, A. S.; **Sistemas de transporte de fármacos para o segmento posterior do olho: bases fundamentais e aplicações.** Arquivo Brasileiro de Oftalmologia, v.70, p.173-179, 2007.

FIALHO, S. L.; REGO, M.G.B.; CARDILHO, J.A.; SIQUEIRA, R.B.; JORGE, R.; SILVA-CUNHA, A.; **Implantes biodegradáveis destinados à administração intraocular.** Arquivo Brasileiro de Oftalmologia, v.66, p.891-896, 2003.

FIGUEIREDO, K. C. S.; BORGES, C. P.; ALVES, T. L. M.; **Efeito das condições operacionais de preparaona morfologia de nanopartículas de poli(ácido láctico).** Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros, Foz do Iguaçu, v. 1, p. 137-146, 2009.

FINAMOR, L. P.; FINAMOR, F.; MUCCIOLI, C.; **Corticoterapia e Uveítes.** Arquivos Brasileiros de Oftalmologia, v. 65, p. 483-486, 2002.

FREDENBERG, S.; WAHLGREN, M.; RESLOW, M.; AXELSSON, A.; **The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems – A review.** International Journal of Pharmaceutics, v. 415, p. 34-52, 2011.

GÓMEZ-GAETE, C.; TSAPIS, N.; BESNARD, M.; BOCHOT, A.; FATTAL, E.; **Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles.** International Journal of Pharmaceutics, v. 331, p.153–159, 2007.

GUPTA, H.; AGIL, M.; KHAR, R. K.; ALI, A.; BHATNAGAR, A.; MITTAL, G.; **Nanoparticles laden *in situ* gel for sustained ocular drug delivery.** Journal of Pharmacy Bioallied Scienc, v. 5, p. 162–165, 2013. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3697196/?report=printable>.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M.; **Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting.** Current Opinion in Solid State and Materials Science, v. 6, p. 319–327, 2002.

HART, F. D.; **Dexamethasone.** Postgraduate medical journal, U.S. National Library of Medicine, v.36, p.26-7,1960.

HESSELINK, D. A.; BAARSMA, G.S.; KUIJPERS, R.W.A.M.; HAGEN, P.M.; **Experience with cyclosporine in endogenous uveitis posterior.** Transplantation Proceedings, v.36, p.372-377, 2004.

HINES, A. L.; MADDOX, R. N.; **Mass Transfer – Fundamentals and Applications.** Englewood Cliffs, New Jersey, Prentice-Hall, Inc., 1985, 529p.

HOLZER, M.; VOGEL, V.; MANTELE, W.; SCHWARTZ, D.; HAASE, W.; LANGER, K.; **Physico-chemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 72, p. 428–437, 2009.

JAFFE, G. J.; MARTIN, D.; CALLANAN, D.; PEARSON, A. P.; LEVY, B.; COMSTOCK, T.; **Fluocinolone acetonide implant (Retisert) for noninfectious posterior uveitis.** *Ophthalmology*, v.113, p.1020-1027, 2006.

JAIN, R. A.; **The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices.** *Biomaterials*, v. 21, p. 2475-2490, 2000.

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

KIMURA, H.; OGURA, Y.; **Biodegradable polymers for ocular drug delivery.** *Ophthalmology*, v. 215, n. 3, p.143-155, 2001.

KLOSE, D.; SIEPMANN, F.; ELKHARRAZ, K.; SIEPMANN, J.; **PLGA-based drug delivery systems: Importance of the type of drug and device geometry.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 354, p. 95–103, 2008.

KOHN, J.; LANGER, R.; **Bioresorbable and Bioerodible Materials.** In: RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E.; *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine.* San Diego, Academic Press, 1996, 497p.

LAO, L. L.; PEPPAS, N. A.; BOEY, F. Y. C.; VENKATRAMAN, S. S.; **Modeling of drug release from bulk-degrading polymers.** *International Journal of Pharmaceutics*, v.418, p.28-41, 2011.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T.; **Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico.** *Quimica Nova*, v.32, p.672-678, 2009.

LE BOURLAIS, C.; ACAR, L.; ZIA, H.; SADO, P. A.; NEEDHAM, T.; LEVERG, R.; **Ophthalmic Drug Delivery Systems Recent Advances.** *Progress in Retinal and Eye Research*, v.17, p.33-58, 1998.

MAINARDES, R. M.; **Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2007. Tese.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F.; **A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 38, p. 375-399, 2002.

MEHNERT, W.; MADER, K.; **Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 64, p. 83–101, 2012.

MELO, C. S.; SILVA-CUNHA, A.; FIALHO, S. L.; **Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos.** Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences, v. 33, p. 469-477, 2012.

MERKLI, A.; TABATABAY, C.; GURNY, R.; HELLER, J.; **Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs.** Progress of Polymers Science, v.23, p. 563-580, 1998.

MITTAL, A.; CHITKARA, D.; KUMAR, N.; PAWAR, R.; DOMB, A.; CORN, B.; **Polymeric Carriers for Regional Drug Therapy.** In: GALAEV, I.; MATTIASSOM, B.; SMART POLYMERS: Applications in Biotechnology and Biomedicine. 2ª ed., Nova York, Editora CRC Taylor & Francis Group, 2008, 492p.

OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E. M.; **Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos.** Revista Eletrônica de Farmácia v.3, p. 29-35, 2006.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P.; **Microemulsões: Estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos.** Quimica Nova, v. 27, p. 131-138, 2004.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G.; **Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 43, p. 491-502, 2007.

SADAHIRA, C. M.; **Síntese, caracterização e avaliação do perfil de liberação *in vitro* de hidrogéis do álcool polivinílico pH sensitivos processados por métodos físico-químicos.** Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2007. Dissertação.

SAHOO, S. K.; DILNAWAZ, F.; KRISHNAKUMAR, S.; **Nanotechnology in ocular drug delivery,** Drug Discovery Today. v.13, p.146-151, 2008.

SANTANDER-ORTEGA, M. J.; JÓDAR-REYES, A. B.; CSABA, N.; BASTOSGONZÁLEZ, D.; ORTEGA-VINUESA, J. L.; **Colloidal stability of Pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: A variety of stabilization mechanisms.** Journal of Colloid and Interface Science, v. 302, p. 522-529, 2006.

SANTOS, R. M. M.; FIALHO, S. L.; **Nanopartículas: uma alternativa para a administração de biofármacos.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 37, p. 52-59, 2007.

SANTOS, T. M.; FIGUEIREDO, K. C. S.; **Síntese de nanopartículas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico): investigação de variáveis utilizando planejamento fatorial reduzido.** In: XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2012, Búzios. Anais do XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2012. p. 1-9.

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

SHEN, J.; BURGESS, D. J.; **Accelerated in vitro release testing of implantable PLGA microsphere/PVA hydrogel composite coatings.** International Journal of Pharmaceutics, v. 422, p. 341– 348, 2012.

SIEPMANN, J.; GÖPFERICH, A.; **Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery Systems.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 48, p. 229–247, 2001.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A.; **Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse.** International Journal of Pharmaceutics, v. 418, p. 6– 12, 2011.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F.; **Mathematical modeling of drug delivery.** International Journal of Pharmaceutics, v.364, p. 328–343, 2008.

SILVA, A.C.; LOPES, C.M.; FONSECA, J.; SOARES, M.E.; SANTOS, D.; SOUTO, E.B.; FERREIRA, D.; **Risperidone Release from Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Validated HPLC Method and Modelling Kinetic Profile.** Current Pharmaceutical Analysis, v. 8, p. 307-316, 2012.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J.; **Nano-emulsions.** Current Opinion in Colloid & Interface Science, v. 10, p. 102-110, 2005.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; **Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de Polímeros Pré-formados – Parte II.** Polímeros, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

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

SRIVASTAVA, A.; RAJAPPA, M.; KAUR, J. **Uveitis: Mechanisms and recent advances in therapy.** Clínica Chimica Acta, v.411, p. 1165–1171, 2010.

STAMATIALLIS, D. F.; PAPPENBURG, B. J.; GIRONÉS, M.; SAIFUL, S.; BETTAHALLI, S. N. M.; SCHMITMEIER, S.; WESSLING, M.; **Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering.** Journal of Membrane Science, v. 308, p.1–34, 2008.

TAMADA, J. A.; LANGER, R.; **Erosion kinetics of hydrolytically degradable polymers.** National Academy of Sciences of the United States of America, v. 90, p. 552-556, 1993.

TAYLOR, S. R. J.; ISA, H.; JOSHI, L.; LIGHTMAN, S.; **New Developments in Corticosteroid Therapy for Uveitis.** Ophthalmologica, v. 224, p.46–53, 2010.

THRIMAWITHANA, T. R.; YOUNG, S.; BUNT, C. R.; GREEN, C.; ALANY, R. G.; **Drug delivery to the posterior segment of the eye.** Drug Discovery Today, v. 16, p. 270-277, 2011.

UHRICH, K. E.; CANNIZZARO, S. M.; LANGER, R. S.; SHAKESHEFF, K. M.; **Polymeric Systems for Controlled Drug Release.** Chemical Reviews, v. 99, 1999.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; **Aplicações Farmacêuticas de Polímeros.** Polímeros: Ciência e Tecnologia, v. 20, p. 51-64, 2010.

YASUKAWA, T.; OGURA, Y.; SAKURAI, E.; TABATA, Y.; KIMURA, H.; **Intraocular sustained delivery using implantable polymeric device.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 57, p. 2033-2046, 2005.

YASUKAWA, T.; OGURA, Y.; SAKURAI, E.; TABATA, Y.; KIMURA, H.; WIEDEMANN, P.; HONDA, Y.; **Drug delivery systems for vitreoretinal diseases.** Retinal and Eye Research, v. 23, p. 253-281, 2004.

ZOLNIK, B. S.; BURGESS, D. J.; **Evaluation of in vivo–in vitro release of dexamethasone from PLGA microspheres.** Journal of Controlled Release, v. 127, p. 137–145, 2008.

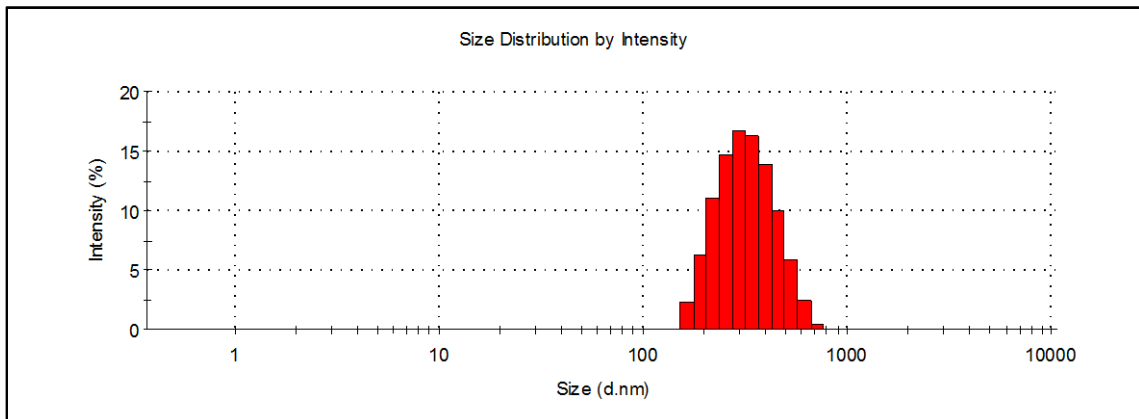
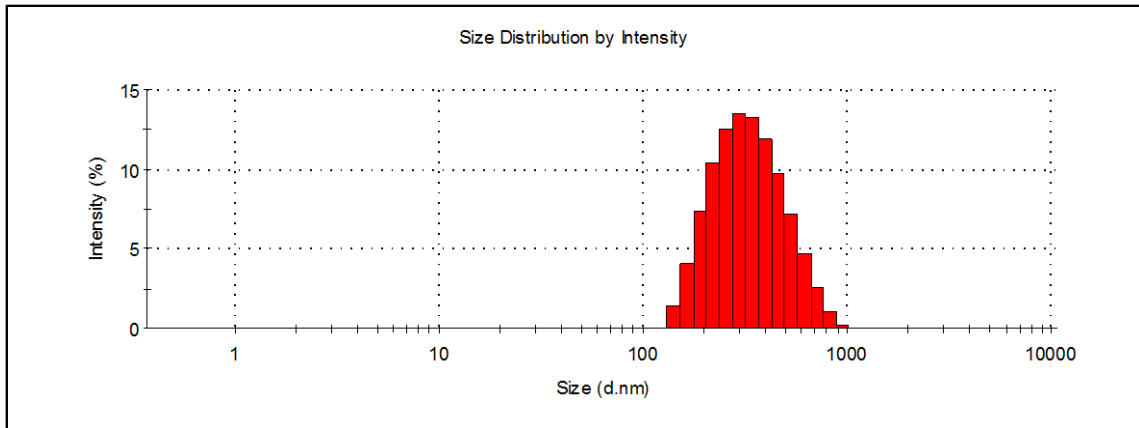
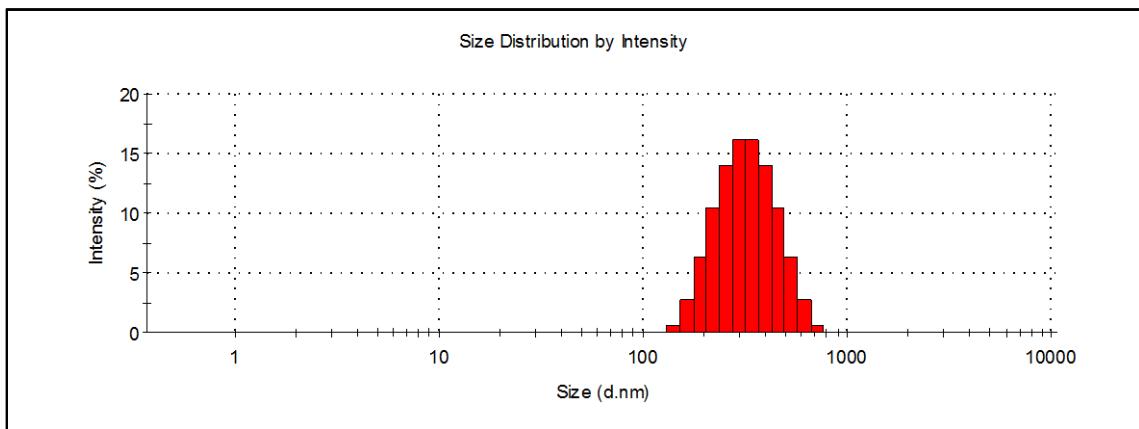
ZWEERS, M. L. T.; ENGBERS, G. H. M.; GRIJPMMA, D. W.; FEIJEN, J.; **Release of anti-restenosis drugs from poly(ethylene oxide)-poly (DL-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles.** *Journal of Controlled Release*, v. 114, p. 317–324, 2006.

ANEXO A

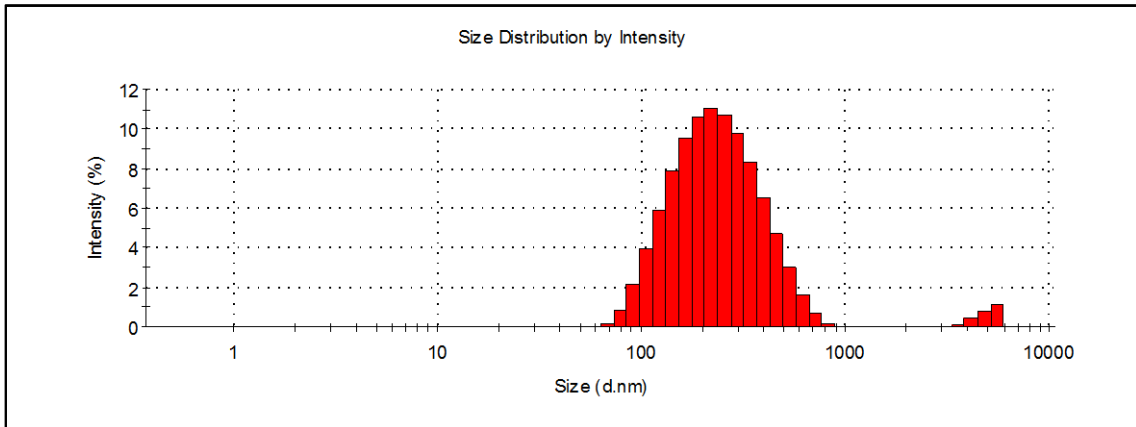
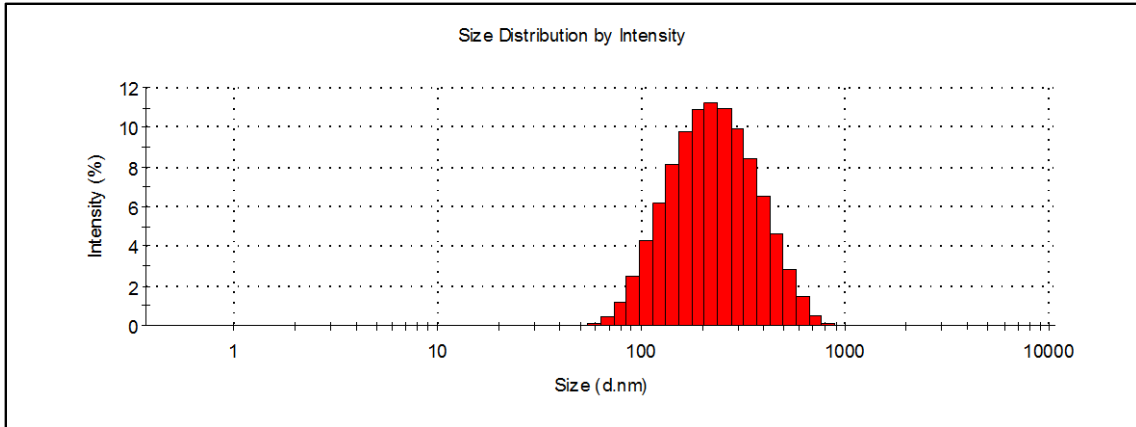
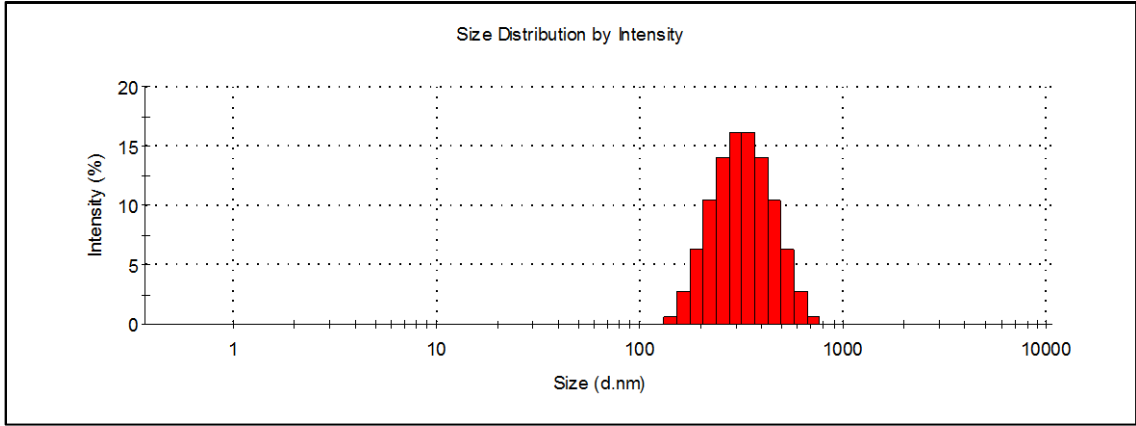
Medidas de tamanho das amostras

Nanopartículas preparadas para as corridas do planejamento experimental

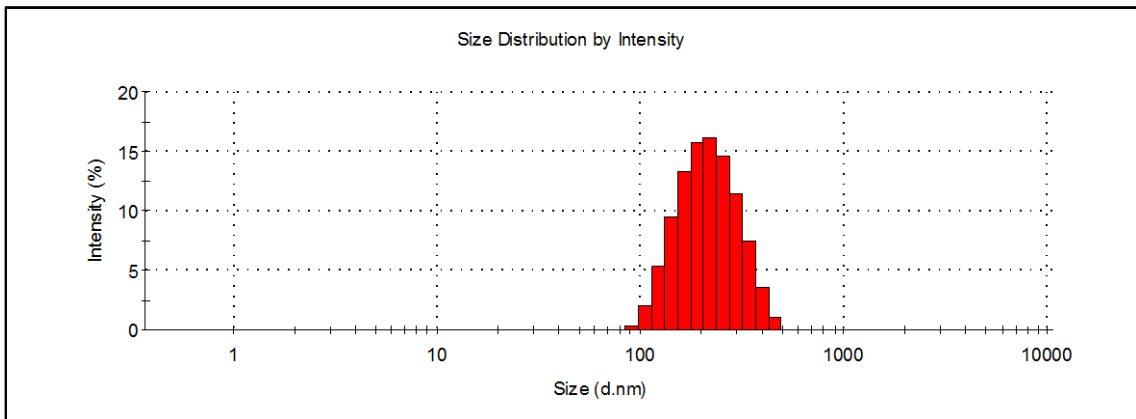
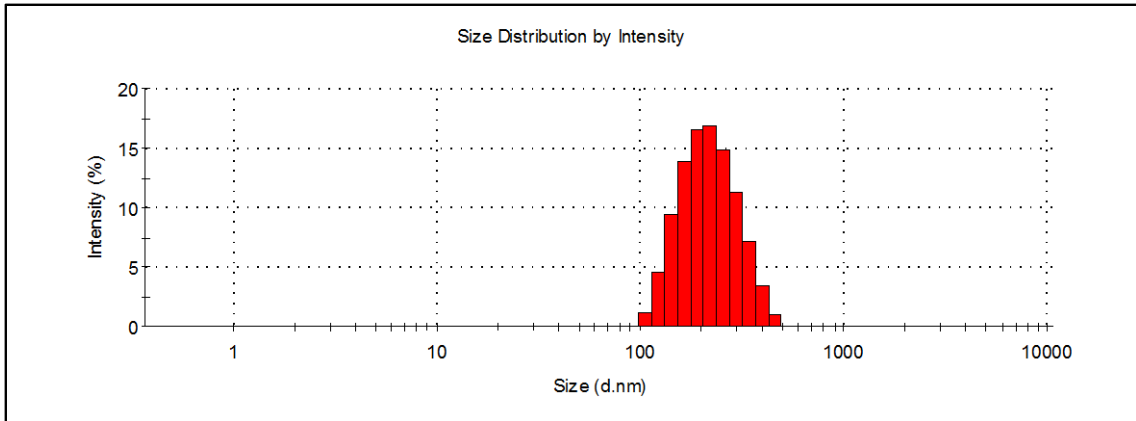
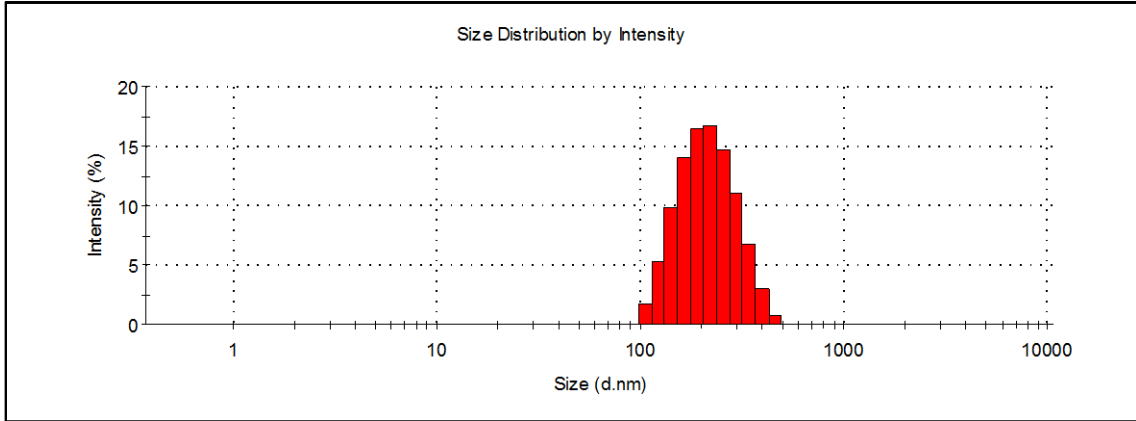
Amostra 1	Tamanho (nm)	Tamanho médio \pm DP	PDI	PDI médio \pm DP
	303	302,3 \pm 0,6	0,081	0,09 \pm 0,03
	302		0,128	
	302		0,088	



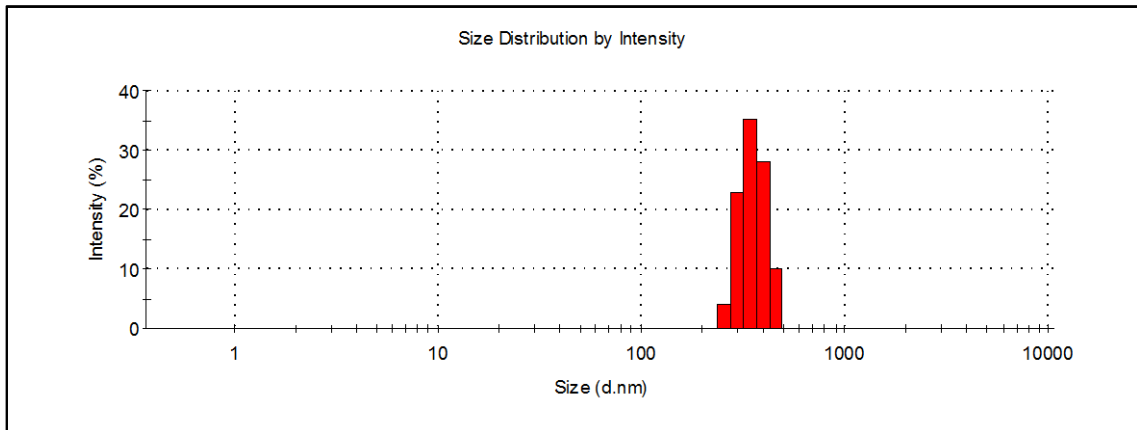
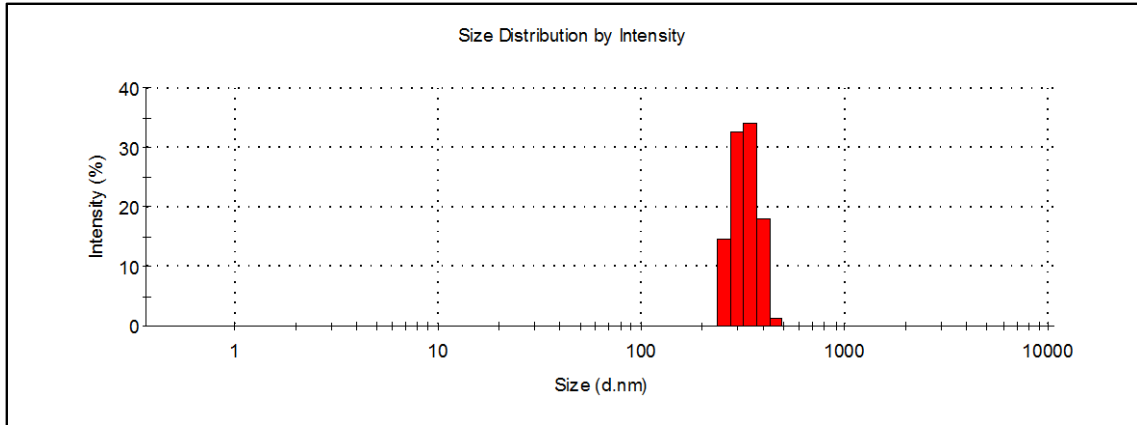
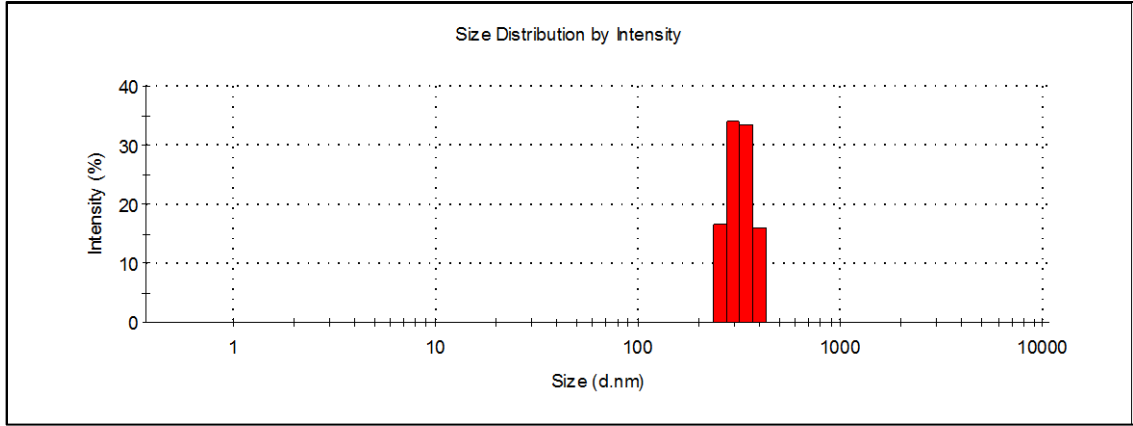
Amostra 2	Tamanho (nm)	Tamanho médio ± DP	PDI	PDI médio ± DP
	206	210 ± 8	0,197	0,21 ± 0,02
	205		0,201	
	219		0,237	



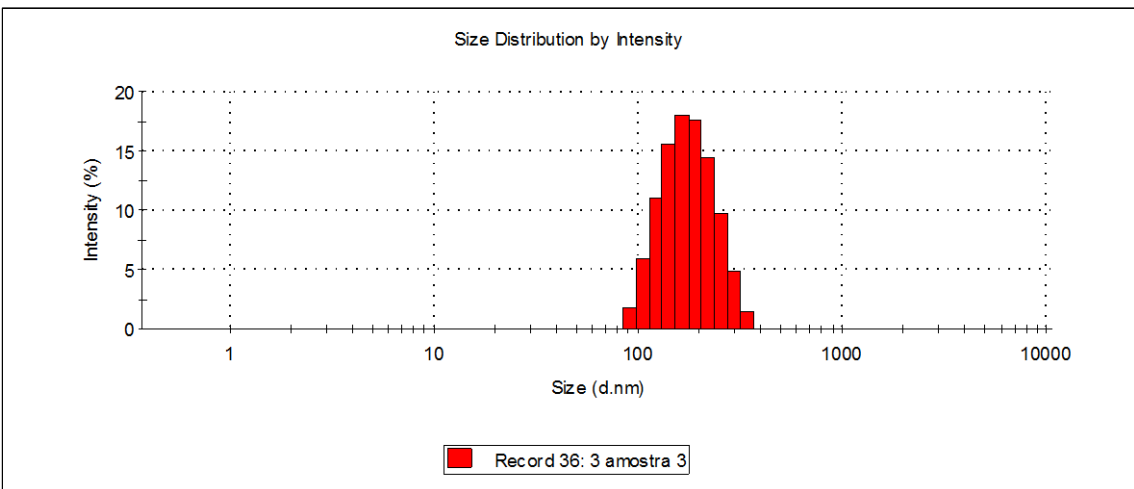
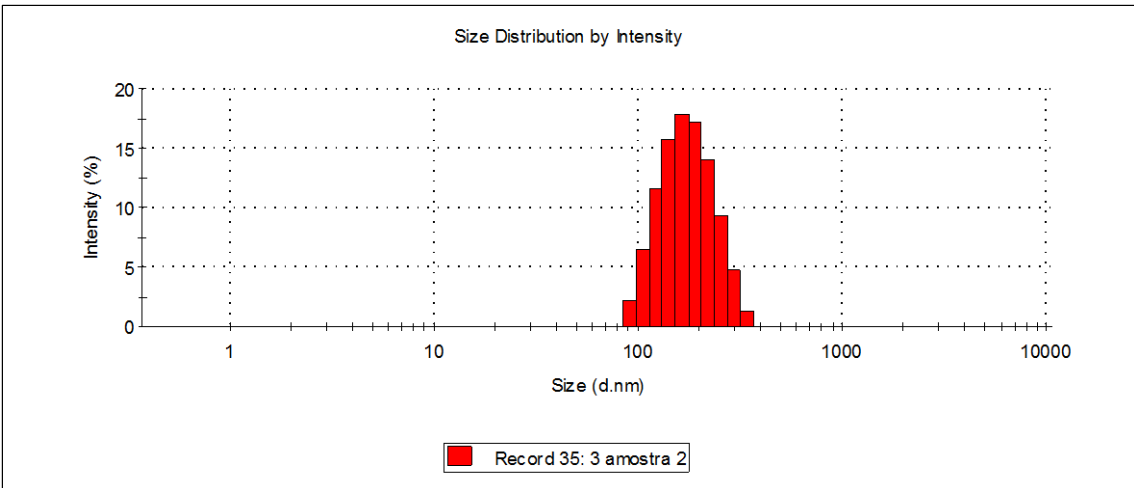
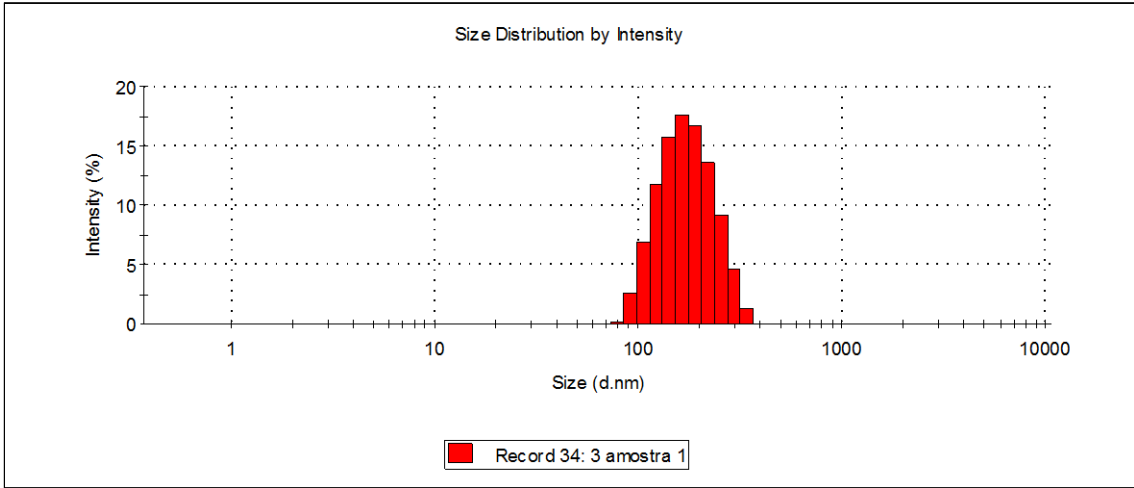
Amostra 3	Tamanho (nm)	Tamanho médio ± DP	PDI	PDI médio ± DP
	201	202 ± 1	0,079	0,09 ± 0,01
	204		0,099	
	203		0,078	



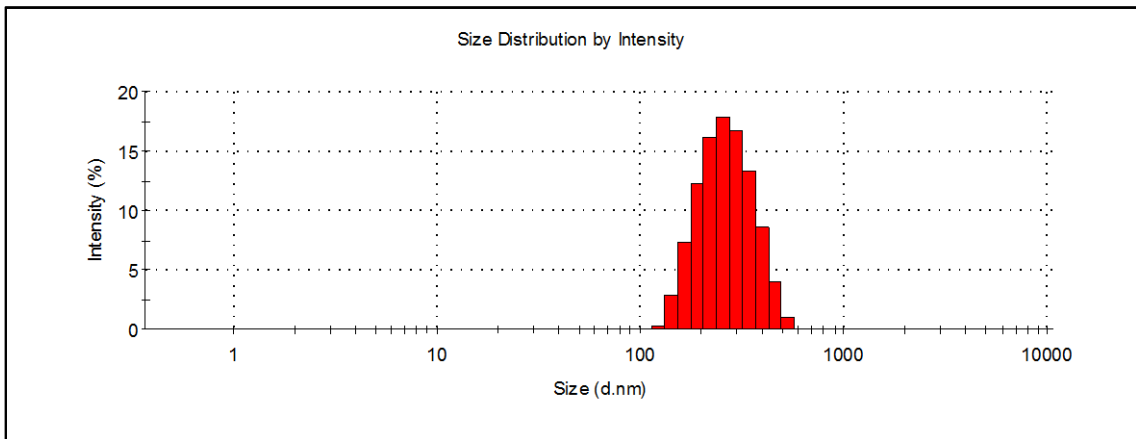
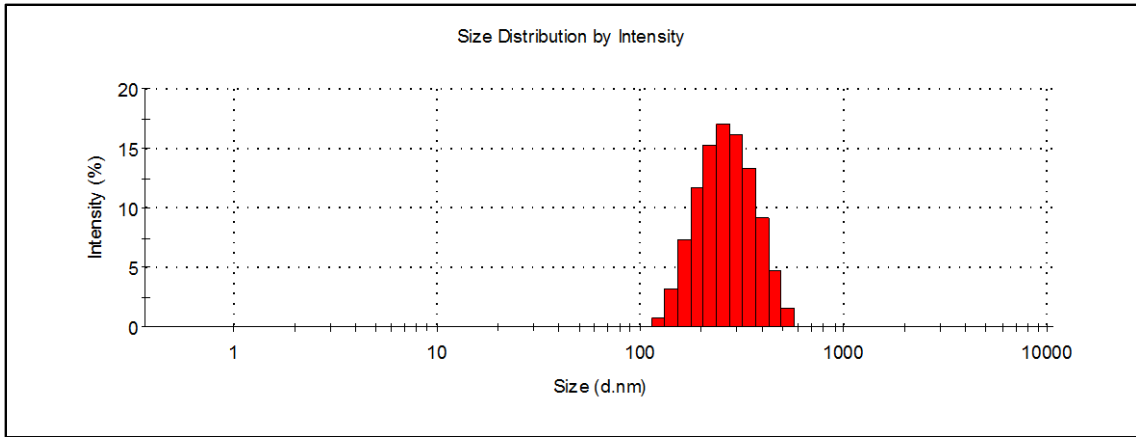
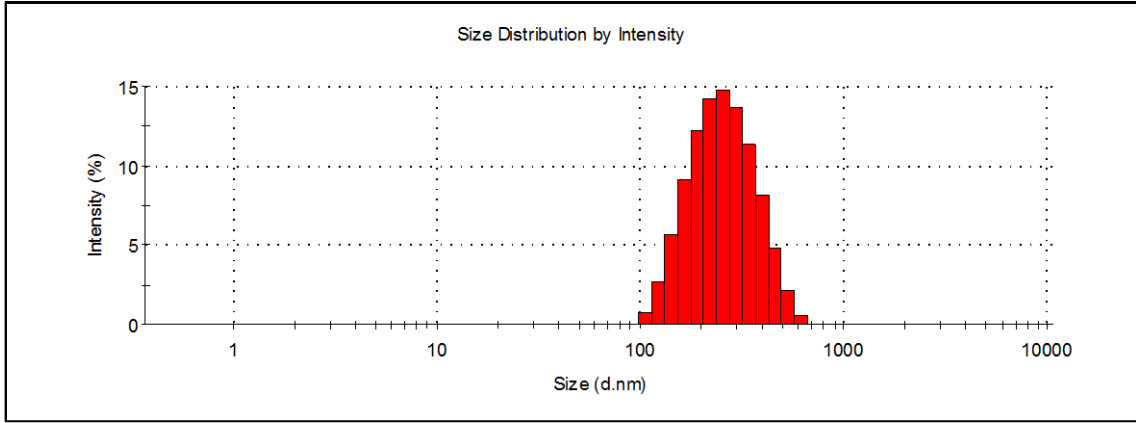
Amostra 4	Tamanho (nm)	Tamanho médio ± DP	PDI	PDI médio ± DP
	336	(36 ± 2) x 10	0,335	0,33 ± 0,03
	359		0,363	
	382		0,293	



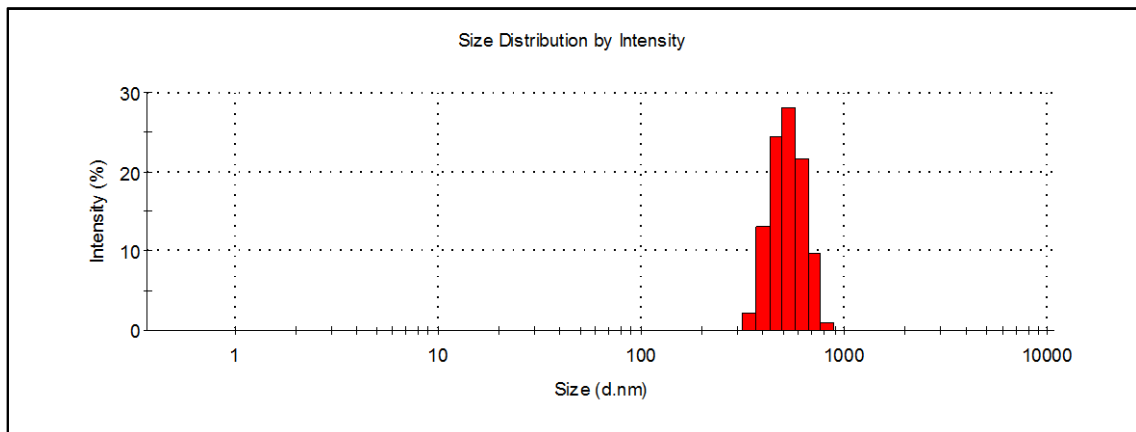
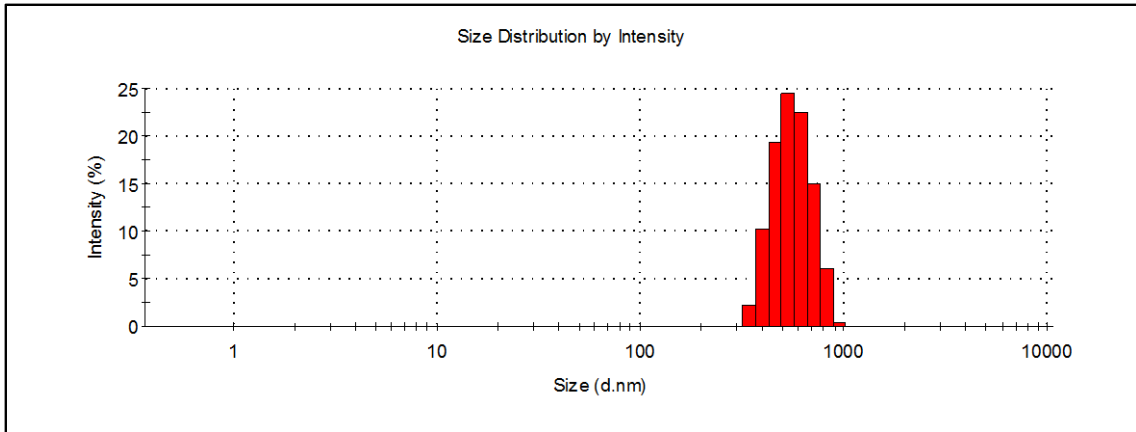
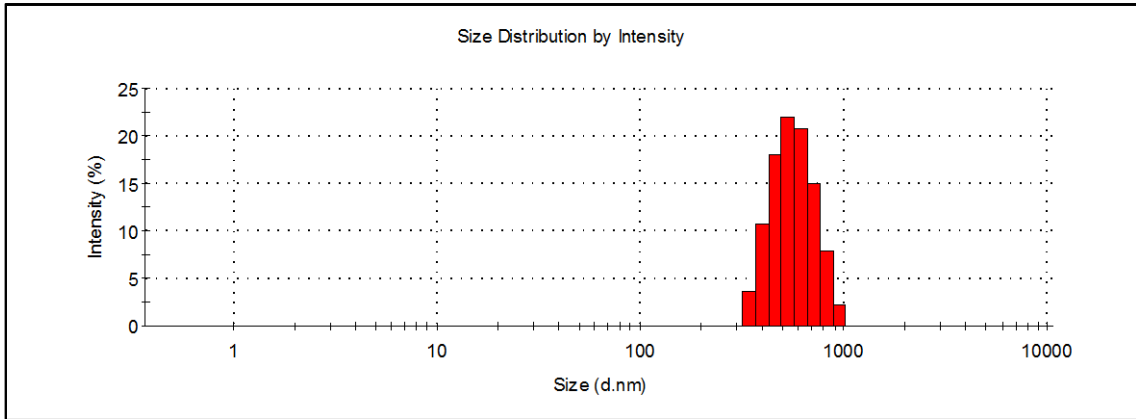
Amostra 5	Tamanho (nm)	Tamanho médio ± DP	PDI	PDI médio ± DP
	185	190 ± 17	0,536	0,55 ± 0,01
	176		0,562	
	208		0,540	



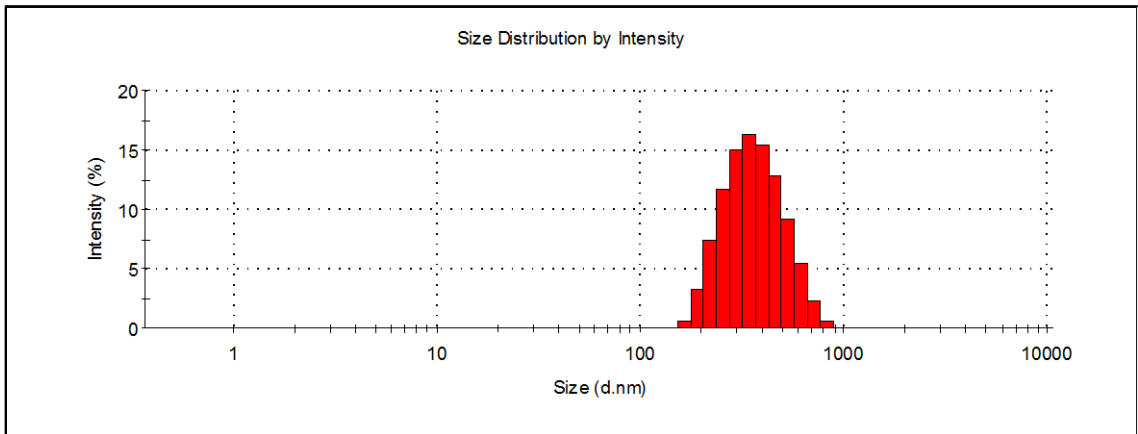
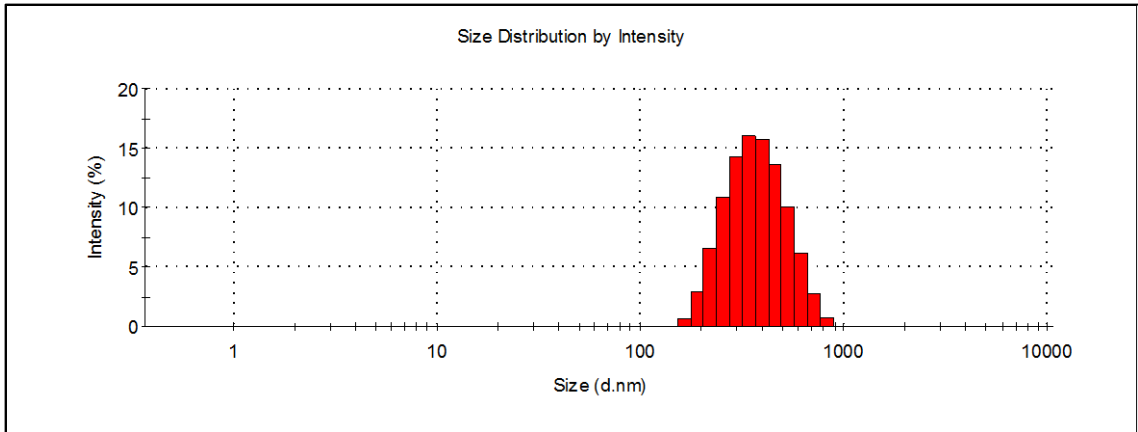
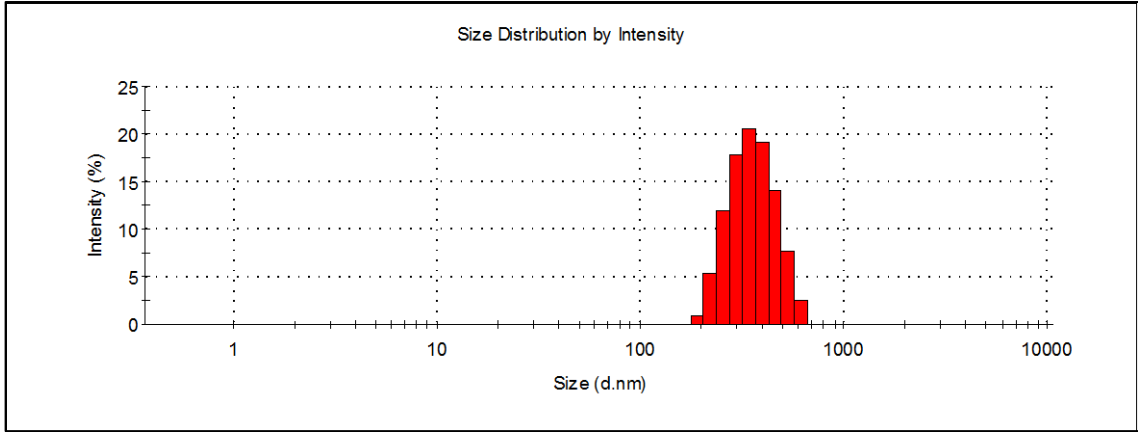
Amostra 6	Tamanho (nm)	Tamanho médio ± DP	PDI	PDI médio ± DP
	237	241 ± 3	0,163	0,13 ± 0,03
	243		0,117	
	244		0,101	



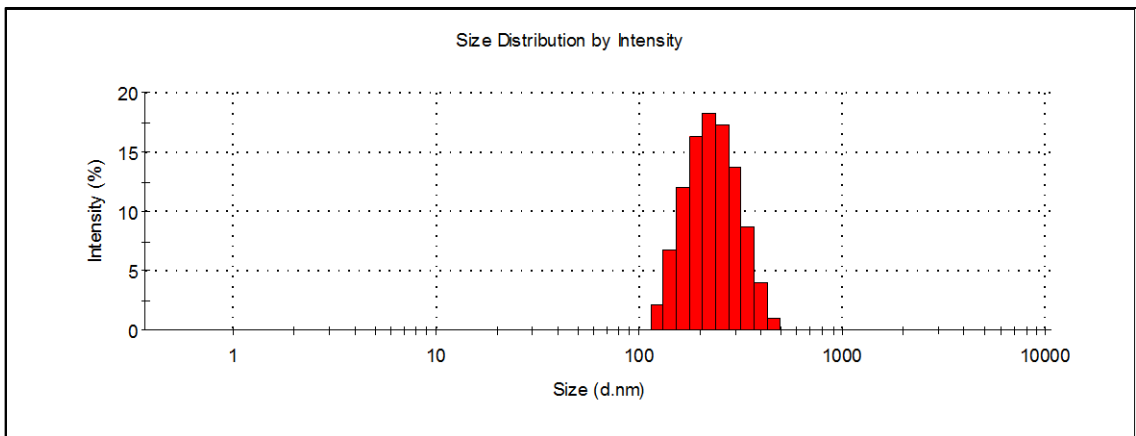
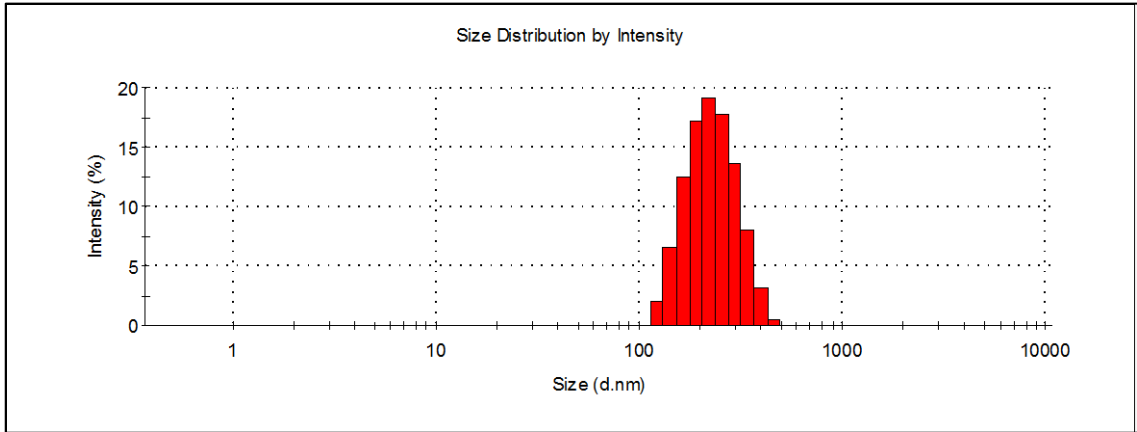
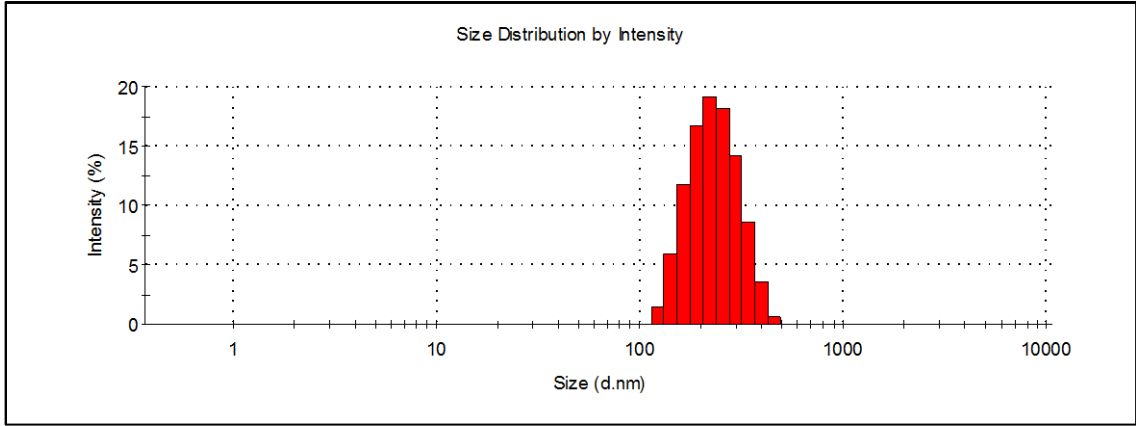
Amostra 7	Tamanho (nm)	Tamanho médio ± DP	PDI	PDI médio ± DP
	525	258 ± 8	0,162	0,09 ± 0,06
	538		0,045	
	521		0,068	



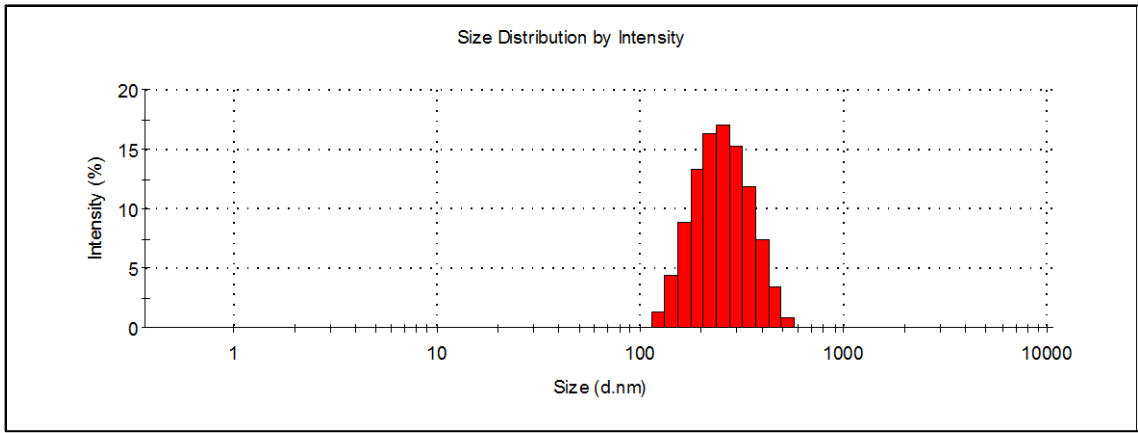
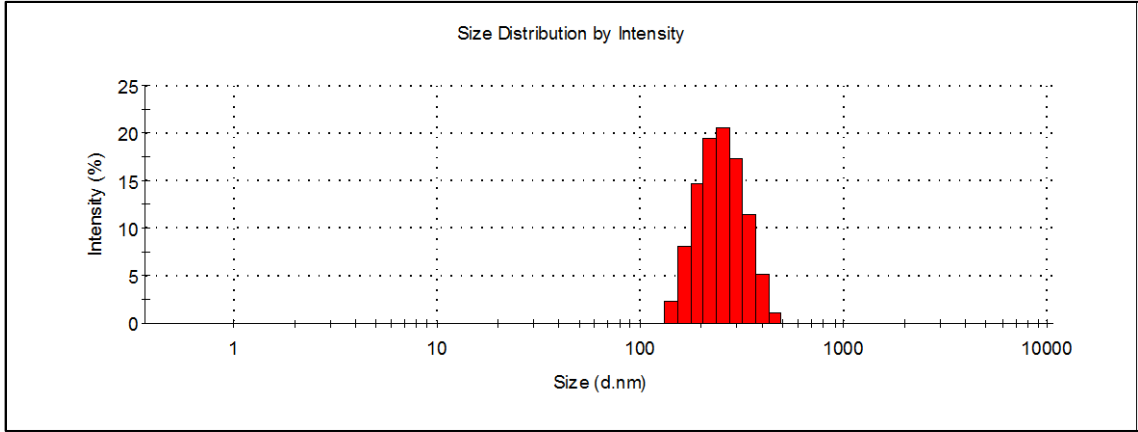
Amostra 9.1	Tamanho (nm)	Tamanho médio ± DP	PDI	PDI médio ± DP
	342	342 ± 3	0,041	0,08 ± 0,03
	346		0,102	
	339		0,102	



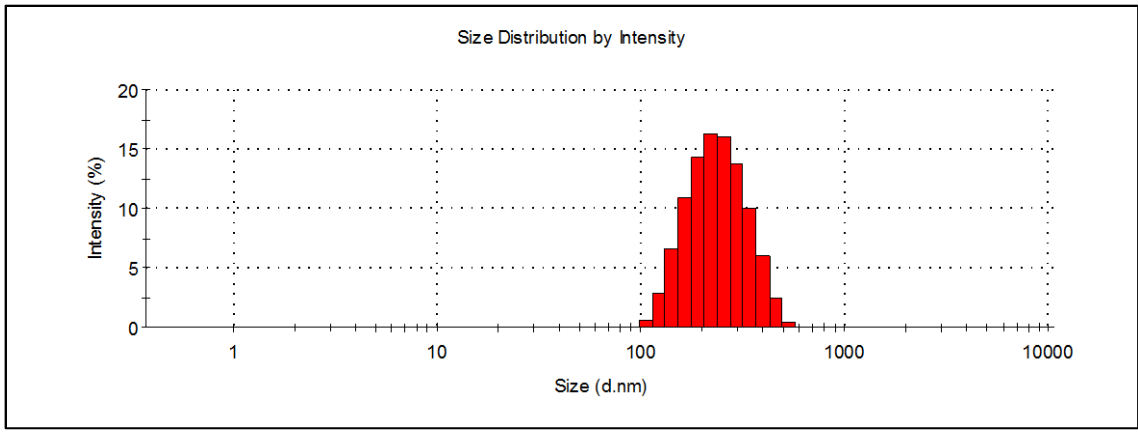
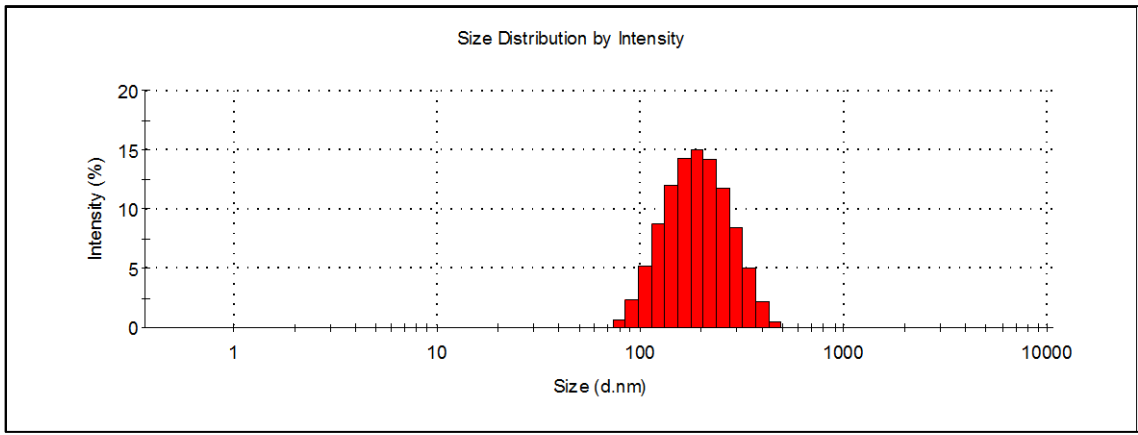
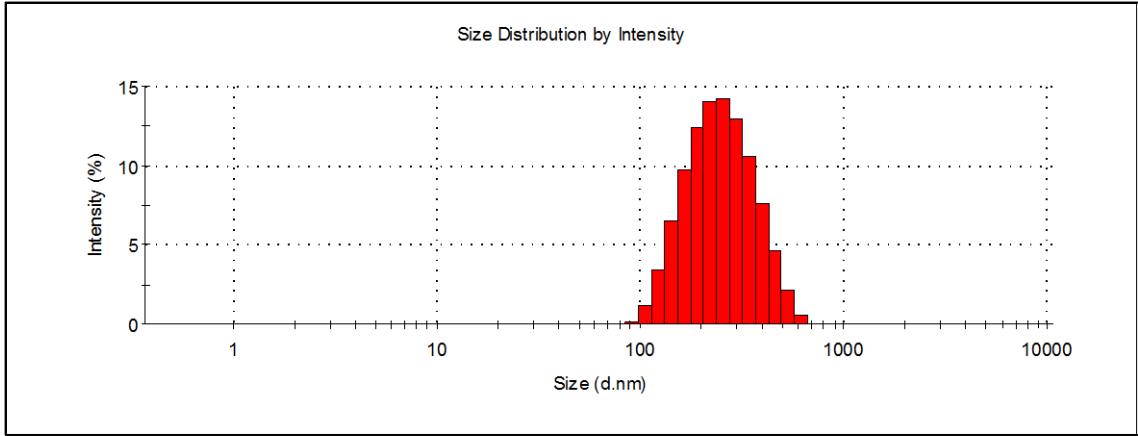
Amostra 9.2	Tamanho (nm)	Tamanho médio ± DP	PDI	PDI médio ± DP
	219	217 ± 1	0,077	0,08 ± 0,01
	216		0,064	
	216		0,083	



Amostra 9.3	Tamanho (nm)	Tamanho médio ± DP	PDI	PDI médio ± DP
	240		0,049	
235	0,083			

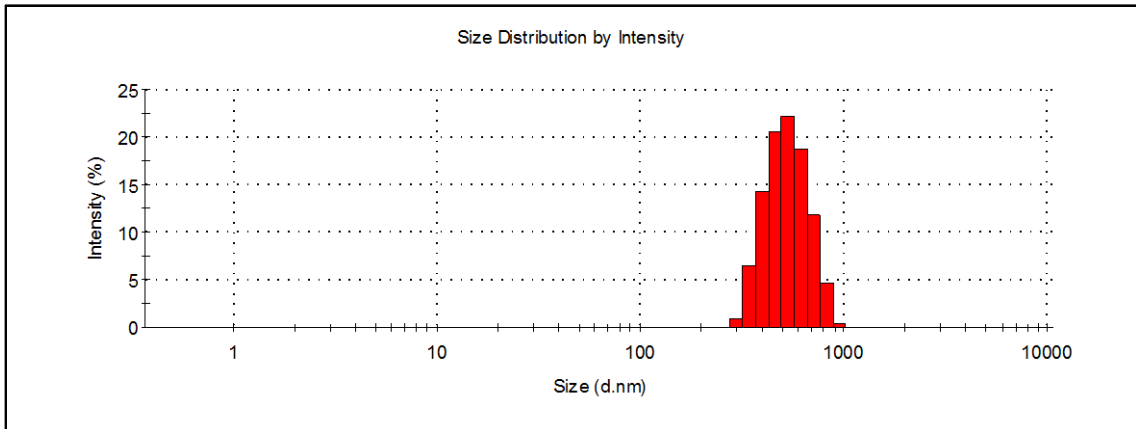
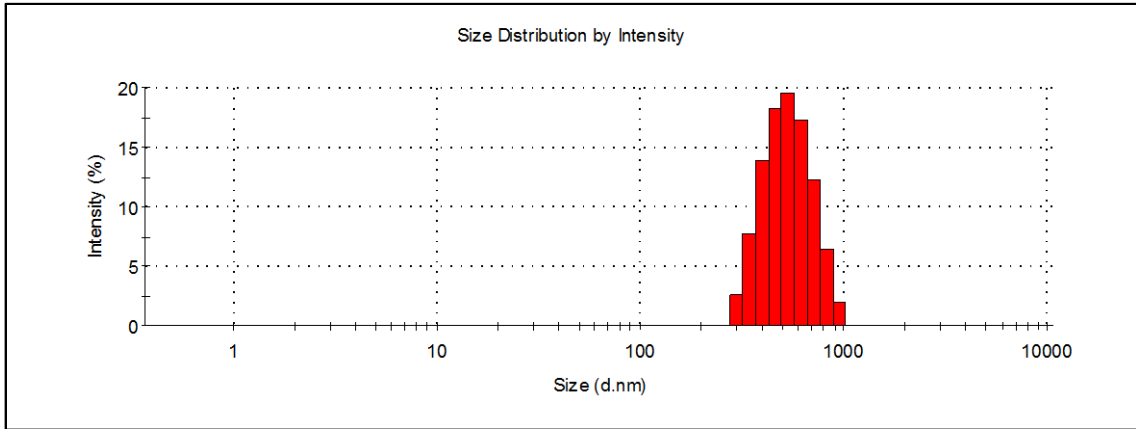
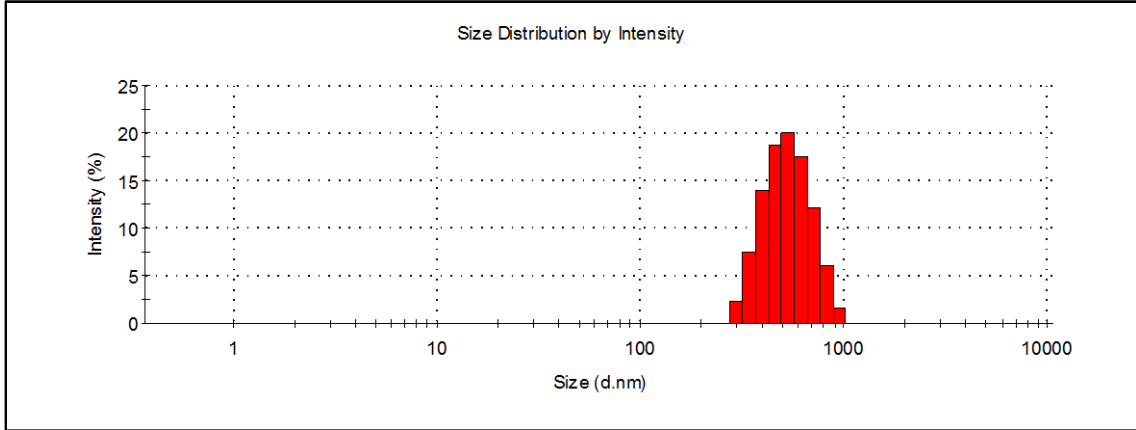


Nanopartículas sem acetato de dexametasona preparada nas condições selecionadas pelo planejamento experimental:



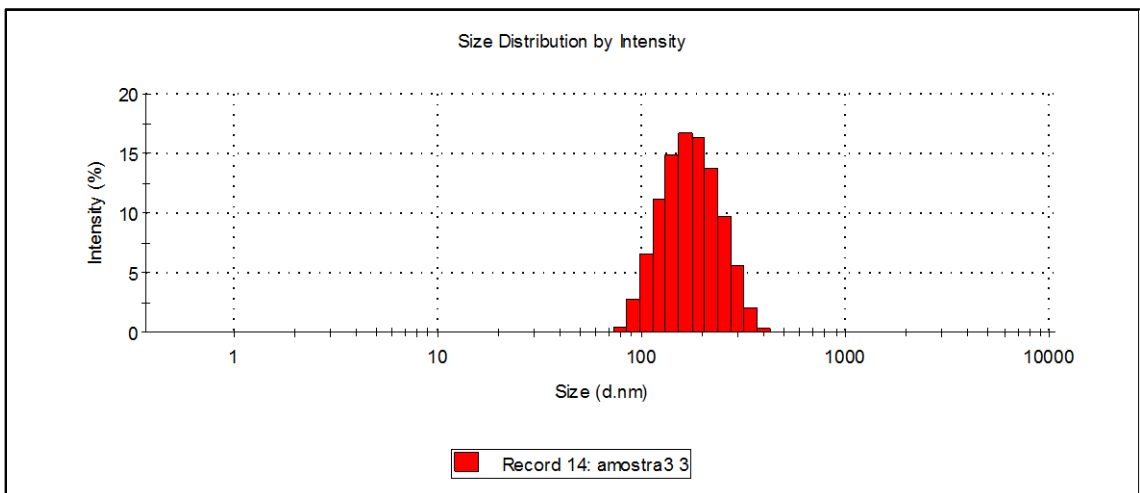
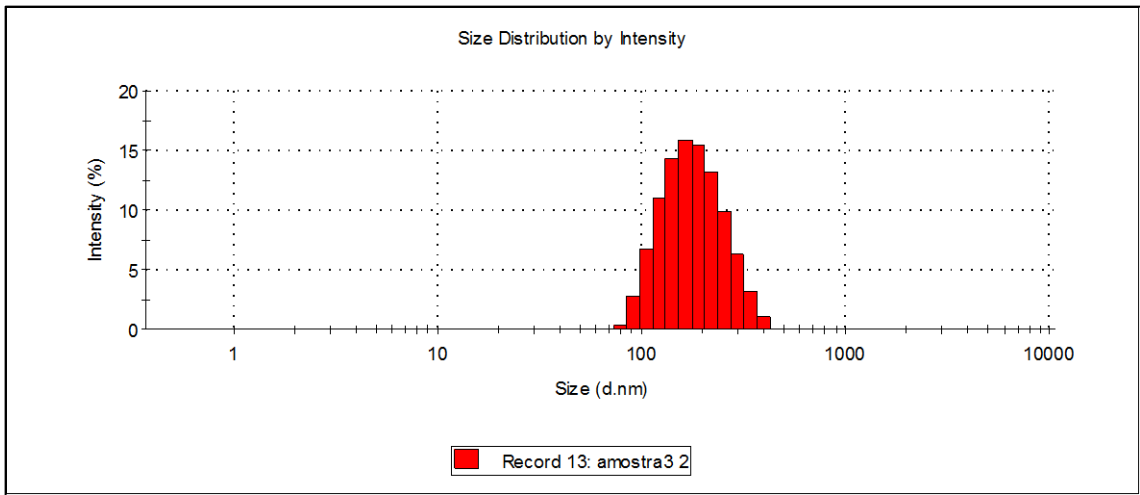
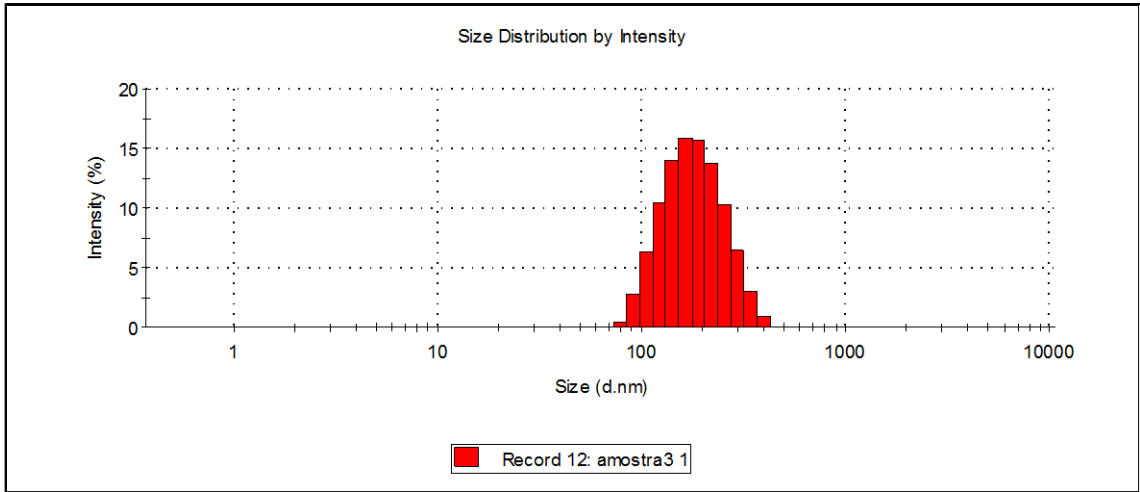
Nanopartículas contendo acetato de dexametasona

Amostra	Tamanho (nm)	Tamanho médio ± DP	PDI	PDI médio ± DP
	541	540 ± 4	0,066	0,07 ± 0,01
	543		0,051	
	535		0,079	

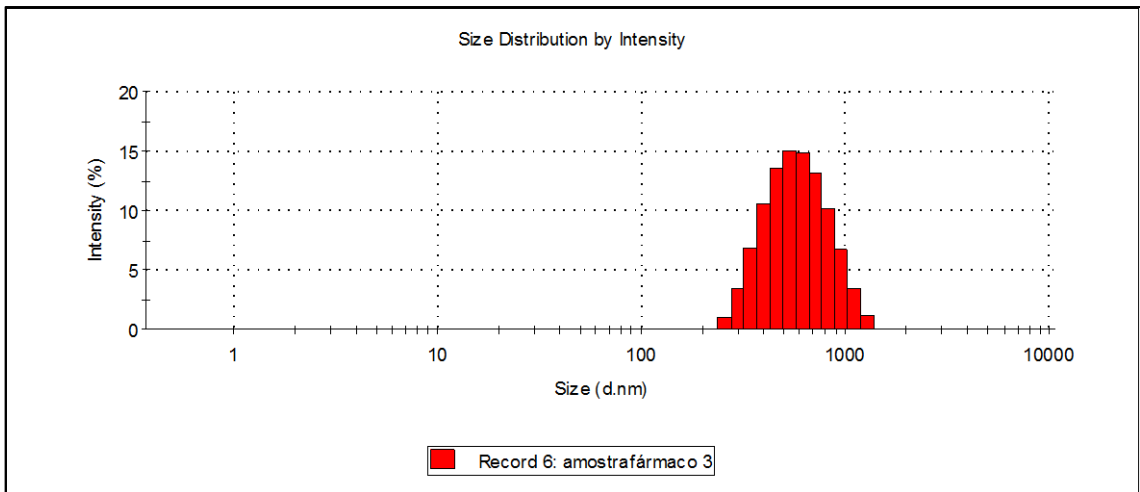
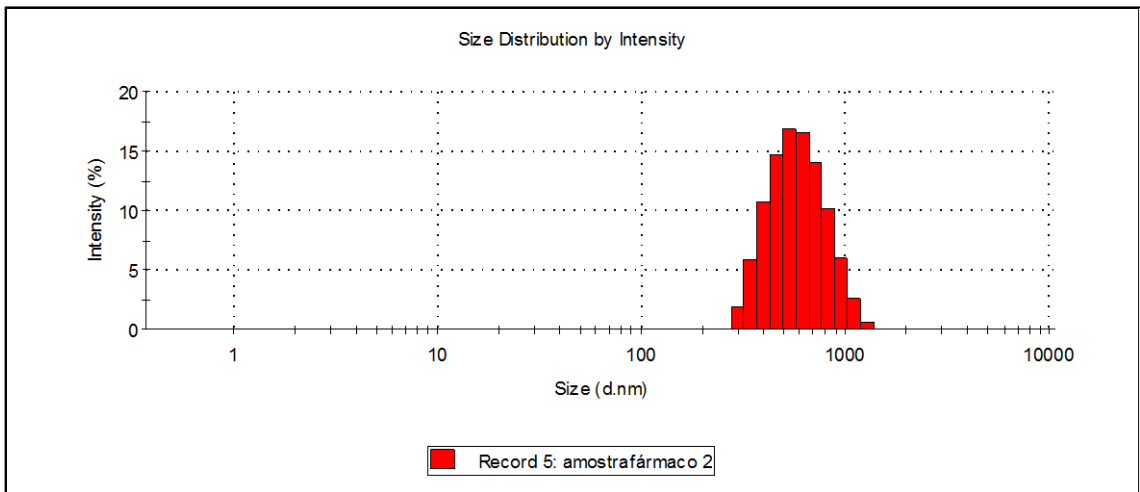
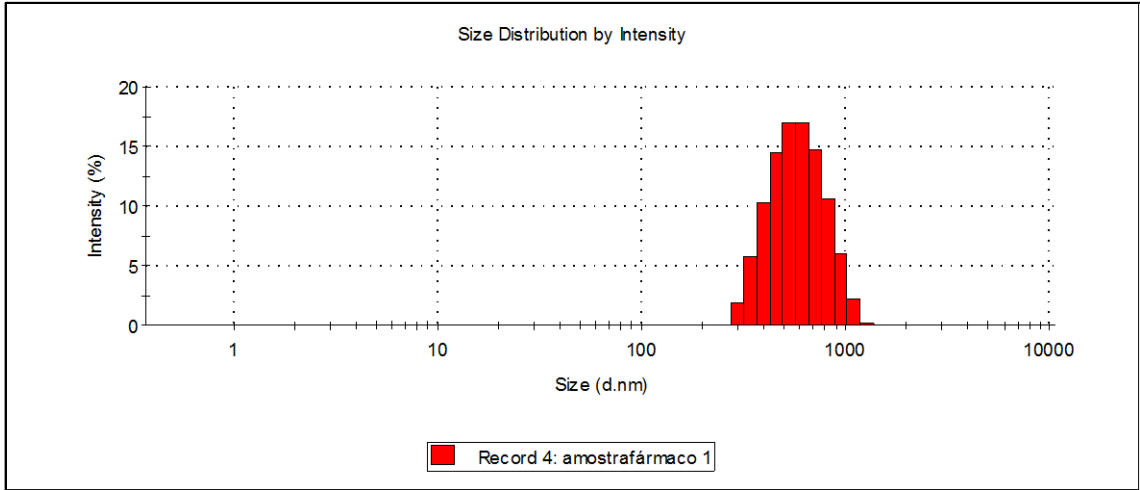


Amostras após sete meses de armazenamento

Amostra sem acetato de dexametasona	Tamanho (nm)	Tamanho médio ± DP	PDI	PDI médio ± DP
	168	167 ± 1	0,104	0,10 ± 0,01
	167		0,102	
	165		0,086	



Amostra contendo acetato de dexametasona	Tamanho (nm)	Tamanho médio ± DP	PDI	PDI médio ± DP
	539	532 ± 6	0,116	0,13 ± 0,02
	529		0,151	
527	0,137			

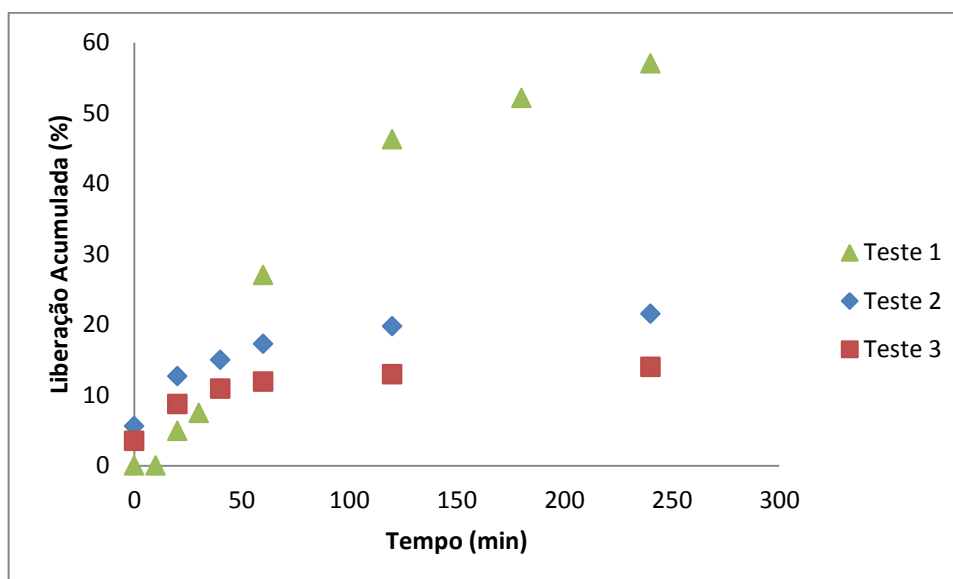


ANEXO B

Ajuste modelos cinéticos

Resultados obtidos para os testes preliminares.

Teste	Tempo (min)	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Fração liberada (%)	Liberação acumulada (%)
1	0	-	-	-	-
	10	-	-	-	-
	20	9201	4,71	4,91	4,91
	30	4734	2,42	2,52	7,43
	60	36693	18,79	19,57	27,00
	120	36098	18,48	19,25	46,25
	180	10947	5,60	5,84	52,09
	240	9243	4,73	4,93	57,02
2	0	10951	5,37	5,59	5,59
	20	13839	6,78	7,07	12,66
	40	4545	2,23	2,32	14,98
	60	4435	2,17	2,26	17,24
	120	4906	2,41	2,51	19,75
	240	3472	1,70	1,77	21,52
	0	13717	2,81	3,50	3,50
3	20	20377	3,36	5,20	8,70
	40	8648	4,99	2,21	10,91
	60	3908	2,12	1,00	11,91
	120	3933	0,96	1,00	12,91
	240	4165	0,96	1,06	13,98



Resultados obtidos para o teste de liberação realizado em triplicata.

Teste	Tempo (horas)	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Fração liberada (%)	Liberação acumulada (%)
1	0	22866	3,21	3,34	3,34
	0,5	27664	3,88	4,04	7,38
	1	11015	1,54	1,61	8,99
	2	9691	1,36	1,42	10,41
	3	8771	1,23	1,28	11,69
	4	7099	1,00	1,04	12,72
	5	21571	3,03	3,15	15,88
	6	15295	2,15	2,23	18,11
	24	15415	2,16	2,25	20,36
	48	16760	2,35	2,45	22,81
2	0	10469	1,47	1,53	1,53
	0,5	5930	0,83	0,87	2,40
	1	10169	1,43	1,49	3,88
	2	7071	0,99	1,03	4,91
	3	47686	6,69	6,97	11,88
	4	8403	1,18	1,23	13,11
	5	10824	1,52	1,58	14,69
	6	15043	2,11	2,20	16,89
	24	15962	2,24	2,33	19,22
	48	11619	1,63	1,70	20,92
3	0	5546	0,78	0,81	0,81
	0,5	8048	1,13	1,18	1,99
	1	9017	1,26	1,32	3,30
	2	15890	2,23	2,32	5,62
	3	68549	9,61	10,01	15,64
	4	8718	1,22	1,27	16,91
	5	18023	2,53	2,63	19,54
	6	11590	1,63	1,69	21,24
	24	14777	2,07	2,16	23,40
	48	21381	3,00	3,12	26,52

A concentração das amostras foi calculada com base no valor da área, de 142617, obtido para o padrão de acetato de dexametasona na concentração de $1\mu\text{g/mL}$, considerando-se ainda a diluição utilizada. As frações liberadas foram calculadas em relação a concentração de $96\mu\text{g/mL}$ encapsulada. Para a montagem do gráfico de liberação foram utilizadas as médias dos valores obtidos para a liberação acumulada.

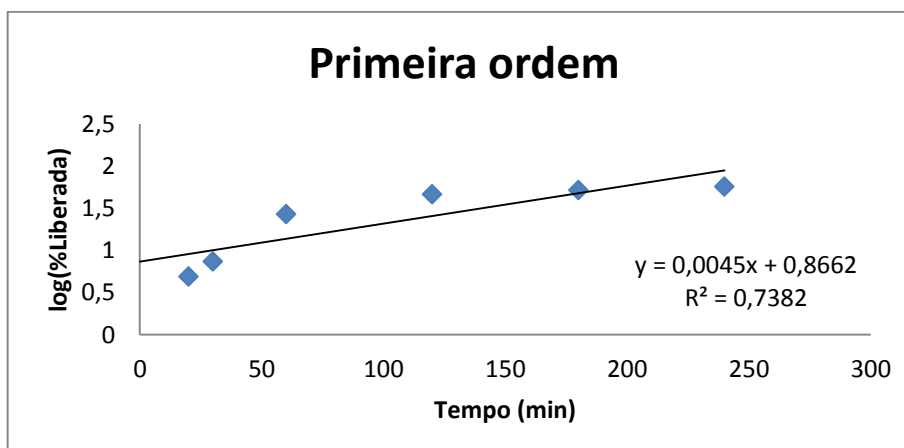
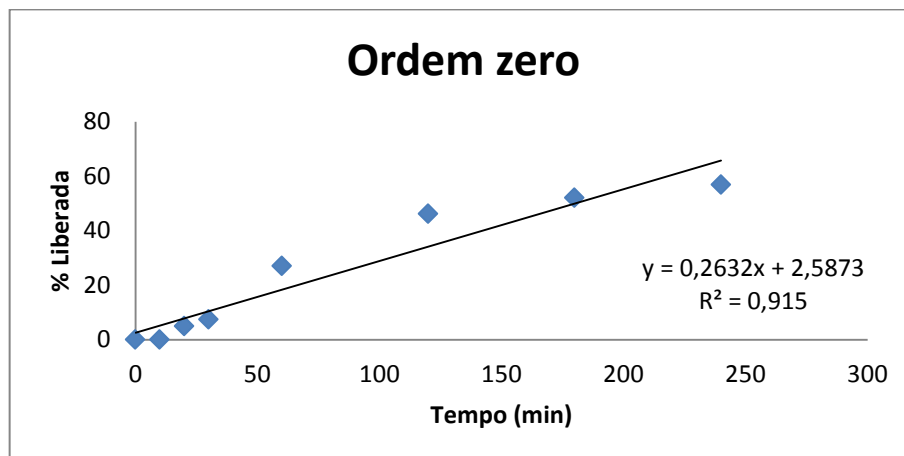
Dados obtidos para a montagem do gráfico de liberação.

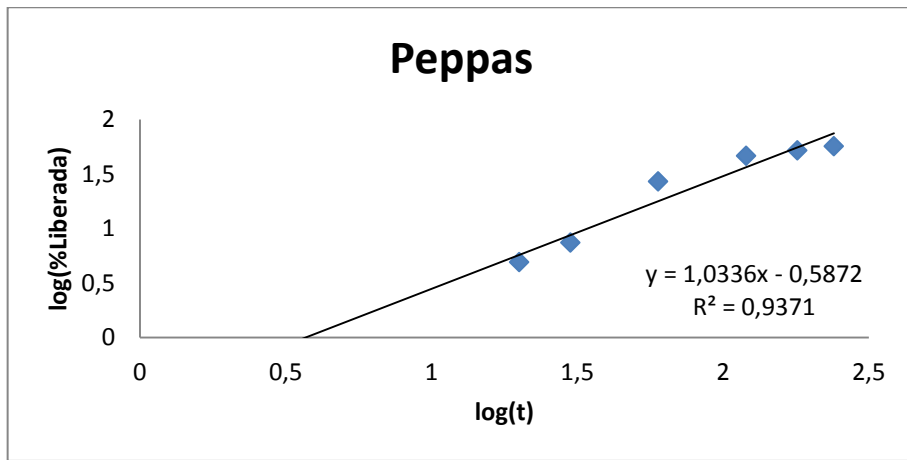
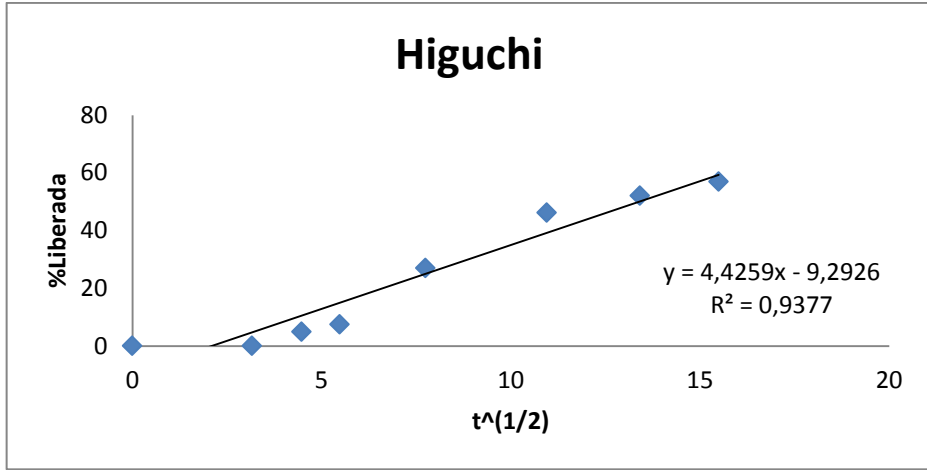
Liberação acumulada (%)			
Teste 1	Teste 2	Teste 3	Média ± DP
3,34	1,53	0,81	2 ± 1
7,38	2,40	1,99	4 ± 3
8,99	3,88	3,30	5 ± 3
10,41	4,91	5,62	7 ± 3
11,69	11,88	15,64	13 ± 2
12,72	13,11	16,91	14 ± 2
15,88	14,69	19,54	17 ± 3
18,11	16,89	21,24	19 ± 2
20,36	19,22	23,40	21 ± 2
22,81	20,92	26,52	23 ± 3

Para o ajuste dos modelos cinéticos, as equações características foram linearizadas. No caso do teste de liberação, os parâmetros do ajuste linear foram obtidos pelas médias das curvas.

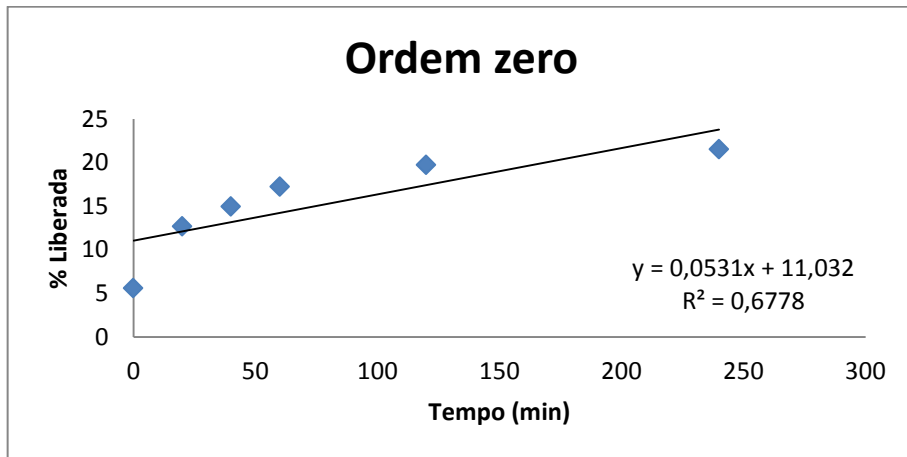
Modelos ajustados para os testes preliminares

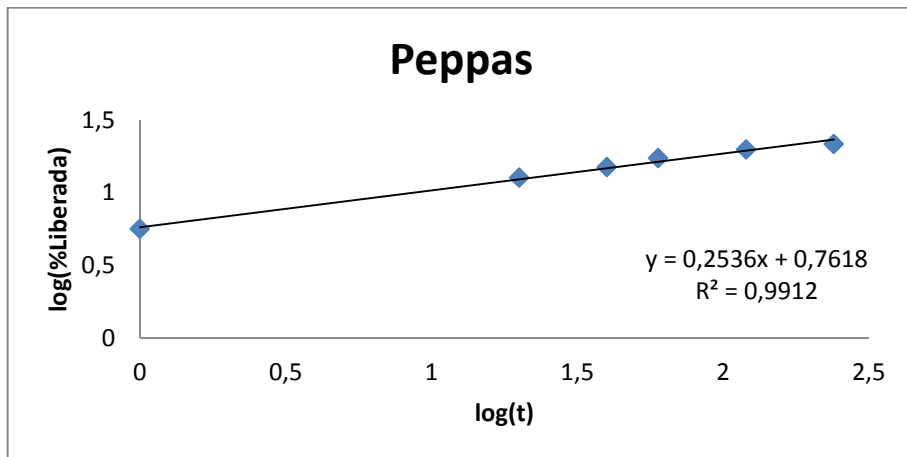
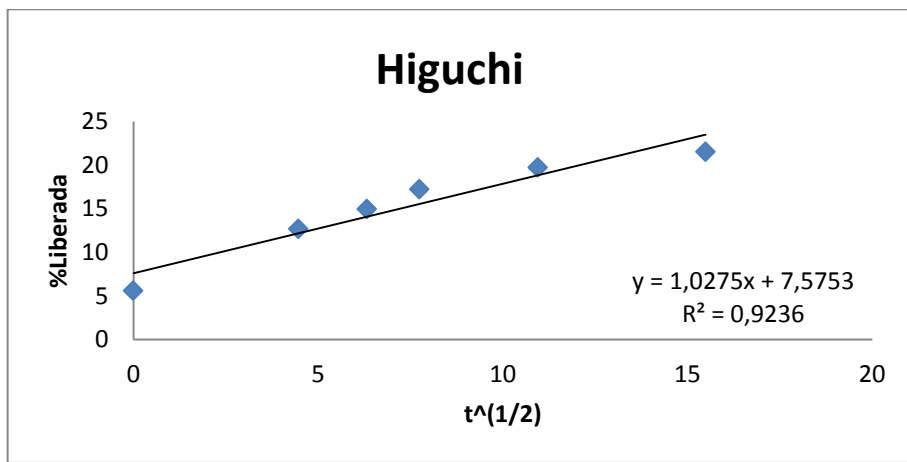
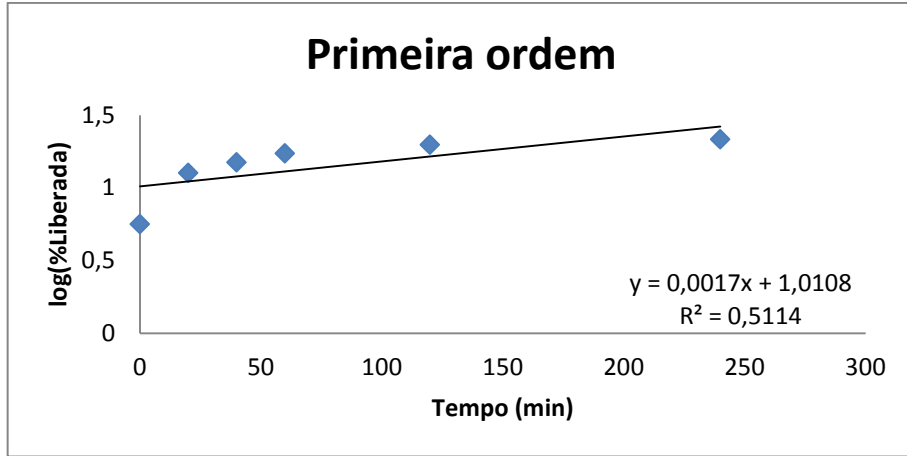
Teste 1:



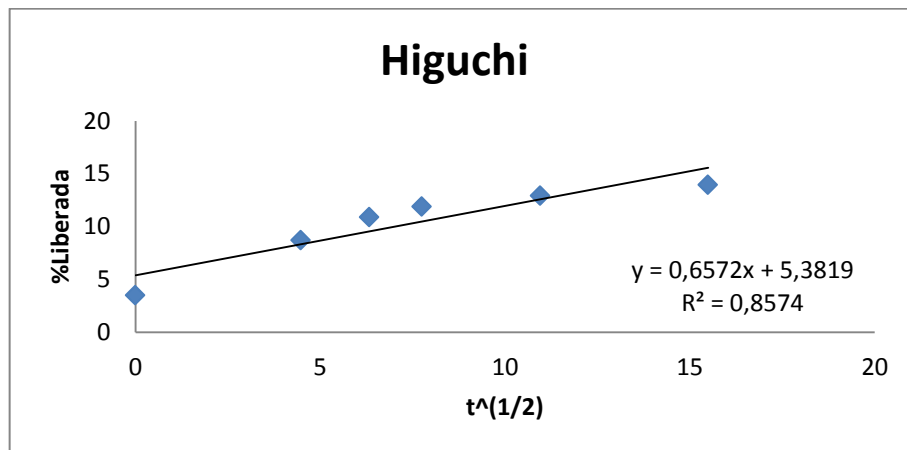
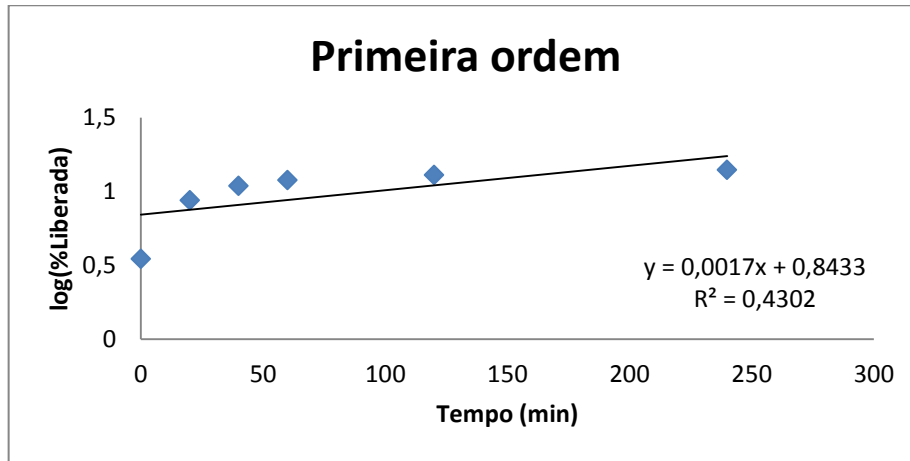
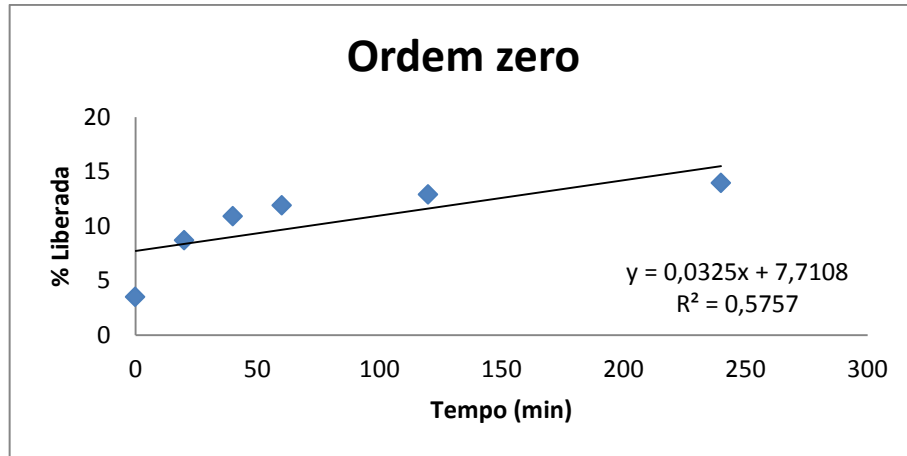


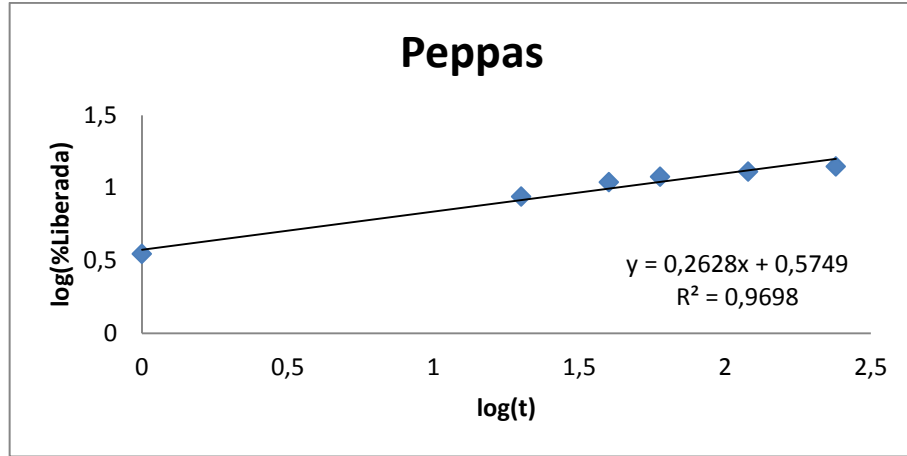
Teste 2:



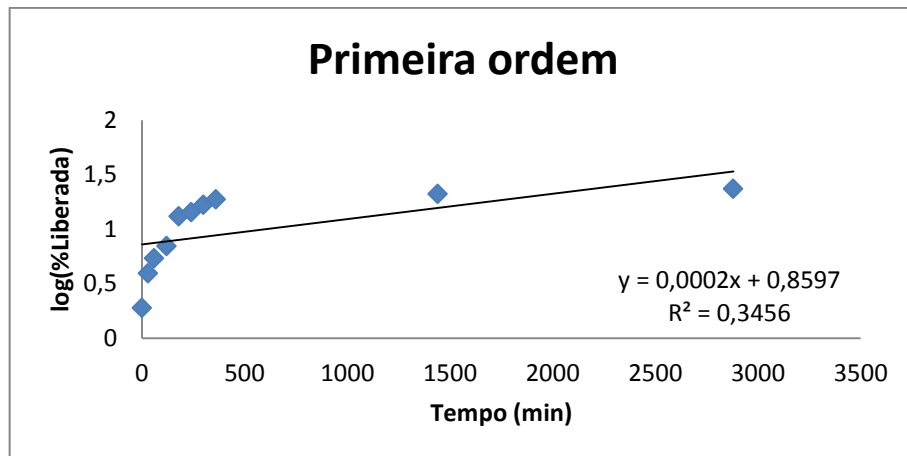
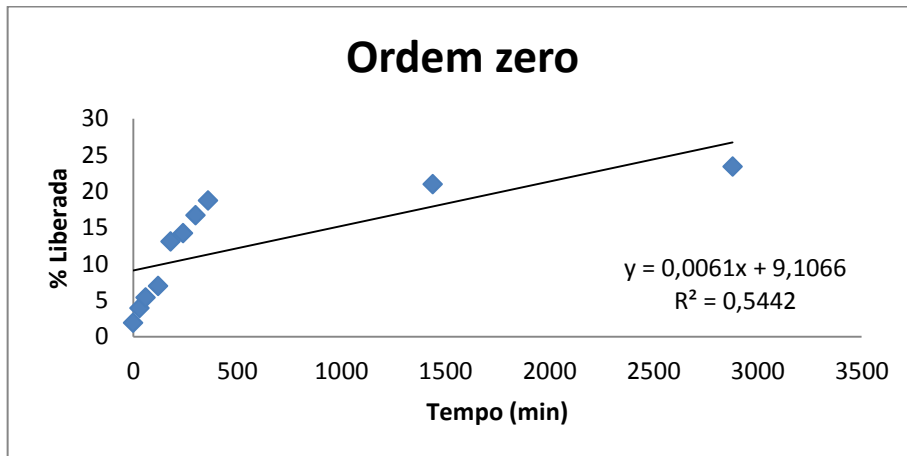


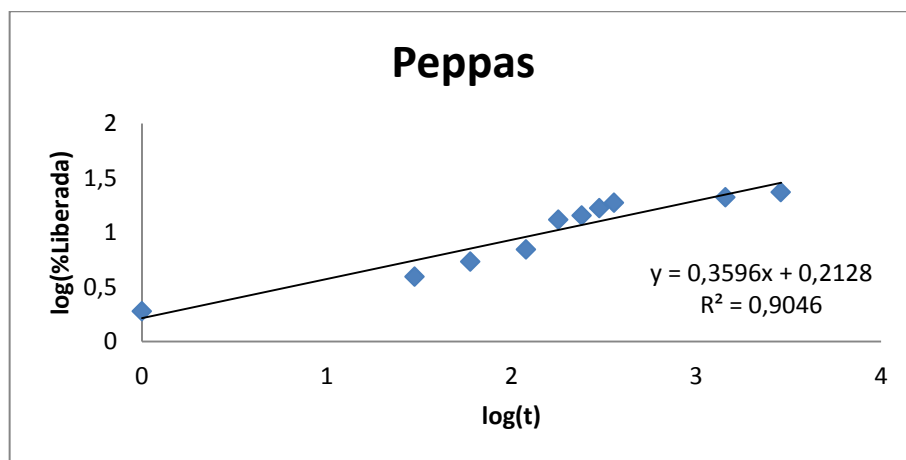
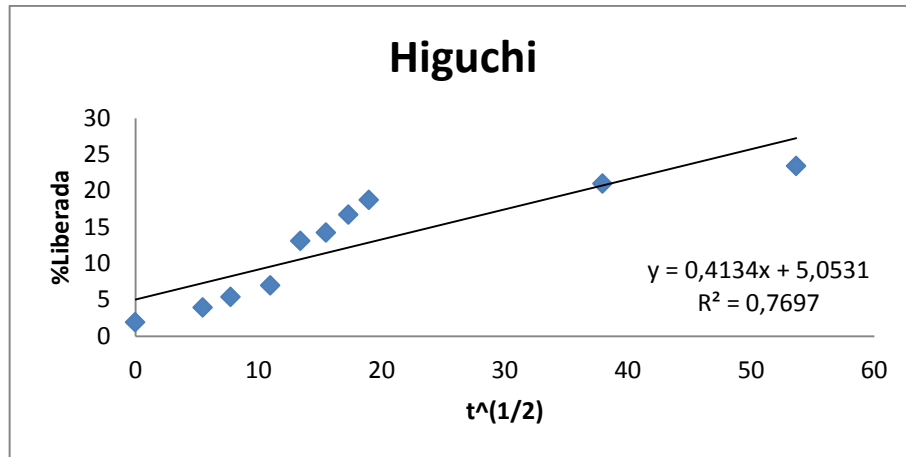
Teste 3:





Modelos ajustados para os testes de liberação





ANEXO C
SANTOS e FIGUEIREDO, 2012 – COBEQ 2012

ESTUDO DA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(ÁCIDO LÁTICO-CO-ÁCIDO GLIGÓLICO): INVESTIGAÇÃO DE VARIÁVEIS UTILIZANDO UM PLANEJAMENTO FATORIAL REDUZIDO

K. C. S. FIGUEIREDO¹, T. M. SANTOS¹

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Engenharia Química
e-mail para contato: katiacsf@ufmg.br

RESUMO – Nanopartículas de poli(ácido lático-co-ácido glicólico), PLGA, têm aplicação na liberação de fármacos pouco solúveis em água, como corticóides, já que são de fácil implantação. Usualmente, estes dispositivos são produzidos por evaporação de solventes utilizando compostos organoclorados, de reconhecida toxicidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar uma técnica alternativa de síntese das nanopartículas de PLGA, na ausência de diclorometano. A solução de PLGA em acetona foi gotejada sobre uma solução de Tween 80 em água/etanol, seguida de agitação em recipiente aberto. Utilizou-se um planejamento fatorial reduzido 2^{4-1} , com réplicas no ponto central. Foram variadas a razão volumétrica água/etanol na solução de Tween 80, de 50 a 80% em volume de etanol, a concentração de Tween 80 nesta solução, de 2 a 6% m/v, a concentração do PLGA em acetona, de 3,75 a 7,50 g/L, e a razão volumétrica entre as fases orgânica (PLGA e acetona), o, e aquosa (água, etanol e Tween 80), a, de 1:4 a 1:2. Um resultado intermediário de tamanho de partícula e potencial zeta foi observado para 80% de etanol em massa, 6% m/v de Tween 80, 7,54 g/L de PLGA e razão o/a de 1:2, em que as partículas apresentaram diâmetro médio de $(302,2 \pm 0,5)$ nm e potencial zeta de (-27 ± 3) mV. A influência e significância das variáveis foram estudadas. Os resultados indicaram que foi possível produzir partículas nanométricas de PLGA sem utilização de solventes organoclorados. Agradecemos o suporte financeiro da Fapemig.

1. INTRODUÇÃO

Algumas regiões do corpo humano, tais como a uvea – conjunto da íris, coróide e corpo ciliar do olho – têm difícil acesso a medicamentos para tratamentos de doenças, como as uveítes. A aplicação desses medicamentos (como corticóides) via sistêmica provoca efeitos colaterais indesejáveis; a aplicação tópica apresenta baixa eficiência de penetração da droga e injeções de medicamento, embora eficientes em alcançar o nível terapêutico necessário, estão associadas a efeitos indesejáveis, como a perfuração do globo ocular, de acordo com o apresentado por Gómez-Gaete *et al.* (2007). Com o objetivo de contornar essas dificuldades, o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de medicamentos através de nanopartículas poliméricas tem se mostrado um campo promissor de estudo. Elas permitiriam, com uma única injeção, que o medicamento fosse mantido no nível terapêutico ótimo por um longo período de tempo. Isso se deve à liberação mais lenta do medicamento, que é controlada pela erosão da camada externa da partícula e pela clivagem das cadeias poliméricas por hidrólise enzimática ou não-enzimática ao longo da matriz, no caso de polímeros como o PLGA (poli(ácido lático-co-ácido glicólico)) e o PLA (poli(ácido lático)), como descrito no trabalho de Yasukawa *et al.* (2004).

Segundo Figueiredo *et al.* (2009), estes polímeros são de grande interesse, uma vez que sua biodegradabilidade torna desnecessárias cirurgias para aplicação, substituição ou remoção de implantes ou partículas que possam ser usados para controle de liberação. As partículas são preparadas dissolvendo o polímero (e a droga, quando utilizada) em um solvente adequado, que são emulsificados em uma fase aquosa. Evapora-se o solvente do polímero e formam-se as partículas, que são lavadas para retirada de resíduos (Kim e Matin (2006)). É prática comum descrita na literatura (Cascone *et al.* (2002); Santander-Ortega *et al.* (2006); Gómez-Gaete *et al.* (2007); Figueiredo *et al.* (2009)) a utilização de solventes organoclorados, particularmente o diclorometano, para a dissolução do polímero durante a preparação das nanopartículas. Estes solventes possuem reconhecida toxicidade, portanto o desenvolvimento de técnicas alternativas que possam substituí-los é de grande interesse prático para a segurança de pesquisadores e futuras aplicações comerciais. Beck *et al.* (2003) apresentaram uma técnica de evaporação de solventes voltada para o estudo da liberação de dexametasona pelo sistema de partículas e sem a utilização de solventes organoclorados. O polímero, poli(ácido

lático) ou PLA, é dissolvido em acetona, juntamente com Span 80 e dexametasona. Essa solução orgânica é derramada lentamente sob agitação magnética em solução de Tween 80 em água. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma técnica modificada de produção de nanopartículas de PLGA para liberação controlada de medicamentos através da evaporação de solventes, mas que não utilize o diclorometano, ou outro solvente organoclorado, e determinar suas condições operacionais ótimas, de modo a obter partículas com o menor diâmetro possível.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Materiais

Poli(ácido lático-co-ácido glicólico), PLGA, com razão L:G 75:25 e massa molar de 66.000 – 107.000 (Aldrich Chemistry), Tween 80 (Sigma-Aldrich), acetona (Synth) e etanol (Synth).

2.2. Síntese de partículas

A síntese das partículas poliméricas foi realizada por meio da técnica denominada evaporação de solventes. Primeiramente, preparou-se uma solução de Tween 80 – o surfactante usado para a emulsificação - em uma mistura água/etanol com diferentes concentrações do surfactante (variando de 2 a 6% m/v) e porcentagem volumétrica de etanol na solução água/etanol (variando de 50 a 80%). Em seguida, foram feitas soluções de PLGA em acetona com concentrações variando de 3,75 g/L a 7,50 g/L. A solução de PLGA em acetona, denominada fase oleosa, foi gotejada lentamente sobre a solução de Tween 80 em água/etanol, denominada fase aquosa, com diferentes razões volumétricas entre as duas fases (que variaram de 1:2 óleo/água até 1:4 o/a), seguida de agitação magnética em recipiente aberto por 5 horas. A montagem utilizada durante o experimento está representada pela Figura 1.

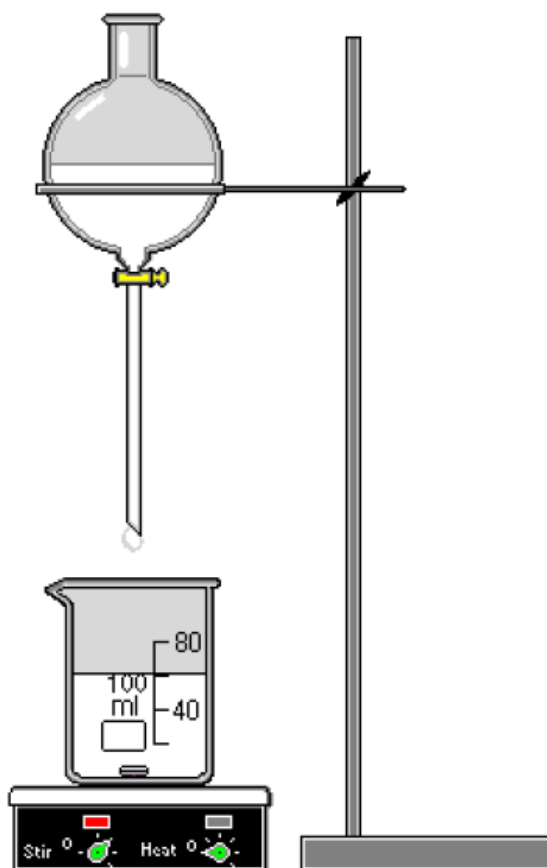


Figura 1 – Montagem utilizada para o gotejamento da solução de PLGA em acetona sobre a solução de Tween 80 em água/etanol.

A mistura resultante foi centrifugada a 3000 rpm por 30 min e lavada com cerca de 20 mL de água destilada. A lavagem das esferas foi realizada três vezes ao todo. O material resultante foi armazenado em 1,0 mL de água destilada até a análise do tamanho e do potencial zeta das partículas. Para esta, foram realizadas diluições de razão 1:3 usando água destilada, seguidas de dispersão por banho de ultrassom. Como não havia dispersão completa, as análises foram efetuadas nas soluções sobrenadantes e em triplicata. Para determinação do tamanho das partículas – cuja operação do equipamento de análise se baseia na intensidade de luz difratada pelas partículas da amostra – estas foram suspensas em 3,0 mL de água destilada. A regressão linear múltipla para as variáveis foi realizada utilizando o software Statistica®.

4. RESULTADOS

4.1. Observações

Imediatamente após o início do gotejamento da solução do polímero sobre a do surfactante, observava-se a turvação da mistura, que adquiria aspecto leitoso diluído, que se mantinha ao longo de toda a agitação. Após a centrifugação, observou-se a formação de um aglomerado polimérico no fundo do tubo da centrífuga. Os testes de medição de tamanho de partículas tiveram que ser realizados no sobrenadante justamente pela formação dessa massa em quase todos os ensaios. O rendimento do processo de formação de nanopartículas foi reduzido principalmente por essa aglomeração, somado à perda de material pelas lavagens.

4.2. Tamanho das partículas

Os testes realizados seguiram um planejamento fatorial reduzido 2⁴-1. Essa escolha foi feita para permitir a análise simultânea das variáveis independentes investigadas sobre as variáveis resposta, de modo a tentar entender o sinergismo entre estas e estabelecer as condições ótimas para a utilização da técnica em estudo. Os diâmetros das partículas medidos para cada um dos testes realizados sobre as diferentes condições experimentais estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados obtidos para o diâmetro das partículas em função das condições operacionais do plano fatorial 24-1 com réplica no ponto central.

Teste	Fração volumétrica de etanol na solução etanol/água	Concentração do surfactante (% m/v)	Concentração do polímero (g/L)	Razão volumétrica das fases óleo/água	Diâmetro das partículas (nm)
1	0,800 ± 0,003	6,01 ± 0,01	7,54 ± 0,02	0,500 ± 0,001	302,2 ± 0,5
2	0,800 ± 0,003	6,01 ± 0,01	3,712 ± 0,008	0,250 ± 0,001	210 ± 8
3	0,800 ± 0,003	2,009 ± 0,005	7,42 ± 0,02	0,250 ± 0,001	202 ± 1
4	0,800 ± 0,003	1,991 ± 0,003	3,852 ± 0,008	0,500 ± 0,001	(36 ± 3) x 10
5	0,500 ± 0,002	6,00 ± 0,01	3,840 ± 0,008	0,250 ± 0,001	(8 ± 1) x 10 ²
6	0,500 ± 0,001	5,98 ± 0,01	7,43 ± 0,02	0,500 ± 0,001	241 ± 4
7	0,500 ± 0,001	1,985 ± 0,003	3,664 ± 0,008	0,500 ± 0,001	528 ± 9
8	0,500 ± 0,002	2,005 ± 0,002	7,74 ± 0,02	0,250 ± 0,001	279 ± 1
9.1	0,650 ± 0,002	4,001 ± 0,006	5,31 ± 0,01	0,375 ± 0,002	342 ± 3
9.2	0,650 ± 0,002	4,002 ± 0,006	5,72 ± 0,01	0,374 ± 0,002	217 ± 1

Dois dos testes (de número 4 e 5) não apresentaram qualidade estatística comparável à dos outros testes e foram responsáveis pelo comprometimento da análise em plano fatorial. Não foi possível estabelecer uma equação de ajuste para o sistema que fosse estatisticamente significativa. Entretanto, a análise qualitativa possibilitou a percepção de relações entre as variáveis em estudo, principalmente pela comparação gráfica. Assim, para maior confiabilidade, os resultados dos testes 4 e 5 não foram utilizados nas análises. Os resultados mostraram que a fração volumétrica de etanol na solução etanol/água teve pouca influência no tamanho das partículas, se comparada às demais variáveis experimentais. Desconsiderando a fração volumétrica de etanol na solução etanol/água, construíram-se gráficos do tamanho das partículas em função de pares das variáveis restantes, como apresentado nas Figuras 2, 3 e 4. Pela análise das dispersões, foi possível perceber as relações de proporcionalidade entre as variáveis independentes e o diâmetro das partículas. A concentração do surfactante, Tween 80, apresentou efeito negativo no tamanho das partículas: maiores concentrações de surfactante implicaram em diâmetros menores. Isso provavelmente ocorreu devido à redução da tensão interfacial entre as fases óleo/água com o aumento da concentração de Tween 80, que estabilizou a emulsão formada, permitindo a formação de gotículas menores da fase orgânica (acetona + PLGA) dispersas na fase aquosa. As moléculas anfífilas

do surfactante impediram a coalescência da fase orgânica, justamente por sua atuação nas interfaces do sistema.

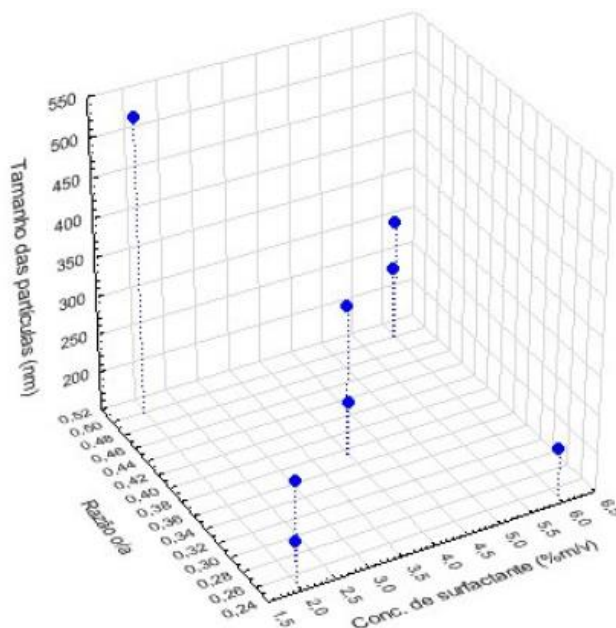


Figura 2 – Gráfico de diâmetro das partículas em função da concentração de Tween 80 (surfactante) e da razão entre as fases óleo/água.

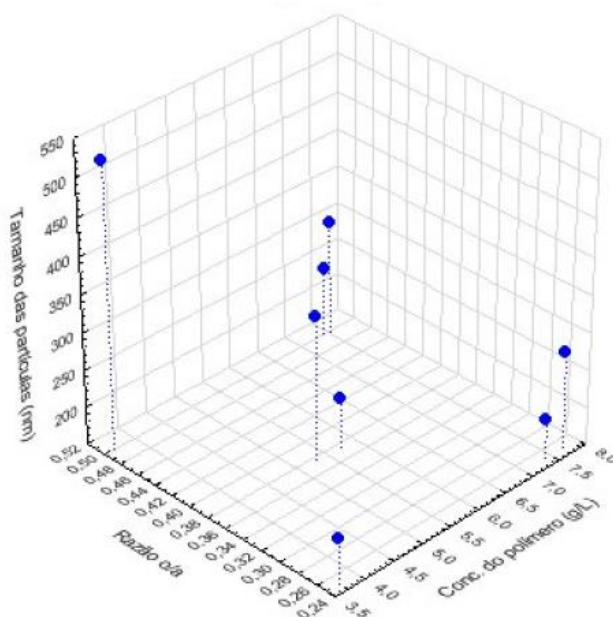


Figura 3 – Gráfico de diâmetro das partículas em função da razão entre as fases óleo/água e da concentração do PLGA (polímero).

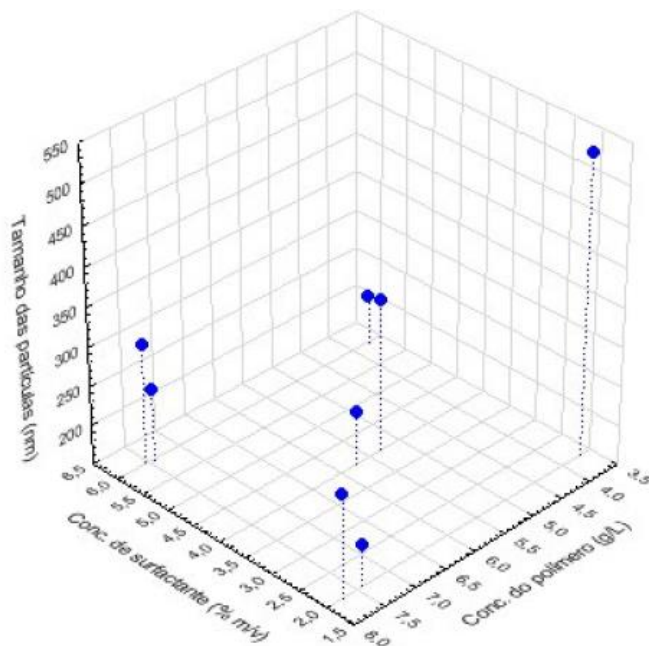


Figura 4 – Gráfico de diâmetro das partículas em função da concentração de Tween 80 (surfactante) e da concentração do PLGA (polímero).

A concentração do polímero apresentou o mesmo efeito: partículas de soluções com concentrações maiores de PLGA apresentaram menor diâmetro. Uma possível explicação para o fato é o aumento da concentração do polímero ter aumentado o número de cargas negativas na superfície das partículas devido à presença de grupos carboxila, aumentando a repulsão entre elas, dificultando sua aglomeração. Esse efeito será discutido mais profundamente na seção 4.3. Já a razão volumétrica entre as fases oleosa/aquosa mostrou uma relação de proporcionalidade positiva sobre o diâmetro das partículas: maiores razões implicaram em tamanhos de partículas maiores. Em outras palavras, o aumento da fração orgânica na mistura implicou em uma maior concentração de gotículas orgânicas no seio aquoso. Este resultado pode ser explicado da seguinte forma: o aumento da quantidade de fase oleosa aumentou a probabilidade de choques entre as gotículas, provocando a coalescência das mesmas. Beck *et al.* (2003) reportaram partículas de PLA com diâmetro de 230 e 285 nm, utilizando, além do Tween 80, o Span 80 para a emulsificação. Feczko *et al.* (2011), utilizando a técnica de dupla emulsão/evaporação de solventes com diclorometano e sonicação, reportaram valores entre 140,3 e 1320,5 nm – média de 278,6 nm, desvio padrão de 221 nm. Os valores obtidos neste estudo se enquadraram na faixa encontrada na literatura, com a vantagem de utilizar uma técnica mais simples – menos reagentes e equipamentos

– e sem a adição de solventes organoclorados. O teste 3 apresentou o menor tamanho de partículas dentre todos. Como esperado, a concentração de PLGA é comparativamente alta, assim como a razão o/a é baixa. Entretanto, a concentração de Tween 80 era menor que a esperada.

4.3. Potencial Zeta

O potencial zeta das partículas medido para cada um dos experimentos executados está apresentado na Tabela 2. Todos os potenciais medidos apresentaram-se com valor negativo, o que era esperado, uma vez que a estrutura do PLGA é composta por grupos eletronegativos, tais como grupos carbonila. Análise estatística semelhante à realizada para o diâmetro de partículas mostrou que apenas a concentração do polímero apresentava influência estatisticamente relevante sobre o potencial zeta da mistura. Observou-se que o aumento da concentração de PLGA acarretou a diminuição do valor (ou o aumento em módulo) do potencial zeta. Isso pode ser explicado pela já citada presença de grupos eletronegativos na estrutura do polímero, e conseqüentemente da partícula, que levaram ao aumento da repulsão entre as partículas, aumentando o valor do potencial zeta, em módulo. Outra observação importante é o fato de os menores valores absolutos encontrados para o potencial zeta corresponderem aos resultados com maiores diâmetros de partícula (testes 4 e 5). Como indicado pelo valor absoluto reduzido do potencial destes testes, a emulsão formada apresentava menor estabilidade, tendendo à coalescência – devido à menor repulsão entre as partículas.

Tabela 2 – Resultados obtidos para o potencial zeta das partículas em função das condições operacionais do plano fatorial 2^{4-1} com réplica no ponto central.

Teste	Fração volumétrica de etanol na solução etanol/água	Concentração do surfactante (% m/v)	Concentração do polímero (g/L)	Razão volumétrica das fases óleo/água	Potencial Zeta (mV)
1	0,800 ± 0,003	6,01 ± 0,01	7,54 ± 0,02	0,500 ± 0,001	-27 ± 3
2	0,800 ± 0,003	6,01 ± 0,01	3,712 ± 0,008	0,250 ± 0,001	-15 ± 2
3	0,800 ± 0,003	2,009 ± 0,005	7,42 ± 0,02	0,250 ± 0,001	-22,0 ± 0,5
4	0,800 ± 0,003	1,991 ± 0,003	3,852 ± 0,008	0,500 ± 0,001	-9 ± 1
5	0,500 ± 0,002	6,00 ± 0,01	3,840 ± 0,008	0,250 ± 0,001	-6,7 ± 0,4
6	0,500 ± 0,001	5,98 ± 0,01	7,43 ± 0,02	0,500 ± 0,001	-25 ± 2
7	0,500 ± 0,001	1,985 ± 0,003	3,664 ± 0,008	0,500 ± 0,001	-25 ± 2
8	0,500 ± 0,002	2,005 ± 0,002	7,74 ± 0,02	0,250 ± 0,001	-43 ± 2
9.1	0,650 ± 0,002	4,001 ± 0,006	5,31 ± 0,01	0,375 ± 0,002	-30 ± 1
9.2	0,650 ± 0,002	4,002 ± 0,006	5,72 ± 0,01	0,374 ± 0,002	-27 ± 2

5. CONCLUSÕES

Os resultados mostraram a viabilidade da técnica em estudo, que permitiu a produção de partículas nanométricas de PLGA para todas as condições estudadas e sem a utilização de solventes organoclorados. As condições ótimas estabelecidas permitem a aplicação futura da técnica para o estudo e composição de sistemas de liberação controlada de medicamentos, como a dexametasona, com tamanho e estabilidade das partículas condizentes com a aplicação desejada. O baixo rendimento da produção, entretanto, exige estudos posteriores para aumento da eficiência da técnica, tal que se possa garantir um melhor aproveitamento do polímero utilizado.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fapemig o apoio financeiro dado para o desenvolvimento desta pesquisa e ao auxílio da pesquisadora Roberta Vianna e da Profa. Rosana Zacarias Domingues, do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG, nos ensaios de determinação do tamanho das partículas e do potencial zeta das amostras. Thiago M. Santos agradece a Dra. Kátia Figueiredo por todo o apoio oferecido ao longo do projeto de iniciação científica.

7. REFERÊNCIAS

BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; FREDDO, R. J.; MICHALOWSKI, C. B.; BARCELLOS, I.; FUNCK, J. A. B. Nanoparticles Containing Dexamethasone: Physicochemical Properties and Anti-Inflammatory Activity. *Acta Farm. Bonaerense*. v. 22 (1), p. 11-15, 2003.

CASCONE, M. G.; ZHU, Z.; BORSELLI, F.; LAZZERI, L. Poly(vinyl alcohol) hydrogels as hydrophilic matrices for the release of lipophilic drugs loaded in PLGA nanoparticles. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, v. 13, p. 29-32, 2002.

FECZKÓ, T.; TÓTH, J.; DÓSA, G.; GYENIS, J. Influence of process conditions on the mean size of PLGA nanoparticles. *Chem. Eng. Process.*, v. 50, p. 846-853, 2011.

FIGUEIREDO, K. C. S.; BORGES, C. P.; ALVES, T. L. M. Efeito das condições operacionais de síntese na morfologia de nanopartículas de poli(ácido láctico). *Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros*. Foz do Iguaçu, v. 1, p. 137-146, 2009.

GÓMEZ-GAETE, C.; TSAPIS, N.; BESNARD, M.; BOCHOT, A.; FATTAL, E. Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, v. 331, p. 153-159, 2007.

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

SANTANDER-ORTEGA, M. J.; JÓDAR-REYES, A. B.; CSABA, N.; BASTOSGONZÁLEZ, D.; ORTEGA-VINUESA, J. L. Colloidal stability of Pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: A variety of stabilization mechanisms. *J. Colloid Interface Sci.*, v. 302, p. 522-529, 2006.

YASUKAWA, T.; OGURA, Y.; TABATA, Y.; KIMURA, H.; WIEDEMANN, P.; HONDA, Y. Drug delivery systems for vitreoretinal diseases. *Prog. Retin. Eye. Res.*, v. 23, p. 253-281, 2004.