

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

**CARACTERIZAÇÃO DE SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS ESTUDADAS COMO CARREADORES DE FÁRMACOS
ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE ESPALHAMENTO DE LUZ E DE RAIOS-X A
BAIXO ÂNGULO**

GRAZIELA MEZZALIRA

Porto Alegre, 2005.

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

**CARACTERIZAÇÃO DE SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS ESTUDADAS COMO CARREADORES DE FÁRMACOS
ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE ESPALHAMENTO DE LUZ E DE RAIOS-X A
BAIXO ÂNGULO**

Dissertação apresentada por **Graziela
Mezzalira** para obtenção de Grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof^a Dr^a Adriana Raffin Pohlmann
Co-orientador: Prof^a Dr^a Nádyá Pesce da Silveira

Porto Alegre, 2005.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 16 de março de 2005, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Clara Ismênia Bicca
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. George Gonzáles Ortega
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Teresa Cristina Tavares Dalla Costa
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

M617c	<p>Mezzalira, Graziela</p> <p>Caracterização de suspensões de nanopartículas poliméricas estudadas como carreadores de fármacos através das técnicas de espalhamento de luz e de raios-X a baixo ângulo / Graziela Mezzalira – Porto Alegre: UFRGS, 2005 – xiv, 124p.: il., gráf., tab.</p> <p>Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.</p> <p>1. Nanopartículas. 2. Indometacina. 3. Espalhamento de luz. 4. Espalhamento de raios-X. I. Pohlmann, Adriana Raffin. II. Silveira, Nádyá Pesce da. III. Título.</p>
-------	---

Bibliotecária Responsável:
Margarida Maria C. F. Ferreira – CRB10/480

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof^a Dr^a Adriana R. Pohlmann e Prof^a Dr^a Nádyá P. da Silveira pela orientação dedicada e sempre presente, não só no desenvolvimento deste trabalho, mas durante todos anos de convivência.

Aos colegas do laboratório 405 (Faculdade de Farmácia) e LINDIM (Instituto de Química) pelo apoio nos trabalhos do dia a dia, pelo empréstimo de materiais, pelo conhecimento compartilhado e pelos momentos de descontração.

Ao Alexandre A. Tavares pela compreensão e apoio especialmente durante a fase final do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron pela possibilidade de realização dos estudos de SAXS.

Ao apoio financeiro da CAPES, FAPERGS e Rede de Nanobiotecnologia – CNPq/Brasília.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi caracterizar suspensões de nanopartículas (NP) de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) contendo indometacina. Nanocápsulas com fármaco (NC¹) foram submetidas a tratamento térmico para verificar se uma relaxação das cadeias poliméricas que recobrem o núcleo pudesse ocorrer. Resultados similares de grau de despolarização da luz espalhada ($\rho_{c \rightarrow 0}$), determinado por Espalhamento de luz estático, e pH, para as NC que passaram ou não por tratamento térmico, sugeriram que essa relaxação não ocorreu. NC, nanoemulsão (NE) e nanoesfera (NS) apresentaram $\rho_{c \rightarrow 0}$ que caracterizam espécies esféricas. No entanto, a suspensão NC³ (com fármaco em excesso) apresentou valores de $\rho_{c \rightarrow 0}$ que sugeriram a presença de nanocristais de fármaco em suspensão. A partir disto, analisou-se a intensidade de luz espalhada por NC⁰ (NC sem fármaco), NC¹, NC³ e nanodispersões com e sem fármaco (ND¹ e ND⁰, respectivamente). Houve uma queda brusca nas intensidades médias de luz espalhada pela NC³ e ND¹ após armazenagem, evidenciada também através da normalização das intensidades pela Razão de Rayleigh. Estes dados, associados à redução do teor de fármaco após armazenagem, apenas para NC³ e ND¹, levaram à conclusão de que são formados nanocristais de fármaco durante o preparo destas NP e que estes se depositam ao longo do tempo, reduzindo a intensidade de luz espalhada pelas amostras. Por outro lado, a NC¹, quando formulada, não apresentou nanocristais nem houve formação desses após armazenagem. Houve grande semelhança entre os espectros de Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) de NS e ND, atribuída à presença do tensoativo monostearato de sorbitano disperso nestas NP. Este tensoativo não foi identificado em espectros de SAXS de NC e NE. O mesmo perfil de espectro foi obtido para NC contendo diferentes concentrações de PCL, levando à conclusão de que as NC devem manter sua organização em nível molecular independente da concentração de PCL utilizada.

Palavras-chave: nanopartículas, nanocristais, modelos de estrutura, espalhamento de luz, espalhamento de raios-X a baixo ângulo.

ABSTRACT

The aim of the present work was to characterize indomethacin-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanoparticle suspensions. Nanocapsules with drug (NC¹) were submitted to a thermic treatment with the aim to verify the possible relaxation of polymeric chains that coat the NC core. After the determination of depolarization degree of light scattered ($\rho_{c \rightarrow 0}$), by Static light scattering, and pH for the treated and not treated samples it was suggested that the relaxation did not occur. The $\rho_{c \rightarrow 0}$ values for NC, nanoemulsion (NE) and nanospheres (NS) showed very low anisotropy, suggesting a spherical shape for these NP. A NC prepared with excess of drug (NC³) presented $\rho_{c \rightarrow 0}$ values which suggested the presence of drug nanocrystals in suspension stabilized by surfactants. So, the intensity of light scattered was analyzed for NC⁰ (NC without drug), NC¹, NC³ and nanodispersion with and without drug (ND¹ and ND⁰, respectively). The average intensities of light scattered for the NC³ and ND¹ after storage decreased, this was also observed after normalization of intensities by Reason of Rayleigh. These data are correlated with the decrease of drug concentration after storage leading to the conclusion that drug nanocrystals are formed in the preparation of these NC³ and ND¹. The nanocrystals agglomerate during storage precipitate, decreasing the intensity of light scattered. On the other hand, the NC¹ neither presented nanocrystals after preparation nor they were formed after storage. The spectra obtained by Small angle X-ray scattering (SAXS) for NS and ND were similar, to the presence of the sorbitan monostearate (SM) dispersed in these nanoparticles. The SM was not identified in NC and NE SAXS spectra. Similar profiles spectra were obtained for NC prepared with different PCL concentrations, allowing the conclusion that the organization in a molecular level for NC is independent of PCL concentration.

Keywords: nanoparticles, nanocrystals, structure models, light scattering, small angle X-ray scattering.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Apresentação.....	3
1.2 Hipóteses de trabalho.....	5
2. OBJETIVOS.....	7
2.1 Objetivos específicos.....	10
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1 Estabilidade físico-química de suspensões de nanopartículas poliméricas.....	13
3.1.2 Influência das matérias-primas na estabilidade dos nanocarreadores.....	13
3.1.2.1 Polímeros.....	13
3.1.2.2 Núcleo oleoso.....	15
3.1.2.3 Tensoativos.....	17
3.1.2.4 Fármacos.....	18
3.1.3 Nanocarreadores de fármaco.....	19
3.1.3.1 Diâmetro médio de partículas.....	20
3.1.3.2 Medidas de pH.....	23
3.1.3.3 Encapsulação de Fármacos.....	25
3.2 Modelos de estrutura para nanopartículas.....	27
4. CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS.....	33
4.1 Espalhamento de luz.....	35
4.1.1 Espalhamento de luz estático com luz polarizada.....	36
4.1.2 Razão de Rayleigh (R) para a intensidade média de luz espalhada no SLS.....	36
4.1.3 Obtenção do raio de giro (R_g) das partículas por SLS.....	37
4.1.3.1 Dissimetria da intensidade de luz no SLS.....	37
4.1.3.2 Gráfico de Guinier.....	38
4.1.4 Obtenção do raio hidrodinâmico (R_h) das partículas por PCS.....	39
4.1.5 Determinação da polidispersão das partículas.....	41
4.2 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).....	41
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
5.1 Matérias-primas e solventes.....	47
5.2 Equipamentos.....	47

5.3 Obtenção das suspensões de nanopartículas.....	49
5.4 Tratamento térmico aplicado às nanopartículas.....	52
5.5 Parâmetros das medidas de espalhamento de luz.....	53
5.6 Parâmetros das medidas de SAXS.....	55
5.7 Parâmetros das medidas de CLAE.....	55
5.8 Preparo das amostras para microscopia ótica.....	56
5.9 Determinação do ponto de fusão.....	56
5.10 Análise estatística.....	56
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
6.1 Caracterização e avaliação da estabilidade fisico-química das suspensões de nanopartículas.....	59
6.1.1 Verificação da hipótese de relaxação das cadeias poliméricas.....	59
6.1.2 Determinação do grau de despolarização da luz espalhada (ρ) para NC com excesso de fármaco.....	63
6.1.3 Determinação do grau de despolarização da luz espalhada (ρ) para NS ⁰ e NE ⁰	65
6.1.4 Determinação da razão R_g/R_h	66
6.1.5 Determinação do diâmetro médio e polidispersão das partículas.....	68
6.2. Investigação da presença de cristais de fármaco em suspensão.....	74
6.2.1 Flutuação da intensidade de luz espalhada.....	74
6.2.2 Intensidade média de luz espalhada.....	85
6.2.3 Razão de Rayleigh para a intensidade média de luz espalhada.....	88
6.2.4 Quantificação do fármaco.....	91
6.3 Análises de espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS).....	92
6.3.1 Influência do tipo de estrutura: NC, NS, NE e ND.....	93
6.3.1.1 Determinação das dimensões das regiões identificadas nos espectros de SAXS.....	100
6.3.2 Influência da concentração de polímero em formulações de NC.....	102
7. CONCLUSÕES.....	105
8. REFERÊNCIAS	109
9. ANEXOS.....	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Comportamento de uma esfera e de um bastão em suspensão.....	9
Figura 3.1: Modelo de estrutura para NS de PCL contendo indometacina baseado no estudo de CALVO e colaboradores (2003).....	28
Figura 3.2: Modelo de estrutura para NC de PCL contendo Miglyol® 810 como núcleo oleoso baseado no estudo de MULLER e colaboradores (2001).....	29
Figura 3.3: Modelos de estruturas para NS baseados no estudo de POHLMANN e colaboradores (2002).....	30
Figura 3.4: Hipótese de modelo de estrutura de NS refutado por SOARES (2003).....	31
Figura 4.1: Geometria do experimento no equipamento de espalhamento de luz.....	35
Figura 5.1: Espectrômetro de correlação de fótons.....	48
Figura 5.2: Metodologia de preparo das nanopartículas.....	50
Figura 5.3: Tratamento térmico aplicado às nanopartículas.....	53
Figura 6.1: Gráfico de pH em função do tempo de armazenagem.....	59
Figura 6.2: Gráficos do grau de despolarização da luz espalhada (ρ), em função da concentração da concentração de polissorbato 80 para NC ¹	60
Figura 6.3: Gráficos do grau de despolarização da luz espalhada (ρ), em função da concentração da concentração de polissorbato 80 para NC ^{1a}	61
Figura 6.4: Gráficos do grau de despolarização da luz espalhada (ρ) em função da concentração de polissorbato 80 para NC ³	63
Figura 6.5: Gráficos do grau de despolarização da luz espalhada (ρ), em função da concentração da concentração de polissorbato 80 para NC ⁰	64
Figura 6.6: Gráficos do grau de despolarização da luz espalhada (ρ) em função da concentração de polissorbato 80 para NS ⁰ e NE ⁰	65
Figura 6.7: Gráfico da dissimetria versus co-seno do ângulo para NC ⁰	67

Figura 6.8: Gráficos de diâmetro médio e de polidispersão em função do tempo de armazenagem para NC ¹	69
Figura 6.9: Gráficos de diâmetro médio e de polidispersão em função do tempo de armazenagem para NC ^{1a}	70
Figura 6.10: Gráficos de diâmetro médio e de polidispersão para NC ³ em função do tempo de armazenagem.....	71
Figura 6.11: Gráficos de diâmetro médio e de polidispersão em função do tempo de armazenagem para NC ⁰	72
Figura 6.12: Gráficos de diâmetro médio e de polidispersão em função do tempo de armazenagem para NS ⁰ e NE ⁰	73
Figura 6.13: Gráficos da flutuação da intensidade de luz espalhada em função do tempo de armazenagem para NC ¹	75
Figura 6.14: Gráficos da flutuação da intensidade de luz espalhada em função do tempo de armazenagem para NC ⁰	76
Figura 6.15: Gráficos da flutuação da intensidade de luz espalhada em função do tempo de armazenagem para NC ³	77
Figura 6.16: Fotos de microscopia ótica para NC ³	78
Figura 6.17: Fotos de microscopia ótica para NC ¹	78
Figura 6.18: Fotos de microscopia ótica para NC ⁰	70
Figura 6.19: Gráficos da flutuação da intensidade de luz espalhada em função do tempo de armazenagem para ND ¹ e ND ⁰	80
Figura 6.20: Gráficos de diâmetro médio e de polidispersão para ND ¹ e ND ⁰ em função do tempo de armazenagem.....	81
Figura 6.21: Fotos de microscopia ótica para ND ¹	84
Figura 6.22: Fotos de microscopia ótica para ND ⁰	84
Figura 6.23: Gráficos da intensidade média de luz espalhada em função do tempo de armazenagem para NC ¹ e NC ⁰	85
Figura 6.24: Gráficos da intensidade média de luz espalhada em função do tempo de armazenagem para NC ³	86
Figura 6.25: Gráficos da intensidade média de luz espalhada em função do tempo de armazenagem para ND ¹ e ND ⁰	87
Figura 6.26: Gráfico de Razão de Rayleigh em função do tempo de armazenagem para NC ⁰ , NC ¹ e NC ³	89

Figura 6.27: Gráfico de Razão de Rayleigh em função do tempo de armazenagem para ND ⁰ e ND ¹	90
Figura 6.28: Gráfico da concentração de indometacina em suspensão em função do tempo de armazenagem.....	91
Figura 6.29: Espectros de SAXS para NC logo após NPPT e após 20 dias de armazenagem.....	93
Figura 6.30: Espectros de SAXS para NS logo após NPPT e após 20 dias de armazenagem.....	94
Figura 6.31: Espectros de SAXS para ND logo após NPPT.....	94
Figura 6.32: Espectros de SAXS para NS e ND logo após NPPT.....	96
Figura 6.33: Hipótese de modelo de estrutura para NS.....	97
Figura 6.34: Espectros de SAXS para NS ⁰ e NS ^{0b}	98
Figura 6.35: Espectros de SAXS para NC ⁰ e NE ⁰ logo após NPPT.....	99
Figura 6.36: Hipótese de modelo de estrutura de NE.....	99
Figura 6.37: Hipótese de modelo de associação da indometacina a NS e ND.....	100
Figura 6.38: Espectros de SAXS para NC ⁰ contendo diferentes concentrações de polímero.....	102
Figura 6.39: Espectros de SAXS para NC ¹ contendo diferentes concentrações de polímero.....	103
Figura 6.40: Modelo de associação da indometacina a NC de PCL contendo Miglyol [®] 810 proposto por POHLMANN e colaboradores (2004).....	104

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1: Valores de diâmetros médios de partículas para diferentes formulações de nanocápsulas.....	22
Tabela 5.1: Composição das formulações utilizadas no estudo de estabilidade e caracterização físico-química de suspensões de nanopartículas.....	51
Tabela 5.2: Composição das formulações utilizadas para a investigação da presença de cristais de fármaco em suspensão.....	51
Tabela 5.3: Formulações utilizadas para as análises de SAXS.....	52
Tabela 6.1: Valores de $\rho_{c \rightarrow 0}$ para NC ¹ e NC ^{1a} em diferentes tempos de armazenagem.....	61
Tabela 6.2: Valores de $\rho_{c \rightarrow 0}$ para NC ⁰ em diferentes tempos de armazenagem.....	64
Tabela 6.3: Valores de $\rho_{c \rightarrow 0}$ para NS ⁰ e NE ⁰ em diferentes tempos de armazenagem.....	66
Tabela 6.4: Valores de diâmetro médio, obtidos através do <i>software</i> CONTIN, para a formulação ND ¹ , em diferentes diluições e após diferentes tempos de armazenagem.....	82
Tabela 6.5: Valores de diâmetro médio, obtidos através do <i>software</i> CONTIN, para a formulação ND ⁰ , em diferentes diluições e após diferentes tempos de armazenagem.....	83
Tabela 6.6: Valores de q (Å ⁻¹) máximo para as bandas encontradas nos espectros de NC, NS e ND.....	95
Tabela 6.7: Valores de “ d ” obtidos para as formulações de NC, NS e ND.....	101
Tabela 6.8: Valores de “ q ” e “ d ” obtidos para as formulações de NC contendo diferentes concentrações de polímero.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

NP: nanopartícula.

NC: nanocápsula.

NS: nanoesfera.

NE: nanoemulsão.

ND: nanodispersão.

NC⁰: suspensão de nanocápsulas preparada na ausência de indometacina.

NC¹: suspensão de nanocápsulas contendo indometacina na concentração de 1 mg/mL.

NC^{1a}: suspensão de nanocápsulas contendo indometacina na concentração de 1 mg/mL, tratada termicamente.

NC³: suspensão de nanocápsulas contendo indometacina na concentração de 3 mg/mL.

NC⁰80: suspensão de nanocápsula preparada na ausência de indometacina e com polímero em concentração reduzida (8 mg/mL).

NC⁰60: suspensão de nanocápsula preparada na ausência de indometacina e com polímero em concentração reduzida (6 mg/mL).

NC⁰40: suspensão de nanocápsula preparada na ausência de indometacina e com polímero em concentração reduzida (4 mg/mL).

NC⁰20: suspensão de nanocápsula preparada na ausência de indometacina e com polímero em concentração reduzida (2 mg/mL).

NC¹80: suspensão de nanocápsulas contendo indometacina na concentração de 1 mg/mL e com polímero em concentração reduzida (8 mg/mL).

NC¹60: suspensão de nanocápsulas contendo indometacina na concentração de 1 mg/mL e com polímero em concentração reduzida (6 mg/mL).

NC¹40: suspensão de nanocápsulas contendo indometacina na concentração de 1 mg/mL e com polímero em concentração reduzida (4 mg/mL).

NC¹20: suspensão de nanocápsulas contendo indometacina na concentração de 1 mg/mL e com polímero em concentração reduzida (2 mg/mL).

NS⁰: suspensão de nanoesferas preparada na ausência de indometacina.

NS^{0b}: suspensão de nanoesferas preparada na ausência de indometacina e de monoestearato de sorbitano.

NE⁰: suspensão de nanoemulsão preparada na ausência de indometacina.

ND⁰: suspensão de nanodispersão preparada na ausência de indometacina.

ND¹: suspensão de nanodispersão contendo indometacina na concentração de 1 mg/mL.

ND³: suspensão de nanodispersão contendo indometacina na concentração de 3 mg/mL.

NPPT: nanoprecipitação.

EHL: equilíbrio hidrófilo-lipofílico.

PCL: poli(ϵ -caprolactona).

PLA: poli(ácido lático)

PLAGA: poli(ácido lático-co-ácido glicólico).

MEV: microscopia eletrônica de varredura.

MET: microscopia eletrônica de transmissão.

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência.

PCS: espalhamento de luz dinâmico.

SLS: espalhamento de luz estático.

SAXS: espalhamento de raios-X a baixo ângulo.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação

A resposta farmacológica de fármacos está diretamente relacionada com sua concentração no sítio de ação requerido. No entanto, a distribuição das moléculas ativas no organismo é essencialmente determinada pelas propriedades físico-químicas dessas substâncias e, muitas vezes, isso ocasiona uma grande concentração de fármaco em órgãos, tecidos ou células saudáveis o que contribui para o aparecimento ou agravamento de efeitos adversos causados pelas substâncias ativas (COUVREUR *et al.*, 2002).

Uma alternativa para direcionar o fármaco ao seu sítio de ação é sua associação com sistemas carreadores de fármacos. Sistemas carreadores de fármacos podem ser classificados em micro e nanoparticulados. Os primeiros podem apresentar diâmetro superior a 1 μm , enquanto que os segundos possuem diâmetro na ordem de nanômetros (COUVREUR *et al.*, 2002; PANYAM e LABHASETWAR, 2003).

As formulações de nanopartículas podem ser preparadas pelos métodos de polimerização *in situ* como polimerização em emulsão (COUVREUR *et al.*, 1982) e polimerização interfacial (AL KHOURI *et al.*, 1986), ou por métodos que utilizam polímeros pré-formados como emulsão-difusão (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1996; LEROUX *et al.* 1995) e nanoprecipitação (FESSI *et al.*, 1988). As formulações do presente estudo serão preparadas pelo método de nanoprecipitação.

A nanoprecipitação é um método simples de preparação de nanopartículas que consiste na deposição interfacial de polímeros pré-formados, onde se dissolvem um polímero biodegradável, um óleo (para a composição do núcleo das nanocápsulas) e um tensoativo de baixo EHL num solvente adequado (acetona). Esta mistura é então vertida sobre uma fase aquosa, que consiste de um tensoativo de elevado EHL dissolvido em água. A fase aquosa, imediatamente, torna-se leitosa com elevada opalescência, resultado da formação das nanopartículas. Após, o solvente (acetona) é removido por evaporação à pressão reduzida e a suspensão é concentrada

pela evaporação da água sob as mesmas condições. A principal vantagem deste método de preparação é a formação imediata e reprodutível de nanopartículas apresentando estreita distribuição de tamanho (FESSI *et al.*, 1989).

Dependendo dos componentes utilizados no preparo das nanopartículas, pode-se obter nanocápsulas (NC) ou nanoesferas (NS), as quais diferem entre si quanto à organização em nível molecular do polímero. As nanoesferas podem ser definidas como sistemas nanoparticulados de caráter matricial, constituídas por uma matriz polimérica, enquanto as nanocápsulas são vesículas nas quais o polímero está disposto ao redor de um núcleo, geralmente oleoso (RAO *et al.*, 2004; COUVREUR *et al.*, 2002; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Sistemas nanoparticulados podem ser preparados na ausência de polímero obtendo-se as nanoemulsões (NE), e na ausência de polímero e óleo, obtendo-se as nanodispersões (ND). Dentre os vários sistemas nanoestruturados as nanopartículas poliméricas apresentam como vantagem a maior estabilidade dos colóides que geralmente é associada à presença do polímero (LOSA *et al.*, 1993; CALVO *et al.*, 1996).

A indometacina é um fármaco antiinflamatório não esteróide, derivado do ácido indolacético, que apresenta importantes atividades antiinflamatória, analgésica e antipirética, mas, no entanto, apresenta também importantes efeitos colaterais, especialmente em nível gastrintestinal (REYNOLDS, 1993). A associação indometacina/nanocarreadores, vem sendo extensivamente investigada pelo nosso grupo de pesquisa, tanto em estudos *in vivo*, visando a redução dos efeitos colaterais causados por este fármaco (RAFFIN *et al.*, 2003), como estudos de estabilidade e caracterização físico-química (RAFFIN *et al.*, 2003; SOARES, 2003; POHLMAN *et al.*, 2002; WEISS, 2001). Sendo assim, a indometacina será utilizada como modelo de fármaco para desenvolvimento deste trabalho.

1.2 Hipótese de trabalho

Um problema comum quanto à estabilidade química de suspensões de nanocarreadores, é a redução dos valores de pH ao longo de um período de armazenagem. Estudos foram desenvolvidos com o intuito de esclarecer os mecanismos responsáveis pela redução do pH. CALVO e colaboradores (1996) associaram o aumento da acidez de suspensões de nanopartículas, primeiramente, à hidrólise dos triglicerídeos que compõem o núcleo oleoso e dos fosfolipídeos utilizados como tensoativos, ambos gerando ácidos graxos livres em solução. Porém, o declínio dos valores de pH nas formulações contendo polímero (poli(ϵ -caprolactona)) foi atribuído também à produção de ácido ϵ -hidroxicapróico livre como resultado da degradação da poli(ϵ -caprolactona). Esta hipótese foi confirmada pelo declínio da massa molecular do polímero formador das nanopartículas. Trabalhos subseqüentes sugeriram que, além da hidrólise do polímero, poderia estar ocorrendo um processo de relaxação das cadeias poliméricas que, conseqüentemente, levaria à exposição de maior número de grupos ácidos terminais, quando o polímero em questão fosse poli(ϵ -caprolactona) (SCHAFFAZICK, 2001), ou aumento da concentração de íons hidrônio na interface partícula/água, quando o polímero fosse poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metila) (LOPES *et al.*, 2000). Tendo em vista a hipótese levantada por estes autores, neste trabalho se propõe investigar a relaxação das cadeias poliméricas através da indução desta relaxação por um tratamento térmico aplicado aos sistemas nanocarreadores.

Um empecilho na encapsulação de fármacos lipofílicos utilizando processos que envolvem a dispersão de um solvente orgânico em uma fase externa aquosa (nanoprecipitação) é a precipitação do fármaco na fase aquosa (CALVO *et al.*, 1996). Estudos realizados por GUTERRES e colaboradores (1995) sugeriram a formação concomitante de nanocristais de fármaco, estabilizados por tensoativos, durante a preparação de formulações de nanocápsulas de poli(ácido láctico) contendo diclofenaco, outro antiinflamatório não esteróide derivado do ácido fenilacético. Trabalhos posteriores com

formulações de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) (MULLER *et al.*, 2004; SCHAFFAZICK *et al.*, 2002) e poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metila) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2002), contendo diclofenaco, também sugeriram a presença de nanocristais de fármaco em suspensão baseados nos estudos realizados por GUTERRES e colaboradores (1995). Sendo assim, outra hipótese de trabalho baseia-se na busca de uma metodologia que seja capaz de diferenciar as nanopartículas poliméricas dos nanocristais de fármaco (indometacina) que podem estar presentes em suspensão.

No que diz respeito à organização em nível molecular dos diversos componentes dos nanocarreadores (polímero, fármaco, tensoativos, óleo), existem algumas propostas de estruturas sugerindo, por exemplo, que o polímero forma uma fina camada polimérica em torno do núcleo oleoso da NC (CALVO *et al.*, 1996), ou mesmo, que esta camada não é contínua (LOSA *et al.*, 1993). Quanto ao tensoativo monoestearato de sorbitano, foi proposto que este se encontra dissolvido no núcleo (triglicerídeos dos ácidos cárpico e caprílico) das NC (MULLER *et al.*, 2001) e, no caso de NS, este tensoativo se encontra retido na matriz polimérica (POHLMANN *et al.*, 2002; MULLER *et al.*, 2001). Logo, será realizado um estudo, através de Espalhamento de raios-X a baixo ângulo, com o intuito de contribuir na proposição de modelos de estruturas de nanopartículas.

2.OBJETIVOS

O objetivo do trabalho é preparar e caracterizar suspensões de nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) contendo indometacina através de técnicas de Espalhamento de luz e de raios-X a baixo ângulo. Inicialmente serão avaliadas estabilidade e características físico-químicas das suspensões, com especial atenção à possível relaxação das cadeias poliméricas. Para isso, uma suspensão de NC passará por tratamento térmico e será monitorada quanto ao pH e grau de despolarização da luz espalhada (ρ), este nos fornecerá, também, informações a respeito da geometria das partículas em suspensão. Considerando que, independente do formato geométrico, partículas em suspensão podem ser tratadas como esferas (Figura 2.1), é importante que se estabeleça qual o formato geométrico das partículas presentes nas formulações estudadas.

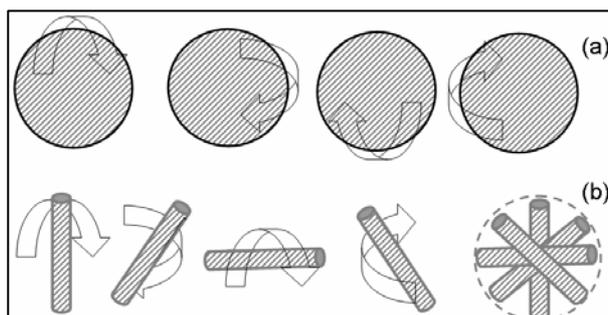


Figura 2.1: Comportamento de uma esfera (a) e de um bastão (b) em suspensão, ambas as formas (a) ou (b) giram em todas as direções.

Outra maneira, pela qual, pretende-se acessar o formato das partículas em suspensão, é através da relação entre o raio de giro (R_g) e o raio hidrodinâmico (R_h) ($P = R_g/R_h$).

Pretende-se verificar a estabilidade físico-química das suspensões através do monitoramento do diâmetro médio de partícula, polidispersão e ρ durante a estocagem. Paralelamente, será realizada uma investigação, por Espalhamento de luz estático, com o intuito de verificar a possível presença de nanocristais de fármaco em suspensão.

Além disso, deseja-se obter informações que possibilitem a proposição de modelos estruturais para nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões através de experimentos de Espalhamento de raios-X a baixo ângulo.

2.1 Objetivos específicos

- Preparar nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) contendo indometacina como fármaco modelo.
- Avaliar o envolvimento da relaxação das cadeias poliméricas na redução do pH de suspensões de nanopartículas preparadas com poli(ϵ -caprolactona).
- Desenvolver estudo de estabilidade de suspensões de NC poliméricas quanto ao diâmetro médio e polidispersão, através da técnica de Espalhamento de luz dinâmico, e determinação do grau de despolarização da luz espalhada (ρ) pela técnica de Espalhamento de luz estático.
- Determinar a forma geométrica das nanopartículas através dos valores obtidos para ρ , e através da relação entre o raio de giro (R_g) e o raio hidrodinâmico (R_h) ($P=R_g/R_h$), sendo que o valor de P está associado à forma da partícula em suspensão.
- Investigar a presença de nanocristais formados pela agregação do fármaco (indometacina) não-associado às nanopartículas através do emprego da técnica de Espalhamento de luz estático.
- Obter informações que permitam diferenciar os diversos tipos de nanocarreadores (NC, NS, NE, ND) através da técnica de Espalhamento de raios-X a baixo ângulo.
- Analisar, através de Espalhamento de raios-X a baixo ângulo, a influência da concentração de polímero na organização dos componentes, em nível molecular, em formulações de NC contendo ou não indometacina.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Estabilidade físico-química de suspensões de nanopartículas poliméricas

A determinação de características físico-químicas de suspensões de nanopartículas é complexa devido ao tamanho reduzido das partículas e à diversidade de matérias-primas que as compõem. Porém, visando à aplicação em âmbito farmacêutico, é fundamental que características como pH, tamanho e distribuição de partículas, potencial zeta, capacidade de associação e cinética de liberação de fármaco, além da avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenagem sejam bem definidos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; COUVREUR *et al.*, 2002).

Nesse sentido são encontrados inúmeros trabalhos na literatura comparando a estabilidade de diferentes polímeros em suspensões de nanopartículas (CAUCHETIER *et al.*, 2003; LEMOINE *et al.*, 1996), a influência da composição do núcleo oleoso, no caso de nanocápsulas (WEISS, 2001; SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2000; GUTERRES *et al.*, 1995; LOSA *et al.*, 1993), o emprego de diferentes concentrações (RAFFIN *et al.*, 2003) ou tipos de tensoativos (MULLER *et al.*, 2004), a capacidade de associação de fármaco (WEISS, 2001; GUTERRES *et al.*, 1995), além de estudos comparativos entre diferentes sistemas nanoparticulados, principalmente, entre nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões (SOARES, 2003; SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2000; CALVO *et al.*, 1996).

3.1.2 Influência das matérias-primas na estabilidade dos nanocarreadores

3.1.2.1 Polímeros

Devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e ausência de toxicidade, poliésteres como poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido lático-co-ácido

glicólico) (PLAGA) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL) tem sido extensivamente empregados no preparo de nanocarreadores de fármacos (SINHA *et al.*, 2004; LEMOINE *et al.*, 1996).

LEMONIE e colaboradores (1996) ao estudar a estabilidade de NS de PCL, PLA e PLAGA demonstraram uma importante influência da temperatura na degradação destas nanopartículas. O decréscimo na massa molecular da PCL em formulações armazenadas à temperatura ambiente ou a 4 °C, após 6 meses de armazenagem, foi de cerca de 12%, já para a mesma formulação armazenada à temperatura de 37 °C, a perda de massa foi de 63,5%. Comportamento semelhante ocorreu com as NS de PLA. No entanto, após 2 meses de armazenagem houve completa degradação das NS de PLAGA. A maior estabilidade das NS de PCL foi atribuída ao fato do PCL se tratar de um polímero semi-cristalino e mais hidrofóbico que os outros dois. Quanto as NS de PLA, a estabilidade foi atribuída também ao caráter hidrofóbico do polímero. Este estudo demonstrou que o grau de cristalinidade e a natureza hidrofóbica do polímero são fatores determinantes da velocidade de degradação destes em formulações de nanopartículas.

CAUCHETIER e colaboradores (2003) avaliaram a estabilidade de formulações de NC contendo PCL, PLA ou PLAGA, com núcleo de benzoato de benzila. Os parâmetros avaliados foram a concentração de fármaco (atovacona) e de benzoato de benzila ao longo de 120 dias. Não houve perda significativa destes componentes nas formulações contendo PCL. No entanto, as formulações contendo PLA ou PLAGA sofreram perda de cerca de 20 % de fármaco e, a formulação contendo PLAGA sofreu perda de 54 % de benzoato de benzila para o meio dispersante. Entretanto, estudos de dissolução/inchamento de filmes poliméricos demonstraram a completa dissolução de filmes de PCL e PLA após 48h de contato com o benzoato de benzila (GUTERRES *et al.*, 2000). Visto que para a preparação de NC é necessário um componente oleoso, miscível com o solvente do polímero, porém não miscível com a mistura solvente/não solvente para o polímero (COUVREUR *et al.*, 1995), GUTERRES e colaboradores (2000) propuseram

uma estrutura micelar para as nanopartículas contendo PCL ou PLA como polímero e benzoato de benzila como componente oleoso.

Copolímeros do ácido metacrílico e metacrilato de metila (Eudragit®) constituem outra classe de polímeros que vem sendo empregados no preparo de nanocarreadores. O interesse na utilização destes polímeros está nas propriedades que possuem de serem insolúveis em fluidos gástricos e altamente solúveis no meio alcalino do fluido intestinal, podendo, deste modo, servir como moduladores da liberação de fármacos (DITGEN *et al.*, 1997).

Poucos são os estudos relacionados à estabilidade físico-química de Eudragit® em suspensões de nanopartículas. SCHAFFAZICK e colaboradores (2002) verificaram, através de ensaios de dissolução/inchamento de filmes de Eudragit® S90, que este não sofre alteração de massa em contato com Miglyol® 810 (triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico) ou benzoato de benzila até 13 dias de experimento. Sendo assim, empregando-se os sistemas Eudragit® S90/Miglyol® 810 ou Eudragit® S90/benzoato de benzila, nanocápsulas podem ser, de fato, formadas.

LOPES e colaboradores (2000) atribuíram a diminuição do pH de suspensões de nanopartículas produzidas com Eudragit® S90, após armazenagem, à relaxação das cadeias poliméricas e estabelecimento do equilíbrio de dissociação dos grupos carboxílicos pendentos destas cadeias. Isso conduziria a um aumento da concentração dos íons hidrônio na interface partícula/água e conseqüente redução do pH.

3.1.2.2 Núcleo oleoso

A presença de um núcleo oleoso pode aumentar significativamente a concentração de fármacos lipofílicos associados às nanopartículas (COUVREUR *et al.*, 2002). Por exemplo, LOPES e colaboradores (2000) ao estudarem NC e NS de Eudragit® S90 obtiveram cerca de 10% a mais de

associação de fármaco (etionamida) nas NC com núcleo de Miglyol[®] 810 em relação às formulações de NS.

TEIXEIRA e colaboradores (2004) ao avaliarem a concentração de xantona ou 3-metoxixantona a NC e NS de PLAGA obtiveram uma eficiência de incorporação de até 33 % de xantona e 42 % de 3-metoxixantona às NS. Enquanto que para NC, a eficiência de incorporação chegou a 89 % para ambos os fármacos. A baixa eficiência de incorporação das xantonas às NS foi associada à baixa afinidade destes fármacos ao polímero. Segundo BARICHELLO e colaboradores (1999), fármacos que possuem baixa afinidade pelo polímero tendem a difundir da fase orgânica para o meio aquoso durante o processo de formação das NS, resultando em uma baixa eficiência de incorporação. Ainda, a elevada eficiência de incorporação das xantonas às NC foi associada à presença de núcleo oleoso composto de Myristol 318 (triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico), visto a solubilidade dos fármacos no núcleo das NC.

A natureza do óleo que compõe o núcleo das nanocápsulas pode afetar a estabilidade física das nanopartículas. NC de PCL ou poli(cianoacrilato de isobutila) (PIBCA) contendo Miglyol[®] 840 como núcleo oleoso demonstraram maior estabilidade com relação às NC preparadas com Labrafil[®] 1944 CS (mistura de óleo de amêndoas e polietilenoglicol-6) , as quais apresentaram separação de fases após curto período de estocagem (LOSA *et al.*, 1993).

SANTOS-MAGALHÃES e colaboradores (2000) realizaram estudos de estabilidade acelerada (centrifugação, ciclos de congelamento e estresse mecânico) com NC de PLAGA contendo benzoato de benzila ou óleo de girassol como núcleos oleosos. Os autores constataram a maior estabilidade física (análise macroscópica) para a formulação contendo benzoato de benzila como núcleo. Neste mesmo estudo, também foram comparadas através de estabilidade acelerada, NE com óleo de soja ou Miglyol[®] 812 como núcleos, sendo constatada maior estabilidade física das NE com Miglyol[®] 812. Este comportamento foi atribuído a maior viscosidade do óleo de soja, o que dificultaria o processo de emulsificação para formação das NE (Yu *et al.*, 1993).

3.1.2.3 Tensoativos

O emprego de tensoativos é fundamental para evitar a agregação das partículas durante a estocagem, sendo que a combinação de um tensoativo com elevado EHL com um de baixo EHL fornece as formulações mais estáveis (COUVREUR *et al.*, 2002; FESSI *et al.*, 1989).

ALVAREZ-ROMÁN e colaboradores (2001) compararam o efeito estabilizante dos tensoativos polissorbato 80 e poloxamer 188 sobre NC de PCL contendo octilmetoxicinamato como substância ativa. Todas as formulações apresentaram-se estáveis (sem presença de agregados), logo após o preparo. Porém, após 7 dias de estocagem, foi observada a formação de agregados nas NC contendo poloxamer 188 como agente estabilizante, enquanto que, as formulações contendo polissorbato 80 mantiveram-se estáveis. Este resultado foi atribuído a maior afinidade do polissorbato 80 à superfície do polímero que forma a NC. Os autores constataram também, que os diâmetros da NC contendo poloxamer 188 foram maiores, entre 427 nm e 330 nm, que os diâmetros das NC contendo polissorbato 80, que estiveram entre 400 nm e 255 nm.

MULLER e colaboradores (2004) ao avaliarem formulações NC de PCL contendo polissorbato 80 e Epikuron[®] 170 (mistura de fosfo e glico-lipídeos de soja) como tensoativos obtiveram suspensões viáveis com concentrações de tensoativos que variaram de 7,66 mg/mL a 1,53 mg/mL. Ainda, ao avaliar suspensões somente com monoestearato de sorbitano ou somente com Epikuron[®] 170, os autores puderam constatar que concentrações superiores a 3,06 mg/mL de Epikuron[®] 170 estabilizam física e quimicamente o diclofenaco associado às nanopartículas, prevenindo sua diminuição em teor e o aparecimento de produtos de degradação nas formulações.

RAFFIN e colaboradores (2003) também utilizaram concentrações variadas de tensoativos (monoestearato de sorbitano e polissorbato 80) no preparo de NC de PCL e obtiveram partículas estáveis quanto ao diâmetro médio até 30 dias de armazenagem.

SCHAFFAZICK e colaboradores (2002) ao preparar NC e NS de Eudragit® S90 contendo monoestearato de sorbitano e polissorbato 80 como tensoativos obtiveram partículas com diâmetro médio de 180 nm para as NC e 83 nm para as NS. O tamanho inferior das NS em relação as NC foi atribuído ao sistema de tensoativos, uma vez que NS de Eudragit® S90 contendo poloxamer 188 no lugar de polissorbato 80 apresentaram diâmetro de cerca de 200 nm (LOPES *et al.*, 2000).

PAUL e colaboradores (1997) constataram que a concentração de tensoativos pode alterar a concentração de fármaco associado às nanopartículas. O trabalho desenvolvido por estes autores demonstrou um aumento linear na concentração de pentamidina associada a NS de PLA quando relacionado à concentração de lecitina de soja utilizada como tensoativo. A percentagem máxima de pentamidina associada às NS foi de 75,8% quando a concentração de lecitina de soja foi de 12,5 mg/mL.

3.1.2.4 Fármacos

Uma variada classe de fármacos é associada a sistemas nanoparticulados como antiinflamatórios não esteróides (MULLER *et al.*, 2004; SCHAFFAZICK *et al.*, 2002; CALVO *et al.*, 1996; GUTERRES *et al.*, 1995), antiipertensivos (VERGER *et al.*, 1998), antibióticos (SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2000), antineoplásicos (AVGOUSTAKIS *et al.*, 2002), anticonvulsivantes (FRESTA *et al.*, 1996) hormônios (SCHAFFAZICK *et al.*, 2005), peptídeos (Li *et al.*, 2001) entre outros. Neste contexto, é necessário que se estabeleça qual a influência dos fármacos sobre os nanocarreadores.

Antiinflamatórios não esteróides, como diclofenaco e indometacina, não modificam parâmetros como pH, tamanho e distribuição de partículas quando associados a nanocarreadores preparados pelo método de nanoprecipitação (SCHAFFAZICK *et al.*, 2002; WEISS, 2001; MULLER *et al.*, 2001).

O potencial zeta é um parâmetro bastante sensível a modificações pela associação de fármacos. Ao associar etionamida às nanopartículas LOPES e colaboradores (2000) observaram leve redução no potencial zeta de NC de Eudragit® S90. Por outro lado, para formulações de NS houve um ligeiro aumento nos valores do potencial zeta. MULLER e colaboradores (2001) ao associar diclofenaco a NC e NS de PCL, também observaram aumento do valor absoluto do potencial zeta para NC e diminuição deste para NS.

Dependendo do fármaco podem ocorrer alterações no tamanho das partículas. GOVENDER e colaboradores (1999) ao estudar NS de PLAGA obtiveram nanopartículas de 157 nm na ausência de procaína sendo que o diâmetro aumentou progressivamente com o aumento da concentração de fármaco chegando a 210 nm. O aumento da concentração de fármaco também aumentou os valores absolutos de potencial zeta para estas formulações.

SCHAFFAZICK e colaboradores (2005) observaram o decréscimo do tamanho das NS de Eudragit® S100 ao adicionarem melatonina à formulação. NS sem melatonina apresentaram diâmetro de 192 nm e com melatonina o diâmetro foi de 126 nm. Para NC de Eudragit® S100 e NE a presença ou não de fármaco não alterou o diâmetro médio que foi de 240 nm, para todas as formulações.

3.1.3 Nanocarreadores de fármaco

Visto a complexidade da composição dos nanocarreadores de fármaco, a composição quali-quantitativa de cada formulação é fator determinante da estabilidade do sistema, que envolve as interações físico-químicas entre os componentes, principalmente do fármaco com o polímero e/ou fase oleosa, sendo necessário um estudo específico para cada caso (SCHAFFAZICK *et al.*, 2002).

Neste trabalho serão avaliadas suspensões de nanopartículas, em especial NC, contendo ou não indometacina, quanto à sua estabilidade e

características físico-químicas ao longo do tempo. Sendo assim, é importante que parâmetros já determinados para sistemas semelhantes sejam conhecidos.

3.1.3.1 Diâmetro médio de partículas

A distribuição do tamanho das partículas é uma das mais importantes caracterizações físico-químicas das suspensões coloidais. A tendência à sedimentação do fármaco durante um longo período de armazenagem e estudos de estabilidade acelerada podem ser monitorados medindo-se a mudança da distribuição do tamanho das partículas na suspensão (MAGENHEIM e BENITA, 1991).

As técnicas mais frequentemente utilizadas para a medida do tamanho e da polidispersão das nanopartículas são Microscopia eletrônica de varredura e de transmissão que permitem análise morfológica e determinação do tamanho através da observação das partículas, e Espectroscopia de correlação de fótons (PCS), que também é chamada de Espalhamento de luz dinâmico, a qual permite a determinação do tamanho das partículas através da análise do movimento difusivo destas em suspensão. As desvantagens na utilização de MEV ou MET, para a determinação de tamanho médio e polidispersão, é a necessidade de contagem de um grande número de partículas para se obter uma estatística confiável, assim como pode haver modificações nas partículas durante a secagem e produção de contraste. O PCS apresenta como vantagens o curto tempo requerido para a realização das medidas e o custo relativamente baixo dos equipamentos (BOOTZ *et al.*, 2003; GUINEBRETIERE *et al.*, 2002; MAGENHEIM e BENITA, 1991).

Como o PCS baseia-se na análise do movimento browniano das partículas, a adsorção de tensoativos e a camada de hidratação podem afetar a determinação do tamanho das mesmas (MAGENHEIM e BENITA, 1991). Sendo assim, os diâmetros determinados por PCS, geralmente, se apresentam superiores aos determinados por MEV ou MET. Um exemplo disto é o estudo

realizado por BOOTZ e colaboradores (2003) que ao determinar o diâmetro de nanopartículas de poli(cianoacrilato de butila) por MEV obteve diâmetro médio de 167 nm com estreita distribuição e por PCS obteve diâmetros em torno de 190 nm, também com distribuição estreita.

O tamanho das NC obtidas por nanoprecipitação usualmente encontra-se entre 100 nm e 500 nm e depende de vários fatores: a natureza química e concentração do polímero e do fármaco; a concentração de tensoativos; a razão solvente orgânico/água; a concentração, tensão superficial e viscosidade do óleo; e a velocidade de difusão da fase orgânica na fase aquosa (COUVREUR *et al.*, 2002).

MEZZALIRA e colaboradores (2001) verificaram diferença entre os valores de diâmetro médio para formulações de NC de PCL preparadas com núcleo de óleo mineral ou Miglyol 810[®] (Tabela 3.1), sendo que este comportamento foi associado ao fato da indometacina não ser solúvel no óleo mineral estando totalmente adsorvida à superfície polimérica. No entanto, o estudo realizado por CRUZ (2005) demonstrou que a hidrólise alcalina total da indometacina associada à NC de PCL contendo Miglyol 810[®] como núcleo, ocorre no mesmo tempo (2 min) que para NS de PCL e NE com Miglyol 810[®], sugerindo que a localização da indometacina em nanopartículas contendo polímero (NC e NS) ou não (NE) seja na interface partícula/água.

Ainda no trabalho realizado por MEZZALIRA e colaboradores (2001), foi possível observar uma tendência à redução do diâmetro médio das NC com óleo mineral, contendo ou não fármaco, após armazenagem (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Valores de diâmetros médios de partículas (nm) para diferentes formulações de nanocápsulas obtidos logo após preparo das formulações e com até 60 dias de armazenagem.

Formulação	Fármaco presente		Fármaco ausente		Referência
	0 a 15 dias	45 a 90 dias	0 a 15 dias	45 a 90 dias	
PCL MI ^{IND}	304 ± 66	-	-	-	MEZZALIRA <i>et al.</i> , 2001
PCL OM ^{IND}	234 ± 16	194 ± 48	262 ± 10	206 ± 10	
PCL OM ^{IND}	231 ± 71	-	230 ± 62	-	WEISS, 2001
PLA OM ^{IND}	195 ± 67	-	190 ± 60	-	
PCL MI ^{MTP}	300 ± 24	400 ± 30	-	-	LOSA <i>et al.</i> , 1993
PCL LB ^{MTP}	193 ± 40	-	-	-	

IND: indometacina; MTP: metipranolol; PCL: poli(ϵ -caprolactona); PLA: poli(ácido láctico); LB: Labrafil[®] 1944 CS; MI: triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (Miglyol[®] 840); OM: óleo mineral.

Para WEISS (2001) a série de nanocápsulas preparadas com PCL e óleo mineral apresentaram diâmetro médio de 230 nm. Enquanto que, para as NC preparadas com PLA e óleo mineral, o diâmetro médio foi próximo a 200 nm. Demonstrando uma leve diminuição do diâmetro médio quando as formulações são preparadas com PLA.

LOSA e colaboradores (1993) obtiveram diâmetros médios para as NC de PCL contendo Miglyol[®] 840 como núcleo oleoso em torno de 300 nm, estes diâmetros foram superiores aos diâmetros médios das formulações contendo Labrafil[®] 1944 CS como núcleo. A diferença entre os tamanhos de partículas foi atribuída ao caráter hidrofílico dos óleos. Considerando que o Labrafil[®] 1944 CS é mais hidrofílico que o Miglyol[®] 840, deve de dispersar de modo mais eficiente pela suspensão resultando em gotículas menores. Neste mesmo estudo, foram preparadas formulações de NE contendo fármaco sendo que o diâmetro médio obtido para estas formulações foi superior as suas respectivas NC. O diâmetro médio das NE contendo Miglyol[®] 840 chegou a 600 nm e das

NE contendo Labrafil[®] 1944 CS chegou a 300 nm. Segundo os autores, a obtenção de diâmetros inferiores para as NC se deve a presença de polímero envolvendo o núcleo oleoso, e desta forma, evitando a coalescência das nanopartículas durante o processo de evaporação do solvente.

CALVO e colaboradores (1996) ao comparar NC e NS de PCL e uma formulação de NE obtiveram diâmetros inferiores a 300 nm para todas as formulações, logo após os seus preparos. Após 180 dias de estocagem observaram o incremento substancial do diâmetro médio da NE. O mesmo não foi observado para as NC e NS, sugerindo então, que o polímero presente nas demais formulações possui um efeito estabilizante para as nanopartículas.

3.1.3.2 Medidas de pH

A medida de pH de suspensões coloidais é um parâmetro importante na avaliação da estabilidade físico-química destes sistemas, uma vez que a mudança no valor do pH de uma suspensão pode estar relacionada à degradação do polímero ou de algum outro componente da formulação, e ainda, no caso da formulação conter fármaco, pode estar ocorrendo a passagem deste do núcleo para o meio aquoso (GUTERRES *et al.*, 1995).

CALVO e colaboradores (1996) verificaram a redução do pH em função do tempo de armazenagem de formulações de NC de PCL contendo Miglyol[®] 840, NS de PCL e NE contendo Miglyol[®] 840, estas possuíam pH inicial entre 5,0 e 5,5. Após 180 dias de armazenagem o pH passou a valores entre 3,0 e 3,4. O aumento da acidez das formulações, primeiramente, foi atribuído à hidrólise dos triglicerídeos que compõem o Miglyol[®] 840 e hidrólise dos fosfolípídeos utilizados como tensoativos, ambos gerando ácidos graxos livres em solução. Porém, o declínio dos valores de pH nas formulações contendo PCL foi atribuído também à produção de ácido ϵ -hidroxicapróico livre como resultado da degradação da PCL. Esta hipótese foi confirmada pelo declínio da

massa molecular do polímero formador das nanopartículas através de análises de Cromatografia por Exclusão de Tamanho.

Para WEISS (2001) as formulações preparadas com PCL e benzoato de benzila apresentaram valor médio de pH, após preparação, de 4,8. Após 30 dias, o pH sofreu um decaimento significativo ($p < 0,05$) para valores próximos a 4,0. Ao final de 90 dias, estes valores continuaram a apresentar um declínio significativo ($p < 0,05$) alcançando valores entre 3,5 e 3,9. Com a utilização de PCL e óleo mineral, resultados similares à série anterior foram observados. Após 30 e 90 dias de armazenamento, os valores de pH decaíram para um patamar próximo a 3,4. Estes resultados seriam devidos à hidrólise do polímero em suspensão produzindo ácido ϵ -hidroxicapróico livre, conforme detectado por CALVO e colaboradores (1996). MULLER (1999) também atribui o abaixamento nos valores de pH de formulações de nanocápsulas de PCL à formação de ácido ϵ -hidroxicapróico livre, baseado nos trabalhos desenvolvidos por CALVO e colaboradores (1996).

Estudos realizados por MALLIN e colaboradores (1996) demonstraram que a hidrólise da PCL é um processo lento e que depende, primeiramente, do inchamento do polímero. Os testes de inchamento de filmes de PCL em água ou tampão fosfato (pH 7,4), realizados nas temperaturas de 25 °C e 37 °C, demonstraram que os filmes de PCL não sofrem inchamento durante um período de 60 dias.

Após 30 dias de armazenagem das NC de PLA com óleo mineral, WEISS (2001) observou um aumento significativo ($p < 0,05$) dos valores de pH alcançando um valor médio de 4,7 e após 90 dias de armazenamento o valor de pH se manteve em torno de 4,7. WEISS (2001) atribuiu os resultados desta análise a uma desestruturação do sistema, que ao longo do tempo de armazenamento apresentou a formação de fios de polímero microscópicos, observados através de Microscopia Eletrônica de Varredura.

SCHAFFAZICK (2001) observou diminuição significativa ($p < 0,05$) do pH de formulações de NC de PCL, contendo Miglyol[®] 810 como componente oleoso, passando de valores iniciais em torno de 5,0 para valores em torno de

4,0 após 105 dias de armazenagem. Este aumento da acidez poderia estar relacionado tanto ao relaxamento das cadeias poliméricas de PCL, o que ocasionaria a exposição de maior número de grupos ácidos terminais, quanto à hidrólise do polímero como proposto por CALVO e colaboradores (1996).

Com relação às formulações de NC de Eudragit® S90 contendo Miglyol® 810 ou benzoato de benzila como núcleo oleoso, SCHAFFAZICK (2001) observou um declínio significativo ($p < 0,05$) dos valores de pH após 105 dias da preparação, o que foi atribuído a um processo de relaxação das cadeias poliméricas. Conforme proposto por LOPES e colaboradores (2000), a diminuição dos valores de pH em formulações contendo Eudragit® S100 estaria relacionada ao aumento da concentração dos íons hidrônio na interface partícula/água.

3.1.3.3 Encapsulação de Fármacos

A determinação do teor e taxa de associação de fármacos presentes nas nanopartículas é fundamental, porém complexa, devido à dificuldade em separar o fármaco livre do associado, em função da natureza coloidal dos carreadores. Para as NS, a técnica de separação mais comumente utilizada é a ultracentrifugação. O fármaco livre é determinado no sobrenadante, enquanto o fármaco total é medido após completa dissolução das nanopartículas num solvente adequado, sendo o conteúdo de fármaco associado determinado pela diferença entre o total de fármaco contido na suspensão e a quantidade de fármaco livre no sobrenadante (MAGENHEIM e BENITA, 1991). Para as NC, a técnica mais empregada é a ultrafiltração-centrifugação que permite a separação entre a fase aquosa dispersante e a fração de nanopartículas, sendo a quantidade de fármaco livre determinada no ultrafiltrado. O conteúdo de fármaco associado é determinado pela diferença entre o total de fármaco contido na suspensão e a quantidade de fármaco livre no ultrafiltrado (FESSI *et al.*, 1989).

CALVO e colaboradores (1996) verificaram por fotomicrografias de Microscopia Eletrônica de Transmissão a presença de cristais de indometacina aderidos à superfície de NS de PCL, o mesmo não ocorreu com as formulações de NC e NE, as quais continham Miglyol[®] 840 como componente oleoso.

GUTERRES e colaboradores (1995) ao determinar a concentração de diclofenaco associado à NC de PLA observaram uma associação de aproximadamente 100 % do fármaco logo após o preparo das suspensões independente do núcleo oleoso (Miglyol[®] 840 ou benzoato de benzila) ou concentração de fármaco adicionado às formulações. No entanto, após 30 dias de armazenagem, o teor de fármaco nas suspensões decaiu para valores próximos a 50 % nas formulações que continham 3 mg/mL de diclofenaco e núcleo de benzoato de benzila, e 2 mg/mL de diclofenaco com núcleo de Miglyol[®] 840, sendo estas as formulações com maior concentração de fármaco inicial. Ainda cabe ressaltar que após 8 meses de armazenagem foi possível observar a formação de cristais do fármaco aderidos às paredes do recipiente que acondicionavam estas formulações. Segundo GUTERRES e colaboradores (1995), os cristais de fármacos poderiam ser formados durante a preparação das nanopartículas, quando a concentração de fármaco excede sua saturação no sistema. Os cristais seriam estabilizados pelos tensoativos da formulação. Se estes cristais possuírem a mesma dimensão de tamanho das NC formadas, isso poderia explicar a sua quantificação nula no ultrafiltrado, considerando-se então, o fármaco 100 % associado. Com o passar do tempo estes nanocristais crescem e precipitam o que ocasiona então, a diminuição do teor de fármaco e visualização de cristais micrométricos.

SCHAFFAZICK (2001) ao estudar NC de PCL contendo diclofenaco obteve teores de fármaco próximos a 100 %, após 45 dias de armazenagem, sendo que após 105 dias de armazenagem estas concentrações decaíram significativamente ($p < 0,05$) para valores em torno de 90 %. Para a série de NC de Eudragit[®] S90 a concentração de diclofenaco após 45 dias de armazenagem também ficou em torno de 100 %, porém após 105 dias de armazenagem a concentração decaiu para valores próximos a 65 % para a

formulação contendo Miglyol[®] 810 como núcleo oleoso e 85 % para formulações contendo benzoato de benzila como núcleo. Sendo que esta acentuada diminuição do teor de diclofenaco nas formulações foi atribuída à possível formação de nanocristais do fármaco que estariam em suspensão estabilizados por tensoativos, o que, após precipitação, diminuiria o teor de fármaco nas suspensões.

Outro trabalho que sugeriu a presença de nanocristais de fármaco em suspensão foi desenvolvido por LACOULONCHE e colaboradores (1999). Estes autores estudaram o perfil de liberação do flurbiprofeno a partir de NS de PCL através do método de diálise (LEAVY e BENITA, 1990). Foi observada uma liberação inicial de fármaco muito rápida (efeito *burst*) seguida de uma fase de liberação sustentada. Foi observado também um comportamento similar na liberação de flurbiprofeno livre (1 mg/mL) com relação a formulação de NS contendo a mesma concentração deste (1 mg/mL), sugerindo que a liberação inicial do flurbiprofeno das nanopartículas poderia ser devido à presença de fármaco adsorvido à superfície da NS ou mesmo que o fármaco poderia estar em suspensão na forma de nanocristais.

3.2 Modelos de estrutura para nanopartículas

Determinar qual a organização em nível molecular dos diversos componentes das nanopartículas é um processo que despende muito trabalho e utilização de uma associação de técnicas variadas.

O potencial zeta é influenciado pelos diferentes componentes presentes na interface partícula/meio dispersante. Baseado nisso, LOSA e colaboradores (1993) ao estudar NC de PCL contendo Miglyol[®] 840 ou Labrafil[®] 1944 CS como núcleos oleosos, observaram que as nanopartículas contendo Miglyol[®] 840 apresentaram potencial zeta mais negativo que as contendo Labrafil[®] 1944 CS. Além disso, formulações de NE, que pela ausência de polímero, foram utilizadas como controles do estudo, apresentaram valores de potencial zeta

similares às suas respectivas NC. Sendo assim, os autores concluíram que a camada polimérica que envolve o núcleo oleoso não é contínua e que a natureza do óleo que compõem o núcleo pode ser um fator determinante do potencial superficial da nanopartículas.

Outro trabalho comparativo envolvendo potencial zeta foi realizado por CALVO e colaboradores (1996). Foram obtidos valores similares de potencial zeta para formulações de NC de PCL e NE (em torno de -42 ± 10 mV), ambas contendo Miglyol[®] 840 como núcleo oleoso, sendo que para uma formulação de NS de PCL o valor do potencial zeta também foi negativo, porém superior ($-16,33 \pm 2,2$ mV). A similaridade dos resultados obtidos para NC de PCL e NE, quanto ao potencia zeta, levou os autores a sugerirem que o polímero que recobre o núcleo oleoso não forma uma camada consistente, mas sim um fino filme polimérico. Ainda neste estudo, CALVO e colaboradores (1996) obtiveram espectros de difração de raios-X para a NS contendo indometacina, para a indometacina isolada, para a PCL isolada e para uma mistura física de PCL e indometacina, sendo que o pico de difração da indometacina não foi visível no espectro da NS mas foi identificado no espectro da mistura física. Estes resultados indicaram que a indometacina se encontra dispersa molecularmente na matriz polimérica da NS (Figura 3.1). Corroborando com esta hipótese, termogramas de Calorimetria Exploratória Diferencial não identificaram a temperatura de fusão referente a indometacina (160 °C) quando esta se encontra associada a NS, restando apenas a identificação da temperatura de fusão da PCL (60 °C).

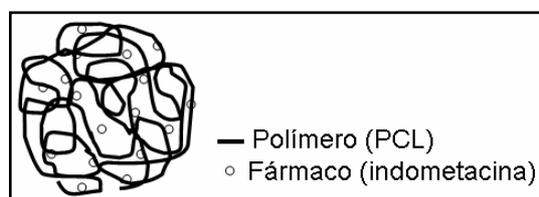


Figura 3.1: Modelo de estrutura para NS de PCL contendo indometacina baseado no estudo de CALVO e colaboradores (2003).

Pela análise de termogramas obtidos por Calorimetria Exploratória Diferencial de suspensões de NC de PCL, contendo Miglyol[®] 810 como núcleo oleoso, foi observada a diminuição de cerca de 7 °C na temperatura de fusão do Miglyol[®] 810 com relação a matéria-prima isolada. Este decréscimo foi atribuído à presença do tensoativo lipofílico (monoestearato de sorbitano) dissolvido no núcleo oleoso (Figura 3.2), uma vez que a temperatura de fusão do monoestearato de sorbitano não foi identificada no termograma da formulação de NC. Para uma formulação de NS (ausência de núcleo oleoso) foi possível a identificação das temperaturas de fusão do polímero e do monoestearato de sorbitano. Desta forma, as NS seriam constituídas de misturas heterogêneas de PCL e monoestearato de sorbitano, ou seja, sistemas bifásicos (MULLER *et al.*, 2001).

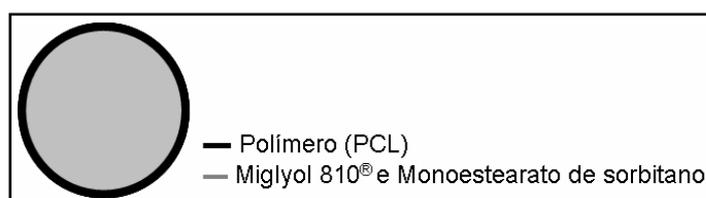


Figura 3.2: Modelo de estrutura para NC de PCL contendo Miglyol[®] 810 como núcleo oleoso baseado no estudo de MULLER e colaboradores (2001).

POHLMANN e colaboradores (2002) observaram a diminuição do tamanho de partículas ao comparar o diâmetro de NS de PCL em suspensão (200 nm), determinado por Espectroscopia de correlação de fótons, com o diâmetro determinado por Microscopia eletrônica de varredura (entre 60 nm e 90 nm) para a mesma formulação após secagem por aspersão (GUTERRES *et al.*, 1999). O mesmo não ocorreu para formulações de NC de PCL com óleo mineral como núcleo oleoso. A partir destas constatações foram preparadas formulações de NC de PCL e óleo mineral, NS de PCL, NE com óleo mineral e uma dispersão de tensoativos (ND), sendo que todas as formulações continham monoestearato de sorbitano como tensoativo lipofílico e polissorbato 80 como tensoativo hidrofílico, com exceção de uma formulação de NS (NS-2) da qual foi excluído o monoestearato de sorbitano. Estas formulações foram

comparadas quanto ao seu diâmetro médio e segundo coeficiente virial (k_D) determinados por PCS. O k_D é um parâmetro que representa a interação das partículas com o meio solvente, neste caso representa a interação das nanopartículas com a água. O diâmetro médio esteve entre 180 nm e 240 nm para todas as formulações. No entanto, os valores de k_D para as formulações de NC, NS e NE foi negativo o que significa uma baixa interação das partículas com a água. No caso da NC e NS isso foi atribuído à presença do monoestearato de sorbitano disperso pela nanopartícula. A baixa interação da NE com a água foi atribuída à presença do óleo mineral. Para as formulações NS-2 e ND o k_D foi positivo, demonstrando uma efetiva interação com o meio solvente que foi atribuída ao polissorbato 80 disperso nestes sistemas. Baseados nestes resultados, e considerando que as NS formam um sistema bifásico na presença de monoestearato de sorbitano (MULLER *et. al.*, 2001), POHLMANN e colaboradores (2002) descartaram que o modelo de estrutura para NS pudesse ser um pequeno núcleo polimérico rodeado por monoestearato de sorbitano (Figura 3.3 (a)), e propuseram uma estrutura onde o monoestearato de sorbitano está retido na matriz de polímero da NS (Figura 3.3 (b)).

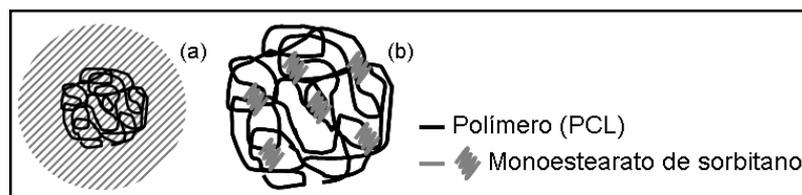


Figura 3.3: Modelos de estruturas para NS baseados no estudo de POHLMANN e colaboradores (2002). (a) estrutura de NS refutada; (b) estrutura de NS proposta.

SOARES (2003) analisou o perfil de hidrólise alcalina de uma sonda de éster etílico de indometacina a partir de NC e NS de PCL e uma formulação de NE. Nos três sistemas observou um comportamento difusivo para o consumo do éster de indometacina, sendo que este processo de difusão foi mais lento para NC do que para NE, e para NS foi mais rápido que para ambas as formulações anteriores, evidenciando diferenças entre os sistemas. Estas

diferenças foram explicadas considerando-se o éster etílico de indometacina associado ao polímero nas NS, e dissolvido no núcleo oleoso (Miglyol[®] 810) nas NC e NE, visto a alta lipofilicidade desta sonda. Considerando a diminuição do diâmetro médio de NS após aspersão (POHLMANN *et al.*, 2002), SOARES (2003) propôs um modelo para NS onde esta seria composta de várias nanopartículas menores (60 a 90 nm) estabilizadas por monoestearato de sorbitano (Figura 3.4).

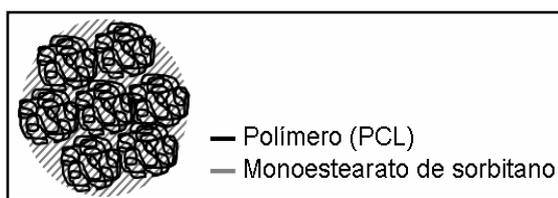


Figura 3.4: Hipótese de modelo de estrutura de NS refutado por SOARES (2003).

Este modelo foi refutado com base na determinação do diâmetro médio de partículas, por Espectroscopia de correlação de fótons, durante a hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina, uma vez que o diâmetro das NS permaneceu constante, entre 200 nm e 250 nm, durante todo o período de hidrólise (8 h), sendo que não foi constatado o surgimento de uma população de partículas com tamanho menor. Desta forma, SOARES (2003) concluiu que o modelo sugerido por POHLMANN e colaboradores (2002) (Figura 3.3 (b)) seria a organização em nível molecular mais apropriada para NS.

Experimentos de hidrólise alcalina do éster etílico de indometacina demonstraram que o consumo total deste éster por reação de hidrólise requer um tempo de cerca de 500 min quando associado a NS, quando associada a NE o tempo é de 800 min e quando associado a NC este tempo é de 1110 min (SOARES, 2003). Em comparação, o mesmo experimento de hidrólise realizado com NC, NS e NE contendo indometacina na forma ácida, demonstraram que o consumo total desta pela reação de hidrólise ocorreu em 2 min para todas as formulações (CRUZ, 2005). Estes resultados sugeriram que a localização preferencial da indometacina nas NC, NS e NE seja na

interface partícula/água, e que seu éster esteja disperso ou dissolvido nas partículas ou gotículas dos colóides (CRUZ, 2005; POHLMANN *et al.*, 2004).

4. CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

A técnica de Espalhamento de Luz será a base para o desenvolvimento do trabalho proposto, sendo assim, é necessário que se esclareçam aspectos importantes a respeito da teoria que norteia as informações obtidas nos experimentos.

4.1 Espalhamento de luz (PECORA e BERNE, 2000)

O Espalhamento de luz designa um conjunto de técnicas nas quais o evento básico é a interação da radiação eletromagnética com a matéria. O campo elétrico da radiação induz na matéria um momento de dipolo elétrico oscilante. Este dipolo oscilante, por sua vez, gera a luz espalhada em todas as direções.

A Figura 4.1 é uma representação esquemática do experimento de espalhamento de luz, onde a amostra está representada por uma partícula.

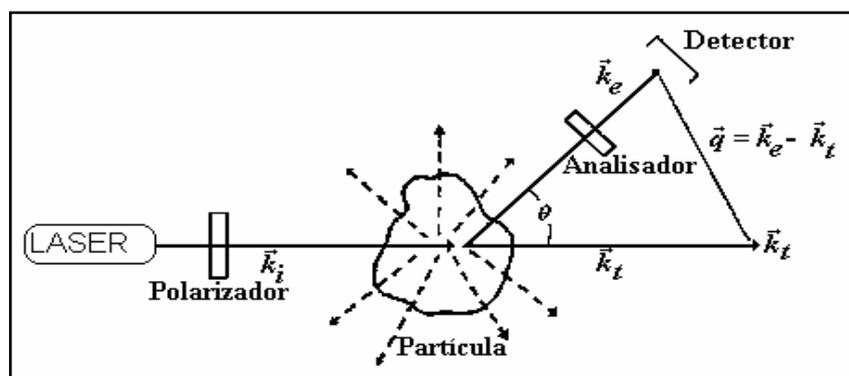


Figura 4.1: Geometria do experimento no equipamento de espalhamento de luz.

4.1.1 Espalhamento de luz estático (SLS) com luz polarizada (PEREIRA *et al.*, 2002)

Ao realizar o experimento a maior parte da luz espalhada corresponde à luz polarizada (I_{vv}) com relação à luz incidente (I_v), porém, com o uso de um polarizador de luz, é possível obter a separação da luz espalhada polarizada (I_{vv}) da luz espalhada despolarizada (I_{vh}). Modificações de concentração na amostra causam variação na intensidade da luz I_{vv} , enquanto que modificações na anisotropia das partículas espalhantes podem ser observadas na intensidade de luz I_{vh} . Ao relacionarmos os componentes da luz, I_{vh} e I_{vv} , temos o grau de despolarização da luz espalhada, que é representado pela equação (4.1).

$$\rho = \frac{I_{vh}}{I_{vv}} \quad (4.1)$$

Portanto, as medidas de I_{vv} e I_{vh} fornecem informações a respeito do grau de anisotropia, ou forma geométrica, das partículas em função da concentração.

4.1.2 Razão de Rayleigh (R) para a intensidade média de luz espalhada no SLS (SILVEIRA *et al.*, 1996)

No experimento de SLS é possível obter informações a respeito dos sistemas em estudo como formação de agregados de elevada massa molar ou de estruturas cristalinas, através da análise de variações na flutuação da intensidade de luz espalhada ao longo de um período de tempo de observação.

A maneira mais correta de se analisar a intensidade média de luz espalhada por um sistema, é através da Razão de Rayleigh (equação 4.2).

$$R_s = \left(\frac{I_{V_s}}{I_{V_{tol}}} \right) \left(\frac{n_s}{n_{tol}} \right) R_{tol} \quad (4.2)$$

Onde: R_s = Razão de Rayleigh da suspensão.

I_{V_s} = intensidade média de luz espalhada pela suspensão.

$I_{V_{tol}}$ = intensidade média de luz espalhada pelo tolueno (solvente de referência).

n_s = índice de refração da suspensão.

n_{tol} = índice de refração do tolueno.

R_{tol} = Razão de Rayleigh do tolueno.

É possível, ainda, retirar a influência que o meio solvente exerce na intensidade de luz espalhada (equação 4.3), restando, desta forma apenas a influência das partículas espalhantes.

$$R_p = R_s - [(1 - \varphi)R_a] \quad (4.3)$$

Onde: R_p = Razão de Rayleigh da partícula.

φ = fração volumétrica da entidade espalhante.

R_a = Razão de Rayleigh da água (solvente).

4.1.3 Obtenção do raio de giro (R_g) das partículas por SLS.

4.1.3.1 Dissimetria da intensidade de luz no SLS (HELLWEG e EIMER, 1998)

Grandes partículas podem gerar aumento da dissimetria angular ($d(\theta)$) na intensidade de luz espalhada. No caso de moléculas grandes e rígidas ou de agregados a dissimetria demonstra um comportamento linear e é definida como expresso na equação (4.4).

$$d(\theta) = \frac{I(\theta)}{I(180^\circ - \theta)} \quad (4.4)$$

Onde: θ = ângulo de observação da luz espalhada.

$I(\theta)$ = intensidade de luz espalhada no ângulo de observação.

$I(180^\circ - \theta)$ = intensidade de luz espalhada no ângulo de 180° subtraído da intensidade de luz espalhada no ângulo de observação.

Para estruturas alongadas encontramos a aproximação descrita pela equação (4.5).

$$d(\theta) \cong 1 + \left(\frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \right)^2 \left(\frac{R_g^2}{3} \right) \cos(\theta) \quad (4.5)$$

Onde: n_0 = índice de refração do meio solvente.

λ_0 = comprimento de onda do feixe de luz incidente no vácuo.

R_g = raio de giro da partícula.

Este método permite a obtenção do R_g pela inclinação da curva obtida da relação de $d(\theta)$ com o $\cos(\theta)$.

4.1.3.2 Gráfico de Guinier (GEORGALIS *et al.*, 1995)

A intensidade da luz espalhada a baixo ângulo no experimento de SLS pode ser expressa conforme a equação (4.6):

$$I(q) \approx \exp\left(\frac{-q^2 R_g^2}{3}\right) \quad (4.6)$$

Onde: I = intensidade de luz espalhada.

R_g = raio de giro da partícula.

$q = (4\pi n_0 / \lambda_0) \sin(\theta/2)$ (vetor de espalhamento)

n_0 = índice de refração do meio solvente.

λ_0 = comprimento de onda do feixe de luz incidente no vácuo.

θ = ângulo de observação da luz espalhada.

De acordo com a equação (4.6), a curva da intensidade de luz espalhada em função do ângulo de observação pode ser construída em escala semi-logarítmica ($\ln(q) \times q^2$), e o R_g pode ser obtido a partir da inclinação da curva.

4.1.4 Obtenção do raio hidrodinâmico (R_h) das partículas por PCS (BROWN, 1993)

No PCS, consideram-se as flutuações de intensidade e as distribuições de frequência originadas da difusão translacional das partículas em solução. Quando as amostras contem uma distribuição de partículas de diferentes tamanhos a função obtida a partir das flutuações de luz espalhada no tempo esta relacionada a uma integral de Laplace do tipo descrita pela equação (4.7).

$$g_1(t) = \int w(\Gamma) \exp(-\Gamma t) d\Gamma \quad (4.7)$$

Onde: t= tempo.

$w(\Gamma)$ = função de distribuição das taxas de relaxação.

Sendo que a função realmente medida está relacionada à equação 4.7 através da relação de Siegert (equação 4.8).

$$g_2(t) = B \left(1 + \beta |g_1(t)|^2 \right) \quad (4.8)$$

Onde: B= linha de base da função de correlação.

β = constante ótica.

Relacionando-se Γ com o ângulo (θ), pode-se determinar o coeficiente de difusão translacional (D_T) das partículas em solução conforme equação (4.9).

$$D_T = \frac{\Gamma}{q^2} \quad (4.9)$$

Sendo “ q ” o vetor de espalhamento, representado pela equação (4.10), que pode ser relacionado com as dimensões do objeto observado.

$$q = \left(\frac{4\pi x}{\lambda_0} \right) \text{sen} \left(\frac{\theta}{2} \right) \quad (4.10)$$

Onde: $x = n_0$ (índice de refração do meio solvente)

Extrapolando-se D_T para ângulo (θ) e concentração (c) zero, obtém-se o valor do coeficiente de difusão a diluição infinita (D_o) através da equação (4.11).

$$D_c = D_o (1 + k_D c) \quad (4.11)$$

Onde: D_c = coeficiente de difusão a ângulo zero

k_D = coeficiente de difusão virial

Este, quando relacionado com a temperatura (T) e a viscosidade (η_o) do solvente, permite o cálculo do raio hidrodinâmico (R_h) das espécies em solução, através da utilização da relação de Stokes-Einstein (equação 4.12).

$$D_o = \frac{k_B T}{6\pi\eta_o R_h} \quad (4.12)$$

Por fim, relacionando os valores de R_g , obtido pelo SLS, e R_h , obtido pelos experimentos de PCS, pode-se calcular o valor de P (equação 4.13), que está associado à forma da partícula em suspensão.

$$P = \frac{R_g}{R_h} \quad (4.13)$$

4.1.5 Determinação da polidispersão das partículas (BROWN, 1993)

Outro parâmetro de interesse, determinado através de PCS, é a polidispersão das partículas que compõem os sistemas. A polidispersão é uma medida relativa da intensidade de luz espalhada em função da distribuição do coeficiente de difusão translacional (D_T), ou seja, é dependente do tamanho das partículas, e pode ser expressa conforme a equação (4.14).

$$\text{Polidispersão} = \frac{\left(\overline{D_T^2}\right) - \left(\overline{D_T}\right)^2}{\left(\overline{D_T}\right)^2} \quad (4.14)$$

Se a amostra é monodispersa a polidispersão é igual ou menor a 0,02, acima deste valor a distribuição do tamanho das partículas não é considerada estreita.

4.2 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Além das técnicas de Espalhamento de luz (SLS e PCS) foi utilizada, também, a técnica de Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) na caracterização das nanopartículas.

No espalhamento de raios-X utilizam-se raios de alta energia com comprimentos de onda na ordem de 1,5 Å, compatíveis com as dimensões atômicas. A radiação interage diretamente com os elétrons fornecendo informações sobre a organização da densidade eletrônica da estrutura que esta sendo investigada (PEREIRA, 2004; DAVIDSON, 1996).

O espalhamento de raios-X é caracterizado pela amplitude de onda e pelas fases dos diferentes comprimentos de onda. A amplitude é diretamente proporcional a densidade eletrônica local, ou seja, depende da distribuição espacial dos átomos na amostra, enquanto que, a fase depende da localização relativa dos átomos na estrutura. Desta forma obtém-se a ordem translacional presente na amostra (MERTINS, 2004; BOUWSTRA *et al.*, 1993).

Quando o material é perfeitamente organizado em nível atômico, como, por exemplo, um cristal, os perfis de difração (reflexões de Bragg) são altamente definidos, neste caso há espalhamento cooperativo onde todas as unidades espalhantes estão em fase. Tratando-se de uma estrutura molecular desorganizada, em sistemas com um grau de ordem menor, o espalhamento torna-se menos intenso e difuso, desta forma abrange uma ampla faixa angular (PEREIRA, 2004; DAVIDSON, 1996).

A intensidade espalhada pode ser assumida como uma função do vetor de espalhamento (q) (equação 4.10), sendo $x=1$, que representa a mudança no vetor de onda do feixe espalhado.

Como no Espalhamento de luz, no Espalhamento de raios-X o vetor de espalhamento está relacionado com as dimensões do objeto observado. Para o Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) as informações obtidas estão relacionadas com dimensões estruturais significativamente maiores do que as dimensões atômicas. Portanto, o domínio típico para esta técnica compreende valores de “ q ” inferiores a $0,1 \text{ \AA}^{-1}$ ($\theta \cong 1^\circ$) (MERTINS, 2004; PEREIRA, 2004).

Uma equação equivalente à lei de Bragg pode ser escrita como:

$$q = n \left(\frac{2\pi}{d} \right) \quad (4.15)$$

Onde: n = número inteiro.

d = separação entre dois planos espalhantes.

Para uma série de planos igualmente espaçados, a intensidade espalhada ($I(q)$) é quase sempre zero, exceto quando a lei de Bragg é

satisfeita. Neste caso, o perfil de difração consiste de uma série de picos igualmente espaçados a uma distância que pode ser definida pela equação 4.16 (DEMUS *et al.*, 1998).

$$d = \frac{2\pi}{q} \quad (4.16)$$

Sendo assim, análises de SAXS podem fornecer informações a cerca das estruturas moleculares em sistemas coloidais como a organização de seus componentes e sua composição cristalina e amorfa, podendo, desta forma, auxiliar na proposição de modelos para as nanopartículas estudadas neste trabalho.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Matérias-primas e solventes

- Indometacina (Sigma - St. Louis, EUA)
- Monoestearato de sorbitano (Span 60[®]) (Delaware - Porto Alegre)
- Polissorbato 80 (Tween 80[®]) (Delaware - Porto Alegre)
- Triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico:
 - Miglyol[®] 810 (Hulls - Puteaux, França)
 - (Brasquim - Porto Alegre)
- Poli(ϵ -caprolactona) $\overline{M}_w = 60000$ (Aldrich - Strasbourg, França)
- Acetona (grau analítico, p.a) (Nuclear - São Paulo e Quimex - Porto Alegre)
- Acetonitrila (grau CLAE) (Merck - Alemanha)
- Ácido acético glacial (grau analítico, p.a) (Merck - Alemanha)
- Água Milli-Q (Destilador/deionizador Milli-Q[®])

5.2 Equipamentos

- Espectrômetro de correlação de fótons (Central analítica - Instituto de Química - UFRGS) (Figura 5.1):
 - Fonte de luz laser: íons He-Ne, 35Mw, $\lambda_0 = 632,8$ nm: Spectra-Physics (California, EUA) e Coherent (California, EUA).

- Goniômetro: BI-200M, versão 2.0 (Brookhaven Instruments - New York, EUA)
- Correlacionador digital: BI-9000AT (Brookhaven Instruments - New York, EUA)
- Detector: BI9863 (Brookhaven Instruments - New York, EUA)

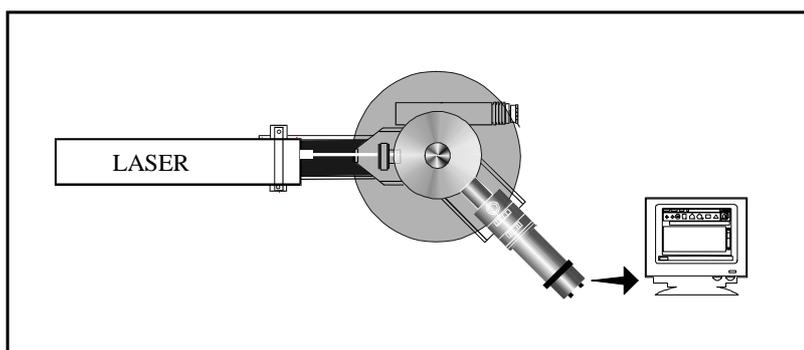


Figura 5.1: Espectrômetro de correlação de fótons.

- Evaporador rotatório R-114 (Büchi - Alemanha)
- Bomba de vácuo V-500 (Büchi Vac[®] - Alemanha)
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Central analítica – Faculdade de Farmácia - UFRGS)
 - Bomba S-200 (Perkin-Elmer - EUA)
 - Injetor S-200 (Perkin-Elmer - EUA)
 - Pré-coluna Lichosorb RP-18 (Merck - Alemanha)
 - Coluna Nova-Pak C₁₈, 150 mm, 3,9 mm, 4 μm (Waters – EUA)
 - Detector UV-Visível S-200 (Perkin-Elmer - EUA)
- Potenciômetro DM-20 (Digimed - São Paulo)

- Microscópio ótico de luz polarizada BX-41 (Olympus - Japão)
- As medidas de SAXS foram realizadas na linha D11A do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, São Paulo.
 - Comprimento de onda do raio incidente igual a 1,605 Å.
 - Detector linear (Princeton Instruments).

5.3 Obtenção das suspensões de nanopartículas

As suspensões foram preparadas pelo método de nanoprecipitação (NPPT) descrito por FESSI e colaboradores (1988). Para uma formulação de nanocápsulas (NC) a fase orgânica deve ser constituída de um polímero (poli(ϵ -caprolactona)), um tensoativo de baixo EHL (monoesterato de sorbitano), um óleo (triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico) e um fármaco com características lipofílicas (indometacina) dissolvidos num solvente orgânico (acetona), sendo que a fase aquosa deve ser composta de um tensoativo de elevado EHL (polissorbato 80) e água. Após a dissolução completa dos componentes em cada fase, a fase orgânica é vertida, lentamente, através de um funil sobre a fase aquosa, que deve ser mantida sob agitação moderada e temperatura ambiente, ocorre então a nanoprecipitação. Após, a suspensão é concentrada em evaporador rotatório para a eliminação da acetona e para ajuste do volume final (Figura 5.2).

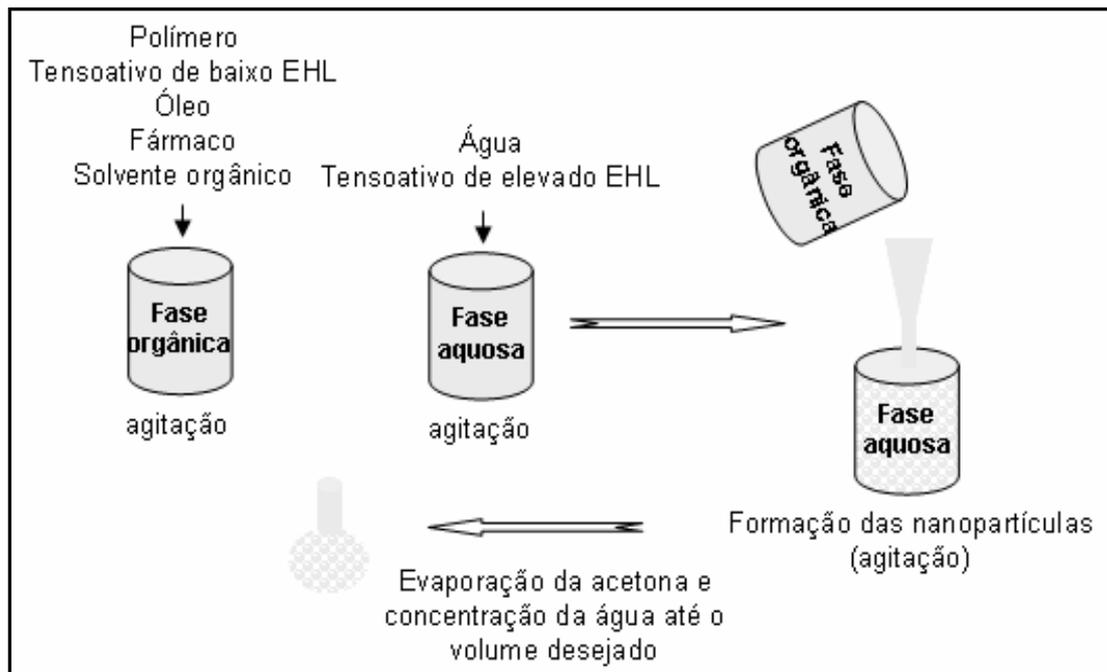


Figura 5.2: Metodologia de preparo das nanopartículas.

Formulações de diferentes composições foram utilizadas para os diferentes estudos ao longo do trabalho (Tabelas 5.1 a 5.3), porém para todas foram mantidos constantes os volumes utilizados de acetona (54 mL) e água (106 mL) e as concentrações de tensoativos (7,7 mg/mL). O volume final das suspensões após evaporação foi de 10 mL.

Tabela 5.1: Composição das formulações utilizadas no estudo de estabilidade e caracterização físico-química de suspensões de nanopartículas.

Formulação	poli(ϵ -caprolactona) (mg/mL)	Triglicerídeos (mL/mL)	Indometacina (mg/mL)
NC ⁰	10	0,033	-
NC ¹	10	0,033	1
NC ^{1a}	10	0,033	1
NC ³	10	0,033	3
NS ⁰	10	-	-
NE ⁰	-	0,033	-

^a Formulação NC¹ tratada termicamente conforme o item 5.4.

Tabela 5.2: Composição das formulações utilizadas para a investigação da presença de cristais de fármaco em suspensão*.

Formulação	poli(ϵ -caprolactona) (mg/mL)	Triglicerídeos (mL/mL)	Indometacina (mg/mL)
NC ⁰	10	0,033	-
NC ¹	10	0,033	1
NC ³	10	0,033	3
ND ⁰	-	-	-
ND ¹	-	-	1

* Nas formulações de ND o componente oleoso, assim como o polímero são omitidos, tendo como resultado uma dispersão de tensoativos contendo ou não fármaco.

Tabela 5.3: Formulações utilizadas para as análises de SAXS.

Formulação	poli(ϵ -caprolactona) (mg/mL)	Triglicerídeos (mL/mL)	Indometacina (mg/mL)
NC ⁰	10	0,033	-
NC ¹	10	0,033	1
NC ³	10	0,033	3
NS ⁰	10	-	-
NS ¹	10	-	1
NS ³	10	-	3
NS ^{0b}	10	-	-
ND ⁰	-	-	-
ND ¹	-	-	1
ND ³	-	-	3
NE ⁰	-	0,033	-
NC ⁰ 80	8	0,033	-
NC ⁰ 60	6	0,033	-
NC ⁰ 40	4	0,033	-
NC ⁰ 20	2	0,033	-
NC ¹ 80	8	0,033	1
NC ¹ 60	6	0,033	1
NC ¹ 40	4	0,033	1
NC ¹ 20	2	0,033	1

^b Formulação de NS preparada na ausência do tensoativo monoestearato de sorbitano.

5.4 Tratamento térmico aplicado às nanopartículas

Para a verificação da hipótese de relaxação das cadeias poliméricas, uma fração das formulações de NC¹ foi submetida a um tratamento térmico que deve acelerar este processo de relaxação.

O tratamento térmico foi realizado em banho a 40 °C num balão de fundo redondo, ao balão foi acoplado um condensador de refluxo. As amostras foram mantidas no banho por um período de 3h e em agitação constante conforme a Figura 5.3. Esse tratamento resultou na amostra NC^{1a}.

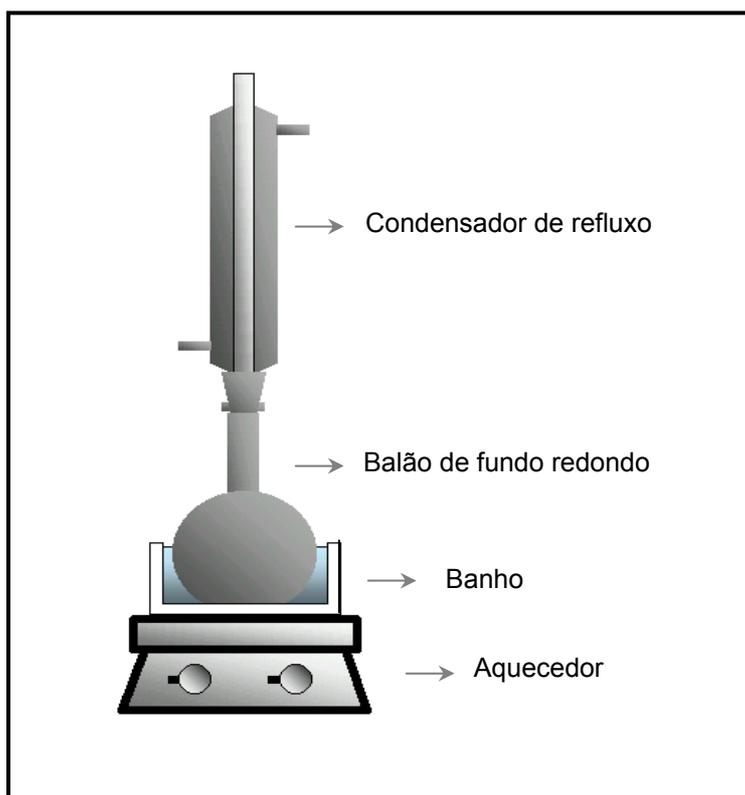


Figura 5.3: Tratamento térmico aplicado às nanopartículas.

5.5 Parâmetros das medidas de espalhamento de luz

Para a realização das medidas de PCS e SLS as suspensões de nanopartículas foram diluídas com água (Milli-Q[®]) de 500 a 10000 vezes conforme segue: as suspensões originais foram diluídas 10 vezes (1 mL da suspensão original diluída em balão volumétrico de 10 mL) fornecendo as correspondentes suspensões "Y" que foram novamente diluídas numa faixa de

dez diluições (A-J): A: 1 mL de “Y” diluído em balão volumétrico a 50 mL; B: 0,77 mL de “Y” a 50 mL; C: 0,59 mL de “Y” a 50 mL; D: 0,5 mL de “Y” a 50 mL; E: 0,33 mL de “Y” a 50 mL; F: 5 mL de D a 10 mL; G: 3 mL de D a 10 mL; H: 2 mL de D a 10 mL; I: 1,34 mL de D a 10 mL; J: 1 mL de D a 10 mL.

Diluições distintas foram utilizadas para os diferentes estudos, portanto temos:

A) Diluições utilizadas no estudo de estabilidade e caracterização físico-química das suspensões de nanopartículas.

Para a verificação de características físico-químicas, como grau de despolarização da luz espalhada (ρ), diâmetro médio e polidispersão das nanopartículas, foram utilizadas as diluições A, B, C, D, F, G, e H, estas amostras foram filtradas através de membrana Millipore[®] (0,45 μm) diretamente dentro de células óticas para assegurar ausência de poeira.

Para a determinação do raio de giro (R_g) foram utilizadas as diluições G, I e J, sendo que estas também foram filtradas através de membrana Millipore[®] (0,45 μm) diretamente dentro das células óticas.

B) Diluições utilizadas para a investigação da presença de cristais de fármaco em suspensão.

Para a avaliação da possível presença de cristais formados pela agregação do fármaco, foram utilizadas as diluições A, D, E e H, estas amostras tiveram apenas o meio de diluição (água Milli-Q) filtrado através de membrana Millipore[®] (0,22 μm), este procedimento assegurou que nenhuma partícula existente na suspensão ficasse retida no filtro, o que ocasionaria resultados equivocados.

Os ângulos de observação da luz espalhada (θ) na determinação do R_g foram 40°, 45°, 60°, 75°, 90°, 105°, 120°, 135° e 145°. As demais medidas de espalhamento de luz, tanto SLS quanto PCS, foram realizadas a $\theta = 90^\circ$. Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente.

5.6 Parâmetros das medidas de SAXS

Para as medidas de SAXS as amostras não sofreram diluição. Estas foram introduzidas em porta-amostra de aço inoxidável de aproximadamente 0,5 mL com janelas de mica e termostatizadas a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, após, foram submetidas à exposição de raios-X por cerca de 10 min. A distância amostra-detector foi ajustada em 43,5 cm, correspondendo a uma região de “ q ” entre 0,01 e $0,4\text{ \AA}^{-1}$. Beonato de prata foi utilizado para a calibração do equipamento. As intensidades foram corrigidas com relação à resposta do detector, aos sinais de corrente escura, bem como para a transmissão da amostra e o espalhamento de fundo.

5.7 Parâmetros das medidas de CLAE

Para a determinação do teor de indometacina as formulações foram mantidas em repouso e destas foram coletadas 100 μL de amostra, os quais foram retirados do núcleo da suspensão. As amostras foram dissolvidas com acetronitrila a 10 mL em balão volumétrico. Posteriormente estas soluções foram filtradas através de membrana Millipore[®] (0,22 μm).

A fase móvel foi constituída de acetronitrila:água na proporção 70:30 e teve pH ajustado para 5 com ácido acético 10%. A velocidade de eluição da fase móvel foi de 0,7 mL/min. O volume de injeção das amostras, assim como da curva de calibração, foi de 20 μL .

A detecção da indometacina foi realizada em UV-Visível, em $\lambda = 267\text{ nm}$, sendo que os demais componentes da formulação não absorvem nesta região do espectro de UV.

5.8 Preparo das amostras para microscopia ótica

As amostras, sem diluição, foram preparadas por deposição das mesmas sobre lâminas de vidro previamente limpas com acetona, sobre cada amostra foi depositado uma lamínula de vidro.

As análises de microscopia foram realizadas com o auxílio de um polarizador de luz.

5.9 Determinação do ponto de fusão

Foi determinado o ponto de fusão do precipitado presente na suspensão ND³. Para tal, o precipitado foi coletado através de filtração e mantido em dessecador por 24 horas. Após foi realizada a determinação do ponto de fusão através de placa aquecida. Para isso, uma pequena quantidade do precipitado seco foi depositada sobre lâmina de vidro e sobre esta foi depositada uma lamínula de vidro, em seguida, foi realizado aquecimento da placa até a temperatura de 160 °C.

5.10 Análise estatística

Os dados obtidos para pH e quantificação de fármaco foram analisados estatisticamente através análise de variância (ANOVA) e teste-*t*. O nível de significância considerado foi de 0,05.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização e avaliação da estabilidade físico-química das suspensões de nanopartículas

6.1.1 Verificação da hipótese de relaxação das cadeias poliméricas

Para verificar a hipótese de relaxação das cadeias poliméricas em suspensão de nanopartículas, formulações de NC contendo fármaco, que passaram ou não por tratamento térmico, NC¹ e NC^{1a}, respectivamente, foram analisadas quanto ao pH e grau de despolarização da luz espalhada (ρ) em função de tempo de armazenagem. Os valores de pH para estas formulações encontram-se na Figura 6.1.

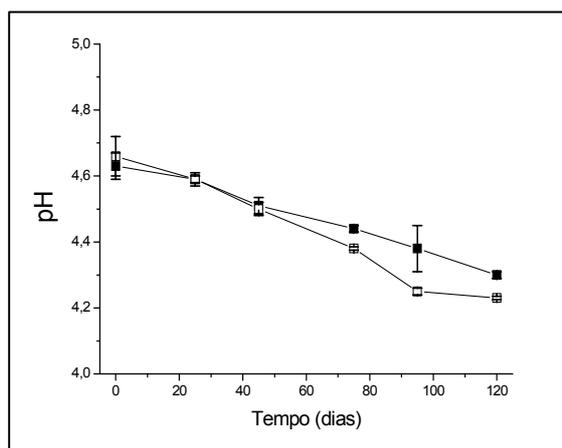


Figura 6.1: Gráfico de pH em função do tempo de armazenagem. (■) NC¹; (□) NC^{1a}.

Não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores de pH obtidos para as NC que passaram ou não tratamento térmico.

Em relação ao tempo de armazenagem, os valores de pH de ambas as suspensões diminuíram significativamente ($p < 0,05$) após 45 dias de armazenagem. Para a NC¹ o valor inicial de pH foi de $4,63 \pm 0,04$, e passou a $4,51 \pm 0,03$, após 45 dias. Para a NC^{1a} o valor inicial de pH foi de $4,66 \pm 0,06$ e, após 45 dias, passou para $4,50 \pm 0,02$. Os valores de pH continuaram

diminuindo significativamente ($p < 0,05$), para ambas as formulações. Com 120 dias de armazenagem a NC¹ apresentou pH de $4,30 \pm 0,01$ e a formulação que passou por tratamento térmico (NC^{1a}) apresentou pH de $4,23 \pm 0,01$. Estes dados corroboram com dados de pH descritos na literatura para sistemas contendo poli(ϵ -caprolactona) (SCHAFFAZICK, 2001; WEISS, 2001; CALVO *et al.*, 1996).

Através das medidas de SLS obtiveram-se os valores de lvv e lvh em função da concentração de polissorbato 80 para as suspensões NC¹ e NC^{1a}. Com a utilização dos valores médios de lvv e lvh calculou-se ρ , através da equação (1), para cada concentração.

Visto que a concentração de nanopartículas em suspensão não é conhecida, optou-se por calcular a concentração das amostras em função da concentração de polissorbato 80, por este ser um componente presente em todas as formulações utilizadas para este estudo.

Nas Figuras 6.2 e 6.3 encontram-se os gráficos de ρ em função da concentração de polissorbato 80 para as formulações NC¹ e NC^{1a}, respectivamente. As medidas foram realizadas nas formulações logo após o processo de nanoprecipitação (NPPT) e com até 120 dias de armazenagem.

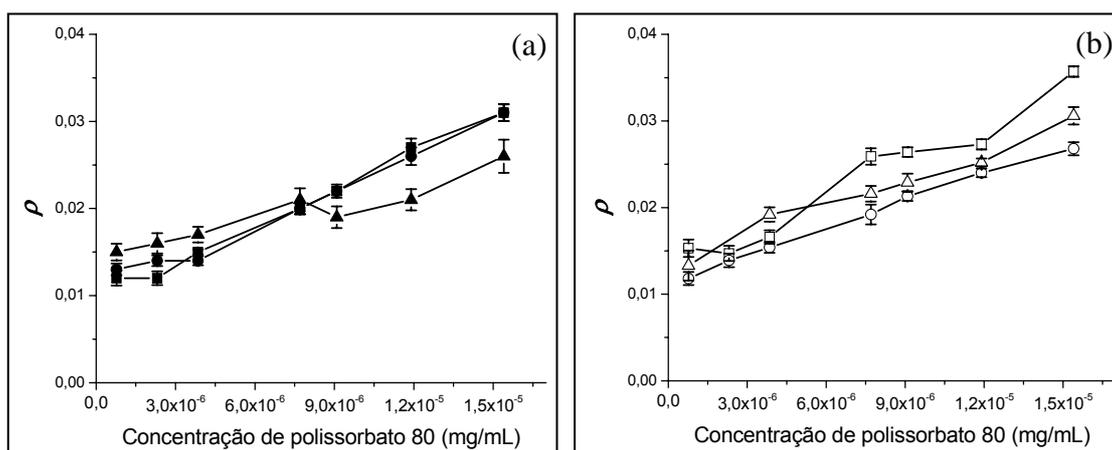


Figura 6.2: Gráficos do grau de despolarização da luz espalhada (ρ), em função da concentração de polissorbato 80, ao longo de 120 dias para NC¹. (a) (■) logo após NPPT; (●) após 25 dias de armazenagem; (▲) após 45 dias. (b) (□) após 70 dias de armazenagem; (○) após 95 dias; (△) após 120 dias.

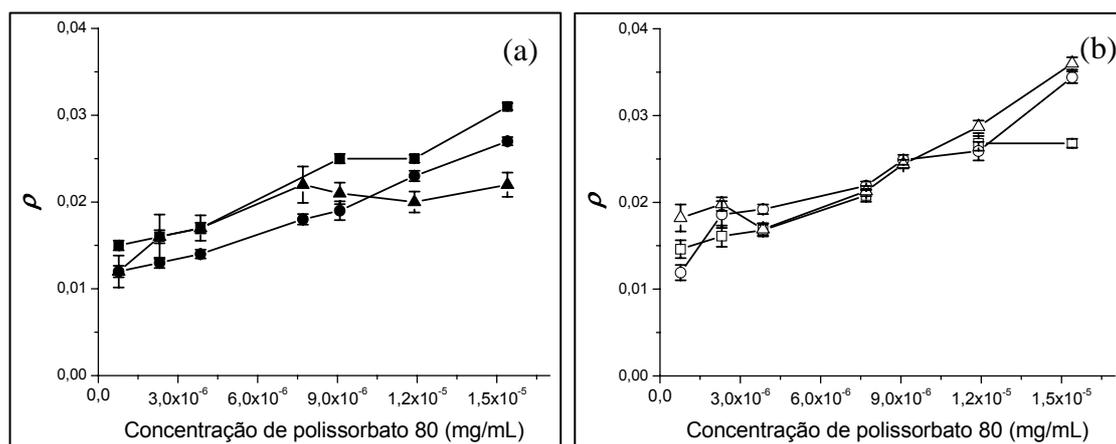


Figura 6.3: Gráficos do grau de despolarização da luz espalhada (ρ), em função da concentração de polissorbat 80, ao longo de 120 dias para NC^{1a}. (a) (■) logo após NPPT; (●) após 25 dias de armazenagem; (▲) após 45 dias. (b) (□) após 70 dias de armazenagem; (○) após 95 dias; (△) após 120 dias.

Para a interpretação correta dos valores de ρ estes foram extrapolados para concentração zero ($\rho_{c \rightarrow 0}$) e encontram-se na Tabela 6.1.

Tabela 6.1: Valores de $\rho_{c \rightarrow 0}$ para NC¹ e NC^{1a} em diferentes tempos de armazenagem.

Tempo de armazenagem	$\rho_{c \rightarrow 0}$ para NC ¹	$\rho_{c \rightarrow 0}$ para NC ^{1a}
Logo após NPPT	$0,01362 \pm 1,0 \times 10^{-3}$	$0,00972 \pm 3,9 \times 10^{-4}$
Após 25 dias	$0,01035 \pm 3,7 \times 10^{-4}$	$0,01051 \pm 7,5 \times 10^{-4}$
Após 45 dias	$0,01449 \pm 1,5 \times 10^{-3}$	$0,01455 \pm 6,5 \times 10^{-4}$
Após 70 dias	$0,01402 \pm 9,9 \times 10^{-4}$	$0,01234 \pm 1,5 \times 10^{-3}$
Após 95 dias	$0,01262 \pm 1,3 \times 10^{-3}$	$0,01141 \pm 3,0 \times 10^{-4}$
Após 120 dias	$0,01321 \pm 2,0 \times 10^{-3}$	$0,01441 \pm 1,2 \times 10^{-3}$

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores de $\rho_{c \rightarrow 0}$ obtidos para a formulação de NC que passou ou não por tratamento térmico (NC^{1a} e NC¹, respectivamente). Com relação ao tempo de armazenagem a NC¹ mantém os valores de $\rho_{c \rightarrow 0}$ em torno de 0,013, enquanto que a NC^{1a} mantém o

$\rho_{c \rightarrow 0}$ em torno de 0,012. Sendo assim, as nanopartículas estudadas não devem sofrer alterações estruturais importantes, como a relaxação das cadeias poliméricas em função do tempo ou tratamento térmico.

Considerando que os valores de pH, assim como, os valores de $\rho_{c \rightarrow 0}$ determinados para as NC que passaram ou não pelo tratamento térmico, não diferiram significativamente ($p > 0,05$), concluiu-se que não há relaxação das cadeias poliméricas envolvidas na diminuição do pH segundo o tempo para formulações de NC contendo poli(ϵ -caprolactona) como polímero.

Como visto na Tabela 6.1, as formulações de NC contendo fármaco (NC¹) apresentaram $\rho_{c \rightarrow 0}$ inferiores a 0,015, mesmo após 120 dias de armazenagem. Estes valores são compatíveis com valores característicos de espécies praticamente isotrópicas, como se espera para partículas esféricas. O fato de se ter determinado certo grau de anisotropia ($> 0,015$) deveu-se ao movimento das partículas que estão em suspensão, ocasionando uma leve despolarização de luz.

A presença de cristais de fármaco em suspensão poderia causar alterações no grau de anisotropia das formulações de NC, visto a presença de diferentes partículas (cristais e nanocápsulas) no meio dispersante, sendo assim, o $\rho_{c \rightarrow 0}$ foi investigado para uma suspensão de NC com excesso de fármaco.

6.1.2 Determinação do grau de despolarização da luz espalhada (ρ) para NC com excesso de fármaco

Com o intuito de verificar se o excesso de fármaco provocaria alterações na anisotropia do sistema, decorrente da presença de nanocristais de fármaco em suspensão estabilizados por tensoativos, como proposto por GUTERRES e colaboradores (1995), uma formulação de NC contendo 3 mg/mL de indometacina (NC³) foi avaliada quanto as suas características anisotrópicas.

Esta formulação foi avaliada somente até 14 dias de armazenagem, pois, apresentou baixa estabilidade física, constatada pela presença de precipitado com cerca de 10 dias de armazenagem. O gráfico de ρ em função da concentração de polissorbato 80 pode ser visualizado na Figura 6.4.

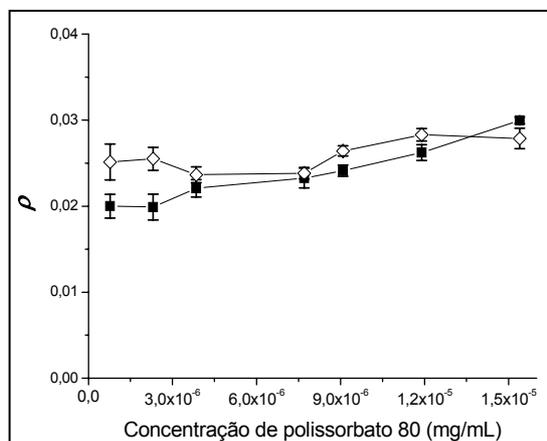


Figura 6.4: Gráficos do grau de despolarização da luz espalhada (ρ) em função da concentração de polissorbato 80 para NC³. (■) logo após NPPT; (◇) após 14 dias de armazenagem.

O valor determinado para $\rho_{c \rightarrow 0}$ logo após o preparo da NC³ foi de $0,01821 \pm 7,61 \times 10^{-4}$ e após 14 dias de armazenagem o valor determinado foi de $0,02265 \pm 1,39 \times 10^{-4}$. Estes valores demonstraram que a presença de fármaco em excesso causou um leve aumento da anisotropia. Este aumento pôde ter sido provocado pela presença de nanocristais de fármaco em suspensão estabilizados por tensoativos.

Para controle do estudo, o $\rho_{c \rightarrow 0}$ foi determinado para uma formulação de NC sem fármaco (NC⁰). O gráfico de ρ em função da concentração de polissorbato 80 pode ser visualizado na Figura 6.5.

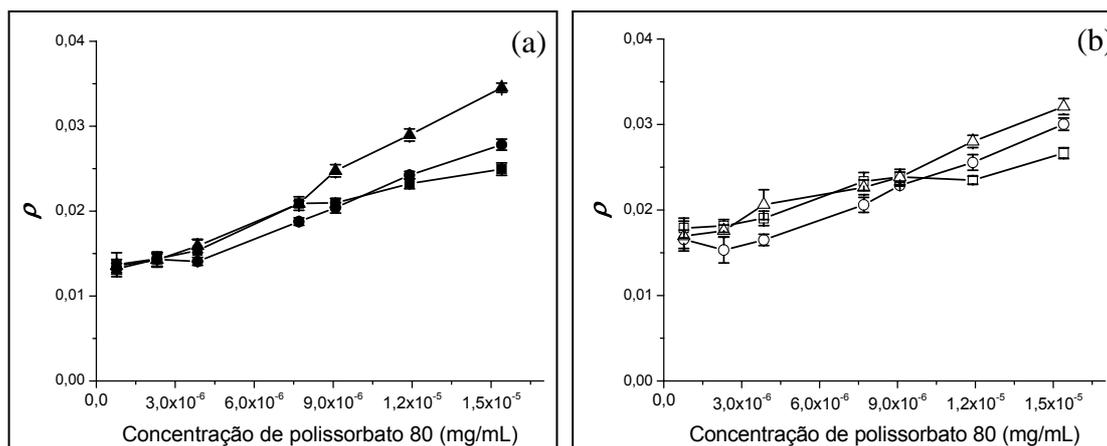


Figura 6.5: Gráficos do grau de despolarização da luz espalhada (ρ), em função da concentração de polissorbato 80, ao longo de 120 dias para NC^0 . (a) (■) logo após NPPT; (●) após 25 dias de armazenagem; (▲) após 45 dias. (b) (□) após 70 dias armazenagem; (○) após 95 dias; (△) após 120 dias.

A Tabela 6.2 apresenta os valores de ρ obtidos para NC^0 , extrapolados para concentração zero ($\rho_{c \rightarrow 0}$).

Tabela 6.2: Valores de $\rho_{c \rightarrow 0}$ para NC^0 em diferentes tempos de armazenagem.

Tempo de armazenagem	$\rho_{c \rightarrow 0}$ para NC^0
Logo após NPPT	$0,01296 \pm 6,6 \times 10^{-4}$
Após 25 dias	$0,01092 \pm 6,9 \times 10^{-4}$
Após 45 dias	$0,01015 \pm 1,0 \times 10^{-3}$
Após 70 dias	$0,01421 \pm 6,2 \times 10^{-4}$
Após 95 dias	$0,01327 \pm 7,8 \times 10^{-4}$
Após 120 dias	$0,01493 \pm 6,4 \times 10^{-4}$

Assim como para a NC^1 , os valores $\rho_{c \rightarrow 0}$ para a formulação NC^0 encontraram-se abaixo de 0,015, mesmo transcorrido o período de armazenagem, caracterizando espécies esféricas. Estes resultados comprovaram que a presença de indometacina na concentração de 1 mg/mL não provocou alterações no formato das nanopartículas em suspensão e que,

de fato, o aumento observado de $\rho_{c \rightarrow 0}$ para a NC^3 seria decorrente do excesso de fármaco que está presente em suspensão na forma de nanocristais.

Para evidenciar se a ausência de núcleo oleoso ou de polímero nas formulações alteraria o formato das nanopartículas, foi determinado o $\rho_{c \rightarrow 0}$ para uma formulação de NS^0 (ausência do componente oleoso) e de NE^0 (ausência do polímero).

6.1.3 Determinação do grau de despolarização da luz espalhada (ρ) para NS^0 e NE^0

Por motivos de comparação entre os diferentes sistemas nanocarreadores, foi determinado o ρ para as formulações NS^0 e NE^0 . Os gráficos de ρ em função da concentração de polissorbato 80 para estas formulações estão representados na Figura 6.6.

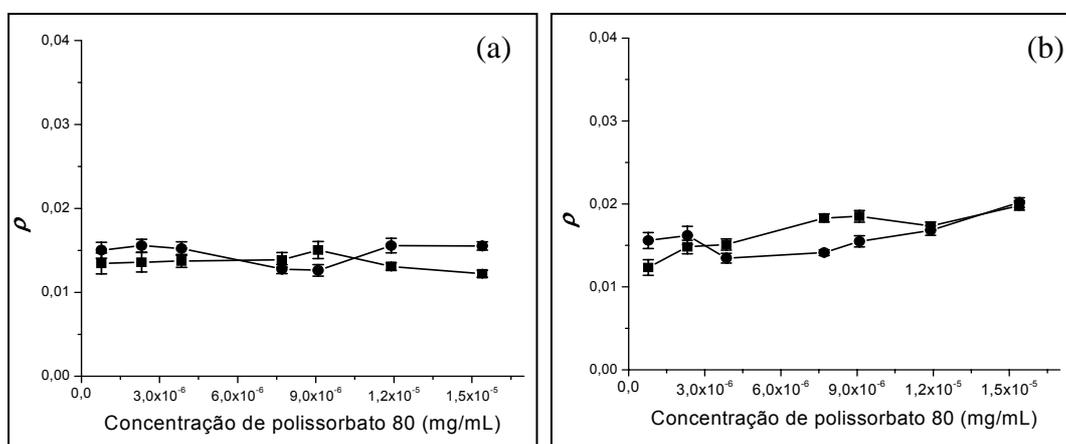


Figura 6.6: Gráficos do grau de despolarização da luz espalhada (ρ) em função da concentração de polissorbato 80 para (a) NS^0 e (b) NE^0 . (■) logo após NPPT; (●) após 25 dias de armazenagem.

Os valores de $\rho_{c \rightarrow 0}$ para as formulações NS^0 e NE^0 encontram-se na Tabela 6.3.

Tabela 6.3: Valores de $\rho_{c \rightarrow 0}$ para NS^0 e NE^0 em diferentes tempos de armazenagem.

Tempo de armazenagem	$\rho_{c \rightarrow 0}$ para NS^0	$\rho_{c \rightarrow 0}$ para NE^0
Logo após NPPT	$0,01442 \pm 6,1 \times 10^{-4}$	$0,01398 \pm 1,0 \times 10^{-3}$
Após 25 dias	$0,01409 \pm 1,2 \times 10^{-3}$	$0,01211 \pm 1,4 \times 10^{-3}$

Quando comparados os valores de $\rho_{c \rightarrow 0}$ obtidos para as formulações NS^0 e NE^0 com os valores obtidos para a NC^0 , pode-se verificar que não ocorreu modificação no grau de anisotropia quando da ausência de polímero, no caso da NE^0 , ou núcleo oleoso, no caso da NS^0 . As espécies permaneceram com valores de $\rho_{c \rightarrow 0}$ inferiores a 0,015, logo consistem de sistemas esféricos.

Outra maneira de se acessar o formato de partículas em suspensão é através da razão entre o raio de giro (R_g), obtido por experimento de SLS, e o raio hidrodinâmico (R_h), obtido por experimentos de PCS. Esta razão foi determinada para a NC^0 .

6.1.4 Determinação do razão R_g/R_h

O R_g foi determinado através da dissimetria da intensidade de luz espalhada no SLS para uma formulação NC^0 . Na Figura 6.7 encontra-se o gráfico da dissimetria ($d(\theta)$) versus co-seno do ângulo ($\cos(\theta)$). Os ângulos de medida menores (40° e 45°) e maiores (135° e 145°) foram excluídos devido à dependência angular apresentada pela amostra decorrente do tamanho da partícula, o que resulta em excesso de luz espalhada.

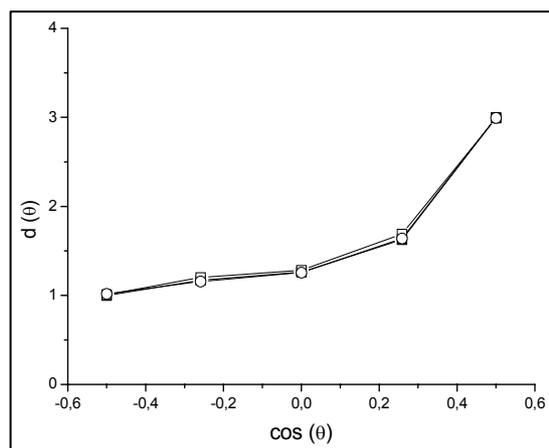


Figura 6.7: Gráfico da dissimetria ($d(\theta)$) versus co-seno do ângulo ($\cos(\theta)$) para NC^0 em diferentes diluições. (■) diluição G; (□) diluição I; (○) diluição J.

Visto que não existiu diferença significativa ($p > 0,05$) da dissimetria para as diferentes diluições, o R_g foi calculado para a diluição “G”, de acordo com a equação 4.5. O valor encontrado para o R_g foi de 87 ± 15 nm.

O R_h para a NC^0 foi determinado a ângulo de observação de 90° . Os valores obtidos foram de 122 ± 28 nm para a diluição “G”, 118 ± 21 nm para a diluição “I” e 125 ± 27 nm para a diluição “J”.

Sendo assim, utilizando os valores de R_g e R_h obtidos para a diluição “G”, o valor calculado de P (equação 4.12) para a NC^0 foi de $0,71 \pm 0,27$. De acordo com BERNE e PECORA (1974) e SCHIMITZ (1990) este valor encontra-se próximo a valores de P esperados para partículas esféricas, que é de 0,80.

Porém, a exclusão dos ângulos 40° , 45° , 135° e 145° , em decorrência da dependência angular apresentada pela amostra, e a baixa correlação entre os pontos do gráfico da Figura 6.7 ($r = 0,86775$), fizeram com que o erro associado à determinação do R_g fosse muito elevado.

Optou-se então, por tratar os dados de acordo com o formalismo de Guinier (item 4.1.3.2). Porém, os ângulos de medida no SLS não foram suficientemente baixos para permitir tal ajuste.

Considerando que o formato das partículas já foi, satisfatoriamente, determinado através do grau de despolarização da luz espalhada (ρ) e as dificuldades encontradas para a obtenção do R_g , optou-se por não determinar o P para as demais formulações envolvidas neste estudo.

Uma vez determinado o formato das partículas, através do ρ , e visto que este se mantém estável até 120 dias para as NC com ou sem fármaco (NC¹ e NC⁰, respectivamente) e para NC com fármaco que passou por tratamento térmico (NC^{1a}), e até 25 dias de armazenagem para as formulações NS⁰ e NE⁰. Cabe determinar qual o tamanho, distribuição e polidispersão destas partículas ao longo do tempo.

6.1.5 Determinação de diâmetro médio e polidispersão das partículas

Uma maneira simples de monitorar a estabilidade física de suspensões de nanocarreadores é através do acompanhamento do diâmetro e polidispersão destes. Sendo assim, o diâmetro médio aparente e a polidispersão das nanopartículas foram determinados através de medidas de PCS, observando-se a luz espalhada em ângulo de 90°. As análises foram realizadas em diferentes diluições das amostras e em função do tempo de armazenagem. Os resultados para as NC contendo fármaco, que passaram ou não por tratamento térmico (NC^{1a} e NC¹, respectivamente) encontram-se nas Figuras 6.8 e 6.9.

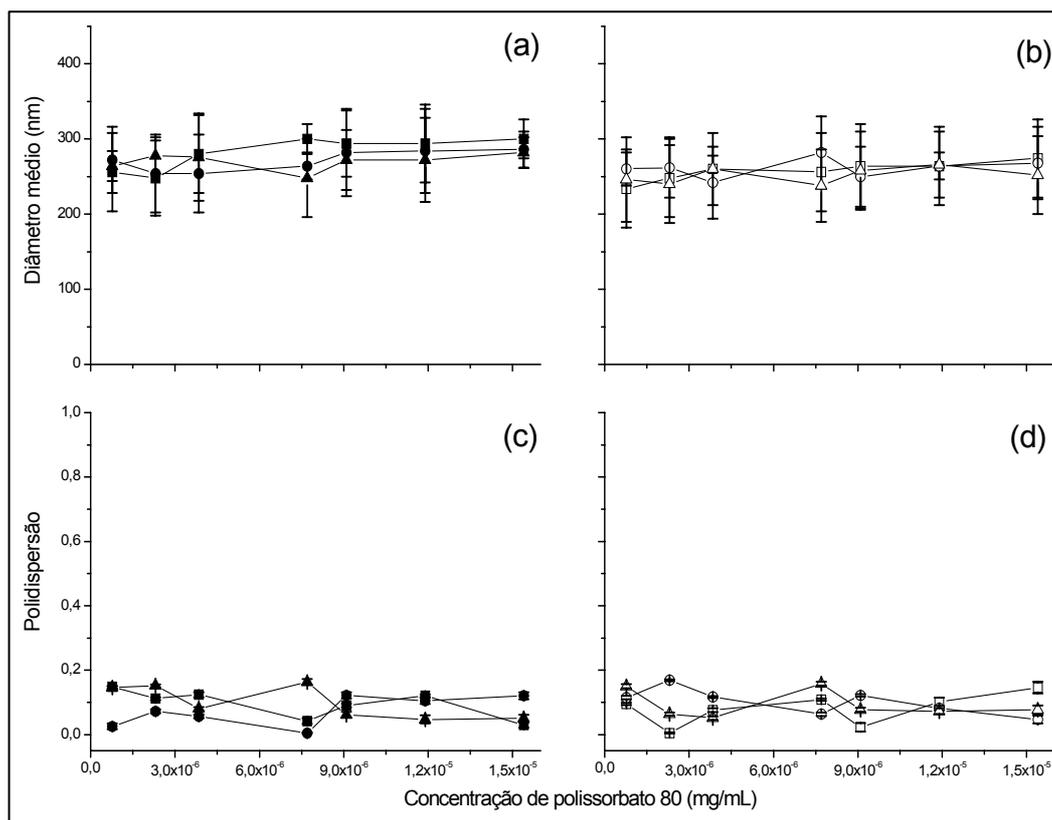


Figura 6.8: Gráficos de diâmetro médio ((a) e (b)) e de polidispersão ((c) e (d)), em diferentes concentrações, em função do tempo de armazenagem para NC¹. (■) logo após NPPT; (●) após 25 dias de armazenagem; (▲) após 45 dias; (□) após 70 dias de armazenagem; (○) após 95 dias; (△) após 120 dias.

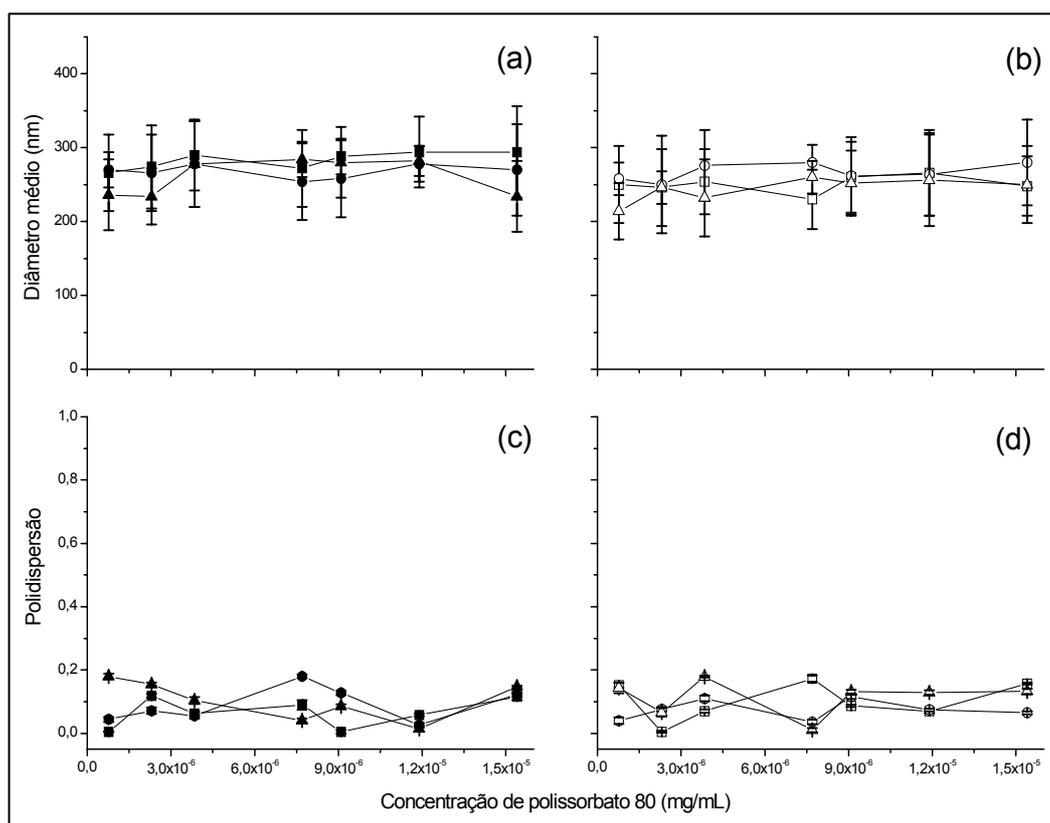


Figura 6.9: Gráficos de diâmetro médio ((a) e (b)) e de polidispersão ((c) e (d)), em diferentes concentrações, em função do tempo de armazenagem para NC^{1a}. (■) logo após NPPT; (●) após 25 dias de armazenagem; (▲) após 45 dias; (□) após 70 dias de armazenagem; (○) após 95 dias; (△) após 120 dias.

Pôde-se observar que não ocorreram alterações no tamanho das nanopartículas para as formulações NC¹ e NC^{1a}, em função do tratamento térmico ou tempo de armazenagem. A distribuição do tamanho de partículas foi unimodal, os gráficos de distribuição de tamanho de partículas, obtidos diretamente dos experimentos de PCS, encontram-se no Anexo 1. Os diâmetros obtidos, para ambas as formulações, situaram-se em torno de 280 ± 20 nm, mesmo transcorridos 120 dias de armazenagem.

Os sistemas NC¹ e NC^{1a} apresentaram polidispersão entre 0,03 e 0,2, portanto, estes sistemas foram considerados polidispersos. Assim como para o diâmetro de partícula, a polidispersão não sofreu alterações devido ao tempo de armazenagem ou tratamento térmico. Observou-se, também, que tanto o diâmetro quanto a polidispersão não são influenciados pelas diluições dos sistemas.

Os resultados de diâmetro médio e polidispersão determinados para a formulação de NC com excesso de fármaco (NC³) encontram-se na Figura 6.10.

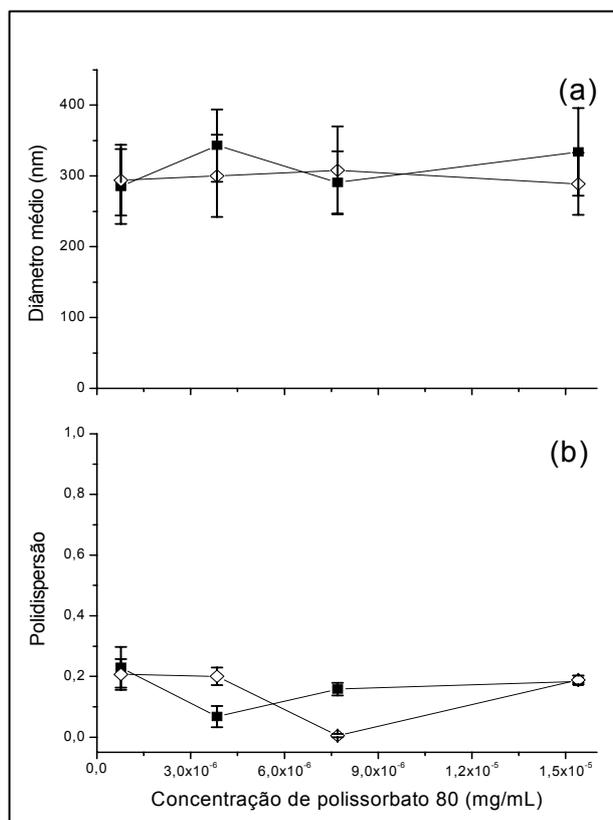


Figura 6.10: Gráficos de diâmetro médio (a) e de polidispersão (b) para NC³, em diferentes concentrações, em função do tempo de armazenagem. (■) logo após NPPT; (◇) após 14 dias de armazenagem.

O diâmetro médio da formulação NC³ apresentou-se em torno de 295 ± 18 nm com distribuição unimodal (Anexo 1), para todas as diluições, mesmo depois de transcorridos 14 dias de armazenagem. A polidispersão se apresentou entre 0,05 e 0,27. O excesso de fármaco não interferiu no tamanho ou distribuição do diâmetro ou mesmo na polidispersão destas nanopartículas.

A formulação controle (NC⁰) apresentou diâmetro médio e polidispersão na mesma ordem que para as formulações contendo fármaco (Figura 6.11).

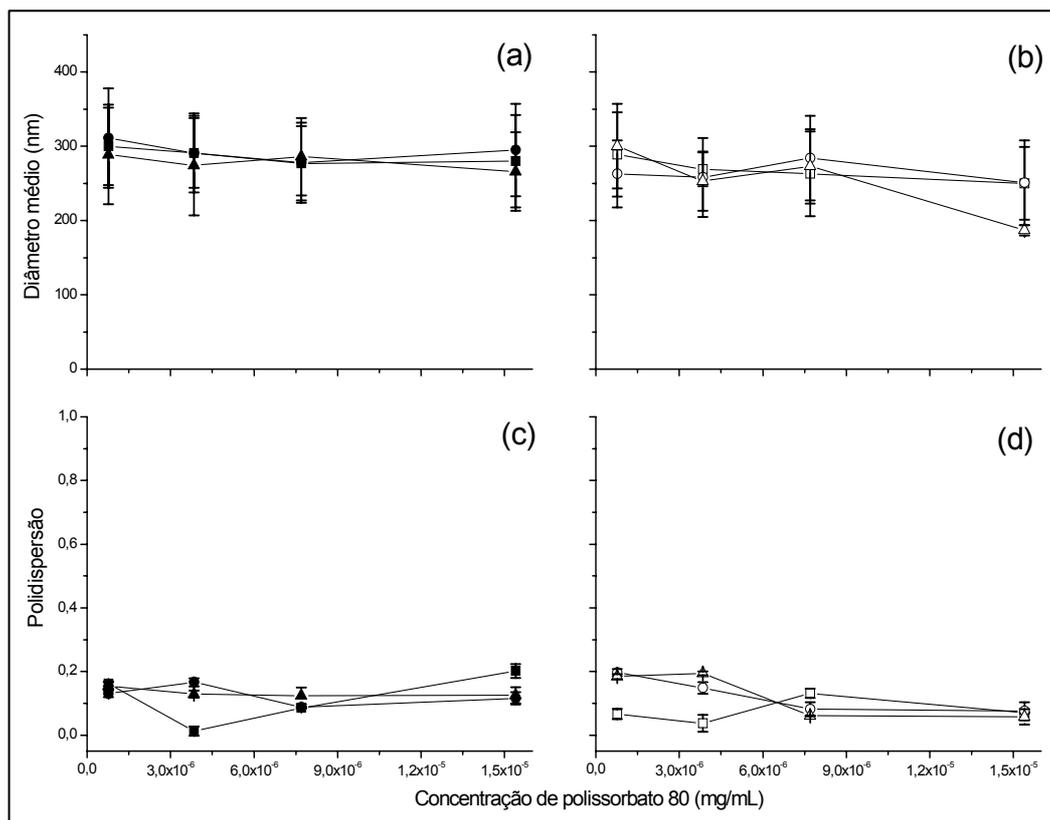


Figura 6.11: Gráficos de diâmetro médio ((a) e (b)) e de polidispersão ((c) e (d)), em diferentes concentrações, em função do tempo de armazenagem para NC^0 . (■) logo após NPPT; (●) após 25 dias de armazenagem; (▲) após 45 dias; (□) após 70 dias de armazenagem; (○) após 95 dias; (△) após 120 dias.

O diâmetro médio das formulações sem fármaco (NC^0) permaneceu constante ao longo do tempo de armazenagem. Obtiveram-se diâmetros em torno de 280 ± 20 nm com distribuição unimodal (Anexo 1), mesmo depois de transcorrido o período de armazenagem. A polidispersão para a NC^0 apresentou valores entre 0,05 e 0,27, indicando que a distribuição do tamanho das partículas não é estreita e que estes sistemas são polidispersos.

Os sistemas NC sem fármaco (NC^0) ou contendo fármaco na concentração de 1mg/mL (NC^1) demonstraram-se estáveis quanto ao diâmetro médio (em torno de 280 ± 20 nm) e polidispersão (entre 0,05 e 0,3) durante os 120 dias de armazenagem.

As formulações NS^0 e NE^0 apresentaram diâmetro médio inferior as NC. Para a NS^0 o diâmetro médio foi de 190 ± 15 nm e, para a NE^0 o diâmetro

médio foi de 232 ± 12 nm, que se mantiveram até 25 dias de armazenagem, ambas apresentaram distribuição de tamanho de partículas unimodal (Anexo 1). (Figura 6.12). A determinação do diâmetro para a NS⁰ e NE⁰ demonstrou que a ausência do núcleo oleoso, constituído de Miglyol[®] 810, ou do polímero, poli(ϵ -caprolactona), interferiram no tamanho das nanopartículas obtidas.

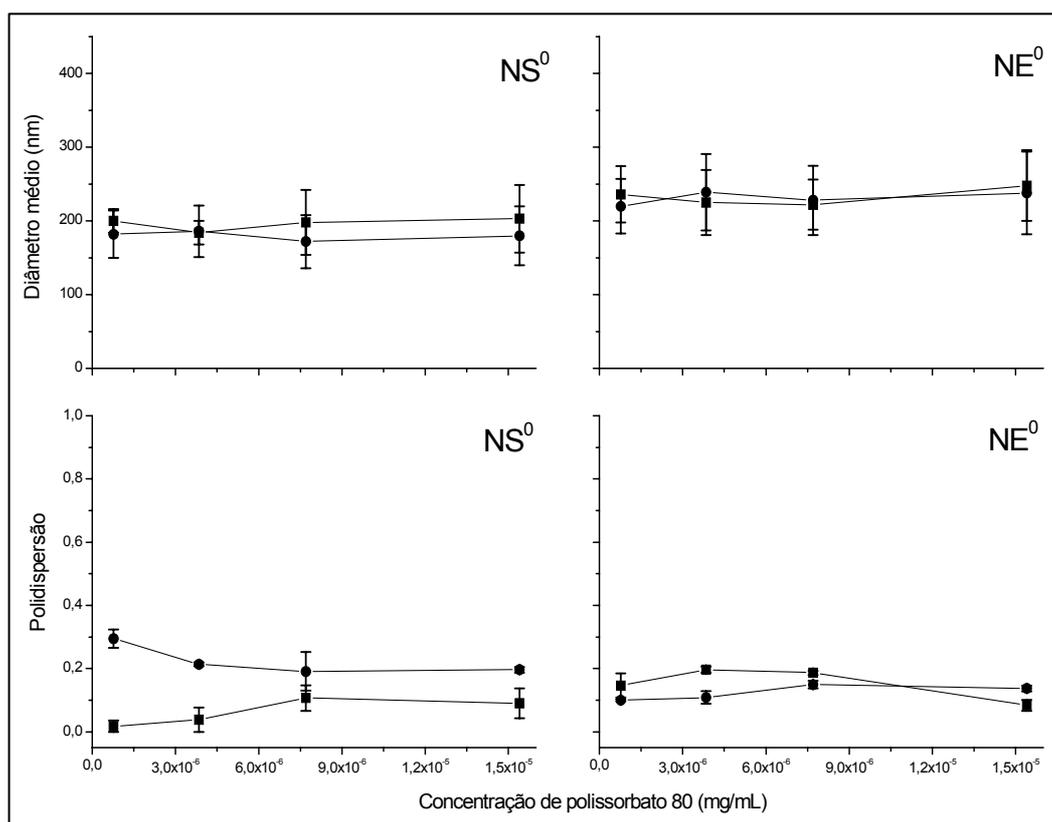


Figura 6.12: Gráficos de diâmetro médio e de polidispersão, em diferentes concentrações, em função do tempo de armazenagem para NS⁰ e NE⁰. (■) logo após NPPT; (●) após 25 dias de armazenagem.

A polidispersão para as formulações NS⁰ e NE⁰ apresentou valores que caracterizaram sistemas polidispersos. Os valores encontrados estiveram entre 0,05 e 0,3, assim como para os demais sistemas nanoparticulados investigados neste estudo.

Considerando a hipótese levantada por GUTERRES e colaboradores (1995) de que podem existir cristais de fármaco em suspensão e o fato dos valores de $\rho_{c \rightarrow 0}$ determinados para a NC³ também indicarem a presença de

nanocristais, foi realizado um estudo com o intuito de investigar a presença ou não destas estruturas nas suspensões de nanopartículas.

6.2. Investigação da presença de cristais de fármaco em suspensão

6.2.1 Flutuação da intensidade de luz espalhada

Alterações na flutuação da intensidade da luz espalhada por amostras em solução durante o experimento de espalhamento de luz estático (SLS), podem ser indicativas da presença de partículas de elevada massa molar ou da formação de estruturas cristalinas (PECORA e BERNE, 2000).

Sendo assim, a intensidade de luz espalhada pela formulação de NC contendo fármaco (NC¹) foi analisada por SLS num período de 30 min, com o intuito de se observar flutuações na intensidade da luz que poderiam caracterizar a presença de cristais nanométricos de fármaco em suspensão como proposto por GUTERRES e colaboradores (1995). As flutuações de intensidade obtidas podem ser observadas nos gráficos da Figuras 6.13. Para controle do experimento, uma formulação sem fármaco (NC⁰) foi analisada paralelamente (Figura 6.14). O comportamento da flutuação de intensidade da luz espalhada foi acompanhado até 120 dias de armazenagem para estas amostras.

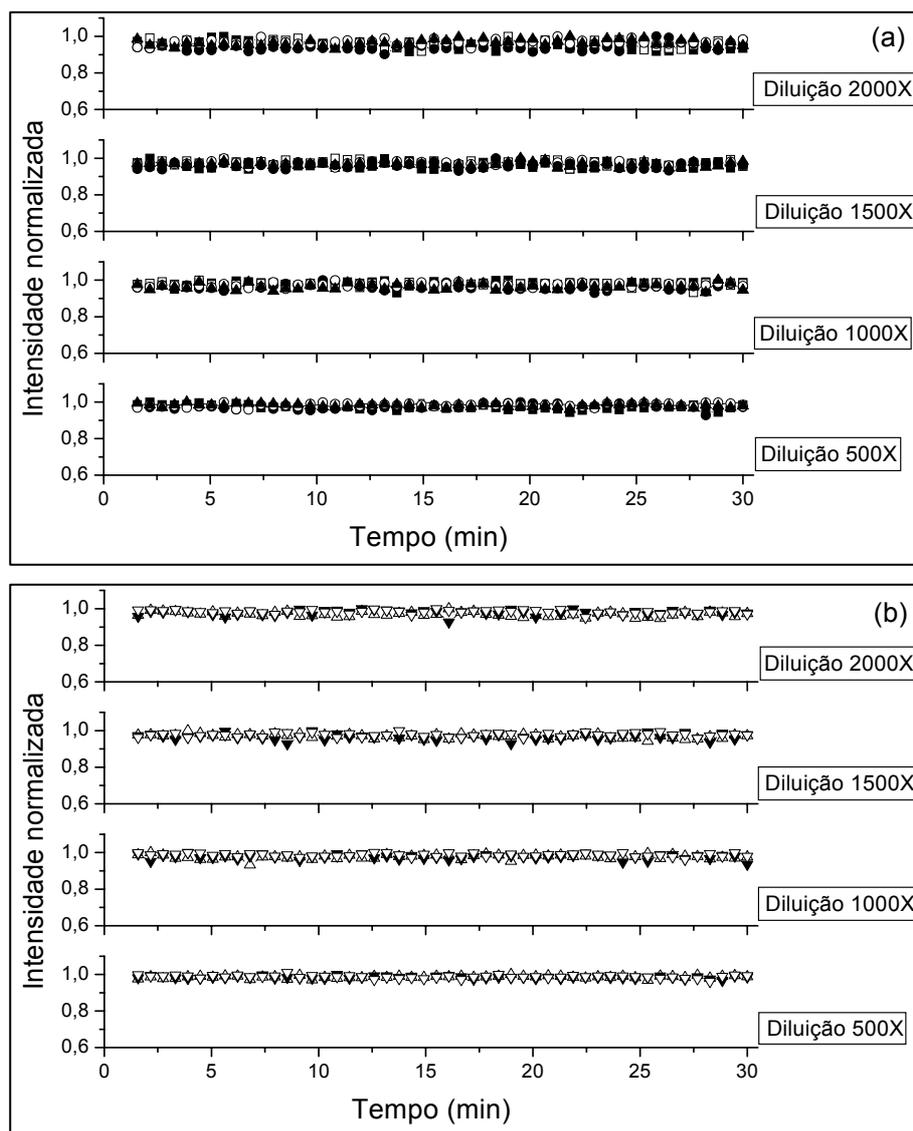


Figura 6.13: Gráficos da flutuação da intensidade de luz espalhada ao longo de 30 min em função do tempo de armazenagem para NC^1 em diferentes diluições. (a) (■) logo após NPPT; (□) após 4 dias de armazenagem; (●) após 7 dias; (○) após 11 dias; (▲) após 14 dias. (b) (△) após 60 dias de armazenagem; (▼) após 90 dias; (▽) após 120 dias.

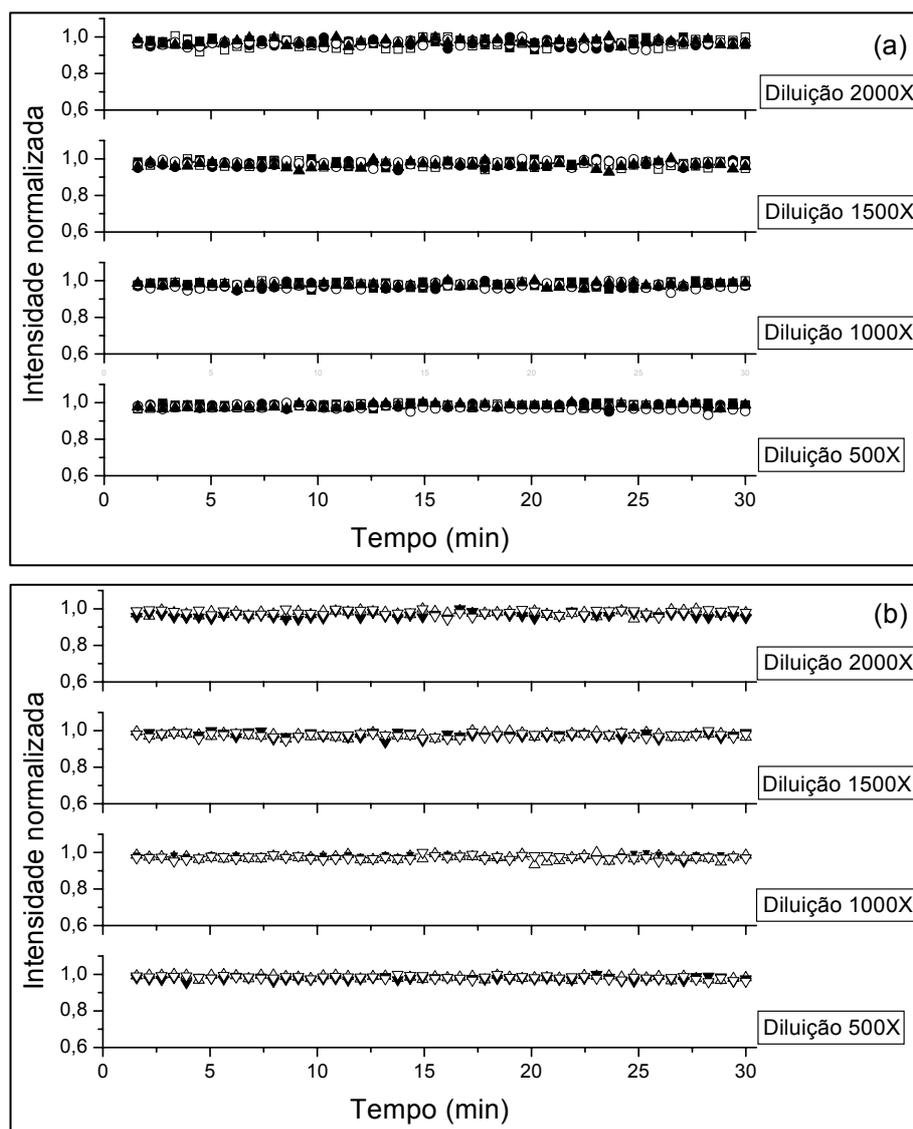


Figura 6.14: Gráficos da flutuação da intensidade de luz espalhada ao longo de 30 min em função do tempo de armazenagem para NC^0 em diferentes diluições. (a) (■) logo após NPPT; (□) após 4 dias de armazenagem; (●) após 7 dias; (○) após 11 dias; (▲) após 14 dias. (b) (△) após 60 dias de armazenagem; (▼) após 90 dias; (▽) após 120 dias.

Não foram observadas diferenças na flutuação da intensidade de luz espalhada entre as formulações NC^1 e NC^0 , isso foi um indicativo seja de que não existem estruturas cristalinas em suspensão, seja de que estas estruturas não estão presentes em quantidade suficiente para serem detectadas. O mesmo comportamento foi observado após um período de armazenagem de 120 dias.

O excesso de fármaco numa formulação de NC poderia aumentar a concentração de cristais deste em suspensão e, desse modo, a detecção pelo aumento da flutuação da intensidade de luz espalhada seria possível. Logo, uma formulação contendo excesso de fármaco (NC³) foi analisada do mesmo modo que a NC¹ e NC⁰. No entanto, a NC³ foi analisada apenas até 14 dias de armazenagem, pois, como já mencionado anteriormente, esta formulação possui estabilidade física limitada. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 6.15.

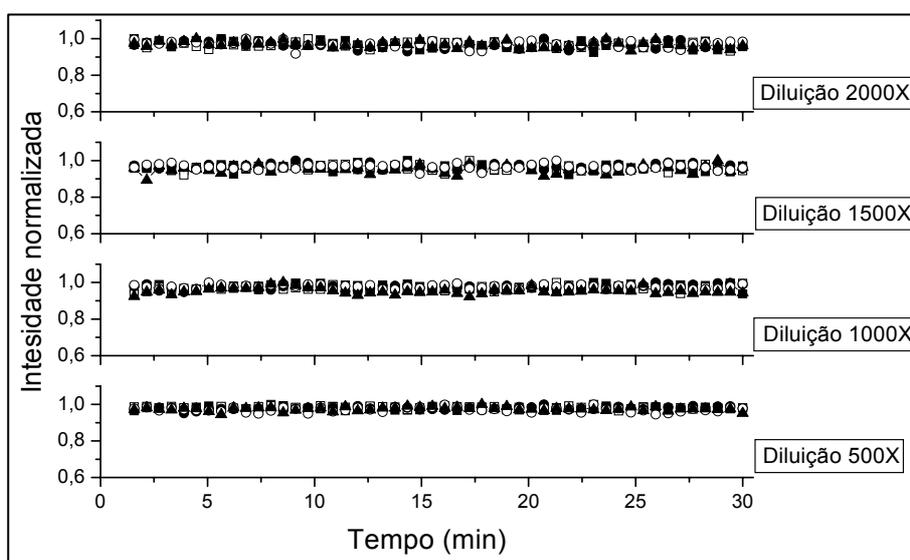


Figura 6.15: Gráficos da flutuação da intensidade de luz espalhada ao longo de 30 min em função do tempo de armazenagem para NC³ em diferentes diluições. (■) logo após NPPT; (□) após 4 dias de armazenagem; (●) após 7 dias; (○) após 11 dias; (▲) após 14 dias.

O mesmo comportamento observado para as formulações NC⁰ e NC¹ foi observado para a NC³. O excesso de fármaco nesta formulação não causou aumento na flutuação da luz espalhada.

No entanto, em fotos de microscopia ótica com luz polarizada observaram-se cristais de fármaco micrométricos logo após o preparo da suspensão NC³ (Figura 6.16). Enquanto que para a suspensão NC¹ não se observou formação cristalina até 120 dias de armazenagem (Figura 6.17).

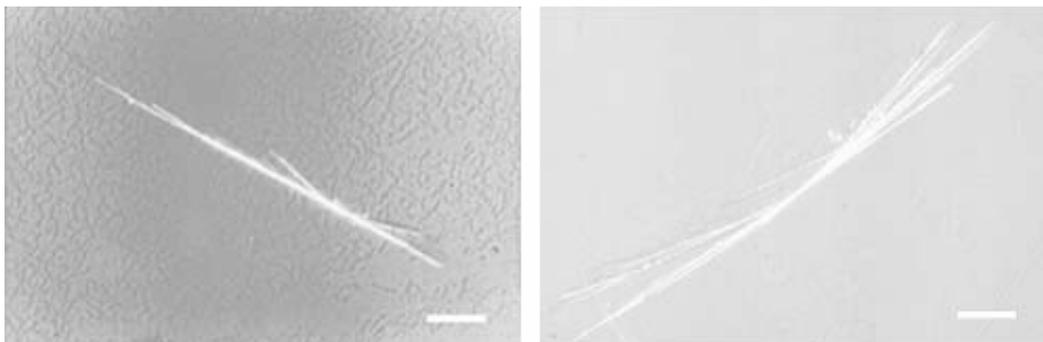


Figura 6.16: Fotos de microscopia ótica para NC³ logo após NPPT e após 14 dias de armazenagem, respectivamente. A barra de escala corresponde a 500 μm .

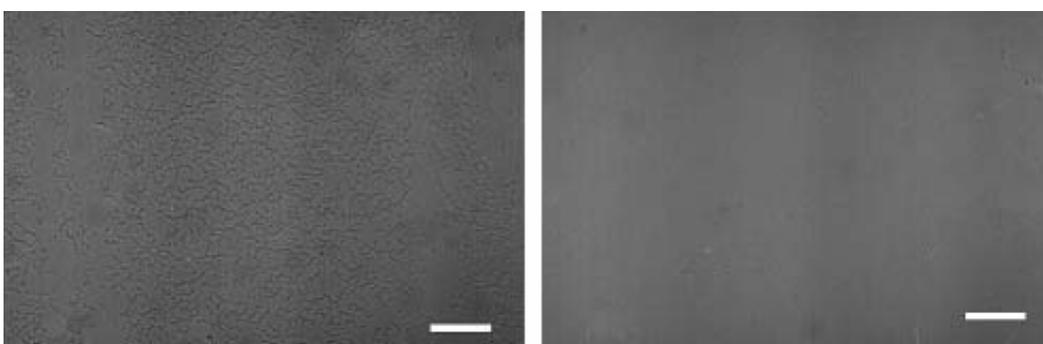


Figura 6.17: Fotos de microscopia ótica para NC¹ logo após NPPT e após 120 dias de armazenagem, respectivamente. A barra de escala corresponde a 500 μm .

O fato de não ter sido observado tipo algum de formação cristalina para a formulação NC¹ não exclui a hipótese da existência de cristais nanométricos de fármaco em suspensão, visto que a microscopia ótica permite apenas a visualização de partículas na ordem de micrômetros.

Como controles do estudo, foram obtidas fotos de microscopia ótica também para a formulação sem fármaco (NC⁰), onde não foi constatado nenhum tipo de formação cristalina (Figura 6.18).

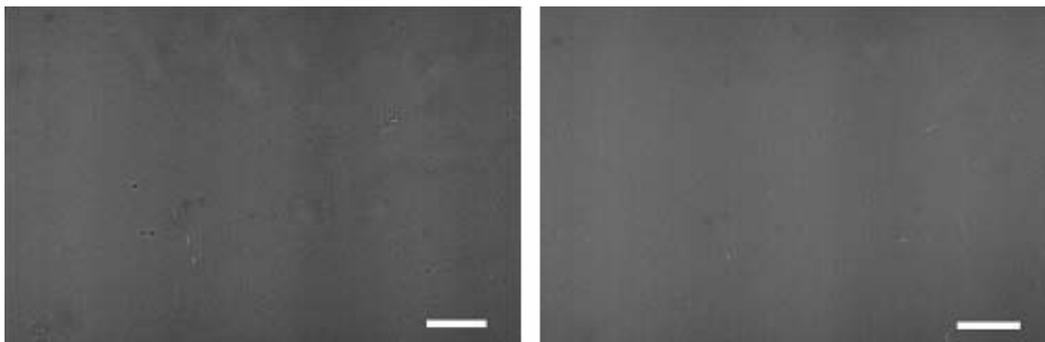


Figura 6.18: Fotos de microscopia ótica para NC^0 logo após NPPT e após 120 dias de armazenagem, respectivamente. A barra de escala corresponde a $500\ \mu m$.

Com o intuito de verificar o comportamento de uma suspensão preparada apenas com tensoativos e fármaco (ND^1), a flutuação da intensidade de luz espalhada foi analisada também para formulação ND^1 . Se houvesse cristais de fármaco em suspensão, nas formulações NC^1 ou NC^3 , estes estariam estabilizados por tensoativos, de forma semelhante ao que ocorre numa formulação ND contendo fármaco. Uma formulação de ND sem fármaco (ND^0) foi analisada paralelamente para o controle do estudo. Do mesmo modo que para a NC^3 , as ND^1 e ND^0 foram analisadas somente até 14 dias de armazenagem, visto a presença de precipitado após curto período de armazenagem na formulação contendo fármaco (ND^1). Os resultados obtidos encontram-se na Figura 6.19.

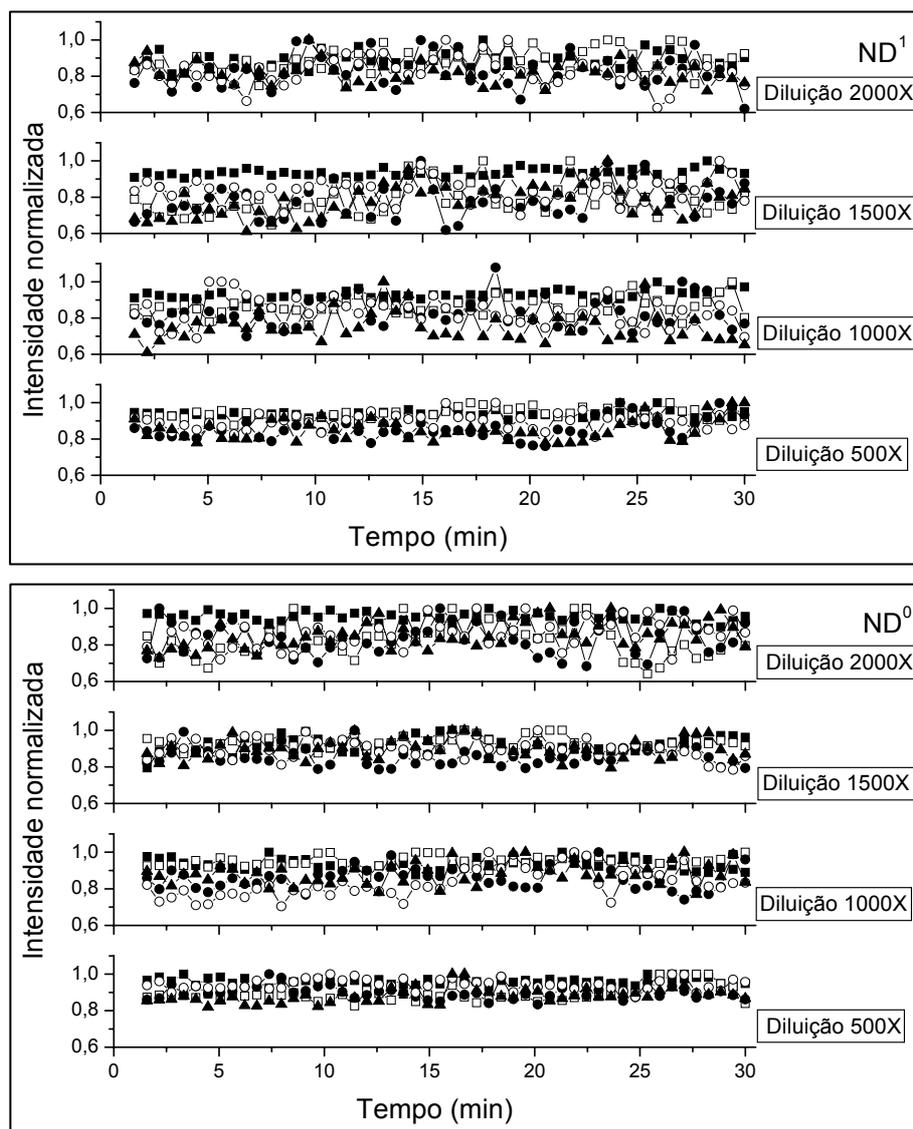


Figura 6.19: Gráficos da flutuação da intensidade de luz espalhada ao longo de 30 min em função do tempo de armazenagem para ND¹ e ND⁰, em diferentes diluições. (■) logo após NPPT; (□) após 4 dias de armazenagem; (●) após 7 dias; (○) após 11 dias; (▲) após 14 dias.

Observou-se maior flutuação da intensidade de luz espalhada nas formulações ND¹ e ND⁰, quando comparadas ao sistema NC (NC⁰, NC¹ e NC³). Esse comportamento foi atribuído a maior instabilidade física dos sistemas ND frente aos sistemas NC, pois os primeiros consistem de dispersões de tensoativos de diferentes EHL, podendo estar ocorrendo troca de massa entre as partículas, enquanto que as NC devem ser estabilizadas fisicamente pela presença do polímero. Além disso, este aumento da flutuação da intensidade

de luz não pôde ser atribuído unicamente à presença de estruturas cristalinas, provindas da agregação do fármaco, pois comportamento semelhante foi observado para ambas as formulações, contendo ou não indometacina.

A instabilidade física das ND pode ser refletida na determinação do diâmetro médio e polidispersão. Sendo assim, estes parâmetros foram determinados para a ND¹ e ND⁰ (Figura 6.20).

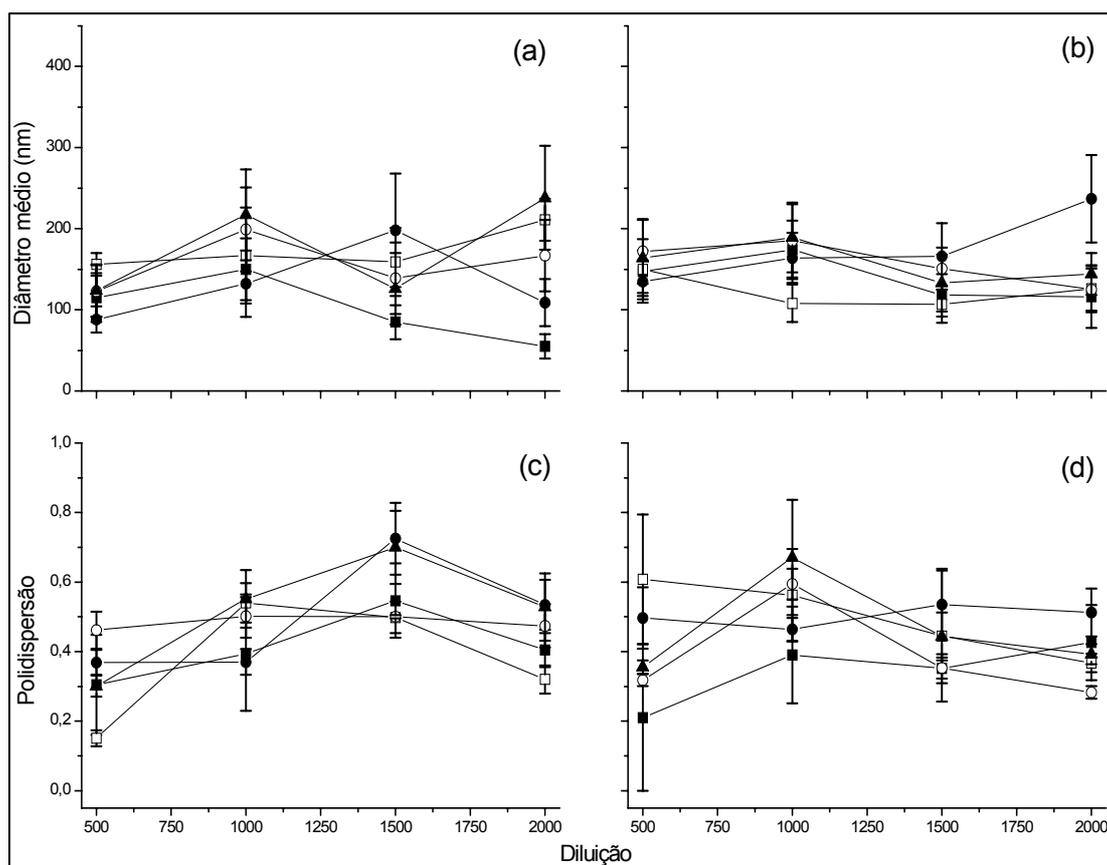


Figura 6.20: Gráficos de diâmetro médio e de polidispersão para ND¹ ((a) e (c)) e ND⁰ ((b) e (d)), em diferentes diluições, em função do tempo de armazenagem. (■) logo após NPPT; (□) após 4 dias de armazenagem; (●) após 7 dias; (○) após 11 dias; (▲) após 14 dias.

A polidispersão apresentou valores entre $0,15 \pm 0,02$ e $0,72 \pm 0,1$ para a ND¹ e, entre $0,21 \pm 0,021$ e $0,67 \pm 0,17$ para a ND⁰, isso indicou uma distribuição de tamanho de partículas bastante ampla, ou seja, os sistemas ND demonstraram-se altamente polidispersos.

Os diâmetros médios das formulações de ND apresentaram grande variabilidade, especialmente a amostra contendo fármaco (ND¹). Além disso, os gráficos de distribuição de diâmetro para os sistemas ND (Anexo 1), indicaram a presença de duas populações de partículas, após armazenagem. Para confirmar a suposição de existência de populações de partículas de tamanhos distintos nos sistemas ND, os dados de determinação do diâmetro médio, obtidos nos experimentos de PCS, foram analisados através do *software* CONTIN (Tabelas 6.4 e 6.5), o qual permite a discriminação de populações com diferentes tamanhos de partícula.

Tabela 6.4: Valores de diâmetro médio (nm), obtidos através do *software* CONTIN, para a formulação ND¹, em diferentes diluições e após diferentes tempos de armazenagem.*

Tempo de armazenagem	Diluição de 500 x	Diluição de 1000 x	Diluição de 1500 x	Diluição de 2000 x
Após NPPT	108 ± 24	112 ± 38	103 ± 37	97 ± 81
Após 4 dias	109 ± 17 ^{a)} 1974 ± 895 ^{b)}	179 ± 153	161 ± 119	297 ± 330 ^{c)} 20 ± 2 ^{d)}
Após 7 dias	132 ± 96	** 106 ± 22 ^{e)} 494 ± 54 ^{f)}	245 ± 36	388 ± 335
Após 11 dias	146 ± 125	211 ± 153	200 ± 24	285 ± 205
Após 14 dias	179 ± 337 ^{g)} 550 ± 203 ^{h)}	165 ± 131	162 ± 132	558 ± 359

^{a)} 75 % da população; ^{b)} 25 % da população; ^{c)} 84 % da população; ^{d)} 16% da população; ^{e)} 40 % da população; ^{f)} 20 % da população; ^{g)} 80 % da população; ^{h)} 20 % da população; * as populações que não estiverem especificadas correspondem a valores iguais ou superiores a 98%; ** presença de uma população variando de 4000 a 50000 nm de diâmetro.

Tabela 6.5: Valores de diâmetro médio (nm), obtidos através do *software* CONTIN, para a formulação ND⁰, em diferentes diluições e após diferentes tempos de armazenagem.*

Tempo de armazenagem	Diluição de 500 x	Diluição de 1000 x	Diluição de 1500 x	Diluição de 2000 x
Após NPPT	151 ± 24	151 ± 34	98 ± 72	115 ± 62
Após 4 dias	140 ± 30	121 ± 53	138 ± 26	124 ± 1 ^{a)} 1314 ± 47 ^{b)}
Após 7 dias	132 ± 87	154 ± 94	159 ± 98	258 ± 316
Após 11 dias	120 ± 46 ^{c)} 997 ± 479 ^{d)}	204 ± 339	127 ± 26 ^{e)} 4022 ± 2218 ^{f)}	311 ± 498
Após 14 dias	122 ± 64 ^{g)} 503 ± 223 ^{h)}	258 ± 170	273 ± 202	**151 ± 12 ⁱ⁾

^{a)} 28 % da população; ^{b)} 67 % da população; ^{c)} 75 % da população; ^{d)} 25 % da população; ^{e)} 75 % da população; ^{f)} 25 % da população; ^{g)} 40% da população; ^{h)} 40% da população; ⁱ⁾ 50% da população; * as populações que não estiverem especificadas correspondem a valores iguais ou superiores a 98%; ** presença de uma população variando de 1500 a 30000 nm de diâmetro.

De acordo com os dados obtidos pelo CONTIN pôde-se observar que os diâmetros médios das formulações ND¹ e ND⁰ apresentaram uma distribuição ampla mesmo logo após a preparo das mesmas, obtendo-se valores que variam de 97 ± 81 nm a 112 ± 38 nm de diâmetro para a ND¹ e, 98 ± 72 nm a 151 ± 34 nm, para a ND⁰. Após curto período de armazenagem, 4 dias, ocorreu o aparecimento de populações de partículas de tamanhos distintos, ultrapassando 1 µm, para ambas as formulações. O aumento do tamanho das partículas deve ter ocorrido pela agregação destas, que consistem de uma dispersão de tensoativos, e não pode ser associada, exclusivamente, ao crescimento de cristais de fármaco, pois o aparecimento de populações de tamanho distinto ocorreu nas formulações contendo ou não fármaco.

As fotos de microscopia ótica comprovaram a existência de cristais micrométricos de indometacina na formulação ND¹, mesmo logo após nanoprecipitação, e ausência destes na ND⁰ (Figuras 6.21 e 6.22).

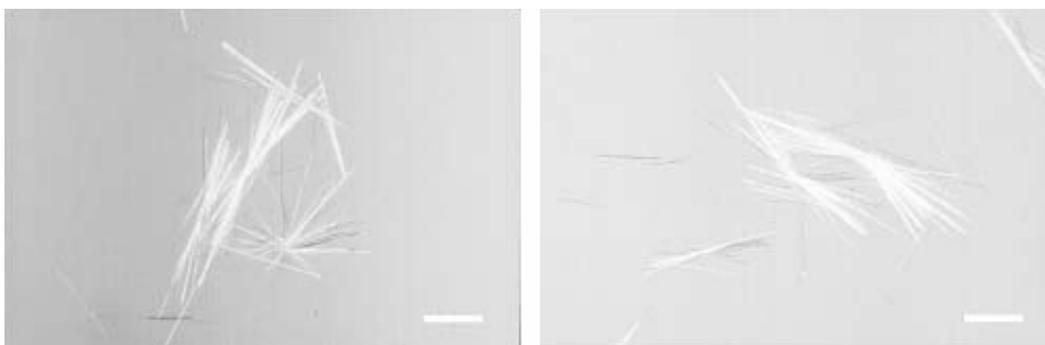


Figura 6.21: Fotos de microscopia ótica para ND¹ logo após NPPT e após 14 dias de armazenagem, respectivamente. A barra de escala corresponde a 500 μm .

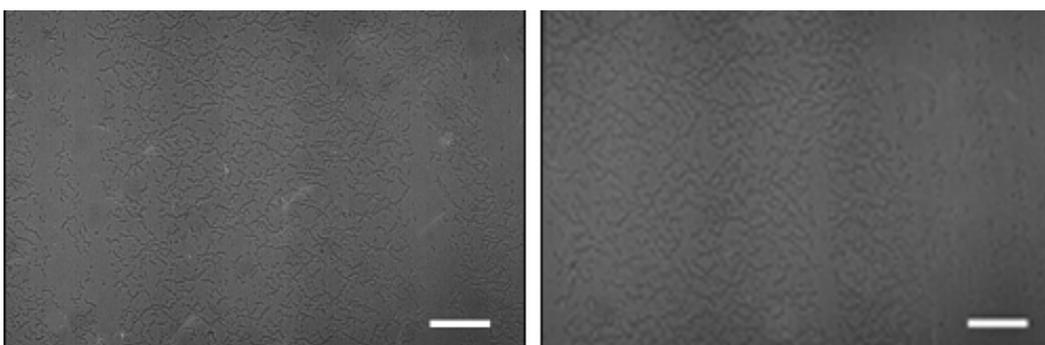


Figura 6.22: Fotos de microscopia ótica para ND⁰ logo após NPPT e após 14 dias de armazenagem, respectivamente. A barra de escala corresponde a 500 μm .

Após 14 dias de armazenagem ainda se observaram cristais de fármaco na ND¹ e não houve ocorrência de formação cristalina na formulação ND⁰, o que sugeriu que os cristais observados nas fotos da ND¹ foram formados por agregados micrométricos de fármaco, uma vez que este é o único componente ausente na ND⁰.

Visto que os dados de flutuação de intensidade, quando normalizados, não forneceram informações a respeito dos cristais de fármaco que estão presentes nas formulações NC³ e ND¹, os mesmos dados de flutuação de

intensidade foram analisados em seus valores absolutos para todas as formulações estudadas.

6.2.2 Intensidade média de luz espalhada

A partir dos dados de flutuação de intensidade de luz espalhada foi calculada a média da intensidade para as diferentes diluições, nos diferentes tempos de armazenagem. Este tratamento dos dados foi realizado com o intuito de se observar variações na intensidade absoluta de luz espalhada em função do tempo de armazenagem, o que pode fornecer informações a respeito de reestruturações do sistema ao longo do tempo. Os resultados obtidos para as NC¹ e NC⁰ encontram-se na Figura 6.23.

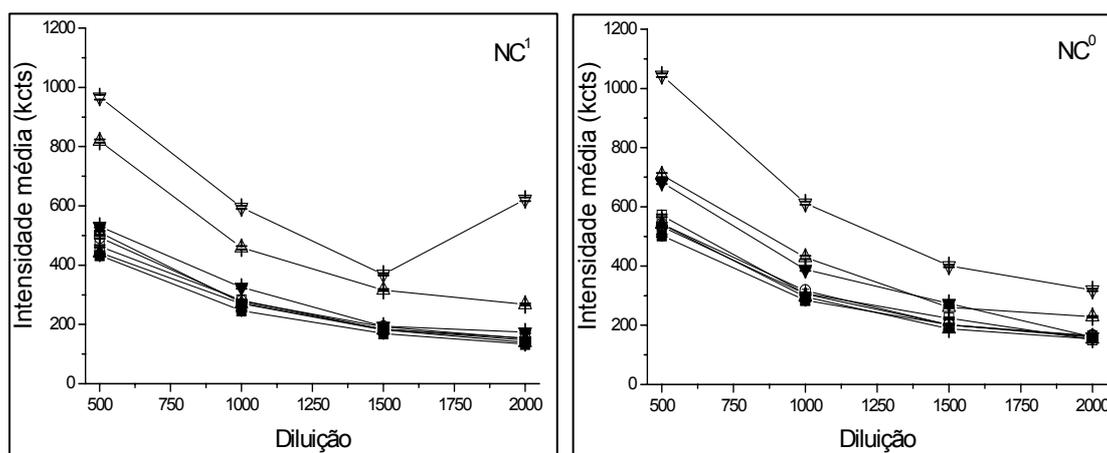


Figura 6.23: Gráficos da intensidade média de luz espalhada ao longo de 30 min em função do tempo de armazenagem para NC¹ e NC⁰, em diferentes diluições. (■) logo após NPPT; (□) após 4 dias de armazenagem; (●) após 7 dias; (○) após 11 dias; (▲) após 14 dias; (△) após 60 dias; (▼) após 90 dias; (▽) após 120 dias.

Até 14 dias de armazenagem a intensidade média de luz espalhada não sofreu modificação, porém após 60 dias foi possível perceber alterações na intensidade da luz. Com o transcorrer do período de armazenagem as nanopartículas podem sofrer modificações na superfície, como hidrólise do polímero (CALVO *et al.*, 1996) e aumento da concentração de grupos

carboxilas, o que estaria levando as alterações de intensidade de luz espalhada após 60 dias de armazenagem.

Para a formulação NC³ (Figura 6.24), com até 7 dias de armazenagem, a intensidade média de luz espalhada esteve entre 700 kcts e 900 kcts, sendo superior aos valores encontrados para as NC⁰ e NC¹, cujos valores de intensidade encontraram-se entre 400 kcts e 600 kcts. Esta elevação da intensidade pode ser consequência da maior concentração de fármaco presente na interface partícula/água da NC³, ou mesmo da presença de agregados nanométricos de fármaco em suspensão.

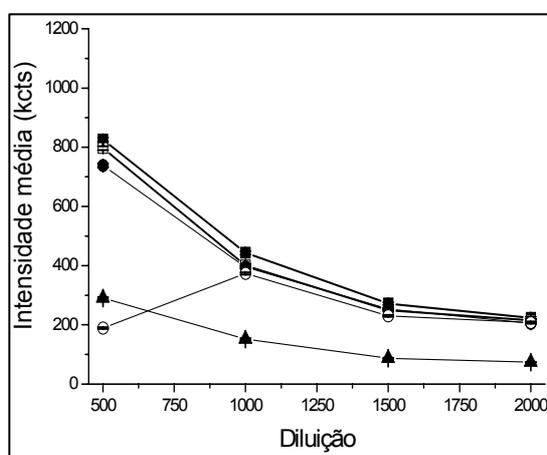


Figura 6.24: Gráficos da intensidade média de luz espalhada ao longo de 30 min em função do tempo de armazenagem para NC³ em diferentes diluições. (■) logo após NPPT; (□) após 4 dias de armazenagem; (●) após 7 dias; (○) após 11 dias; (▲) após 14 dias.

Com 11 dias de armazenagem ocorreu um decréscimo da intensidade média de luz espalhada para a menor diluição (500 vezes) da formulação de NC³, isso foi indicativo da redução de unidades espalhantes em suspensão que deve ter sido decorrente da precipitação dos agregados de fármaco, presente em excesso nesta formulação. Com o aumento da diluição este efeito não foi mais importante a ponto de alterar a intensidade média de luz espalhada.

Ocorreu uma queda na intensidade de luz espalhada após 14 dias de armazenagem em todas as diluições para a formulação NC³, isso pode ter sido decorrente da agregação e precipitação de fármaco. Comportamento

semelhante não foi observado na formulação NC¹, pois a concentração de fármaco presente não excederia a concentração de saturação do mesmo no sistema.

As intensidades médias de luz espalhada para ND¹ e ND⁰ (Figura 6.25) foram bastante inferiores às encontradas para os sistemas NC, isso foi decorrente dos diferentes materiais que constituem a interface com o meio aquoso. No caso das NC o material em questão foi o polímero que, em relação aos demais componentes da formulação, possui elevada massa molar, o que gera intensidades elevadas de luz espalhada. As ND possuem tensoativos como material espalhante, estes possuem baixa massa molar e proporcionam intensidades de luz espalhada inferiores ao polímero presente nas NC.

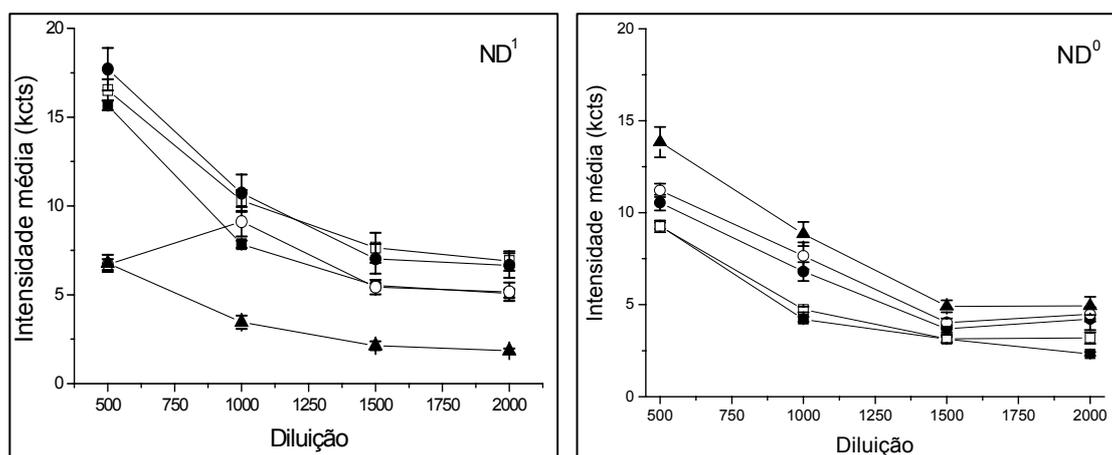


Figura 6.25: Gráficos da intensidade média de luz espalhada ao longo de 30 min em função do tempo de armazenagem para ND¹ e ND⁰, em diferentes diluições. (■) logo após NPPT; (□) após 4 dias de armazenagem; (●) após 7 dias; (○) após 11 dias; (▲) após 14 dias.

O comportamento apresentado pela ND¹ foi semelhante ao apresentado pela NC³. Após 11 dias de armazenagem ocorreu um decréscimo da intensidade média de luz espalhada para a menor diluição, este comportamento não foi observado para a ND⁰, sendo assim, provavelmente este decréscimo foi devido à precipitação de agregados de fármaco, o que altera a composição do meio, e conseqüentemente a intensidade de luz espalhada. Com o aumento da diluição este efeito não foi mais observado.

Após 14 dias de armazenagem ocorreu uma queda na intensidade média de luz espalhada para todas as diluições da ND¹, que provavelmente também foi decorrente da agregação e precipitação do fármaco na suspensão, visto que o mesmo comportamento não ocorreu na formulação sem fármaco (ND⁰).

As diferenças nos valores absolutos de intensidade entre a formulação NC³ quando comparada a NC¹ e NC⁰, e a forte queda nas intensidades de luz espalhada pela NC³ e ND¹, após armazenagem, sugeriram a presença de nanocristais de fármaco em suspensão.

Uma análise mais detalhada dos valores de intensidade média de luz espalhada pode ser feita através da normalização destas intensidades pela Razão de Rayleigh.

6.2.3 Razão de Rayleigh para a intensidade média de luz espalhada

Para comparar os valores de intensidade média de luz espalhada de forma mais precisa foram calculadas as Razões de Rayleigh, conforme a equação (4.3), para as formulações NC⁰, NC¹, NC³, ND⁰ e ND¹ na diluição de 500 vezes em função do tempo de armazenagem. A fração volumétrica (φ), tanto para os sistemas NC, como para ND, foi desconsiderada, pois, devido à elevada diluição (500 vezes) estes valores tornaram-se insignificantes. Os resultados para os sistemas NC encontram-se na Figura 6.26.

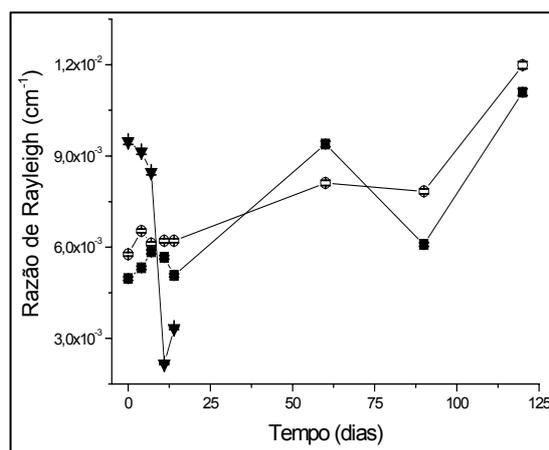


Figura 6.26: Gráfico de Razão de Rayleigh em função do tempo de armazenagem para (○) NC⁰, (■) NC¹ e (▼) NC³.

Observam-se comportamentos similares para as formulações NC⁰ e NC¹. Até 14 dias de armazenagem ocorreram pequenas flutuações na Razão de Rayleigh destas formulações, sendo que os sistemas consistem de suspensões de composição complexa, estas variações estão de acordo com o previsto. Após um período maior de armazenagem, 60 dias a 120 dias, aumentou a oscilação da Razão de Rayleigh para estes sistemas, isso novamente corroborou com a hipótese de modificações na superfície das NC ao longo do período de armazenagem, proposto por CALVO e colaboradores (1996), como citado no item 6.2.2. A presença ou ausência de fármaco não influenciou este parâmetro.

Para NC³ o valor da Razão de Rayleigh, até o sétimo dia de experimento, foi superior aos valores encontrados para as formulações NC⁰ e NC¹. Sugere-se que esta diferença de intensidade seja devido à formação de cristais de fármaco durante o processo de preparo da NC³, sendo que após um período de armazenagem estes nanocristais devem agregar e precipitar resultando na grande redução na Razão de Rayleigh, após 11 dias de armazenagem, para esta formulação.

Os resultados obtidos para a ND¹ (Figura 6.27), embora tenham apresentado valores absolutos bastante distintos, demonstraram comportamento similar aos obtidos para a NC³. Ocorreu grande redução da

Razão de Rayleigh após 11 dias de armazenagem, do mesmo modo que para a NC³.

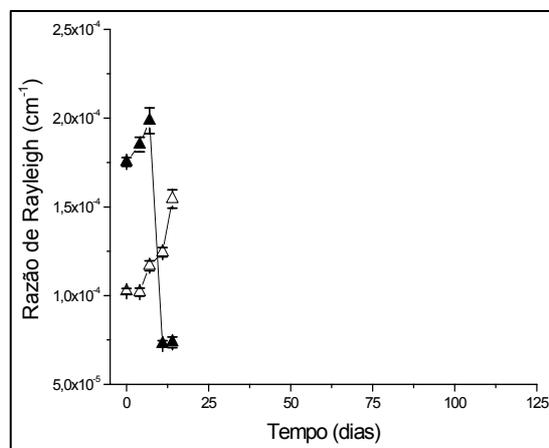


Figura 6.27: Gráfico de Razão de Rayleigh em função do tempo de armazenagem para (△) ND⁰ e (▲) ND¹.

Observou-se um aumento da Razão de Rayleigh para a ND⁰ com o transcorrer do período de armazenagem. Sabendo-se que as ND são sistemas micelares, pode estar ocorrendo transferência de massa entre as nanopartículas, o que conduzira ao aumento da intensidade de luz espalhada ao longo do tempo.

Para verificar se a hipótese de que a precipitação de agregados de fármaco estaria levando à redução da Razão de Rayleigh das formulações NC³ e ND¹, o teor de fármaco destas suspensões foi acompanhado ao longo do tempo. A NC¹ também teve seu teor de fármaco determinado, pois, se a hipótese sugerida fosse válida, não deveria haver redução no teor de fármaco desta suspensão, uma vez que a intensidade de luz espalhada por esta amostra não reduz em função do tempo.

6.2.4 Quantificação do fármaco

Com o objetivo de verificar se a hipótese de precipitação de fármaco das suspensões era válida, os teores das suspensões NC¹, NC³ e ND¹ foram acompanhados em função do tempo de armazenagem. Os resultados encontram-se na Figura 6.28.

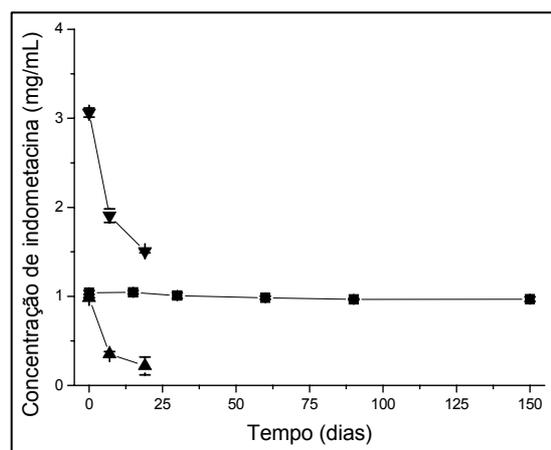


Figura 6.28: Gráfico da concentração de indometacina em suspensão em função do tempo de armazenagem. (■) NC¹; (▼) NC³; (▲) ND¹.

O teor inicial de indometacina na suspensão NC¹ foi de $1,01 \pm 0,02$ mg/mL, e este se manteve, sem variação significativa ($p > 0,05$), até 150 dias de armazenagem. Demonstrando um teor de fármaco para a NC¹ constante ao longo de 150 dias.

Para a NC³ observou-se significativa ($p < 0,05$) redução no teor de indometacina depois de transcorrido o período de armazenagem. O teor inicial de fármaco foi de $3,06 \pm 0,16$ mg/mL, após 7 dias de armazenagem obteve-se teor de fármaco de $1,91 \pm 0,15$ mg/mL, e chegou-se ao patamar de $1,51 \pm 0,03$ mg/mL, após 19 dias de armazenagem. Pela análise visual desta formulação foi possível observar precipitado após 10 dias de armazenagem, provavelmente decorrente da agregação do fármaco excedente.

Para a ND¹, também ocorreu significativa ($p < 0,05$) redução no teor de indometacina depois de transcorrido o período de armazenagem. Esta suspensão possuía teor inicial de indometacina de $0,98 \pm 0,01$ mg/mL, após 7 dias de armazenagem, este valor passou a $0,35 \pm 0,01$ mg/mL e finalmente chegou-se ao teor de $0,22 \pm 0,02$ mg/mL, após 19 dias de armazenagem.

Os dados de teor de fármaco em função do tempo de armazenagem, para as formulações NC³ e ND¹, vêm corroborar com a hipótese levantada anteriormente de que a queda na Razão de Rayleigh, após 11 dias de armazenagem, fosse devido à precipitação de agregados de fármaco das suspensões. Sendo assim, através dos dados de quantificação de fármaco e de Razão de Rayleigh pôde-se concluir que são formados nanocristais de fármaco, estabilizados por tensoativos durante o processo de obtenção das nanopartículas, quando a concentração de fármaco exceder sua saturação no sistema, e que estes se agregam e precipitam após curto período de armazenagem.

Embora o teor de fármaco logo após o preparo da NC³ e ND¹ tenha sido de 100%, observaram-se cristais micrométricos de indometacina através de microscopia ótica (Figuras 6.16 e 6.21). Isso, provavelmente, ocorreu porque as formulações encontram-se saturadas de fármaco e este ao entrar em contato com o vidro da lâmina tende a se agrupar devido à repulsão pelo vidro, formando os cristais micrométricos.

6.3 Análises de espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS)

Através de análises de SAXS é possível observar características das partículas presentes no meio, como organização do polímero e demais componentes da formulação ao nível molecular. Sendo assim, análises de SAXS foram realizadas com o intuito de se contribuir para a proposição de modelos de estrutura que melhor definam a organização em nível molecular dos diferentes componentes das formulações de nanocarreadores.

6.3.1 Influência do tipo de estrutura: NC, NS, NE e ND

Inicialmente foram obtidos espectros dos sistemas NC (NC^0 , NC^1 e NC^3), NS (NS^0 , NS^1 e NS^3) e ND (ND^0 , ND^1 e ND^3) com o intuito de se verificar a organização dos componentes (polímero, óleo, tensoativos e fármaco) nas nanopartículas. Além disso, foi obtido um espectro do polímero, poli(ϵ -caprolactona) (PCL), puro e no estado sólido (EHRBURGER-DOLLE, 2004) para comparação com os espectros de NC e NS. Os espectros dos sistemas NC e NS, logo após nanoprecipitação (NPPT) e com 20 dias de armazenagem, encontram-se nas Figura 6.29 e 6.30. Os espectros para as ND, logo após NPPT, podem ser observados na Figura 6.31.

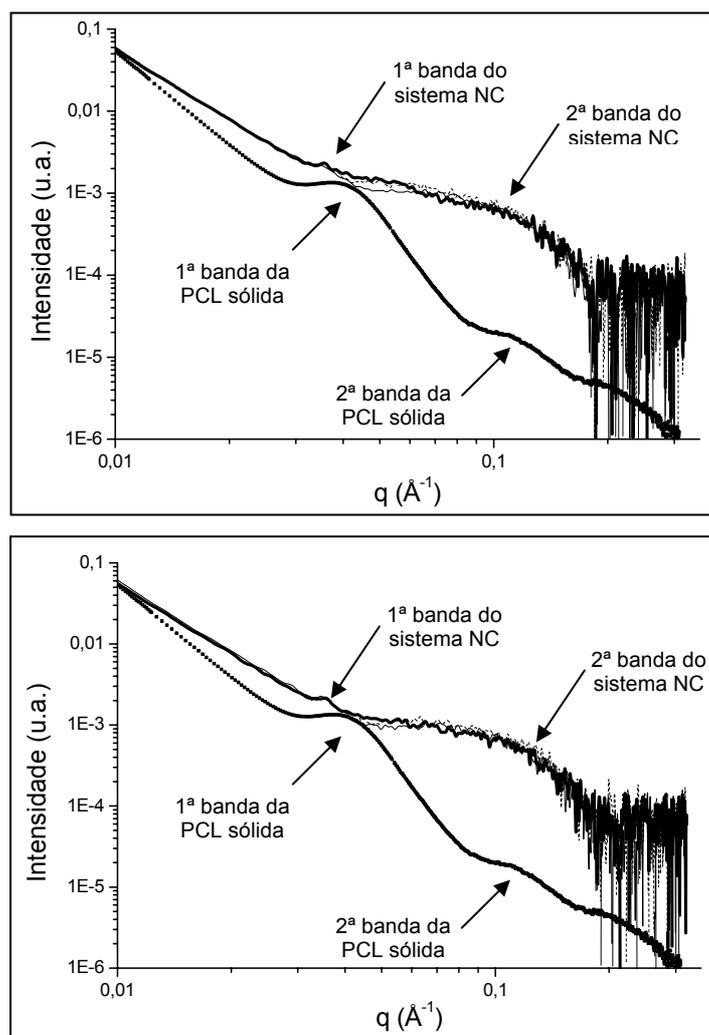


Figura 6.29: Espectros de SAXS para NC logo após NPPT e após 20 dias de armazenagem, respectivamente. (····) NC^0 , (—) NC^1 , (—) NC^3 , (■) PCL.

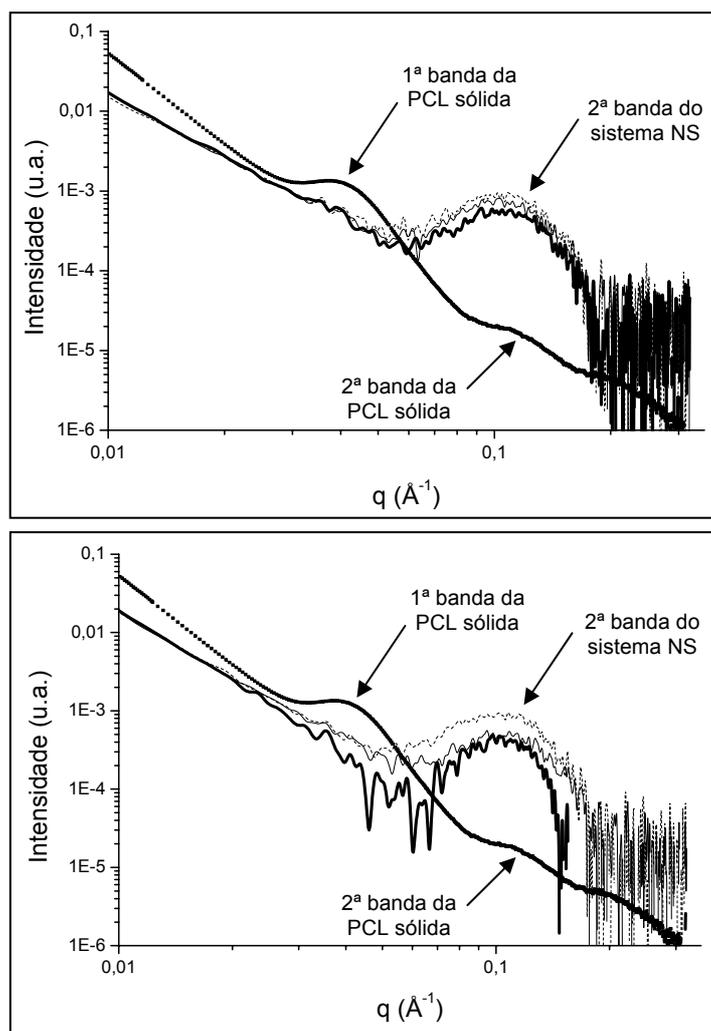


Figura 6.30: Espectros de SAXS para NS logo após NPPT e após 20 dias de armazenagem, respectivamente. (····) NS⁰, (—) NS¹, (—) NS³, (■) PCL.

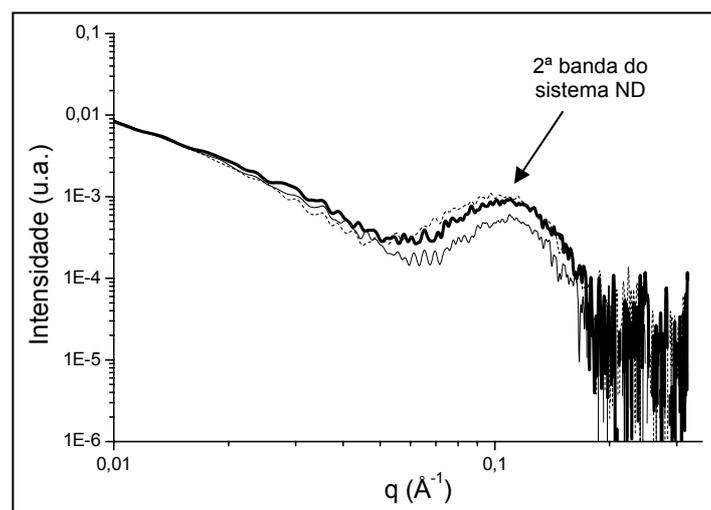


Figura 6.31: Espectros de SAXS para ND logo após NPPT. (····) ND⁰, (—) ND¹, (—) ND³.

Os espectros da Figura 6.30, sistemas NC, permitiram observar que existe correspondência entre a primeira e segunda banda do espectro da PCL com as respectivas bandas do espectro das NC, as mesmas encontraram-se nas mesmas regiões de q , para ambos os sistemas. Os valores de “ q ” máximos para as bandas dos espectros de NC, NS e ND encontram-se na Tabela 6.6.

Tabela 6.6: Valores de q (\AA^{-1}) máximo para as bandas encontradas nos espectros de NC, NS e ND.

Formulação	Após NPPT		Após 20 dias	
	1ª banda	2ª banda	1ª banda	2ª banda
NC ⁰	0,0329	*	0,0337	*
NC ¹	0,0342	*	0,0338	*
NC ³	0,0332	*	0,0338	*
NS ⁰	**	0,1033	**	0,1018
NS ¹	**	0,1039	**	0,1046
NS ³	**	0,1049	**	0,1039
ND ⁰	**	0,1025	-	-
ND ¹	**	0,1078	-	-
ND ³	**	0,1068	-	-

*os valores máximos de “ q ” não puderam ser determinados.

**bandas não existentes.

O valor máximo de q para a primeira banda do espectro da PCL foi de $0,0371 \text{ \AA}^{-1}$ e para a segunda banda foi de $0,1023 \text{ \AA}^{-1}$. Os valores máximos de “ q ” encontrados para as NC e para a PCL confirmaram a correspondência entre ambos os espectros, porém somente a primeira banda dos espectros das NC deve corresponder ao polímero, uma vez que a segunda ocorreu também para a formulação de ND, que não contém polímero.

As bandas em $q \cong 0,03 \text{ \AA}^{-1}$ nos espectros de NC (Figura 6.29) indicaram a existência de uma organização na superfície destas nanopartículas. De acordo com JEONG e colaboradores (2003), essa organização deve ser

representativa da presença de regiões cristalinas do polímero. A inexistência destas bandas nos espectros de NS (Figura 6.30) pode ser decorrente da presença do monoestearato de sorbitano atuando como uma impureza entre as cadeias poliméricas e, desse modo, afetando a cristalinidade do polímero.

Essa interferência causada pelo monoestearato de sorbitano não ocorre no caso das NC, pois, em NC o monoestearato de sorbitano encontra-se dissolvido no núcleo oleoso como demonstrado por MULLER e colaboradores (2001), sendo assim, este tensoativo não deve interferir na camada polimérica ao redor do núcleo. Logo, os resultados aqui demonstrados para as NC corroboram com proposta de modelo de NC feita por MULLER e colaboradores (2001) (Figura 3.2), onde esta é formada por um núcleo de monoestearato de sorbitano dissolvido no componente oleoso e este núcleo é envolvido pelo polímero.

Devido à semelhança encontrada entre os espectros obtidos para as NS e ND, os espectros da NS⁰, NS¹, ND⁰ e ND¹ foram sobrepostos (Figura 6.32).

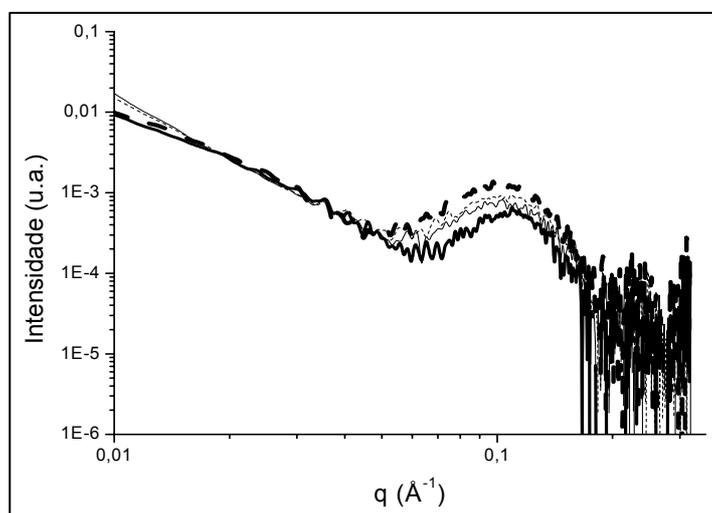


Figura 6.32: Espectros de SAXS para NS e ND logo após NPPT. (····) NS⁰, (—) NS¹, (•••) ND⁰, (—) ND¹.

Existem apenas pequenas diferenças de intensidade entre os espectros das formulações de NS e ND, sendo que as formulações de ND não contêm polímero. A obtenção de espectros semelhantes para estas formulações foi

atribuída à presença de monoestearato de sorbitano, tensoativo lipofílico. Sabendo-se que na formulação de ND o monoestearato de sorbitano é mantido em suspensão apenas na presença de polissorbato 80, tensoativo hidrofílico, pode-se levantar a hipótese de que as NS sejam constituídas de um núcleo de monoestearato de sorbitano rodeado de polímero, e que estes sejam estabilizados pelo polissorbato 80 (Figura 6.33).

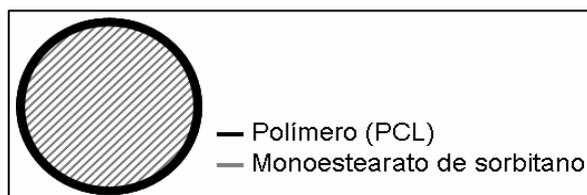


Figura 6.33: Hipótese de modelo de estrutura para NS.

No entanto, esta proposta de estrutura para NS foi refutada, pois se o monoestearato de sorbitano não estivesse interagindo com o polímero se esperaria observar a banda em $q \cong 0,03 \text{ \AA}^{-1}$ representando a porção cristalina do polímero. Desta forma, se aceita como mais provável a estrutura de NS proposta por POHLMANN e colaboradores (2002) (Figura 3.3 (b)), onde o monoestearato de sorbitano se encontra retido na matriz polimérica destes nanocarreadores.

Considerando a hipótese de que as bandas presentes em $q \cong 0,10 \text{ \AA}^{-1}$ nos espectros de NS e de ND são representativas da presença do monoestearato de sorbitano, uma formulação de NS sem fármaco foi preparada na ausência deste tensoativo (NS^{0b}) e analisada através de SAXS (Figura 6.34).

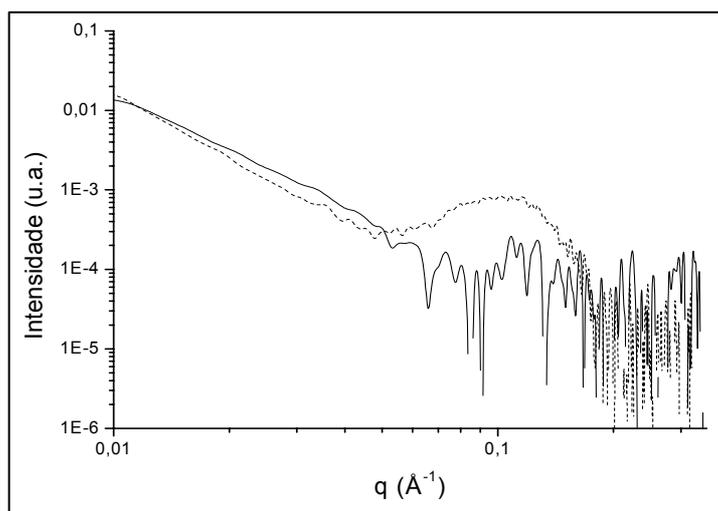


Figura 6.34: Espectros de SAXS para (····) NS^0 e (—) NS^{0b} .

A ausência de uma banda definida em $q \cong 0,10 \text{ \AA}^{-1}$ no espectro da formulação NS^{0b} confirmou que a banda presente nos espectros das ND e das NS contendo monoestearato de sorbitano é representativa deste tensoativo. No entanto, não foi possível identificar a banda referente à porção cristalina do polímero ($q \cong 0,03 \text{ \AA}^{-1}$) no espectro da NS^{0b} . Desta forma pode-se supor que a organização do polímero (PCL) numa NS, independente da presença ou não de monoestearato de sorbitano, afeta o grau de cristalinidade da PCL.

Considerando ainda, que nas formulações de NC o monoestearato de sorbitano se encontra dissolvido no núcleo oleoso (MULLER *et al.*, 2001) e por isso não é passível de detecção por SAXS, o mesmo deve ocorrer com uma formulação que possui o componente oleoso, mas não o polímero, sendo assim, uma formulação de NE sem fármaco (NE^0) foi analisada (Figura 6.35).

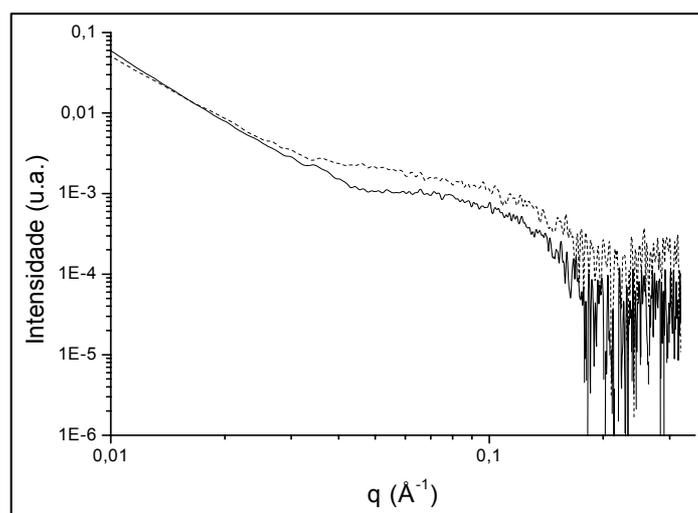


Figura 6.35: Espectros de SAXS para (—) NC^0 e (---) NE^0 .

Pôde-se observar uma grande semelhança entre os espectros de NC e de NE. Sendo assim, considerou-se que as gotículas da NE devem conter monoesterato de sorbitano dissolvido no núcleo oleoso, como nas NC, e este núcleo deve ser estabilizado pelo polissorbato 80 que é o tensoativo hidrofílico (Figura 6.36).

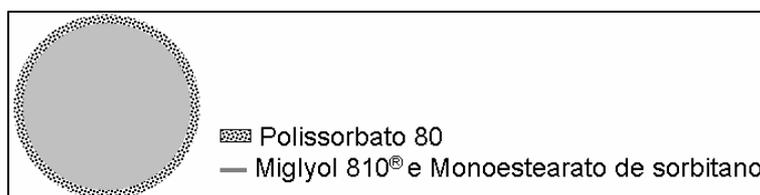


Figura 6.36: Hipótese de modelo de estrutura de NE.

Através da análise dos espectros foi observado que a presença do fármaco altera a intensidade das bandas para as formulações de NS (Figura 6.30) e ND (Figura 6.31). Isso indicou que o fármaco conduziu à alteração na organização do sistema. No caso das NS (Figura 6.37) os cristaltos de fármaco devem estar se intercalando à matriz polimérica e/ou interagindo com o monoesterato de sorbitano presente nesta nanoestrutura. As ND formam micelas que estabilizam o fármaco em suspensão (Figura 6.37), sendo assim, é

esperado que se observem diferenças entre as formulações contendo ou não fármaco.

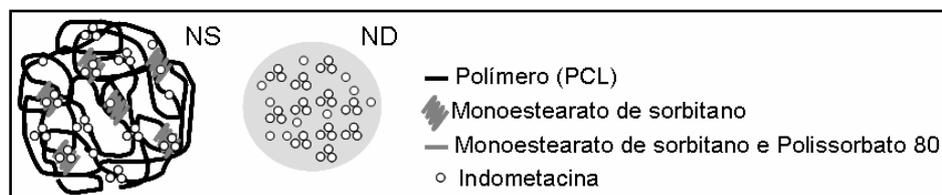


Figura 6.37: Hipótese de modelo de associação da indometacina a NS de PCL e ND compostas de monoestearato de sorbitano e polissorbitato 80.

A formulação ND³ possui uma estabilidade muito limitada devido ao excesso de fármaco, apresentando precipitado poucas horas após seu preparo. Se este precipitado fosse formado basicamente de fármaco, isso explicaria a intensidade observada no espectro da ND³ ser semelhante à intensidade do espectro da ND⁰, uma vez que as análises de SAXS foram realizadas cerca de 24h após o preparo das formulações. Para verificar esta hipótese, foi determinado o ponto de fusão do precipitado através de placa aquecida. O precipitado apresentou ponto de fusão variando entre 148 °C e 152 °C, estando próximo ao ponto de fusão da indometacina que encontra-se em torno de 155 °C. Este experimento permitiu se concluir que o precipitado apresentado pela ND³, após algumas horas de preparo, de fato, é formado por fármaco.

6.3.1.1 Determinação das dimensões das regiões identificadas nos espectros de SAXS

As bandas encontradas num espectro de SAXS são representativas de regiões organizadas na estrutura que está sendo analisada. Logo, com os valores máximos de “ q ” podemos calcular a ordem de grandeza (d) destas regiões através da equação 4.16. Os valores obtidos para os sistemas estudados (NC, NS e ND) encontram-se na Tabela 6.7.

Tabela 6.7: Valores de “*d*” obtidos para as formulações de NC, NS e ND.

Formulação	Após preparo		Após 20 dias	
	q (Å ⁻¹)	<i>d</i> (nm)	q (Å ⁻¹)	<i>d</i> (nm)
NC ⁰	0,0329	19,10	0,0337	18,64
NC ¹	0,0342	18,37	0,0338	18,59
NC ³	0,0332	18,93	0,0338	19,59
NS ⁰	0,1041	6,04	0,1018	6,17
NS ¹	0,1036	6,07	0,1046	6,01
NS ³	0,1049	5,98	0,1039	6,05
ND ⁰	0,1025	6,13	-	-
ND ¹	0,1078	5,83	-	-
ND ³	0,1068	5,88	-	-

As regiões cristalinas presentes no polímero que compõem a superfície das NC possuem dimensões em torno de 18 nm, valores próximos aos encontrados por JEONG e colaboradores (2003). Estes autores investigaram, através de SAXS, micropartículas de PCL contendo papaverina como fármaco e dodecil sulfato de sódio como tensoativo. Ao utilizar PCL de massa molecular 40000 g/mol no preparo das micropartículas obtiveram $d= 13,5$ nm e ao utilizar PCL de massa molecular 80000 g/mol obtiveram $d= 15,0$ nm. Considerando as diferenças dos sistemas estudados por JEONG e colaboradores (2003) em relação aos sistemas do presente estudo, cristalitos com lamelas em torno de 18 nm para o polímero que recobre o núcleo das nanocápsulas são aceitáveis.

Como visto anteriormente, as ND apresentam espectros muito semelhantes aos espectros de NS, devido à presença do monoestearato de sorbitano, e ambas apresentam valores de “*d*” que variam de 5,83 nm a 6,17 nm (Tabela 6.7), novamente comprovando a semelhança entre os resultados obtidos para estas formulações.

6.3.2 Influência da concentração de polímero em formulações de NC

Foram realizadas análises de SAXS com formulações contendo concentrações de polímero inferiores, em relação à formulação NC⁰, com o intuito de investigar alterações que podem ocorrer na estrutura das NC. Alterações tais como na espessura da camada polimérica, verificar se esta camada é contínua ou não e, além disso, verificar se ocorrem alterações na organização dos componentes. Os espectros obtidos para as formulações sem fármaco podem ser observados na Figura 6.38.

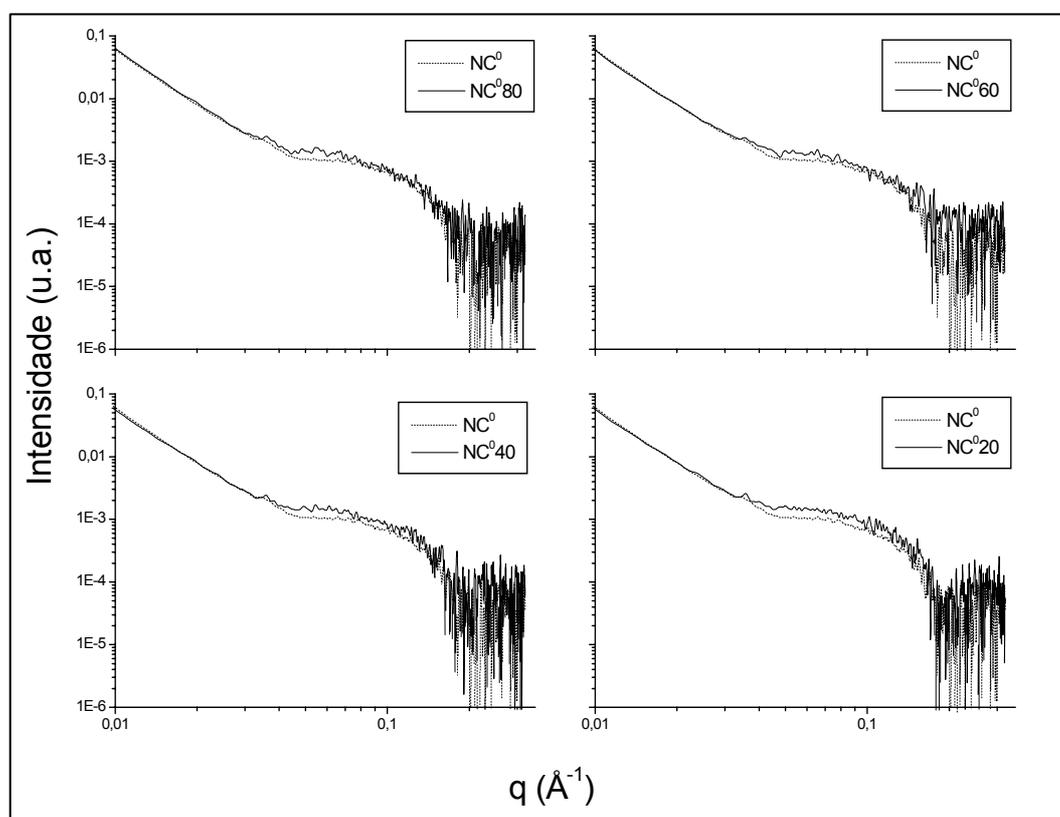


Figura 6.38: Espectros de SAXS para NC⁰ contendo diferentes concentrações de polímero.

A variação na quantidade de polímero utilizado no preparo das NC não alterou o perfil dos espectros de SAXS. Ainda é possível perceber a banda referente à porção cristalina do polímero ($q \cong 0,03 \text{ \AA}^{-1}$) (Tabela 6.8), isso é um

indicativo de que as NC devem manter a mesma organização de seus componentes, independente da concentração de polímero que foi utilizada.

Tabela 6.8: Valores de “ q ” e “ d ” obtidos para as formulações de NC contendo diferentes concentrações de polímero.

Formulação	q (\AA^{-1})	d (nm)
NC ⁰ 80	0,0359	17,51
NC ⁰ 60	0,0340	18,50
NC ⁰ 40	0,0351	17,89
NC ⁰ 20	0,0352	17,84

Foram preparadas também, formulações com menor concentração de polímero, porém com fármaco associado na concentração de 1 mg/mL. Os espectros obtidos encontram-se na Figura 6.39.

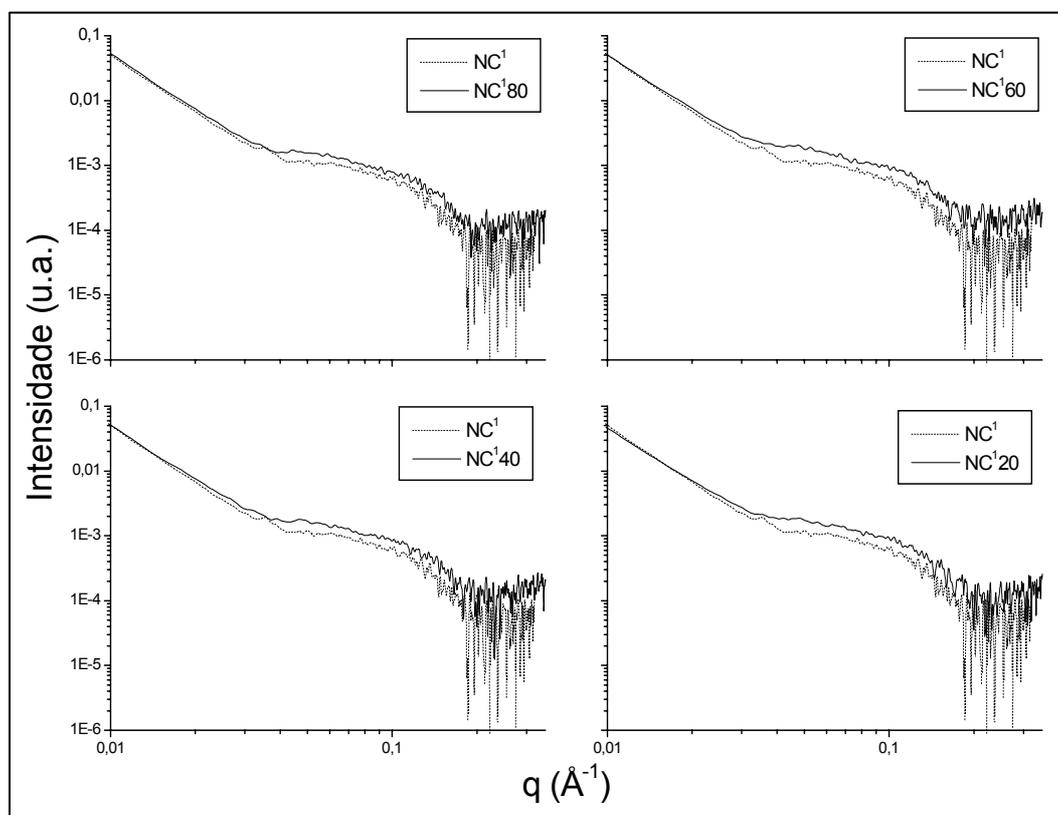


Figura 6.39: Espectros de SAXS para NC¹ contendo diferentes concentrações de polímero.

Não foi mais possível a identificação da porção cristalina do polímero em NC contendo concentração reduzida deste (NC¹⁸⁰, NC¹⁶⁰, NC¹⁴⁰ e NC¹²⁰) quando o fármaco foi associado ao sistema. A indometacina deve ter interferido na organização das cadeias poliméricas em torno do núcleo oleoso quando a concentração de polímero foi inferior a 10 mg/mL.

Uma vez que foi possível detectar a influência da indometacina sobre a organização do polímero, conclui-se que esta esteja na interface partícula/água, associada ao polímero. Sendo assim, estes dados vêm corroborar com a proposta de POHLMANN e colaboradores (2004) onde em sistemas NC de PCL contendo Miglyol[®] 810 como núcleo oleoso, a indometacina está localizada na interface partícula/água (Figura 6.40).

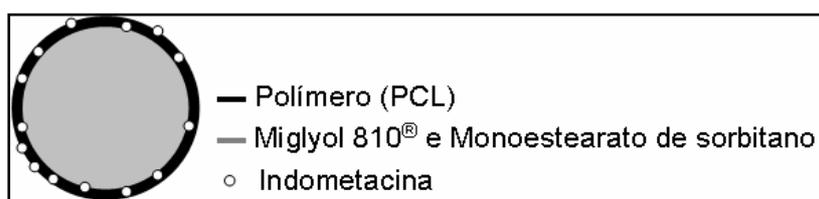


Figura 6.40: Modelo de associação da indometacina a NC de PCL contendo Miglyol[®] 810 como núcleo oleoso proposto por POHLMANN e colaboradores (2004).

É importante ressaltar que este estudo é preliminar. Para a melhor interpretação dos espectros com relação à presença de fármaco seriam necessários novos experimentos de SAXS, talvez, utilizando outros fármacos associados além da indometacina, que foi utilizada nesse estudo. Quanto a melhor identificação da porção cristalina do polímero, seriam necessários experimentos com maior tempo de medida para que desta forma fosse possível reduzir o ruído e melhor evidenciar esta banda.

7. CONCLUSÕES

- Não há relaxação das cadeias poliméricas envolvidas na redução dos valores de pH segundo o tempo, baseado nos resultados de pH e $\rho_{c \rightarrow 0}$ obtidos para os sistemas NC, com fármaco, tratados ou não termicamente.
- Os valores de $\rho_{c \rightarrow 0}$ para os sistemas estudados (NC⁰, NC¹, NC^{1a}, NS⁰, NE⁰) são inferiores a 0,015, demonstrando que estes sistemas praticamente não apresentam anisotropia, logo consistem de sistemas cujas partículas são esféricas.
- Os valores de $\rho_{c \rightarrow 0}$ obtidos para a NC³ estão em torno de 0,02 demonstrando que a presença de fármaco em excesso está causando leve aumento da anisotropia do sistema.
- Os diâmetros médios para os sistemas NC estudados encontram-se entre 175 e 400 nm, com distribuição unimodal, estáveis por 120 dias. Para os sistemas NS e NE os diâmetros médios encontram-se entre 150 e 300 nm, também com distribuição unimodal, estáveis por pelo menos 25 dias. A polidispersão para os sistemas NC, NS e NE apresentou valores variando entre 0,05 e 0,3.
- As NC, com ou sem fármaco associado, demonstraram-se estáveis quanto ao diâmetro médio (em torno de 280 ± 20 nm), polidispersão (entre 0,05 e 0,3) e grau de despolarização da luz espalhada (ρ) (entre 0,010 e 0,015) até 120 dias de armazenagem.
- Não são formados nanocristais de fármaco durante o processo de preparação da formulação NC¹, além disso, a redução do teor de fármaco em 150 dias de armazenagem é desprezível.
- Nas formulações NC³ e ND¹ são formados nanocristais de fármaco durante o processo de preparação destas nanopartículas, e estes nanocristais estão relacionados com a redução do teor de fármaco, apresentado por estas formulações ao longo do tempo, devido a sua agregação e precipitação.
- Foi possível estabelecer uma relação entre a Razão de Rayleigh e o teor de indometacina das formulações de NC e ND, sendo que, quando a Razão de

Rayleigh diminui com o tempo observa-se também uma diminuição do teor de fármaco.

- Os estudos comparativos entre NC, NS, NE e ND, através de SAXS, demonstraram que a organização em nível molecular difere para os sistemas com diferentes composições qualitativas.
- O modelo de NS como uma matriz heterogênea composta de poli(ϵ -caprolactona) retendo monoestearato de sorbitano foi corroborado pelos dados de SAXS, assim como o modelo de NC onde o núcleo é formado pelo monoestearato de sorbitano dissolvido no componente oleoso e estes são envolvidos pelo polímero.
- Os resultados de SAXS para as amostra onde a concentração de polímero foi reduzida, na ausência de fármaco (NC⁰80, NC⁰60, NC⁰40 e NC⁰20), demonstraram que a concentração de polímero não influencia na organização em nível molecular desses sistemas.
- Os resultados de SAXS para as formulações que tiveram a concentração de polímero reduzida, porém, na presença de fármaco (NC¹80, NC¹60, NC¹40 e NC¹20), corroboraram com o modelo de associação da indometacina, na interface partícula/água, em sistemas contendo poli(ϵ -caprolactona) como polímero e Miglyol[®] 810 como núcleo oleoso.

8. REFERÊNCIAS

- AL KHOURI, N.; ROBLOT-TREUPEL, L.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 28, p. 125-135, 1986.
- ALVAREZ-ROMÁN, R.; BARRÉ, G.; GUY, R. H.; FESSI, H. Bidegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.52, p. 191-195, 2001.
- AVGOUSTAKIS, K.; BELTSI, A.; PANAGI, Z.; KLEPETSANIS, P.; KARYDAS, A. G.; ITHAKISSIOS, D.S. PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: *in vitro* nanoparticle degradation, *in vitro* drug release and *in vivo* drug residence in blood properties. *Journal of Controlled Release*, v. 79, p. 123-135, 2002.
- BARICHELLO, J. M.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 25, p. 471-476, 1999.
- BERNE, B.J.; PECORA, R. *Dynamic light scattering*. New York: Wiley, 1974
- BOOTZ, A.; VOGEL, V.; SCHUBERT, D.; KREUTER, J. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v.57,p.369-375, 2003.
- BOUWSTRA, J.A.; GOORIS, G.S.; BRAS, W.; TALSMA, H. Small Angle X-Ray Scattering: possibilities and limitations in characterization of vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.64, p.83-98, 1993.
- BROWN, W. *Dynamic light scattering: the method and some applications*. Oxford: University Press, 1993. ŠTĚPÁNEK, P. Cap. 4
- CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.85, n.5, p.530-536, 1996.
- CAUCHETIER, E.; DENIAU, M.; FESSI, H.; ASTIER, A.; PAUL, M. Atavaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of polymer on their *in vitro* characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, v.250, p.273-281, 2003.
- COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. *Critical ReviewsTM in Therapeutic Carrier Systems*, v.19, p.99-134, 2002.
- COUVREUR, P.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.41, p. 2-13, 1995.

COUVREUR, P.; ROLAND, M.; SPEISER, P. Biodegradable submicromic particles containing a biologically active and composition containing then. *U.S. Patent*, 4329332, 1982.

CRUZ, L. *Estudo físico-químico de sistemas nanoestruturados contendo indometacina e seu éster etílico e avaliação in vivo da atividade anti-dematogênica*. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

DAVIDSON, P. X-Ray diffraction by liquid crystalline side-chain polymers. *Progress in Polymer Science*, v.21, p.893-950, 1996.

DEMUS, D.; GOODBY, J.; GRAY, G.W.; SPIESS, H.W.; VILL, V. *Handbook of Liquid Crystal*. v. 1. New York: Willey-VHC, 1998.

DITTMER, M.; DURRANI, M.; LEHMANN, K. Acrylic polymers: A review of pharmaceutical applications. *S. T. P. Pharma Science*, v. 7, p. 403-437, 1997.

FESSI, H.; PUISEIUX, F.; DEVISSAGUET, J-P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, v.55, p.R1-R4, 1989.

FESSI, H.; PUISEIUX, F.; DEVISSAGUET, J-P. Procédé de preparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. *European Patent*, 0274961 A1, 1988.

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

GEORGALIS, Y., SCHULER, J., FRANK, J., SOUMPASIS, M. D., SAENGER, W. Protein crystallization screening through scattering techniques. *Advances in Colloid and Interface Science*, v.58, p. 57-86, 1995.

GOVENDER, T.; STOLNIK, S.; GARNETT, M. C.; ILLUM, L.; DAVIS, S.S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release*, v. 57, p. 171-185, 1999.

GUINEBRETIERE, S.; BRIANON, S.; FESSI, H.; TEODORESCU, V. S.; BLANCHIN, M. G. Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy. *Materials Science and Engineering C*, v. 21, p. 137-142, 2002.

GUTERRES, S. S.; WEISS, V.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, R. Influence of bezyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. *Drug Delivery*, v. 7, p. 195-199, 2000.

GUTERRES, S.S.; POLHMANN, A. R.; DALLA COSTA, T.; BASSANI, V. L.; MULLER, C. R. Processo de secagem de suspensões coloidais de

nanocápsulas e nanoesferas polimérica por aspersão. *Brazilian Patent*, INPI: PI9906081-7, 1999.

GUTERRES, S.S.; FESSI,H.; BARRAT,G.; DEVISSAGUET, J-P.; PUISIEX, F. Poly(D, L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. formulation and stability study. *International Journal of Pharmaceutics*, v.13, p.57-63, 1995.

HELLWEG, T.; EIMER, W. The micro-structures formed by Ni²⁺-AOT/cyclohexane/water microemulsions: a light scattering study. *Colloids and Surfaces A*, v.136, p.97-107, 1998.

JEONG, J.C.; LEE, J.; CHO, K. Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres. *Journal of Controlled Release*, v.92, p.249-258, 2003.

LACOUILONCHE, F.; GAMISANS, F.; CHAUVET, A.; GARCÍA, M. L.; ESPINA, M.; EGEA, M. A. Stability and in vitro drug release of flurbiprofen-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanospheres. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 25, p. 983-993, 1999.

LEAVY, M. Y.; BENITA, S. Drug release from submicrom O/W emulsion: A new *in vitro* kinetic evaluation model. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 66, p.29-37, 1990.

LEMOINE, D.; FRANÇOIS, C.; KEDZIEREWICZ, F.; PREAT, V.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Stability study of nanoparticles, of poly(ϵ -caprolactone), poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials*, v. 17, p. 2191-2197, 1996.

LEROUX, J. C.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; GURNY, R. New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 41, p.14-18, 1995.

Li, Y-P.; Pei, Y-Y.; Zhang, X-Y.; Gu, Z-H.; Zhou, Z-H.; Yuan, W-F; Zhou, J-J.; Zhu J-H.; Gao, X-J. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *Journal Controlled Release*, v. 71, p.203-211, 2001.

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

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

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticles characterization: a comprehensive physicochemical approach. *STP Pharma Sciencs*, v. 1, n. 4, p. 221-241, 1991.

- MALLIN, M.; HILJANEN-VAINIO, M.; KARJALAINEN, T.; SEPALA, J. Biodegradable lactone copolymers. II. Hydrolytic study of ϵ -caprolactone and lactide copolymers. *Journal of Applied Polymer Science*, v.59, p. 1289-1298, 1996.
- MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. *Análise de suspensões de nanopartículas poliméricas contendo indometacina através de Espalhamento de Luz Dinâmico*. XIII Salão de Iniciação Científica - Livro de Resumos, p.415-416, 2001.
- MERTINS, O. *Desenvolvimento e caracterização de nanovesículas lipossômicas compósitas de fosfatidilcolina da lecitina de soja e quitosana*. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- MULLER, C. R.; HAAS, S. E.; BASSANI, V. L.; GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; PERALBA, M. C. R.; POHLMANN, A. R. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 555-560, 2004.
- MULLER, C. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; SILVEIRA, N. P.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Spray-dried diclofenac-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. *Pharmazie*, v.56, n.11, p.864-867, 2001.
- MULLER, C. R. *Desenvolvimento tecnológico e avaliação biológica de nebulizados de nanocápsulas e nanoesferas contendo diclofenaco*. 1999. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.
- PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.55, p. 329-347, 2003.
- PAUL, M.; FESSI, H.; LAATIRIS, A.; BOULARD, Y.; DURAND, R.; DENIAU, M.; ASTIER, A. Pentamidine-loaded poly(D,L-lactide nanoparticles: physicochemical properties and stability work. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 159, p. 223-232, 1997.
- PECORA, R. e BERNE, B. J. *Dynamic Light Scattering with applications to chemistry, biology and physics*. New York: Dover Publications, Inc. 2000.
- PEREIRA, F. V. *Comportamento mesomórfico, estrutura e ordenação de cristais líquidos poliméricos em massa e em solução: um estudo através de Espalhamento de Luz e Raios-X*. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

- PEREIRA, F. V.; MERLO, A. A.; SILVEIRA, N. P. Behaviour of mesogenic side group polyacrilates in dilute and semidilute regime. *Polymer*, v.42, p.3901-3908, 2002.
- POLHMANN, A. R.; SOARES, L. U.; CRUZ, L.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. Alkaline hydrolysis as a tool to determine the association form of indomethacin in nanocapsules prepared with poly(ϵ -caprolactone). *Current Drug Delivery*, v.1, p.103-110, 2004.
- POLHMANN, A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; da SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S.S. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.16, p.305-012, 2002.
- QUINTANAR-GUERRERO, D.; FESSI, H.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 143, p. 133-141, 1996.
- RAFFIN, R. P.; OBACH, E. S.; MEZZALIRA, G.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocápsulas poliméricas secas contendo indometacina: estudo de formulação e de tolerância gastrointestinal em ratos. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, v.22, p.163-172, 2003.
- RAO, G. C. S.; KUMAR, M. S.; MATHIVANAN, N.; RAO, M. E. B. Nanosuspension as the most promising approach in nanoparticulate drug delivery systems. *Pharmazie*, v. 59, p. 5-9, 2004.
- REYNOLDS, J. E. F. *Martindale the Extra Pharmacopeia*. Londres: Pharmaceutical Press, 30 ed, 1993.
- SANTOS-MAGALHÃES, N.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. W.; CAETANO, M. N. P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 208, p. 71-80, 2000.
- SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; CORDOVA de, C. A. S.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; GUTERRES, S. S. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 289, p. 209-213, 2005.
- SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspension: nanocapsules, nanospheres and nanosuspensions. A comparative study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 56, p.501-505, 2003.
- SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v.21, n.2, p.99-106, 2002.
- SCHAFFAZICK, S. R. *Caracterização físico-química e avaliação biológica de liofilizados de nanopartículas poliméricas contendo diclofenaco*. Dissertação

(Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

SCHMITZ, S. K. *An introduction to dynamic light scattering by macromolecules*, New York: Academic Press, 1990.

SILVEIRA, N. P.; SAMIOS, D.; STREHLE, F.; DORFMULLER, T. Determination of the optical anisotropy of atatic polystyrene using a grating monochromator. *Macromol. Chem. Phys.*, v.197, p.1945-1957, 1996.

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

SOARES, L. U. *Estudo comparativo da difusão do éster etílico de indometacina associado à nanocápsulas, nanoesferas ou nanoemulsões através de sua hidrólise alcalina*. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

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

TEIXEIRA, M.; ALONSO, M. J.; PINTO, M. M. M.; BARBOSA, C. M. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-metoxyxanthone. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. In press, 2004.

VERGER, L. L. M.; FLUCKIGER, L.; KIM, Y. I.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 46, p. 137-143, 1998.

WEISS, V. *Avaliação tecnológica de suspensões e nebulizados de nanocápsulas e nanoesferas contendo indometacina*. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

YU, W.; TABOJA do EGITO, E. S.; BARRAT, G.; FESSI, H., DEVISAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. A novel approach to the preparation of injectable emulsions by spontaneous emulsification process. *International Journal of Pharmaceutics*, v.89, p.139-146, 1993.

ANEXO 1

Gráficos de distribuição de diâmetro obtidos por PCS para formulações de NC, ND, NS e NE na diluição de 500 vezes:

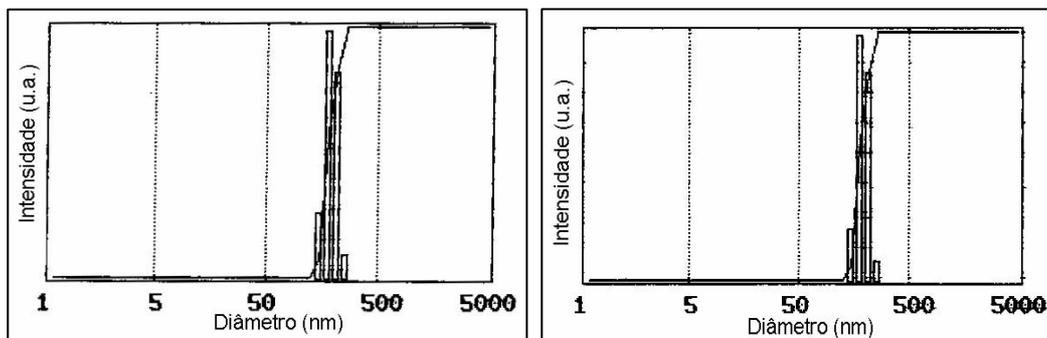


Figura 9.1: Gráfico de distribuição de diâmetro para NC⁰ logo após preparo e após 120 dias de armazenagem, respectivamente.

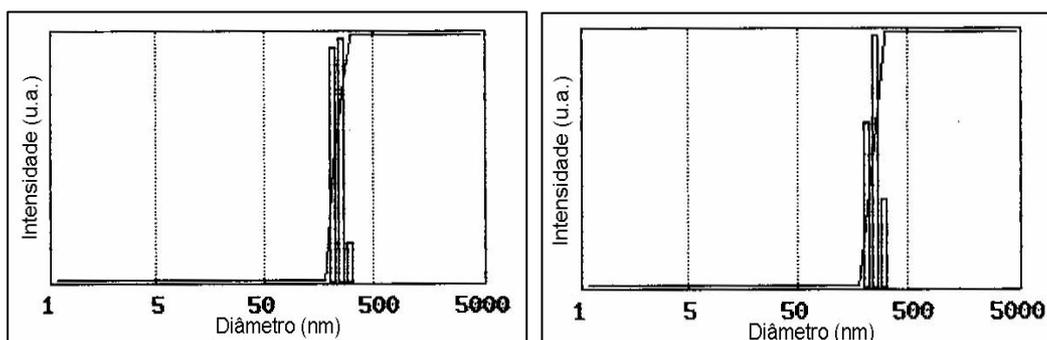


Figura 9.2: Gráfico de distribuição de diâmetro para NC¹ logo após preparo e após 120 dias de armazenagem, respectivamente.

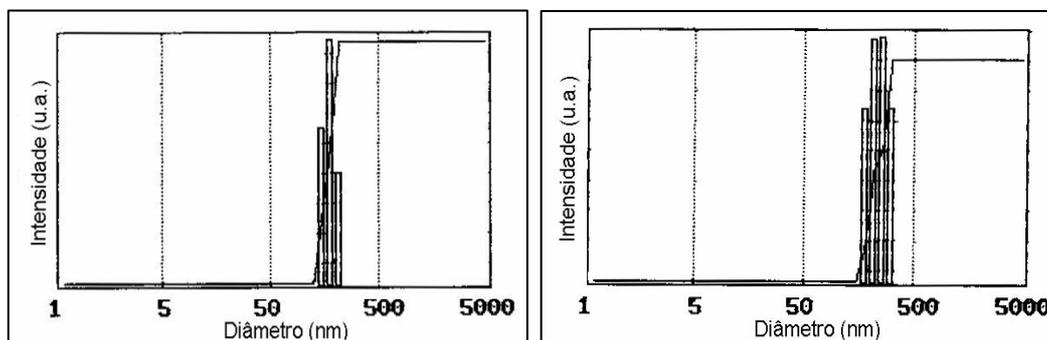


Figura 9.3: Gráfico de distribuição de diâmetro para NC³ logo após preparo e após 14 dias de armazenagem, respectivamente.

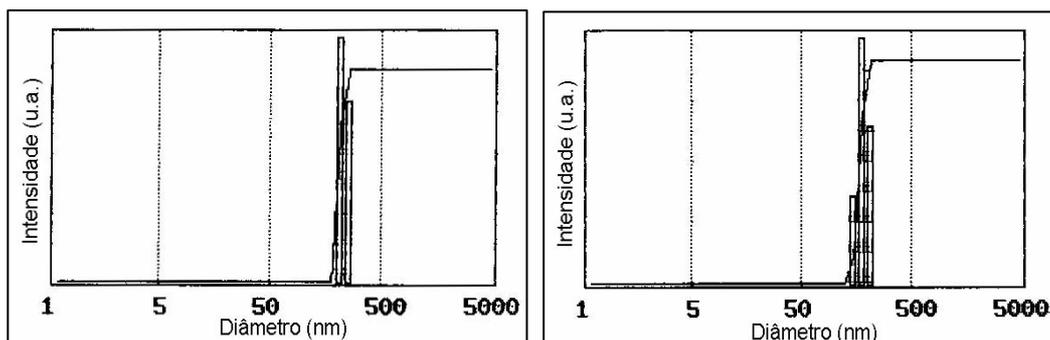


Figura 9.4: Gráfico de distribuição de diâmetro para NS⁰ logo após preparo e após 25 dias de armazenagem, respectivamente.

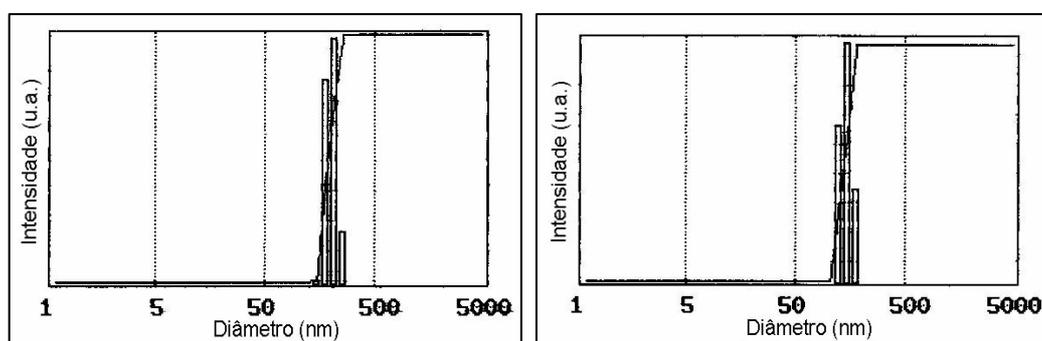


Figura 9.5: Gráfico de distribuição de diâmetro para NE⁰ logo após preparo e após 25 dias de armazenagem, respectivamente.

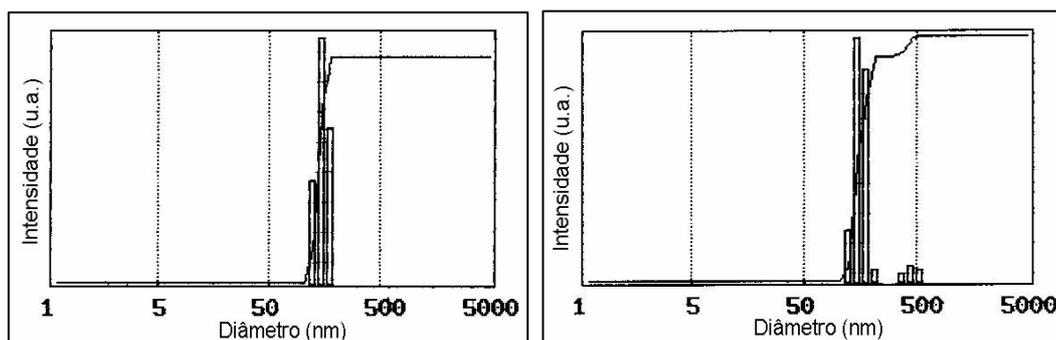


Figura 9.6: Gráfico de distribuição de diâmetro para ND⁰ logo após preparo e após 14 dias de armazenagem, respectivamente.

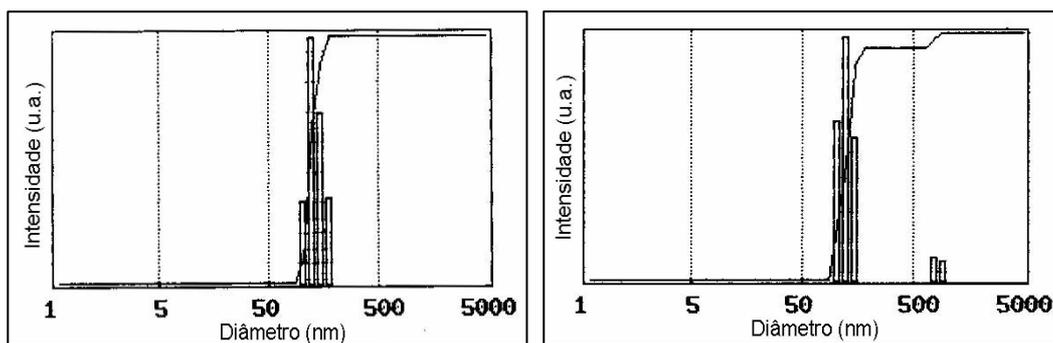


Figura 9.7: Gráfico de distribuição de diâmetro para ND¹ logo após preparo e após 14 dias de armazenagem, respectivamente.

ANEXO 2

Pareceres dos membros da Comissão Examinadora:

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

Nível: Mestrado Acadêmico

Área de concentração:
Pesquisa e desenvolvimento de matérias-primas farmacêuticas e pesquisa e desenvolvimento de medicamentos.

Título: Caracterização de suspensões de nanopartículas poliméricas estudadas como carreadores de fármacos através de espalhamento de luz estático e dinâmico.

Mestranda: GRAZIELA MEZZALIRA

PARECER

A presente dissertação de mestrado trata de caracterização de suspensões de nanopartículas de poli (ε-caprolactona) que contém o fármaco indometacina. Como técnicas principais, utilizaram-se espalhamento de luz estático e dinâmico e, como técnica complementar, espalhamento de raios X a baixo ângulo. O tema desenvolvido é atual, o que pode ser em parte evidenciado pelo fato de que mais de metade das referências bibliográficas citadas data dos últimos cinco anos. O trabalho experimental foi executado de forma sistemática e cuidadosa, o que permitiu testar as hipóteses formuladas no início do trabalho e estabelecer importantes conclusões, como por exemplo, a forma esférica de alguns dos sistemas nanoparticulados, sua baixa polidispersão, a presença de nanopartículas de fármacos em nanopartículas com excesso de fármaco bem como a combinação de modelos estruturais anteriormente propostos para nanocapsulas e nanocapsulas. Em razão do exposto, avaliamos o trabalho como **APROVADO**.

Porto Alegre, 11 de março de 2005


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

Nível: Mestrado Acadêmico

Área de concentração:

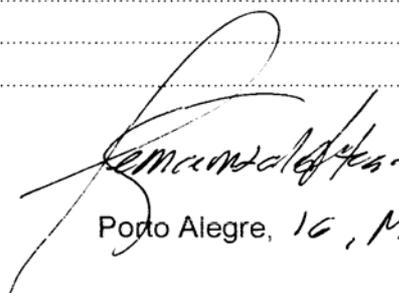
Pesquisa e desenvolvimento de matérias-primas farmacêuticas e pesquisa e desenvolvimento de medicamentos.

Título: Caracterização de suspensões de nanopartículas poliméricas estudadas como carreadores de fármacos através de espalhamento de luz estático e dinâmico.

Mestranda: GRAZIELA MEZZALIRA

PARECER

Trata-se de trabalho sobre tema polêmico e complexo, bem alicerçado e estruturado. Os resultados estão bem discutidos e comparados, quando pertinente, com achados recentes na literatura. Algumas correções de formato ou erros tipográficos têm caráter momentâneo e não refletem a qualidade do trabalho. O aval tem mérito e validade, fornecendo subsídios importantes para o entendimento das estruturas nanoparticuladas objeto desse estudo. Visto o anterior sou eu parecer favorável à concessão do grau de mestre pretendido.



Porto Alegre, 16, Março 2005

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

Nível: Mestrado Acadêmico

Área de concentração:

Pesquisa e desenvolvimento de matérias-primas farmacêuticas e pesquisa e desenvolvimento de medicamentos.

Título: Caracterização de suspensões de nanopartículas poliméricas estudadas como carreadores de fármacos através de espalhamento de luz estático e dinâmico.

Mestranda: GRAZIELA MEZZALIRA

PARECER

O trabalho objetivou a caracterização de nanopartículas de poli (ε-caprolactone) contendo indometacina através de utilizações de técnicas de espalhamento de luz dinâmica e estática e espalhamento de raios-X a baixo ângulo. O tema proposto é atual e altamente complexo e relevante, sendo que os resultados obtidos auxiliam na elucidação da organização das nanoestruturas em nível molecular. O trabalho conta com uma revisão de literatura apresentada de modo objetivo e focado no tema da pesquisa. Os objetivos foram sistematicamente abordados através de metodologias utilizadas. Os resultados obtidos foram adequadamente discutidos sendo as conclusões pertinentes. Em função da qualidade do trabalho apresentado e da contribuição relevante dos resultados obtidos, sou de parecer favorável a aprovação do nome e a concessão do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas à candidata.

Luise Dalke forte

Porto Alegre, 16 de março 2005