

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

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO
RALOXIFENO EMPREGANDO OS MÉTODOS DE DEPOSIÇÃO INTERFACIAL DE
POLÍMERO PRÉ-FORMADO OU SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO VIBRACIONAL**

MÁRCIA CAMPONOGARA FONTANA

PORTO ALEGRE, 2013

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

**Desenvolvimento de formulações farmacêuticas contendo raloxifeno
empregando os métodos de deposição interfacial de polímero pré-formado ou
secagem por atomização vibracional**

Tese apresentada por **Márcia Camponogara
Fontana** para obtenção do TÍTULO DE
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Porto Alegre, 2013

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 14 de novembro de 2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Bibiana Verlindo de Araújo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Clarice Madalena Bueno Rolim
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Profa. Dra. Simone Gonçalves Cardoso
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Fontana, Márcia Camponogara

Desenvolvimento de formulações farmacêuticas contendo raloxifeno empregando os métodos de deposição interfacial de polímero pré-formado ou secagem por atomização vibracional / Márcia Camponogara Fontana. -- 2013.

201 f.

Orientador: Ruy Carlos Ruver Beck.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. nanocápsulas. 2. raloxifeno. 3. atomização vibracional. 4. dexametasona. 5. via pulmonar. I. Beck, Ruy Carlos Ruver, orient. II. Título.

*Dedico este trabalho à minha família,
pelo incentivo e apoio necessários
para esta conquista.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelas oportunidades oferecidas.

Ao Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck, pela sua orientação, amizade, incentivo, exigências, oportunidades concedidas, conhecimentos compartilhados e exemplo profissional demonstrado.

Às professoras Dr^a Silvia S. Guterres e Dr^a Adriana R. Pohlmann pela estrutura oferecida e pelas contribuições científicas.

Ao Corpo Docente do PPGCF-UFRGS, pelos conhecimentos transmitidos.

Às professoras Dr^a Andréia Buffon e Dr^a Bibiana Araújo pelas colaborações e contribuições científicas.

Aos meus pais, irmãs e ao Flávio, pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

Aos colegas de laboratório 405 pelo auxílio, companheirismo, pelos bons momentos de convivência e descontração. Em especial aos colegas Taís, Frantiescoli, Manoel, Diego, Karina, Rossana, Cássia, Gabriele, Renata, Noé, Ana Carolina, Stela, Lucas, Tatieli, Cati, Cris, Karine, Paula, Aline e Thatiana. E também a Betieli, bolsista de iniciação científica, que me auxiliou no último ano de trabalho experimental.

Aos colegas de Laboratório de Cultura Celular, pelo auxílio nos experimentos com cultura de células, em especial a Aline Beckenkamp, colaboradora do projeto.

Aos colegas do CBIM (Centro Bioanalítico de Medicamentos) pelo auxílio prestado nos experimentos de farmacocinética, em especial ao João Victor, colaborador do projeto.

À CAPES, órgão financiador da bolsa de estudos. Ao CNPq, FAPERGS e INCT-if pelos financiamentos.

RESUMO

Partículas nanométricas e submicrométricas são desenvolvidas para controlar a liberação do fármaco, aumentar o efeito antiproliferativo e evitar o metabolismo pré-sistêmico de fármacos. Neste trabalho foram preparadas nanocápsulas através da deposição interfacial de polímeros pré-formados com os polímeros catiônico e aniônico, contendo cloridrato de raloxifeno, que apresentaram adequadas características nanotecnológicas. Dependendo do perfil de liberação *in vitro* do fármaco pôde-se obter um efeito antiproliferativo diferenciado em células de carcinoma mamário. A secagem por atomização vibracional é uma técnica recentemente utilizada na produção de partículas submicrométricas esféricas a partir de soluções aquosas ou orgânicas. A aplicação desta secagem no desenvolvimento de partículas poliméricas submicrométricas pulverulentas foi estudada. Inicialmente foram produzidos pós contendo dexametasona para administração pulmonar, apresentando diâmetro aerodinâmico adequado para esta via de administração (< 5 µm). A poli(ε-caprolactona) foi fundamental para modular a liberação *in vitro* do fármaco a partir do pó. A formulação contendo a menor proporção polimérica possibilitou uma distribuição granulométrica simétrica e adequada desaglomeração. Na sequência, partículas submicrométricas sólidas contendo cloridrato de raloxifeno no estado amorfo foram produzidas através da atomização vibracional. A presença do polímero na estrutura destas partículas também levou a uma liberação do fármaco sustentada. As formulações foram avaliadas em relação à deposição nas diferentes porções do trato respiratório *in vitro*, demonstrando uma adequada deposição pulmonar e atingindo as porções mais inferiores do trato respiratório. Além disso, um implante subcutâneo e biodegradável contendo cloridrato de raloxifeno foi produzido a partir da compressão manual de um pó preparado por secagem por atomização vibracional. O polímero [poli(ε-caprolactona)] e o óleo (mistura de triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico) presentes na formulação foram fundamentais para a liberação do fármaco *in vitro* por 24 dias. O pó para administração pela via pulmonar e o implante subcutâneo contendo cloridrato de raloxifeno possibilitam a escolha de outras vias de administração para este fármaco, que apresenta um grande metabolismo de primeira passagem após administração oral. Para avaliar a biodisponibilidade do cloridrato de raloxifeno, foi validado um

método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência, com baixo limite de quantificação, para a análise deste fármaco no plasma de ratos. Este método está sendo aplicado em estudos farmacocinéticos após administração pulmonar e subcutânea das formulações desenvolvidos nesta tese. Assim, a nanoencapsulação do cloridrato de raloxifeno possibilitou um aumento no efeito antiproliferativo sobre as células de carcinoma mamário e formulações inovadoras foram produzidas a partir da secagem por atomização vibracional.

Palavras-chaves: nanocápsulas, raloxifeno, atomização vibracional, dexametasona, via pulmonar, implante.

ABSTRACT

Development of pharmaceutical formulations containing raloxifene through interfacial deposition of preformed polymer or vibrational atomization spray-drying

Nano and submicron particles are produced to drug control release, improve the antiproliferative effect and prevent the presystemic metabolism of drugs. In this work cationic and anionic polymeric nanocapsules were prepared by interfacial deposition of preformed polymers containing raloxifene hydrochloride, showing adequate nanotechnological properties. Prolonged antiproliferative effect on breast carcinoma cells was depending on the *in vitro* drug release profile from the different formulations. The vibrational atomization spray-drying is a technique recently used for the production of submicrometer spherical particles from aqueous or organic solutions. The use of this drying in the development of polymeric submicrometer powders was studied. Dry powders containing dexamethasone were developed for the pulmonary administration, showing mass median aerodynamic diameter suitable for this route of administration ($< 5 \mu\text{m}$). Poly(ϵ -caprolactone) was essential to modulate the *in vitro* drug release from powder. The lowest drug:polymer ratio led to the symmetric primary particle size distribution and efficient deagglomeration behavior. Spray-drying submicrometric particles containing amorphous raloxifene hydrochloride were also produced by vibrational atomization. Controlled drug release profile was obtained for formulation containing polymer. Formulations were evaluated according to their *in vitro* lung deposition. They presented adequate pulmonary deposition, reaching the deepest stages of respiratory tract. Furthermore, a biodegradable subcutaneous implant containing raloxifene hydrochloride was developed by the manual compression of the powder produced by vibrational atomization spray-drying. The presence of the polymer [poly(ϵ -caprolactone)] and the oil (caprylic/capric triglyceride mixture) were essential to promote the *in vitro* drug release for 24 days. The powder for pulmonary route and the subcutaneous implant containing raloxifene hydrochloride enable to choose other routes of administration for this drug, which has a large first pass metabolism after oral administration. To

evaluate the bioavailability of raloxifene hydrochloride, an analytical method was validated by high performance liquid chromatography, with low limit of quantification for the analysis of this drug in rat plasma. This method is applied in pharmacokinetic studies after pulmonary and subcutaneous administration of formulations developed in this work. Thus, the nanoencapsulation of raloxifene hydrochloride enabled a improved the antiproliferative effect on breast carcinoma cells and innovative formulations were produced from the vibrational atomization spray-drying.

Keywords: nanocapsules, raloxifene, vibrational atomization, dexamethasone, pulmonary administration, implant.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
OBJETIVOS	27
Objetivo geral	29
Objetivos específicos	29
REVISÃO DA LITERATURA	31
Cloridrato de raloxifeno e sistemas de liberação de fármacos	33
Nanopartículas poliméricas	36
Via pulmonar e o uso da secagem por atomização vibracional	36
Implante subcutâneo	40
CAPÍTULO 1: Controlled release of raloxifene by nanoencapsulation: effect on <i>in vitro</i> antiproliferative activity of human breast cancer cells	41
CAPÍTULO 2: Aplicação da secagem por atomização vibracional na preparação de formulações farmacêuticas	69
PARTE 1: Piezoelectric atomizing spray-dryer to convert liquids to dry powders: operational parameters and formulation characteristics	71
PARTE 2: Polymeric controlled release inhalable powder produced by vibrational spray-drying: one-step preparation and <i>in vitro</i> lung deposition	95
PARTE 3: Development of raloxifene hydrochloride submicron particles for pulmonary administration by vibrational atomization spray-drying	123
PARTE 4: Polymeric subcutaneous implant to raloxifene hydrochloride sustained delivery: development and characterization	147
CAPÍTULO 3: Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV para quantificação do cloridrato de raloxifeno em plasma de ratos e sua aplicação para o estudo farmacocinético	161
DISCUSSÃO GERAL	175
CONCLUSÕES	185
REFERÊNCIAS	189
ANEXO	199

A micro e a nanotecnologia têm sido amplamente estudadas na área farmacêutica no desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos. As formulações preparadas com estes sistemas apresentam vantagens frente aos medicamentos convencionais, como o direcionamento do efeito farmacológico ao órgão-alvo (Elsheikh *et al.*, 2012), o aumento da biodisponibilidade do fármaco (Cruz *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2012) e a diminuição das reações adversas (Kumari *et al.*, 2010; Vilos and Velasquez, 2012). Além disso, a liberação controlada de fármacos é uma importante ferramenta empregada em novas formas farmacêuticas através da nanotecnologia, possibilitando o aumento da eficácia (Bernardi *et al.*, 2009), mesmo com um menor número de administrações (Fontana *et al.*, 2011; Jaques *et al.*, 2012).

Entre os sistemas coloidais carreadores de ativos farmacêuticos, as nanocápsulas poliméricas são amplamente empregadas no desenvolvimento de formulações que controlam a liberação de fármacos. Estas suspensões podem ser mucoadesivas no trato gastrointestinal e se comportar como um reservatório de fármaco para posterior absorção (Cattani *et al.*, 2010). Além disso, as nanocápsulas poliméricas protegem o trato gastrointestinal de lesões causadas por ativos farmacêuticos (Guterres *et al.*, 2001; Bernardi *et al.*, 2009) e proporcionam uma maior concentração do fármaco no sítio-alvo (Haas *et al.*, 2009; Frozza *et al.*, 2010). A parede polimérica e o núcleo oleoso, constituintes das nanocápsulas poliméricas, são os responsáveis pela sua importante propriedade de modular a liberação das substâncias nanoencapsuladas (Fontana *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010; Hoffmeister *et al.*, 2012).

Os polímeros sintéticos PLGA [poli(ácido lactídeo-co-ácido glicolídeo)], PLA [poli(ácido lactídeo)] e PCL [poli(ϵ -caprolactona)] são muito empregados na preparação das nanocápsulas por serem biodegradáveis (Ourique *et al.*, 2008; Fontana *et al.*, 2009; Fontana *et al.*, 2010). No entanto, polímeros não biodegradáveis, como os polimetacrilatos, que são aprovados pelo FDA para uso oral e tópico, também são utilizados no desenvolvimento destes sistemas coloidais (Schaffazick *et al.*, 2005; Contri *et al.*, 2011). Diferentes óleos já foram utilizados como formadores do núcleo destas nanocápsulas, como a mistura de triglicerídeos de cadeia média e o óleo de girassol (Friedrich *et al.*, 2008), o óleo de semente de uva e o óleo de amêndoas doce (Almeida *et al.*, 2009), assim como óleos essenciais (Flores *et al.*, 2011). Estes sistemas coloidais aquosos são estabilizados por

tensoativos hidrofílicos (polissorbato 80, poloxamer 188) e lipofílicos (monooleato de sorbitano, sesquioleato de sorbitano, monoestearato de sorbitano). Entretanto, podem apresentar problemas de estabilidade, como a agregação das nanopartículas com formação de precipitados e hidrólise do polímero (Schaffazick *et al.*, 2006; Friedrich *et al.*, 2008; Fontana *et al.*, 2009).

A liofilização e a secagem por aspersão convertem as suspensões coloidais em materiais pulverulentos e são estratégias utilizadas para diminuir sua instabilidade (Schaffazick *et al.*, 2003; Schaffazick *et al.*, 2006; Marchiori *et al.*, 2012). Para este processo é necessário adicionar adjuvantes de secagem nas suspensões aquosas, como o dióxido de silício, a leucina, a lactose, o manitol, a maltodextrina e a polivinilpirrolidona (Schaffazick *et al.*, 2006; Guterres *et al.*, 2009; Hoffmeister *et al.*, 2012). Os pós obtidos apresentam alta eficiência de encapsulação do fármaco (Beck *et al.*, 2004; Beck *et al.*, 2005; Marchiori *et al.*, 2012); possibilitam o controle de liberação do ativo, tanto para uso oral como tópico (Beck *et al.*, 2007; Hoffmeister *et al.*, 2012); protegem a mucosa gastrointestinal frente a irritação do fármaco (Beck *et al.*, 2005; Beck *et al.*, 2006); protegem o fármaco contra a fotodegradação (Marchiori *et al.*, 2012); apresentam propriedades aerodinâmicas adequadas para administração pulmonar (Chougule *et al.*, 2008) e contribuem para o aumento da biodisponibilidade do fármaco (Chougule *et al.*, 2007). No entanto, estas formulações apresentam a desvantagem de apresentar baixa concentração final de fármaco no pó (m/m) e, geralmente, baixo rendimento do processo (Marchiori *et al.*, 2012).

A secagem por aspersão a partir de uma atomização vibracional foi introduzida no mercado em 2009, produzindo partículas esféricas com tamanho submicrométrico e com alto rendimento de processo (Schmid *et al.*, 2009; Beck-Broichsitter *et al.*, 2012). Diferente da secagem por aspersão convencional, esta técnica apresenta um sistema inovador de atomização vibracional através do processo piezoelétrico, que lança na torre de secagem um fino aerossol (Schmid *et al.*, 2010). Além disso, esta nova tecnologia apresenta um sistema de coleta diferenciado, impedindo que os pós mais finos sejam perdidos pelo filtro, possibilitando sua coleta através da atração eletrostática (Lee *et al.*, 2011). A partir de uma solução orgânica ou aquosa é possível produzir partículas cristalinas submicrométricas de fármaco (Sun *et al.*, 2011; Martena *et al.*, 2012), pós inaláveis com propriedades aerodinâmicas adequadas (Feng *et al.*, 2011; Beck-Broichsitter *et*

al., 2012) e partículas submicrométricas poliméricas, que controlam a liberação de fármacos (Beck-Broichsitter *et al.*, 2012; Schafroth *et al.*, 2012).

A secagem por aspersão tem sido amplamente utilizada no desenvolvimento de formulações pulverulentas para a administração de fármacos pela via pulmonar, visando o efeito local (Prota *et al.*, 2011; Aquino *et al.*, 2012) ou efeito sistêmico (Cruz *et al.*, 2011), devido à alta vascularização do pulmão (Sung *et al.*, 2007). Assim, os pós produzidos podem ser administrados por esta via como alternativa para os fármacos com baixa biodisponibilidade oral e que sofrem metabolismo de primeira passagem (Cruz *et al.*, 2011).

O emprego de implantes subcutâneos é outra estratégia empregada para evitar o metabolismo pré-sistêmico do fármaco e possibilitar a liberação do ativo por um tempo prolongado (Cheng *et al.*, 2009; Hiremath and Devi, 2011; Aqil *et al.*, 2012). A poli(ϵ -caprolactona) é um polímero biodegradável e biocompatível empregado no desenvolvimento de implantes subcutâneos, como os utilizados para a liberação sustentada de ativos que apresentam baixa biodisponibilidade oral (Aqil *et al.*, 2012; Solano *et al.*, 2013).

O cloridrato de raloxifeno (CR), um dos fármacos selecionados neste trabalho, é um derivado benzotiofênico não-esteróide, aprovado pelo FDA para o tratamento e prevenção da osteoporose em mulheres após a menopausa, além de reduzir o risco de câncer de mama e endométrio em mulheres na pós-menopausa com osteoporose (Hochner-Celnikier *et al.*, 1999). A dexametasona, outro fármaco selecionado neste trabalho, é um glicocorticóide sintético utilizado principalmente pelos seus efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, sendo administrada pela via oral, tópica e intravenosa para o tratamento de processos inflamatórios. Também é habitualmente indicada a pacientes no tratamento pré-quimioterápico, pois pode ajudar a aliviar e prevenir náusea e outros efeitos colaterais associados à quimioterapia (GOODMAN & GILMAN, 2007).

A partir do exposto, propôs-se nesta tese o desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas com distintas características de superfície (aniônica ou catiônica) para investigar o seu efeito sobre a viabilidade celular empregando uma linhagem de carcinoma mamário (MCF-7). Além disso, foi delineado o desenvolvimento de formulações farmacêuticas sólidas para uso pulmonar e subcutâneo empregando a secagem através da atomização vibracional, recentemente desenvolvida. Este trabalho foi planejado com o objetivo de produzir formulações que possam aumentar

a biodisponibilidade dos fármacos através da diminuição do metabolismo pré-sistêmico, mudando a via de administração do fármaco e controlando a cinética de liberação dos fármacos a partir destas formulações farmacêuticas.

Objetivo geral

Desenvolver formulações nanométricas ou submicrométricas contendo cloridrato de raloxifeno ou dexametasona, empregando as técnicas de deposição interfacial do polímero ou secagem por atomização vibracional, estudando o papel do polímero no controle da liberação, no efeito antiproliferativo e/ou propondo vias alternativas de administração destes fármacos para contornar a limitação do metabolismo pré-sistêmico.

Objetivos específicos

- Estudar a influência do potencial de superfície (positivo ou negativo) de nanocápsulas poliméricas contendo cloridrato de raloxifeno sobre as suas características físico-químicas, liberação *in vitro* do fármaco e efeito antiproliferativo em linhagem celular de câncer de mama (MCF-7);
- Estudar o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica contendo dexametasona, para uso pulmonar, produzida a partir da secagem por atomização vibracional, utilizando a poli(ϵ -caprolactona) como polímero para controlar a liberação do fármaco;
- Desenvolver formulações submicrométricas sólidas para administração pulmonar contendo cloridrato de raloxifeno, empregando a secagem por atomização vibracional, avaliando a liberação *in vitro* do fármaco a partir destas novas formas farmacêuticas;
- Desenvolver um implante biodegradável subcutâneo de cloridrato de raloxifeno através da compressão manual de um pó produzido por atomização vibracional e estudar a liberação *in vitro* do fármaco a partir desta forma farmacêutica;
- Desenvolver e validar um método para quantificação do cloridrato de raloxifeno em plasma de ratos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV, para a aplicação aos estudos farmacocinéticos a partir das formulações desenvolvidas nesta tese.

Cloridrato de raloxifeno e sistemas de liberação de fármacos

A terapia hormonal é utilizada na prevenção e no tratamento da osteoporose após a menopausa devido ao declínio dos níveis de estrogênio no plasma (Bayrak *et al.*, 2010). Por muito tempo o estrogênio e a progesterona foram utilizados na reposição hormonal, mas o seu uso prolongado aumenta o risco de câncer de mama e endométrio (Lee *et al.*, 2008).

O cloridrato de raloxifeno (CR, Figura 1) foi sintetizado para prevenir o câncer de mama, que tem sua proliferação dependente de estrogênio. A ligação deste fármaco aos receptores de estrogênio localizados no tecido mamário leva ao bloqueio da transcrição do DNA, sendo considerado um agente quimiopreventivo (Bayrak *et al.*, 2010; Dai and Wu, 2011). O CR é um não-esteróide, modulador seletivo dos receptores de estrogênio, que apresenta efeito agonista sobre o tecido ósseo e o sistema cardiovascular, mas tem efeito antagonista sobre o tecido mamário e endométrio (Kayath *et al.*, 1999). Alguns pesquisadores demonstraram que o CR inibe a proliferação de células de câncer de mama dependentes de hormônio e também causa a morte celular por apoptose e bloqueio do ciclo celular, como na linhagem celular MCF-7 (Liu *et al.*, 2003; Sookvanichsilp and Boonleang, 2005; Hodges-Gallagher *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 2012).

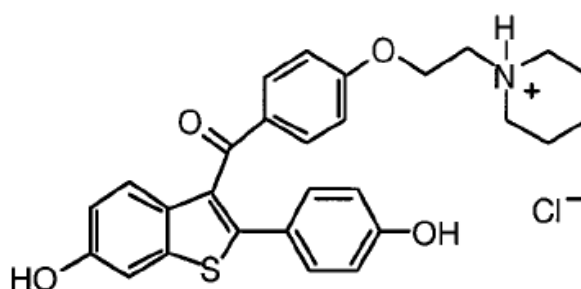


Figura 1. Estrutura química do cloridrato de raloxifeno ($C_{28}H_{27}NO_4S.HCl$).

O CR é atualmente comercializado na forma de comprimidos (60 mg) com o nome comercial de Evista[®] (Lilly). Após a sua administração oral, aproximadamente 60 % da dose é absorvida pelo trato gastrointestinal. Por ser extensamente metabolizado no intestino e fígado, sua biodisponibilidade absoluta é de apenas 2 % com formação de conjugados de sulfato e glicuronídeos (Morello *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2005). O cloridrato de raloxifeno é ligeiramente solúvel em água ($627,4 \pm$

132,0 µg/mL), seu peso molecular é de 510,06 g/mol e apresenta 3 valores de pKa (8,95; 9,83 e 10,91) (Teeter and Meyerhoff, 2002). Este fármaco pertence à classe 2 do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, apresentando baixa solubilidade e alta permeabilidade (Oh *et al.*, 2012).

Várias estratégias têm sido estudadas para aumentar a biodisponibilidade oral do CR, como a complexação com ciclodextrinas (Wempe *et al.*, 2008), a co-administração com flavonóides (Chen *et al.*, 2010), a moagem com desintegrantes (Balasubramaniam *et al.*, 2010), as dispersões sólidas obtidas por secagem (Oh *et al.*, 2012), além do desenvolvimento de microesferas bioadesivas (Jha *et al.*, 2011).

Chen e colaboradores (2010) avaliaram a farmacocinética oral do CR em ratos quando administrado associado a um flavonóide, a apigenina. Neste estudo não foi observado o aumento da absorção do fármaco pelo trato gastrointestinal, mas a apigenina diminuiu o metabolismo de primeira passagem, inibindo a glicuronidação e sulfatação do CR no intestino, aumentando consequentemente a sua biodisponibilidade. Jha e colaboradores, em 2011, desenvolveram microesferas bioadesivas contendo CR empregando a técnica de secagem por aspersão. Estas partículas eram constituídas pela complexação do CR com ciclodextrinas, carbopol e hidroxipropil metilcelulose (HPMC). A microencapsulação proporcionou o aumento na solubilidade do fármaco e isto foi explicado pela mudança de sua cristalinidade na formulação. Além disso, as microesferas (3 - 15 µm) demonstraram mucoadesão, possibilitaram o controle de liberação do fármaco e promoveram uma maior absorção e biodisponibilidade do CR. Em 2008, Wempe e colaboradores já haviam demonstrado que a complexação do CR com hidroxibutenil-beta-ciclodextrinas aumentou a biodisponibilidade oral deste fármaco em ratos.

Entretanto, é amplamente reconhecido que o aumento da biodisponibilidade dos fármacos pode ser promovido através da diminuição do tamanho de partícula e consequente aumento da sua área superficial e solubilidade intrínseca. Balasubramaniam e colaboradores (2010) aumentaram a velocidade de dissolução e a biodisponibilidade do CR através da moagem deste fármaco com desintegrantes. Para isto, o moinho de bolas foi utilizado e foram testados os seguintes desintegrantes: crospovidona, croscarmelose sódica e amido glicolato de sódio. As misturas contendo CR e crospovidona em diferentes proporções apresentaram uma maior redução no tamanho de partícula, sendo que a proporção

fármaco:desintegrante 5:1 (m/m) promoveu a maior dissolução do CR. Esta mistura aumentou em 7 vezes a biodisponibilidade oral do fármaco.

Mais recentemente, Oh e colaboradores (2012) prepararam dispersões sólidas de CR com um polímero hidrofílico (HPMC) empregando a secagem por aspensão. A dissolução do fármaco a partir das nanopartículas (610 nm - 992 nm), em meio gástrico e intestinal simulado, foi maior do que a dissolução do fármaco puro (21 μ m). Isto foi explicado pela diminuição do tamanho de partícula e pelas ligações de hidrogênio entre o fármaco e o nanocarreador. Os autores propõem que as nanopartículas desenvolvidas por esta técnica representam um potencial para promover a biodisponibilidade oral do CR.

Neste contexto, torna-se importante realçar que a nanotecnologia é muito utilizada para aumentar a eficácia dos fármacos, podendo proporcionar, também, um aumento na sua biodisponibilidade (Patel *et al.*, 2012) e um aumento na quantidade de fármaco nos órgãos alvo (Elsheikh *et al.*, 2012), possibilitando a diminuição da dose administrada e dos efeitos adversos. Keshavarz e colaboradores (2012) prepararam nanopartículas contendo CR utilizando a técnica de fluido supercrítico. Este estudo demonstrou o aumento na velocidade de dissolução do fármaco a partir das nanopartículas, sugerindo uma melhora na sua biodisponibilidade.

Nanopartículas de lipídio sólido contendo CR foram preparadas por Patel e colaboradores (2012) apresentando potencial zeta positivo e aproximadamente 100 nm. Estas partículas apresentaram uma maior permeabilidade intestinal *in vitro* e proporcionaram um aumento na concentração máxima no plasma de ratos (3,5 vezes) quando comparadas com a formulação comercial. Por outro lado, Elsheikh e colaboradores (2012) prepararam nanoemulsões contendo CR. Duas formulações foram preparadas, uma contendo o CR disperso na nanoemulsão e outra contendo o fármaco dissolvido através da alcalinização da nanoemulsão com trietanolamina, apresentando potencial zeta positivo e negativo, respectivamente. As formulações apresentaram tamanho médio de partícula inferior a 40 nm e baixo índice de polidispersão (< 0,32). No estudo de liberação *in vitro*, a nanoemulsão que continha o fármaco dissolvido controlou a liberação do CR, mas a nanoemulsão que continha o fármaco disperso apresentou um perfil de liberação semelhante ao controle (suspensão do fármaco). No entanto, após a administração oral em ratas, ambas formulações dobraram a concentração do CR no sítio-alvo (útero, trompas de falópio e ovários), demonstrando que não houve correlação *in vitro/in vivo*.

Nanopartículas poliméricas

Nanocápsulas poliméricas são sistemas carreadores submicrométricos de fármacos, onde o fármaco pode ficar localizado dentro do nanocarreador ou adsorvido na sua superfície (Kumari *et al.*, 2010). Existem algumas técnicas *in vitro* para estudar a liberação do fármaco a partir destas partículas, como o método dos sacos de diálise, em que as nanopartículas são separadas do meio externo através de uma membrana de diálise (Soppimath *et al.*, 2001). Os polímeros mais utilizados para preparar nanopartículas poliméricas são o PLA, PLGA (Fontana *et al.*, 2010), PCL (Fontana *et al.*, 2009) e polimetacrilatos (Schaffazick *et al.*, 2005; Contri *et al.*, 2011).

Nanopartículas poliméricas contendo CR, que promoveram o controle da liberação do fármaco, foram preparadas por Bikiaris e colaboradores (2009), empregando novos poliésteres (succinato de polietileno e adipato de polipropileno). As partículas foram preparadas através da precipitação, filtradas para a retirada de precipitados poliméricos e liofilizadas, apresentando tamanho médio de partícula de 200 a 350 nm. O estudo de liberação *in vitro* demonstrou uma liberação inicial rápida, seguida por uma liberação muito lenta do fármaco, o que levou os autores a concluir que a liberação do fármaco depende do ponto de fusão e do grau de cristalinidade do polímero empregado. No entanto, até o momento não foram relatados estudos da avaliação do efeito da nanoencapsulação do CR sobre seu efeito antiproliferativo em células cancerígenas.

Via pulmonar e o uso da secagem por atomização vibracional

Os pulmões representam uma importante via de administração de fármacos para efeito local e também para o tratamento sistêmico. Este órgão apresenta uma elevada permeabilidade, grande área superficial para absorção de fármacos e limitada atividade proteolítica (Sung *et al.*, 2007). Além disso, para melhorar a biodisponibilidade e impedir o metabolismo de primeira passagem (intestino e fígado) dos fármacos utilizados pela via oral pode-se mudar a via pela qual os medicamentos são usualmente administrados, empregando-se como alternativa a via pulmonar (Cruz *et al.*, 2011).

A micro e a nanotecnologia tem sido amplamente estudadas para o desenvolvimento de medicamentos utilizados pela via pulmonar, devido ao tamanho

aerodinâmico que as partículas devem apresentar ($< 5 \mu\text{m}$). Para a produção destas partículas submicrométricas, a secagem por aspersão tem sido bastante empregada (Chougule *et al.*, 2007; Bürki *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2011; Prota *et al.*, 2011; Aquino *et al.*, 2012; Beck-Broichsitter *et al.*, 2012).

Em 2009, uma nova possibilidade de secagem por aspersão foi introduzida no mercado, baseada na atomização vibracional (Nano Spray Dryer Büchi® - modelo B-90 Advanced) (Schmid *et al.*, 2009). Com este novo equipamento é possível preparar partículas submicrométricas esféricas a partir da secagem de uma solução orgânica ou aquosa (Paolo *et al.*, 2010; Schmid *et al.*, 2010; Durli *et al.*, 2013), nanoemulsão (Li *et al.*, 2010) e nanossuspensão (Beck-Broichsitter *et al.*, 2012). Além disso, nanocristais e cristais submicrométricos de fármaco podem também ser produzidos (Sun *et al.*, 2011; Martena *et al.*, 2012; Durli *et al.*, 2013). Nesta técnica é possível variar a temperatura de entrada, a taxa de saída do spray, o fluxo de ar, o modo de operação da bomba e a porosidade da membrana ($4 \mu\text{m}$, $5,5 \mu\text{m}$ e $7 \mu\text{m}$) utilizada no atomizador (Schmid *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011). Esta técnica leva à obtenção de pós com baixo teor de umidade e com alto rendimento (Durli *et al.*, 2013; Martena *et al.*, 2012).

O Nano Spray Dryer B-90 apresenta o conjunto de três novas tecnologias: a atomização vibracional através do processo piezoelétrico, que causa a vibração da membrana de atomização; o fluxo laminar de ar, que seca as gotículas que são lançadas; e o coletor de partículas finas, que capta o pó por atração eletrostática. Este eficiente coletor é composto por um eletrodo estrelado central (cátodo) e um eletrodo cilíndrico (ânodo) onde é realizada a coleta do pó com o auxílio de uma espátula. A presença de uma alta voltagem neste coletor cria um campo eletrostático que acelera a deposição das partículas carregadas negativamente sobre a parede interna do cilindro (Schmid *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011). Para a secagem de soluções orgânicas é necessário conectar o Nano Spray Dryer B-90 em uma unidade de refrigeração e captação do solvente que é evaporado (Inert Loop B-295). Além disso, para prevenção de explosão que pode ser causada pelo oxigênio e o solvente que é evaporado dentro do equipamento, o nitrogênio é utilizado como gás inerte, sendo programado para que a concentração de oxigênio não ultrapasse 4 % (Li *et al.*, 2010; Schmid *et al.*, 2010).

Recentemente, alguns trabalhos foram publicados com a preparação de pós inaláveis produzidos a partir da atomização vibracional (Bürki *et al.*, 2011; Feng *et*

al., 2011; Beck-Broichsitter *et al.*, 2012). Em 2011, Bürki e colaboradores avaliaram a possibilidade de emprego dessa técnica para produção de partículas de proteína para ser utilizada pela via pulmonar. O pó foi constituído de trealose e a β -galactosidase foi utilizada como modelo de proteína. Um desenho fatorial foi empregado para analisar as melhores condições de secagem. A distribuição do tamanho de partícula monodispersa foi obtida com a menor membrana utilizada no atomizador (4 μm). A menor temperatura de entrada (80 °C), a menor membrana de atomização e a solução com maior proporção de etanol (20 %) proporcionou alto rendimento do processo. No entanto, a estabilidade e atividade da proteína foram superiores omitindo-se a presença de etanol na solução. Neste estudo foram obtidas partículas esféricas com superfície lisa e/ou rugosa com tamanho entre 1,5 e 6 μm . No entanto, análises do comportamento aerodinâmico destas micropartículas devem ser realizadas para comprovar suas potencialidades para administração pulmonar.

Feng e colaboradores (2011) prepararam micropartículas contendo leucina e trealose através da secagem por atomização vibracional para administração pulmonar. Diferentes proporções entre estes excipientes foram testadas para analisar a influência da leucina nas características das partículas formadas. Os autores observaram que a cristalinidade da leucina aumentou quando uma maior proporção deste excipiente era adicionada na formulação, sendo que para quantidades superiores a 25 % não foi observada região amorfa nas partículas. Além disso, o aumento na concentração de leucina levou à formação de partículas menos esféricas, porosas e com menor diâmetro aerodinâmico.

A poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um polímero hidrofóbico, biocompatível, biodegradável, semicristalino e com lenta degradação. Este polímero é empregado em diferentes formulações micro e nanoestruturadas preparadas por secagem por aspersão (Sinha *et al.*, 2004). Apesar disso, somente o polímero poli(ácido lactídeo-co-ácido glicolídeo) (PLGA) foi explorado até o momento na produção de partículas submicrométricas poliméricas por atomização vibracional (Beck-Broichsitter *et al.*, 2012; Schafroth *et al.*, 2012).

Beck-Broichsitter e colaboradores (2012) prepararam, empregando esta técnica, partículas poliméricas de sildenafil a partir de uma solução orgânica contendo PLGA e também de uma nanossuspensão de PLGA. Ambas as formulações apresentaram diâmetros aerodinâmicos adequados para administração pulmonar ($\leq 4 \mu\text{m}$). No entanto, as partículas esféricas com superfície lisa, que foram

secas a partir da solução orgânica, demonstraram um maior controle de liberação do fármaco do que as partículas esféricas rugosas que foram secas a partir da nanossuspensão aquosa.

Neste trabalho de tese, foi proposto o desenvolvimento de formulações para uso pulmonar contendo dexametasona. Embora atualmente não existam formulações comerciais para administração pulmonar de dexametasona, recentemente, em um estudo *in vitro*, este fármaco demonstrou potencial para reduzir a inflamação utilizando células epiteliais de fibrose cística (Rebeyrol *et al.*, 2012) e também regulou, *in vivo*, a expressão de fatores inflamatórios no pulmão (Yubero *et al.*, 2012). A dexametasona (Figura 2) é um glicocorticoide sintético utilizado como anti-inflamatório no tratamento de inflamações agudas e crônicas pela via oral, tópica, intravenosa e intramuscular (Goodman & Gilman, 2007).

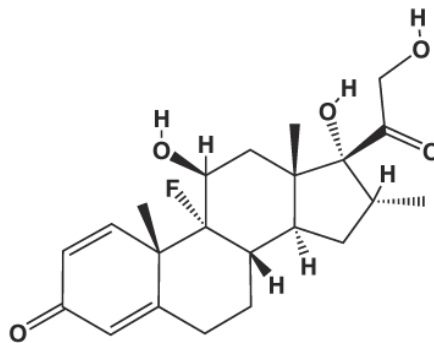


Figura 2. Estrutura química da dexametasona (C₂₂H₂₉FO₅).

Em 2012, Schafroth e colaboradores prepararam nano e micropartículas de PLGA contendo fármacos insolúveis em água (ciclosporina e dexametasona) através da atomização vibracional. Estas partículas apresentaram formato esférico, superfície porosa, tamanho de partícula inferior a 2,5 µm e rendimento de processo máximo de 55 %. Os autores observaram que a ciclosporina está molecularmente dispersa na rede polimérica, enquanto a dexametasona está presente nas partículas no estado cristalino. Neste estudo foi demonstrado o controle de liberação da dexametasona a partir das partículas de PLGA, entretanto não foi proposta uma aplicação farmacêutica desta formulação. Além disso, assim como não existem formulações comerciais, não existem trabalhos publicados visando à preparação de formulações contendo dexametasona para serem administradas pela via pulmonar. Considerando o cloridrato de raloxifeno, outro fármaco estudado nesse trabalho de

tese, foi observado que a sua administração pela via pulmonar ainda não foi explorada, pois não foram encontrados relatos na literatura científica.

Implante subcutâneo

Assim como a administração pulmonar, o uso de implantes subcutâneos biodegradáveis também representa uma alternativa para os fármacos com baixa biodisponibilidade oral ou para a manutenção da concentração sistêmica do fármaco por tempo prolongado (Aqil *et al.*, 2012; Solano *et al.*, 2013). Neste contexto, a PCL é um polímero amplamente empregado na preparação de implantes subcutâneos com liberação sustentada de ativos (Fialho *et al.*, 2008; Aqil *et al.*, 2012) devido a sua lenta biodegradação e formando um sistema matricial que promove a liberação modificada dos fármacos por períodos prolongados (Sinha *et al.*, 2004; Villanova *et al.*, 2010).

Os implante podem ser preparados por liofilização seguido de compressão (Fialho *et al.*, 2008), pela evaporação do solvente presente da solução que contém os constituintes da formulação e posterior extrusão em molde (Aqil *et al.*, 2012), pela fusão das substâncias com posterior resfriamento dentro de um molde (Cheng *et al.*, 2009; Hiremath *et al.*, 2011; Hiremath *et al.*, 2013; Solano *et al.*, 2013) e por extrusão por fusão (*melt extrusion*) (Hiremath and Devi, 2011). A liberação do fármaco a partir do implante pode ocorrer através da erosão da matriz, difusão do fármaco ou pela combinação destes mecanismos (Solano *et al.*, 2013).

Aqil e colaboradores (2012) produziram implantes de poli(ϵ -caprolactona) contendo quimiopreventivos de baixa biodisponibilidade oral. Estes ativos foram detectados por fluorescência em alguns órgãos (pulmão, fígado e cérebro), demonstrando que a manutenção dos níveis sistêmicos possibilitou a absorção dos ativos pelos órgãos analisados. Além disso, os implantes são também estudados para a terapia hormonal, possibilitando uma sustentada concentração sérica e ação nos tecidos que possuem receptores de estrogênio, podendo reduzir a incidência de câncer de mama (Glaser e Dimitrakakis, 2013; Glaser *et al.*, 2013). No entanto, na literatura não foram encontrados relatos do desenvolvimento de implantes subcutaneous visando o controle sustentado da concentração sistêmica da dexametasona e do raloxifeno.

CAPÍTULO 1: Controlled release of raloxifene by nanoencapsulation: effect on *in vitro* antiproliferative activity of human breast cancer cells

ABSTRACT

Raloxifene hydrochloride (RH) is considered as an antiproliferative agent on mammary tissue. The aim of this study was to investigate the effect of the encapsulation of RH in polymeric nanocapsules with anionic or cationic surface on its release profile and antiproliferative activity. They were prepared followed by a wide physicochemical characterization and *in vitro* RH release was assessed. The antiproliferative effect on MCF-7 cell viability was investigated by the MTT assay and via counting viable cells. They had high encapsulation efficiency, low polydispersity and nanometric mean size. Nanocapsules prepared with Eudragit RS100 and Eudragit S100 presented positive and negative zeta potential. Drug release studies demonstrated a RH controlled release from anionic nanocapsules which could be explained due to a stronger interaction of the drug to these nanocapsules and the higher amount of entrapped drug. On the other hand, this control was not observed from cationic nanocapsules. MCF-7 cell viability studies and counting cell showed that RH-loaded Eudragit RS100 nanocapsules promote the best antiproliferative activity after 24 hours of treatment, whereas the best activity was observed for RH-loaded Eudragit S100 nanocapsules after 72 hours. Furthermore, the combined treatment of these formulations improved the antiproliferative effect during the entire treatment.

Keywords: raloxifene, polymeric nanocapsules, physicochemical characterization, drug control release, antiproliferative effect, MCF-7.

Parte 1: Piezoelectric atomizing spray-dryer to convert liquids to dry powders:
operational parameters and formulation characteristics

Capítulo publicado no livro: **Advances in Nanotechnology and Applications**.
Editado por H.T. Tran & G Pillai. Publicado por CENTERA (Center for
Nanotechnology Education Research and Applications), Louisville, Kentucky, USA.
Volume 4, Capítulo 7, páginas 105-131, setembro de 2012.

Parte 2: Polymeric controlled release inhalable powder produced by vibrational spray-drying: one-step preparation and *in vitro* lung deposition

Abstract

Innovative polymeric controlled release inhalable dry powders containing dexamethasone were developed for the treatment of pulmonary diseases. Powders were prepared in one step by vibrational atomization spray-drying using an organic solution containing dexamethasone, poly(ϵ -caprolactone) and a surfactant. The characteristics of the powders were monitored considering the drug content, morphological features, mean particle size, drug-polymer-surfactant compatibility and physical state. *In vitro* dexamethasone release was studied applying the dialysis bag method. The dose uniformity of the powders, their aerodynamic properties and the *in vitro* lung deposition was evaluated using a Dosage Unit Sampling Apparatus and Andersen Cascade Impactor. The powders had a high yield (65 - 80 %), drug content between 170 - 880 mg.g⁻¹ and high encapsulation rate (93 - 97 %). All formulations had spherical particles with a rough surface and the primary mean particle size was around 1.00 μ m. The formulation prepared with the lowest amount of polymer led to a more symmetric primary particle size distribution and an efficient deagglomeration behavior. The powders exhibited dexamethasone crystallinity and no interaction between the drug and other excipients was evidenced. Dexamethasone release from the powders followed the biexponential model. The lowest drug:polymer ratio led to the best controlled release of the drug. Furthermore, the powders showed dose uniformity close to 100%, a mass median aerodynamic diameter lower than 5 μ m and fine particle fraction between 59% and 62%. These polymeric submicrometer powders can be recommended as a platform for the production of new controlled release systems for pulmonary administration.

Keywords: controlled release, dexamethasone, poly(ϵ -caprolactone), pulmonary deposition, submicrometer powders, vibrational atomization spray-drying.

Parte 3: Development of raloxifene hydrochloride submicron particles for pulmonary administration by vibrational atomization spray-drying

Abstract

Raloxifene hydrochloride (RH) is used for treatment of osteoporosis, but it has low oral bioavailability. In this work, vibrational atomization spray-drying nanoparticles containing RH were developed for pulmonary administration intended to prevent the first-pass metabolism. Powders showed low moisture (< 2%), high yield (> 80 %), drug content close to their theoretical value (440 - 890 mg.g⁻¹), high encapsulation rate (> 95 %), nanometric mean size and spherical shape with smooth surface. RH was converted from crystalline to amorphous state after the spray-drying and drug is molecularly dispersed in the semicrystalline polymeric matrix. Controlled drug release profile was observed for formulation containing polymer. Powders presented dose uniformity (95 - 100 %), high respirable fraction (> 60 %) and adequate mass median aerodynamic diameter for pulmonary delivery (< 5 μm). Spray-dried nanoparticles have a potential as lung RH delivery system, being candidates for nanomedicines using new route of administration.

Keywords: raloxifene hydrochloride, poly(ε-caprolactone), controlled release, pulmonary administration, spray-drying.

Parte 4: Polymeric subcutaneous implant to raloxifene hydrochloride sustained
delivery: development and characterization

Abstract

Biodegradable subcutaneous implant containing raloxifene hydrochloride (RH) was produced after manual compression of spray-drying particles aiming to prevent its first-pass metabolism. The implant was based on the presence of poly(ϵ -caprolactone), as polymer and caprylic/capric triglyceride mixture, as oil, to promote the controlled drug release. The powder was prepared by the vibrational spray-drying technique and had high yield (90.43 ± 1.22 %), drug content of 286.76 ± 1.27 mg.g⁻¹, mean particle size of 870 ± 266 nm, irregular and spherical shape with smooth surface particles. The X-ray diffraction showed that RH was in the amorphous state dispersed in the semicrystalline polymeric matrix. Using this powder, a greenish yellow implant with hydrophobic matrix (4 mm x 1 mm) was produced with mean weight of 9.73 ± 0.15 mg and drug content of 2.65 ± 0.06 mg. Images from scanning electron microscopy showed the integrity of the particles on the surface and inner compartment after compression. *In vitro* drug release study showed that a polymeric matrix was responsible for the RH controlled release for 24 days. The drug release was explained by the diffusion of RH and erosion of the polymer, according to the Korsmeyer-Peppas model. After the release study changes occur in the morphology of the implant, as cracks, channels and a higher porosity, probably due to polymer erosion. Hence, the biodegradable implant has potential as candidates for RH medicines using new routes of administration to avoid its first-pass metabolism and to prolong its systemic circulation.

Keywords: raloxifene hydrochloride, controlled release, poly(ϵ -caprolactone), spray-drying, subcutaneous implant.

Capítulo 3: Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV para quantificação do cloridrato de raloxifeno em plasma de ratos e sua aplicação para o estudo farmacocinético

Resumo

Um método simples, exato e preciso por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por UV, foi desenvolvido e validado para a quantificação do cloridrato de raloxifeno (CR) em plasma de ratos, usando a dexametasona como padrão interno (PI). O método foi validado de acordo com as diretrizes internacionais contemplando, linearidade, limite de quantificação, especificidade, precisão, exatidão e estabilidade. O fármaco foi extraído do plasma através da extração líquido-líquido, e analisado utilizando coluna C-18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm, 110Å), fase móvel constituída de ACN:tampão acetato de amônio 0,05 M pH 4,0 à 1 ml/min, volume de injeção de 40 µl e detecção em 287 nm. Os tempos de retenção para CR e PI foram aproximadamente 11 e 14 min, respectivamente. O limite inferior de quantificação foi de 25 ng/mL e as curvas de calibração foram lineares na faixa de concentração de 25 - 1000 ng/mL. As precisões intra e inter-dia, expressas pelos desvios-padrão relativos (DPR) foram menores do que 10% e 15 %, respectivamente. A razão de área do pico do analito e PI foi utilizada para a quantificação das amostras de plasma. A recuperação CR a partir do plasma foi maior que 90 %. A estabilidade do fármaco no plasma foi demonstrada à temperatura ambiente (6 horas), depois de processadas no auto-injetor (6 horas), após três ciclos de congelamento e descongelamento e após armazenagem de longa duração sob congelamento a -80 °C (45 dias). O novo método apresenta como vantagens o baixo limite de quantificação e a estabilidade em diferentes condições, sendo adequado para ser utilizado em estudos farmacocinéticos que necessitem a quantificação de concentrações muito baixas do fármaco no plasma. A aplicabilidade do método desenvolvido foi confirmada pela análise bem sucedida dos níveis plasmáticos do cloridrato de raloxifeno em um estudo farmacocinético, após sua administração intravenosa em ratos (5 mg/kg).

Palavras-chave: raloxifeno, cromatografia líquida, plasma, biodisponibilidade, farmacocinética.

REFERÊNCIAS

Almeida, J.S.; Jezur, L.; Fontana, M.C.; Paese, K.; Silva, C.B.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S.; Beck, R.C.R. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 165-172, 2009.

Almeida, J.S.; Lima, F.; Da Ros, S.; Bulhões, L.O.S.; Carvalho, L.M.; Beck, R.C.R. Nanostructured systems containing rutin: *in vitro* antioxidant activity and photostability studies. **Nanoscale Research Letters**, v. 5, p. 1603-1610, 2010.

Aqil, F.; Jeyabalan, J.; Kausar, H.; Bansal, S.S.; Sharma, R.J.; Singh, I.P.; Vadhanam, M.V.; Gupta, R.C. Multi-layer polymeric implants for sustained release of chemopreventives. **Cancer Letters**, 2012, *in press*.

Aquino, R.P.; Prota, L.; Auriemma, G.; Santoro, A.; Mencherini, T.; Colombo, G.; Russo, P. Dry powder inhalers of gentamicin and leucine: formulation parameters, aerosol performance and *in vitro* toxicity on CuFi1 cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, p. 100-107, 2012.

Balasubramaniam, J.; Rajesh, Y.; Bindu, K.; Hemalatha, T.; Swetha, M.; Rao, V.U. Enhanced Dissolution and Bioavailability of Raloxifene Hydrochloride by Co-grinding with Different Superdisintegrants. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, p. 293-300, 2010.

Bayrak, E.; Lambrecht, F.Y.; Durkan, K.; Yilmaz, O. *In vitro* evaluation, biodistribution in rats of radiolabeled raloxifene. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 68, p. 33-36, 2010.

Beck, R.C.R.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S. Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, p. 499-512, 2004.

Beck, R.C.R.; Pohlmann, A.R.; Benvenuti, E.V.; Dalla-Costa, T.; Guterres, S.S.; Nanostructure-coated diclofenac-loaded microparticles: preparation, morphological, characterization, *in vitro* release and *in vivo* gastrointestinal tolerance. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1233-1240, 2005.

Beck, R.C.R.; Haas, S.E.; Guterres, S.S.; Re, M.I.; Benvenuti, E.V.; Pohlmann, A.R. Nanoparticle-coated organic-inorganic microparticles: experimental design and gastrointestinal tolerance evaluation. **Química Nova**, v. 29, p. 990-996, 2006.

Beck, R.C.R.; Pohlmann, A.R.; Hoffmeister, C.; Gallas, M.R.; Collnot, E.; Schaefer, U.F.; Guterres, S.S.; Lehr, C.M. Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: correlation between *in vitro* drug release and drug transport across caco-2 cell monolayers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 18-30, 2007.

Beck-Broichsitter, M.; Schweiger, C.; Schmehl, T.; Gessler, T.; Seeger, W.; Kissel, T. Characterization of novel spray-dried polymeric particles for controlled pulmonary drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 158, p. 329-335, 2012.

Berkower, C.L.; Johnson, N.M. Longdo, S.B.; McGusty-Robinson, S.O.; Semenkow, S.L.; Margulies, B.J. Silicone-acyclovir controlled release devices suppress primary herpes simplex virus-2 and varicella zoster virus infections in vitro. **Advances in Pharmacological Sciences**, 2013, *in press*.

Bernardi, A.; Zilberstein, A.C.C.V.; Jäger, E.; Campos, M.M.; Morrone, F.B.; Calixto, J.B.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S.; Battastini, A.M.O. Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, p. 1104-1111, 2009.

Bikiaris, D.; Karavelidis, V.; Karavas, E. Novel biodegradable polyesters. Synthesis and application as drug carriers for the preparation of raloxifene HCl loaded nanoparticles. **Molecules**, v. 14, p. 2410-2430, 2009.

Bürki, K.; Jeon, I.; Arpagaus, C.; Betz, G. New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, p. 248-256, 2011.

Cattani, V.B.; Fiel, L.A.; Jäger, A.; Jäger, E.; Colomé, L.M.; Uchoa, F.; Stefani, V.; Dalla Costa, T.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R. Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, p. 116-124, 2010.

Chen, Y.; Jia, X.; Chen, J.; Wang, J.; Hu, M. The pharmacokinetics of raloxifene and its interaction with apigenin in rat. **Molecules**, v. 15, p. 8478-8487, 2010.

Cheng, L.; Guo, S.; Wu, W. Characterization and *in vitro* release of praziquantel from poly(ϵ -caprolactone) implants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, p. 112-119, 2009.

Chougule, M.; Padhi, B.; Misra, A. Nano-liposomal dry powder inhaler of tacrolimus: preparation, characterization, and pulmonary pharmacokinetics, **International Journal of Nanomedicine**, v. 2, p. 675-688, 2007.

Chougule, M.; Padhi, B.; Misra, A. Development of spray-dried liposomal dry powder inhaler of dapsons. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 9, p. 47-53, 2008.

Contri, R.V.; Kaiser, M.; Poletto, F.S.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S. Simultaneous control of capsaicinoids release from polymeric nanocapsules. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, p. 2398-2406, 2011.

Cruz, L.; Fattal, E.; Tasso, L.; Freitas, G.C.; Carregaro, A.B.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R.; Tsapis, N. Formulation and *in vivo* evaluation of sodium alendronate spray-dried microparticles intended for lung delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 152, p. 370-375, 2011.

Dai, X.; Wu, J. Selective estrogen receptor modulator: raloxifene. **Journal of Reproduction & Contraception**, v. 22, p. 51-60, 2011.

Durli, T.L.; Dimer, F.A.; Fontana, M.C.; Pohlmann, A.R.; Beck, R.C.R.; Guterres, S.S. *in press*. Innovative approach to produce submicron drug particles by vibrational atomization spray drying: influence of the type of solvent and surfactant. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, *in press*.

Elsheikh, M.A.; Elnaggar, Y.S.R.; Gohar, E.Y.; Abdallah, O.Y. Nanoemulsion liquid preconcentrates for raloxifene hydrochloride: optimization and *in vivo* appraisal. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 3878-3802, 2012.

European Legislation, Official Journal of the European Union, v. 54, 2011.

Feng, A.L.; Boraey, M.A.; Gwin, M.A.; Finlay, P.R.; Kuehl, P.J.; Vehring, R. Mechanistic models facilitate efficient development of leucine containing microparticles for pulmonary drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 409, p. 156-163, 2011.

Fialho, S.L.; Behar-Cohen, F.; Silva-Cunha, A. Dexamethasone-loaded poly(ϵ -caprolactone) intravitreal implants: A pilot study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 637-646, 2008.

Flores, F.C.; Ribeiro, R.F.; Ourique, A.F.; Pohlmann, A.R.; Beck, R.C.R.; Guterres, S.S.; Rolim, C.M.B.; Silva, C.B. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, p. 968-972, 2011.

Fontana, M.C.; Coradini, K.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R.; Beck, R.C.R. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 254-263, 2009.

Fontana, M.C.; Coradini, K.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S.; Beck, R.C.R. Nanocapsules prepared from amorphous polyesters: effect on the physicochemical characteristics, drug release, and photostability. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, p. 3091-3099, 2010.

Fontana, M.C.; Rezer, J.F.P.; Coradini, K.; Leal, D.B.R.; Beck, R.C.R. Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, p. 241-249, 2011.

Friedrich, R.B.; Fontana, M.C.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S.; Beck, R.C.R. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. **Química Nova**, v. 31, p. 1131-1136, 2008.

Frezza, R.L.; Bernardi, A.; Paese, K.; Hoppe, J.B.; Silva, T.; Battastini, A.M.O.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S.; Salbego, C. Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, p. 694-703, 2010.

Glaser, R.L.; Dimitrakakis, C. Reduced breast cancer incidence in women treated with subcutaneous testosterone, or testosterone with anastrozole: a prospective, observational study. **Maturitas**, 2013, *in press*.

Glaser, R.; Kalantaridou, S.; Dimitrakakis, C. Testosterone implants in women: pharmacological dosing for a physiologic effect. **Maturitas**, v. 74, p. 179-184, 2013.

Goodman & Gilman. Gilman, A. G.; Rall, T. W.; Nies, A. S.; Taylor, P. As bases farmacológicas da terapêutica, 11th edition. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007.

Guterres, S.S.; Müller, C.R.; Michalowski, C.B.; Pohlmann, A.R.; Dalla Costa, T. Gastro-intestinal tolerance following oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. **S.T.P. Pharma Sciences**, v. 11, p. 229-233, 2001.

Haas, S.E.; Bettoni, C.C.; Oliveira, L.K.; Guterres, S.S.; Dalla Costa, T. Nanoencapsulation increases quinine antimalarial efficacy against *Plasmodium berghei* in vivo. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, p. 156-161, 2009.

Hiremath, J.G. and Devi, V.K. Preparation and *in vitro* characterization of poly (epsilon-caprolactone)-based tamoxifen citrate-loaded cylindrical subdermal implant for breast cancer. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 5, p. 9-14, 2011.

Hiremath, J.G.; Patel, P.B.; Aitha, R.K.; Mura, P.; Palavalli, G.S. Characterization of cylindrical and strip-shaped tamoxifen citrate-loaded biodegradable implants. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 5, p. 209-214, 2011.

Hiremath, J.G.; Khamar, N.S.; Palavalli, S.G.; Rudani, C.G.; Aitha, R.; Mura, P. Paclitaxel loaded Carrier based biodegradable polymeric implants: preparation and *in vitro* characterization. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 85-91, 2013.

Hochner-Celnikier, D. Pharmacokinetics of raloxifene and its clinical application. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 85, p. 23-29, 1999.

Hodges-Gallagher, L.; Valentine, C.D.; Bader, S.E.; Kushner, P.J. Estrogen receptor beta increases the efficacy of antiestrogens by effects on apoptosis and cell cycling in breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 109, p. 241-250, 2008.

Hoffmeister, C.R.D.; Durli, T.L.; Schaffazick, S.R.; Raffin, R.P.; Bender, E.A.; Beck, R.C.R.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, p. 1-24, 2012.

Jaques, J.A.S.; Rezer, J.F.P.; Ruchel, J.B.; Souza, V.C.G.; Pinheiro, K.V.; Schlemmer, K.B.; Schlemmer, J.B.; Bertoldo, T.M.D.; Martins, N.M.B.; Bertoncheli, C.M.; Fontana, M.C.; Beck, R.C.R.; Leal, D.B.R. An experimental model of contact dermatitis evaluation of the oxidative profile of Wistar rats treated with free and nanoencapsulated clobetasol. **Redox Report** (Edinburgh), 2012, *in press*.

Jeong, E.J.; Liu, Y.; Lin, H.; Hu, M. Species- and disposition model-dependent metabolism of raloxifene in gut and liver: role of UGT1a10, **Drug Metabolism and Disposition**, v. 33, p. 785-794, 2005.

Jha, R.K.; Tiwari, S.; Mishra, B. Bioadhesive microspheres for bioavailability enhancement of raloxifene hydrochloride: formulation and pharmacokinetic evaluation. **American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech**, v. 12, p. 650-657, 2011.

Kayath, M.J. Raloxifeno e osteoporose: revisão de um novo modulador seletivo do receptor de estrógeno. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabologia**, v. 43, p. 433-441, 1999.

Keshavarz, A.; Karimi-Sabet, K.; Fattahi, A.; Golzary, A.; Rafiee-Tehrani, M.; Dorkoosh, F.A. Preparation and characterization of raloxifene nanoparticles using Rapid Expansion of Supercritical Solution (RESS). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 63, p. 169-179, 2012.

Kumari, A.; Yadav, S.K.; Yadav, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 1-18, 2010.

Lee, S.H.; Heng, D.; Ng, W.K.; Chan, H.; Tan, R.B.H. Nano spray-drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, p. 192-200, 2011.

Lee, W.L.; Chao, H.T.; Cheng, M.H.; Wang, P.H. Rationale for using raloxifene to prevent both osteoporosis and breast cancer in postmenopausal women. **Maturitas**, v. 60, p. 92-107, 2008.

Li, X.; Anton, N.; Arpagaus, C.; Belleiteix, F.; Vandamme, T.F. Nanoparticles by spray-drying using innovative new technology: the Büchi Nano Spray Dryer B-90. **Journal of Controlled Release**, v. 147, p. 304-310, 2010.

Liu, H.; Lee, E.S.; Gajdos, C.; Pearce, S.T.; Chen, B.; Osipo, C.; Loweth, J.; McKian, K.; De Los Reyes, A.; Wing, L.; Jordan, V.C. Apoptotic action of 17 β -estradiol in raloxifene-resistant MCF-7 cells *in vitro* and *in vivo*. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, p. 1586-1597, 2003.

Marchiori, M.C.L.; Ourique, A.F.; Silva, C. B.; Raffin, R.P.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S.; Beck, R.C.R. Spray-dried powders containing tretinoin-loaded engineered lipid-core nanocapsules: development and photostability study. **Journal Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, p. 2059-2067, 2012.

Martena, V.; Censi, R.; Hoti, E.; Malaj, L.; Martino, P.D. A new nanospray-drying method for the preparation of nicergoline pure nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, p. 934-944, 2012.

Morello, K.C.; Wurz, G.T.; DeGregorio, M.W. Pharmacokinetics of selective estrogen receptor modulators. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, p. 361-372, 2003.

Oh, M.J.; Shim, J.B.; Yoo, H.; Lee, G.Y.; Jo, H.; Jeong, S.M.; Yuk, S.H.; Lee, D.; Khang, G. The dissolution property of raloxifene HCl solid dispersion using hydroxypropyl methylcellulose. **Macromolecular Research**, 2012, *in press*.

Ourique, A.F.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S.; Beck, R.C.R. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 1-4, 2008.

Paolo, B.; Aurélie, S.; Stefano, G.; Carlo, R.; Maurizio, R. Alginate micro- and nanoparticle production by spray-drying. Meeting on lactose as a carrier for inhalation products, 26-28 September 2010, Parma, Italy, Abstract book, p. 137-138, 2010.

Patel, B.D.; Modi, R.V.; Thakkar, N.A.; Patel, A.A.; Thakkar, P.H. Development and characterization of solid lipid nanoparticles for enhancement of oral bioavailability of Raloxifene. **Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences**, v. 4, p. 14-16, 2012.

Prota, L.; Santoro, A.; Bifulco, M.; Aquino, R.P.; Mencherini, T.; Russo, P. Leucine enhances aerosol performance of naringin dry powder and its activity on cystic fibrosis airway epithelial cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 412, p. 8-19, 2011.

Rebeyrol, C.; Saint-Criq, V.; Guillot, L.; Riffault, L.; Corvol, H.; Chadelat, K.; Ray, D.W.; Clement, A.; Tabary, O.; Rouzic, P.L. Glucocorticoids reduce inflammation in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. **Cellular Signalling**, v. 24, p. 1093-1099, 2012.

Schaffazick, S.R.; Pohlmann, A.R.; Dalla Costa, T.; Guterres, S.S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 501-505, 2003.

Schaffazick, S.R.; Pohlmann, A.R.; Cordova, C.A.S.; Creczynski-Pasa, T.B.; Guterres, S.S. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, p. 209-213, 2005.

Schaffazick, S.R.; Pohlmann, A.R.; Mezzalana, G.; Guterres, S.S. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 562-569, 2006.

Schafroth, N.; Arpagaus, C.; Jadhava, U.Y.; Maknea, S.; Douroumis, D. Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 8-15, 2012.

Schmid, K.; Arpagaus, C.; Friess, W. Evaluation of a Vibrating Mesh Spray Dryer for Preparation of Submicron Particles. **Respiratory Drug Delivery Europe**, p. 323-326, 2009.

Schmid, K.; Arpagaus, C.; Friess, W. Evaluation of the Nano Spray Dryer B-90 for pharmaceutical applications. **Pharmaceutical Development and Technology**, p. 1-8, 2010.

Sinha, V.R.; Bansal, K.; Kaushik, R.; Kumria, R.; Trehan, A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1-23, 2004.

Solano, A.G.R.; Pereira, A.F.; Pinto, F.C.H. Development and evaluation of sustained-release etoposide-loaded poly(ϵ -caprolactone) implants. **American Association of Pharmaceutical Scientists Pharmaceutical Science Technology**, v. 14, 890-900, 2013.

Sookvanichsilp, N. and Boonleang, C. Alendronate, raloxifene and tibolone inhibit the proliferation-stimulating activity of 17β -estradiol in MCF-7 cells. **Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, p. 55-65, 2005.

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.

Sun, Y.; Song, X.; Wang, J.; Yu, J. Preparation of lithium carbonate hollow spheres by spray pyrolysis. **Crystal Research and Technology**, v. 46, p. 173-177, 2011.

Sung, J.C.; Pulliam, B.L.; Edwards, D.A. Nanoparticles for drug delivery to the lungs, *Trends Biotechnology*, v. 25, p. 563-570, 2007.

Teeter, J.S. and Meyerhoff, R.D. Environmental fate and chemistry of raloxifene hydrochloride. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.31, p. 729-736, 2002.

Tu, Z.; Li, H.; Ma, Y.; Tang, B.; Tian, J.; Akers, W.; Achilefu, S.; Gu, Y. The enhanced antiproliferative response to combined treatment of trichostatin A with raloxifene in

MCF-7 breast cancer cells and its relevance to estrogen receptor β expression. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 366, p. 111-122, 2012.

Villanova, J.C.O.; Oréfice, R.L.; Cunha, A.S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, p. 51-64, 2010.

Vilos C. and Velasquez L.A. Therapeutics strategies based on polymeric microparticles. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, ID 672760, p. 1-9, 2012.

Wempe, M.F.; Wachter, V.J.; Ruble, K.M.; Ramsey, M.G.; Edgar, K.J.; Buchanan, N.L.; Buchanan, C.M. Pharmacokinetics of raloxifene in male Wistar–Hannover rats: Influence of complexation with hydroxybutenyl-beta-cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, p. 25-37, 2008.

Yubero, S.; Manso, M.A.; Ramudo, L.; Vicente, S.; Dios, I.D. Dexamethasone down-regulates the inflammatory mediators but fails to reduce the tissue injury in the lung of acute pancreatitis rat models. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, p. 319-324, 2012.

Projeto: 22226 - Avaliação do perfil farmacocinético do cloridrato de raloxifeno nanoparticulado

Prezado Pesquisador RUY CARLOS RUYER BECK,

Informamos que o projeto de pesquisa “*Avaliação do perfil farmacocinético do cloridrato de raloxifeno nanoparticulado*”, encaminhado para análise em 02/02/2012, foi aprovado pela Comissão de ética no Uso de Animais com o seguinte parecer:

Parecer reunião: 26/03/2012

O projeto tem como objetivo desenvolver suspensões de nanopartículas de Eudragit RS100 e Eudragit S100 contendo cloridrato de raloxifeno, avaliando características físico-químicas; desenvolver um pó nanoparticulado contendo cloridrato de raloxifeno pela técnica de secagem por aspersão em Nano Spray Dryer. Avaliar a farmacocinética plasmática do cloridrato de raloxifeno nanoparticulado em ratos Wistar preparado em Nano Spray Dryer, após administração intratraqueal e avaliar a farmacocinética plasmática do cloridrato de raloxifeno nanoparticulado (nanocápsulas de Eudragit RS100, nanocapsulas de Eudragit S100 e pó nanoparticulado), para determinação dos parâmetros farmacocinéticos nesses animais, após administração oral. O projeto está bem delineado, baseado em literatura recente e experiência do grupo de pesquisadores. O manejo dos animais está adequado à legislação vigente, o número amostral foi calculado e será desenvolvido um projeto piloto para confirmá-lo. O grau de severidade para cada procedimento foi atribuído. O descarte de resíduos químicos e biológicos está adequado às normas da UFRGS. Recomendamos que o presente projeto seja aprovado com base na Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794 (08.10.2008).

CEUA/UFRGS

Atenciosamente,
Comissão de ética no Uso de Animais