

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

Estudo Físico-químico Comparativo de Sistemas Nanoestruturados Contendo
Indometacina ou seu Éster Etilico e Avaliação *in vivo* da Atividade
Antiedematogênica

LETÍCIA CRUZ

Porto Alegre, 2005

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

Estudo Físico-químico Comparativo de Sistemas Nanoestruturados Contendo
Indometacina ou seu Éster Etilico e Avaliação *in vivo* da Atividade
Antiedematogênica

Dissertação apresentada por **Letícia Cruz** para
obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 02 de março de 2005, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Célia Gervásio M. Chaves

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Clarisse Maria Sartori Piatnicki

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Vera Lúcia Eiffler Lima

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

C957e

Cruz, Letícia

Estudo físico-químico comparativo de sistemas nanoestruturados contendo indometacina ou seu éster etílico e avaliação *in vivo* da atividade antiedematogênica / Letícia Cruz – Porto Alegre: UFRGS, 2005 – ix, 114p.: il., gráf., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1.Nanopartículas. 2.Indometacina. 3.Éster etílico de indometacina. 4. Poliéster. I. Pohlmann, Adriana Raffin. II. Título.

CDU: 615.453.4:541.6

Bibliotecária Responsável:

Margarida Maria C. F. Ferreira – CRB10/480

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Adriana R. Pohlmann por sua orientação dedicada, paciência e confiança. Sobretudo, aos ensinamentos transmitidos e oportunidades concedidas.

À Profa. Dra. Sílvia Guterres pela atenção e interesse dispensados ao longo deste trabalho e por sua orientação valiosa na avaliação da atividade antiedematogênica.

À Profa. Dra. Elfrides Schapoval por sua colaboração dedicada no ensaio antiedematogênico. À Profa. Dra. Miriam Appel pelo auxílio prestado nesse ensaio.

À Profa. Dra. Teresa Dalla Costa pela grande colaboração na parte de modelagem matemática dos resultados.

Aos colegas e amigos do laboratório 405 e do grupo de pesquisa pela amizade e auxílios prestados: Marilúcia, Lali, Sandra, Scheila, Ruy, Renata, Valéria, Helen, Graziela, Ana Elisa, Marta, Leandro, Letícia Colomé, Bibiana, Clarissa Bettoni, Clarissa Xavier, Cristiane, Daniela, Eduardo, Érico, Rodrigo Freddo, Gislane, Tassiana, Vanessa, Maria, Fernanda, Letícia Sias, Alessandro, Eliezer, Rodrigo Fortunato, Vitória, Deise e Letícia Ghiggi.

Em especial, à Sandra Haas, Helen Pedroni e Graziela Mezzalira por seus valiosos auxílios.

Ao Leonardo Soares pela amizade e por suas importantes contribuições.

Aos meus pais, Rosane e Gerson, pela formação que me propiciaram, pelo carinho, apoio e incentivos constantes.

Às minhas irmãs, Ana, Andréa, Alessandra, Laura e Luciana pelo carinho, amizade e companheirismo.

À Nádia por seu incentivo e amizade, e ao Gilberto, por seu inestimável auxílio.

Ao Cristiano por seu amor, compreensão e apoio incondicional.

À CAPES, órgão financiador da bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho. À FAPERGS, CNPq e Rede Nanobiotec CNPq/MCT pelo apoio financeiro recebido ao longo deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	03
2. 1 Objetivos Gerais	03
2. 2 Objetivos Específicos	03
3 REVISÃO DA LITERATURA	05
3. 1 Caracterização Físico-química de Nanopartículas	05
3. 2 Mecanismos de Associação do Fármaco	08
3. 3 Modelos de Estrutura de Nanopartículas.....	10
3. 4 Liberação de Fármacos a partir de Sistemas Nanoparticulados	15
3. 4. 1 Teoria da Difusão e Modelos Matemáticos.....	16
3. 4. 2 Perfil da Liberação de Fármacos em Nanopartículas	19
3. 5 Atividade Antiedematogência	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4. 1 Materiais	26
4. 1. 1 Matérias-primas	26
4. 1. 2 Aparelhos e Equipamentos.....	27
4. 1. 3 Solventes e Outros Materiais.....	28
4. 1. 4 Avaliação Biológica.....	29
4. 2 Métodos.....	29
4. 2. 1 Obtenção do Éster Etilico de Indometacina.....	29
4. 2. 2 Método Analítico	30
4. 2. 3 Preparação dos Sistemas Nanoestruturados	31
4. 2. 4 Caracterização Físico-química dos Sistemas Nanoestruturados	32
4. 2. 4. 1 Determinação do pH.....	32
4. 2. 4. 2 Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico das Partículas	33
4. 2. 4. 3 Teor de Sonda (IndOH ou IndOEt) nas Formulações.....	33
4. 2. 5 Diluição das Suspensões da Nanocápsulas com Etanol	34
4. 2. 6 Medida do Diâmetro da Nanocápsula após Adição de Quantidades Crescentes de Etanol.....	34
4. 2. 7 Hidrólise das Sondas em Meio Alcalino.....	34
4. 2. 8 Medidas de Diâmetro de Partícula Durante a Reação de Hidrólise	35

4. 2. 9 Modelagem Matemática dos Perfis Cinéticos.....	35
4. 2. 10 Edema de Pata de Rato Induzido por Carragenina	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5. 1 Obtenção do Éster Etilico de Indometacina.....	38
5. 2 Validação do Método Analítico	39
5. 2. 1 Indometacina	39
5. 2. 2 Éster Etilico de Indometacina	41
5. 3 Formas de Associação da Indometacina nos Sistemas Nanoestruturados	42
5. 3. 1 Suspensões de Nanocápsulas	42
5. 3. 2 Diluição das Suspensões de Nanocápsulas com Etanol	42
5. 3. 3 Medida do Diâmetro das Nanocápsulas após Adição de Quantidades Crescentes de Etanol.....	43
5. 3. 4 Reações de Hidrólise Alcalina	45
5. 3. 5 Determinação do Diâmetro das Nanocápsulas Durante a Reação de Hidrólise.....	48
5. 3. 6 Suspensões de Nanoesferas e Nanoemulsão.....	49
5. 4 Influência da Concentração do Polímero na Difusão do IndOEt.....	53
5. 5 Modelagem Matemática dos Perfis Cinéticos.....	54
5. 5. 1 Estudo Comparativo de Nanocápsulas, Nanoesferas e Nanoemulsão	54
5. 5. 2 Estudo da Influência da Concentração do Polímero na Difusão do IndOEt Associado a Nanocápsulas.....	65
5. 5. 3 Modelagem Matemática dos Perfis Cinéticos Segundo o Modelo da Lei da Potência.....	71
5. 6 Atividade Antiedematogênica	81
6 CONCLUSÕES	86
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
8 ANEXOS	95

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Formas de associação da substância ativa às nanopartículas.....	07
FIGURA 2	Curva de calibração da indometacina	39
FIGURA 3	Determinação da quantidade adsorvida usando etanol	43
FIGURA 4	Efeito da adição de etanol nas suspensões de nanocápsulas	44
FIGURA 5	Perfil cinético da hidrólise da IndOH e do IndOEt em solução	46
FIGURA 6	Perfil cinético da hidrólise da IndOH e do IndOEt em nanocápsulas	47
FIGURA 7	Diâmetro e polidispersão das nanocápsulas contendo IndOH durante a hidrólise	48
FIGURA 8	Diâmetro e polidispersão das nanocápsulas contendo IndOEt durante a hidrólise	49
FIGURA 9	Perfis cinéticos da hidrólise da IndOH em nanoesferas e nanoemulsão	50
FIGURA 10	Perfis cinéticos da hidrólise do IndOEt em nanoesferas e nanoemulsão	51
FIGURA 11	Diâmetro e polidispersão da nanoemulsão contendo IndOH durante a hidrólise	52
FIGURA 12	Diâmetro e polidispersão das nanoesferas contendo IndOH durante a hidrólise	52
FIGURA 13	Modelagem monoexponencial de nanocápsulas e solução contendo IndOH	56
FIGURA 14	Modelagem monoexponencial do IndOEt em NS e NE	56
FIGURA 15	Hidrólise alcalina da indometacina	57
FIGURA 16	Modelagem monoexponencial do IndOEt em solução	59
FIGURA 17	Modelagem mono e biexponencial para NC100	61
FIGURA 18	Modelagem mono e biexponencial para NE	62
FIGURA 19	Modelagem mono e biexponencial para NS	63
FIGURA 20	Formas de associação do IndOEt em NC, NS e NE	65
FIGURA 21	Modelagem mono e biexponencial para NC80	67
FIGURA 22	Modelagem mono e biexponencial para NC60	68
FIGURA 23	Modelagem mono e biexponencial para NC40	69

FIGURA 24	Modelagem mono e biexponencial para NC20.....	70
FIGURA 25	Modelagem da Lei da Potência para NC100.....	72
FIGURA 26	Modelagem da Lei da Potência para NC80.....	73
FIGURA 27	Modelagem da Lei da Potência para NC60.....	74
FIGURA 28	Modelagem da Lei da Potência para NC40.....	75
FIGURA 29	Modelagem da Lei da Potência para NC20.....	76
FIGURA 30	Modelagem da Lei da Potência para NE.....	77
FIGURA 31	Modelagem da Lei da Potência para NS.....	78
FIGURA 32	Diâmetro e polidispersão de NC80.....	79
FIGURA 33	Diâmetro e polidispersão de NC60.....	79
FIGURA 34	Diâmetro e polidispersão de NC40.....	80
FIGURA 35	Diâmetro e polidispersão de NC20.....	80
FIGURA 36	Dispersão do IndOEt nas nanoestruturas.....	81
FIGURA 37	Aumento do volume das patas dos ratos tratados com NC-IndOEt.....	82
FIGURA 38	Aumento do volume das patas dos ratos tratados com NS-IndOEt.....	83
FIGURA 39	Aumento do volume das patas dos ratos tratados com NE-IndOEt.....	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Mecanismo de liberação do fármaco a partir de sistemas poliméricos de diferentes geometrias.....	19
TABELA 2	Composição quali e quantitativa das formulações	31
TABELA 3	Coeficientes de correlação das curvas de calibração	40
TABELA 4	Exatidão do método analítico	40
TABELA 5	Coeficientes de variação intra e inter-dia do método analítico	41
TABELA 6	Características físico-químicas das nanocápsulas	42
TABELA 7	Características físico-químicas das nanoesferas e nanoemulsão ...	50
TABELA 8	Características físico-químicas das nanocápsulas com diferentes concentrações de polímero.....	53
TABELA 9	Tempo de consumo total do IndOEt.....	54
TABELA 10	Modelagem monoexponencial para IndOH	55
TABELA 11	Modelagem monoexponencial para o IndOEt em solução	58
TABELA 12	Modelagem matemática para o IndOEt em nanocápsulas	60
TABELA 13	Modelagem matemática para o IndOEt em nanoemulsão.....	62
TABELA 14	Modelagem matemática para o IndOEt em nanoesferas	63
TABELA 15	Modelagem matemática para o IndOEt em NC80	66
TABELA 16	Modelagem matemática para o IndOEt em NC60	67
TABELA 17	Modelagem matemática para o IndOEt em NC40	68
TABELA 18	Modelagem matemática para o IndOEt em NC20	69
TABELA 19	Modelagem da Lei da Potência para NC100.....	71
TABELA 20	Modelagem da Lei da Potência para NC80.....	72
TABELA 21	Modelagem da Lei da Potência para NC60.....	73
TABELA 22	Modelagem da Lei da Potência para NC40.....	74
TABELA 23	Modelagem da Lei da Potência para NC20.....	75
TABELA 24	Modelagem da Lei da Potência para NE	76
TABELA 25	Modelagem da Lei da Potência para NS	77
TABELA 26	Expoentes de liberação das nanoestruturas	79
TABELA 27	Atividade antiedematogênica do IndOEt associado aos nanocarreadores	82

LISTA DE ABREVIATURAS

IndOH	Indometacina
IndOEt	Éster etílico de indometacina
NC	Nanocápsulas
NS	Nanoesferas
NE	Nanoemulsão
NC-IndOEt	Nanocápsulas contendo éster etílico de indometacina
NS-IndOEt	Nanoesferas contendo éster etílico de indometacina
NE-IndOEt	Nanoemulsão contendo éster etílico de indometacina
NC100	Formulação de nanocápsula com 10,0 mg/mL de poli(ϵ -caprolactona)
NC80	Formulação de nanocápsula com 8,0 mg/mL de poli(ϵ -caprolactona)
NC60	Formulação de nanocápsula com 6,0 mg/mL de poli(ϵ -caprolactona)
NC40	Formulação de nanocápsula com 4,0 mg/mL de poli(ϵ -caprolactona)
NC20	Formulação de nanocápsula com 2,0 mg/mL de poli(ϵ -caprolactona)

RESUMO

Nanocápsulas (NC), nanoesferas (NS) e nanoemulsão (NE) são propostas na literatura como carreadores submicrométricos de fármacos. Os objetivos deste trabalho são realizar um estudo comparativo para diferenciar o comportamento cinético desses sistemas e avaliar a influência da espessura da parede polimérica das NC no perfil de liberação de um modelo lipofílico de fármaco a partir de diversas formulações preparadas com diferentes concentrações de poli(ϵ -caprolactona) (PCL). Com esse propósito, o éster etílico de indometacina (IndOEt) foi associado a cada sistema e a sua hidrólise alcalina foi realizada para simular uma condição *sink*. As suspensões aquosas foram tratadas com solução aquosa de NaOH e a modelagem matemática dos perfis de consumo do IndOEt foi realizada. Uma vez que os derivados éster de indometacina têm sido relatados como inibidores seletivos da ciclooxigenase-2, também constitui objetivo deste trabalho avaliar a atividade antiedematogênica em ratos do IndOEt associado aos nanocarreadores através da inibição do edema em pata de rato induzido por carragenina. O IndOEt apresentou consumo total em 24 horas para NC, 12 horas para NS e 8 horas para NE. A modelagem matemática demonstrou que os perfis cinéticos apresentaram uma fase de liberação rápida, com tempo de meia-vida de 5,9, 4,4 e 2,7 minutos, e uma fase de liberação sustentada com tempos de meia-vida de 288,8, 87,7 e 147,5 minutos, respectivamente. Comparando-se os resultados, as NC apresentaram os maiores tempos de meia-vida para o modelo lipofílico de fármaco associado aos nanocarreadores. Para todas as formulações preparadas com diferentes concentrações de PCL, a modelagem matemática dos perfis demonstrou que quanto menor a concentração de polímero empregada, mais rápido é o consumo do éster. Para todos os sistemas estudados, um ajuste satisfatório dos dados experimentais ao modelo da Lei das Potências foi obtido. A incorporação do IndOEt em NC e NS apresentou atividade antiedematogênica após a administração oral das formulações. Por outro lado, a associação do IndOEt na NE não inibiu o edema induzido pela carragenina.

Palavras-chave: nanopartículas, nanocápsulas, indometacina, hidrólise alcalina, poliéster, poli(ϵ -caprolactona), éster etílico de indometacina.

Comparative physico-chemical study of nanostructured systems containing indomethacin or its ethyl ester and *in vivo* evaluation of antiedematogenic activity

Nanocapsules (NC), nanospheres (NS) and nanoemulsion (NE) are proposed in the literature as submicronic drug carriers. The aims of this work were to carry out a comparative study to differentiate the kinetic behavior of these systems and evaluate the influence of the thickness of the polymeric wall of NC on the release profile of lipophilic model of drug from several formulations prepared using different concentrations of poly(ϵ -caprolactona) (PCL). With this purpose, the indomethacin ethyl ester (IndOEt) was entrapped within each system and its alkaline hydrolysis were carried out to simulate a *sink* condition. The aqueous suspensions were treated with NaOH aqueous solution and the consumption profiles of the indomethacin ethyl ester due to its alkaline hydrolysis were mathematically modeled. Since the ester derivatives of indomethacin have been described as selective cyclooxygenase-2 inhibitors, the antiedematogenic activity in rats of the nanocarriers containing IndOEt by inhibition of acute edema produced by injection of carrageenin was also carried out. The total disappearance of IndOEt from each reaction was 24 h for NC, 12 h for NE and 8 h for NS. Mathematical modeling of the disappearance of the ester was conducted, showing that the burst phases presented half-life times of 5,9, 4,4 and 2,7 min, and the sustained phase half-life times were 288,8, 87,7 and 147,5 min, respectively. Comparing the data, nanocapsules presented the highest half-life times for a lipophilic model of drug entrapped within the nanocarriers. For all formulations prepared using different concentrations of PCL, mathematical modeling of the profiles showed that as lower the polymer concentration was used as faster the consumption of the ester was observed. For all systems, a satisfactory agreement between Power Law and experimental data was found. The incorporation of IndOEt in NC and NS exhibit antiedematogenic activity following oral administration. On the other hand, the incorporation of IndOEt in NE did not inhibit carrageenin-induced edema.

Key words: nanoparticles, nanocapsules, indomethacin, alkaline hydrolysis, polyester, poly(ϵ -caprolactona), indomethacin ethyl ester.

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas nanoestruturados apresentam dimensões situadas entre 10 e 1000 nm e diferem entre si de acordo com a composição qualitativa e organização em nível molecular (COUVREUR *et al.*, 1995). As nanocápsulas são formadas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, enquanto que as nanoesferas são sistemas matriciais, constituídos de polímero. As nanoemulsões são emulsões submicrométricas, nas quais uma dispersão líquido-líquido é estabilizada por agregados de tensoativo (MAGENHEIM e BENITA, 1991; LANGEVIN, 1992).

Nos últimos anos, esses sistemas nanoestruturados têm sido investigados em estudos fundamentais e aplicados para verificar a possibilidade de serem utilizados como carreadores de fármacos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Este interesse reflete a necessidade de liberação do fármaco em áreas específicas do corpo, objetivando, principalmente, aumentar o índice terapêutico e diminuir efeitos colaterais (BARRATT, 2000; HANS e LOWMAN, 2002). Além desses benefícios, as nanoestruturas também são potencialmente capazes de proteger o fármaco frente à degradação enzimática, química ou imunológica (BARRATT, 2000).

O comportamento *in vivo* desses sistemas está relacionado com suas características físico-químicas, sendo, desta forma, importante estabelecer modelos de estruturas e elucidar a forma de associação do fármaco às nanoestruturas para compreensão do seu comportamento biológico (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). No entanto, a caracterização físico-química desses sistemas é tecnicamente difícil de ser realizada devido ao tamanho reduzido das partículas (MAGENHEIM e BENITA, 1991).

A maioria dos métodos empregados para analisar as nanoestruturas determinam o estado físico e a natureza química dos componentes do sistema. Técnicas como a espectroscopia nas regiões do infravermelho e visível são muito sensíveis na detecção dos componentes químicos, entretanto, falham na determinação de detalhes estruturais. Métodos de análise térmica como a calorimetria diferencial exploratória permitem a identificação dos estados de fase e suas correspondentes transições, mas não fornecem informação detalhada a respeito da natureza química das fases individuais. A análise através de microscopia eletrônica freqüentemente é prejudicada por possíveis artefatos e a microscopia óptica é inadequada quando aplicada a estruturas submicrométricas (MAYER *et al.*, 2002).

Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (POHLMANN *et al.*, 2002; GUTERRES *et al.*, 2000) foram propostos modelos tanto de organização molecular de nanopartículas, quanto de organização micelar em suspensões poliméricas. Estudos comparativos, caracterizando-se nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão, foram realizados com base nas propriedades de liberação de modelos de fármaco a partir desses carreadores (LOPES *et al.*, 2000; SOARES, 2003). Dentre esses estudos, o uso de um derivado lipofílico não-ionizável de indometacina (SOARES, 2003) foi proposto como sonda de uma reação interfacial de hidrólise alcalina, simulando uma condição *sink* de liberação. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo diferenciar o comportamento de liberação do modelo de substância lipofílica a partir de nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão, assim como demonstrar a influência da parede polimérica das nanocápsulas na liberação da sonda lipofílica. Uma vez que a sonda escolhida, o éster etílico de indometacina, foi descrita como inibidor seletivo de ciclooxigenase-2 (KALGUTKAR *et al.*, 2000), também constitui objetivo deste trabalho a avaliação biológica *in vivo* da atividade anti-dematogênica do éster etílico de indometacina associado aos nanocarreadores.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O trabalho tem como objetivos determinar a forma de associação da indometacina e de seu éster etílico em nanocápsulas preparadas com poli(ϵ -caprolactona) e mistura de triglicerídeos dos ácidos caprílico/cáprico, avaliar a influência da concentração de poli(ϵ -caprolactona) no perfil cinético de consumo do éster etílico de indometacina, assim como diferenciar os sistemas nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão através da modelagem matemática dos perfis cinéticos da difusão do éster etílico de indometacina. Para tanto, as reações de hidrólise alcalina da indometacina ou de seu éster etílico, propostos como sonda, serão utilizadas para caracterizar diferentes formulações de nanocápsulas, assim como para propor modelos da forma de associação das sondas aos sistemas através do estudo cinético do consumo dos substratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar suspensões nanoestruturadas (nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão), contendo indometacina ou éster etílico de indometacina, através dos métodos de nanoprecipitação da poli(ϵ -caprolactona) e emulsificação espontânea;

- Preparar suspensões de nanocápsulas, empregando diferentes concentrações de poli(ϵ -caprolactona);
- Caracterizar as formulações quanto ao teor da sonda (indometacina ou seu éster etílico), pH da formulação, diâmetro hidrodinâmico e perfil cinético de consumo da sonda frente ao tratamento com solução aquosa de NaOH;
- Estudar o comportamento físico-químico de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo indometacina ou seu éster etílico frente a adição de etanol nas suspensões;
- Determinar a velocidade de consumo da sonda frente ao tratamento dos sistemas nanoestruturados com solução aquosa de NaOH, seguido de modelagem matemática dos dados experimentais;
- Avaliar a atividade antiedematogênica em ratos do éster etílico de indometacina associado a nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS

A determinação de parâmetros físico-químicos das suspensões de nanopartículas é importante para a proposição de modelos de suas organizações em nível molecular. Tal caracterização é tecnicamente difícil de ser realizada, devido ao tamanho reduzido das partículas (inferior a 1 μm) (MAGENHEIN e BENITA, 1991). A avaliação físico-química desses sistemas só é possível mediante a combinação de diversas técnicas de análise, sendo estas, principalmente: a análise morfológica e a distribuição do tamanho das partículas, a determinação do potencial zeta e do pH, a determinação da concentração de fármaco associado às nanoestruturas e a cinética de liberação do fármaco (LEGRAND *et al.*, 1999; COUVREUR *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A observação direta de nanopartículas é realizada através de métodos de microscopia eletrônica, tais como a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Essas técnicas têm sido empregadas na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas. A MET permite também diferenciar nanocápsulas e nanoesferas, assim como já foi relatada a determinação da espessura da parede das nanocápsulas através dessa técnica (ROLLOT *et al.*, 1986; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998).

Para a determinação da distribuição do tamanho das nanoestruturas o método mais indicado é a espectroscopia de correlação de fótons (PCS). Esta técnica fornece medidas rápidas e acuradas para a determinação de partículas com tamanho de 5 nm a 5 μm (LEGRAND *et al.*, 1999) indicando a largura de distribuição

de tamanho, o que é fundamental para a caracterização das formulações. A microscopia eletrônica também permite a obtenção de informações relativas ao tamanho das nanopartículas, com a vantagem de fornecer uma imagem da partícula isolada do meio, enquanto que a PCS determina o raio hidrodinâmico das partículas em suspensão (HOFFMANN *et al.*, 1997; COUVREUR *et al.*, 2002).

Quanto à caracterização da superfície das nanopartículas, um método muito empregado envolve a medida do potencial zeta, o qual reflete o potencial da superfície da partícula. As nanopartículas usualmente apresentam um potencial zeta diferente de zero, o que conduz a sistemas relativamente estáveis. O potencial zeta é uma boa aproximação do potencial de superfície que é decorrente da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão (LEGRAND *et al.*, 1999; COUVREUR *et al.*, 2002).

Através do monitoramento do pH das suspensões de nanopartículas, em função do tempo, informações relevantes sobre a estabilidade destes sistemas podem ser obtidas. Alterações do pH podem ser indícios de degradação do polímero ou ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero (LEGRAND *et al.*, 1999; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A determinação do teor de fármaco contido em nanopartículas é dificultada pela necessidade de separação da fração livre de fármaco daquela parcela incorporada (SOPPIMATH *et al.*, 2001). Uma técnica de separação bastante utilizada é a ultracentrifugação, na qual a concentração de fármaco livre, presente na suspensão, é determinada no sobrenadante, após a centrifugação (MARCHAL-HEUSSLER *et al.*, 1990). O teor total de fármaco é determinado pela completa dissolução das nanopartículas em solvente adequado. Desta forma, a quantidade de fármaco associado às nanoestruturas é calculada pela diferença entre as concentrações de fármaco total e livre (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Outra técnica empregada é a ultrafiltração-centrifugação, na qual uma membrana de porosidade de corte de 10 kDa é empregada para separar parte da fase aquosa dispersante da suspensão coloidal (LOSA *et al.*, 1993; GUTERRES *et al.*, 1995). A concentração

livre é determinada no ultrafiltrado e a fração de fármaco associada às nanoestruturas é calculada também pela diferença das concentrações total e livre.

As nanopartículas poliméricas podem ser distinguidas em dois tipos: nanocápsulas, que são formadas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso; e nanoesferas, que são sistemas matriciais constituídos de polímero (MAGENHEIM e BENITA, 1991; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A substância ativa pode estar molecularmente dispersa ou retida na matriz polimérica das nanoesferas e, no caso das nanocápsulas, o fármaco pode estar adsorvido na parede polimérica, ou disperso por toda a partícula (Figura 1).

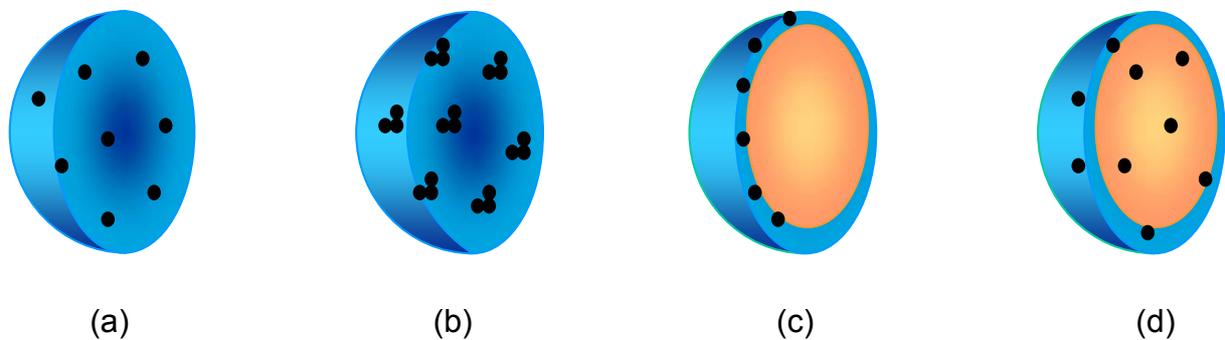


Figura 1. Formas de associação da substância ativa às nanopartículas. (a) adsorvida ou molecularmente dispersa na matriz (nanoesferas), (b) retida na matriz (nanoesferas), (c) adsorvida na parede polimérica (nanocápsulas), (d) dispersa na partícula (nanocápsulas).

Para uma caracterização completa, os sistemas nanoestruturados contendo fármacos são submetidos à determinação da cinética de liberação *in vitro* do fármaco a partir das nanopartículas. Diferentes comportamentos cinéticos são esperados para um fármaco dissolvido no núcleo oleoso da nanocápsula ou simplesmente retido ou adsorvido em sua parede polimérica (SOARES, 2003). Duas técnicas são empregadas para a separação do fármaco dissolvido no meio das nanopartículas dispersas: a difusão em bolsas de diálise (EL SAMALIGY *et al.*,

1986) e a separação baseada na ultracentrifugação ou na ultrafiltração-centrifugação (MAGENHEIN e BENITA, 1991; GUTERRES *et al.*, 1995).

As informações obtidas através de uma caracterização físico-química dos sistemas nanoparticulados podem levar à proposição de modelos, que descrevam a organização molecular destes sistemas, bem como a elucidação do mecanismo de associação dos fármacos a estas nanopartículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

3. 2 MECANISMOS DE ASSOCIAÇÃO DO FÁRMACO

A determinação dos mecanismos de associação de fármacos às nanoestruturas é fundamental para a compreensão do comportamento das nanopartículas, uma vez que o estado físico do fármaco e do polímero influenciam nas características de liberação *in vitro* e *in vivo* do fármaco (LEROUEIL-LE VERGER *et al.*, 1998; SOARES, 2003). Muitas técnicas têm sido desenvolvidas e empregadas no estudo da forma como os fármacos estão associados a estas nanoestruturas. Neste contexto, os métodos termo-analíticos, como a calorimetria diferencial exploratória e a termogravimetria, têm demonstrado grande aplicabilidade. Outras técnicas combinadas também muito utilizadas nesses estudos incluem a difração de raios-X, estudos de adsorção e/ou taxa de associação do fármaco às nanopartículas, espectroscopia na região do infravermelho, determinação do potencial zeta e do perfil de liberação *in vitro*, e, ainda, o uso de sondas fluorescentes (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Em um estudo onde o isradipino foi associado a nanoesferas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(D,L-lactídeo) (PLA) ou poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo) (PLAGA) foi observado através de calorimetria diferencial exploratória e difração de raios-X que o fármaco encontrava-se na forma amorfa ou molecularmente disperso na matriz polimérica das nanoesferas (LEROUEIL-LE VERGER *et al.*, 1998). Por análise termogravimétrica e calorimetria diferencial exploratória, GAMISANS e colaboradores (1999) determinaram a dispersão molecular do flurbiprofeno em nanoesferas preparadas com PCL pela técnica de nanoprecipitação. DAI e colaboradores (2004) estudaram a forma de associação da ciclosporina A em

nanoesferas sensíveis ao pH preparadas com diversos copolímeros do poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metila). Através de estudos de difração de raios-X foi constatada a dispersão molecular da ciclosporina A na matriz polimérica das nanoesferas. Os autores também utilizaram a técnica de espectroscopia de raios-X fotoeletrônica e demonstraram a localização do fármaco na superfície da nanopartícula.

CALVO e colaboradores (1996) demonstraram através das técnicas de calorimetria diferencial exploratória e difração de raios-X que a indometacina está molecularmente dispersa na matriz polimérica das nanoesferas de PCL, resultado também obtido para nanocápsulas. Através das técnicas de calorimetria diferencial exploratória e difração de raios-X, também foi constatado que o diclofenaco sódico está molecularmente disperso em nanocápsulas preparadas com uréia-formaldeído (KULKARNI *et al.*, 2000).

ABOUBAKAR e colaboradores (1999) prepararam nanocápsulas de poli(cianoacrilato de *iso*-butila) e Miglyol 812N[®] contendo insulina (peptídeo hidrossolúvel) pelo método de polimerização interfacial. A taxa de insulina associada às nanocápsulas foi calculada após a separação destas do meio dispersante por ultracentrifugação. A taxa de associação foi de 90% para a formulação contendo 0,5 mg/mL de insulina. O potencial zeta de nanocápsulas contendo insulina e de nanocápsulas sem o fármaco foi determinado com a finalidade de verificar-se diferenças ou não, podendo a insulina estar encapsulada no núcleo oleoso ou simplesmente adsorvida na superfície polimérica. Os resultados obtidos mostraram potenciais zeta idênticos (-19 mV) para as duas formulações, sugerindo que a superfície das nanocápsulas com insulina tenha a mesma composição das nanocápsulas sem o fármaco. Isto reforçou a hipótese de que a insulina estaria encapsulada no núcleo oleoso. Esta idéia foi confirmada pelo fato de que o potencial zeta aumentou de -19 mV para -10 mV, quando 0,5 mg/mL de insulina foram incubados em suspensão de nanocápsulas, inicialmente preparadas sem o fármaco. Neste caso, os autores consideraram que a insulina estaria adsorvida na superfície das nanocápsulas, quando a associação do fármaco é realizada por incubação.

FERRANTI e colaboradores (1999) avaliaram o perfil de liberação *in vitro* de nanocápsulas de PCL contendo primidona como fármaco encapsulado e álcool benzílico como núcleo oleoso. As amostras de nanocápsulas foram colocadas em meio gástrico simulado (pH 1,25) ou em meio intestinal simulado (pH 7,4). Os perfis de liberação das nanocápsulas contendo primidona foram comparados aos perfis de liberação de uma solução padrão de primidona em álcool benzílico, utilizada como controle. Após 8 horas do início do experimento, 100 % da primidona contida na solução controle foi liberada. Para o mesmo tempo, o percentual de primidona liberado a partir das nanocápsulas foi de $76,0 \pm 1,4$ % (pH 7,4) e de $83,0 \pm 4,5$ % (pH 1,25). A quantidade de primidona liberada das nanocápsulas foi significativamente menor em comparação ao controle. Para explicar tal fato, os autores sugeriram que ocorra uma interação entre o fármaco e o polímero. A rápida liberação do fármaco, durante a primeira hora, sugere que uma parte da primidona estaria adsorvida na superfície das nanocápsulas.

Em um estudo realizado em nosso laboratório (LOPES *et al.*, 2000) foi avaliado o mecanismo de associação da etionamida a nanocápsulas e nanoesferas de Eudragit S90[®] através de seus perfis de liberação. As suspensões nanoestruturadas foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, sendo o fármaco adicionado antes da formação das nanopartículas (incorporação) ou por incubação, adicionado após a preparação das nanopartículas. Foi observada a liberação rápida e total do fármaco a partir das formulações obtidas por incubação e liberação de 80 % e de 90% a partir das nanopartículas preparadas por incorporação. Desta forma, os autores consideraram que a adsorção na superfície das nanopartículas é o mecanismo preferencial de incorporação do fármaco. Esta adsorção seria decorrência da formação de um sal entre o ácido conjugado da etionamida e os ânions carboxilato do polímero.

3. 3 MODELOS DE ESTRUTURA DE NANOPARTÍCULAS

As técnicas de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão têm sido muito utilizadas para observar a morfologia, tamanho e estrutura das nanopartículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A MET combinada com a técnica de criofratura

fornece informações úteis sobre a estrutura de nanocápsulas, ressaltando a parede polimérica e a cavidade oleosa, e permitindo estimar a espessura da parede polimérica (COUVREUR *et al.*, 2002).

EL SAMALIGY e colaboradores (1986) prepararam nanocápsulas de poli(cianoacrilato de alquila) contendo doxorrubicina. Através de MEV observaram que as nanocápsulas possuíam formato esférico. Além disso, verificaram que o aumento da quantidade de monômero utilizada, traduzia-se no aumento da espessura da camada polimérica das estruturas.

Nanocápsulas (contendo Miglyol 812[®] como núcleo oleoso) e nanoesferas preparadas com poli(cianoacrilato de *iso*-butila) foram submetidas à criofratura e analisadas por MET. De acordo com os autores, foram observadas uma estrutura polimérica sólida e granular para as nanoesferas e uma fina (cerca de 5,0 nm) e irregular parede polimérica ao redor do núcleo oleoso das nanocápsulas (ROLLOT *et al.*, 1986). Por outro lado, AL KHOURI e colaboradores (1986) estimaram através de MET que a espessura da parede polimérica de nanocápsulas de poli(cianoacrilato de *iso*-butila) possuía 3,0 nm e, por meio de MEV, observaram que o invólucro das nanocápsulas era liso e uniforme. Para nanocápsulas preparadas com PCL e Miglyol 812[®] contendo indometacina, GUINEBRETIERE e colaboradores (2002), através de MET, estimaram a espessura da parede polimérica das nanocápsulas em 1,5 a 2,0 nm.

DAI e colaboradores (2004) prepararam nanoesferas sensíveis ao pH contendo ciclosporina A formuladas com diversos copolímeros do poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metila) e analisaram suas propriedades morfológicas por MET. As partículas apresentaram-se como esferas sólidas não-agregadas, enquanto que a superfície não se mostrou lisa e uniforme. Esta característica foi relacionada com a presença de moléculas de ciclosporina A adsorvidas na superfície do polímero, fato que foi confirmado pela espectroscopia de raio-X fotoeletrônica.

Medidas de potencial zeta são freqüentemente empregadas para caracterizar a superfície das nanopartículas (SOPPIMATH *et al.*, 2001). Um trabalho que exemplifica a utilização desta técnica, é o realizado por CALVO e colaboradores (1996). Os autores observaram os efeitos da composição de diferentes carreadores

nanoestruturados (nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão) sobre os valores do potencial zeta. Foi verificado que a presença da fase oleosa (Miglyol 840[®]), nas nanocápsulas e nanoemulsão, conferiu um potencial zeta mais negativo em relação à ausência da mesma, no caso das nanoesferas. A similaridade dos resultados obtidos para nanocápsulas e nanoemulsão sugeriu que a parede polimérica (PCL) formada ao redor das gotículas de óleo não seria uma parede consistente, mas um fino filme polimérico. Por outro lado, baseados na similaridade dos valores de potencial zeta de nanocápsulas e nanoemulsão, LOSA e colaboradores (1993) consideraram que o polímero que reveste a gota de óleo é uma parede descontínua, sendo a natureza do óleo o principal fator que determina o potencial superficial da partícula.

MOSQUEIRA e colaboradores (2000) avaliaram a influência da composição nas características físico-químicas e estruturais de nanocápsulas de PLA, preparadas pela técnica de nanoprecipitação de polímero pré-formado. Para avaliar a influência da natureza da fase oleosa, formulações de nanocápsulas foram preparadas com os seguintes óleos: Miglyol 810[®], Miglyol 812[®], Miglyol 829[®], Miglyol 840[®], oleato de etila, óleo de soja, óleo mineral e dodecano. Os valores de potencial zeta (-55 ± 6 mV) não mudaram significativamente em função da natureza do núcleo oleoso, sugerindo que o óleo não está localizado na interface, mas completamente encapsulado pelo polímero. A influência da massa molar do polímero nos valores de potencial zeta foi também avaliada nesse estudo. As formulações foram preparadas com e sem lecitina (fosfatidilcolina usada como tensoativo). Na ausência de lecitina, os grupos carboxila terminais das cadeias de PLA influenciaram o potencial zeta: PLA_{9KDa} (-27 mV), PLA_{91KDa} (-17 mV), PLA_{251KDa} (-7 mV). Quanto maior a massa molar do polímero, menor é a influência no potencial superficial, pois há menor concentração de grupamentos carboxílicos na superfície. Por outro lado, os resultados indicaram que a massa molar do polímero exerceu pouca influência nos valores de potencial zeta de nanocápsulas preparadas com lecitina: PLA_{9KDa} (-40 mV), PLA_{91KDa} (-39 mV), PLA_{251KDa} (-38 mV). Estes resultados levaram os autores a concluir que provavelmente o polímero está encoberto pela lecitina (um fosfolípídeo) e que seus grupos fosfato determinaram o potencial zeta das nanocápsulas.

Uma outra técnica que recentemente têm sido estudada para caracterizar a estrutura das nanopartículas, especialmente nanocápsulas, é a espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Esta técnica é capaz de detectar simultaneamente a natureza química e a mobilidade dos componentes do sistema. Esta característica permite determinar as difusões rotacionais dos componentes da dispersão. Além disso, pela observação das propriedades de difusão lateral é possível diferenciar componentes encapsulados de componentes da fase externa (MAYER, 2002).

MAYER e colaboradores (2002) avaliaram a aplicabilidade da espectroscopia de ressonância magnética nuclear na análise estrutural de nanocápsulas de poli(cianoacrilato de *n*-butila), contendo Miglyol 812[®], preparadas pelo método de polimerização *in situ*. A análise foi realizada após a formação das nanocápsulas, mas antes da evaporação do solvente orgânico (etanol). O modelo proposto foi definido como sendo uma fase externa contendo água, etanol e tensoativo, separada da fase interna por uma parede de poli(cianoacrilato de *n*-butila) com o triglicerídeo (Miglyol 812[®]) e o tensoativo adsorvidos. A fase interna contém triglicerídeo e etanol.

Em um outro trabalho, a formulação descrita acima foi preparada pelo método de polimerização interfacial, sob condições clássicas e sob condições ácidas (método modificado), e estudada pela espectroscopia de ressonância magnética nuclear com aplicação de gradientes de campo pulsado. As análises foram realizadas após a formação das nanocápsulas, mas antes da evaporação do etanol. Em ambos os tipos de formulações, as cavidades internas foram observadas como esferas com diâmetro interior próximo ao tamanho da nanocápsula e livre de obstruções que afetem a difusão do conteúdo líquido. Para estudar a permeabilidade da parede das nanocápsulas, o benzeno foi adicionado nos sistemas preparados pelos métodos clássico e modificado. Enquanto que as moléculas de benzeno em uma dispersão preparada pelo método modificado permanecem na cavidade oleosa por um período médio de 70 ms, o tempo de residência correspondente para as nanocápsulas preparadas pelo método clássico foi quase o dobro (130 ms). A diferença na permeabilidade está de acordo com um estudo anterior dos autores (WOHLGEMUTH *et al.*, 2000), onde a espessura da parede de nanocápsulas de poli(cianoacrilato de *iso*-butila) foi determinada por experimentos de gradiente de

densidade como sendo de 2,3 e 3,1 nm para os métodos modificado e clássico, respectivamente. Sendo assim, os autores concluíram que a maior permeabilidade das nanocápsulas preparadas pelo método modificado é consequência de uma parede com menor espessura. Em ambas as formulações os tempos de residência observados para o benzeno são muito maiores do que o tempo observado para o etanol (6 ms) em trabalho anterior (MAYER *et al.*, 2002). Os autores relacionaram esse fato a diferenças de tamanho e polaridade das moléculas de benzeno e etanol (WOHLGEMUTH e MAYER, 2003).

CAUCHETIER e colaboradores (2003) calcularam a espessura da parede polimérica de nanocápsulas contendo atovaquona, preparadas com benzoato de benzila e três diferentes polímeros: PCL, PLA ou PLGA. Os valores teóricos para a espessura da parede polimérica foram determinados baseados na hipótese de que o polímero é o único componente da parede das nanocápsulas. A aproximação matemática forneceu um valor próximo a 20 nm para os três polímeros. Entretanto, em um trabalho realizado em nosso grupo de pesquisa, GUTERRES e colaboradores (2000) demonstraram que o benzoato de benzila não é apropriado para formular nanocápsulas de PCL ou de PLA. Através de testes de inchamento/dissolução de filmes destes polímeros, os autores comprovaram que o benzoato de benzila é capaz de dissolver ambos os polímeros. Desta maneira, os sistemas formados utilizando-se PCL ou PLA e benzoato de benzila, não se adaptariam ao conceito de nanocápsula, uma vez que para a formação destas estruturas vesiculares o fator mais importante é a insolubilidade do polímero tanto na fase aquosa quanto no núcleo oleoso (GALLARDO *et al.*, 1993; LEGRAND *et al.*, 1999). Nesse caso, foi proposto que as estruturas formadas seriam do tipo micelar.

Em um trabalho realizado em nosso grupo de pesquisa, POHLMANN e colaboradores (2002) propuseram um modelo de estrutura para nanoesferas, preparadas com PCL e monoestearato de sorbitano. Utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmico, os autores realizaram um estudo comparativo entre nanocápsulas e nanoesferas de PCL preparadas por nanoprecipitação. Como tensoativos foram utilizados o polissorbato 80 (alto EHL) e o monoestearato de sorbitano (baixo EHL). Para formulação das nanocápsulas, o óleo mineral foi empregado como núcleo oleoso. O experimento forneceu valores negativos para o

coeficiente virial k_D para as formulações de nanocápsulas e nanoesferas, demonstrando uma baixa interação destas com a fase aquosa. Com fins comparativos, foi preparada uma outra formulação de nanoesferas sem o tensoativo lipofílico (monoestearato de sorbitano). Os resultados mostraram um valor de k_D positivo para esta formulação. A ausência de interação de nanocápsulas e nanoesferas com a água foi atribuída à presença do monoestearato de sorbitano disperso no polímero. A comparação dos sistemas nanoestruturados baseada em suas propriedades dinâmicas permitiu aos autores sugerir que as suspensões de nanoesferas preparadas com PCL e monoestearato de sorbitano, são um sistema bifásico onde o monoestearato de sorbitano estaria disperso na matriz polimérica. Este modelo foi baseado em trabalho anterior do grupo (MÜLLER *et al.*, 2001), onde medidas de calorimetria diferencial exploratória foram realizadas para suspensões de nanoesferas preparadas com PCL e monoestearato de sorbitano, mostrando que ambos os materiais constituem um sistema bifásico.

3. 4 LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS A PARTIR DE SISTEMAS NANOPARTICULADOS

Os estudos de liberação *in vitro* de fármacos determinam a fração do fármaco liberada das nanoestruturas em função do tempo. A caracterização do perfil de liberação do fármaco pode fornecer informações quanto à estrutura do sistema, o mecanismo envolvido no processo de liberação, a interação fármaco-carreador e, ainda, podem ser utilizados como controle de qualidade (WASHINGTON, 1990).

A liberação do fármaco a partir das nanopartículas depende da dessorção do fármaco da superfície das partículas, da difusão do fármaco através da matriz das nanoesferas, da difusão através da parede polimérica das nanocápsulas, da erosão da matriz polimérica ou da combinação dos processos de difusão e erosão (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

3. 4 .1 Teoria da Difusão e Modelos Matemáticos

A difusão é um fenômeno que está relacionado ao transporte de massa de moléculas individuais através de uma barreira ou espaço livre. Este processo é movido por um gradiente de concentração e está relacionado ao movimento aleatório das moléculas (movimento browniano) (MARTIN *et al.*, 1993; NETZ e ORTEGA, 2002).

De acordo com a Primeira Lei de Fick, o fluxo J de uma substância é proporcional ao gradiente de concentração dc/dx , sendo a constante de proporcionalidade o coeficiente de difusão D , que está relacionado à mobilidade da substância (Equação 1).

$$J = -D \cdot \left(\frac{dc}{dx} \right)$$

(Equação 1)

O sinal negativo indica que o fluxo de matéria ocorre no sentido no qual a concentração é menor. O coeficiente de difusão D não pode ser considerado propriamente uma constante, uma vez que depende da temperatura, pressão, propriedades do solvente, natureza química e concentração do difusante, principalmente quando este está em concentrações elevadas (MARTIN *et al.*, 1993).

O fenômeno da difusão pode ser visto como um processo no qual a concentração tende a se igualar em todos os pontos do sistema com o passar do tempo. A variação da concentração em função do tempo é descrita pela Segunda Lei de Fick (Equação 2), a qual afirma que a variação da concentração com o tempo, em um dado ponto do sistema, é igual à variação do gradiente de concentração, multiplicada pelo respectivo coeficiente de difusão (NETZ e ORTEGA, 2002):

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D \frac{\partial c}{\partial x} \right)$$

(Equação 2)

Através da modelagem matemática pode-se avaliar a aproximação de pontos experimentais a um modelo descrito pela comparação estatística de parâmetros calculados (O'HARA *et al.*, 1998). Os principais modelos matemáticos estudados para explicar os perfis de liberação baseados em processos de difusão são o de Higuchi e o de Korsmeyer-Peppas (SIEPMANN e PEPPAS, 2001).

Higuchi desenvolveu diversos modelos teóricos para estudar a liberação de fármacos solúveis e pouco solúveis incorporados em matrizes sólidas e semi-sólidas (COSTA e LOBO, 2001). A equação de Higuchi (Equação 3) foi inicialmente empregada para sistemas planares, sendo depois modificada para considerar diferentes geometrias dos sistemas matriciais (HIGUCHI, 1963).

$$ft = Q = \sqrt{D(2c_0 - c_s)c_s t}$$

(Equação 3)

Onde Q é a quantidade de fármaco liberado no tempo t por unidade de área, D é o coeficiente de difusão da substância na matriz, c_0 é a concentração inicial da substância e c_s é a solubilidade da substância na matriz.

É possível resumir o modelo de Higuchi à seguinte expressão (Equação 4):

$$ft = K_H \sqrt{t}$$

(Equação 4)

onde K_H é a constante de dissolução de Higuchi que descreve a liberação do fármaco como um processo baseado na lei de Fick, linearmente proporcional à raiz quadrada do tempo (COSTA e LOBO, 2001; SIEPMANN e PEPPAS, 2001).

A aplicação do modelo de Higuchi segue alguns postulados: a) a concentração inicial da substância no sistema deve ser muito maior que sua solubilidade no meio; b) a análise matemática é baseada em uma difusão unidimensional; c) a substância é considerada em estado molecularmente disperso, com partículas muito menores em diâmetro do que a espessura do sistema; d) a

dissolução do polímero carreador é negligenciável; e e) a difusibilidade da substância é constante (SIEPMANN e PEPPAS, 2001).

O modelo de Korsmeyer-Peppas, também chamado Lei da Potência, foi desenvolvido por KORSMEYER e colaboradores (1983) e RITGER e PEPPAS (1987). Esse modelo relaciona a liberação do fármaco com o tempo através da seguinte equação:

$$f_t = at^n$$

(Equação 5)

onde a é uma constante que incorpora características estruturais e geométricas da forma farmacêutica, n é o expoente de liberação, indicativo do mecanismo de liberação do fármaco, e a função de t é M_t/M_∞ (liberação fracional do fármaco).

Foi desenvolvida uma forma modificada da Equação 5 (FORD *et al.*, 1987) para considerar o tempo de latência (tempo para o início da liberação do fármaco):

$$\frac{M_{(t-l)}}{M_\infty} = a(t-l)^n$$

(Equação 6)

onde, M_∞ é a quantidade de fármaco no estado de equilíbrio; M_t é a quantidade de fármaco difundido no tempo t , e l é o tempo de latência.

Quando ocorre o efeito de liberação abrupta inicial (b) a equação acima transforma-se em (RITGER e PEPPAS, 1987):

$$\frac{M_{(t-l)}}{M_\infty} = at^n + b$$

(Equação 7)

A equação de Higuchi representa um caso especial da Lei da Potência quando $n = 0,5$. Peppas e colaboradores (1985) foram os primeiros a introduzir o uso e as limitações desta equação. Os autores utilizaram o valor de n para caracterizar diferentes mecanismos de liberação. Para difusão fickiana, o valor de n é 0,5. Quando o valor de n é 1,0, corresponde a um modelo não-fickiano Caso II. Para valores de n entre 0,5 e 1,0, o modelo é dito não-fickiano do tipo transporte anômalo. Os valores de n acima definidos correspondem a um sistema matricial planar. Quando outras geometrias como cilindros e esferas são consideradas, esses valores sofrem modificações (Tabela 1).

Tabela 1. Mecanismo de liberação do fármaco a partir de sistemas poliméricos de liberação controlada de diferentes geometrias.

Expoente de liberação (n)			Mecanismo de liberação do fármaco
Filmes	Cilindros	Esferas	
0,5	0,45	0,43	Difusão fickiana
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Transporte anômalo
1,0	0,89	0,85	Transporte caso II
$> 1,0$	$> 0,89$	$> 0,85$	Transporte Super-caso II

3. 4. 2 Perfil de Liberação de Fármacos em Nanopartículas

Segundo SOPPIMATH e colaboradores (2001), o perfil de liberação do fármaco a partir das nanopartículas é dependente da natureza do sistema de liberação. No caso de sistemas matriciais, como as nanoesferas, a liberação de fármacos a partir destes sistemas têm demonstrado seguir cinética de primeira ordem, freqüentemente atribuída à difusão do fármaco a partir da matriz polimérica

para o meio e/ou à erosão do sistema matricial, liberando o fármaco (FRETA *et al.*, 1995; POLAKOVIC *et al.*, 1999). No caso das nanocápsulas (sistema de liberação de fármacos do tipo reservatório), o fármaco está envolto pelo polímero e a liberação ocorre pela difusão do fármaco através da barreira polimérica o que, teoricamente, descreve cinética de ordem zero (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Em 1996, CALVO e colaboradores estudaram a penetração corneal da indometacina, utilizando três sistemas nanoestruturados, nanoesferas e nanocápsulas preparadas com PCL e nanoemulsão (utilizando Miglyol 840[®] como fase oleosa), e determinaram os respectivos perfis de liberação. Os perfis obtidos foram muito similares para todas as formulações. Os resultados demonstraram que 85 % da indometacina difundiu a partir do sistema nanoestruturado no período de 2 horas e praticamente todo o fármaco foi liberado em 4 horas. Além da rápida liberação, a similaridade dos perfis de liberação obtidos para as nanocápsulas e nanoemulsão evidenciou que o revestimento do polímero das nanocápsulas não exerceu função no processo de liberação. Assim, os autores propuseram que, para estas formulações, somente a partição do fármaco entre o óleo e o meio aquoso externo afetou a liberação. Este mecanismo de liberação foi reforçado pelo fato de que o principal fator controlador da liberação da indometacina foi o volume do meio aquoso: a indometacina foi liberada mais rapidamente e completamente do seu vetor quando há uma maior diluição, mas a mesma não é liberada quando as suspensões não são diluídas.

SANTOS-MAGALHÃES e colaboradores (2000) observaram perfis de liberação similares para nanocápsulas de PLAGA e nanoemulsão contendo penicilina G benzatina. A liberação de penicilina G benzatina a partir da nanoemulsão foi ligeiramente mais lenta devido a diferenças na natureza da fase oleosa dos dois vetores nanoestruturados. Na preparação das nanocápsulas foi usado óleo de girassol e na nanoemulsão foi usado Miglyol 812[®]. Assumindo que o processo cinético é governado pelo coeficiente de partição óleo/água, os autores sugeriram que a diferença nos valores de força iônica e constante dielétrica dos óleos poderia explicar as diferenças observadas nos perfis de liberação da penicilina G benzatina a partir das nanocápsulas e da nanoemulsão.

POLAKOVIC e colaboradores (1999) estudaram o mecanismo de liberação da lidocaína contida em nanoesferas de PLA através de modelagem matemática. O fármaco foi incorporado em três diferentes formulações de nanoesferas, variando o tamanho de partícula (aproximadamente 250 a 820 nm) e a taxa de fármaco incorporado (cerca de 7 a 32 % v/v). A taxa de liberação nestes sistemas esteve relacionada com a concentração de fármaco incorporada e demonstrou ser mais rápida em partículas pequenas com menor concentração de lidocaína. Dois modelos, difusão e dissolução foram estudados para descrever os dados experimentais da liberação da lidocaína (meio de dissolução pH 7,4) e identificar o mecanismo de liberação das formulações com diferentes concentrações de fármaco. A modelagem dos resultados mostrou que nas formulações com concentrações maiores, a dissolução dos cristais de fármaco poderia ser a etapa limitante da liberação. Por outro lado, a liberação do fármaco foi controlada por difusão nas formulações com concentrações menores de lidocaína, onde o fármaco estava totalmente disperso na matriz.

O mecanismo de liberação do isradipino contido em nanoesferas preparadas pelo método de nanoprecipitação foi estudado por LEROUEIL-LE VERGER e colaboradores (1998). Foram preparadas formulações com os polímeros PLA e PLAGA. Dois tipos de PLAGA foram utilizados: PLA85GA15, que contém 85 % de lactídeo e 15 % de glicolídeo, e PLA50GA50, que contém quantidades iguais de lactídeo e glicolídeo. Para avaliar a liberação do isradipino foi empregada a técnica de difusão em saco de diálise. Em pH gástrico (pH 1,3) e pH intestinal (pH 6,8) as suspensões coloidais exibiram um perfil de liberação sustentada. Em pH 1,3 os perfis foram similares para todas as formulações de nanoesferas durante as primeiras 14 horas. Após este período, cerca de 40 % do isradipino foi liberado. Durante as primeiras 24 horas, os perfis de liberação não diferiram significativamente e o percentual de fármaco liberado foi cerca de 50 %. Após 72 horas, os percentuais de isradipino liberado foram de 60, 80 e 85 % para PLA50GA50, PLA85GA15 e PLA, respectivamente. Em pH 6,8, o percentual de isradipino liberado foi de 100 % para PLA85GA15 e PLA e 90 % para PLA50GA50. Para explicar a diferença nos percentuais de isradipino liberado, a perda relativa de massa molecular de cada polímero foi calculada. PLA85GA15 e PLA apresentaram

uma pequena perda de massa molecular (aproximadamente 10 %), que foi significativamente maior que a perda para PLA50GA50 (2 %). Estes resultados levaram os autores a concluir que a liberação do fármaco foi produto dos mecanismos de difusão e erosão, sendo esta última menos significativa para a formulação de PLA50GA50.

HU e colaboradores (2002) prepararam nanoesferas de quitosana-poli(ácido acrílico) contendo o peptídeo da seda. O mecanismo de liberação do peptídeo a partir das nanoesferas foi estudado através da técnica de difusão em sacos de diálise em diferentes valores de pH. Uma liberação inicial rápida do peptídeo seguida por uma fase lenta ocorreu em pH 4,5 e 7,4. Além disso, a formulação promoveu uma liberação contínua do peptídeo por 10 dias. Por outro lado, em pH 2,0 e 3,0, a liberação do peptídeo foi muito rápida e cerca de 90 % do peptídeo incorporado foi liberado das nanoesferas em 25 horas. Estes resultados mostraram que a liberação do peptídeo da seda a partir das nanoesferas de quitosana-poli(ácido acrílico) foi dependente do pH do meio de liberação. O perfil de liberação em pH 4,5 apresentou a razão de liberação mais lenta, e em pH 2,0, a formulação de nanoesferas quase não apresentou propriedades de liberação sustentada. Isto foi explicado pelo fato de que a liberação do peptídeo depende do inchamento das nanoesferas. Em pH 4,5, o inchamento é limitado, e o peptídeo não pode ser liberado das nanoesferas facilmente. Entretanto, em pH 7,4 as nanoesferas incham em maior extensão, resultando em liberação mais rápida do peptídeo. Em condições fortemente ácidas (pH < 4,0), as nanoesferas são dissolvidas rapidamente, levando a uma liberação rápida do peptídeo.

O perfil de liberação do 4-nitroanisol a partir de nanocápsulas e nanoesferas de PLA, estas últimas contendo hexano como núcleo oleoso, foi avaliado através da técnica de difusão em saco de diálise em pH 7,0 (ROMERO-CANO e VINCENT, 2002). As nanocápsulas foram formuladas pela preparação prévia de uma emulsão óleo em água, onde a fase oleosa consistiu de PLA, 4-nitroanisol, diclorometano, hexano e acetona, e a fase aquosa foi formada por uma solução de poli(álcool vinílico) (agente emulsificante) em água. A fase aquosa foi mantida sob agitação a 12000 rpm e a fase oleosa foi adicionada sobre esta durante 60 segundos para formação da emulsão. A emulsão resultante foi mantida sob agitação por 1 hora.

Após, uma solução aquosa de poli(álcool vinílico) a 2 % foi adicionada à emulsão. A emulsão diluída foi mantida sob agitação durante a noite. Após esse período, o resíduo de diclorometano e acetona foi removido sob pressão reduzida e, então, ocorreu a precipitação do polímero ao redor da gota de óleo. No caso das nanoesferas, dois tipos de estruturas foram preparadas. No primeiro tipo (I), a formulação foi preparada da mesma forma que as nanocápsulas, mas o hexano foi removido sob pressão reduzida juntamente com o diclorometano e a acetona. As nanoesferas formadas concentraram o fármaco no centro da matriz. O segundo tipo (II) foi preparado da mesma forma, mas omitindo o hexano da formulação. Nesse caso, o fármaco permaneceu homogeneamente disperso na matriz. Além disso, as três formulações foram preparadas com 1,5 ou 2,5 g de PLA. Todas as formulações apresentaram um perfil bifásico, sendo a liberação do fármaco explicada pelo mecanismo de difusão. A liberação do 4-nitroanisol seguiu uma relação linear com a raiz quadrada do tempo na primeira metade da curva de liberação, demonstrando um bom ajuste dos dados ao modelo de Higuchi. Através da determinação do coeficiente de difusão D , foi observada uma liberação mais rápida do fármaco a partir das nanocápsulas preparadas com menor quantidade de polímero. Os autores relacionaram esta diferença com a espessura da parede da nanocápsula, considerando que uma maior concentração de polímero conduz à formação de uma parede mais espessa, o que tornaria a difusão mais lenta. Para as formulações de nanoesferas os valores do coeficiente de difusão foram similares.

3. 5 ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA

A inflamação é caracterizada por uma resposta multifatorial essencial para a manutenção da homeostase celular diante de uma lesão tissular ou infecção. Este processo fisiológico envolve uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão (WOO, 2000; KUMMER e COELHO, 2002).

O processo inflamatório é desencadeado pela liberação de mediadores químicos originados nos tecidos lesados e nas células migratórias. Dentre os principais mediadores figuram a histamina, as proteases plasmáticas, os metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxano A₂ e leucotrienos), o fator

ativador de plaquetas, as interleucinas, o óxido nítrico, os constituintes lisossômicos do leucócitos e os radicais livres derivados do oxigênio (CALIXTO *et al.*, 2000).

Na literatura são relatadas diversas metodologias para a avaliação da atividade antiinflamatória, entre as quais: o edema de pata de rato induzido por carragenina, bradicinina, dextrana ou histamina, a pleurisia induzida por carragenina, a lesão granulomatosa induzida por “pellet” de algodão e o aumento da concentração sérica de glicoproteína ácida α -1, que pode ser determinado por imunoensaio (FERNÁNDEZ-URRUSUNO *et al.*, 1995).

Dentre os métodos relatados acima, o edema de pata de rato induzido por carragenina figura como uma das metodologias mais comumente empregadas para avaliação da atividade antiinflamatória. Essa técnica baseia-se na capacidade de uma substância em inibir o edema produzido na pata traseira do rato por injeção de um agente flogístico, neste caso, a carragenina (WINTER *et al.*, 1962).

Nanoesferas preparadas com PLA contendo dexametasona, um antiinflamatório esteróide, demonstraram atividade antiedematogênica avaliada por edema de pata de rato induzido por carragenina semelhante à formulação comercial de dexametasona (Decadron[®]), na dose de 30 μ g/Kg (BECK *et al.*, 2003).

AMMOURY e colaboradores (1993) prepararam nanocápsulas de PLA contendo indometacina, um antiinflamatório não-esteróide, e avaliaram a atividade antiedematogênica deste fármaco nanoencapsulado pela técnica de edema de pata de rato induzido por carragenina. Neste estudo, três doses de indometacina foram testadas: 2,5, 5,0 e 10,0 mg/Kg. Os resultados mostraram que a incorporação da indometacina nas nanocápsulas não alterou sua atividade antiinflamatória, uma vez que os perfis de inibição do edema observados foram similares aos das soluções aquosas. No entanto, somente para a dose de 2,5 mg/Kg o efeito da inibição do edema foi significativamente mais pronunciado para a indometacina associada às nanocápsulas do que para a solução aquosa.

Em outro estudo, foi avaliada a atividade antiinflamatória da indometacina associada a nanocápsulas de poli(cianoacrilato de *iso*-butila) utilizando a mesma metodologia. Os resultados mostraram que a indometacina nanoencapsulada

apresentou atividade antiinflamatória aumentada em 10 vezes quando foram comparadas as doses de 3 mg/Kg de indometacina livre e 0,3 mg/Kg de indometacina nanoencapsulada (GÜR SOY *et al.*, 1989).

KALGUTKAR e colaboradores (2000) sintetizaram uma série de amidas e ésteres derivados da indometacina. Algumas dessas moléculas são capazes de se ligar fortemente à enzima ciclooxigenase-2 (cox-2), mas não à ciclooxigenase-1 (cox-1). A inibição seletiva da cox-2 foi demonstrada *in vitro* através do uso da enzima humana purificada. A esterificação da indometacina com ésteres alifáticos aumentou a inibição da cox-2, mas diminuiu o efeito sobre a cox-1, sendo que esta inibição aumenta com o aumento da cadeia alquílica. Ésteres aromáticos também apresentam inibição seletiva da cox-2, assim como as amidas primárias e secundárias. Por outro lado, amidas terciárias e cíclicas não apresentaram efeito inibitório sobre a cox-2. Dentre esses derivados, as amidas 2-feniletílica e a 4-acetamidofenílica foram avaliadas no ensaio de edema de pata de rato induzido por carragenina, exibindo atividade antiedematogênica¹.

¹ KALGUTKAR, A. S.; CREWS, B. C.; ROWLINSON, S. W.; MARNETT, A. B.; KOZAK, K. R.; REMMEL, R. P.; MARNETT, L. J. Biochemically Based Design of Cyclooxygenase (COX-2) Inhibitors. Facile Conversion of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs to Potent and High Selective COX-2 Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000 *apud* KALGUTKAR, A. S.; MARNETT, A. B.; CREWS, B. C.; REMMEL, R. P. Ester and Amide Derivatives of the Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug, Indomethacin, as Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, p. 2860-2870, 2000.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4. 1 MATERIAIS

4. 1. 1 Matérias-primas

- Substância ativa: Indometacina (Sigma - St. Louis, EUA)
- Polímero: Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) $\overline{M}_w = 60000$ (Aldrich - Strasbourg, França)
- Tensoativos:
 - Baixo índice EHL: Monoestearato de sorbitano (Span 60[®]) (Delaware - Porto Alegre - Brasil)
 - Alto índice EHL: Polissorbato 80 (Tween 80[®]) (Delaware - Porto Alegre - Brasil)
- Fase oleosa: Triglicerídeo caprílico/cáprico:
 - Miglyol 810[®] (Hulls - Puteaux, França)
 - Brasquim - Porto Alegre - Brasil

4. 1. 2 Aparelhos e Equipamentos

- Evaporador rotatório (Büchi - Alemanha)
- Bomba de vácuo V-500 (Büchi Vac[®] - Alemanha)
- Potenciômetro B474 (Micronal - São Paulo, Brasil)
- Agitador Certomat MV (Vitaris – Alemanha)
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Central Analítica - Faculdade de Farmácia - UFRGS):
 - Injetor S-200 (Perkin-Elmer – Boston, EUA)
 - Detector UV-VIS S-200 (Perkin-Elmer – Boston, EUA)
 - Bomba S-200 (Perkin-Elmer – Boston, EUA)
- Espectrômetro de auto-correlação laser (Central Analítica - Instituto de Química - UFRGS):
 - Fonte de luz laser: íons He-Ne, 35Mw, $\lambda_0 = 632,8\text{nm}$, modelo 127 (Spectra-Physics - California, EUA)
 - Goniômetro: BI-200M, versão 2.0 (Brookhaven Instruments - Nova York, EUA)
 - Correlacionador digital: BI-9000AT (Brookhaven Instruments - Nova York, EUA)
 - Detector: BI9863 (Brookhaven Instruments - Nova York, EUA)
- Centrifuga 4K15 (Sigma - Alemanha)
- Banho Termostatizado (Ika - EH4 - Rio de Janeiro, Brasil)
- Equipamento para determinação do ponto de fusão (Reichert - Nova York, EUA)

- Hidropletismômetro (Ugo Basile – Comério, Itália)
- Espectrômetro VXR-200 ou YH-300 (Instituto de Química - UFRGS)
(Varian - Palo Alto, EUA)

4. 1. 3 Solventes e Outros Materiais

- Acetonitrila grau CLAE (Omnisolv - Charlotte, EUA)
- Acetona (Nuclear - São Paulo - Brasil e Quimex - Porto Alegre, Brasil)
- Água destilada
- Água Milli-Q (Destilador/deionizador Milliq-Q® - Millipore - Billerica, EUA)
- Álcool etílico (Nuclear - São Paulo, Brasil)
- Ácido acético (Synth - Diadema, Brasil)
- Ácido clorídrico (Nuclear - São Paulo, Brasil)
- Hidróxido de sódio (Merck – Frankfurt, Alemanha)
- Diclorometano (Nuclear - São Paulo, Brasil)
- Bicarbonato de sódio (Merck – Frankfurt, Alemanha)
- 4-(*N, N*-dimetilamino)piridina (DMAP) (Sigma - St. Louis, EUA)
- Diciclohexilcarbodiimida (DCC) (Sigma - St. Louis, EUA)
- Acetato de etila (Quimex - Porto Alegre, Brasil)
- Ciclohexano (Quimex - Porto Alegre, Brasil)
- Membrana 0,45 µm (Millipore - Billerica, EUA)
- Sílica para enchimento de pré-coluna LiChrosorb RP-18 (Merck - Frankfurt, Alemanha)

- Coluna (Nova-Pack C₁₈, 150 mm, 3,9 mm, 4 μm) (Waters - Milford, EUA)

Os solventes e reagentes líquidos foram adquiridos em grau analítico ou cromatográfico e utilizados como recebidos.

4. 1. 4 Avaliação Biológica

- Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 180 a 200 g, provindos do biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS).
- Carragenina (Sigma - St. Louis, EUA)

4. 2 MÉTODOS

4. 2. 1 Obtenção do Éster Etilico de Indometacina²

A síntese do éster etílico de indometacina (IndOEt) segue a metodologia descrita por KALGUTKAR e colaboradores (2000) com pequenas adaptações. Em uma solução de indometacina (IndOH) (5,0 mmol) em etanol (20 mL) foi adicionado 0,2 mmol de DMAP. A solução foi resfriada a 0 °C em um balão sob argônio e, após 10 minutos, foi adicionado DCC (5,0 mmol). A reação permaneceu à temperatura de 0 °C por mais 30 minutos e, então, foi mantida à temperatura ambiente por 16 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada.

Ao final da reação o excesso de solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em diclorometano (30 mL) e a suspensão foi filtrada. O filtrado foi lavado com solução aquosa saturada de NaHCO₃ (3 x 10 mL) e o precipitado de dicitclohexiluréia foi descartado. A fase orgânica foi seca com MgSO₄ anidro, filtrada e o solvente foi evaporado. O produto foi purificado através de coluna cromatográfica (sílica-gel 60, 70-230 mesh), empregando uma mistura de acetato de

² O IndOEt foi sintetizado por Leonardo U. Soares em seu trabalho de mestrado realizado no PPG-Química (UFRGS).

etila e ciclohexano (1:1 v/v) como eluente. O éster foi obtido com 80 % de rendimento, após purificação.

O ponto de fusão não corrigido do IndOEt foi determinado em equipamento de ponto de fusão em bloco situando-se na faixa de 82 - 83 °C.

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas em Espectrômetro Varian (VXR-200 ou YH-300) à temperatura ambiente, usando o tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

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

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

4. 2. 2 Método Analítico

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi o método empregado para a quantificação da IndOH e de seu éster nas formulações preparadas e durante as reações de hidrólise alcalina (perfis cinéticos).

A fase móvel empregada foi preparada com acetonitrila/água (70:30 v/v), tendo seu pH aparente ajustado em 5,0 com ácido acético a 10 % e medido em potenciômetro. O fluxo empregado foi de 0,7 mL/min e o volume de injeção foi de 20 μL . Tanto a IndOH como seu éster etílico foram detectados em 267 nm.

A validação da metodologia foi realizada segundo as recomendações da International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use (ICH,1996). Os parâmetros avaliados foram a linearidade, a exatidão, a repetibilidade, a precisão intermediária e o limite

de quantificação. Esses parâmetros foram determinados pela análise de três curvas de calibração e amostras de nanocápsulas a cada dia, durante três dias consecutivos. A solução-mãe foi preparada a partir da massa exata de aproximadamente 25,0 mg de IndOH diluída em 50 mL de acetonitrila. A partir da solução-mãe as curvas foram preparadas nas seguintes concentrações: 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 e 25,0 µg/mL. As amostras de nanocápsulas foram preparadas a partir de soluções-mãe distintas daquela da curva de calibração. À estas amostras foram adicionadas quantidades de indometacina resultando nas concentrações 3,0, 12,0 e 17,0 µg/mL, sendo determinado o percentual de IndOH recuperado a partir destas amostras acrescidas de fármaco.

4. 2. 3 Preparação dos Sistemas Nanoestruturados

As suspensões de nanocápsulas (NC), nanoesferas (NS) e nanoemulsão (NE) foram preparadas empregando-se a composição de fases descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Composição quali e quantitativa das formulações.

	Componentes	Quantidade	NC	NS	NE
Fase Aquosa	Água destilada	53 mL	X	X	X
	Polissorbato 80	0,0770 g	X	X	X
Fase Orgânica	Acetona	27 mL	X	X	X
	Monoestearato de sorbitano	0,0770 g	X	X	X
	Poli(ε-caprolactona)	0,1000 g	X	X	
	Triglicerídeo dos ácidos caprílico/cáprico	0,330 mL	X		X
	IndOH ou IndOEt	0,0100 g	X	X	X

As suspensões de NC foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímeros pré-formados (FESSI *et al.*, 1989). Primeiramente, foi preparada a fase orgânica contendo o óleo (triglicerídeo dos ácidos caprílico/cáprico), o tensoativo de baixo EHL (monoestearato de sorbitano), o polímero (PCL), a substância a ser

encapsulada (IndOH ou IndOEt) e acetona. Esta foi mantida sob agitação e aquecimento a 40 °C. Em um frasco separado, o polissorbato 80 (tensoativo de elevado EHL) foi disperso em água, permanecendo sob agitação à temperatura ambiente. Após a completa dissolução dos componentes de ambas as fases, a fase orgânica foi vertida lentamente sobre a fase aquosa através de um funil. A suspensão resultante foi mantida sob agitação moderada por 10 minutos, à temperatura ambiente. A suspensão foi concentrada a um volume final de 10 mL em evaporador rotatório, para eliminação do solvente orgânico e concentração da água para um ajuste da concentração final de IndOH ou de seu éster a 1,0 mg/mL em balão volumétrico. Para a preparação de NS procedeu-se da mesma forma descrita para as NC, omitindo-se o óleo da composição (método de nanoprecipitação). A NE foi preparada através da emulsificação espontânea conforme descrito para NC, omitindo-se o polímero. As formulações foram preparadas em triplicatas.

Em paralelo, foram preparadas formulações de NC contendo IndOEt, com diferentes concentrações de polímero, variando em um gradiente de PCL de 8,0 mg/mL (NC80), 6,0 mg/mL (NC60), 4,0 mg/mL (NC40), 2,0 mg/mL (NC20) e 0,0 mg/mL (NE).

4. 2. 4 Caracterização Físico-Química dos Sistemas Nanoestruturados

4. 2. 4. 1 Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado mediante a utilização de potenciômetro, calibrado com soluções-tampão de valores de pH 4,0 e 7,0. Este parâmetro foi determinado a partir das suspensões mantidas à temperatura ambiente, após a preparação. Foram realizadas três determinações para cada formulação.

4. 2. 4. 2 Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico das Partículas

A avaliação do diâmetro e distribuição do diâmetro das nanopartículas foi realizada por espalhamento de luz dinâmico (PCS), por análise da luz espalhada em ângulo fixo de 90° à temperatura ambiente (20 °C). As medidas foram realizadas em espectrômetro de auto-correlação laser Brookhaven, sendo as amostras diluídas 500 vezes. Os resultados representam a média de três determinações.

4. 2. 4. 3 Teor de Sonda (IndOH ou IndOEt) nas Formulações

As suspensões contendo 1,0 mg/mL de IndOH ou do IndOEt foram tratadas com acetonitrila para a dissolução de todos os componentes da formulação. Foram transferidas alíquotas de 100 µL a um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com acetonitrila. A solução foi filtrada (Millipore, 0,45 µm) e o teor de sonda foi determinado pelo método de CLAE. Os resultados foram expressos em teor total de IndOH ou IndOEt (mg/mL) e representam a média de triplicata de amostra para cada suspensão.

4. 2. 5 Diluição das Suspensões de Nanocápsulas com Etanol

Uma alíquota de suspensão de NC foi diluída em etanol na proporção de 1:100 (v/v). Após 3 minutos de agitação, a amostra foi centrifugada (10 minutos, 5000 rpm). A IndOH ou o seu éster foram determinados nos correspondentes sobrenadantes por CLAE. As medidas foram realizadas em duplicatas de três amostras de cada formulação preparada com a IndOH ou com o IndOEt. O sedimento resultante da centrifugação foi analisado por ressonância magnética nuclear de ¹H (200 MHz; acetona-*d*₆) e teve seu ponto de fusão determinado (método do bloco aquecido).

4. 2. 6 Medida do Diâmetro das Nanocápsulas após Adição de Quantidades Crescentes de Etanol

A medida do diâmetro de NC contendo IndOEt ou IndOH, após adição de volumes crescentes de etanol, foi acompanhada por PCS, conforme descrito no item 4. 2. 4. 2.

Foi medido inicialmente o diâmetro das NC antes da adição de etanol, através da diluição de 100 μ L da suspensão até o volume de 50 mL com água. Foram adicionados, então, na mesma solução (5,0 mL), volumes crescentes de etanol (de 0,1 mL até 27,3 mL), sendo que, após cada adição, o diâmetro efetivo de partícula foi novamente medido. As medidas foram realizadas em triplicata de amostra para cada suspensão.

4. 2. 7 Hidrólise das Sondas em Meio Alcalino

As reações de hidrólise alcalina da IndOH e de seu éster associados às nanopartículas foram realizadas à temperatura de 37 °C por adição de 2 mL de cada formulação em 8 mL de solução aquosa de NaOH 0,05 M. Alíquotas (300 μ L) foram coletadas entre 5 minutos e 1440 minutos para o IndOEt e entre 0,5 minuto e 2 minutos para a IndOH e tratadas com 5 μ L de HCl 2,5 M, seguido de diluição com 1,2 mL de acetonitrila. Após centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos, os sobrenadantes foram analisados por CLAE observando-se o desaparecimento do substrato. As reações foram realizadas em triplicata.

Com fins comparativos, foram realizadas reações de hidrólise alcalina das sondas em solução de acetonitrila (1,0 mg/mL), seguindo a mesma metodologia.

4. 2. 8 Medidas de Diâmetro de Partícula Durante a Reação de Hidrólise

As suspensões de nanopartículas contendo as sondas foram analisadas quanto à variação do seu diâmetro durante a reação de hidrólise alcalina. As medidas de diâmetro de partícula em função do tempo foram acompanhadas por PCS.

Do meio reacional descrito no item 4. 2. 7 foram coletadas, em intervalos de tempo pré-estabelecidos, alíquotas de 100 µL e diluídas até o volume de 10 mL com água, procedendo-se as medidas conforme descrito no item 4. 2. 4. 2.

4. 2. 9 Modelagem Matemática dos Perfis Cinéticos

Com a finalidade de explicar os perfis cinéticos obtidos a partir das reações das sondas associadas aos sistemas nanoestruturados foi aplicado o modelo da Lei da Potência (Equação 5). A modelagem matemática dos resultados cinéticos segundo a equação da Lei das Potências permitiu a obtenção dos parâmetros a e n , que caracterizaram os sistemas quanto as suas características estruturais e geométricas e o mecanismo de liberação das sondas.

A descrição matemática das curvas cinéticas foi realizada pelo ajuste dos dados experimentais aos modelos monoexponencial (Equação 8) e biexponencial (Equação 9).

$$C = C_0 e^{-kt}$$

(Equação 8)

$$C = ae^{-k_1t} + be^{-k_2t}$$

(Equação 9)

Onde: C é a concentração da sonda no tempo t ,

C_0 é a concentração inicial da sonda;

k é a constante cinética observada;

a e b são as concentrações iniciais de sonda;

k_1 e k_2 são constantes cinéticas observadas.

A modelagem dos perfis cinéticos experimentais foi realizada através do programa Micromath Scientist[®], realizando a comparação dos modelos entre si com base nos seguintes parâmetros: critério de seleção do modelo (MSC), maior coeficiente de correlação e melhor ajuste gráfico.

4. 2. 10 Edema de Pata de Rato Induzido por Carragenina³

A atividade antiedematogênica do IndOEt associado a NC, NS e NE foi avaliada pelo método de edema de pata de rato induzido por carragenina, utilizando a metodologia descrita por WINTER e colaboradores (1962). O parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (UFRGS) encontra-se no anexo.

Para o experimento, os ratos utilizados, com peso entre 180-200 g, foram divididos em oito grupos:

- Grupo controle positivo: tratado com dispersão aquosa de indometacina (1 mg/mL) em polissorbato 80 (1 %), na dose de 10 mg/Kg, v. o. (n = 10).
- Grupo controle negativo A: tratado com água destilada, v. o. (n = 9).
- Grupos controle negativo B: tratados com as suspensões de NC (n = 8), NS (n = 6) e NE (n = 8) na ausência do IndOEt, v. o.
- Grupos teste: tratados com as formulações de NC (n = 8), NS (n = 10) e NE (n = 8) contendo o IndOEt (1 mg/mL), na dose de 10 mg/Kg, v. o.

Os animais foram levemente sedados com éter etílico para administração das formulações por via oral através de uma sonda, uma hora antes da indução do edema. Após, os animais foram anestesiados pela via intraperitoneal, com pentobarbital sódico, na dose de 40 mg/Kg de peso corporal e o edema foi induzido na aponevrose subplantar na pata traseira direita dos ratos, através da injeção de 0,1 mL de solução de carragenina em salina (7,5 mg/mL). A pata esquerda serviu de

³ A avaliação da atividade antiedematogênica foi realizada no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia (UFRGS), sob a supervisão da Profa. Dra. Elfrides Schapoval e colaboração da Profa. Dra. Sílvia Guterres.

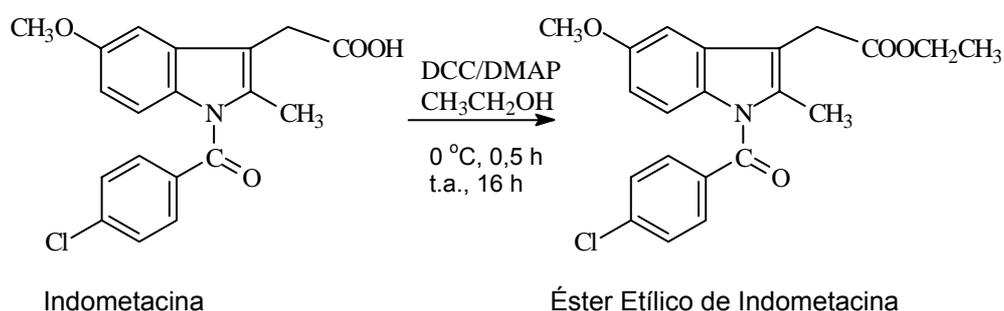
controle, através da injeção de 0,1 mL de solução salina. O volume das patas foi medido em triplicata em hidropletismômetro 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção do agente flogístico. Os resultados de redução de edema foram calculados em relação ao aumento percentual do volume das patas dos animais controle e tratados. A atividade antiedematogênica das formulações contendo IndOEt foi expressa como percentual de redução do edema, em relação aos grupos controle.

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e. p. m.) e analisados estatisticamente pelo teste “t” de Student.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. 1 OBTENÇÃO DO ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA

A preparação do IndOEt consistiu na ativação da IndOH com DCC, que forma um intermediário com bom grupo abandonador. Após a ativação da função ácido carboxílico, a condensação com etanol (usado como reagente em excesso e como solvente) produziu o éster (Esquema 1). O rendimento do produto purificado foi de 80 % e a pureza foi avaliada por CLAE, tendo sido estimada em $99,24 \pm 0,04$ %. O espectro de RMN do ^1H apresentou sinais em 4,16 e 1,27 ppm, correspondentes ao grupo etoxila, e no espectro de RMN de ^{13}C (APT), foram observados sinais em 170,9 ppm e 61,0 ppm atribuídos à carbonila do éster e ao CH_2 do grupo etoxila, respectivamente. Os deslocamentos químicos (δ) são relativos ao tetrametilsilano.



Esquema 1. Síntese do éster etílico de indometacina.

5. 2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

5. 2. 1 Indometacina

A validação de uma metodologia analítica deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ICH, 1996; BRASIL, 2003). Foram selecionados os seguintes parâmetros para a validação das curvas-padrão: linearidade, exatidão, repetibilidade, precisão intermediária e limite de quantificação.

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

A média das nove curvas de calibração da IndOH em acetonitrila, na faixa de concentração de 1,0 a 25,0 $\mu\text{g/mL}$, pode ser visualizada na Figura 2. O valor de F (7,63) da ANOVA da regressão foi maior que o F tabelado (4,04) para $\alpha = 0,01$, indicando a existência de relação linear entre a variáveis relacionadas. Da mesma forma, os coeficientes de correlação (r) das curvas intra e inter-dias apresentaram valores acima de 0,99, estando de acordo com o que é preconizado pelo ICH (1996) (Tabela 3).

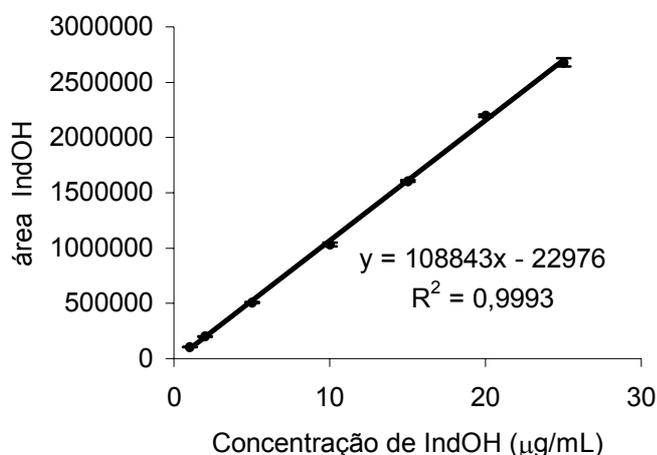


Figura 2. Média das nove curvas de calibração da IndOH em acetonitrila.

Tabela 3. Coeficientes de correlação (r) das curvas de calibração da IndOH.

Dia de validação	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Inter-dias
1	0,9988	0,9991	0,9996	0,9992 ± 0,0004
2	0,9996	0,9992	0,9995	0,9994 ± 0,0002
3	0,9994	0,9991	0,9996	0,9994 ± 0,0003

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor adotado como verdadeiro. Foram preparadas amostras NC acrescidas de IndOH nas concentrações de 3,0, 12,0 e 17,0 µg/mL para avaliar esse parâmetro. Para todas as amostras o percentual de fármaco recuperado foi de 100 %, estando de acordo com os padrões estipulados pelo ICH (1996) (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliação da exatidão do método analítico de doseamento da IndOH.

Concentração de IndOH (µg/mL)	Dia 1 Conc. ± DP (exatidão %)	Dia 2 Conc. ± DP (exatidão %)	Dia 3 Conc. ± DP (exatidão %)
3,0	3,0 ± 0,1 (100,0 %)	3,0 ± 0,1 (100,0 %)	3,0 ± 0,0 (100,0 %)
12,0	12,0 ± 0,0 (100,0 %)	12,0 ± 0,1 (100,0 %)	12,0 ± 0,0 (100,0 %)
17,0	17,0 ± 0,0 (100,0 %)	17,0 ± 0,1 (100,0 %)	17,0 ± 0,1 (100,0 %)

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

Os dados de repetibilidade, expressos pelos coeficientes de variação intra-dia, e os dados de precisão intermediária, expressos pelos coeficientes de variação

inter-dia, foram obtidos através da análise das mesmas amostras de NC batizadas com IndOH e apresentaram valores abaixo de 2 %.

Tabela 5. Avaliação dos coeficientes de variação intra e inter-dia do método analítico de doseamento da IndOH.

Concentração de IndOH (µg/mL)	Dia 1 CV %	Dia 2 CV%	Dia 3 CV%	Inter-dia CV %
3,0	1,7	1,3	1,0	0,7
12,0	0,3	0,5	0,3	0,3
17,0	0,1	0,3	0,3	0,1

Os resultados referentes aos testes de exatidão, repetibilidade e precisão intermediária e os coeficientes de correlação obtidos das curvas de calibração apresentaram-se adequados, permitindo considerar validado o método para doseamento da IndOH na faixa de concentração de 1,0 a 25,0 µg/mL.

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

O ponto da curva de calibração referente à concentração de 1,0 µg/mL foi considerado o limite de quantificação do método analítico, uma vez que apresentou coeficiente de variação aceitável (abaixo de 2 %). A concentração de 0,5 µg/mL foi testada e forneceu um coeficiente de variação de 21,5 %, sendo, portanto, inadequado para o propósito.

5. 2. 2 Éster etílico de indometacina

A validação do método de quantificação do IndOEt foi realizada por SOARES (2003). A curva de calibração foi obtida na faixa de 1,0 a 25,0 µg/mL, com coeficiente de correlação 0,9995. As amostras de controle de qualidade com concentrações de 3,0 12,0 e 17,0 µg/mL apresentaram exatidão de 104,78 %, 99,42 % e 100,20 %, respectivamente. Os dados de repetibilidade e precisão intermediária foram obtidos a partir das mesmas amostras de controle de qualidade e apresentaram coeficientes de variação abaixo de 2 %.

5. 3 FORMAS DE ASSOCIAÇÃO DA INDOMETACINA NOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

5. 3. 1 Suspensões de Nanocápsulas

Após a preparação, as suspensões de NC apresentaram aspecto macroscopicamente homogêneo, com diâmetros de partícula inferiores a 300 nm. Os valores de pH foram de $5,07 \pm 0,03$ e $5,31 \pm 0,06$, para as formulações contendo IndOH e IndOEt, respectivamente, e as concentrações de IndOH e IndOEt foram próximas de 1,0 mg/mL (Tabela 6).

Tabela 6. Características físico-químicas das formulações de NC.

Formulação	Diâmetro (nm) ^a ± DP	pH ± DP	teor ± DP (mg/mL)
NC-IndOH	288 ± 9	5,07 ± 0,03	0,98 ± 0,01
NC-IndOEt	278 ± 29	5,31 ± 0,06	0,98 ± 0,01

^a Amplitude de distribuição < 62 nm.

A taxa de associação da IndOH foi considerada correspondente ao teor total, uma vez que foi anteriormente demonstrado para essa formulação que 100 % da IndOH está associada às NC (O'BACH, 2002). A concentração do IndOEt associado às NC também foi considerada correspondente ao teor total, pois foi determinado por SOARES (2003) que a solubilidade do IndOEt em água é menor do que 1,0 µg/mL, e que não há estabilização de nanocristais de éster nas suspensões pela ação dos tensoativos.

5. 3. 2 Diluição das Suspensões de Nanocápsulas com Etanol

Com o objetivo de diferenciar a adsorção no polímero da dissolução no núcleo oleoso das NC como forma de associação da IndOH e de seu éster, foi realizada a diluição das suspensões de NC com etanol. Considerando que o etanol solubiliza a IndOH ou o IndOEt, e não dissolve o polímero, a fração adsorvida na matriz

polimérica de IndOH ou de seu éster poderia ser extraída por este solvente (Figura 3). Desta forma, uma liberação inicial rápida (efeito *burst*) poderia ser diferente para a IndOH, quando comparada com o IndOEt devido às suas diferentes solubilidades no óleo, e, conseqüentemente, diferentes concentrações na superfície da partícula. No entanto, os resultados mostraram uma liberação de $97,0 \pm 0,6$ % para IndOH e $98,7 \pm 4,8$ % para o IndOEt. Desta forma, ambas as substâncias (IndOH e seu éster) poderiam estar adsorvidas no polímero (superfície da partícula) ou elas poderiam ter sido completamente liberadas das NC, após diluição das suspensões com etanol.

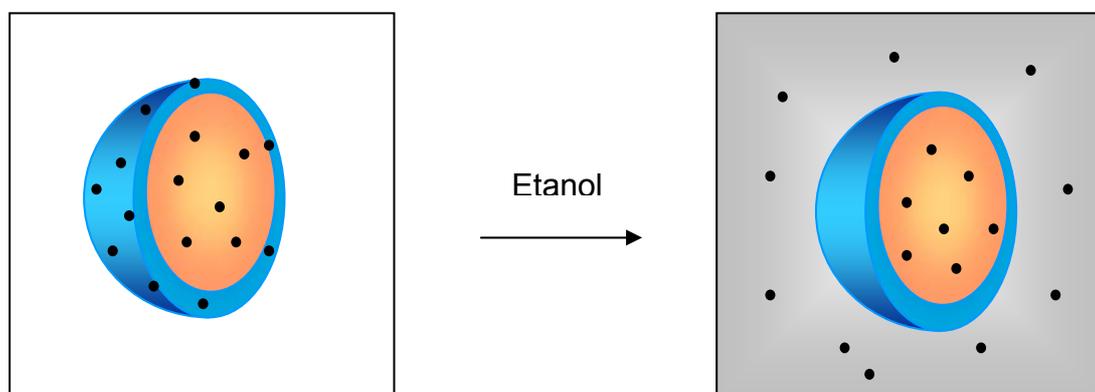


Figura 3. Representação esquemática da estratégia de determinação da concentração de IndOH ou de IndOEt adsorvida na parede polimérica usando etanol como solvente.

5. 3. 3 Medida do Diâmetro das Nanocápsulas após Adição de Quantidades Crescentes de Etanol

Com o objetivo de verificar o comportamento das suspensões (NC-IndOH e NC-IndOEt) em presença de etanol, foram realizadas análises de PCS após a adição de alíquotas de etanol nas suspensões. Os resultados (Figura 4) mostraram um aumento no tamanho de partícula de 274 ± 4 nm para 622 ± 17 nm para NC-IndOH e 285 ± 14 nm para 622 ± 25 nm para NC-IndOEt, após adição de 3,3 mL de etanol, seguido por um decréscimo até 360 ± 15 nm e 370 ± 3 nm, respectivamente, após

adição de 27,3 mL deste solvente. Esses resultados sugerem a permeação do etanol através da parede polimérica das NC durante a adição de etanol nas suspensões. O aumento do tamanho de partícula poderia estar relacionado com a difusão do etanol a partir da fase externa aquosa para a fase interna das NC, enquanto que o decréscimo poderia estar relacionado com a difusão do etanol da fase interna para o meio externo. Após a adição de 5 mL de etanol, conduzindo a uma proporção de etanol e água de 1:1 (v/v) (Figura 4), a fase interna poderia difundir para o meio externo ocasionando o decréscimo do tamanho de partícula em cada adição do solvente, devido a afinidade da fase interna pelo solvente orgânico. Após a adição de 23 mL, os sistemas apresentaram diâmetro de partícula constante.

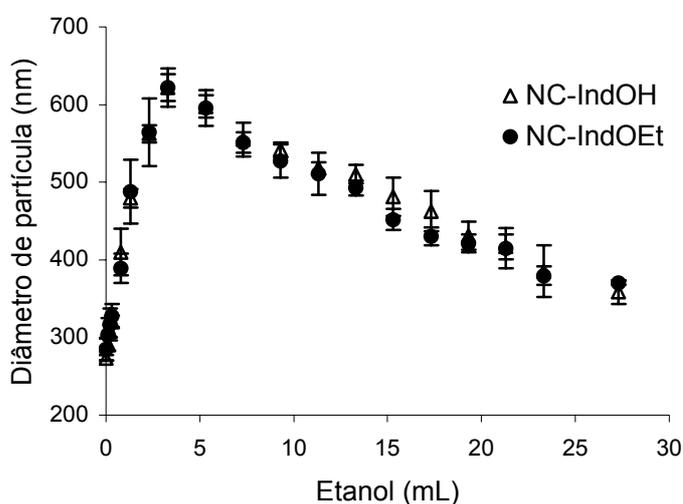


Figura 4. Efeito da adição de etanol nas suspensões de nanocápsulas contendo IndOH ou IndOEt.

De acordo com a literatura (MAYER *et al.*, 2002), quando o etanol é usado como solvente na preparação de NC de poli(cianoacrilato de *n*-butila) pelo método de polimerização *in situ*, contendo um triglicerídeo (Mygliol 812[®]), após a formação das NC mas antes da evaporação do solvente, as moléculas de etanol difundem através da parede polimérica, em um tempo de meia-vida do etanol encapsulado de aproximadamente 6 ms.

A respeito do experimento de diluição das suspensões de NC com etanol, se as fases interna e externa de cada sistema estão em equilíbrio e a centrifugação

promove a agregação do polímero, o sobrenadante poderia conter, além da IndOH e de seu éster, o óleo e os dois tensoativos. Neste caso, o sedimento poderia ser constituído apenas de polímero.

Com o objetivo de verificar a composição dos sedimentos após adição de etanol e centrifugação, cada uma das formulações (NC-IndOH e NC-IndOEt) teve seu sedimento separado do sobrenadante e este foi seco (dessecador) para análises de ponto de fusão e RMN. O faixa de fusão de ambos os sedimentos foi de 58-60 °C, correspondendo aos valores de ponto de fusão da PCL e do monoestearato de sorbitano. Com a finalidade de determinar a estrutura química dos sedimentos, análises de RMN foram realizadas. O espectro (RMN do ¹H) apresentou dois tripletes em 4,05 ppm e 2,30 ppm, integrando dois prótons cada um, e dois multipletes em 1,62 ppm e 1,41 ppm, integrando quatro e dois prótons, respectivamente (Anexo). Essas análises confirmaram que o polímero (PCL) é o único componente do sedimento. Neste caso, todos os componentes, exceto o polímero, foram dissolvidos pelo etanol após a diluição, e a centrifugação promoveu a agregação do polímero.

O experimento baseado na diluição das suspensões com etanol [1:100(v/v)], seguido de centrifugação, promoveu a total liberação da IndOH ou de seu éster a partir das NC. Os resultados mostraram que o emprego desta abordagem não foi adequada para diferenciar a forma de associação da IndOH ou de seu éster em NC.

5. 3. 4 Reações de Hidrólise Alcalina

Com o objetivo de diferenciar a forma de associação da IndOH em NC, foram comparados os perfis cinéticos de hidrólise das funções amida e éster da IndOH e do IndOEt por catálise alcalina. Se a IndOH e o IndOEt estão dissolvidos no óleo das NC, poderia ser esperado um comportamento difusivo de ambos quando tratados com solução aquosa de NaOH. Essa abordagem foi baseada na baixa afinidade do polímero pela fase aquosa das suspensões (POHLMANN *et al.*, 2002). Nesse caso, a reação poderia ocorrer na interface partícula/água e a taxa de hidrólise poderia ser

correspondente à difusão das moléculas a partir da fase interna para a interface, simulando-se uma liberação em condição *sink*.

A hidrólise da IndOH e do IndOEt (1 mg/mL) em solução de acetonitrila foi determinada pela adição em cada formulação de uma solução aquosa de NaOH (0,05 M) e o desaparecimento do substrato foi determinado por CLAE (Figura 5).

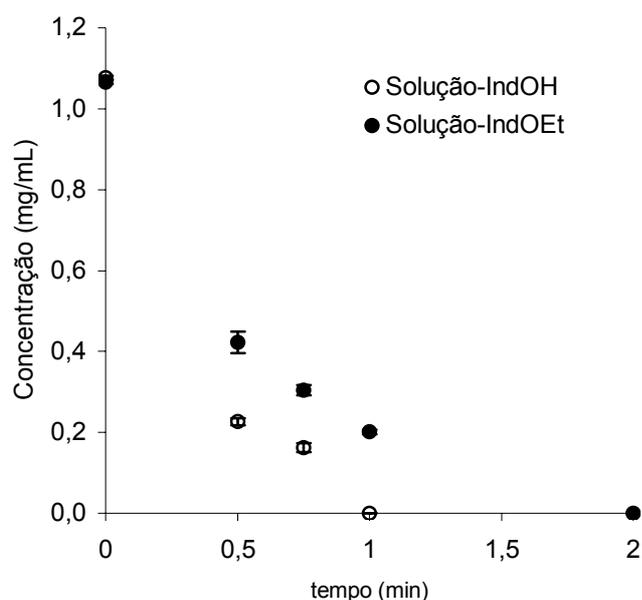


Figura 5. Perfil cinético da hidrólise da IndOH e do IndOEt em solução de acetonitrila.

Após 1 e 2 minutos, a IndOH e o IndOEt foram totalmente hidrolisados, respectivamente. Por outro lado, quando as suspensões correspondentes de NC foram tratadas com NaOH, a IndOH foi totalmente consumida em 2 minutos, enquanto que para a reação do IndOEt associado a NC a totalidade do éster foi consumida ao final de 24 horas (Figura 6).

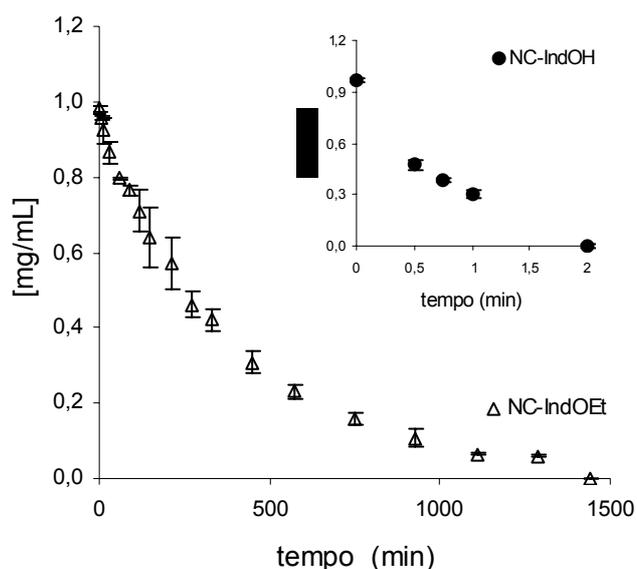


Figura 6. Perfil cinético da hidrólise da IndOH e do IndOEt em nanocápsulas.

Para explicar porque a hidrólise do IndOEt foi muito mais lenta quando comparada com a IndOH duas hipóteses foram levantadas. A primeira hipótese foi considerar que a IndOH estaria adsorvida no polímero e, pelo menos, uma parte do IndOEt foi dissolvido no óleo das NC. O tratamento das suspensões com NaOH poderia promover a liberação total da IndOH pela formação do sal (solúvel em água) e a amida poderia ser hidrolisada em solução. Por outro lado, a taxa de hidrólise do éster poderia ser determinada pela sua difusão a partir da fase interna para a interface e/ou pela erosão das NC. As NC hidrofóbicas (PCL) poderiam sofrer uma erosão diferenciada pela presença da IndOH (um ácido) ou pela presença do IndOEt (um éster). No caso da IndOH, a taxa de erosão poderia ser mais rápida e a formação do sal, que é solúvel em água, poderia facilitar a hidrólise da amida. Para determinar a influência da solução aquosa de NaOH no diâmetro de partícula, realizou-se a determinação da média do diâmetro e polidispersão durante o experimento de hidrólise alcalina da IndOH e do IndOEt.

5. 3. 5 Determinação do Diâmetro das Nanocápsulas Durante a Hidrólise Alcalina

Para verificar a integridade das NC em cada sistema, após a adição de solução aquosa de NaOH, os tamanhos de partícula e as polidispersões foram determinados. Como a hidrólise da IndOH em meio alcalino foi muito rápida, o experimento foi conduzido até 30 minutos. Para o experimento envolvendo NC contendo IndOEt, a determinação do diâmetro durante a hidrólise foi realizada até 24 horas. Durante a hidrólise alcalina, as NC contendo IndOH apresentaram diâmetros de partícula constantes de 264 ± 10 nm (polidispersão de 0,1021) (Figura 7), e as NC contendo IndOEt apresentaram tamanhos de partícula de 259 ± 7 nm (polidispersão de 0,1005) (Figura 8). Os tamanhos de partícula constantes durante as reações de hidrólise demonstraram que as NC não foram dissolvidas e nem o polímero sofreu inchamento com a água durante o contato com a solução aquosa de NaOH. Além disso, a determinação da polidispersão, que é um indicativo da heterogeneidade de tamanho da população de partículas que compõe os sistema, demonstrou que a formulação manteve constante sua polidispersão.

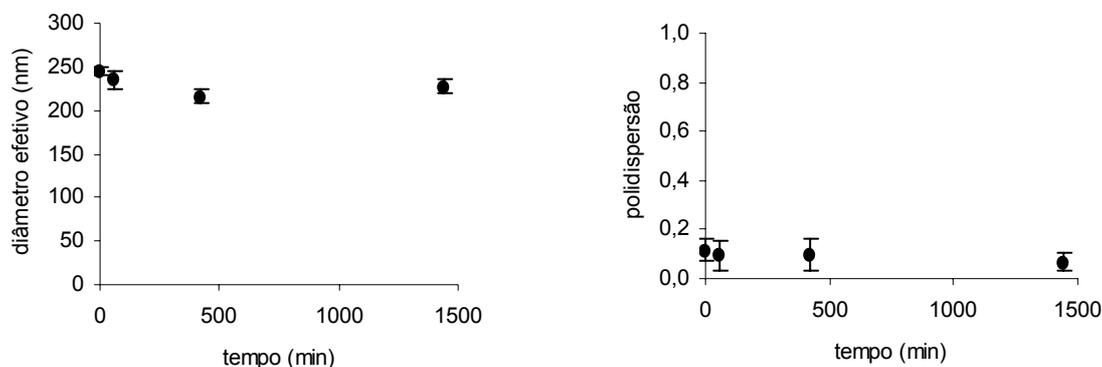


Figura 7. Diâmetro efetivo e polidispersão das NC contendo IndOH durante a hidrólise alcalina.

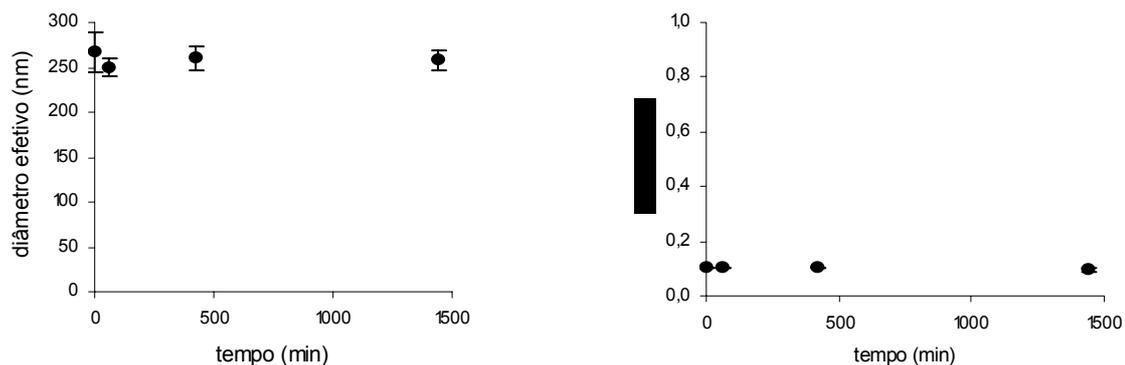


Figura 8. Diâmetro efetivo e polidispersão das NC contendo IndOEt durante a hidrólise alcalina.

De acordo com esses resultados, a hipótese de erosão foi refutada, sugerindo que a reação é determinada pela difusão. A adsorção foi admitida como modelo de associação da IndOH em NC. Sendo assim, a IndOH está adsorvida no polímero e a adição de NaOH promoveu sua rápida liberação pela formação do sal correspondente. O produto dissolvido é rapidamente hidrolisado pelo excesso de NaOH. Por outro lado, o IndOEt estaria distribuído no óleo e na parede das NC.

5. 3. 6 Suspensões de Nanoesferas e Nanoemulsão

Com fins comparativos, foi realizada a caracterização de NS e NE para determinação da forma de associação da IndOH e do IndOEt nestas formulações. As formulações apresentaram-se monodispersas, com diâmetros de partícula entre 174 e 288 nm. Os valores de pH situaram-se entre 4,90 e 5,22. O doseamento das suspensões recém preparadas mostrou teor de IndOH ou de IndOEt próximo de 1,0 mg/mL para todas as formulações (Tabela 7).

Tabela 7. Características físico-químicas das formulações de NS e NE.

Formulação	Diâmetro (nm) ^a ± DP	pH ± DP	Teor ± DP (mg/mL)
NS-IndOH	174 ± 3	4,90 ± 0,01	0,98 ± 0,01
NS-IndOEt	208 ± 9	5,22 ± 0,07	0,99 ± 0,01
NE-IndOH	236 ± 17	4,94 ± 0,03	0,99 ± 0,01
NE-IndOEt	250 ± 9	5,18 ± 0,07	0,99 ± 0,01

^a Polidispersões < 0,2.

A hidrólise alcalina da IndOH associada a NS e NE também demonstrou o consumo total do fármaco em 2 minutos de reação (Figura 9), demonstrando um perfil cinético similar dos dois sistemas ao da NC.

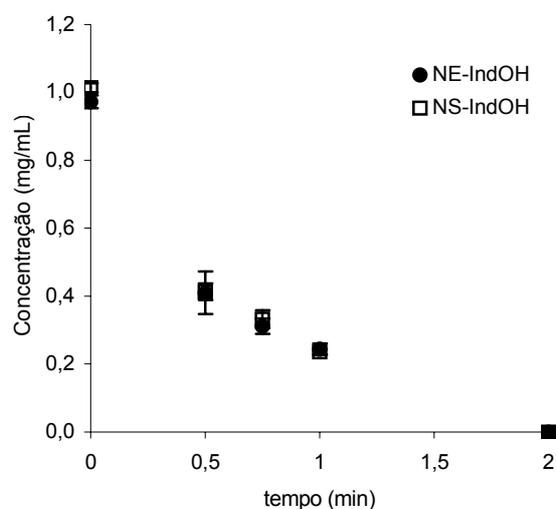


Figura 9. Perfis cinéticos da hidrólise da IndOH em nanoesferas e nanoemulsão.

Quanto aos resultados da hidrólise do IndOEt em NS e NE⁴, estes também mostraram uma velocidade de hidrólise muito mais lenta, quando comparada com a hidrólise da IndOH associada a esses sistemas. Para as NS, o consumo total do IndOEt foi em 450 minutos, enquanto que para a NE o consumo total foi em 750 minutos (Figura 10).

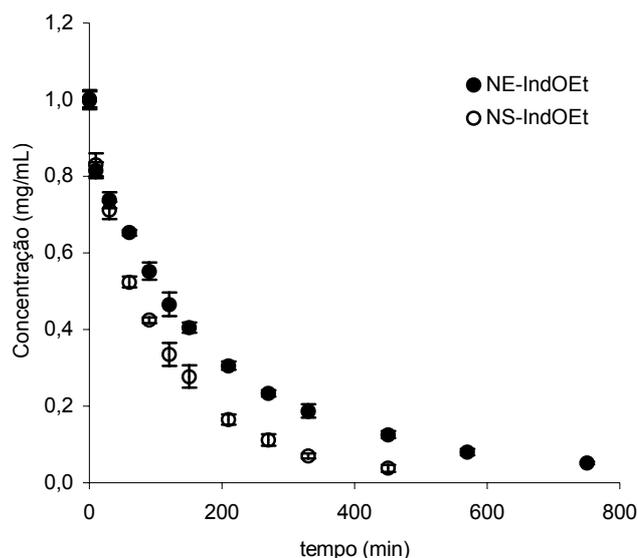


Figura 10. Perfil cinético da hidrólise do IndOEt em NS e NE.

O mesmo experimento de medida de diâmetro de partícula durante a reação de hidrólise alcalina feito para NC foi realizado para NS e NE, demonstrando também a manutenção do diâmetro de partícula desses sistemas durante a hidrólise. Para NE contendo IndOH o diâmetro de partícula foi de 229 ± 9 nm (polidispersão de 0,1064) (Figura 11), e para NS contendo IndOH o diâmetro de partícula foi de 167 ± 8 nm (polidispersão de 0,1068) (Figura 12).

⁴ Dados experimentais obtidos por Leonardo U. Soares em seu trabalho de mestrado no PPG-Química (UFRGS).

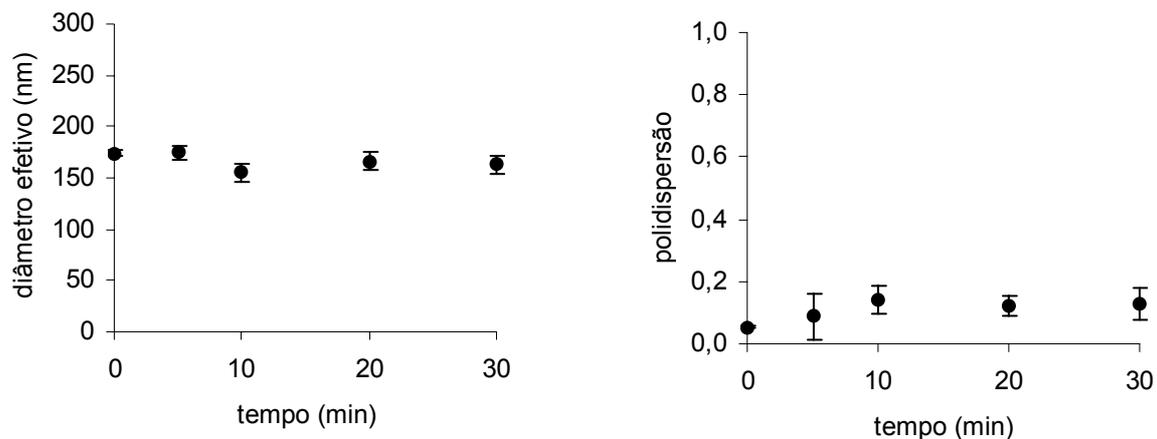


Figura 11. Diâmetro efetivo e polidispersão da nanoemulsão contendo IndOH durante a hidrólise alcalina.

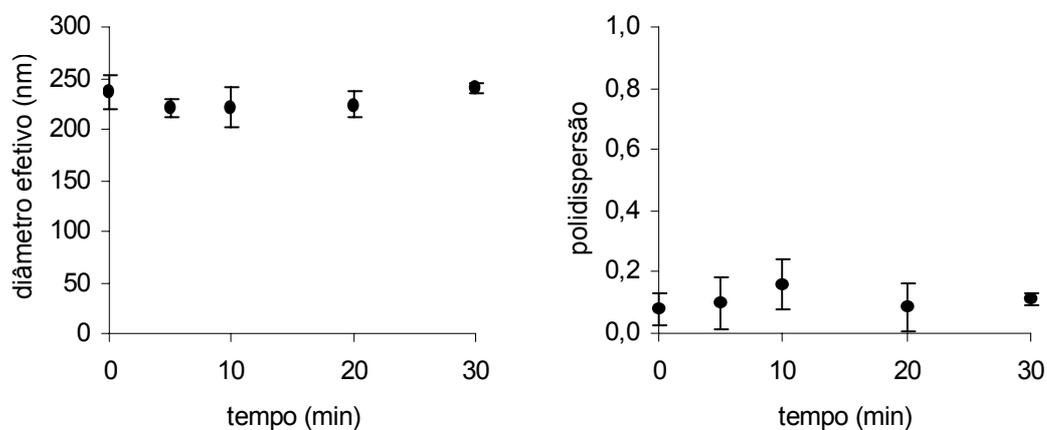


Figura 12. Diâmetro efetivo e polidispersão das nanoesferas contendo IndOH durante a hidrólise alcalina.

O experimento para determinação do diâmetro de NE e NS contendo IndOEt durante a hidrólise também demonstrou a manutenção do diâmetro efetivo das nanoestruturas e os gráficos de polidispersão indicaram que os sistemas são

monomodais de distribuição estreita, e se mantêm assim durante todo o tempo de reação⁵.

De acordo com os dados experimentais, pode-se concluir que, independente da natureza do sistema nanoestruturado, a IndOH está preferencialmente localizada na interface partícula (gotícula)/água, enquanto que o IndOEt estaria disperso ou dissolvido no interior das partículas.

5. 4 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO POLÍMERO NA DIFUSÃO DO IndOEt

Para avaliar a influência da concentração de PCL na difusão do IndOEt foram preparadas NC com concentrações variáveis de 8 a 2 mg/mL de polímero. Todas as formulações apresentaram aspecto homogêneo, com tamanhos de partícula inferiores a 300 nm, teor de IndOEt próximo a 1,0 mg/mL e valores de pH entre 5,44 e 5,04 (Tabela 8).

Tabela 8. Características físico-químicas das formulações de nanocápsulas com diferentes concentrações de polímero.

Formulação	Diâmetro (nm) ^a ± DP	pH ± DP	[IndOEt] (mg/mL) ± DP
NC80	286 ± 21	5,44 ± 0,19	0,99 ± 0,02
NC60	244 ± 3	5,34 ± 0,21	1,01 ± 0,01
NC40	239 ± 24	5,22 ± 0,01	0,99 ± 0,01
NC20	245 ± 5	5,04 ± 0,10	0,99 ± 0,02

^a Polidispersão < 0,2.

A hidrólise alcalina do IndOEt associado a NC80, NC60, NC40 e NC20 foi acompanhada entre 5 e 1440 minutos. Através da análise dos perfis cinéticos dessas formulações e comparando estes perfis com a hidrólise do IndOEt em NC com 10,0 mg/mL de PCL (NC100) e com NE (formulação sem polímero) pode-se

⁵ Dados experimentais obtidos por Leonardo U. Soares em seu trabalho de mestrado realizado no PPG-Química (UFRGS).

observar diferenças nos sistemas estudados, uma vez que o consumo total do éster ocorreu em diferentes tempos (Tabela 9).

Tabela 9. Tempo de consumo total do IndOEt.

	NC100	NC80	NC60	NC40	NC20	NE
Tempo de consumo (min)	1440	1440	1290	1290	1110	750

Os resultados demonstraram que concentração de polímero influencia no tempo de hidrólise do IndOEt, sendo este menor nas formulações com menor concentração de PCL.

5. 5 MODELAGEM MATEMÁTICA DOS PERFIS CINÉTICOS

5. 5. 1 Estudo Comparativo de Nanocápsulas, Nanoesferas e Nanoemulsão

A partir dos resultados obtidos das reações de hidrólise da IndOH e do IndOEt em solução de acetonitrila e associados às suspensões nanoestruturadas, foi realizado um estudo comparativo entre NC, NS e NE baseado na modelagem matemática dos perfis de hidrólise alcalina. A descrição matemática das curvas cinéticas foi realizada pelo ajuste dos pontos experimentais aos modelos monoexponencial (Equação 8) e biexponencial (Equação 9).

No experimento com a IndOH em solução de acetonitrila a modelagem foi realizada para os pontos experimentais até 45 segundos. Para as formulações de NC, NS e NE realizou-se a modelagem de todos os pontos obtidos até 60 segundos. Os pontos obtidos além dos tempos mencionados acima apresentaram consumo total da IndOH ou concentrações inferiores ao limite de quantificação do método analítico. O melhor ajuste gráfico foi para a equação monoexponencial, o que está de acordo com a condição experimental de excesso de NaOH, podendo-se considerar a reação em fase homogênea como uma reação de pseudo-primeira ordem.

A modelagem matemática pelo programa Micromath Scientist[®] forneceu a constante cinética observada do processo k e o coeficiente de correlação r (Tabela 10). A hidrólise alcalina da IndOH em solução forneceu a constante cinética observada $k = 2,7080 \pm 0,0125 \text{ min}^{-1}$ e $r = 0,9975 \pm 0,0008$. A hidrólise alcalina da IndOH em NC forneceu a constante cinética observada $k = 1,2880 \pm 0,0636 \text{ min}^{-1}$ e coeficiente de correlação $r = 0,9968 \pm 0,0009$. Em NS, o valor de k foi de $1,5620 \pm 0,0874 \text{ min}^{-1}$ e o valor de r foi de $0,9965 \pm 0,0005$. Para NE obteve-se constante cinética observada $k = 1,5380 \pm 0,0128 \text{ min}^{-1}$ e coeficiente de correlação $r = 0,9941 \pm 0,0046$. A hidrólise da IndOH em solução foi aproximadamente 2 vezes mais rápida quando comparada com as suspensões coloidais. Isto está de acordo com os perfis cinéticos demonstrados anteriormente (Figuras 5, 6 e 9), onde o consumo total da IndOH em solução ocorre em 1 minuto, e em 2 minutos quando a IndOH está associada às nanoestruturas. O ajuste dos pontos experimentais ao modelo calculado é apresentado nas Figura 13 e 14. A reação interfacial da IndOH associada às nanoestruturas é determinada pela dessorção do fármaco através de sua ionização pela ação do hidróxido de sódio. Após a ionização, ocorre a formação do sal sódico de IndOH, e este em solução sofre hidrólise da função amida (Esquema 2 e Figura 15).

Tabela 10. Parâmetros da modelagem matemática da hidrólise da IndOH utilizando a equação monoexponencial.

	$k \text{ (min}^{-1}\text{)}$	média	DP	r	média	DP
Solução 1	2,7120			0,9969		
Solução 2	2,6940	2,7080	0,0125	0,9984	0,9975	0,0008
Solução 3	2,7180			0,9973		
NC 1	1,3560			0,9958		
NC 2	1,2300	1,2880	0,0636	0,9975	0,9968	0,0009
NC 3	1,2780			0,9971		
NS 1	1,5900			0,9965		
NS 2	1,4640	1,5620	0,0874	0,9970	0,9965	0,0005
NS 3	1,6320			0,9961		
NE 1	1,6860			0,9905		
NE 2	1,4700	1,5380	0,0128	0,9925	0,9941	0,0046
NE 3	1,4580			0,9993		

DP = desvio padrão referente à triplicata de lote.

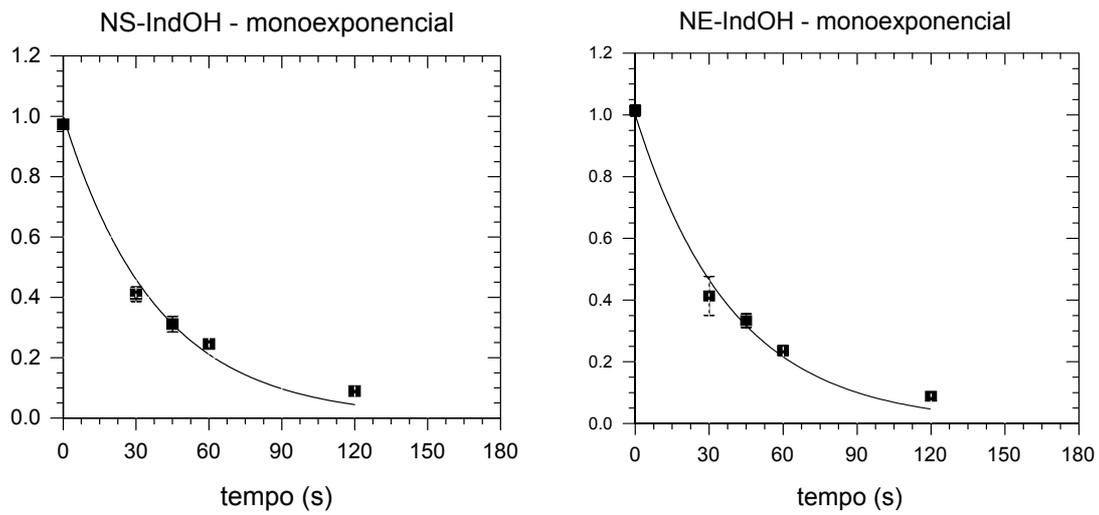


Figura 13. Modelagem da equação monoexponencial para solução e NC contendo IndOH (ordenadas em mg/mL).

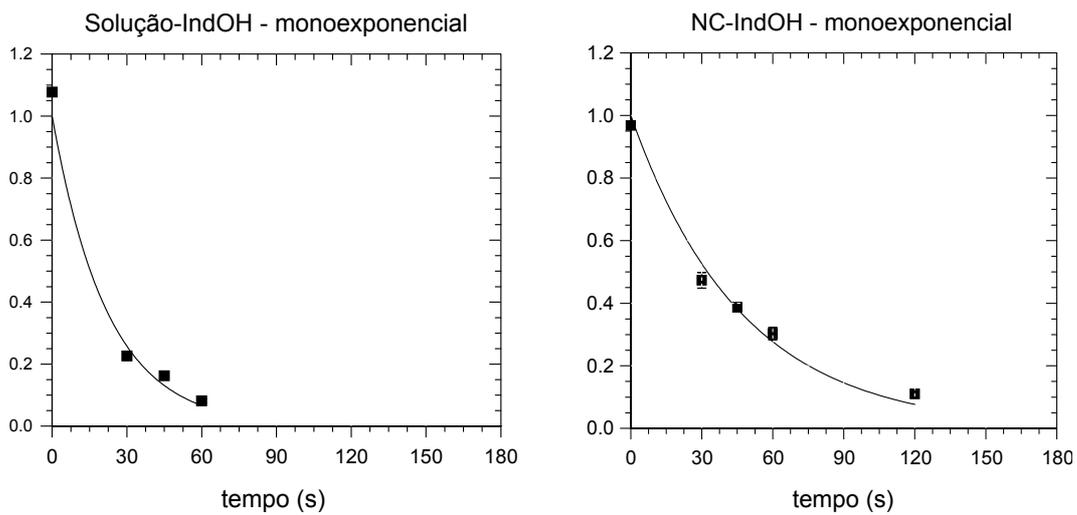
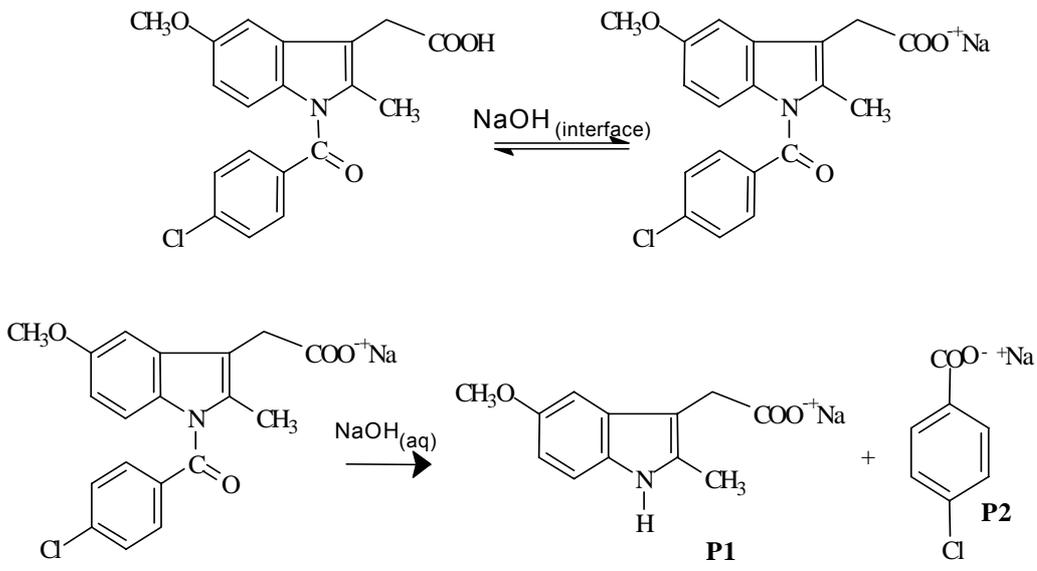


Figura 14. Modelagem da equação monoexponencial para NS e NE contendo IndOH (ordenadas em mg/mL).



Esquema 2. Hidrólise alcalina da IndOH.

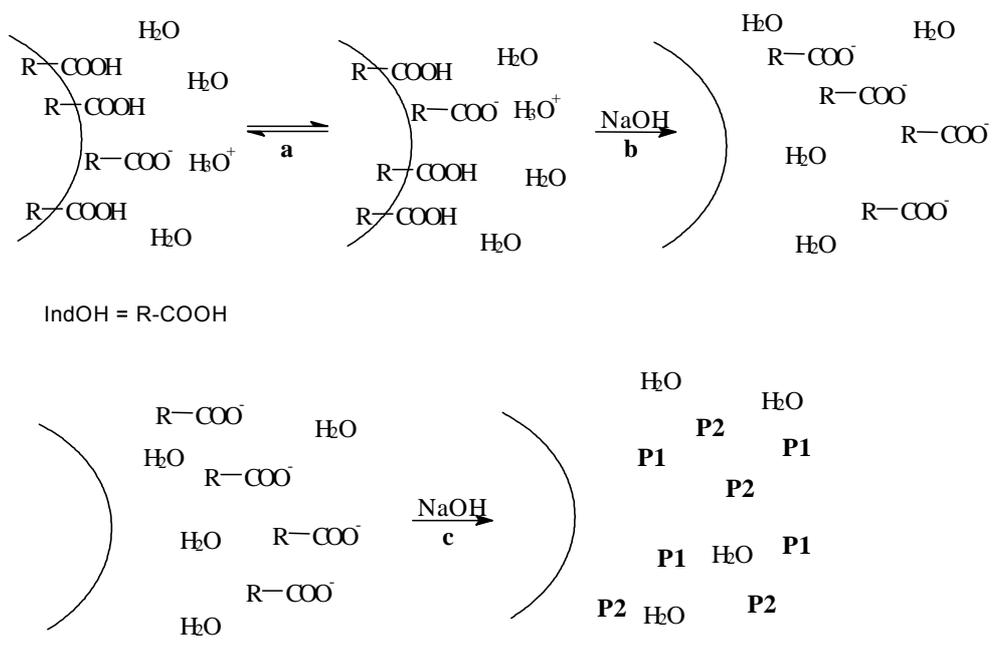


Figura 15. Representação esquemática da hidrólise alcalina da IndOH. a) a IndOH encontra-se adsorvida na superfície da partícula; b) a adição de NaOH promove uma rápida liberação da IndOH pela formação do sal; c) o excesso de NaOH catalisa a hidrólise do fármaco solúvel, fornecendo os produtos 3-acetato-5-metóxi-2-metilindol de sódio (P1) e 4-clorobenzoato de sódio (P2).

Com base nos resultados obtidos nas reações de hidrólise do IndOEt em solução de acetonitrila e associado às suspensões nanoestruturadas, é proposto um estudo comparativo entre os sistemas coloidais baseado na modelagem matemática dos perfis de hidrólise alcalina. A descrição matemática das curvas cinéticas foi realizada pelo ajuste dos dados experimentais aos modelos monoexponencial e biexponencial.

Para o experimento de hidrólise do IndOEt em solução, a modelagem foi realizada até 1 minuto de reação, enquanto que para os experimentos com NC, NE e NS modelou-se todos os pontos obtidos até os tempos de 1290, 750 e 450 minutos, respectivamente. Os pontos obtidos além dos tempos mencionados acima apresentaram consumo total do IndOEt ou concentrações inferiores ao limite de quantificação do método analítico.

O perfil de hidrólise do IndOEt em solução foi ajustado segundo o modelo monoexponencial, que descreve cinética química de pseudo-primeira ordem, estando de acordo com as condições experimentais, ou seja, a hidrólise realizada com excesso de NaOH. A modelagem matemática forneceu a constante cinética observada $k = 1,6400 \pm 0,0061 \text{ min}^{-1}$ e o coeficiente de correlação $r = 0,9983 \pm 0,0013$ (Tabela 11). O ajuste dos pontos experimentais ao modelo calculado é apresentado na Figura 16.

Tabela 11. Parâmetros da modelagem matemática para o IndOEt em solução utilizando a equação monoexponencial.

	Solução 1	Solução 2	Solução 3	média	DP
$k \text{ (min}^{-1}\text{)}$	1,6860	1,5720	1,6620	1,6400	0,0061
r	0,9981	0,9996	0,9971	0,9983	0,0013

DP = desvio padrão referente à triplicata de lote.

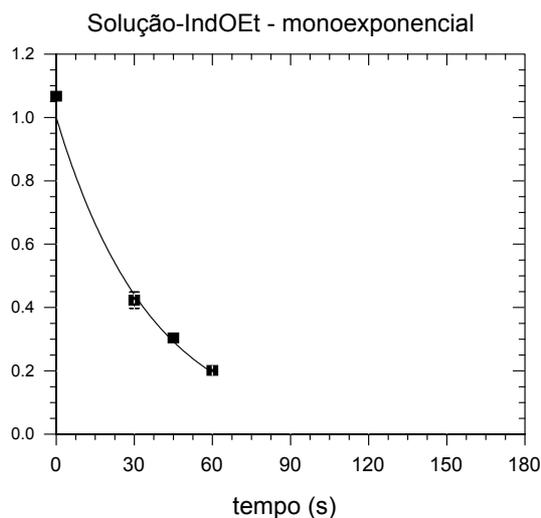


Figura 16. Modelagem da equação monoexponencial para o IndOEt em solução (ordenada em mg/mL).

Os perfis cinéticos da hidrólise alcalina do IndOEt associado a NC, NS e NE foram modelados segundo os modelos monoexponencial, que fornece uma constante cinética para o processo, e biexponencial, constituído de dois termos monoexponenciais, fornecendo duas constantes cinéticas. Para a escolha do modelo matemático que melhor se ajusta aos pontos experimentais foram observados os melhores ajustes gráficos, assim como os maiores coeficientes de correlação e valores de critério de seleção do modelo (MSC) obtidos. As constantes cinéticas e os parâmetros calculados para o experimento de hidrólise do IndOEt associado a NC estão reunidos na Tabela 12.

Tabela 12. Parâmetros da modelagem matemática do perfil de hidrólise do IndOEt associado a NC.

Monoexponencial	NC 1	NC 2	NC 3	média	DP
k (min⁻¹)	0,0024	0,0028	0,0030	0,0027	0,0003
r	0,9980	0,9981	0,9973	0,9978	0,0004
MSC	4,9529	4,4665	3,8982	4,4392	0,5279
Biexponencial	NC 1	NC 2	NC 3	média	DP
k_1 (min⁻¹)	0,1072	0,1131	0,1325	0,1176	0,0132
k_2 (min⁻¹)	0,0022	0,0025	0,0026	0,0024	0,0002
a (mg/mL)	0,0255	0,0480	0,0774	0,0503	0,0260
b (mg/mL)	0,9612	0,9333	0,9065	0,9337	0,0274
r	0,9982	0,9984	0,9976	0,9981	0,0004
MSC	5,2647	5,3594	4,8358	5,1533	0,2790

DP = desvio padrão referente à triplicata de lote.

O modelo biexponencial apresentou coeficiente de correlação $r = 0,9981 \pm 0,0004$ e $MSC = 5,1533 \pm 0,2790$, sendo superiores aos valores obtidos para o modelo monoexponencial. Pela comparação destes valores, além da análise gráfica dos ajustes (Figura 17), o modelo escolhido para descrever matematicamente a hidrólise do IndOEt em NC é o biexponencial. Esse modelo forneceu duas constantes cinéticas observadas, $k_1 = 0,1176 \pm 0,0132 \text{ min}^{-1}$ e $k_2 = 0,0024 \pm 0,0002 \text{ min}^{-1}$, e valores para os parâmetros a e b de $0,0503 \pm 0,0260 \text{ mg/mL}$ e $0,9337 \pm 0,0274 \text{ mg/mL}$, respectivamente.

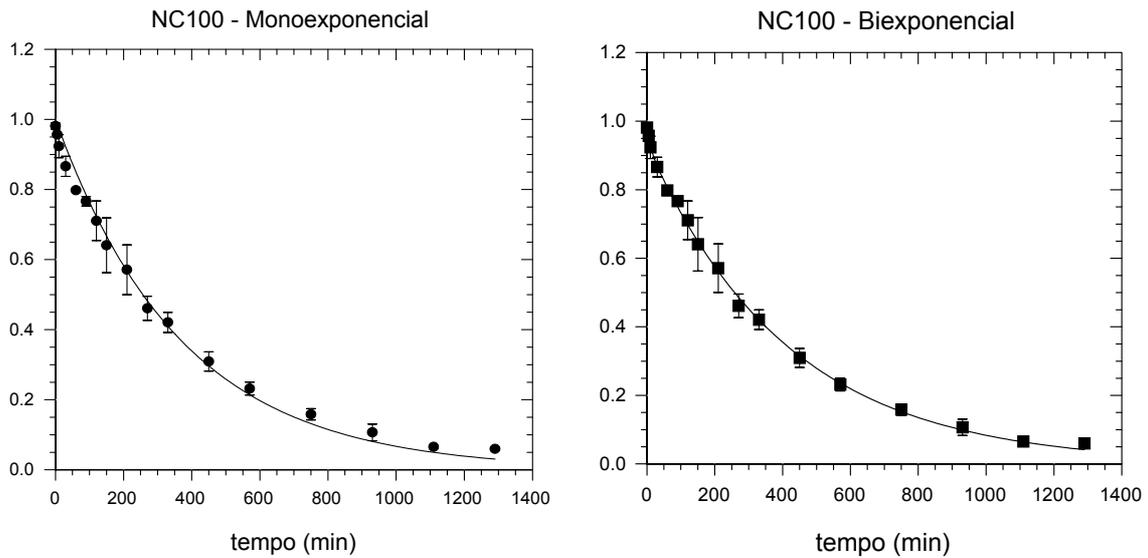


Figura 17. Modelagem das equações mono e biexponencial para NC contendo IndOEt (ordenadas em mg/mL).

Para o experimento com NE, o modelo selecionado também foi o biexponencial. De acordo com a Tabela 13 os valores de coeficiente de correlação e MSC foram de $0,9989 \pm 0,0001$ e $5,4201 \pm 0,2130$, respectivamente. Os gráficos obtidos estão representados na Figura 18. Os valores obtidos para as constantes cinéticas observadas foram $k_1 = 0,2528 \pm 0,0768 \text{ min}^{-1}$ e $k_2 = 0,0047 \pm 0,0001 \text{ min}^{-1}$, e os valores obtidos para os parâmetros a e b foram $0,1630 \pm 0,0139 \text{ mg/mL}$ e $0,8394 \pm 0,0007 \text{ mg/mL}$, respectivamente.

Tabela 13. Parâmetros da modelagem matemática do perfil de hidrólise do IndOEt associado a NE.

Monoexponencial	NE 1	NE 2	média	DP
k (min^{-1})	0,0060	0,0060	0,0060	0,0000
r	0,9955	0,9935	0,9945	0,0014
MSC	3,1884	3,1238	3,1561	0,0457
Biexponencial	NE 1	NE 2	média	DP
k_1 (min^{-1})	0,1985	0,3071	0,2528	0,0768
k_2 (min^{-1})	0,0046	0,0047	0,0047	0,0001
a (mg/mL)	0,1531	0,1728	0,1630	0,0139
b (mg/mL)	0,8389	0,8399	0,8394	0,0007
r	0,9990	0,9988	0,9989	0,0001
MSC	5,5707	5,2695	5,4201	0,2130

DP = desvio padrão referente à duplicata de lote.

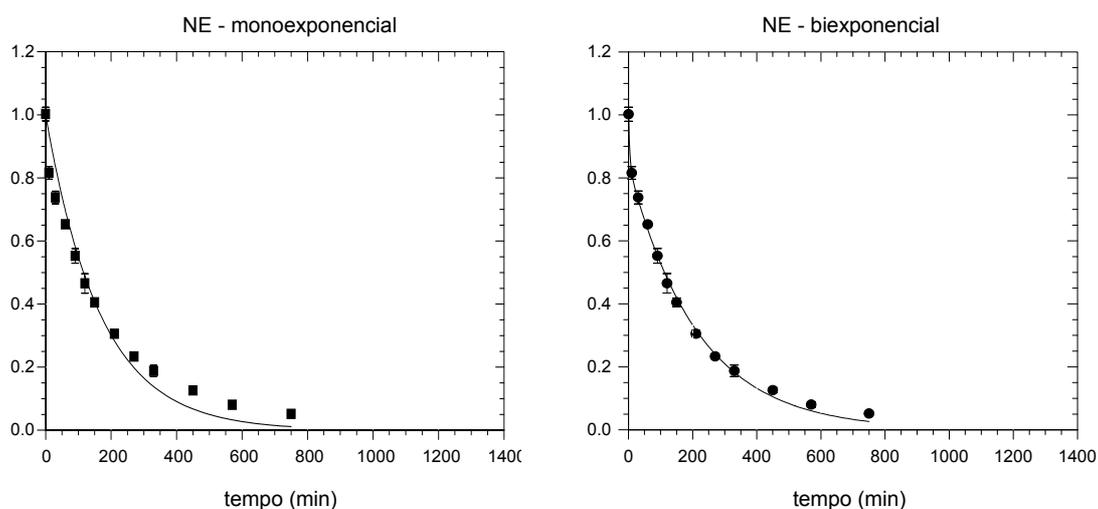


Figura 18. Modelagem das equações mono e biexponencial para NE (ordenadas em mg/mL).

Os resultados da modelagem matemática para o experimento com NS também indicaram um melhor ajuste dos dados experimentais ao modelo biexponencial (Tabela 14). Os valores de coeficiente de correlação e MSC obtidos para o modelo biexponencial foram de $0,9990 \pm 0,0001$ e $5,9209 \pm 0,7435$, respectivamente. O ajuste gráfico dos pontos experimentais ao modelo calculado está representado na Figura 19. Quanto aos valores obtidos para as constantes

cinéticas observadas k_1 e k_2 , estes foram de $0,1581 \pm 0,0552 \text{ min}^{-1}$ e $0,0079 \pm 0,0006 \text{ min}^{-1}$, respectivamente. Para os parâmetros a e b , os valores obtidos foram de $0,1259 \pm 0,0078 \text{ mg/mL}$ e $0,8717 \pm 0,0267 \text{ mg/mL}$, respectivamente.

Tabela 14. Parâmetros da modelagem matemática do perfil de hidrólise do IndOEt associado a NS.

Monoexponencial	NS 1	NS 2	média	DP
$k \text{ (min}^{-1}\text{)}$	0,0090	0,0096	0,0093	0,0004
r	0,9967	0,9977	0,9972	0,0007
MSC	3,8012	4,4331	4,1172	0,4468
Biexponencial	NS 1	NS 2	média	DP
$k_1 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	0,1191	0,1971	0,1581	0,0552
$k_2 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	0,0074	0,0083	0,0079	0,0006
$a \text{ (mg/mL)}$	0,1314	0,1204	0,1259	0,0078
$b \text{ (mg/mL)}$	0,8528	0,8906	0,8717	0,0267
r	0,9989	0,9990	0,9990	0,0001
MSC	5,3951	6,4466	5,9209	0,7435

DP = desvio padrão referente à duplicata de lote.

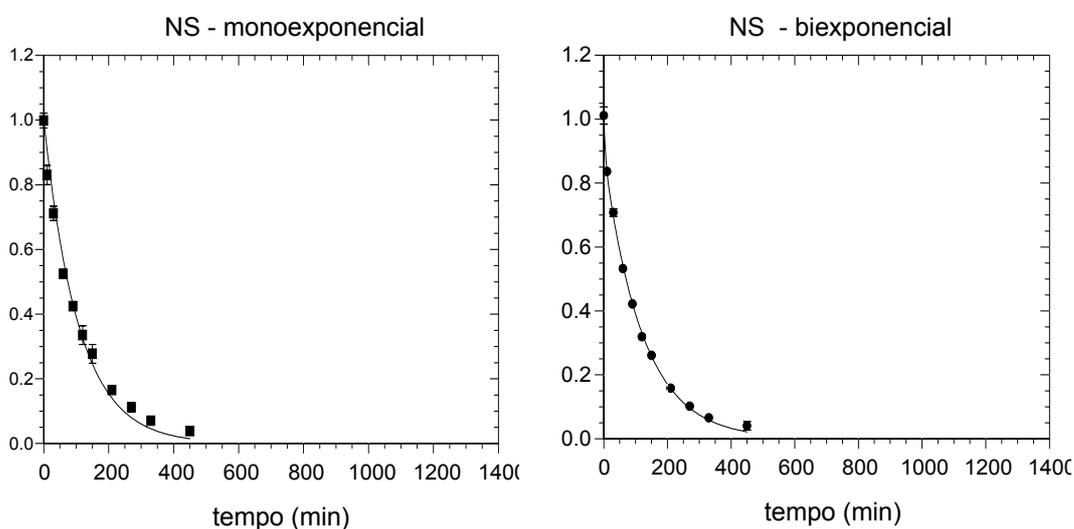


Figura 19. Modelagem das equações mono e biexponencial para NS (ordenadas em mg/mL).

Pela comparação dos modelos entre si, o perfil cinético da hidrólise alcalina do IndOEt associado aos três sistemas coloidais é descrito pela equação biexponencial. A fase rápida está relacionada ao consumo da porção adsorvida e a fase lenta está relacionada ao consumo da porção dispersa no interior das nanoestruturas, que difundem até a interface para sofrer a hidrólise.

Desta maneira, pode ser observado que a presença do polímero diminui a velocidade da fase rápida, sendo o consumo da porção adsorvida do IndOEt na NE ($k_1 = 0,2528 \pm 0,0768 \text{ min}^{-1}$) mais rápido quando comparado a NC ($k_1 = 0,1176 \pm 0,0132 \text{ min}^{-1}$) e a NS ($k_1 = 0,1581 \pm 0,0552 \text{ min}^{-1}$). Por outro lado, quando os dois sistemas poliméricos são comparados, o que se observa é a reação mais rápida do IndOEt adsorvido nas NS, provavelmente, devido à grande área superficial e porosidade da matriz polimérica.

Quanto à constante k_2 , relacionada à difusão do IndOEt até a interface partícula/água, pode-se observar que este processo é mais rápido em NS ($k_2 = 0,0079 \pm 0,0006 \text{ min}^{-1}$), devido a sua estrutura porosa, que propicia uma grande área superficial ao sistema, em relação a NC ($k_2 = 0,0024 \pm 0,0002 \text{ min}^{-1}$) e NE ($k_2 = 0,0047 \pm 0,0001 \text{ min}^{-1}$).

A fase de liberação rápida (*burst*) apresentou tempos de meia-vida de 5,9, 4,4 e 2,7 minutos para NC, NS e NE e a fase de liberação sustentada apresentou tempos de meia-vida de 288,8, 87,7 and 147,5 minutos, respectivamente. A presença do polímero aumentou o tempo de meia-vida da fase rápida, enquanto que a presença do óleo aumentou o tempo de meia-vida da fase sustentada. Pela comparação dos resultados, as NC apresentaram os maiores tempos de meia-vida para o IndOEt associado aos nanocarreadores.

No que se refere à interpretação dos parâmetros a e b , estes foram considerados como sendo correspondentes às concentrações do IndOEt nas pseudo-fases de cada sistema. Para NC, os parâmetros calculados a e b foram $0,0503 \pm 0,0260 \text{ mg/mL}$ e $0,9337 \pm 0,0274 \text{ mg/mL}$, respectivamente. Isto sugere uma concentração inicial de IndOEt na interface partícula/água de $0,05 \text{ mg/mL}$ e no interior da partícula de $0,93 \text{ mg/mL}$. No caso das NS, os parâmetros a e b

apresentaram valores de $0,1259 \pm 0,0078$ mg/mL e $0,8717 \pm 0,0267$ mg/mL, respectivamente. Em relação à NE, os parâmetros calculados foram: $a = 0,1630 \pm 0,0139$ mg/mL e $b = 0,8394 \pm 0,0007$ mg/mL, sugerindo que o IndOEt está disperso por toda a gotícula, com uma concentração inicial de éster na interface gotícula/água de 0,16 mg/mL. Considerando-se os dados obtidos, assim como a concentração de saturação do IndOEt no triglicerídeo (4,13 mg/mL) (SOARES, 2003), pode-se propor que o IndOEt esteja retido nas nanoestruturas (Figura 20).

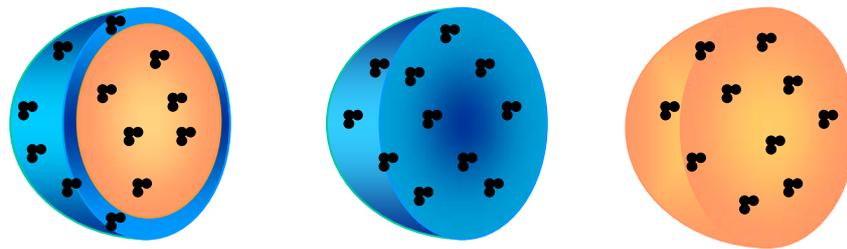


Figura 20. Formas de associação do IndOEt em NC, NS e NE.

Uma vez que a constante cinética observada (k_2) para o consumo do IndOEt a partir da NE é o dobro da constante k_2 observada para o consumo a partir de NC, propõe-se que o polímero possa exercer uma barreira para a difusão do IndOEt até a interface.

5. 5. 2 Estudo da Influência da Concentração do Polímero na Difusão do IndOEt Associado a Nanocápsulas

Para estudar matematicamente os perfis cinéticos obtidos da hidrólise do IndOEt associado NC80, NC60, NC40 e NC20 também foi realizada a modelagem das curvas para os modelos monoexponencial e biexponencial, seguindo os mesmos critérios de seleção da equação que melhor descreve os dados experimentais.

Para o experimento com NC80 realizou-se a modelagem de todos os pontos obtidos até o tempo de 1290 minutos, enquanto que para os experimentos com NC60 e NC40 utilizou-se todos os pontos até 1110 minutos e para o experimento

com NC20 os pontos foram modelados até 930 minutos. Os pontos além dos tempos mencionados acima apresentaram concentrações inferiores ao limite de quantificação do método analítico. Em todos os casos, o modelo selecionado para descrever o comportamento matemático das curvas foi o biexponencial.

Para as NC80 preparadas com 20 % a menos de polímero foram obtidas as seguintes constantes cinéticas observadas: $k_1 = 0,0325 \pm 0,0105 \text{ min}^{-1}$ e $k_2 = 0,0025 \pm 0,0001 \text{ min}^{-1}$. Os parâmetros a e b apresentaram valores de $0,1059 \pm 0,0357 \text{ mg/mL}$ e $0,8834 \pm 0,0537 \text{ mg/mL}$ (Tabela 15). O ajuste gráfico dos dados experimentais ao modelo calculado está apresentado na Figura 21.

Tabela 15. Parâmetros dos modelos mono e biexponencial para a hidrólise alcalina do IndOEt associado a NC80.

Monoexp.	NC80-1	NC80-2	NC80-3	média	DP
k (min^{-1})	0,0028	0,0034	0,0028	0,0030	0,0003
r	0,9982	0,9960	0,9975	0,9972	0,0011
MSC	5,0338	3,5383	4,5162	4,3628	0,7595
Biexp.	NC80-1	NC80-2	NC80-3	média	DP
k_1 (min^{-1})	0,0431	0,0321	0,0222	0,0325	0,0105
k_2 (min^{-1})	0,0025	0,0025	0,0024	0,0025	0,0001
a (mg/mL)	0,0802	0,1467	0,0909	0,1059	0,0357
b (mg/mL)	0,9293	0,8244	0,8964	0,8834	0,0537
r	0,9990	0,9989	0,9984	0,9988	0,0003
MSC	5,6877	5,6596	5,2870	5,5448	0,2237

DP = desvio padrão referente à triplicata de lote.

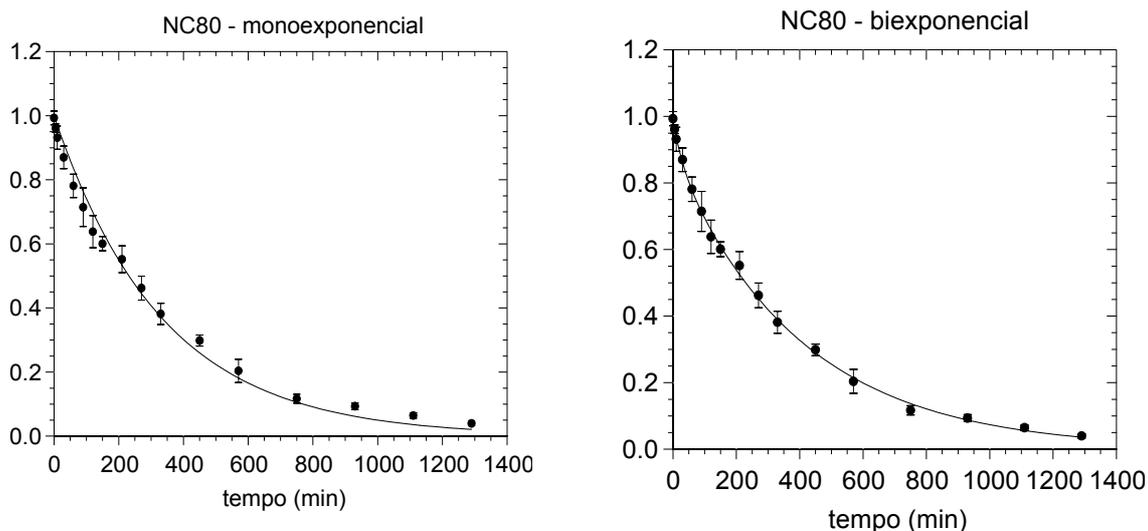


Figura 21. Modelagens das equações mono e biexponencial para NC80 (ordenadas em mg/mL).

Para a formulação NC60, os valores dos parâmetros calculados foram: $a = 0,0470 \pm 0,0157$ mg/mL e $b = 0,9615 \pm 0,0057$ mg/mL, e os valores das constantes cinéticas observadas foram: $k_1 = 0,1604 \pm 0,0392$ min⁻¹ e $k_2 = 0,0027 \pm 0,0003$ min⁻¹ (Tabela 16). A Figura 22 ilustra o ajuste gráfico do modelo aos pontos experimentais.

Tabela 16. Parâmetros dos modelos mono e biexponencial para a hidrólise alcalina do IndOEt associado a NC60.

Monoexp.	NC60-1	NC60-2	NC60-3	média	DP
k (min⁻¹)	0,0033	0,0027	0,0027	0,0029	0,0003
r	0,9976	0,9983	0,9961	0,9973	0,0011
MSC	4,8669	5,1641	4,5317	4,8542	0,3164
Biexp.	NC60-1	NC60-2	NC60-3	média	DP
k_1 (min⁻¹)	0,1632	0,1198	0,1981	0,1604	0,0392
k_2 (min⁻¹)	0,0031	0,0025	0,0026	0,0027	0,0003
a (mg/mL)	0,0516	0,0296	0,0599	0,0470	0,0157
b (mg/mL)	0,9552	0,9663	0,9631	0,9615	0,0057
r	0,9979	0,9984	0,9965	0,9976	0,0010
MSC	4,9759	5,2334	4,4426	4,8840	0,4033

DP = desvio padrão referente à triplicata de lote.

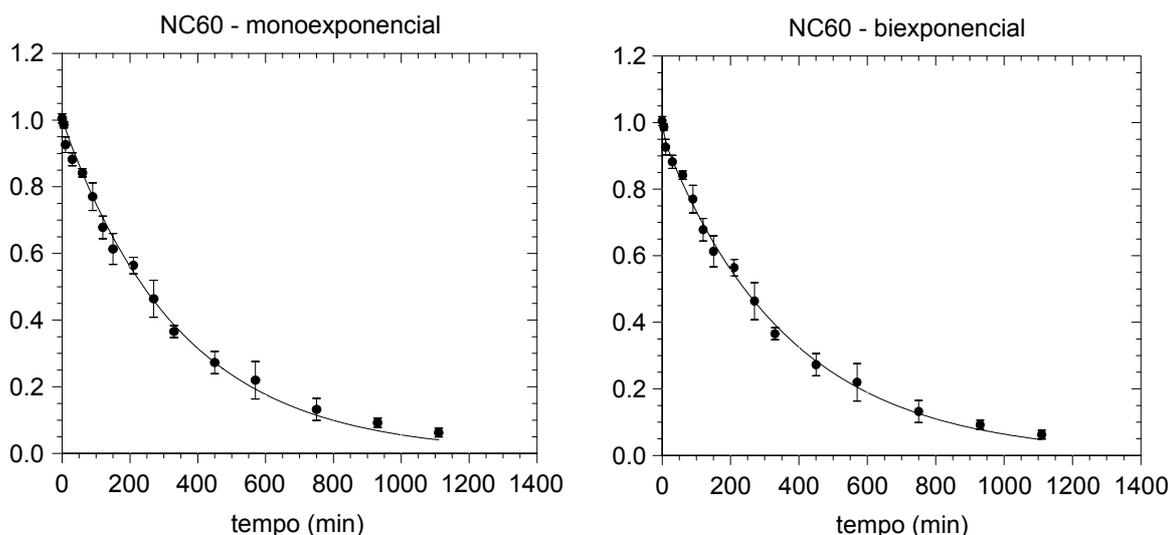


Figura 22. Modelagens das equações mono e biexponencial para NC60 (ordenadas em mg/mL).

De acordo com a Tabela 17, a NC40 preparada com 4 mg/mL de PCL apresentou constantes cinéticas observadas $k_1 = 0,1854 \pm 0,0288 \text{ min}^{-1}$ e $k_2 = 0,0032 \pm 0,0005 \text{ min}^{-1}$, e valores obtidos para os parâmetros a e b de $0,1359 \pm 0,0286 \text{ mg/mL}$ e $0,8505 \pm 0,0283 \text{ mg/mL}$, respectivamente. Na Figura 23 estão representados os gráficos obtidos na modelagem das equações.

Tabela 17. Parâmetros dos modelos mono e biexponencial para a hidrólise alcalina do IndOEt associado a NC40.

Monoexp.	NC40-1	NC40-2	NC40-3	média	DP
k (min^{-1})	0,0041	0,0038	0,0045	0,0041	0,0004
r	0,9952	0,9910	0,9957	0,9940	0,0026
MSC	3,0388	2,8161	3,6167	3,1572	0,4132
Biexp.	NC40-1	NC40-2	NC40-3	média	DP
k_1 (min^{-1})	0,1566	0,1854	0,2141	0,1854	0,0288
k_2 (min^{-1})	0,0031	0,0028	0,0037	0,0032	0,0005
a (mg/mL)	0,1340	0,1654	0,1082	0,1359	0,0286
b (mg/mL)	0,8390	0,8297	0,8827	0,8505	0,0283
r	0,9988	0,9980	0,9973	0,9980	0,0008
MSC	5,5434	5,1555	4,7079	5,1356	0,4181

DP = desvio padrão referente à triplicata de lote.

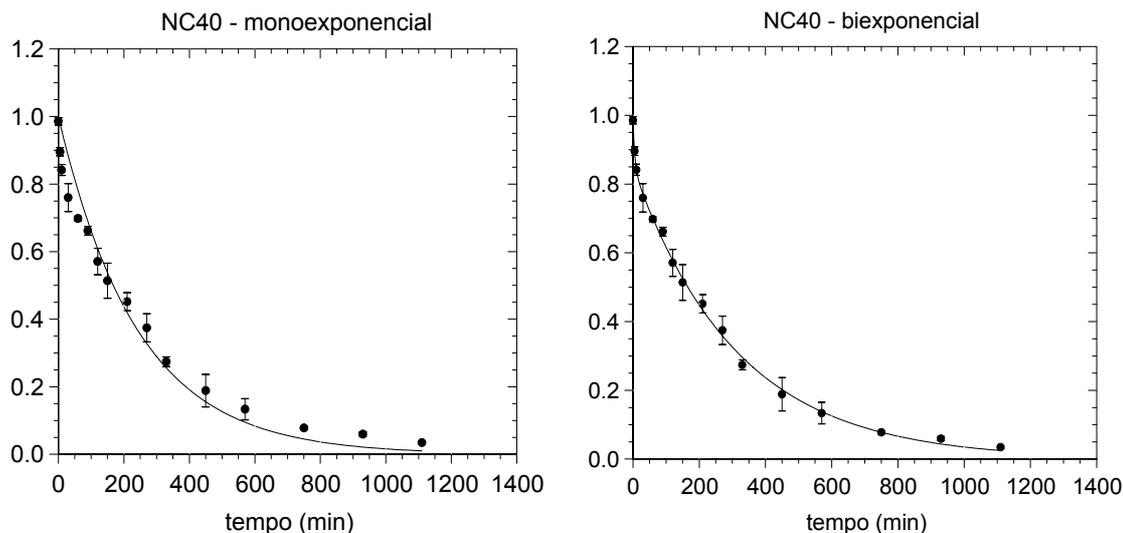


Figura 23. Modelagens das equações mono e biexponencial para NC40 (ordenadas em mg/mL).

Para a formulação NC20, obteve-se constantes cinéticas observadas: $k_1 = 0,1966 \pm 0,0647 \text{ min}^{-1}$ e $k_2 = 0,0036 \pm 0,0001 \text{ min}^{-1}$, enquanto que os parâmetros calculados apresentaram foram os seguintes: $a = 0,1100 \pm 0,0398 \text{ mg/mL}$ e $b = 0,8698 \pm 0,0189 \text{ mg/mL}$ (Tabela 18). A Figura 24 apresenta o gráfico que ilustra o ajuste dos pontos experimentais aos modelos testados.

Tabela 18. Parâmetros dos modelos mono e biexponencial para a hidrólise alcalina do IndOEt associado a NC20.

Monoexp.	NC20-1	NC20-2	NC20-3	média	DP
$k \text{ (min}^{-1}\text{)}$	0,0047	0,0042	0,0043	0,0044	0,0003
r	0,9918	0,9954	0,9950	0,9941	0,0020
MSC	2,9649	3,3462	3,4770	3,2627	0,2661
Biexp.	NC20-1	NC20-2	NC20-3	média	DP
$k_1 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	0,2613	0,1966	0,1319	0,1966	0,0647
$k_2 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	0,0037	0,0035	0,0035	0,0036	0,0001
$a \text{ (mg/mL)}$	0,1430	0,0658	0,1212	0,1100	0,0398
$b \text{ (mg/mL)}$	0,8498	0,8874	0,8723	0,8698	0,0189
r	0,9963	0,9975	0,9972	0,9970	0,0006
MSC	4,3656	4,8969	4,6303	4,6309	0,2657

DP = desvio padrão referente à triplicata de lote.

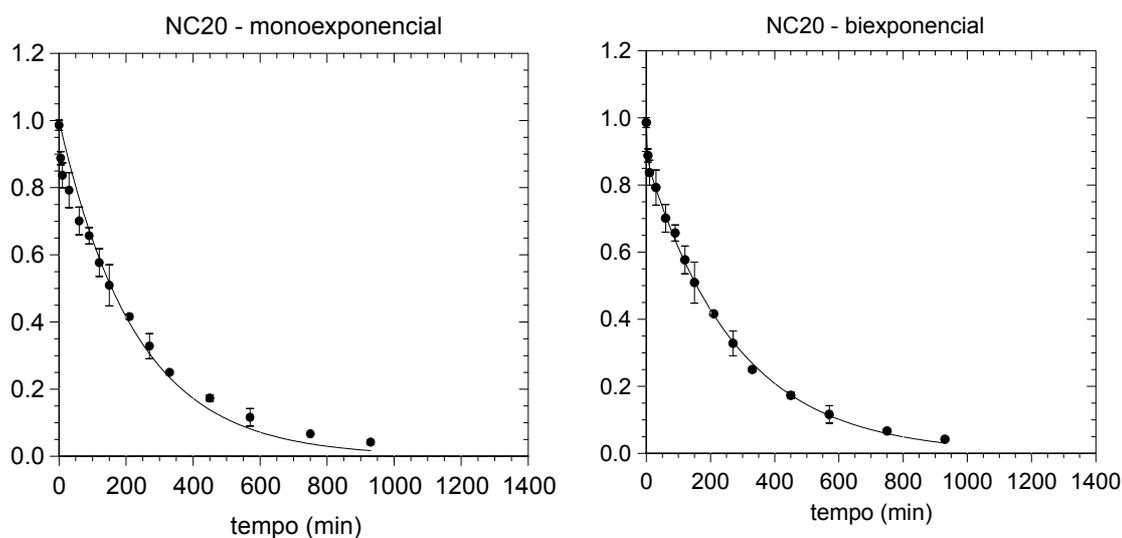


Figura 24. Modelagens das equações mono e biexponencial para NC20 (ordenadas em mg/mL).

Os resultados mostraram um aumento no valor da constante k_1 com a diminuição da concentração de polímero na formulação. Desta forma, o aumento da velocidade de consumo do IndOEt adsorvido está relacionado com a espessura da parede polimérica da NC: quanto menor a concentração de polímero na formulação, menos espessa é a parede. Da mesma forma, pode-se observar um aumento no valor de k_2 com a diminuição da concentração de polímero na formulação, o que está relacionado com difusão mais rápida do éster a partir do núcleo oleoso para a interface da partícula.

Quanto aos parâmetros a e b , pode-se dizer que 5 a 15 % do IndOEt está adsorvido e/ou disperso na superfície polimérica e que a maior parte do éster (85 a 95 %) está retida no núcleo oleoso das NC.

5. 5. 3 Modelagem Matemática dos Perfis Cinéticos Segundo o Modelo da Lei da Potência

A Lei da Potência é um modelo semi-empírico desenvolvido com base nas leis de Fick para estudar a liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos. Os perfis cinéticos da hidrólise alcalina do IndOEt associado aos sistemas nanoestruturados foram avaliados segundo a equação desse modelo (Equação 5) através da modelagem matemática dos dados experimentais.

A modelagem permitiu a obtenção das curvas f_t em função do tempo e os parâmetros a e n , que correspondem à constante que incorpora as modificações estruturais e as características geométricas do sistema e o expoente de liberação difusional, relacionado ao mecanismo de liberação do fármaco, respectivamente.

Para a formulação de NC preparada com 10 mg/mL de PCL (NC100), os pontos experimentais foram modelados até 1290 minutos e obteve-se o coeficiente de correlação $r = 0,9882 \pm 0,0007$ e valores de a e n de $0,0306 \pm 0,0084$ e $0,4959 \pm 0,0380$, respectivamente (Tabela 19). O gráfico obtido para o perfil médio está apresentado na Figura 25.

Tabela 19. Parâmetros da modelagem matemática utilizando a Lei da Potência para a hidrólise alcalina do IndOEt em NC100.

Parâmetro	Lote 1	Lote 2	Lote 3	MD	DP
<i>a</i>	0,0225	0,0300	0,0392	0,0306	0,0084
<i>n</i>	0,5333	0,4972	0,4573	0,4959	0,0380
<i>r</i>	0,9890	0,9879	0,9876	0,9882	0,0007
MSC	3,5452	3,4278	3,4185	3,4638	0,0706

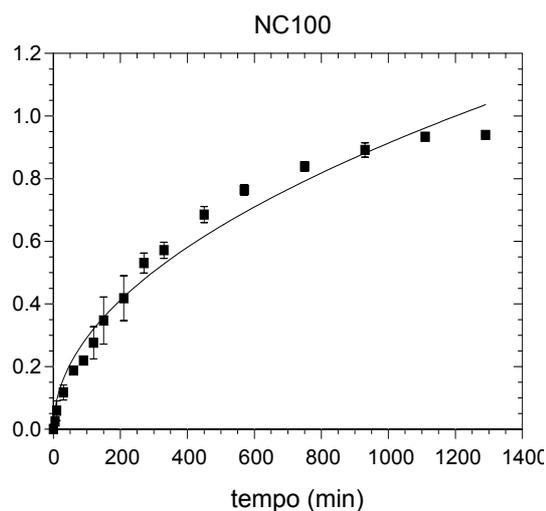


Figura 25. Ajuste dos dados experimentais da hidrólise do IndOEt associado a NC100 ao modelo da Lei da Potência (ordenadas em f_t).

Para NC80, a curva calculada até o ponto de 1290 minutos teve um bom ajuste aos pontos experimentais, sendo o coeficiente de correlação $r = 0,9896 \pm 0,0012$. Os valores de a e n calculados foram de $0,0398 \pm 0,0070$ e $0,4581 \pm 0,0229$, respectivamente. Os valores individuais para a modelagem em triplicata e o gráfico obtido para o perfil médio são apresentados na Tabela 20 e na Figura 26.

Tabela 20. Parâmetros da modelagem matemática utilizando a Lei da Potência para a hidrólise alcalina do IndOEt em NC80.

Parâmetro	Lote 1	Lote 2	Lote 3	MD	DP
<i>a</i>	0,0367	0,0478	0,0349	0,0398	0,0070
<i>n</i>	0,4681	0,4319	0,4744	0,4581	0,0229
<i>r</i>	0,9883	0,9898	0,9906	0,9896	0,0012
MSC	3,4653	3,5790	3,6866	3,5770	0,1107

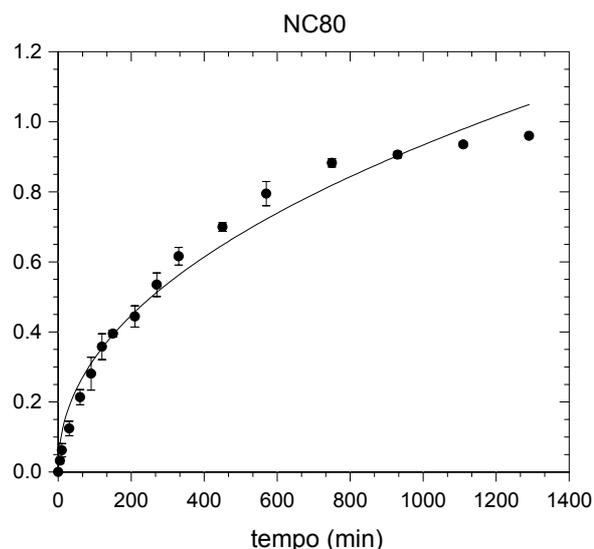


Figura 26. Ajuste dos dados experimentais da hidrólise do IndOEt associado a NC80 ao modelo da Lei da Potência (ordenadas em f_t).

Nas formulações de NC preparadas com 6 mg/mL de PCL os dados experimentais foram ajustados ao modelo até o tempo de 1110 minutos. O coeficiente de correlação fornecido pela modelagem foi $r = 0,9876 \pm 0,0019$ e os parâmetros obtidos para esta formulação foram $a = 0,0305 \pm 0,0064$ e $n = 0,5034 \pm 0,0283$. Os dados individuais são apresentados na Tabela 21 e o gráfico obtido pode ser visualizado na Figura 27.

Tabela 21. Parâmetros da modelagem matemática utilizando a Lei da Potência para a hidrólise alcalina do IndOEt em NC60.

Parâmetro	Lote 1	Lote 2	Lote 3	MD	DP
a	0,0365	0,0238	0,0312	0,0305	0,0064
n	0,4799	0,5348	0,4955	0,5034	0,0283
r	0,9854	0,9891	0,9883	0,9876	0,0019
MSC	3,2396	3,5214	3,4721	3,4110	0,1505

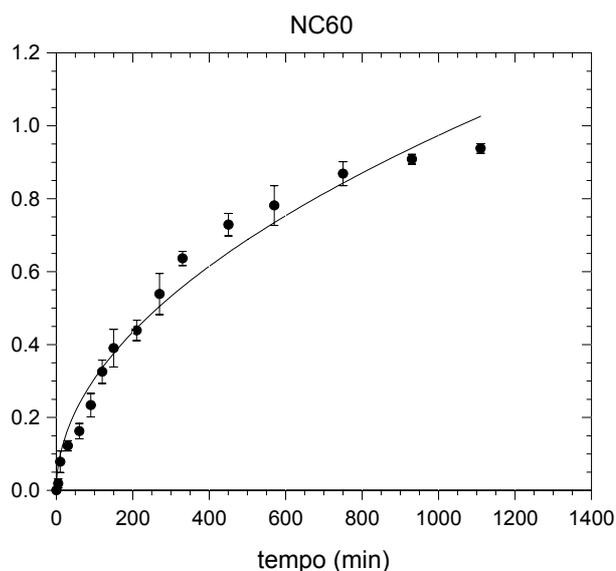


Figura 27. Ajuste dos dados experimentais da hidrólise do IndOEt associado a NC60 ao modelo da Lei da Potência (ordenadas em f_i).

Para a formulação NC40, os dados experimentais também foram ajustados até o tempo de 1110 minutos e os parâmetros foram $a = 0,0648 \pm 0,0042$ e $n = 0,3975 \pm 0,0066$, com coeficiente de correlação $r = 0,9886 \pm 0,0047$ (Tabela 22). O gráfico desta modelagem pode ser visualizado na Figura 28.

Tabela 22. Parâmetros da modelagem matemática utilizando a Lei da Potência para a hidrólise alcalina do IndOEt em NC40.

Parâmetro	Lote 1	Lote 2	Lote 3	MD	DP
<i>a</i>	0,0619	0,0629	0,0696	0,0648	0,0042
<i>n</i>	0,4032	0,3991	0,3903	0,3975	0,0066
<i>r</i>	0,9902	0,9924	0,9833	0,9886	0,0047
MSC	3,6586	3,9417	3,1246	3,5750	0,4149

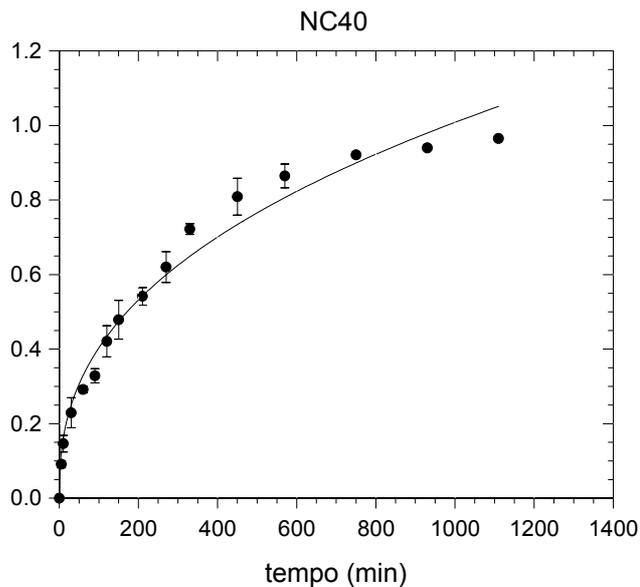


Figura 28. Ajuste dos dados experimentais da hidrólise do IndOEt associado a NC40 ao modelo da Lei da Potência (ordenadas em f_t).

Os dados experimentais foram modelados até o ponto de 930 minutos para a formulação NC20. O coeficiente de correlação obtido apresentou valor $0,9880 \pm 0,0018$, enquanto que os parâmetros a e n apresentaram valores de $0,0580 \pm 0,0118$ e $0,4250 \pm 0,0309$, respectivamente. Os valores individuais e o gráfico obtido são apresentados na Tabela 23 e na Figura 29.

Tabela 23. Parâmetros da modelagem matemática utilizando a Lei da Potência para a hidrólise alcalina do IndOEt em NC20.

Parâmetro	Lote 1	Lote 2	Lote 3	MD	DP
a	0,0699	0,0463	0,0578	0,0580	0,0118
n	0,3955	0,4572	0,4222	0,4250	0,0309
r	0,9874	0,9865	0,9900	0,9880	0,0018
MSC	3,4134	3,3459	3,6201	3,4598	0,1429

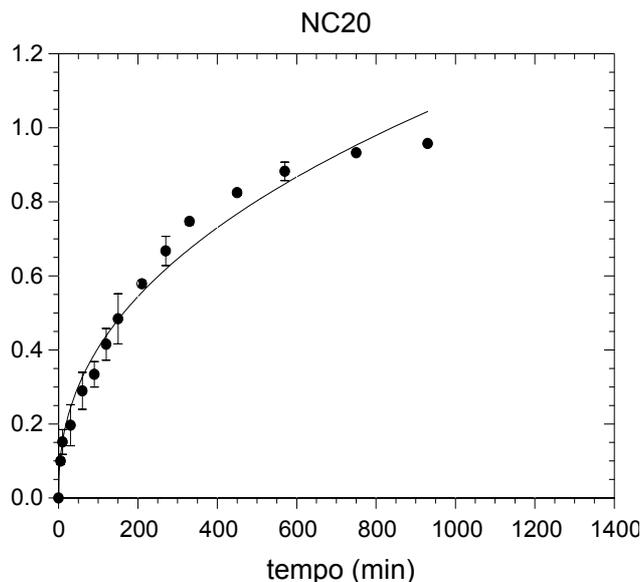


Figura 29. Ajuste dos dados experimentais da hidrólise do IndOEt associado a NC20 ao modelo da Lei da Potência (ordenadas em f_t).

A modelagem dos dados experimentais da NE foi realizada até o tempo de 750 minutos e obteve-se coeficiente de correlação $r = 0,9936 \pm 0,0003$ e valores de $a = 0,0580 \pm 0,0118$ e $n = 0,4250 \pm 0,0309$ (Tabela 24). O gráfico obtido é apresentado na Figura 30.

Tabela 24. Parâmetros da modelagem matemática utilizando a Lei da Potência para a hidrólise alcalina do IndOEt em NE.

Parâmetro	Lote 1	Lote 2	MD	DP
a	0,0717	0,0812	0,0765	0,0067
n	0,4117	0,3915	0,4016	0,0143
r	0,9938	0,9934	0,9936	0,0003
MSC	3,9815	3,9877	3,9846	0,0044

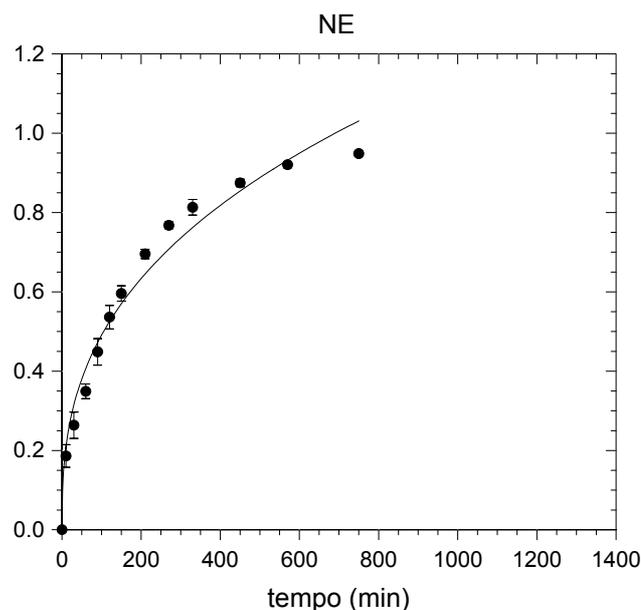


Figura 30. Ajuste dos dados experimentais da hidrólise do IndOEt associado a NE ao modelo da Lei da Potência (ordenadas em f_t).

Finalmente, para NS, o ajuste ao modelo da Lei da Potência foi realizado até 450 minutos e apresentou coeficiente de correlação $r = 0,9881 \pm 0,0019$ e parâmetros $a = 0,0943 \pm 0,0074$ e $n = 0,3949 \pm 0,0117$ (Tabela 25). O gráfico desta modelagem é apresentado na Figura 31.

Tabela 25. Parâmetros da modelagem matemática utilizando a Lei da Potência para a hidrólise alcalina do IndOEt em NS.

Parâmetro	Lote 1	Lote 2	MD	DP
<i>a</i>	0,0890	0,0995	0,0943	0,0074
<i>n</i>	0,4031	0,3866	0,3949	0,0117
<i>r</i>	0,9894	0,9867	0,9881	0,0019
MSC	3,4675	3,2431	3,3553	0,1587

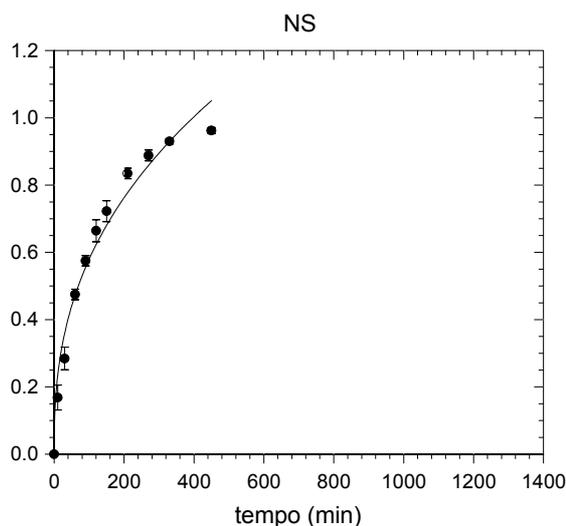


Figura 31. Ajuste dos dados experimentais da hidrólise do IndOEt associado a NS ao modelo da Lei da Potência (ordenadas em f_t).

Para todos os sistemas estudados observou-se um ajuste satisfatório dos dados experimentais ao modelo da Lei da Potência, através de coeficientes de correlação próximos de 0,99. Os expoentes de liberação obtidos para NC40, NC20, NE e NS apresentaram valores próximos de 0,43 (Tabela 26), o que indica a difusão fickiana da sonda molecular a partir de uma matriz de geometria esférica. As formulações NC100, NC80 e NC60 apresentaram valores de expoentes de liberação acima de 0,43, o que indicaria um fenômeno de transporte anômalo para sistemas de geometria esférica, que está relacionado com a sobreposição dos mecanismos de liberação controlados por difusão e pelo inchamento do sistema. No entanto, tal afirmação é refutada pelos resultados obtidos nos experimentos onde foram determinados os diâmetros de partícula durante a reação de hidrólise alcalina. Os resultados obtidos nesse experimento demonstraram a manutenção do diâmetro efetivo das nanoestruturas durante o consumo do IndOEt e os dados de polidispersão indicaram que todos os sistemas mantêm constantes as polidispersões durante todo o tempo de reação (Figuras 32, 33, 34 e 35).

Tabela 26. Expoente de liberação (n) para os sistemas nanoestruturados estudados.

	NC100	NC80	NC60	NC40	NC20	NE	NS
n	0,4959	0,4581	0,5034	0,3975	0,4250	0,4016	0,3949

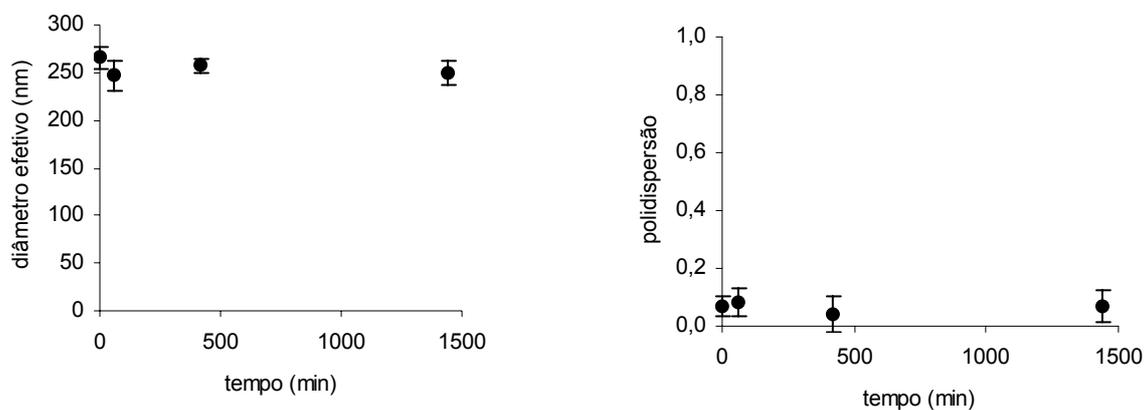


Figura 32. Diâmetro efetivo e polidispersão das NC80 contendo IndOEt durante a hidrólise alcalina.

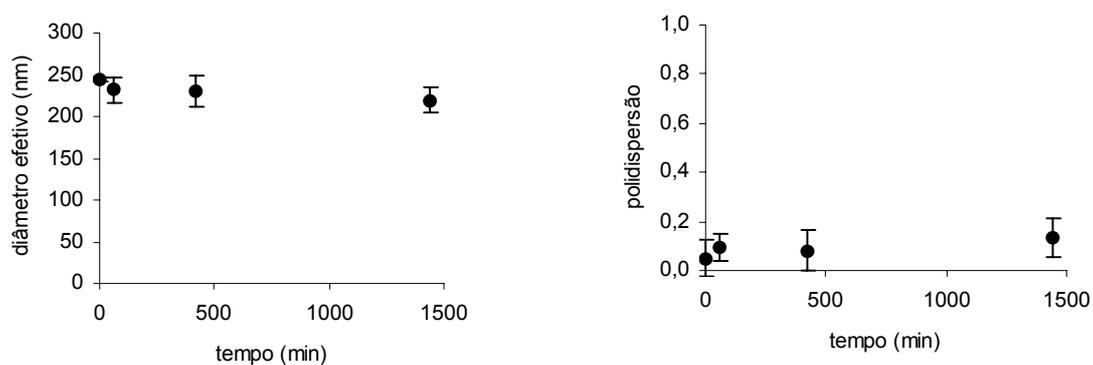


Figura 33. Diâmetro efetivo e polidispersão das NC60 contendo IndOEt durante a hidrólise alcalina.

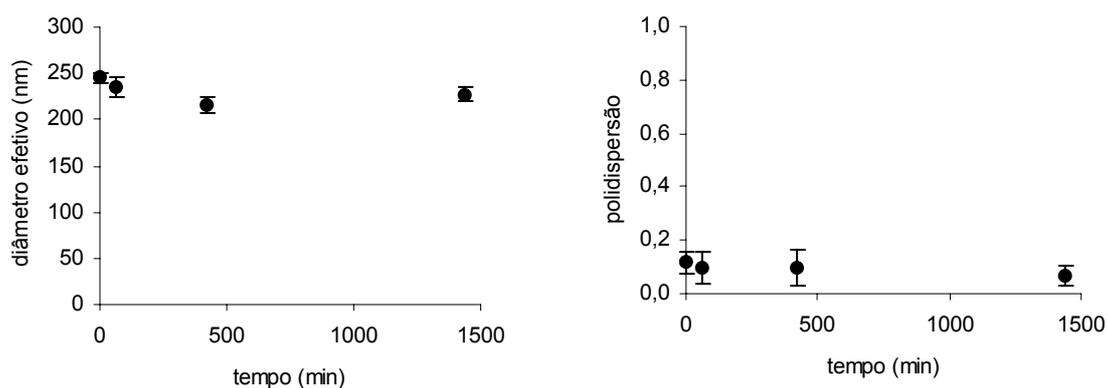


Figura 34. Diâmetro efetivo e polidispersão das NC40 contendo IndOEt durante a hidrólise alcalina.

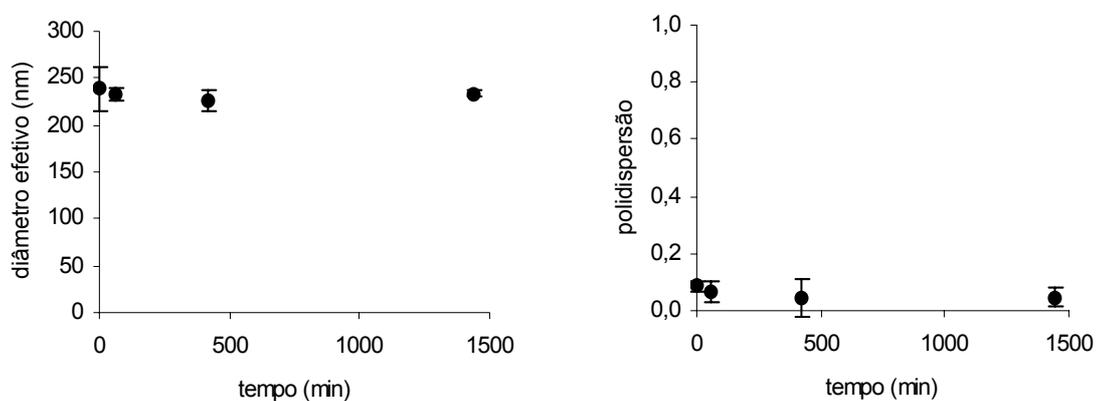


Figura 35. Diâmetro efetivo e polidispersão das NC20 contendo IndOEt durante a hidrólise alcalina.

Desta forma, esse experimento descarta a hipótese de inchamento ou ainda erosão dos sistemas nanoestruturados, reforçando a idéia de que a difusão da sonda controla a velocidade da reação. A variação dos valores de n para as formulações NC60, NC80 e NC100 frente aos preconizados pelo modelo de Korsmeyer-Peppas pode ser devido à influência da parede polimérica, podendo-se admitir a difusão da sonda através de um filme. A variação de 0 a 10 mg/mL na concentração de PCL nas formulações levou à formação de NC com espessuras de parede intermediárias entre as formulações de NE e NC100. Em todas as formulações, o IndOEt encontra-se retido nas nanoestruturas (Figura 36).

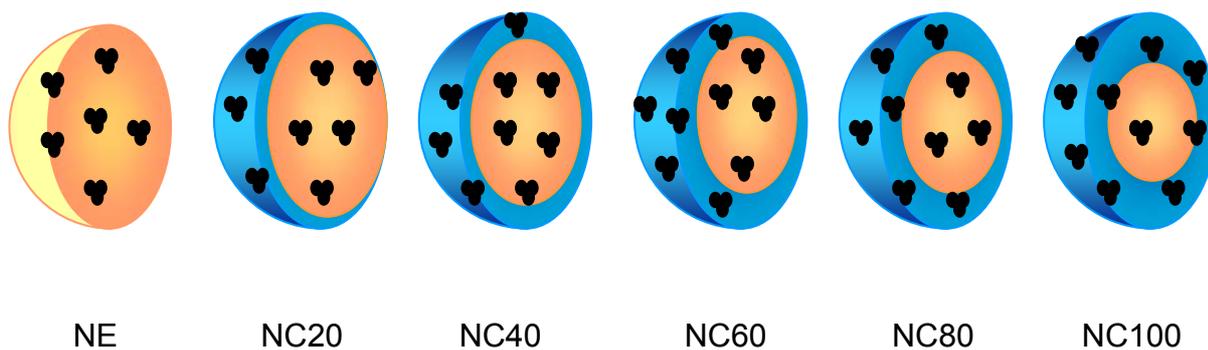


Figura 36. Representação esquemática da dispersão do IndOEt nas nanoestruturas.

5. 6 EDEMA DE PATA DE RATO INDUZIDO POR CARRAGENINA

Considerando que os ésteres alifáticos de IndOH apresentaram atividade antiinflamatória seletiva para a *cox-2 in vitro* (KALGUTKAR *et al.*, 2000) e, ainda, que o IndOEt apresenta solubilidade em meio aquoso e fluidos biológicos menor que 1,0 $\mu\text{g/mL}$ (SOARES, 2003), propõe-se a avaliação da atividade antiedematogênica *in vivo* desse éster associado a NC, NS e NE.

Com base nas doses de IndOH utilizadas em outros estudos de avaliação da atividade antiedematogênica, a dose de IndOEt testada foi de 10,0 mg/Kg de peso corporal (AMMOURY *et al.*, 1993).

Os efeitos da administração oral do IndOEt associado aos nanocarreadores na inibição da formação do edema em pata de rato induzido pela carragenina, podem ser observados na Tabela 27 e os aumentos dos volumes dos edemas das patas de ratos podem ser observados, graficamente, nas Figuras 37, 38 e 39.

Tabela 27. Atividade antiedematogênica do IndOEt associado aos nanocarreadores.

Aumento do volume das patas ± e.p.m. (% inibição)				
Grupo	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora
Controle A	1,25 ± 0,25	2,34 ± 0,21	1,39 ± 0,31	0,66 ± 0,30
Controle B – NC	0,92 ± 0,34 (26,57)	2,39 ± 0,44 (-2,09)	1,29 ± 0,35 (6,93)	0,61 ± 0,18 (8,33)
Controle B – NE	0,69 ± 0,08 (45,12)	1,80 ± 0,33 (23,02)	0,99 ± 0,14 (28,95)	0,70 ± 0,07 (-6,31)
Controle B – NS	0,90 ± 0,28 (27,94)	2,05 ± 0,09 (12,25)	0,80 ± 0,16 (42,27)	0,42 ± 0,08 (37,12)
NC-IndOEt	0,73 ± 0,09 (41,86)	0,89 ± 0,29*	0,40 ± 0,25*	0,42 ± 0,28 (36,74)
NE-IndOEt	0,47 ± 0,11* (62,44)	1,75 ± 0,19 (25,15)	0,82 ± 0,14 (41,31)	0,52 ± 0,08 (21,78)
NS-IndOEt	0,01 ± 0,14* (99,20)	0,94 ± 0,29* (59,89)	0,02 ± 0,14* (98,42)	-0,12 ± 0,07* (117,88)
Indometacina	0,08 ± 0,16* (93,43)	0,20 ± 0,14* (91,63)	-0,16 ± 0,13* (111,52)	-0,21 ± 0,12* (131,99)

Os valores representam a média de 6 a 10 animais.

*p < 0,05

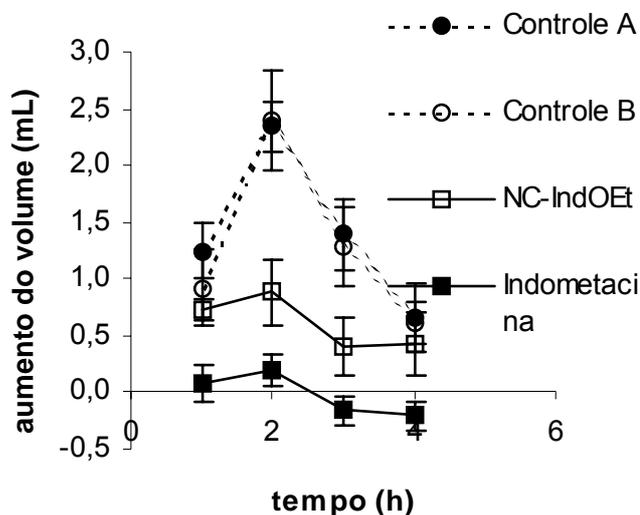


Figura 37. Aumento do volume (mL) das patas dos ratos tratados com NC-IndOEt e respectivos controles.

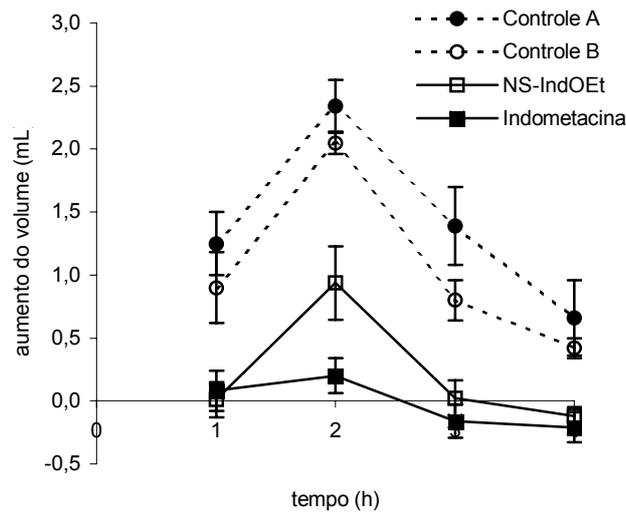


Figura 38. Aumento do volume (mL) das patas dos ratos tratados com NS-IndOEt e respectivos controles.

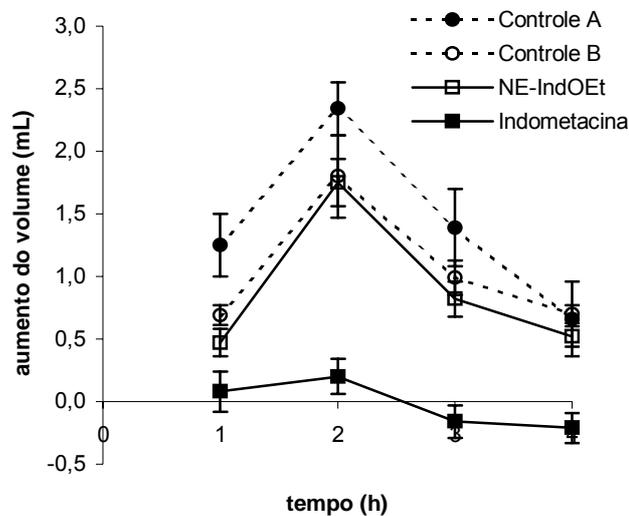


Figura 39. Aumento do volume (mL) das patas dos ratos tratados com NE-IndOEt e respectivos controles.

De acordo com os resultados apresentados pode-se observar que a formulação NE-IndOEt não inibiu significativamente o edema induzido pela carragenina. No entanto, as formulações NC-IndOEt e NS-IndOEt apresentaram inibição significativa do edema, sendo que a primeira formulação apresentou inibição

significativa a partir da segunda hora, atingindo 62,12 % de inibição, e a segunda, inibiu significativamente o edema a partir da primeira hora, atingindo 99,20 % de inibição.

Esses resultados demonstram a importância da presença do polímero nas formulações de NC e NS, visto que não foi observado efeito antiedematogênico após administração oral do IndOEt associado à NE. A ausência de efeito farmacológico da formulação NE-IndOEt foi atribuída a uma desestruturação do nanocarreador no trato gastrointestinal, provavelmente pela presença do sais biliares. No caso das NC e NS, o polímero promove a estabilização das formulações no trato gastrointestinal, prevenindo a desestruturação do carreador.

Os resultados positivos neste ensaio para as formulações de NC e NS demonstram as potencialidades destes nanocarreadores em promover a administração oral do IndOEt. Considerando que o éster é insolúvel em água ou em fluidos biológicos e que a sua nanodispersão é instável, as nanopartículas propiciaram a absorção do éster, uma vez que foi observado efeito farmacológico. De acordo com a literatura, duas hipóteses são levantadas para esclarecer de que modo as NC e NS promoveram a absorção do IndOEt. A primeira explicação consiste em considerar que a PCL possui propriedades bioadesivas, resultando em um aumento do contato da partícula com as paredes do intestino e, conseqüentemente, facilitando a transferência do IndOEt pelas células absorptivas. A segunda hipótese assume que ocorre a translocação das nanopartículas pela barreira gastrointestinal através das placas de Peyer e estas acessam o sistema linfático mesentérico e a circulação sanguínea (APRAHAMIAN *et al.*, 1987; AMMOURY *et al.*, 1993).

O edema de pata de rato induzido por carragenina avalia apenas um dos parâmetros da inflamação, tornando-se necessária a realização de outros ensaios farmacológicos para a avaliação da atividade antiinflamatória do IndOEt, como a indução de pleurisia e determinação do número de células no exsudato pleural e a lesão granulomatosa induzida por “pellet” de algodão. A partir dos resultados obtidos com esse experimento, abre-se a perspectiva de novos trabalhos que tenham como objetivos determinar qual forma do IndOEt está atuando, ou seja, se o éster possui

atividade antiinflamatória, ou se ele é hidrolisado e libera a indometacina, e esclarecer de que modo as NC e NS promoveram a absorção do IndOEt.

6 CONCLUSÕES

- As suspensões de nanocápsulas e nanoesferas de poli(ϵ -caprolactona) e a nanoemulsão contendo indometacina ou éster etílico de indometacina preparadas pelo método de nanoprecipitação da poli(ϵ -caprolactona) ou emulsificação espontânea apresentaram diâmetro de partícula inferior a 300 nm, pH na faixa de 4,5 a 5,5 e teores totais de sonda próximos a 1mg/mL.
- As suspensões de nanocápsulas preparadas com diferentes concentrações de poli(ϵ -caprolactona), variando entre 8 mg/mL e 2 mg/mL, exibiram as mesmas características apresentadas acima.
- A estratégia de emprego de um solvente do fármaco e, simultaneamente, não-solvente do polímero não foi adequada para diferenciar a quantidade de indometacina ou seu éster etílico adsorvida no polímero da quantidade dissolvida no óleo das nanocápsulas. O experimento baseado na diluição das suspensões com etanol [1:100(v/v)], seguido de centrifugação, promoveu a total liberação da indometacina ou de seu éster a partir das nanocápsulas.
- A hidrólise alcalina da indometacina e do éster etílico em solução de acetonitrila ocorreu em 1 e 2 minutos, respectivamente. Por outro lado, quando as sondas foram associadas às nanocápsulas, o consumo total ocorreu em 2 minutos e 24 horas, respectivamente.
- A hidrólise alcalina da indometacina associada a nanoesferas e nanoemulsão também demonstrou o consumo total do fármaco em 2 minutos de reação,

demonstrando um perfil cinético similar dos dois sistemas ao da nanocápsula. Por outro lado, quando o éster etílico de indometacina foi associado a esses sistemas, o consumo total ocorreu em 8 e 12 horas, respectivamente.

□ A determinação do diâmetro das nanoestruturas durante a hidrólise alcalina demonstrou que as partículas não foram dissolvidas e nem o polímero sofreu inchamento com a água durante o contato com a solução aquosa de NaOH. De acordo com esses resultados, a hipótese de erosão foi refutada, sugerindo que a reação é determinada pela difusão.

□ A hidrólise alcalina das sondas permitiu concluir que, independente da natureza do sistema nanoestruturado, a indometacina está preferencialmente localizada na interface partícula (gotícula)/água, enquanto que o éster etílico de indometacina estaria retido no interior das partículas.

□ A modelagem matemática da indometacina em solução e associada aos nanocarreadores mostrou um ajuste dos perfis cinéticos ao modelo monoexponencial. A hidrólise alcalina da indometacina em solução forneceu a constante cinética observada $k = 2,7080 \pm 0,0125 \text{ min}^{-1}$. A hidrólise alcalina da indometacina associada à nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão forneceu as constantes cinéticas observadas $k = 1,2880 \pm 0,0636 \text{ min}^{-1}$, $k = 1,5620 \pm 0,0874 \text{ min}^{-1}$ e $k = 1,5380 \pm 0,0128 \text{ min}^{-1}$, respectivamente.

□ A modelagem matemática dos perfis de consumo do éster etílico de indometacina permitiu concluir que a hidrólise do éster em solução é descrita pelo modelo monoexponencial, com constante cinética observada $k = 1,6400 \pm 0,0061 \text{ min}^{-1}$. Para as nanoestruturas o modelo selecionado foi o biexponencial que descreve o processo difusivo controlado por duas constantes, sendo para os três sistemas, k_1 maior que k_2 .

□ Os perfis cinéticos de hidrólise do éster etílico de indometacina associado a nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão apresentaram uma fase de liberação rápida, com tempo de meia-vida de 5,9, 4,4 e 2,7 minutos, e uma fase de liberação sustentada com tempos de meia-vida de 288,8, 87,7 e 147,5 minutos, respectivamente.

- O estudo da influência da concentração de poli(ϵ -caprolactona) na difusão do éster etílico de indometacina associado a nanocápsulas demonstrou que quanto menor a concentração de polímero empregada, mais rápido é o consumo do éster. O consumo total da sonda ocorreu em 24 horas, para a nanocápsula preparada com 8,0 mg/mL de polímero, em 21,5 horas, para as nanocápsulas preparadas com 6,0 e 4,0 mg/mL de polímero e 18,5 horas, para nanocápsula preparada com 2,0 mg/mL de polímero.
- A modelagem matemática mostrou um ajuste dos dados ao modelo biexponencial. As constantes cinéticas observadas k_1 e k_2 foram relacionadas aos processos de dessorção e difusão do éster a partir das nanoestruturas. Pode ser observado que as constantes cinéticas diminuem com o aumento da concentração de polímero (k_1 diminui de $0,2528 \pm 0,0768$ para $0,1176 \pm 0,0132 \text{ min}^{-1}$ e k_2 diminui de $0,0047 \pm 0,0001$ para $0,0024 \pm 0,0002 \text{ min}^{-1}$). As concentrações de éster para os processos de dessorção (a) e difusão (b) foram calculadas baseadas no modelo biexponencial. Os valores de a variaram entre 0,05 e 0,16 mg/mL e os valores de b variaram entre 0,84 e 0,96 mg/mL.
- Para todos os sistemas estudados observou-se um ajuste satisfatório dos dados experimentais ao modelo da Lei da Potência, através de coeficientes de correlação próximos de 0,99. Os expoentes de liberação obtidos para os sistemas estudados apresentaram valores entre 0,39 e 0,50, descrevendo o processo de difusão fickiana da sonda a partir de um sistema de geometria esférica.
- Os efeitos da administração oral do IndOEt associado aos nanocarreadores demonstraram atividade antiedematogênica frente ao ensaio de edema de pata de rato induzido por carragenina na dose de 10 mg/Kg somente para as formulações de nanocápsulas e nanoesferas, as quais inibiram significativamente o edema.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUBAKAR, M.; PUISIEUX, F.; COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Physico-chemical Characterization of Insulin-loaded Poly(isobutylcyanoacrylate) Nanocapsules Obtained by Interfacial Polymerization. *International Journal of Pharmaceutics*, v.183, p. 63-66, 1999.

AL KHOURI, N.; ROBLOT-TREUPEL, L.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-Ph.; PUISIEUX, F. Development of a New Process for the Manufacture of Polyisobutylcyanoacrylate Nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 28, p.125-132, 1986.

AMMOURY, N.; DUBRASQUET, M.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-Ph.; PUISIEUX, F.; BENITA, S. Indomethacin-loaded Poly(D, L-lactide) Nanocapsules: Protection from Gastrointestinal Ulceration and Anti-inflammatory Activity Evaluation in Rats. *Clinical Materials*, v. 13, p. 121-130, 1993.

APRAHAMIAN, M.; MICHEL, C.; HUMBERT, W.; DEVISSAGUET, J-Ph.; DAMGE, C. Transmucosal passage of Polyalkylcyanoacrylate Nanocapsules as a New Drug Carrier in the Small Intestine. *Biology of the Cell*. v. 61, p. 69-76, 1987.

BARRATT G. M. Therapeutic Applications of Colloidal Drug Carriers. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, v. 3, n. 5, p. 163-171, 2000.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M. Kinins and Pain in Inflammation. *Pain*, v. 87, p. 1-5, 2000.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative *In Vitro* Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules and Nanoemulsions, as Ocular Drug Carrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 85, n. 5, p. 530-536, 1996.

CAUCHETIER, E.; DENIEAU, M.; FESSI, H.; ASTIER, A.; PAUL, M. Atovaquone-loaded Nanocapsules: Influence of the Nature of the Polymer on their *in vitro* Characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 250, p. 273-281, 2003.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and Comparison of Dissolution Profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 13, p. 123-133, 2001.

COUVREUR, P.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F. Controlled Drug Delivery with Nanoparticles: Current Possibilities and Future Trends. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 41, n. 1, p. 2-13, 1995.

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

DAI, J.; NAGAI, T.; WANG, X.; ZHANG, T.; MENG, M.; ZHANG, Q. pH-sensitive Nanoparticles for Improving the Oral Bioavailability of Cyclosporine A. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 280, p. 229-240, 2004.

EL-ARINI, S. K.; LEUENBERGER, H. Modelling of Drug Release from Polymer Matrices: Effect of Drug Loading. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 121, p. 141-148, 1995.

EL-SAMALIGY, M. S.; ROHDEWALD, P.; MAHMOUD, H. A. Polyalkylcyanoacrylate Nanocapsules. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 38, p. 216-218, 1986.

FERNÁNDEZ-URRUSUNO, R.; DEVISSAGUET, J-Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Influence of Surface Properties on the Inflammatory Response to Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 9, p. 1385-1387, 1995.

FERRANTI, V.; MARCHAIS, H.; CHABENAT, C.; ORECCHIONI, A. M.; LAFONT, O. Primidone-loaded Poly- ϵ -caprolactone Nanocapsules: Incorporation Efficiency and *In Vitro* Release Profiles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 193, p. 107-111, 1999.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsules Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 55, p. r1-r4, 1989.

FORD, J. L.; RUBISTEIN, M. H.; McCAUL, F.; HOGAN, J. E. EDGAR, P. J. Importance of Drug Type, Tablet Shape and Added Diluents on Drug Release Kinetics from Hydroxypropylmethylcellulose Matrix Tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 40, p. 223-234, 1987.

FRESTA, M.; PUGLISI, G.; GIAMMONA, G.; CAVALLARO, G.; MICALI, N.; FURNERI, P. M. Pefloxacin Mesilate- and Ofloxacin-loaded Polyethyl cyanoacrylate Nanoparticles: Characterization of the Colloidal Drug Carrier Formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 84, p. 895-902, 1995.

GALLARDO, M.; COUARRAZE, G.; DENIZOT, B.; TREUPEL, L.; COUVREUR, P.; PUISIEUX, F. Study of the Mechanisms of Formation of Nanoparticles and

Nanocapsules of Polyisobutyl-2-cyanoacrylate. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 100, p. 55-64, 1993.

GAMISANS, F.; LACOUOLONCHE, F.; CHAUVET, A.; ESPINA, M.; GARCÍA, M. L.; EGEA, M. A. Flurbiprofen-loaded Nanospheres: Analysis of the Matrix Structure by Thermal Methods. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 179, p. 37-48, 1999.

GUINEBRETIERÉ, 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.

GÜRSOY, A.; EROGLU, L.; ULUTIN, S.; TASYÜREK, M.; FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-Ph. Evaluation of Indomethacin Nanocapsules for their Physical Stability and Inhibitory Activity on Inflammation and Platelet Aggregation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 52, p. 101-108, 1989.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J-Ph.; PUISIEUX, F. Poly(D,L-lactide) Nanocapsules Containing Diclofenac: I. Formulation and Stability Study. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 113, p. 57-63, 1995.

GUTERRES, S. S.; WEISS, V.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Influence of Benzyl 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.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable Nanoparticles for Drug Delivery and Targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, v. 6, p. 319-327, 2002.

HIGUCHI, T. Theoretical Analysis of Rate of Release of Solid Drugs Dispersed in Solid Matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 52, n. 12, 1963.

HOFFMANN, F.; CINATL Jr., J.; KABICKOVÁ, H.; KREUTER, J.; STIENEKER, F. Preparation, Characterization and Cytotoxicity of Methylmethacrylate Copolymer Nanoparticles with a Permanent Positive Surface Charge. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 157, p. 189-198, 1997.

HU, Y.; JIANG, X.; DING, Y.; GE, H.; YUAN, Y.; YANG, C. Synthesis and Characterization of Chitosan-poly(acrylic acid) Nanoparticles. *Biomaterials*, v. 23, p. 3193-3201, 2002.

ICH Harmonized Tripartite Guideline. *Validation of Analytical Procedures: Methodology*. United States of America, 1996.

KALGUTKAR, A. S.; MARNETT, A. B.; CREWS, B. C.; REMMEL, R. P. Ester and Amide Derivatives of the Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug, Indomethacin, as Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, p. 2860-2870, 2000.

- KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of Solute Release from Porous Hydrophilic Polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 15, p. 25-35, 1983.
- KULKARNI, A. R.; SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M. Urea-formaldehyde Nanocapsules for the Controlled Release of Diclofenac Sodium. *Journal Of Microencapsulation*, v. 17, n. 4, p.449, 2000.
- KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios Não-esteróides Inibidores da Ciclooxygenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.
- LANGVIN, D. Micelles and Microemulsions. *Annual Reviews of Physicochemistry*, v. 43, p. 341-369, 1992.
- LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-Ph. Polymeric Nanocapsules as Drug Delivery Systems. A Review. *S.T.P. Pharma Sciences*, v. 9, p. 414-418, 1999.
- LEROUEIL-LE VERGER, M.; FLUCKIGER, L.; KIM, Y.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Preparation and Characterization of Nanoparticles Containig an Antihypertensive Agent. *European Journal Of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 46, p. 137-143, 1998.
- LOPES, E. C.; POHLMANN, A. R.; BASSANI, V.; GUTERRES, S. S. Polymeric Colloidal Systems Containing Ethionamide: Preparation and Physico-chemical Characterization. *Pharmazie*, v. 55, n. 7, p. 527-530, 2000.
- LOSA, C.; MARCHAL-HEUSSLER, L.; ORALLO, F.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Design of New Formulations for Topical Ocular Administration: Polymeric Nanocapsules Containing Metipranolol. *Pharmaceutical Research*, v. 10, n. 1, p. 80-87, 1993.
- MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticles Characterization: A Comprehensive Physicochemical Approach. *S. T. P. Pharma Sciences*, v. 1, n. 4, p. 221-241, 1991.
- MARCHAL-HEUSSLER, L.; MAICENT, P.; HOFFMAN, M.; SPITTLER, J.; COUVREUR, P. Antiglaucomatous Activity of Betaxolol Chlorhydrate Sorbed onto Different Isobutylcyanoacrylate Nanoparticle Preparation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 58, p. 115-122, 1990.
- MARTIN, A.; BUSTAMANTE, P.; CHUN, A. H. C. *Physical Pharmacy*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
- MAYER, C. Nuclear Magnetic Resonance on Dispersed Nanoparticles. *Progressin Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 40, p. 307-366, 2002.
- MAYER, C.; HOFFMANN, D.; WOHLGEMUTH, M. Structural Analysis of Nanocapsules by Nuclear Magnetic Resonance. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 242, p. 37-46, 2002.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRAT, G. Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Prepared by a Solvent Displacement Process: Influence of the Composition on Physicochemical and Structural Properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 89, n. 5, p. 614-626, 2000.

MÜLLER, C. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; SILVEIRA, N. P.; COSTA, T. D.; GUTERRES, S. S. Spray-dried Diclofenac-loaded Poly(ϵ -caprolactone) Nanocapsules and Nanospheres. Preparation and Physicochemical Characterization. *Pharmazie*, v. 56, n.11, p. 864-867, 2001.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. *Fundamentos da Físico-química: uma Abordagem Conceitual para as Ciências Farmacêuticas*. Porto Alegre: Artmed, 2002.

OBACH, E. S. Avaliação dos Perfis de Liberação *In Vitro* e da Toxicidade Gastrointestinal *In Vivo* de Indometacina a partir de Nebulizados de Nanopartículas. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

O'HARA, T.; DUNNE, A.; BUTLER, J.; DEVANE, J. A Review of Methods Used to Compare Dissolution Profile Data. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, v. 1, n. 5, p. 214-223, 1998.

PEPPAS, N. A. Analysis of Fickian and Non-fickian Drug Release from Polymers. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, v. 60, n. 4, p. 110-111, 1985.

POHLMANN, A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. Spray-dried Indomethacin-loaded Polyester Nanocapsules and Nanospheres: Development, Stability Evaluation and Nanostructure Models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 16, p. 305-312, 2002.

POLAKOVIC, M.; GÖRNER, T.; GREF, R.; DELLACHERIE, E. Lidocaine Loaded Biodegradable Nanospheres II. Modeling of Drug Release. *Journal of Controlled Release*, v. 60, p. 169-177, 1999.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 24, n. 12, p. 1113-1128, 1998.

RAFFIN, R. P.; OBACH, E. P.; MEZZALIRA, G.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocápsulas Poliméricas Secas Contendo Indometacina: Estudo de Formulação e de Tolerância Gastrintestinal em Ratos. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, v. 22, n. 2, p. 163-172, 2003.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A Simple Equation for Description of Solute Release I. Fickian and Non-fickian Release From Non-swellable Devices in the Form of Slabs, Spheres, Cylinders or Discs. *Journal of Controlled Release*, v. 5, p. 23-36, 1987.

ROLLOT, J. M.; COUVREUR, P.; ROBLOT-TREUPEL, L.; PUISIEUX, F. Physicochemical and Morphological Characterization of Polyisobutylcyanoacrylate Nanocapsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 75, n. 4, p. 361-364, 1986.

ROMERO-CANO, M. S.; VINCENT, B. Controlled Release of 4-nitroanisole from Poly(lactic acid) Nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, v. 82, p. 127-135, 2002.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. W.; CAETANO, M. N. P. Colloidal Carriers for Benzathine Penicillin G: Nanoemulsions and Nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 208, p. 71-80, 2000.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHMANN A. R. Caracterização Físico-química e Estabilidade de Sistemas Nanoestruturados para Administração de Fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modelling of Drug Release from Delivery Systems Based on Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, p. 139-157, 2001.

SOARES, L. U. Estudo Cinético da Hidrólise do Éster Etilico de Indometacina Associado a Nanopartículas de Poli(ϵ -caprolactona). Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Devices. *Journal of Controlled Release*, v. 70, p. 1-20, 2001.

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

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 111, p. 544-547, 1962.

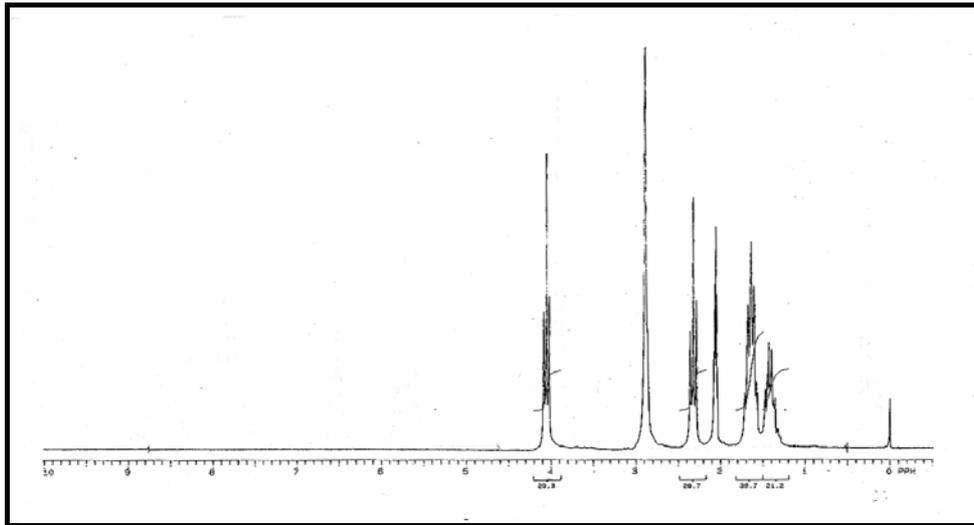
WOHLGEMUTH, M.; MÄCHTLE, W.; MAYER, C. Improved Preparation and Physical Studies of Polybutylcyanoacrylate Nanocapsules. *Journal of Microencapsulation*, v. 17, n. 4, p. 437-448, 2000.

WOHLGEMUTH, M.; MAYER, C. Pulsed Field Gradient NMR on Polybutylcyanoacrylate Nanocapsules. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 260, p. 324-331, 2003.

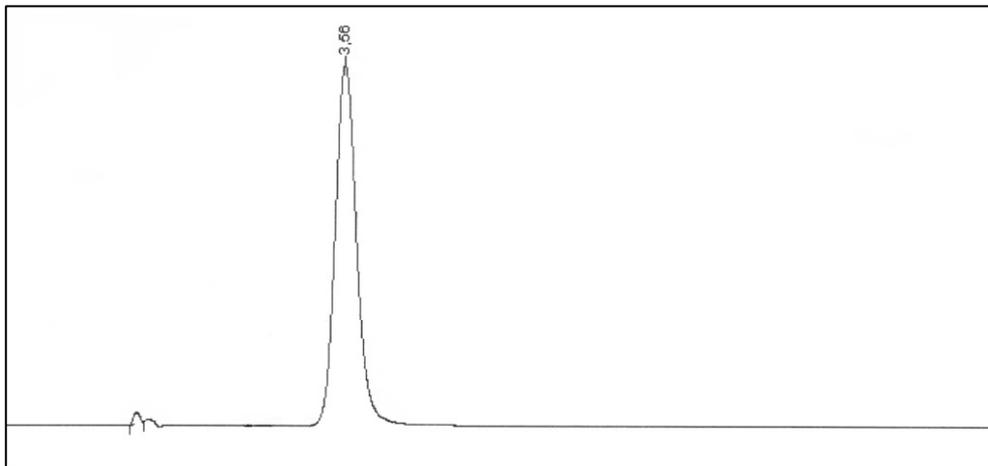
WOO, P. Cytokine Polymorphisms and Inflammation. *Clinical and Experimental Pharmacology*, v. 18, n. 6, p. 767-771, 2000.

ANEXOS

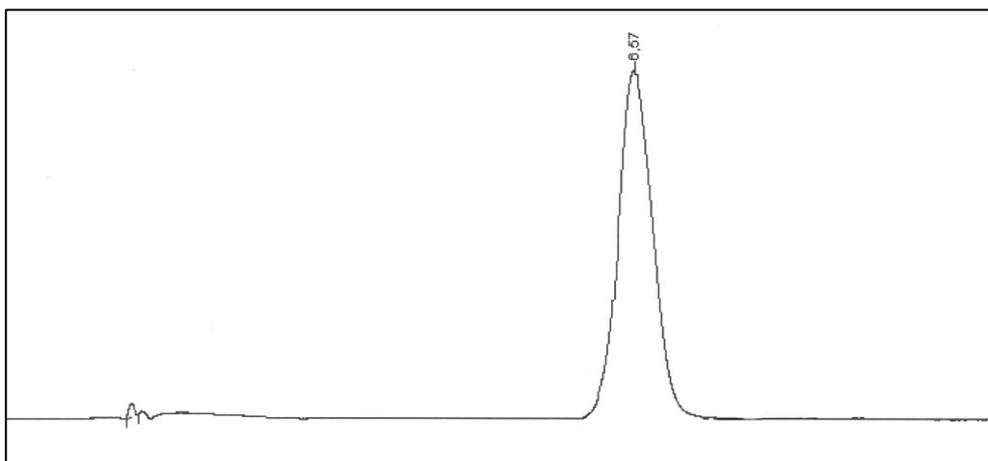




Espectro de RMN de ^1H da poli(ϵ -caprolactona) em CD_3COCD_3 .



Cromatograma da Indometacina em solução de acetonitrila*.



Cromatograma do éster etílico de indometacina em solução de acetonitrila*.

*Fase móvel: acetonitrila/água (70:30 v/v), pH aparente: 5,0; Fluxo: 0,7 mL/min; Volume de injeção: 20 μL ; Detecção: 267 nm.