

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

Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo saquinavir planejadas para administração oral

JULIANA EMANUELLI

Porto Alegre, 2015.

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

Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo saquinavir planejadas para administração oral

Dissertação apresentada
por **Juliana Emanuelli**
para obtenção do GRAU
DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Irene Clemes Kulkamp Guerreiro

Coorientadora: Profa. Dra. Bibiana Verlindo de Araújo

Porto Alegre, 2015.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de mestrado acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26.03.2015, pela banca examinadora constituída por:

Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. José Ângelo Zuanazzi

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Renata Vidor Contri

Unidade Integrada Vale do Taquari de Ensino Superior

Emanuelli, Juliana

Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo saquinavir planejadas para administração oral / Juliana Emanuelli. -- 2015. 130 f.

Orientadora: Irene Cledes Kulkamp Guerreiro.

Coorientadora: Bibiana Verlindo De Araújo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Nanocápsulas. 2. Saquinavir. 3. Administração oral. I. Guerreiro, Irene Cledes Kulkamp, orient. II. De Araújo, Bibiana Verlindo, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 307 e 405 da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aos meus queridos pais, dedico...

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

(Marcel Proust)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Irene Cledes Külkamp Guerreiro pela oportunidade concedida, orientação, amizade, confiança e ensinamentos.

Aos professores Louise Seixas, Miriam Anders Apel, Andreas Sebastian Loureiro Mendez, pela companhia, palavras de incentivo e auxílio.

À Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres e à Profa. Dra. Adriana Pohlmann por conceder os equipamentos necessários à realização deste trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos concedidos.

À Professora Dra. Bibiana Verlindo de Araújo e à Profa. Dra. Andréia Buffon pelo auxílio durante a realização deste trabalho.

Ao Stanley Bilatto e Daniel Souza Correa pelo auxílio nos experimentos da língua eletrônica.

À UFRGS e ao PPGCF-UFRGS pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos amigos João Vítor Laureano, Júlia Willing, João Guilherme, Rodrigo Cé, Fernando Carreño, Joana Forgearini, Renata Daudt, Gregory Svetlichny, Mariana Domingues Bianchin, Cecília Michalowski, Karina Paese, Renata Contri e Natália Mendonça pela amizade e auxílio com os experimentos.

À Profa. Dra. Renata Contri pelos ensinamentos, amizade e auxílio durante o estágio docente.

Às bolsistas Viviane Pagnussat e Katherine Krieser pelo auxílio, amizade, ensinamentos, apoio e momentos de descontração.

Às amigas Clarice Machado, Pricila Pflüger, Natália Panno, Natália Giordani, Milene Zilio pelos momentos de diversão e palavras de incentivo.

Aos colegas de Pós-Graduação pela amizade, carinho e pelos momentos de diversão em especial, Lucélia Albarello Balestrin, Silvana Baréa, Fernando Carreño, Rafael Von Borowski, João Guilherme De Marqui e Natália Mendonça.

À grande amiga Thaís Franciele Maito pela amizade, auxílio com o trabalho, pelo companheirismo de todos os dias, por estar sempre disposta a me ajudar, pelos momentos de diversão e apoio durante os momentos difíceis.

Às minhas tias Jurema e Elimor, pelo carinho, momentos de diversão, auxílio e palavras de incentivo.

Ao meu companheiro Rômulo Edler pelo amor, amizade, confiança e acima de tudo pela paciência que demonstrou durante a realização deste trabalho.

À minha família, em especial ao meu pai Júlio, minha mãe Gelci e meus irmãos Caroline, Luis e Rafaela que souberam compreender meus momentos de ausência, que sempre estiveram ao meu lado auxiliando com palavras de incentivo e pelo amor incondicional.

À empresa Cristália pelo fornecimento de saquinavir base.

À Deus por ter me concedido força, serenidade e equilíbrio nos momentos em que mais precisei.

À todas as pessoas que participaram diretamente ou indiretamente na realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento CAPES, FAPERGS e CNPq pelo financiamento deste trabalho.

RESUMO

Saquinavir é um medicamento antirretroviral desenvolvido para inibir a protease do vírus da imunodeficiência humana. Este fármaco apresenta várias limitações em função dos seus efeitos colaterais, baixa biodisponibilidade e sensorial não agradável. A nanoencapsulação de fármacos é uma técnica promissora para superar esses problemas. O objetivo deste trabalho é desenvolver suspensões aquosas de nanocápsulas poliméricas contendo saquinavir utilizando uma mistura de poli- ϵ -caprolactona (PCL) e poli- ϵ -caprolactone triol (PCL-T) visando uma formulação líquida adequada para o tratamento de crianças infectadas. As nanocápsulas foram preparadas pela técnica de deposição interfacial de polímeros pré-formados. A análise de diâmetro médio de partícula foi realizada por diferentes técnicas, difração a laser, dispersão de luz dinâmica e análise de rastreamento de nanopartículas. O potencial zeta foi determinado por mobilidade eletroforética, o pH por potenciometria e o teor de fármaco e a taxa de encapsulação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta. O ensaio de liberação *in vitro* foi realizado com membrana de diálise e coleta das amostras nos intervalos de 0-120 horas, a 37°C. A estabilidade foi verificada nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 dias, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente e com o monitoramento do pH, potencial zeta, diâmetro, teor de fármaco e através da análise de retroespalhamento de luz. A morfologia foi observada por microscopia eletrônica de transmissão. A citotoxicidade em linfócitos T humano foi determinada pelo teste de exclusão de azul de tripan e o mascaramento do sabor de saquinavir pela língua eletrônica. Todas as formulações apresentaram tamanho nanométrico entre 172 ± 18 e 225 ± 4 nm e uma boa distribuição de tamanho. A taxa de encapsulação de saquinavir foi maior que 99%. As nanocápsulas apresentaram potencial zeta negativo, valores de pH levemente ácido e morfologia esférica. Os parâmetros avaliados na estabilidade mantiveram-se constantes ao longo do tempo analisado. O ensaio *in vitro* mostrou uma liberação controlada de saquinavir. As formulações não apresentaram toxicidade *in vitro* e foram capazes de mascarar o sabor do saquinavir. Portanto, a associação de polímeros é eficaz para a encapsulação de saquinavir, apresentando características nanotecnológicas adequadas para a sua administração.

Palavras-chave: Administração oral; Nanocápsulas; Saquinavir

ABSTRACT

Saquinavir is an antiretroviral drug designed to inhibit the human immunodeficiency virus protease. This drug presents several limitations regarding side effects, very low bioavailability and sensory not pleasant. The drug nanoencapsulation is a promising technique to overcome these issues. The aim of this work is to develop aqueous suspensions of polymeric nanocapsules containing saquinavir using poly- ϵ -caprolactone (PCL) and poly- ϵ -triol caprolactone (PCL-T) towards a liquid formulation suitable for the treatment of infected children. The nanocapsules were prepared using the technique of interfacial deposition of preformed polymers. The characterization study was conducted by examining the average particle diameter by three techniques, the laser diffraction, the dynamic light scattering and the nanoparticle tracking analysis. The zeta potential was evaluated by electrophoretic mobility, the pH by potentiometry and drug content and encapsulation rate by high performance liquid chromatography with UV detection. The *in vitro* release assay was carried out in a dialysis membrane with analysis at 0-120 hours, at 37 °C. The stability was checked at 0, 15, 30, 60 and 90 days, protected from light, at room temperature and by monitoring the pH, zeta potential, diameter, drug content and by multiple light scattering analysis. The morphology was observed by transmission electron microscopy. The cytotoxicity in human T lymphocytes was determined by exclusion of trypan blue test and the taste masking by the electronic tongue. All formulations presented nanometric size between 172 ± 18 and 225 ± 4 nm and a good size distribution. The drug encapsulation rate was higher than 99%. The nanocapsules presented negative zeta potential, pH values slightly acidic and spherical morphologies. The parameters evaluated in stability remained constant over time analyzed. The *in vitro* assay showed a controlled drug release from nanocapsules formulations. The developed formulations showed no toxicity and were able to mask the taste of saquinavir. The association of polymers is effective for saquinavir nanoencapsulation presenting suitable nanotechnological features for drug administration.

Keywords: Nanocapsules; Oral Administration; Saquinavir

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 3. 1: Número de casos de crianças com SIDA entre os anos de 2001 e 2012 no Brasil (BRASIL, DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS). 36

Figura 3. 2: Ciclo de replicação do HIV e alvo de ação dos antirretrovirais (SOUZA; ALMEIDA, 2003). 37

Figura 3. 3: Estrutura molecular de saquinavir 52

Figura 3. 4: Valor médio de concentração em função do tempo ($\mu\text{g/mL}$) da área sob a curva (ASC) de saquinavir (SQV) administrado com ou sem terapia combinada com ritonavir (RTV), onde tid (três vezes ao dia), od (uma vez ao dia) (PLOSKER; SCOTT, 2003). 54

CAPÍTULO II

Figura 4. 1: Escala de distribuição e tamanho das nanocápsulas NA, NB e NC 80

Figura 4. 2: Gráficos de distribuição de tamanho obtidos pela técnica de ARP para nanocápsulas contendo saquinavir, onde A (NA), B (NB), C (NC) 82

Figura 4. 3: Fotomicrografia das nanocápsulas poliméricas de saquinavir (150.000 x), onde A (NA), B (NB) e C (NC) 84

Figura 4. 4: Diâmetro médio das nanocápsulas das formulações NA, NB e NC, nos tempos 0,15, 30, 60 e 90 dias (n=3) 86

Figura 4. 5: Valor do índice de polidispersão das nanocápsulas das formulações NA, NB e NC, nos tempos 0,15, 30, 60 e 90 dias (n=3) 87

Figura 4. 6: Percentual de recuperação de saquinavir das formulações NA, NB e NC, nos tempos 0,15, 30, 60 e 90 dias (n=3) 87

Figura 4. 7: Valores de pH das formulações NA, NB e NC (a) e NA', NB', NC' (b), nos tempos 0,15, 30, 60 e 90 dias (n=3) 88

Figura 4. 8: Potencial zeta das formulações NA, NB e NC (a) e NA', NB', NC' (b), nos tempos 0,15, 30, 60 e 90 dias (n=3) 89

Figura 4. 9: Gráficos da variação de retroespalhamento de luz das formulações onde, a: NA, b: NB, c: NC 90

Figura 4. 10: Liberação de saquinavir a partir das nanocápsulas em meio de liberação pH 6,8	92
Figura 4. 11: Viabilidade celular de linfócitos T humanos tratados com concentrações diferentes de saquinavir nanoencapsulado (NA, NB, NC) e com nanocápsulas controle (NA', NB', NC'), onde a: concentração de 0,5 μ M de saquinavir e b:concentração de 1 μ M de saquinavir	95
Figura 4. 12: Morfologia de linfócitos T humanos em exposição à saquinavir nanoencapsulado e à nanocápsulas controle (400x) na concentração de 1 μ M, onde a: controle negativo, b: NA', c: NA, d: NB', e: NB, f: NC', g: NC.	96
Figura 4. 13: Representação da análise das Componentes Principais (PCA) de saquinavir na forma livre e nanoencapsulada (a) e representação da distância euclidiana obtida a partir do ponto médio dos cluster da PCA (b). Dados obtidos a partir de medidas de capacitância	97

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. CAPÍTULO I.....	33
Revisão da Literatura	33
3.1 HIV/SIDA.....	35
3.1.1 Histórico e prevalência	35
3.1.2 Ciclo de replicação, patogênese e transmissão	36
3.1.3 Diagnóstico.....	39
3.1.4 Reservatórios virais	40
3.1.5 Tratamento	41
3.2 Inibidores da protease.....	44
3.2.1 Mecanismo de ação.....	44
3.2.2 Representantes da classe	45
3.2.3 Resistência viral.....	46
3.2.4 Acumulação intracelular	47
3.2.5 A problemática do uso de inibidores de protease	49
3.3 SAQUINAVIR.....	51
3.3.1 Mecanismo de ação.....	51
3.3.2 Forma farmacêutica e dados farmacocinéticos	52
3.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	56
3.4.1 Componentes e metodologia de preparo das nanocápsulas.....	57
3.5 BLENDS POLIMÉRICAS	62
3.5.1 Poli(ϵ -caprolactona).....	63
3.5.2 Poli(ϵ -caprolactona) triol	63
3.6 ESTRATÉGIAS DE NANOENCAPSULAÇÃO DO SAQUINAVIR	64
4. CAPÍTULO II.....	67
Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas poliméricas de saquinavir planejadas para a administração oral.....	67
4.1 Resumo.....	69
4.2 Introdução	70
4.3 Metodologia.....	71
4.3.1 Materiais	71

4.3.2	Preparação das nanocápsulas	71
4.3.3	Morfologia das nanocápsulas	72
4.3.4	Análise do índice de refração	72
4.3.5	Determinação do tamanho de partícula e do potencial zeta	73
4.3.6	Determinação do pH.....	74
4.3.7	Análises de retroespalhamento de luz.....	74
4.3.8	Determinação do teor de saquinavir nas nanopartículas.....	75
4.3.9	Determinação da taxa de associação de saquinavir nas nanopartículas	75
4.3.10	Avaliação da estabilidade do saquinavir	76
4.3.11	Liberação in vitro e modelagem matemática	76
4.3.12	Citotoxicidade em linfócitos T humano	77
4.3.13	Língua eletrônica	78
4.3.14	Análise Estatística	79
4.4	Resultados e discussões.....	79
4.4.1	Caracterização das nanocápsulas desenvolvidas	79
4.4.1.1	Determinação do tamanho de partícula.....	79
4.4.1.2	Determinação do pH, teor total, potencial zeta e taxa de associação de saquinavir	83
4.4.1.3	Morfologia das nanocápsulas (MET)	84
4.4.2	Estabilidade	85
4.4.3	Análises de retroespalhamento de luz.....	89
4.4.4	Liberação in vitro	91
4.4.5	Citotoxicidade em linfócitos T humanos.....	94
4.4.6	Língua eletrônica	96
4.5	Conclusão	98
4.6	Agradecimentos	98
4.7	Referências	98
5.	DISCUSSÕES GERAIS.....	103
6.	CONCLUSÕES GERAIS	111
7.	REFERÊNCIAS GERAIS.....	115

1. INTRODUÇÃO

Com mais de 35 milhões de pessoas infectadas, o vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um grande problema de saúde pública. A prevenção e o acesso ao tratamento são os únicos alicerces para o controle da epidemia uma vez que não existe cura para a infecção (WHO, 2014).

Embora a terapia de medicamentos antirretrovirais contribua significativamente para a melhoria do paciente e controle da doença, seu uso atual está associado com várias desvantagens e inconvenientes para os pacientes portadores do vírus HIV, pois muitos desses medicamentos sofrem metabolismo de primeira passagem e degradação gastrointestinal, levando à baixa biodisponibilidade, além de possuírem tempo de meia-vida curto levando à necessidade de administração frequente de doses, o que pode aumentar os efeitos colaterais (LI; CHAN, 1999). 08006041211

Como o HIV pode se alojar em compartimentos de difícil acesso no corpo, tais como o sistema nervoso central, sistema linfático e dentro dos macrófagos, estes locais não podem ser atingidos pela maioria dos fármacos nas concentrações terapêuticas necessárias. Isso contribui significativamente para a falha na eliminação do HIV a partir destes reservatórios, bem como o desenvolvimento de multirresistência contra os antirretrovirais (AMIJI; VYAS; SHAH, 2009; VYAS; SHAH; AMIJI, 2006).

O saquinavir é um fármaco antirretroviral inibidor da protease do vírus da imunodeficiência humana (HIV) sendo o primeiro fármaco disponível comercialmente para pacientes com infecção pelo HIV (FIGGITT; PLOSKER, 2000). A protease do HIV é uma enzima essencial que cliva cadeias polipeptídicas em pequenas proteínas funcionais. O bloqueio da protease viral libera vírus estruturalmente desorganizados e não infecciosos (KOHL et al., 1988).

Dentre os vários problemas relacionados ao uso de saquinavir, a biodisponibilidade é o principal limitante dos seus potenciais efeitos terapêuticos. Devido aos efeitos combinados de baixa absorção devido ao efluxo pela Pgp e metabolismo de primeira passagem pelo citocromo P450, altas doses diárias são necessárias ao tratamento (NOBLE; FAULDS, 1996; WILLIAMS; SAMPSON; GREEN, 1992).

Atualmente, saquinavir é comercializado na forma de cápsulas e comprimidos de mesilato de saquinavir o que dificulta a administração para crianças (BRASIL, 2008). Em virtude de as indústrias farmacêuticas não produzirem medicações voltadas exclusivamente para atender a essa faixa etária, os cuidadores trituram e/ou dissolvem a medicação antes de oferecer às crianças, o que pode comprometer a eficácia da terapia (FEITOSA et al., 2008). Além disso observa-se que outro aspecto é a questão do sabor dos medicamentos. O saquinavir apresenta sabor amargo, metálico e adstringente (SCHIFFMAN et al., 1999) o que pode dificultar ainda mais a adesão das crianças ao tratamento.

Há, ainda, a interrupção em decorrência do incômodo causado pelos efeitos colaterais dos medicamentos (FEITOSA et al., 2008). As reações adversas mais comuns relatadas em pacientes recebendo saquinavir foram distúrbios gastrointestinal, como diarreia, náusea ou desconforto abdominal (PERRY; NOBLE, 1998). Diante disso, percebe-se a necessidade da pesquisa para desenvolvimento de formulações capazes de diminuir efeitos colaterais, mascarar gostos desagradáveis e diminuir o número de doses a fim de se obter o efeito desejado (FEITOSA et al., 2008).

Neste contexto, as vesículas nanométricas são uma alternativa para proporcionar um modo diferente de carrear e distribuir as substâncias ativas possibilitando a liberação controlada e a vetorização de fármacos. Apresentam como vantagens a proteção de fármacos contra a umidade, calor, oxidação, além disso podem mascarar sabores desagradáveis de substâncias (DONBROW, 1991; FAVARO-TRINDADE; DE PINHO; ROCHA, 2008; LUZZI; PALMIERI; LIM, 1984; RAWAT et al., 2006).

As nanocápsulas são formadas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso com diâmetro variando entre 100 e 500 nm apresentando-se, em geral, na forma de suspensões líquidas (FESSI, H. D., J-PH; PUISIEUX, F.; THIES, C., 1988; MAGENHEIM; BENITA, 1991). O componente ativo pode encontrar-se dissolvido na cavidade central oleosa ou adsorvido à parede polimérica (SOPPIMATH et al., 2001).

A utilização de nanoformulações é relatada como uma alternativa para melhorar a farmacodinâmica e farmacocinética de fármacos (OJEWOLE et al., 2008). Esta melhora implica em um aumento da biodisponibilidade, no sabor do fármaco, no tempo de meia-vida, pois o fármaco encontra-se protegido na vesícula nanométrica (DONBROW, 1991; LUZZI et al., 1984; RAWAT et al., 2006). Contudo, faz-se necessário estudar o impacto que essa nova tecnologia pode causar ao organismo.

Unindo a nanotecnologia ao uso de formulações que facilitem o processo de deglutição, como a formulação líquida oral, pode haver uma melhora na taxa de adesão das crianças ao tratamento além da melhora das características biofarmacêuticas de saquinavir.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é desenvolver suspensões aquosas contendo nanocápsulas de saquinavir caracterizar essas suspensões bem como a avaliar o perfil de liberação, a citotoxicidade e a melhora do sensorial de saquinavir.

A dissertação encontra-se estruturada em dois capítulos:

- Capítulo I: neste capítulo encontra-se uma revisão da literatura a respeito dos principais assuntos abordados nesta dissertação.
- Capítulo II: este capítulo foi escrito na forma de manuscrito para ser submetido a revista científica a ser definida. São abordados assuntos como método de preparação da formulação, caracterização físico-química, estabilidade, avaliação da liberação *in vitro* e modelagem matemática, teste de citotoxicidade e mascaramento do sabor.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver uma formulação farmacêutica líquida para uso oral contendo nanocápsulas de saquinavir, tendo como proposta a melhora das características físico-químicas, avaliação do perfil citotóxico e do perfil de liberação do fármaco e comparação da mudança do sabor em relação a saquinavir livre.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver formulações nanotecnológicas com diferentes polímeros a fim de obter uma formulação adequada para nanoencapsulação do saquinavir.
- Caracterizar as nanocápsulas de saquinavir quanto ao diâmetro médio de partícula, potencial zeta, índice de polidispersão, aspectos macroscópicos, teor e taxa de encapsulação, pH e morfologia.
- Avaliar a estabilidade das nanocápsulas desenvolvidas considerando os parâmetros pH, diâmetro médio, potencial zeta e teor de fármaco.
- Realizar um estudo de liberação *in vitro* e modelagem matemática dos dados.
- Avaliar a citotoxicidade das nanocápsulas de saquinavir em linfócitos T humano.
- Comparar o fármaco livre com o fármaco nanoencapsulado através da língua eletrônica.

3. CAPÍTULO I

Revisão da Literatura

3.1 HIV/SIDA

3.1.1 Histórico e prevalência

A doença resultante da infecção pelo vírus HIV, a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) foi reconhecida em meados de 1981, nos EUA, com a identificação de um número elevado de pacientes adultos do sexo masculino e moradores de São Francisco ou Nova York, que apresentavam sarcoma de Kaposi, pneumonia por *Pneumocystis carinii* e comprometimento do sistema imune. Concluiu-se que se tratava de uma nova doença de etiologia provavelmente infecciosa e transmissível. Porém, apenas em 1986 esse vírus (HIV) foi reconhecido como capaz de infectar seres humanos pelo Comitê Internacional (OLIVEIRA; SANTOS; MELLO, 2001).

O Brasil teve o primeiro caso de HIV diagnosticado em São Paulo no ano de 1982 e neste mesmo ano tomou-se conhecimento da sua possível transmissão por contato sexual, uso de drogas ou exposição a sangue e derivados. Dez anos após já existiam aproximadamente 15 mil casos de infecção pelo HIV no Brasil. O AZT (azidotimidina) foi o primeiro medicamento disponível capaz de reduzir a multiplicação do vírus sendo lançado no ano de 1992 e um ano após sua produção foi iniciada no Brasil (BRASIL – DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS).

Com mais de 35 milhões de pessoas infectadas (WHO, 2014), a doença afeta principalmente países mais pobres, de forma que aproximadamente 68% de todas as pessoas que vivem com HIV no mundo residem na África Subsaariana, região que representa 12% da população mundial (WHO, 2011). Outras importantes regiões afetadas pelo HIV incluem o Caribe, a América Latina e o sul e sudeste da Ásia. No Brasil, no ano de 2014 foram registrados aproximadamente 734 mil pessoas vivendo com HIV/SIDA, o que corresponde a uma prevalência de 0,4%. A taxa de detecção no Brasil nos últimos 10 anos tem apresentado estabilização com uma média de 20,5 casos para cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2013).

Conforme demonstrado na Figura 3.1, o número de casos por ano de crianças infectadas pelo HIV vem diminuindo a cada ano, porém verifica-se que

ainda é elevado o número de casos de crianças com menos de 5 anos (aproximadamente 500 casos/ano). A taxa de incidência de SIDA em menores de 5 anos de idade está estável no Brasil, no patamar médio de 3,5 por 100.000 habitantes.

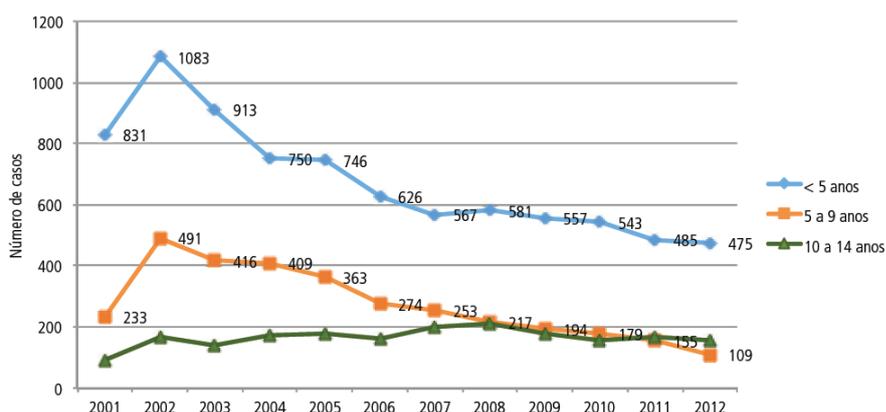


Figura 3. 1: Número de casos de crianças com SIDA entre os anos de 2001 e 2012 no Brasil (BRASIL, DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS).

O combate à epidemia mundial enfrenta grandes desafios devido à ausência de uma vacina eficaz, acessibilidade aos testes para detecção e monitoramento da doença bem como a disponibilidade de medicamentos antirretrovirais (DAMHORST; WATKINS; BASHIR, 2013).

3.1.2 Ciclo de replicação, patogênese e transmissão

O HIV é um retrovírus com genoma RNA (ácido ribonucléico), da família *Lentiviridae*. Os vírus dessa família possuem um período de incubação prolongado e são capazes de infectar células do sangue e do sistema nervoso bem como causar supressão do sistema imune (BRASIL, DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS).

O vírus é conhecido como uma nanoestrutura biológica (100-150 nm) composto por membrana, nucleocapsídeo e material genético sob a forma de RNA contendo três genes estruturais. Estes genes codificam importantes antígenos (genes gag), enzimas virais (transcriptase reversa, integrase e

protease) e glicoproteínas presentes no exterior da membrana viral (gp120 e gp41) sendo esta última responsável pelo reconhecimento do receptor CD4 e do CCR5 ou CXCR4 (co-receptores na membrana da célula hospedeira) (DAS NEVES et al., 2010; LEVY, 2007).

A infecção ocorre quando o vírus se liga a um receptor celular (geralmente T CD4+) por meio de sua proteína gp 120, permitindo a sua penetração e a entrada do capsídeo viral no interior da célula, com a liberação do complexo núcleo-proteico no citoplasma da célula hospedeira. O material genético (RNA) liberado na célula é convertido em duas fitas de DNA complementar (cDNA) através da ação da enzima transcriptase. A cópia de DNA de dupla hélice é então transportada ao núcleo celular onde uma segunda enzima, integrase, catalisa a incorporação do DNA viral ao material genético do hospedeiro. A expressão dos genes virais resulta na formação de poliproteínas virais que juntamente com o RNA movem-se para a superfície da célula para formação de novos vírus que apenas se tornam infectantes após a ação da enzima protease, capaz de processar as poliproteínas virais em proteínas e enzimas estruturais essenciais.

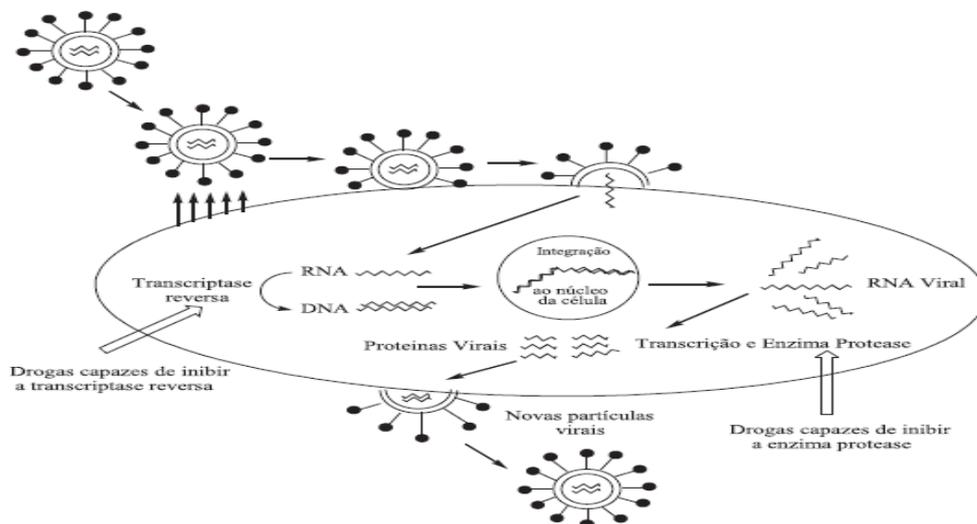


Figura 3. 2: Ciclo de replicação do HIV e alvo de ação dos antirretrovirais (SOUZA; ALMEIDA, 2003).

Todas as células que expressam a proteína de superfície celular CD4 como macrófagos, células T e células dendríticas podem ser infectadas pelo HIV (HAASE, 1999).

A primeira fase da doença conhecida como infecção aguda tem por característica o ataque ao sistema imune pelo vírus. Essa fase dura de 3 a 6 semanas e os sintomas característicos como febre e mal-estar são muito parecidos com os sintomas de gripe, por isso passam despercebidos pela maioria dos portadores. O período assintomático é a próxima etapa da doença e é caracterizado pelo equilíbrio entre amadurecimento e morte do vírus no organismo, uma vez que o sistema imune é forte o suficiente para manter esse equilíbrio, essa fase pode durar anos (BRASIL, DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS).

Devido ao frequente ataque, as células imunes ficam fracas e surge a fase sintomática inicial, caracterizada pela diminuição exacerbada dos linfócitos T CD4 no organismo. Com a depleção dos linfócitos devido a infecção, micro-organismos tais como fungos, vírus e parasitas causam infecções oportunistas em portadores do HIV que entram no estágio de SIDA. A doença, portanto, caracteriza-se por pronunciada supressão do sistema imune, levando à exacerbação de diversas infecções oportunistas (GOUVEIA, 2010).

Em crianças, a velocidade de progressão da doença tem implicação na idade de apresentação. Devido à imaturidade imunológica, o curso clínico da SIDA é mais rápido na criança em relação ao adulto (BRASIL, DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS).

Antes da utilização da terapia antirretroviral, alguns padrões de progressão da doença foram observados. O primeiro, denominado progressão rápida, atinge aproximadamente 20% a 30% das crianças não tratadas, sendo que a evolução dos quadros são graves no primeiro ano de vida, com possibilidade de morte antes dos quatro anos. O segundo, denominado de progressão normal, é conhecido por ser mais lento, abrangendo (70% a 80%) dos casos, com o desenvolvimento dos sintomas podendo se iniciar na idade escolar ou na adolescência e tempo médio de sobrevivência de 9 a 10 anos, com disponibilidade de terapia específica. O terceiro padrão da doença,

denominado progressão lenta, é observado em pequena porcentagem (<5%) de crianças infectadas no período perinatal. Essas crianças apresentam progressão mínima ou nula da doença com contagem normal de linfócitos TCD4 (BRASIL, DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS).

São conhecidos dois tipos diferentes de HIV capazes de causar infecção e doença em seres humanos, o HIV-1 e o HIV-2. A principal diferença entre eles é que o HIV-2 está associado a uma progressão mais lenta da imunodeficiência possuindo uma menor eficiência de transmissão e é também muito menos prevalente do que HIV-1, sendo encontrado principalmente em indivíduos da África Ocidental e na Índia (COHEN et al., 2008; DE SILVA; COTTEN; ROWLAND-JONES, 2008; THOMSON; NÁJERA, 2005).

O HIV pode ser transmitido através de vários fluídos corporais tais como sangue, esperma e secreções vaginais bem como através de transmissão vertical (da mãe para filho, através do parto, aleitamento) (WHO, 2014). O conhecimento do processo de transmissão e patogênese da infecção pelo HIV são ferramentas essenciais para fornecer informações importantes ao desenvolvimento de novas e melhores opções de tratamento (GOVENDER et al., 2008).

3.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção por HIV é realizado principalmente através de exames sorológicos que indicam a presença de anticorpos e/ou antígenos do HIV, sendo que o Elisa é utilizado como teste de triagem. Se for positivo, o resultado deve ser confirmado por *Western Blot* ou imunofluorescência indireta uma vez que resultados falso-positivos podem acontecer devido a ocorrência de doenças como artrite reumatoide, doença autoimune e alguns tipos de câncer. Outros exames rápidos estão disponíveis, incluindo testes de fluidos orais e sangue total a partir de punção (ABERG et al., 2009; DAMHORST et al., 2013).

A Sociedade Americana de Doenças Infecciosas recomenda a avaliação imediata dos dois marcadores centrais do progresso da infecção: a contagem de linfócitos CD4 e carga viral plasmática (normalmente avaliada através da

quantificação de RNA viral no plasma sanguíneo), além de testes de resistência a terapia antirretroviral e hemograma completo (ABERG et al., 2009).

Em crianças, a identificação precoce da infecção é importante para o início da terapia antirretroviral e também para a profilaxia das infecções oportunistas, intercorrências infecciosas e distúrbios nutricionais (BRASIL, DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS).

O diagnóstico da infecção vertical é interferido pela passagem transplacentária de anticorpos maternos do tipo IgG anti-HIV. Esses anticorpos podem persistir na criança por até os 18 meses de idade, portanto, a detecção de anticorpos anti-HIV não é suficiente para o diagnóstico em crianças menores de 18 meses de idade, sendo necessário também a realização de testes virológicos, como a quantificação da carga viral (BRASIL, DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS).

3.1.4 Reservatórios virais

Mesmo a terapia antirretroviral sendo capaz de reduzir a carga viral para níveis não detectáveis, o HIV é capaz de persistir no corpo humano em vários locais chamados de reservatórios. Esses locais são capazes de proteger o vírus a partir das vias de eliminação biológica, imunitária ou de fármacos antirretrovirais, tornando-se impossível erradicar o vírus e conseguir uma cura com a terapia atualmente disponível (BLANKSON; PERSAUD; SILICIANO, 2002).

Os reservatórios dividem-se em celulares e anatômicos. Os reservatórios celulares são macrófagos, células TCD4+ e células dendríticas foliculares sendo o macrófago o responsável pelo transporte do HIV para o sistema nervoso central. Os principais locais de reservatório anatômico do HIV incluem baço, linfonodos e sistema nervoso central. Outros locais potenciais que também foram descritos como possíveis reservatórios incluem os testículos e o trato genital feminino (BLANKSON et al., 2002; SCHRAGER; D'SOUZA, 1998).

A importância dos órgãos linfóides é devido ao seu papel na circulação e na produção de linfócitos. O sistema nervoso central é um grande desafio a terapia antirretroviral eficaz devido a pobre penetração desses fármacos para esse local. A infecção nesse reservatório pode resultar em distúrbios neurocognitivos e demência (BLANKSON et al., 2002; SCHRAGER; D'SOUZA, 1998).

Alguns estudos têm sido realizados com objetivos de atingir esses reservatórios virais através da utilização da nanotecnologia. Com o objetivo de direcionar os antirretrovirais aos reservatórios virais, nanopartículas poliméricas estão sendo desenvolvidas com ligantes (peptídeos, proteínas e anticorpos) que são capazes de se unir aos receptores no local alvo (SHARMA; GARG, 2010; WONG et al., 2010). XIA e colaboradores (2012), desenvolveram nanopartículas de PEG-PLA funcionalizada com peptídeo para facilitar liberação de fármacos no cérebro e como resultado obteve que as nanopartículas desenvolvidas atingiram grande captação nesse local sugerindo que esses sistemas possam ser utilizados para a liberação de fármacos no cérebro.

A distribuição nos tecidos de indinavir, livre ou incorporado a imunolipossomas anti-HLA-DR, foi avaliada. A administração de indinavir livre resultou em baixos níveis da droga em órgãos linfóides. Em contraste, os imunolipossomas anti-HLA-DR desenvolvidos foram muito eficazes na obtenção de elevadas concentrações de indinavir para tecidos linfóides durante pelo menos 15 dias após a administração em ratos, um aumento de até 126 vezes a acumulação do fármaco nos gânglios linfáticos (GAGNÉ et al., 2002).

3.1.5 Tratamento

A terapia para tratamento do paciente infectado se baseia na diminuição da morbidade e mortalidade objetivando a melhoria da qualidade e expectativa de vida do portador e não da erradicação da doença. Tem por objetivo também reduzir a carga viral ao mínimo para deter a progressão da doença e reduzir ou prevenir os variantes resistentes (BRASIL, 2013).

O estímulo para o início do tratamento imediato independente da contagem de linfócitos T CD4 tem por objetivo diminuir a taxa de transmissão do vírus e leva em conta a motivação do portador. Porém a falha virológica pode ocorrer em função da baixa adesão ao tratamento devido à complexidade posológica e a ocorrência de efeitos colaterais, que são características do tratamento antirretroviral (BRASIL, 2013).

Os efeitos colaterais mais frequentes são diarreia, vômitos, náuseas, manchas avermelhadas pelo corpo, agitação e insônia. Alguns desses sintomas geralmente acontecem no início do tratamento, tendendo a desaparecer em dias ou semanas. Porém, além dos efeitos colaterais, danos aos rins, fígado, ossos e intestinos a longo prazo podem ocorrer e são resultantes da ação do HIV, somados aos efeitos tóxicos provocados pelos medicamentos (BRASIL, DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS).

A utilização de terapias com múltiplos fármacos, onde cada um possui toxicidade considerável é uma questão problemática que pode determinar o retardo ao início do tratamento ou a sua interrupção. Além disso, as interações entre medicamentos antirretrovirais ou com outros fármacos são frequentes (BARRY et al., 1999; TYMCHUK; CURRIER, 2008). Para supressão viral eficaz, é essencial um cumprimento contínuo da terapia por longos períodos (DANEL et al., 2006).

Existem cerca de 30 medicamentos antirretrovirais disponíveis para o tratamento da infecção pelo HIV. Estes encontram-se distribuídos nas classes que incluem inibidores da transcriptase reversa, inibidores da protease, inibidores de entrada e inibidores da integrase. A escolha entre a variedade de fármacos e regimes posológicos depende de variáveis relacionadas com as propriedades toxicológicas, custos da terapia, progressão da doença, resistência ao fármaco e características dos pacientes (DE CLERCQ, 2007; HAMMER et al., 2008).

A busca pelo desenvolvimento de medicamentos inovadores conseguiu melhorar algumas dessas questões, porém o HIV possui uma notável capacidade de resistência às novas opções terapêuticas devido aos constantes

erros de transcrições virais que tem como consequência um alto polimorfismo levando à mutação (DAS NEVES et al., 2010). Propriedades físico-químicas como baixa solubilidade, permeabilidade e estabilidade baixas prejudicam a absorção, biodistribuição e o efeito sustentado, fatores que contribuem para um resultado clínico insuficiente na terapia com os antirretrovirais disponíveis atualmente (DAS NEVES et al., 2010).

A fim de tentar contornar esses problemas que limitam o sucesso terapêutico, sistemas de liberação para os antirretrovirais têm sido propostos na literatura (OJEWOLE et al., 2008; VON BRIESEN; RAMGE; KREUTER, 2000). Vários sistemas de liberação nanotecnológicos foram utilizados a fim de melhorar a terapêutica para o HIV, como nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas, nanoemulsões, dendrímeros e fármacos conjugados (por exemplo, com lipoproteínas de baixa densidade ou peptídeos) (LANAO; BRIONES; COLINO, 2007; OJEWOLE et al., 2008).

A nanotecnologia surge como uma alternativa para mudanças na distribuição de fármacos antirretrovirais conferindo vantagens farmacológicas quando comparados aos fármacos convencionais por mudanças nos fenômenos biológicos como reconhecimento imunológico e passagem através de barreiras biológicas (PARBOOSING et al., 2012).

Em trabalho recente Woodrow e colaboradores, observaram o comportamento favorável de nanopartículas de PLGA *in vivo*, com o objetivo de desenvolvimento de microbicidas eficazes e seguros com completa distribuição no trato genital e retenção no tecido (até uma semana). Os resultados encontrados podem comprovar que as nanopartículas de PLGA podem conferir prolongada ação de moléculas microbicidas incorporados devido a liberação intracelular sustentada (WOODROW et al., 2009).

Nanopartículas preparadas com PLA, livres de surfactante, foram propostas por ATAMAN-ÖNAL e colaboradores (2006), como um sistema de liberação para vacina e foi testado em vários modelos animais utilizando a proteína p24 do HIV-1. Nanopartículas de PLA revestidas de p24 (PLA/p24) induziram elevados anticorpos em ratos, coelhos e macacos. Este sistema de

liberação de proteínas confirmam o potencial de nanopartículas no campo do desenvolvimento da vacina (ATAMAN-ÖNAL et al., 2006).

3.2 Inibidores da protease

A introdução dos inibidores de protease do HIV foi feita, a partir de 1996, para uso em combinação com os inibidores da transcriptase reversa do vírus e os compostos foram desenvolvidos por meio da técnica de modelagem molecular, baseando-se na estrutura cristalina da protease do vírus (HUGEN et al., 1999).

Essa classe faz parte de um núcleo denominado terapia antirretroviral de alta atividade, regime que reduziu com sucesso morbidade e mortalidade, resultando em um aumento drástico no tempo de vida de doentes infectados por HIV (FLEXNER, 1998).

3.2.1 Mecanismo de ação

Inibidores de protease são fármacos que agem no último estágio da formação do HIV, impedindo a ação da enzima protease, que é fundamental para a clivagem das cadeias protéicas produzidas pela célula infectada em proteínas virais estruturais e enzimas que formarão cada partícula do HIV (DEEKS et al., 1997; MCDONALD; KURITZKES, 1997).

A protease do HIV é necessária para clivar as poliproteínas gag e gag-pol em seus produtos finais de proteína funcionais, capaz de gerar uma partícula viral infecciosa e completamente madura. A protease é codificada como parte da poliproteína gag-pol-se e torna-se ativa após um evento de dimerização que só é possível nos locais onde a concentração dessas poliproteínas são elevadas, essencialmente no local da montagem do vírus e do seu brotamento (PETTIT, STEVEN C et al., 2005; PETTIT, STEVE C et al., 2005).

O próprio domínio da protease cliva fora da poliproteína gag-pol para constituir um homodímero montado simetricamente, em que o local de ligação ao substrato é uma cavidade central, simétrico que é igualmente definida por

cada uma das duas subunidades do homodímero. A clivagem proteolítica das poliproteínas gag e gag-pol pela protease pode ser visto como um interruptor de uma configuração das poliproteínas que antes favorecia a montagem e brotação na superfície da célula, para uma configuração que promove a montagem de uma estrutura de cápside madura livre que pode ser liberado para o citoplasma da célula alvo, onde o vírus vai entregar a maquinaria de replicação completamente funcional. A montagem apropriada desta estrutura de cápside madura requer que a clivagem das proteínas gag e gag-pol pela protease ocorra de uma maneira ordenada e controlada (PETTIT, STEVEN C et al., 2005; PETTIT, STEVE C et al., 2005).

O papel crítico da enzima protease na maturação do vírus se estabeleceu como um importante alvo para intervenção terapêutica (FORD; KHOO; BACK, 2004). Os fármacos desenvolvidos são inibidores seletivos, competitivos e reversíveis da protease de HIV-1 e HIV-2 (WU et al., 2014).

3.2.2 Representantes da classe

A primeira geração de inibidores de protease são análogos estruturais do local de clivagem da protease e são classificados como inibidores peptidomiméticos. São os principais representantes dessa classe: Indinavir, Ritonavir, Saquinavir, Nelfinavir e Amprenavir (RANDOLPH; DEGOEY, 2004).

A segunda geração de inibidores da protease do vírus HIV é uma classe de não-peptídeos. Possui dois representantes, tipranavir e darunavir, que são aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*). O tipranavir é ativo contra cepas de HIV-1 que são resistentes a outros inibidores da protease do HIV (FLEXNER; BATE; KIRKPATRICK, 2005).

Apesar do sucesso clínico dos inibidores de protease em controlar a replicação do HIV, o tratamento com essa classe é associado a ocorrência de toxicidade hepática grave, complicações no trato gastrointestinal e resistência que são comuns causas da interrupção ou suspensão do tratamento. As evidências sugerem que vários mecanismos podem estar envolvidos e podem ocorrer diferentes efeitos sobre o metabolismo lipídico hepático e sobre o trato gastrointestinal nos diferentes indivíduos (CARR, 2000; CARR et al., 1998).

3.2.3 Resistência viral

A resistência viral pelos inibidores da protease é o resultado de uma interação de muitos fatores que incluem não apenas as mutações virais, mas também fatores farmacocinéticos como ligação às proteínas plasmáticas, metabolismo hepático, transportadores de efluxo, e interações medicamentosas (ESTÉ; CIHLAR, 2010; FORD et al., 2004). Uma característica única de resistência aos inibidores de protease do HIV é o fato de mutações de resistência não só surgirem na própria protease - o alvo direto dos inibidores de protease, mas também em alguns dos substratos naturais da protease - os locais de clivagem da gag (CLAVEL; MAMMANO, 2010).

A resistência aos inibidores da protease do HIV, é a consequência da acumulação de substituições de aminoácidos na enzima (CONDRA et al., 1996; MOLLA et al., 1996). Uma das características de mutações primárias é a substituição do local V82A (resíduo de valina na posição 82), que é encontrado na maioria dos vírus que desenvolveram resistência aos diferentes inibidores da protease. Esta mutação modifica um forte ponto de contato entre a enzima e os inibidores (PRABU-JEYABALAN et al., 2004). As mutações secundárias envolvem aminoácidos localizados longe da cavidade de ligação do substrato. Estas mutações são menos fármaco-específicas que mutações primárias, mas não deixam de ser críticas para a resistência de alto nível. Ambas as mutações, primárias e secundárias, modificam a forma e tamanho da cavidade de ligação ao substrato na protease do HIV, reduzindo, assim, a afinidade e o potencial dos inibidores de protease (LOGSDON et al., 2004; PRABU-JEYABALAN; KING; et al., 2006; PRABU-JEYABALAN; NALIVAIIKA; et al., 2006).

Em geral, as mutações parecem aumentar a cavidade de ligação ao substrato na protease (LOGSDON et al., 2004). Este alargamento tem consequências importantes sobre a ligação dos inibidores, a maioria dos quais são dependentes de uma interação forte com o sítio ativo da enzima, do que na ligação dos substratos naturais da protease, conhecidos como gag e gag-pol (LOGSDON et al., 2004; PRABU-JEYABALAN; KING; et al., 2006; PRABU-JEYABALAN; NALIVAIIKA; et al., 2006).

3.2.4 Acumulação intracelular

Na tentativa de otimizar a terapia, muitos estudos de concentração plasmática dos inibidores da protease foram realizados. No entanto, o alvo dos inibidores da protease é intracelular e, assim, a farmacocinética e avaliação terapêutica de medicamentos com base em concentrações plasmáticas podem não ser suficientes para prever a resposta (JUSTESEN, 2008; PAWI—SKI et al., 2008).

Por exemplo, a concentração plasmática de saquinavir não foi associada com o resultado antirretroviral em pacientes com infecção por HIV-1 (LÖTSCH et al., 2007). Outro estudo também mostrou que as concentrações plasmáticas de atazanavir e lopinavir não dizem respeito à eficácia no tratamento antirretroviral em pacientes infectados por HIV-1. Com base nessas evidências, não está claro se existe uma relação entre a concentração do fármaco no plasma e os efeitos farmacológicos, ou mesmo efeitos secundários, em órgãos alvo (JOSEPHSON et al., 2010).

Outro fato importante que demonstra a complexidade da acumulação dos fármacos nos linfócitos é que a ligação às proteínas por si só não é diretamente relacionada com a acumulação intracelular nos inibidores de protease. Os fármacos representantes dessa classe se ligam a glicoproteína a1-ácido (AAG) reduzindo assim a concentração de fármaco da fração livre (não ligada) disponível para atravessar membranas celulares. No entanto, é importante notar que o nelfinavir, que se acumula em maior quantidade nas células, possui ligação altamente protéica (> 98%), ao passo que o indinavir, que se acumula menos, é de apenas 60% de ligação (BILELLO et al., 1996; JONES, K et al., 2001).

É altamente provável que inibidores de protease se ligam às proteínas intracelulares devido à sua elevada afinidade com as proteínas no compartimento plasmático. Dentro das células, uma dinâmica de equilíbrio deve então existir entre o fármaco ligado à proteína e fármaco ligado a protease do HIV, influenciada pela afinidade de inibidores de protease por cada proteína. Portanto, inibidores da protease estão localizados principalmente dentro das frações mitocondrial, nucleares e citosólicas das células e não

apenas na membrana extracelular (BILELLO et al., 1996; JONES, K et al., 2001).

Devido às propriedades físico-químicas os inibidores de protease são propícios a atravessar as células por difusão passiva. A difusão através da membrana é determinada pelo tamanho da molécula, pelas concentrações de fármaco não ligado, grau de ionização e lipofilicidade (FORD et al., 2004; ZHA et al., 2012).

O peso molecular da maioria dos inibidores de protease é menor que 700 Da e os valores de pKa são menores que o pH fisiológico. Considerando também as propriedades de base fraca, a maioria destes compostos são mais propensos a atravessar membranas lipídicas celulares. No entanto, o fator mais importante para predizer a acumulação intracelular é a sua lipofilicidade, uma vez que uma boa correlação linear foi descrita entre log P e a acumulação intracelular dos inibidores de protease (FORD et al., 2004; ZHA et al., 2012).

O coeficiente de partição é um modelo utilizado para descrever o potencial de acumulação de um composto. Nelfinavir é o inibidor da protease mais lipofílico tendo maior coeficiente de partição, e pode, portanto, difundir passivamente para o compartimento intracelular para uma maior extensão em comparação com outros inibidores da protease (FORD et al., 2003).

Os valores de log P para os inibidores de protease foram relatados na seguinte ordem: nelfinavir > saquinavir > amprenavir = lopinavir > ritonavir > indinavir, fornecendo uma indicação da lipofilicidade da acumulação intracelular dos fármacos em linfócitos e sugerindo que a difusão passiva é importante na bioacumulação de cada fármaco (FORD et al., 2003).

As membranas são impermeáveis a formas ionizadas de drogas e assim o grau de ionização da molécula afeta a concentração que está disponível para a difusão passiva através das membranas biológicas. Uma vez que a constante de dissociação (pKa) é igual ao pH na qual um composto é 50% ionizado, as bases fracas encontram-se essencialmente não-ionizada num ambiente básico e se lipofílico pode ser absorvido. Portanto nelfinavir (pKa 6,0/11,1), saquinavir (pKa 1,1/7,1) e indinavir (pKa 6,2), que são bases fracas, são mais suscetíveis a atravessar as membranas lipídicas de células ou

organelas quando o pH ambiente é maior do que o seu pKa. Assim, existe o potencial de retenção de compostos básicos ($pK_a > 8$) em compartimentos ácidos e o gradiente de pH entre o plasma e linfócitos irá influenciar a captura de íons. O gradiente de pH entre o plasma e linfócitos está sujeita a mudar, dependendo do potencial de membrana (FORD et al., 2004; KASHUBA et al., 1999).

O alvo dos inibidores da protease é o citoplasma, porém a maioria dos fármacos causa toxicidade em organelas subcelulares (ZHA et al., 2012). Vários estudos têm sido realizados a fim de contornar a toxicidade celular como a co-administração de moduladores de efluxo para melhorar absorção e acumulação intracelular. No entanto, a inibição de efluxo de proteínas pode causar a acumulação de moléculas citotóxicas que são normalmente repelidas por estas proteínas de efluxo (AGARWAL; PAL; MITRA, 2007; JONES, KEVIN et al., 2001). Três principais transportadores estão envolvidos no efluxo e captação de inibidores de protease, são eles: transportadores ABC (ATP-binding cassette), transportadores de cátions orgânicos e transportadores de ânions polipeptídeos orgânicos (ZHA et al., 2012).

A nanotecnologia pode proporcionar uma vantagem estratégica para melhorar a acumulação intracelular de inibidores da protease. Nanopartículas com propriedades ópticas foram usadas para aumentar a acumulação intracelular de saquinavir no cérebro, e melhorar a sua atividade contra o HIV-1 diminuindo a replicação viral nesses locais (MAHAJAN et al., 2010).

3.2.5 A problemática do uso de inibidores de protease

O uso clínico de inibidores de protease também é afetado pelo seu elevado preço e por problemas de tolerabilidade e toxicidade. Antes da introdução do primeiro inibidor de protease na prática clínica, expectativas otimistas acreditavam que a toxicidade virostática desta classe seria baixa por causa da ausência de enzimas semelhantes para a protease de HIV no corpo humano. Infelizmente, a realidade foi diferente, e em breve descobriu-se que os compostos podiam interagir com outras moléculas, particularmente no metabolismo e vias lipídicas (POKORNÁ et al., 2009).

Os efeitos colaterais dos inibidores de protease são muito frequentes e muitas vezes tão graves que a toxicidade pode até mesmo representar um risco maior aos pacientes do que a própria infecção pelo HIV (SHIBUYAMA et al., 2006; WOHL et al., 2006). A presença de efeitos secundários, juntamente com o regime de dosagem dos comprimidos influencia negativamente a adesão do paciente e, conseqüentemente, contribuem para a evolução da resistência (POKORNÁ et al., 2009).

Todos os inibidores de protease foram aprovados apenas para administração oral, mas a sua absorção no trato gastrointestinal e difusão através de barreiras anatômicas é geralmente pobre. Este efeito se deve, em parte, devido à sua extensa ligação às proteínas plasmáticas (90-99%), e em parte devido à ligação à glicoproteína-P com conseqüente efluxo da droga (POLLI et al., 1999) contribuindo para uma baixa biodisponibilidade oral (FORD et al., 2004).

A fim de suprimir a infecção viral, os níveis de concentração dos antirretrovirais na circulação sanguínea devem ser adequados. Concentrações menores de fármaco nos locais de ação podem levar à replicação viral e permitir o aparecimento de variantes resistentes aos fármacos. Muitas limitações farmacocinéticas dos inibidores da protease puderam ser parcialmente superadas pela co-administração com doses baixas de um potente inibidor do citocromo P450, ritonavir. A terapia de inibidores de protease com ritonavir leva a regimes de tratamento simplificados, reduzindo a quantidade de comprimidos contribuindo para uma melhor adesão do paciente ao tratamento (POKORNÁ et al., 2009).

Essa combinação ajuda a evitar o aparecimento de resistência antirretroviral. Atualmente, todos os inibidores de protease comercializados, com exceção de nelfinavir, são prescritos com uma dose baixa (100 mg por dia) de ritonavir como reforço. Embora o mecanismo de inibição do citocromo P450 por ritonavir, não seja totalmente compreendido, a terapia de combinação com inibidores do citocromo P450 tornou-se um campo de pesquisa muito ativo na ciência farmacêutica (XU; DESAI, 2009).

Por outro lado, qualquer co-administração dos inibidores do citocromo P450 com fármacos metabolizadas pelo citocromo P450 pode ser problemática e levar a efeitos secundários graves. Vários fármacos como o sildenafil, corticosteróides ou agentes psicotrópicos (WINSTON; BOFFITO, 2005), também precisam ser prescritos com cautela para pacientes em terapia combinada com inibidores do citocromo P450 (POKORNÁ et al., 2009).

Novos inibidores de protease devem ser desenvolvidos com alta especificidade contra os mutantes resistentes do HIV, conferindo melhores propriedades farmacocinéticas, menor toxicidade e regime de dosagem mais simples (POKORNÁ et al., 2009).

3.3 SAQUINAVIR

3.3.1 Mecanismo de ação

Saquinavir (SQV) foi o primeiro inibidor da protease disponível e foi aprovado pelo *FDA* em dezembro de 1995. É um inibidor derivado de peptídeo altamente seletivo e potente de protease do HIV, com mínimo efeito sobre a atividade de outras proteinases aspárticas humanas estruturalmente relacionadas. Tal como acontece com outros inibidores da protease do HIV, saquinavir inibe a clivagem do substrato gag-pol que conduz à liberação de partículas virais estruturalmente defeituosas e funcionalmente inativas. É um análogo do estado de transição estável cuja estrutura imita um derivado de ligação amida-prolina N-terminal que é clivado pela protease do HIV (PETTIT; MICHAEL; SWANSTROM, 1993; REDSHAW, 2008).

É ativo em ambos tipos, HIV-1 e HIV-2, e também tem atividade em células cronicamente infectadas e cepas de HIV resistentes aos inibidores da transcriptase reversa. Sinergia de ação tem sido observada com outros fármacos antirretrovirais (VELLA; FLORIDIA, 1998). A afinidade de saquinavir para proteases do HIV é de aproximadamente 50 000 vezes maior do que para proteases humanas (MOYLE, 1998).

3.3.2 Forma farmacêutica e dados farmacocinéticos

Comercialmente, saquinavir (Figura 3.3) se apresenta na forma de mesilato de saquinavir nas formas farmacêuticas cápsula de gelatina dura e comprimidos, sendo administrado nas concentrações de 200 e 500 mg de saquinavir (correspondendo a 228,7 e 571,5 mg de mesilato de saquinavir, respectivamente) (BRASIL, 2008).

O mesilato de saquinavir tem como produto de referência no mercado INVIRASE®, fabricado pela indústria farmacêutica Roche® e disponibilizado para atender ao Programa de SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) do Ministério da Saúde (BRASIL, DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS).

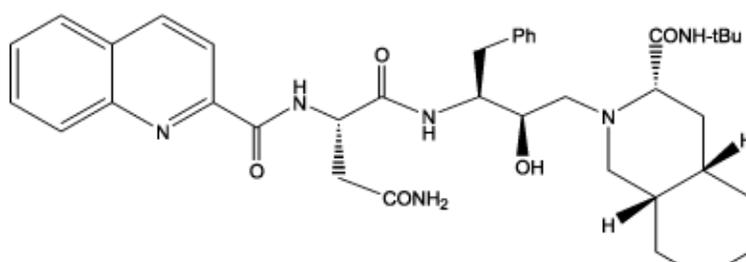


Figura 3. 3: Estrutura molecular de saquinavir

Na forma de base livre, saquinavir tem um peso molecular de 670,85g/mol e sua ligação às proteínas plasmáticas é superior a 98% (HOFFMANN, 1996). Estudos demonstraram que a biodisponibilidade absoluta de 600mg de saquinavir em 30 minutos após uma refeição foi aproximadamente 4% (WILLIAMS et al., 1992), além disso possui baixa solubilidade em água (BRANHAM; MOYO; GOVENDER, 2012). A biodisponibilidade foi consideravelmente inferior (18 vezes) no estado de jejum (MUIRHEAD G. J., 1992; SHAW T. M., 1992; WILLIAMS et al., 1992). A baixa biodisponibilidade do saquinavir é devida aos efeitos combinados de absorção limitada (cerca de 30%) e do metabolismo hepático de primeira passagem, onde o fármaco é rapidamente metabolizado pelo citocromo P450 3A4 aos derivados inativos (NOBLE; FAULDS, 1996; WILLIAMS et al., 1992).

O metabolismo intestinal através do mesmo sistema também tem sido relatado (VELLA; FLORIDIA, 1998). Saquinavir é geralmente bem tolerado, com sintomas gastrointestinais leves que representam os efeitos adversos mais comumente observados (VELLA; FLORIDIA, 1998). As reações adversas mais comuns relatados em pacientes recebendo saquinavir foram distúrbios gastrointestinais, como diarreia, náusea ou desconforto abdominal (PERRY; NOBLE, 1998).

Nanocarreadores são descritos como capazes de contornar o metabolismo de primeira passagem reduzindo o metabolismo pelo citocromo P450, família das enzimas presentes nos enterócitos do intestino e hepatócitos do fígado e/ou inibir a bomba de efluxo, a glicoproteína-P (DATE et al., 2010; PORTER; CHARMAN, 2001).

A excreção biliar é responsável por quase toda a eliminação de saquinavir sendo que a excreção renal tem uma contribuição mínima (cerca de 1%) (NOBLE; FAULDS, 1996).

As concentrações mais elevadas de saquinavir no plasma podem ser obtidas por combinação do medicamento com bloqueadores do citocromo P450, tais como o cetoconazol ou ritonavir. Devido a sua interferência com o sistema metabólico do citocromo, saquinavir não pode ser co-administrado com astemizol, terfenadina ou cisaprida. Rifampicina (rifampicina) também é contraindicado, pois a administração concomitante pode levar a reduções nas concentrações de saquinavir. Interações também têm sido relatadas com outros fármacos metabolizados através do mesmo sistema, incluindo os inibidores da transcriptase reversa não-nucleósidos e inibidores de protease de HIV (VELLA; FLORIDIA, 1998).

Quando o saquinavir e ritonavir são administrados concomitantemente em doses terapêuticas um grande aumento de concentração plasmática em função do tempo é observado na área sob a curva (ASC) de saquinavir. Um estudo foi realizado em 44 voluntários saudáveis onde saquinavir (capsula de gelatina mole) foi administrado com ou sem a presença de ritonavir por aproximadamente duas semanas (Figura 3.4) (HSU et al., 1998; KILBY et al., 2000; MERRY et al., 1997). Este aumento de concentração geralmente ocorre

sem aumento dos efeitos adversos associados ao saquinavir. Dados de longo prazo com a administração concomitante de doses terapêuticas de saquinavir e ritonavir indicam que as concentrações de saquinavir em plasma podem diminuir ao longo do tempo, em pacientes que receberam regimes estáveis e que estavam aparentemente compatíveis com a terapia (BUSS et al., 2001).

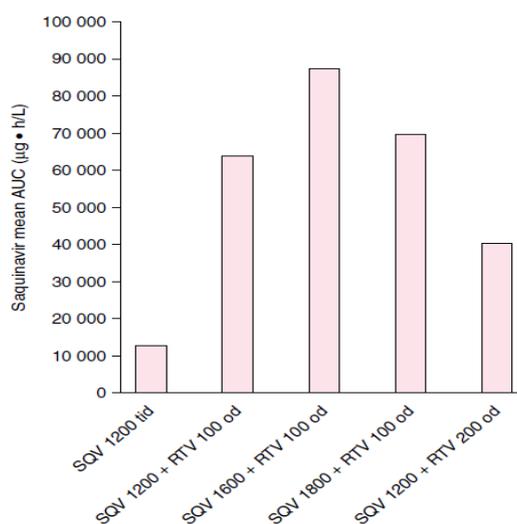


Figura 3. 4: Valor médio de concentração em função do tempo ($\mu\text{g}/\text{mL}$) da área sob a curva (ASC) de saquinavir (SQV) administrado com ou sem terapia combinada com ritonavir (RTV), onde tid (três vezes ao dia), od (uma vez ao dia) (PLOSKER; SCOTT, 2003).

A fim de melhorar a biodisponibilidade de saquinavir, uma nova formulação do fármaco em cápsulas moles foi desenvolvida e comercializada sob o nome de Fortovase® (Hoffman-La Roche) (KILBY et al., 2000). Logo após, SQV foi co-formulado com ritonavir. Em 15 de fevereiro de 2006, as vendas de Fortovase foram interrompidas no Estados Unidos por causa da intolerância ao fármaco, portanto o Invirase® em combinação com ritonavir permaneceu como a única formulação de SQV atualmente disponível no mercado (POKORNÁ et al., 2009).

Embora caracterizado por uma baixa biodisponibilidade, em ensaios de fase III saquinavir demonstrou ter eficácia clínica. Tal como acontece com os outros inibidores da protease, saquinavir deve ser utilizado em combinação com outros fármacos antirretrovirais. Orientações terapêuticas, no entanto, recomendam a seleção de um regime de tratamento inicial com outros

inibidores da protease com maior atividade *in vivo* com melhor resposta por CD4 (VELLA; FLORIDIA, 1998).

A resistência ao saquinavir foi observada *in vitro* e *in vivo*, após a exposição ao fármaco, com um perfil de mutação relativamente específica em comparação com outros inibidores da protease (VELLA; FLORIDIA, 1998).

Essa resistência é dependente de mutações em genes específicos e também do número de mutações existentes na protease. As mutações no gene protease que conferem resistência ao saquinavir são L90M e G48V. Alguns estudos têm mostrado que os pacientes cujo vírus contém até quatro ou cinco mutações na protease são ainda suscetíveis a alcançar uma resposta clínica com saquinavir combinado com ritonavir (PLOSKER; SCOTT, 2003).

Vários estudos *in vitro* demonstraram que saquinavir, assim como outros inibidores de protease, tem atividade antirretroviral sobre vários tipos de células, que incluem células mononucleares do sangue periférico, monócitos-macrófagos e várias linhagens celulares de linfócitos (NOBLE; FAULDS, 1996).

Saquinavir é ativo tanto de forma aguda quanto na forma crônica de células infectadas e em cepas de HIV resistentes aos inibidores da transcriptase (BUGELSKI; KIRSH; HART, 1994; NOBLE; FAULDS, 1996).

Vários estudos *in vitro* foram realizados a fim de avaliar a atividade antirretroviral de saquinavir em combinação com outros antirretrovirais. Os fármacos que demonstraram ter efeito sinérgico (efeito em termos de concentração inibitória) com saquinavir foram: análogos de nucleosídeos (zidovudina, zalcitabina, lamivudina e estavudina), inibidores da transcriptase reversa não-nucleosídeos (MKC 442 e nevirapina), produtos anti-TAT (Ro-247429) e interferon- α (NOBLE; FAULDS, 1996). Um estudo mostrou um antagonismo de atividade *in vitro* entre saquinavir e indinavir (MERRILL et al., 1997).

Em comparação com outros inibidores da protease do HIV, saquinavir tem um bom perfil de tolerabilidade, que pode resultar em uma melhor adesão terapêutica. As principais limitações do fármaco, em conjunto com as características de biodisponibilidade, são representados pela distribuição limitada no sistema nervoso central e pelas restrições, como outros protease

inibidores, sobre o uso concomitante com antimicobacteriano (CONTROL; PREVENTION, 1996).

3.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As nanopartículas poliméricas fazem parte de um grande grupo de sistemas nanoestruturados que apresentam vantagens frente a outros sistemas nanocarreadores uma vez que protegem a substância ativa incorporada através de um invólucro polimérico que possui função também de controlar a liberação dessa substância ao meio de dispersão (DINGLER et al., 1999).

Conforme a composição e a organização estrutural as nanopartículas podem ser classificadas em nanoesferas e nanocápsulas. As nanoesferas não apresentam óleo na sua composição e são constituídas por uma matriz polimérica estando a substância ativa retida ou adsorvida na matriz. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo a substância ativa estar dissolvida neste núcleo e/ou adsorvida à parede polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Podem ser definidas como partículas sólidas coloidais com tamanho inferior a 1 μm que carregam a substância ativa. Podem ser obtidas por diferentes métodos e geralmente apresentam tamanho entre 100 e 500 nm (NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2010; QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998).

Podem ser administradas pelas vias tópica, oral, intravenosa, intramuscular, ocular e subcutânea (SCHAFFAZICK et al., 2003; WEISS-ANGELI, 2007). Na via oral são estudadas principalmente em busca da diminuição dos efeitos colaterais de fármacos e também na proteção contra a degradação de fármacos suscetíveis a esse fenômeno no trato gastrointestinal, aumentando consequentemente a biodisponibilidade dos mesmos (SCHAFFAZICK et al., 2003).

As nanopartículas têm sido exploradas para a melhoria da formulação e da eficácia de fármacos com propriedades físicas problemáticas tais como fraca solubilidade e estabilidade (DE JAEGHERE et al., 2000). Elas estão sendo cada vez mais investigadas para dirigir os antirretrovirais até as células

infectadas com HIV e para atingir uma cinética de liberação controlada de fármacos (CHAOWANACHAN et al., 2013).

Devido ao fármaco estar encapsulado, a sua proteção frente ao metabolismo é uma característica favorável desses nanosistemas, pois evita o mecanismo de resistência, por permitir maior acúmulo e tempo de residência em locais alvo (DAS NEVES et al., 2010).

Além disso, a utilização de sistemas de administração de fármaco em nanopartículas podem ser particularmente vantajosos para a entrega direcionada dos fármacos a células ou órgãos que estão diretamente implicados em HIV / AIDS (OJEWOLE et al., 2008; VYAS et al., 2006), podendo reduzir a dose e a toxicidade em outros órgãos com consequente diminuição dos efeitos adversos e maior adesão à terapia (DAS NEVES et al., 2010). Por conseguinte, o mascaramento do sabor do fármaco pode ocorrer por uma menor exposição do fármaco, uma vez que encontra-se protegido na vesícula.

3.4.1 Componentes e metodologia de preparo das nanocápsulas

Dentre as metodologias existentes para o preparo das nanocápsulas, o método de deposição interfacial do polímero pré-formado descrito por FESSI e colaboradores (1989), possui a vantagem de não gerar monômeros e oligômeros residuais e, portanto, foi escolhido para o desenvolvimento das nanocápsulas no presente trabalho (AMMOURY et al., 1993; GUTERRES et al., 1995). Esse método consiste na solubilização do polímero em solvente orgânico juntamente com o óleo, o tensoativo lipofílico e o fármaco. Após essa fase orgânica é vertida sobre a fase aquosa que contém a água ultrapura e o tensoativo hidrofílico e sob aquecimento e agitação as nanocápsulas são geradas espontaneamente (DEVISSAGUET; FESSI; PUISIEUX, 1991; FESSI, H. D., J-PH; PUISIEUX, F.; THIES, C., 1988).

O polímero é responsável pela formação da parede polimérica que separa as interfaces água/óleo. Dentre os polímeros mais usados para o preparo das nanocápsulas destacam-se a poli(ϵ -caprolactona) e o Eudragit®. No componente oleoso, o fármaco a ser encapsulado estará solubilizado,

sendo a lipossolubilidade, portanto, fator importante para a encapsulação. Dentre os óleos mais utilizados, destacam-se os triglicerídeos de cadeia média. A presença dos tensoativos hidrofílicos e lipofílicos é relacionada a estabilidade do sistemas e dentre os mais utilizados destacam-se o Tween 80 (polissorbato 80) como tensoativo hidrofílico e o Span 60 (monostearato de sorbitano) como tensoativo lipofílico (FESSI, H. et al., 1989; WEISS-ANGELI, 2007).

Uma vez que suspensões coloidais são propensas a fenômenos de instabilidade alguns parâmetros como diâmetro, potencial zeta, pH, concentração de fármaco associado às nanocápsulas, entre outros devem ser determinados e monitorados. A determinação do tamanho é um fator importante para avaliar a tendência a sedimentação de formulações estocadas (WEISS-ANGELI, 2007). O monitoramento do pH fornece informações sobre a degradação do polímeros ou das outras substâncias presentes na formulação (GUTERRES et al., 1995). O potencial zeta fornece informações a respeito do potencial de superfície das partículas, valores altos de carga indicam estabilidade do sistema uma vez que as forças repulsivas previnem a agregação (MAGENHEIM; BENITA, 1991).

3.4.2 Nanopartículas e a administração pela via oral

A administração oral é a via mais conveniente e mais amplamente utilizada para administração de fármacos, com boa adesão dos pacientes (AGRAWAL et al., 2014). Apesar desta vantagem, também há desvantagens associadas à administração oral, normalmente relacionada com a liberação imediata do fármaco que causa toxicidade na prática, a baixa solubilidade aquosa e baixa taxa de penetração através das membranas intestinais (CHENG, Y. et al., 2008). Além disso, a biodisponibilidade oral de fármacos é fortemente influenciada pela solubilidade e permeabilidade (AGRAWAL et al., 2014).

Um fármaco que é administrado por via oral deve sobreviver no ambiente hostil do trato gastrointestinal e deve ser absorvido. A biodisponibilidade de fármacos onde a taxa de dissolução é a limitação torna-se um desafio para a entrega eficaz por via oral. Assim, medidas protetoras são necessárias para

evitar a destruição de fármacos e potencializar sua absorção. Este objetivo pode ser conseguido através da incorporação de fármacos em novos sistemas de administração (AGRAWAL et al., 2014). Um número significativo de sistemas nanocarreadores poliméricos surgiram, englobando diversas vias de administração, para atingir a entrega controlada de fármacos (BIJU et al., 2006).

A nanotecnologia apresenta alguns benefícios tais como: a entrega de fármacos fracamente solúveis em água; pode ter como alvo a entrega de fármacos para partes específicas do trato gastrointestinal; a transcitose de fármacos através da barreira do trato gastrointestinal e a entrega intracelular e transcelular de grandes macromoléculas (FAROKHZAD; LANGER, 2009).

Os sistemas coloidais são permeáveis à barreira gastrointestinal e os possíveis mecanismos de passagem dessas partículas são a captação pela via paracelular, a captação intracelular e o transporte através das células epiteliais da mucosa intestinal além da captação pelo sistema linfático pelas células *M* e de *Peyer* (AHLIN et al., 2002; HUSSAIN; JAITLEY; FLORENCE, 2001; KREUTER, 1991).

Os parâmetros que podem influenciar na absorção intestinal das nanopartículas são descritos como o tamanho da partícula, o potencial zeta, a natureza do polímero, o meio de dispersão, o revestimento da partícula e também a presença de nutrientes no trato gastrointestinal (DELIE, 1998; TOMAR et al., 2011).

O aumento da estabilidade dos nanocarreadores na mucosa intestinal, e posteriormente na circulação sanguínea, podem ser realizados por intermédio de modificações nas propriedades de superfície (tamanho, superfície e carga das partículas), além do meio de dispersão onde as nanopartículas são inseridas para administração (HUSSAIN et al., 2001; TORCHILIN; TRUBETSKOY, 1995).

O mecanismo de adesão ao muco intestinal permite prolongar o tempo de residência do fármaco no sítio de ação o que pode favorecer a absorção, uma vez que o contato direto do fármaco com as células do intestino é o primeiro passo na etapa de absorção. Com isso, acredita-se que o aumento da

biodisponibilidade de fármacos inseridos em nanopartículas é devido ao prolongamento do tempo de contato do medicamento com a mucosa intestinal (PONCHEL; IRACHE, 1998).

3.4.3 Avaliação da citotoxicidade de nanopartículas

É crescente a utilização de nanopartículas no desenvolvimento de diferentes sistemas terapêuticos e medicamentos. Os diferentes tipos de nanopartículas apresentam ampla possibilidade de aplicação na liberação controlada de diversos fármacos e em outros produtos para saúde e diagnóstico (COUVREUR; VAUTHIER, 2006; HOET; BRÜSKE-HOHLFELD; SALATA, 2004; MEDINA et al., 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Porém, alguns estudos têm demonstrado que os materiais nanoparticulados podem levar a eventos biológicos adversos e toxicidade. Os efeitos biológicos adversos podem estar relacionados com diferentes mecanismos, sendo que o mais extensivamente citado é a o dano oxidativo (PULSKAMP; DIABATÉ; KRUG, 2007; XIA, T. et al., 2006; XIA, T.; LI; NEL, 2009). Demonstrou-se, por exemplo, que a administração intravenosa em dose única ou doses repetidas de nanopartículas poliméricas podem induzir modificações no sistema antioxidante hepático, provavelmente devido a produção de espécies reativas ao oxigênio (FERNÁNDEZ-URRUSUNO et al., 1997; HOET et al., 2004).

Os testes *in vitro* são uma importante ferramenta para avaliar a potencialidade de sistemas nanoestruturados em provocar estímulo oxidativo e citotoxicidade, permitindo a comparação da toxicidade de diferentes sistemas nanoestruturados (XIA, T. et al., 2006), e proporcionado indicativos úteis para investigação em estudos *in vivo* (PUJALTÉ et al., 2011). Desta forma, pode ser feita a triagem e seleção de formulações nanotecnológicas para posterior estudo *in vivo*, diminuindo assim a utilização de animais na pesquisa científica. As possíveis limitações que podem ser questionadas com relação aos estudos *in vitro*, relacionadas com a dificuldade de correlação entre os estudos *in vitro* e

in vivo, podem ser superadas pela utilização de testes *in vitro* complementares, com diferentes linhagens celulares (KROLL et al., 2011).

A maioria dos estudos de nanotoxicologia tem focado exhaustivamente no estudo do efeito de nanopartículas principalmente do tipo inorgânicas, como por exemplo, nanoestruturas de carbono ou nanopartículas de dióxido de zinco e de titânio (DIAZ et al., 2008; PULSKAMP et al., 2007; SAYES et al., 2006; YANG et al., 2009). Por exemplo, PUJALTÉ e colaboradores (2011) demonstraram a influência da escala de tamanho de nanopartículas inorgânicas na viabilidade celular, bem como a ocorrência de toxicidade relacionada à produção intracelular de espécies reativas ao oxigênio destas mesmas partículas. Por outro lado, poucos trabalhos tem explorado o efeito de diferentes nanopartículas poliméricas na toxicidade de sistemas *in vitro* com linhagens celulares diversas.

Neste contexto, é primordial que os estudos que avaliem aspectos relacionados à toxicidade de nanopartículas procedam à caracterização físico-química e morfológica rigorosa, a fim de correlacionar as características das nanopartículas com os resultados obtidos na avaliação dos efeitos toxicológicos observados. Dentre as propriedades dos nanomateriais que estão envolvidas em interações biológicas pode-se incluir o tamanho, a forma e as propriedades físico-químicas em geral, como carga, agregação e revestimento (XIA, T. et al., 2009; YANG et al., 2009).

3.5 LÍNGUA ELETRÔNICA

A Língua Eletrônica utilizada na análise dos fármacos consiste de cinco unidades sensoriais, compostas por microelétrodos interdigitados onde estão depositados filmes finos (nanoestruturados) de polímeros condutores. Este conjunto de unidades sensitivas é empregado para avaliar cada uma das amostras separadamente (em termos de capacitância e resistência e elétrica). A impedância elétrica varia de acordo com a composição dos sabores básicos (MUSIO; FERRARA, 1997). Dependendo do material depositado no sensor, o

sistema ajusta a frequência aplicada para ter-se a maior sensibilidade na medida (NAIME; SHINYA; MATTOSO, 2005)

A interpretação dos resultados da língua eletrônica é geralmente realizada através de PCA (*Principal Component Analysis*). A PCA é um método estatístico capaz de reduzir a complexidade de um conjunto de dados de n dimensões (n sensores) para apenas duas dimensões estatisticamente mais significativas (dois componentes principais). Como geralmente os dois componentes principais somam mais de 97%, os demais não possuem significância estatística relevante (NAIME et al., 2005).

Para a análise de agrupamentos (*cluster analysis*) a similaridade entre duas amostras pode ser expressa como uma função da distância entre os dois pontos representativos destas amostras no espaço n-dimensional. A maneira mais usual de calcular a distância entre dois pontos a e b no espaço n-dimensional é conhecida por distância euclidiana (NETO; MOITA, 1998). Os objetos que possuem a menor distância entre si são mais semelhantes, um do outro, do que os objetos com a maior distância (VICINI; SOUZA, 2005).

3.6 BLENDA POLIMÉRICAS

A mistura de polímeros pode proporcionar o desenvolvimento de novos materiais para aplicação farmacêutica por modificação de propriedades como a elasticidade, a resistência, a biodegradabilidade dos polímeros envolvidos bem como a variação do perfil de difusão do fármaco (BAJPAI et al., 2008; KANIS; SOLDI, 2012; LYU et al., 2005)

Devido a pequena quantidade de polímeros que podem ser utilizados in vivo, o interesse pelo estudo de misturas poliméricas tem aumentado. A capacidade de hidratação de um polímero hidrofóbico pode ser modificada através da adição de um polímero com características hidrofílicas através de uma mistura, com conseqüente modificação do perfil de liberação do fármaco (KANIS; SOLDI, 2012). Como conseqüência, pode ocorrer uma diminuição da

resistência mecânica, devido a diminuição da cristalinidade (CHENG, L.; LEI; GUO, 2010; LYU et al., 2005).

3.6.1 *Poli(ϵ -caprolactona)*

A Poli (ϵ -caprolactona) (PCL), é um poliéster alifático semicristalino, biodegradável, com temperatura de fusão de aproximadamente 60°C. É capaz de misturar-se com uma grande variedade de polímeros conferindo interessantes propriedades físico-químicas e mecânicas para os novos dispositivos (LABET; THIELEMANS, 2009; POHLMANN et al., 2013). A sua degradação ocorre principalmente pela hidrólise da ligação éster (DOMINGUES, 2006).

Possui propriedades bioadesivas, característica capaz de conferir um acréscimo na deposição de partículas na região do trato gastrointestinal podendo aumentar a absorção sistêmica de fármacos (LAMPRECHT et al., 2000).

Muitos trabalhos têm utilizando este polímero como carreador de fármaco em sistemas micro e nanoparticulados (LAMPRECHT et al., 2000; PAESE, 2008; SCHAFFAZICK et al., 2002; WEISS-ANGELI, 2007).

3.6.2 *Poli(ϵ -caprolactona) triol*

A poli(ϵ -caprolactona) triol (PCL-T), é um poliéster alifático biodegradável que possui um baixo peso molecular. Possui temperatura de fusão próximo aos 33°C e solubilidade moderada em água (KANIS; GENEROSO; SOLDI, 2007).

É um polímero semelhante à PCL, entretanto sua massa molar é mais baixa e os grupos hidroxila terminais conferem maior caráter hidrofílico (WESSLER, 2007).

Como a PCL-T possui temperatura de fusão abaixo da temperatura corporal, a adição de um polímero biodegradável a uma mistura polimérica capaz de se fundir no organismo pode aumentar a porosidade da matriz através da lixiviação, permitindo dessa forma a liberação do fármaco com uma maior velocidade de degradação polimérica (KANIS; SOLDI, 2012).

3.7 ESTRATÉGIAS DE NANOENCAPSULAÇÃO DO SAQUINAVIR

Alguns estudos já foram realizados com diferentes nanocarreadores a fim de encapsular saquinavir. SegueM abaixo algumas dessas estratégias.

Para aumentar a penetração de saquinavir através da barreira hemato-encefálica, nanopartículas lipídicas sólidas foram preparadas e marcadas com anticorpo monoclonal. Os testes indicaram que as nanopartículas atravessaram o endotélio cerebral além de melhorar a biodisponibilidade de saquinavir (KUO; KO, 2013).

Com o mesmo objetivo de aumentar a permeabilidade de saquinavir através da barreira hemato-encefálica, a permeabilidade de nanopartículas compostas por poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli- (ácido glutâmico- γ) (γ -PGA) e polietilenoimina (PEI) foi estudada. Saquinavir foi encapsulado afim de permear monocamadas de células endoteliais cerebrais microvasculares humanas (HBMECs) em um campo eletromagnético (EMF). Como conclusão o estudo demonstrou que a combinação de PEI / γ -PGA / PLGA e EMF pode ser uma estratégia inovadora para a liberação de saquinavir no cérebro (KUO; YU, 2011).

Nanopartículas lipídicas sólidas e nanossuspensões contendo saquinavir foram preparadas, caracterizadas e um estudo de farmacocinética *in vivo* foi realizado para a melhoria da biodisponibilidade. Esse estudo demonstrou uma maior biodisponibilidade para saquinavir quando comparado com uma microssuspensão do mesmo fármaco (DODIYA et al., 2011).

Para contornar o problema da baixa permeabilidade e consequente biodisponibilidade de saquinavir através da membrana intestinal, estudos foram realizados a fim de nanoencapsular saquinavir. Diferentes formulações de nanocarreadores lipídicos foram propostas, e, por mecanismos diferentes de transcitose, foram capazes de superar o efluxo do fármaco pela Glicoproteína-P, melhorando a sua permeabilidade na membrana intestinal (BELOQUI et al., 2013).

Para aumentar a concentração intracelular de saquinavir, um estudo desenvolveu nanopartículas com poli (óxido de etileno) e poli (ϵ -caprolactona) a fim de encapsular saquinavir. Os resultados demonstraram que as concentrações intracelulares de saquinavir nos macrófagos e monócitos, foram maiores do que para o fármaco livre (SHAH; AMIJI, 2006).

No entanto, nenhum destes estudos desenvolveu nanopartículas poliméricas contendo associação dos polímeros PLC e PCL-T, também não houve estudo quanto ao mascaramento do sabor de fármacos, bem como pouco tem se estudado quanto ao potencial citotóxico de formulações nanotecnológicas.

Este trabalho tem como proposta o desenvolvimento de uma formulação líquida contendo nanocápsulas de saquinavir que possa ser administrada por via oral para auxiliar no tratamento de crianças infectadas pelo vírus HIV, uma vez que atualmente saquinavir só existe na forma farmacêutica de comprimidos e cápsulas de gelatina mole dificultando a administração deste fármaco para essa faixa etária.

4. CAPÍTULO II

Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas poliméricas de saquinavir planejadas para a administração oral

Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas poliméricas de saquinavir planejadas para administração oral

EMANUELLI, J¹; PAGNUSSAT, V¹; KRIESER, K¹; WILLING, J³; BUFFON, A³; DE ARAUJO, B.V.²; KANIS, L⁴; BILATTO, S⁵; CORREA, D S.⁵; KULKAMP-GUERREIRO, I¹

¹Laboratório de Produção de Matéria-prima, Faculdade de Farmácia, UFRGS, ²Departamento de Produção e Controle de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, UFRGS, ³Laboratório de análises bioquímicas e citológicas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, ⁴Mestrado em Ciências da Saúde, UNISUL, ⁵Embrapa Instrumentação

4.1 Resumo

Saquinavir é um medicamento antirretroviral capaz de inibir a protease do vírus da imunodeficiência humana. Apresenta várias limitações em função dos seus efeitos colaterais, baixa biodisponibilidade e ausência de uma formulação líquida adequada para o tratamento de crianças infectadas. O objetivo deste trabalho é desenvolver formulações nanotecnológicas contendo saquinavir utilizando uma mistura de poli- ϵ -caprolactona (PCL) e poli- ϵ -caprolactone triol (PCL-T). As nanocápsulas foram preparadas pela técnica de deposição interfacial de polímeros pré-formados. A caracterização das formulações foi realizada pela análise de diâmetro médio e distribuição do tamanho, potencial zeta, pH, teor de fármaco, taxa de encapsulação e morfologia. O ensaio de liberação *in vitro* foi realizado em membrana de diálise com análise das amostras em intervalos pré-determinados. A estabilidade foi verificada em 90 dias de estocagem com o monitoramento do pH, potencial zeta, diâmetro, teor de fármaco e através da análise de retroespalhamento de luz. A citotoxicidade e o mascaramento do sabor de saquinavir também foram avaliados. Todas as formulações apresentaram tamanho nanométrico e uma boa distribuição de tamanho. A taxa de associação de saquinavir foi maior que 99%. As nanocápsulas apresentaram potencial zeta negativo entre $-9,68 \pm 2,56$ e $-11,93 \pm 1,94$ mV, valores de pH entre $6,41 \pm 0,07$ e $6,67 \pm 0,08$ e morfologia esférica. Os parâmetros avaliados na estabilidade mantiveram-se constantes ao longo do tempo analisado. O ensaio *in vitro* mostrou uma liberação controlada de fármaco a partir das formulações em comparação com o fármaco livre. As formulações não apresentaram toxicidade *in vitro* e foram capazes de mascarar o sabor do saquinavir. Portanto, a associação de polímeros é eficaz para a encapsulação de saquinavir, apresentando características nanotecnológicas adequadas para a sua administração.

Palavras-chave: Administração oral; Nanocápsulas; Saquinavir

4.2 Introdução

Saquinavir foi o primeiro fármaco da classe dos inibidores de protease disponível para o tratamento do HIV e faz parte de um núcleo denominado terapia antirretroviral de alta atividade, regime capaz de reduzir com sucesso a morbidade e mortalidade, melhorando substancialmente os desfechos clínicos de pacientes com AIDS (FLEXNER, 1998).

No entanto, uma série de limitações são encontradas, dificultando explorar seu potencial terapêutico completo (PATHAK et al., 2010). A absorção no trato gastrointestinal e difusão através de barreiras anatômicas é geralmente pobre, contribuindo para uma baixa biodisponibilidade oral (FORD et al., 2004). Além de suas características físico-químicas desfavoráveis para a permeabilidade, acredita-se que a proteína de efluxo, P-gp, dificulta o transporte de saquinavir a partir do intestino e que saquinavir é rapidamente metabolizado aos derivados inativos pelo citocromo P450 (KIM et al., 1998; NOBLE; FAULDS, 1996; WILLIAMS et al., 1992).

O vírus sobrevivendo a exposição ao fármaco pode mutar-se e se tornar resistente. Portanto, é essencial para o sucesso do tratamento da infecção pelo HIV que fármacos administrados por via oral sejam adequadamente absorvidos (PATHAK et al., 2010).

Outro aspecto crítico é a questão do sabor dos medicamentos. Saquinavir apresenta sabor amargo, metálico e adstringente (SCHIFFMAN et al., 1999) e é disponível comercialmente na forma de cápsulas e comprimidos, o que pode dificultar ainda mais a adesão das crianças ao tratamento. A fim de superar esses desafios, novas formulações devem ser desenvolvidas com melhora das características biofarmacêuticas para que aumentem a adesão de adultos e principalmente de crianças ao tratamento.

Nesse contexto o uso de nanotecnologia têm sido bastante explorado para o desenvolvimento de formulações capazes de melhorar a eficácia de fármacos com propriedades físicas problemáticas (DE JAEGHERE et al., 2000).

Muitos trabalhos têm utilizado a nanotecnologia com o propósito de melhorar as características biofarmacêuticas de saquinavir (BELOQUI et al.,

2013; DODIYA et al., 2011; KUO; KO, 2013). Contudo, pouco tem-se explorado a respeito do uso de misturas poliméricas a fim de se estudar novos materiais no desenvolvimento de formulações e o potencial citotóxico que esses materiais podem ter no organismo.

No presente trabalho, nanocápsulas poliméricas foram desenvolvidas a fim de contornar as limitações de saquinavir na terapia contra a infecção pelo HIV. Formulações contendo misturas de polímeros foram desenvolvidas como proposta inovadora, após caracterizadas e estudos de liberação *in vitro*, citotoxicidade e mascaramento do sabor foram conduzidos.

4.3 Metodologia

4.3.1 Materiais

Todos os materiais com exceção da acetona (Nuclear) e etanol (Dinâmica) de grau analítico e acetonitrila (Merck) de grau cromatográfico possuem grau farmacêutico. Foram utilizados mistura de triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico (Brasquim), poli(ϵ -caprolactona) (80.000 g/mol - Sigma Aldrich), poli(ϵ -caprolactona) triol (900 g/mol – Sigma Aldrich) monoesterato de sorbitano (Span 60 - Sigma Aldrich), polissorbato 80 (Tween 80 - Synth), saquinavir base (Cristália), butil-hidroxitolueno (Via Farma), fosfato de sódio dibásico (Synth) e fosfato de potássio monobásico (Nuclear).

4.3.2 Preparação das nanocápsulas

As nanocápsulas foram preparadas através do método de precipitação do polímero pré-formado descrito por Jäger e colaboradores (2009). A composição das formulações contendo o fármaco e da formulação controle (nanocápsulas sem a presença do fármaco) encontra-se na Tabela 4.1.

A dissolução dos componentes da fase orgânica foi realizada em banho-maria (37°C) sob agitação magnética (Marte-Mag-multi). Após a fase aquosa foi adicionada à fase orgânica sob agitação. Posteriormente, a suspensão foi evaporada até o volume final de 10mL em rotaevaporador

(Büchi), para a retirada do solvente orgânico e ajuste da concentração de saquinavir para 1 mg/mL.

Tabela 4.1: Composição das suspensões de nanocápsulas

Composição	Formulações					
	NA	NB	NC	NA'	NB'	NC'
Fase orgânica						
Poli (ϵ -caprolactona) (PCL)	25 mg	50 mg	75 mg	25 mg	50 mg	75 mg
Poli (ϵ -caprolactona) Triol (PCLT)	75 mg	50 mg	25 mg	75 mg	50 mg	25 mg
Monoestearato de sorbitano	38 mg					
TCM	160 μ L					
Etanol	5 mL					
Acetona	27 mL					
Saquinavir	10 mg	10 mg	10mg	-	-	-
Fase aquosa						
Água destilada	54 mL					
Polissorbato 80	76 mg					

Foram testadas diferentes quantidades do polímero PCL e PCLT, resultando em 3 formulações contendo o fármaco e 3 formulações sem fármaco usadas como controle nas determinações de diâmetro, de pH e de potencial zeta e na estabilidade no monitoramento do pH e potencial zeta.

4.3.3 Morfologia das nanocápsulas

A morfologia das nanocápsulas foi analisada através de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para isso, as suspensões foram previamente diluídas (1:10 v/v) e depositadas sobre *grids* de cobre e o acetato de uranila em solução aquosa (2%) foi utilizado como contraste negativo. A morfologia foi determinada no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

4.3.4 Análise do índice de refração

O índice de refração das formulações desenvolvidas foi avaliado através de refratômetro de bancada tipo Abbé, com leitura na escala do índice de refatividade. O prisma do refratômetro foi calibrado com água e a determinação do índice para as amostras foi realizada em triplicata.

4.3.5 Determinação do tamanho de partícula e do potencial zeta

O tamanho das nanopartículas e o índice de polidispersão (IPD) foram determinados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico a 25 °C e o potencial zeta foi determinado pela técnica de mobilidade eletroforética através do equipamento ZetaSizer® (Malvern). As amostras foram diluídas 1:500 em água MilliQ® para determinação do diâmetro e PDI e em solução de NaCl 1mM para determinação do potencial zeta. Após, essas suspensões foram filtradas em membrana com abertura de poro 0,45 µm (PTFE – Millipore) e introduzidas em cubeta apropriada para leitura. As análises foram realizadas em triplicata e os dados analisados através do *software Dispersion Technology* (versão 4.0, 2002, Malvern).

O tamanho das nanopartículas foi determinado também pela técnica de difração de laser por volume através dos valores de diâmetro médio e da distribuição de tamanho das partículas (SPAN) utilizando o equipamento *Mastersizer 2000®* e pela técnica de análise de rastreamento de nanopartículas (NanoSight®).

Para análise pelo método de difração a laser, a amostra foi adicionada diretamente ao recipiente de análise e a água foi utilizada como meio dispersante. As análises foram realizadas em triplicata e os dados foram analisados através do programa *Mastersizer 2000® 5.54 software*. O índice de refração utilizado para a leitura de cada amostra foi o obtido através do ensaio de determinação do índice de refatividade. O valor do tamanho médio (Equação 1) e da distribuição de tamanho (Equação 2) foram obtidos através das seguintes equações:

$$D_{[4,3]} = \frac{\sum d^4}{\sum d^3} \quad (\text{Equação 1})$$

$$D = \frac{(D_{0,9} - D_{0,1})}{D_{0,5}} \text{ (Equação 2)}$$

Onde, D 0,9 é o tamanho que abrange 90 % da curva de distribuição, D 0,1 é o tamanho que abrange 10 % das partículas de menor tamanho sob a curva de distribuição e D 0,5 é o tamanho que representa a mediana da curva de distribuição de tamanhos.

A determinação do diâmetro através da técnica de análise de rastreamento de nanopartículas (ARN) é baseada nas propriedades de espalhamento de luz e movimento browniano da qual se obtém a distribuição de tamanho das partículas das formulações. As análises por ARP foram realizadas através do equipamento NanoSight). O *software* utilizado para capturar e analisar dados foi o NTA 2.0 Build 127. As amostras foram preparadas através da diluição de 10.000 x das formulações em água MilliQ® previamente filtrada (0,45µm, PTFE - Millipore) e foram medidas com detecção automática a uma temperatura de 25°C em triplicata. O tamanho médio e os valores de desvio padrão obtidos pelo *software* correspondem à média aritmética dos valores calculados através dos tamanhos de todas as partículas analisadas pelo *software*.

4.3.6 Determinação do pH

O pH das nanocápsulas foi determinado diretamente nas suspensões a 25 °C por potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 (Digimed). Os resultados representam o valor médio de três determinações.

4.3.7 Análises de retroespalhamento de luz

Um estudo de estabilidade preliminar foi realizado a fim de prever a estabilidade das formulações. O método utilizado foi retroespalhamento de luz (Turbiscan LAb®). Este método pode dar informações sobre a tendência das formulações de sofrerem fenômenos de desestabilização física como cremagem, sedimentação, floculação ou coalescência. A análise é feita através do escaneamento da cubeta da parte inferior para a superior onde se encontra a amostra. As análises foram realizadas a 25 ° C utilizando 20 mL de

formulação sem diluição, ao longo de 60 minutos com uma varredura a cada 5 minutos.

4.3.8 Determinação do teor de saquinavir nas nanopartículas

As amostras para determinação do teor de saquinavir foram preparadas através da diluição das nanocápsulas em acetonitrila (1:100). Uma solução a 5% de BHT foi adicionada na proporção de (1:100) para evitar a degradação do fármaco. Para otimização da extração as amostras foram homogeneizadas em vórtex (3 minutos). Após foram filtradas diretamente para o *vial* utilizando membrana com abertura de poro de 0,45 µm (PTFE – Millipore).

Para determinação do teor de saquinavir foi utilizada uma metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta (CLAE-UV) validada por Krieser e colaboradores (2012). O doseamento de saquinavir nas nanocápsulas foi realizado em cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Perkin Elmer), com detector UV em 237 nm. A coluna utilizada foi *Phenomenex C18* (250 mm x 4,5mm, tamanho de partícula 5 µm) a 25 °C. Os dados foram obtidos e processados através do programa TCNavigator®. O teor de saquinavir foi avaliado em sistema isocrático com um fluxo de 1,4 mL/min utilizando como fase móvel uma mistura de tampão fosfato (50µM) e acetonitrila (60:40) com pH 5,6 ajustado com uma solução de fosfato de sódio dibásico (50µM). Foi utilizado um volume de injeção de 20 µL e as análises foram realizadas em duplicata.

Para a quantificação de saquinavir foi utilizada uma curva de calibração com coeficiente de correlação maior que 0,99. Esta curva foi obtida através da plotagem das áreas dos picos de cinco soluções padrão contendo diferentes concentrações de saquinavir (1 – 16 µg/mL) quantificadas previamente pelo mesmo método.

4.3.9 Determinação da taxa de associação de saquinavir nas nanopartículas

A taxa de associação foi determinada através do método de ultrafiltração-centrifugação, utilizando *centrifugal filters* (Amicon Ultra, Ultracel®, 10,000 MWCO).

O teor total de saquinavir foi determinado através da extração de saquinavir da suspensão de nanocápsulas. Para isso, a suspensão de nanocápsulas foi diluída em acetonitrila na proporção de 1:100. Foi adicionada uma solução de BHT 5% na proporção de 1:100 e após a amostra foi homogeneizada em vórtex (3 minutos). A quantificação do teor total foi determinada por CLAE.

Para a determinação da concentração de saquinavir livre, a suspensão de nanocápsulas (500 µL) foi filtrada em centrífuga (Eppendorf 5417R) durante 20 min a uma velocidade de 4.500 x g e temperatura de 24 °C. Uma solução de BHT 5% (1:1) foi adicionada ao filtrado e, após, o mesmo foi analisado por CLAE-UV.

A taxa de associação (E) foi determinada a partir da razão entre a diferença da concentração total de saquinavir na amostra (CT) e a concentração de saquinavir livre (CL) e a concentração total, multiplicada por 100 (Equação 3).

$$E = \frac{CT - CL}{CT} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

4.3.10 Avaliação da estabilidade do saquinavir

A avaliação da estabilidade das suspensões de nanocápsulas de saquinavir foi realizada nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 dias em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os parâmetros avaliados foram tamanho de partícula e índice de polidispersão (IPD) (Zetasizer, Malvern), pH (Digimer), potencial zeta (Zetasizer, Malvern) e teor total (CLAE-Perkin Elmer).

4.3.11 Liberação *in vitro* e modelagem matemática

A liberação *in vitro* de saquinavir a partir das nanocápsulas foi avaliada pelo método de difusão. Dois mililitros das formulações foram adicionadas dentro da membrana de diálise (25mm - Sigma-Aldrich) e após foram

colocados em 150 mL de solução tampão (tampão fosfato contendo 2% de polissorbato 80, pH 6,8) previamente filtrado utilizando uma membrana com porosidade de 0,45 µm (Millipore, Brasil).

Esse sistema foi mantido sob agitação a 37 °C. A condição *sink* foi mantida durante o experimento. Alíquotas de 1,0 mL do meio de liberação foram coletadas para análise em intervalos pré-determinados e diretamente analisadas por CLAE (Perkin-Elmer). A concentração de saquinavir nas amostras obtidas no estudo de liberação foi comparada com às obtidas a partir de uma solução padrão do fármaco, analisada nas mesmas condições utilizando um *software* computacional (Microsoft Office Excel 2007).

Os perfis de liberação obtidos foram modelados utilizando o programa *KinetDS3.0*, conforme cinética de ordem zero (Equação 4), primeira ordem (Equação 5), segunda ordem (Equação 6) e modelo de Korsmeyer-Peppas (Equação 7). A seleção do modelo matemático semi-empírico foi baseada no maior coeficiente de correlação, critérios de melhor seleção de modelo (Akaike) e melhor ajuste gráfico dos pontos experimentais.

$$Q=k \cdot t+Q_0 \text{ (Equação 4)}$$

$$Q=Q_0 e^{k \cdot t} \text{ (Equação 5)}$$

$$1/Q =k \cdot t + 1/Q_0 \text{ (Equação 6)}$$

$$Q=k \cdot t^n \text{ (Equação 7)}$$

Onde Q é quantidade (%) de fármaco liberado no tempo t , Q_0 é o valor inicial de Q , t é o tempo, k é a constante de velocidade e n é o expoente de liberação.

4.3.12 Citotoxicidade em linfócitos T humano

O teste de citotoxicidade das nanocápsulas contendo fármaco, controle e do fármaco livre em DMSO foi realizado em linfócitos T humano, através da técnica de viabilidade celular por ensaio de exclusão de Azul de *Trypan*. A extração dos linfócitos a partir do sangue total foi realizada com reagente Histopaque®. Após a extração foi adicionado meio RPMI zero (sem soro fetal bovino) aos linfócitos e este foi centrifugado (Eppendorf centrifuge 5804) por 10

minutos a 1.500 x g. Após a quarta lavagem com meio RPMI zero, o *pellet* formado foi ressuspenso com meio RPMI suplementado com 10% soro fetal bovino.

A contagem de linfócitos contendo azul de *Trypan* foi feita em microscópio (Olympus IX71) com o auxílio da câmera de Neubauer para plaquear a quantidade de 10.000 células por poço (placa de 96 poços) e após as formulações foram adicionadas diretamente na proporção de 1:10 nas concentrações de 0,5 e 1 μ M. A placa foi incubada em estufa de CO₂ a 37°C por 24 horas.

Após o período de incubação, foi adicionado azul de *Trypan* às suspensões de linfócitos (1:1) para contagem em microscópio. Os resultados são expressos como percentual em relação aos controles.

A morfologia dos linfócitos foi analisada em microscópio (Nikon - Eclipse TE300), após a exposição ao fármaco na sua forma livre e nanocapsulado e à nanocápsulas controle sem a presença de corante.

4.3.13 Língua eletrônica

A Língua Eletrônica utilizada consiste de cinco unidades sensitivas, sendo cada uma composta por eletrodos interdigitados recobertos por filmes finos (nanoestruturados) de polímeros condutores (PANI/PSS). As cinco unidades sensitivas foram recobertas por 0, 1, 3, 5 e 7 bicamadas dos filmes poliméricos nanoestruturados utilizando a técnica de automontagem. Este conjunto de unidades sensitivas foi empregado para avaliar cada uma das amostras separadamente (em termos de capacitância e resistência e elétrica). Após preparação das soluções, a língua eletrônica foi inserida em um recipiente contendo cada uma das soluções isoladas, e mediu-se, em triplicata, a capacitância das soluções na frequência de 1 KHz, utilizando-se um analisador de impedância.

Os resultados foram interpretados por meio da técnica estatística de *Principal Component Analysis* (PCA) e distância Euclidiana.

4.3.14 Análise Estatística

Os resultados foram avaliados através do teste-t ou da análise da variância (ANOVA) seguido do teste de *Tukey* utilizando o programa *GraphPad 6.0*. A diferença foi considerada como sendo estatisticamente significativa quando o valor de $p \leq 0,05$. Os resultados são apresentados em média (n=3) com o respectivo valor de desvio padrão.

4.4 Resultados e discussões

4.4.1 Caracterização das nanocápsulas desenvolvidas

4.4.1.1 Determinação do tamanho de partícula

As formulações desenvolvidas apresentaram-se como um líquido leitoso, homogêneo e opaco com reflexo azulado característico do efeito *Tyndall* decorrente do movimento browniano das nanopartículas (MAGENHEIM; BENITA, 1991) homogêneo, opaco, sem a presença de grumos ou odor característico.

A determinação do diâmetro médio das partículas permite avaliar fenômenos físicos como a tendência a cremagem e sedimentação, por mudanças na distribuição do tamanho das partículas ao longo do tempo (SCHAFFAZICK et al., 2003). Fatores como método de preparo, natureza e a concentração do polímero e do óleo na solução orgânica entre outros são determinantes no tamanho das nanopartículas (LEGRAND et al., 1999). No caso de nanocápsulas o óleo utilizado como núcleo é fator determinante do seu tamanho (SCHAFFAZICK et al., 2003). O índice de refração das nanopartículas foi determinado e os valores obtidos para ambas as formulações não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$), portanto o valor médio de $1,336 \pm 0,002$ obtido foi utilizado como parâmetro para a determinação do diâmetro pelo método de difração a laser (Mattersizer 2000®).

Na Figura 4.1 encontra-se a escala de distribuição de tamanho das nanocápsulas obtida através da técnica de difração a laser para as três formulações desenvolvidas (n=3). Pode-se observar que as formulações

apresentaram distribuição de tamanho unimodal e dentro do intervalo de escala nanométrica.

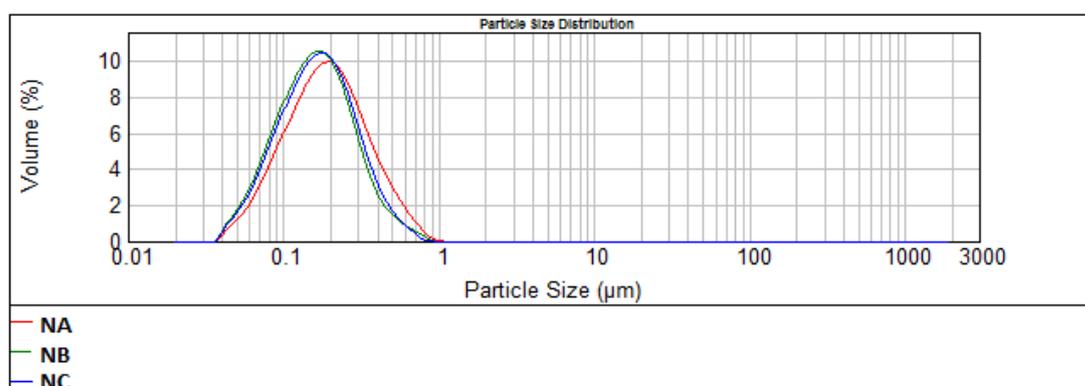


Figura 4. 1: Escala de distribuição e tamanho das nanocápsulas NA, NB e NC

Na Tabela 4.1 encontram-se os valores de diâmetro médio e o respectivo valor de desvio padrão (n=3) das formulações contendo o fármaco e controles obtidos pelas diferentes técnicas:

Tabela 4.1: Valores de diâmetro médio (nm) das nanocápsulas obtidos pelos diferentes métodos

Formulação	LD		DLS		ARN
	D(4,3) ± DP	Span ± DP	Diâmetro médio (nm) ± DP	IPD ± DP	Diâmetro médio ± DP
NA	225 ± 4*	1,693 ± 0,05	222 ± 34	0,200 ± 0,08	197 ± 54
NB	192 ± 22	1,553 ± 0,05	199 ± 12	0,170 ± 0,06	195 ± 61
NC	172 ± 18	1,445 ± 0,14	192 ± 18	0,161 ± 0,08	184 ± 53
NA'	205 ± 17	1,674 ± 0,06	189 ± 6	0,080 ± 0,02	205 ± 89
NB'	192 ± 21	1,570 ± 0,07	197 ± 4	0,112 ± 0,02	202 ± 63
NC'	185 ± 3	1,574 ± 0,02	181 ± 6**	0,076 ± 0,03	181 ± 56

Onde, LD (difração de laser), DLS (espalhamento de luz dinâmico) e ARN (análise de rastreamento de partículas).

*Diferença significativa em relação ao controle (p<0,05, Tukey)

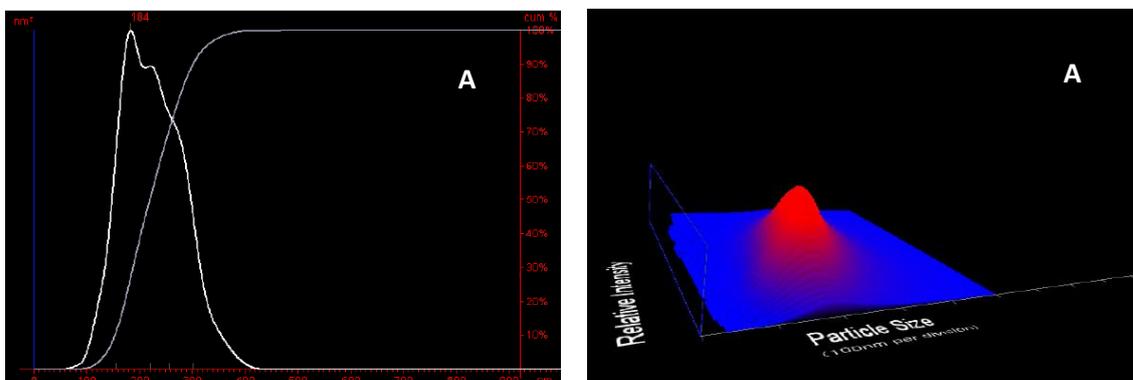
**Diferença significativa em relação as demais formulações (p<0,05, ANOVA)

Independente da técnica utilizada os valores de diâmetro encontrados foram nanométricos e próximos entre si. A análise estatística realizada para os valores de diâmetro obtidos pela técnica de difração a laser (LD) nas formulações controle (NA', NB' e NC') mostrou que não existe diferença significativa (p>0,05) no tamanho das nanocápsulas em relação a proporção de

polímero utilizado. Quando comparados os controles com as formulações contendo saquinavir, houve diferença significativa ($p < 0,05$) apenas para a formulação contendo maior quantidade de PCL-T (NA), demonstrando que a presença do fármaco interfere no tamanho apenas para essa proporção de polímero. Todas as formulações apresentaram uma boa distribuição de tamanho com valores de SPAN menores que 2.

Pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) o resultado da análise estatística demonstrou haver diferença significativa em relação ao diâmetro nas nanocápsulas quando comparadas entre si (NA', NB', NC') em relação a proporção de polímero utilizado. A formulação contendo a menor quantidade de PCL-T (NC') possui nanocápsulas com diâmetro menor que as demais formulações. Quando comparadas com suas formulações controle, as formulações contendo o fármaco não tiveram seu tamanho alterado em função da presença do fármaco ($p > 0,05$). O valor do índice de polidispersão foi menor ou igual a 0,2 para todas as formulações, sugerindo boa distribuição de tamanho conforme os valores obtidos pela técnica de difração de laser.

O diâmetro médio foi determinado também pela técnica de rastreamento de nanopartículas (ARN), a fim de confirmar os valores obtidos pelas demais técnicas utilizadas. Com essa técnica é possível determinar o tamanho de partículas com tamanho entre 30 e 1000 nm onde o *software* é capaz de identificar e rastrear nanopartículas individuais que circulam em movimento browniano (FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010). A Figura 4.2 demonstra os gráficos de distribuição de partícula obtidas pela técnica de ARP das formulações contendo saquinavir:



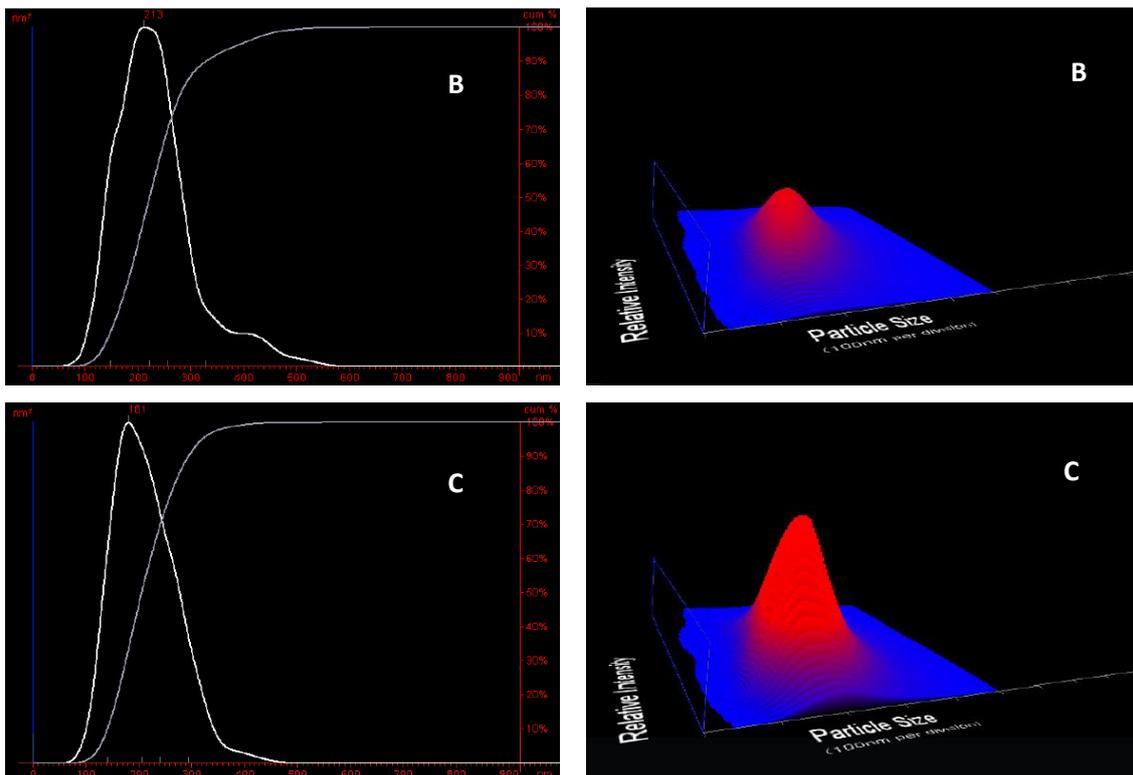


Figura 4. 2: Gráficos de distribuição de tamanho obtidos pela técnica de ARP para nanocápsulas contendo saquinavir, onde A (NA), B (NB), C (NC)

Conforme a Figura 4.2A é possível observar a presença de um pico médio e outro próximo indicando a presença de uma segunda população com tamanho de partícula próximo aos valores médios. Uma segunda população é também observada na Figura 4.2B, com valores mais distantes da média. A Figura 4.2C possui a presença de apenas uma população, com uma maior concentração das partículas mais próximo da média e este resultado confirma um menor valor de diâmetro médio encontrado para esta formulação pela técnica de espalhamento de luz dinâmico.

Embora uma segunda população tenha sido detectada nas formulações NA e NB, os valores de diâmetro permaneceram dentro da escala de tamanho nanométrico e os valores médios de diâmetro encontrados nas formulações ficaram próximos dos valores encontrados pelas demais técnicas.

4.4.1.2 Determinação do pH, teor total, potencial zeta e taxa de associação de saquinavir

Na Tabela 4.2 encontram-se os valores de pH, potencial zeta, teor total e taxa de associação obtidos após a preparação das formulações.

Tabela 4.2: Valores de pH, potencial zeta (mV), teor total (mg/mL) e taxa de associação (%)

Formulação	pH \pm DP	Potencial zeta (mV) \pm DP	Teor (mg/mL) \pm DP	Taxa de associação (%)
NA	6,41 \pm 0,080	- 9,68 \pm 2,56	0,819 \pm 0,052	99,4
NB	6,51 \pm 0,056	- 11,93 \pm 1,94	0,844 \pm 0,055	99,2
NC	6,67 \pm 0,078	- 10,49 \pm 1,53	0,873 \pm 0,079	99,1
NA'	5,92 \pm 0,177	- 10,83 \pm 2,40	-	-
NB'	6,02 \pm 0,160	- 10,36 \pm 1,12	-	-
NC'	6,06 \pm 0,137	- 9,11 \pm 1,04	-	-

Conforme a Tabela 4.2, todas as formulações apresentaram um valor de pH levemente ácido. A presença do fármaco nas formulações contribuiu significativamente para um leve aumento do pH quando comparado com as formulações controle ($p < 0,05$). Saquinavir é uma base fraca, portanto sua presença na formulação pode contribuir para um leve aumento do pH. A proporção de polímero não influenciou no valor de pH das formulações ($p > 0,05$). Valores de pH próximos a 6,5 foram encontrados para formulações de nanocápsulas de PCL contendo benzofenona-3 em trabalho desenvolvido por PAESE, (2008).

O potencial zeta está relacionado ao potencial de superfície das partículas e foi negativo em função do constituinte da parede polimérica, componente principal das nanocápsulas, ser a poli- ϵ -caprolactona (PCL)/ poli- ϵ -caprolactona triol (PCLT). A carga negativa se deve ao caráter não iônico dos polímeros e da presença de polissorbato 80 na interface partícula / água. A densidade de carga negativa está relacionada com as estruturas químicas dos polímeros, e os baixos valores, em módulo, de potencial zeta são devido ao

revestimento de polissorbato 80, o que estabiliza as nanocápsulas por um mecanismo estérico (CATTANI et al., 2010).

Os valores de potencial zeta encontrados ficaram próximos a -10 mV para todas as formulações desenvolvidas e a presença do fármaco não influenciou a carga de superfície das partículas. O mesmo valor de potencial zeta, em torno de -10 mV, foi encontrado em nanocápsulas de indometacina desenvolvidas com PCL e polissorbato 80 (CATTANI et al., 2010).

Os valores de teor total encontrados nas formulações foi próximo ao valor teórico de 1 mg/mL e não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as formulações. A taxa de associação de saquinavir às nanocápsulas foi superior a 99% independente da proporção de polímero. Esse percentual indica uma elevada capacidade de encapsulação do fármaco devido a sua alta lipofília e capacidade de se solubilizar no componente oleoso.

4.4.1.3 Morfologia das nanocápsulas

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) tem sido muito empregada a fim de se obter informações a respeito do diâmetro e da morfologia das nanocápsulas (SCHAFFAZICK et al., 2003). A morfologia das nanocápsulas desenvolvidas encontram-se na Figura 4.3.

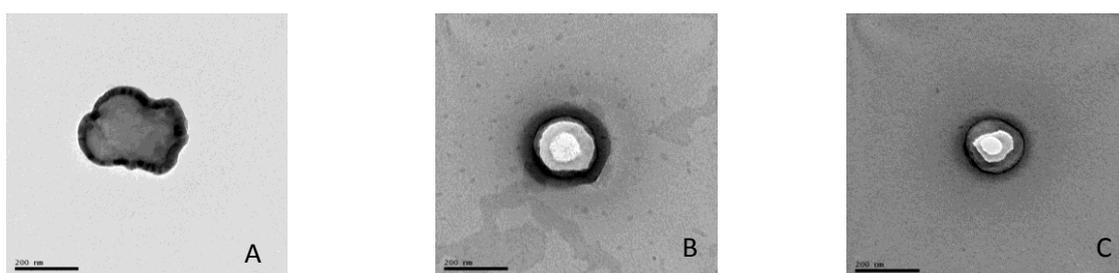


Figura 4. 3: Fotomicrografia das nanocápsulas poliméricas de saquinavir (150.000 x), onde A (NA), B (NB) e C (NC)

As nanocápsulas desenvolvidas apresentaram-se como esferas com bordas regulares para as formulações com menores quantidades de PCL-T (B, C) e borda irregular para a formulação com maior quantidade de PCL-T (A). A irregularidade da borda na formulação contendo maior quantidade de PCL-T se deve provavelmente ao fato de que esse polímero possui uma maior

flexibilidade devido a sua massa molar ser mais baixa com os grupos hidroxila terminais conferindo um maior caráter hidrofílico a PCL-T (WESSLER, 2007).

Por essa técnica pode-se também confirmar que as formulações apresentaram tamanho nanométrico e que os valores encontrados estão de acordo com as demais técnicas empregadas para determinação do diâmetro.

4.4.2 Estabilidade

Embora o processo de sedimentação seja lento devido a minimização pelo movimento Browniano, com o tempo, as nanopartículas podem sofrer fenômenos de aglomeração com conseqüente sedimentação. O monitoramento dos parâmetros como diâmetro médio de partícula, pH, potencial zeta e teor de fármaco podem fornecer informações importantes a respeito da estabilidade das suspensões coloidais (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Após a caracterização físico-química, um estudo de estabilidade foi conduzido a fim de acompanhar o comportamento dessas formulações com análise dos parâmetros nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 dias. As formulações foram armazenadas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Os valores médios de diâmetro obtidos após estocagem por 90 dias estão representados na Figura 4.4. Os valores diâmetro da formulação NA alteram-se significativamente ($p < 0,05$) nos tempos 15 e 60 dias, porém retornaram aos valores iniciais obtidos. Os valores de diâmetro das formulações NB e NC permaneceram constantes nos tempo analisado. Essa variação de tamanho observada na formulação NA, é, provavelmente, devido a maior quantidade do polímero PLC-T. Como observado na morfologia, as nanocápsulas produzidas com essa proporção de polímeros possuem uma maior flexibilidade em torno das vesículas, e estas, portanto, podem estar se agregando ou se dividindo com o passar do tempo formando populações com tamanhos diferenciados.

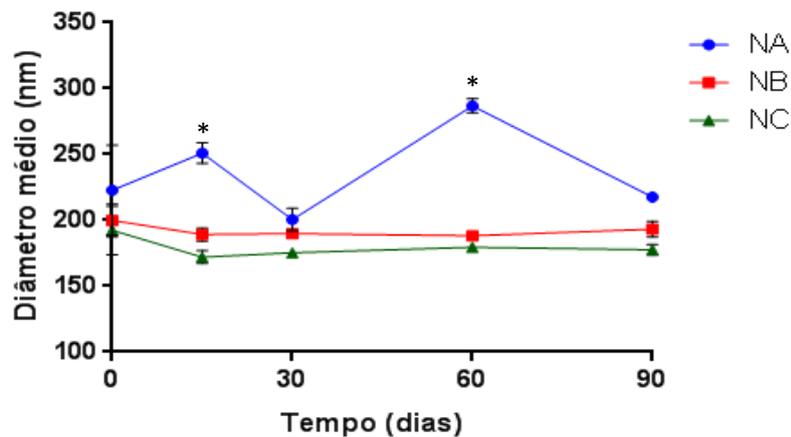


Figura 4. 4: Diâmetro médio das nanocápsulas das formulações NA, NB e NC, nos tempos 0,15, 30, 60 e 90 dias (n=3)

*Diferença significativa em relação aos demais tempos ($p < 0,05$, ANOVA)

Os valores do índice de polidispersão das formulações estão representados na Figura 4.5. Assim como observado para o valor de diâmetro médio, o índice de polidispersão alterou significativamente seu valor ($p < 0,05$) nos tempos 15 e 60 dias para a formulação NA. Para as demais formulações o valor da polidispersão permaneceu em uma faixa de valor não superior a 0,2, indicando boa distribuição de tamanho. Esse aumento do valor do índice para a formulação NA, ocorreu juntamente com o aumento de diâmetro observado na Figura 4.4, o que pode indicar uma tendência a desestabilização do sistema.

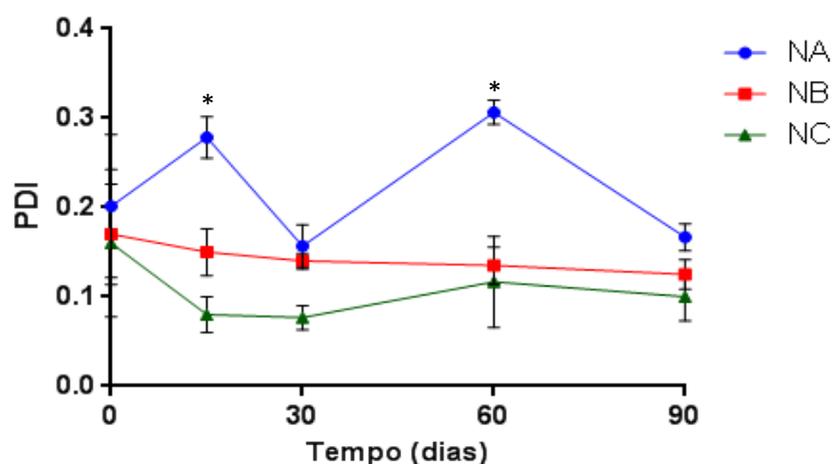


Figura 4. 5: Valor do índice de polidispersão das nanocápsulas das formulações NA, NB e NC, nos tempos 0,15, 30, 60 e 90 dias (n=3)
*Diferença significativa em relação dos demais tempos ($p < 0,05$, ANOVA)

Conforme a Figura 4.6, o percentual de fármaco recuperado durante a estocagem permaneceu constante no tempo analisado. Este resultado demonstra que o fármaco é capaz de se manter estável nas formulações desenvolvidas pelo período analisado.

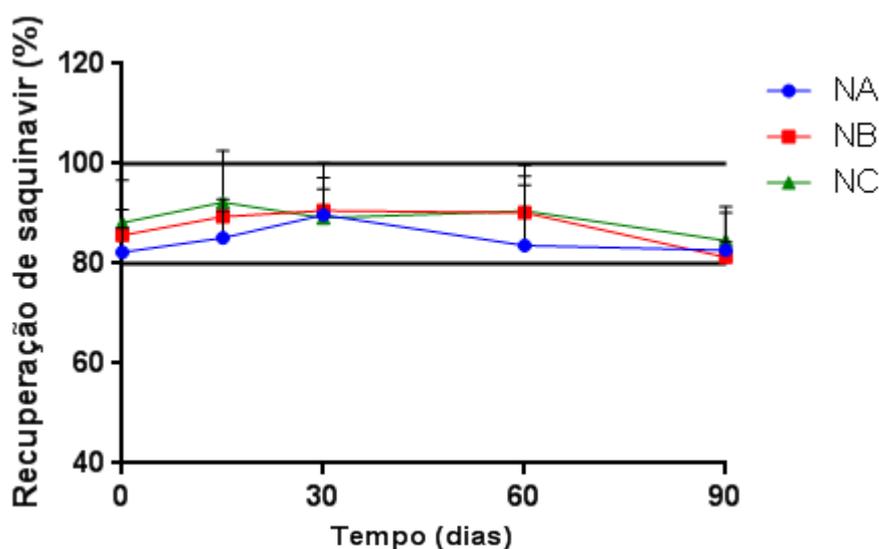


Figura 4. 6: Percentual de recuperação de saquinavir das formulações NA, NB e NC, nos tempos 0,15, 30, 60 e 90 dias (n=3)

Os valores de pH diminuíram com o passar do tempo, conforme a Figura 4.7a. Essa diminuição foi mais acentuada nos primeiros 30 dias de estocagem

e os valores foram se estabilizando com o passar do tempo. Essa diminuição do valor de pH não parece estar relacionada ao fármaco uma vez que as formulações de nanocápsulas controle também diminuíram o pH durante o tempo de estocagem (Figura 4.7b). Segundo Schaffazick e colaboradores (2003), a diminuição de pH das nanocápsulas que ocorre em um curto período de tempo pode ser devido a ionização dos grupos carboxila presentes ou a hidrólise do polímero.

MULLER (1999) também observou diminuição no valor do pH de nanocápsulas e nanoesferas de PCL contendo diclofenaco após armazenamento. A diminuição foi explicada como uma provável degradação do polímero durante o armazenamento.

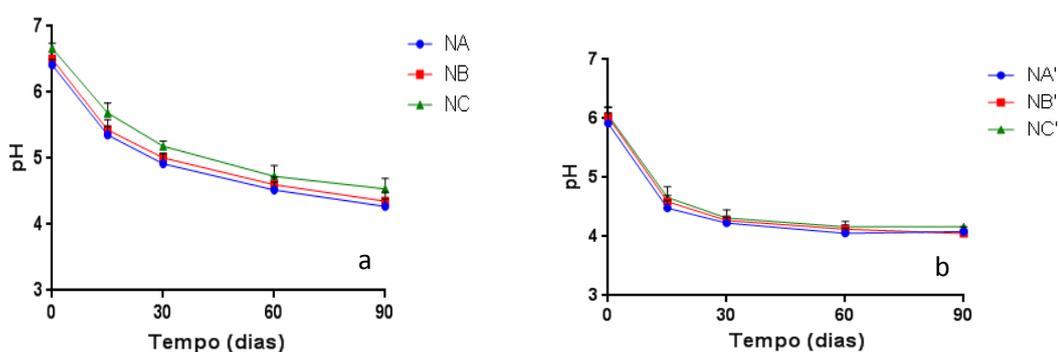


Figura 4. 7: Valores de pH das formulações NA, NB e NC (a) e NA', NB', NC' (b), nos tempos 0,15, 30, 60 e 90 dias (n=3)

A variação do potencial zeta das nanocápsulas de saquinavir durante a estocagem estão representados na Figura 4.8a. Não houve variação significativa do potencial zeta entre as formulações e os valores mantiveram-se constantes durante o período analisado. Esse resultado demonstra que o sistema mantém-se estabilizado com manutenção da carga e prevenção da agregação uma vez que se mantém a repulsão entre as partículas. A presença do fármaco não influenciou o potencial zeta das nanocápsulas durante o período analisado (Figura 4.8b) uma vez que as nanocápsulas controle tiveram comportamento semelhante durante a estocagem com manutenção da carga durante o período analisado.

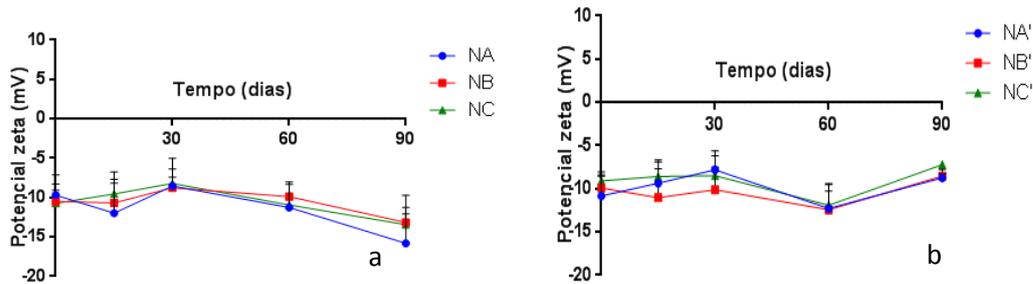


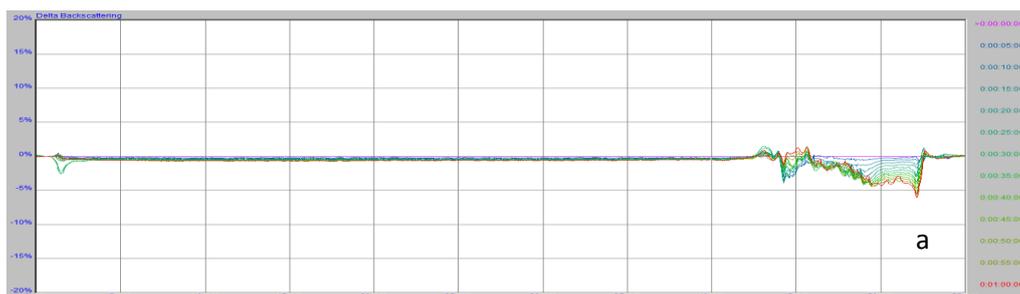
Figura 4. 8: Potencial zeta das formulações NA, NB e NC (a) e NA', NB', NC' (b), nos tempos 0,15, 30, 60 e 90 dias (n=3)

4.4.3 Análises de retroespalhamento de luz

A análise de retroespalhamento de luz foi realizada no equipamento denominado Turbiscan Lab[®]. Essa técnica consiste na avaliação da transmissão e do retroespalhamento de luz através de uma fonte de infravermelho com detectores que medem a intensidade da luz que é transmitida ou refletida através da amostra. Fenômenos de instabilidade reversíveis como sedimentação e cremagem e irreversíveis como floculação e coalescência podem ser detectados por essa técnica.

A principal vantagem dessa técnica é a detecção do fenômeno com rapidez e segurança, sendo que esses podem ser detectados antes de serem percebidos pelo olho humano (LEMARCHAND et al., 2003). Para sistemas opacos, o fenômeno é percebido através da variação do retroespalhamento de luz e para sistemas translúcidos através da análise de variação da transmissão da luz (SIQUEIRA, 2008).

A Figura 4.9 representa a variação de retroespalhamento de luz das formulações contendo saquinavir. A parte esquerda do gráfico refere-se à leitura da base de cubeta e parte direita o topo.



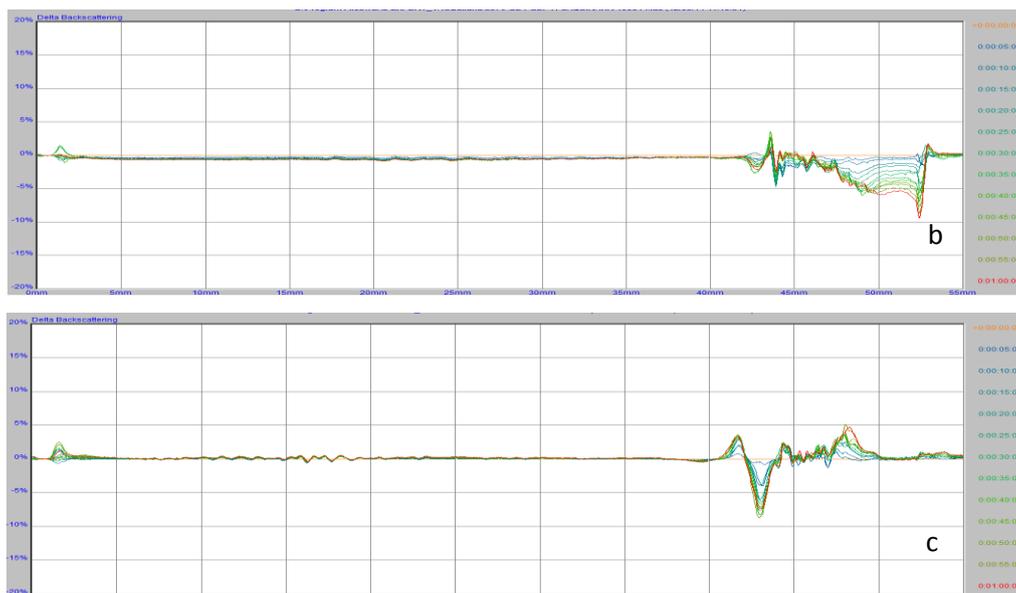


Figura 4. 9: Gráficos da variação de retroespalhamento de luz das formulações onde, a: NA, b: NB, c: NC

É possível observar que houve um aumento na variação de retroespalhamento na base da cubeta indicando um maior volume de partículas nessa região para as formulações NB e NC, e uma diminuição no topo da cubeta indicando uma menor concentração de partícula em todas as formulações, demonstrando uma leve tendência a sedimentação, uma vez que o aumento do retroespalhamento de luz no topo da cubeta indica fenômenos de cremagem e a diminuição indica fenômenos de sedimentação. O polímero torna a partícula mais densa que a fase contínua, portando a tendência à sedimentação é um fenômeno esperado, uma vez que as partículas encontram-se em suspensão (CONTRI et al., 2011).

A oscilação do aumento e diminuição simultâneo do retroespalhamento, como ocorre no topo da cubeta para a formulação NC, indica que há diferença no tamanho das partículas (SIQUEIRA, 2008). Entretanto, essa alteração de diâmetro não foi observada pelas demais técnicas de determinação de distribuição de tamanho e durante o período de estocagem por 90 dias.

Em relação a análise da parte central do gráfico não foi observada variação no valor de retroespalhamento, indicando que não existe tendência a ocorrência de fenômenos irreversíveis como coalescência e floculação nas formulações desenvolvidas.

4.4.4 Liberação *in vitro*

O conhecimento sobre a extensão e a velocidade com que o fármaco é liberado do sistema carreador é de grande importância quando se desenvolve formulações nanotecnológicas, pois fatores como previsão do seu comportamento *in vivo*, entendimento dos mecanismos de liberação do fármaco a partir do sistema após administração e elucidação da estrutura da partícula podem ser entendidos (WASHINGTON, 1989),

Muitos métodos têm sido descritos para elucidar o perfil de liberação das substâncias a partir do carreador (WASHINGTON, 1990). Porém muitos deles apresentam o inconveniente devido a dificuldade de separação das partículas da solução onde o fármaco encontra-se dissolvido, com eficiência e rapidez (MAGENHEIM; BENITA, 1991). O método de membrana de diálise tem sido amplamente utilizado como metodologia de avaliação da liberação dos fármacos a partir das nanopartículas. Nesse método, as nanopartículas são separadas do meio através de membranas de diálise que são permeáveis ao fármaco livre, mas impermeáveis a estas (SHEN; BURGESS, 2013).

A manutenção da condição *sink* durante o experimento é fundamental e se o fármaco é pouco solúvel em água, pode ser permitido adicionar solventes não aquosos ou agentes solubilizantes (WASHINGTON, 1990). Devido à baixa solubilidade de saquinavir no tampão pH 6,8 foi adicionado polissorbato 80 a fim de proporcionar um aumento de sua solubilidade como garantia da condição *sink*.

A liberação do fármaco pode se dar por diferentes processos. A difusão é caracterizada pelo coeficiente de partição que resulta em tempos de liberação da ordem de horas ou minutos. O carreador mantém a sua integridade estrutural nesta situação. O fármaco irá difundir para fora do carreador até que o equilíbrio de partição seja alcançado (WASHINGTON, 1990).

O carreador pode também ser degradado e neste caso, a acumulação do fármaco resulta da erosão do carreador. Esse perfil de liberação é muito mais rápido do que a liberação controlada pelo processo de difusão. Na prática,

o perfil de liberação de uma substância pode também ser uma combinação destes mecanismos (WASHINGTON, 1990).

O estudo de liberação de saquinavir em suspensões de nanocápsulas foi realizado e os resultados obtidos foram expressos em percentagem de fármaco liberado *versus* tempo (horas) e podem ser visualizados na Figura 4.10.

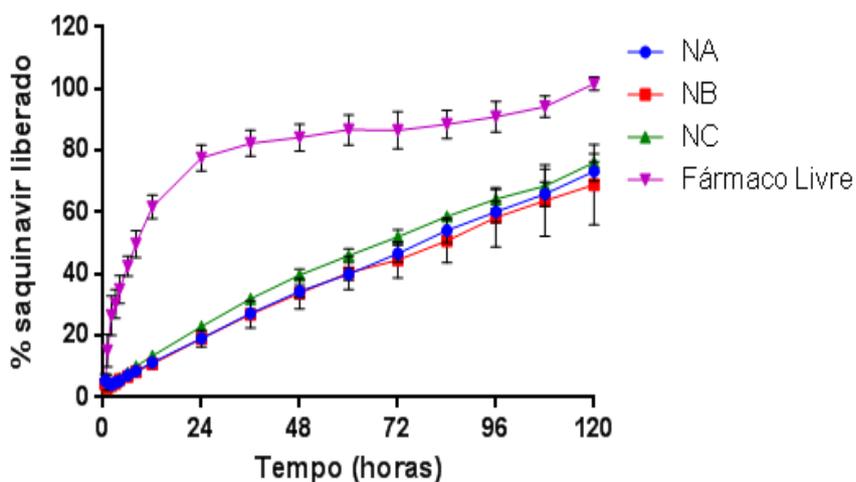


Figura 4. 10: Liberação de saquinavir a partir das nanocápsulas em meio de liberação pH 6,8

Conforme a Figura 4.10, a liberação de saquinavir em meio pH 6,8 resultou em diferentes perfis do fármaco nanoencapsulado e livre. As formulações desenvolvidas apresentaram um perfil linear com liberação controlada de saquinavir quando comparadas com o fármaco livre, que apresentou em torno de 80 % de liberação do fármaco para o meio em 24 horas, sendo que para as nanocápsulas esse percentual foi atingido em 120h. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as formulações quando comparadas entre si, demonstrando que a proporção de polímero utilizada não afeta o perfil de liberação de saquinavir em meio de liberação pH 6,8.

Em trabalho desenvolvido por FERREIRA (2007) um perfil semelhante de liberação do fármaco camptotecina foi observado para as nanocápsulas desenvolvidas com PLA/PLA-PEG. A liberação do fármaco nas nanocápsulas não ultrapassou 60 % de liberação em 100 horas de experimentação, sendo

que 70% de liberação de captotencina na sua forma livre foi observado em 5 horas.

A cinética de liberação foi avaliada e o modelo que mais se adequou ao perfil de liberação de saquinavir a partir das nanocápsulas foi cinética de ordem zero, com valor de coeficiente de correlação maior que 0,98 para as três formulações e valor de critério de AKAIKE maior que 5,45, conforme a Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Valores de coeficiente de correlação (r^2), critério de seleção do modelo (AIC) obtidos dos diferentes modelos e valor de n obtido pela aplicação do modelo de Korsmeyer-Peppas.

Formulação	Ordem zero		Primeira ordem		Segunda ordem		Korsmeyer-Peppas
	r^2	AIC	r^2	AIC	r^2	AIC	n
NA	0,9977 ± 0,000	5,45 ± 0,23	0,8860 ± 0,013	1,42 ± 0,01	0,6588 ± 0,045	2,56 ± 0,88	0,58 ± 0,04
NB	0,9950 ± 0,002	6,68 ± 0,39	0,8690 ± 0,011	1,44 ± 0,04	0,6224 ± 0,019	2,67 ± 0,03	0,61 ± 0,00
NC	0,9891 ± 0,001	8,49 ± 0,01	0,8439 ± 0,004	1,49 ± 0,01	0,5687 ± 0,030	2,89 ± 0,09	0,60 ± 0,00

As formas farmacêuticas que seguem o perfil de cinética de ordem zero são capazes de liberar a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo, sendo este o modelo ideal para as formas farmacêuticas de liberação prolongada (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

Para entendimento do mecanismo de liberação de saquinavir a partir das nanocápsulas a lei de potência (modelo Korsmeyer-Peppas) para foi aplicada ($f_t = a \cdot t^n$). Esta equação é capaz de dar informações a respeito da fração dissolvida (f_t) no tempo (t), onde n é o expoente de liberação que indica o mecanismo de liberação do fármaco e a é a constante que incorpora as características estruturais e geométricas da forma. Quando o sistema é esférico, $n=0,43$ indica um processo de difusão do fármaco através da parede polimérica, $n=0,85$ indica um processo de erosão da matriz polimérica e $0,43 < n < 0,85$ indica transporte anômalo (combinação dos processos de erosão e difusão) (SCHAFFAZICK et al., 2003; SIEPMANN; PEPPAS, 2012).

Os valores de n encontrados para as formulações foram 0,58, 0,61 e 0,60 para as formulações NA, NB e NC, respectivamente. Aplicando a lei de

potência, pode-se concluir que o processo de liberação de saquinavir a partir das nanocápsulas desenvolvidas é anômalo, onde a combinação dos processos de difusão e erosão da mistura de polímeros é o que explica a liberação do fármaco.

Jagër e colaboradores (2009), observaram o mesmo mecanismo de liberação anômalo das nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo éster etílico de indometacina desenvolvidas, através da aplicação do modelo Korsmeyer-Peppas.

4.4.5 Citotoxicidade em linfócitos T humanos

As nanopartículas podem atuar no corpo humano produzindo não apenas efeitos biológicos desejáveis, mas também efeitos indesejados (HOET et al., 2004; MEDINA et al., 2007). Em contraste a ampla divulgação científica dos benefícios das nanopartículas para uso terapêutico, pouca atenção tem sido dada para a avaliação dos efeitos indesejáveis e tóxicos que as nanopartículas podem causar em meio biológico (HOET et al., 2004; MEDINA et al., 2007).

Com essa preocupação, um ensaio de citototoxicidade foi proposto a fim de se conhecer o potencial efeito citotóxico das formulações. Os modelos de cultura de células são muito úteis para estudos fisiológicos e toxicológicos pré-clínicos (CHUEH et al., 2014).

O Teste de exclusão de azul de *trypan* é um teste de viabilidade celular capaz de corar células desprovidas de membrana intacta, enquanto células viáveis não são capazes de se corar, permitindo assim a distinção das mesmas (SANTOS, 2012).

A viabilidade celular de linfócitos T humanos, avaliada após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de saquinavir (0,5 e 1 μ M) nas formas nanoencapsulado e à exposição de nanocápsulas controle está representada na Figura 4.11.

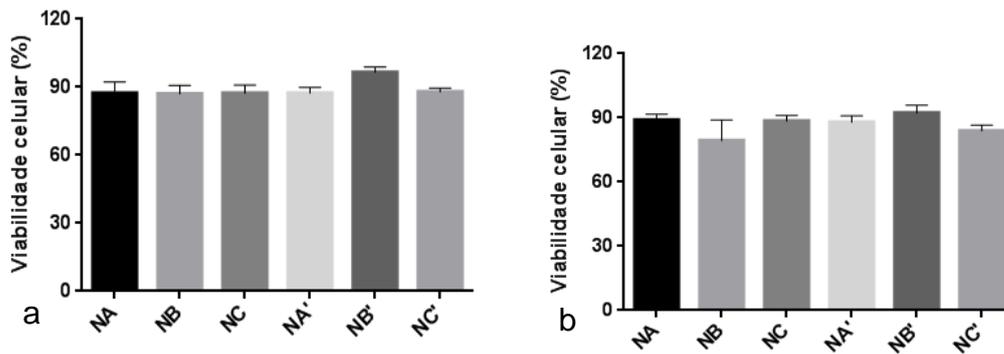
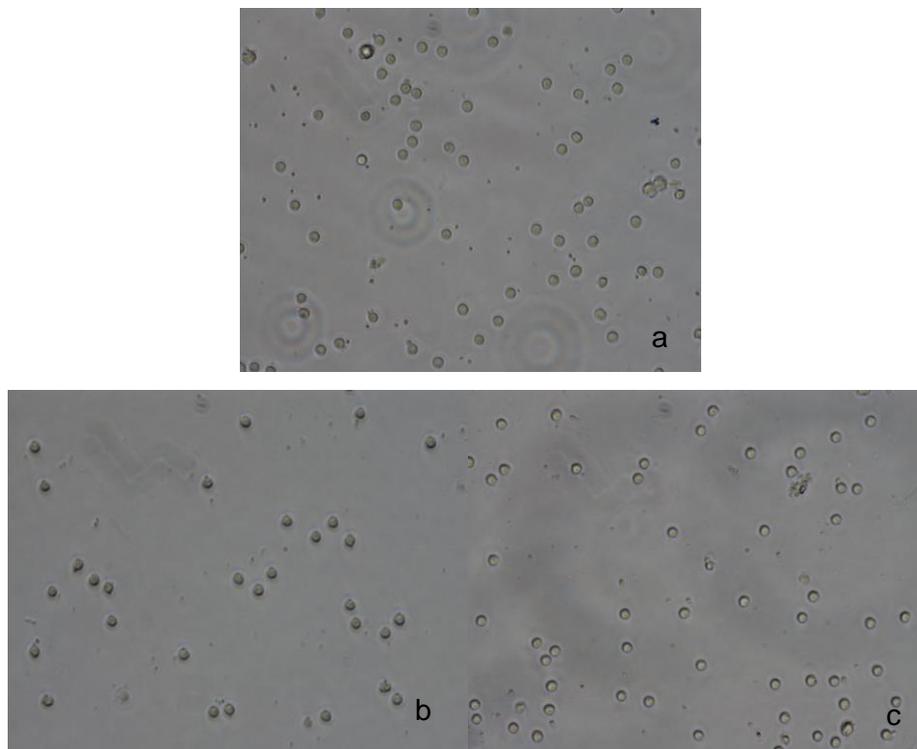


Figura 4. 11: Viabilidade celular de linfócitos T humanos tratados com concentrações diferentes de saquinavir nanoencapsulado (NA, NB, NC) e com nanocápsulas controle (NA', NB', NC'), onde a: concentração de 0,5 µM de saquinavir e b:concentração de 1 µM de saquinavir

A viabilidade celular foi calculada como percentual em relação ao controle negativo (não tratado). Conforme é possível observar, independente da concentração de saquinavir a viabilidade celular foi próxima de 90 % para todas as formulações testadas.

A morfologia dos linfócitos em exposição a saquinavir nanoencapsulado bem como as nanocápsulas controle está representada na Figura 4.12.



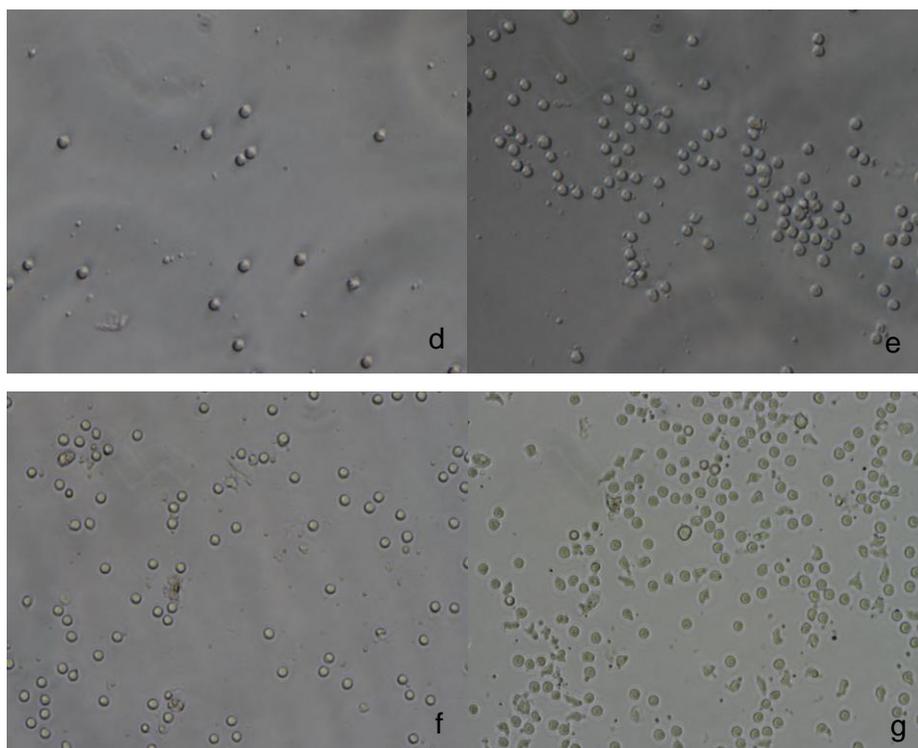


Figura 4. 12: Morfologia de linfócitos T humanos em exposição à saquinavir nanoencapsulado e à nanocápsulas controle (400x) na concentração de $1\mu\text{M}$, onde a: controle negativo, b: NA', c: NA, d: NB', e: NB, f: NC', g: NC.

É possível observar através da microscopia que as células expostas à saquinavir na forma nanoencapsulada e à nanocápsulas controle mantem sua morfologia quando comparadas com o controle negativo, o que confirma, portanto, um alto percentual de viabilidade celular das células quando expostas às formulações desenvolvidas.

Com a avaliação da citotoxicidade de nanomateriais em sistemas *in vitro* acompanhada da caracterização físico-química detalhada das nanopartículas, pode-se orientar o futuro desenvolvimento de carreadores nanotecnológicos poliméricos com maior segurança para a veiculação de saquinavir e o desenvolvimento de uma nova formulação.

4.4.6 Língua eletrônica

Um dos grandes problemas de adesão ao tratamento antirretroviral se deve também em função do sabor desagradável desses medicamentos (KOURROUSKI; DE LIMA, 2009). Saquinavir apresenta sabor amargo,

metálico e adstringente (SCHIFFMAN et al., 1999), o que pode dificultar a adesão ao tratamento, principalmente para crianças.

Em um estudo realizado por Stone e colaboradores (1998), 248 pacientes foram questionados sobre as causas de interrupção do tratamento com inibidores de protease e 18% dos pacientes relataram a desistência do tratamento em função do sabor. O sabor e dificuldade de deglutição dos inibidores de protease tem sido uma grande preocupação no tratamento de crianças infectadas pelo HIV (MELVIN et al., 1997).

Com o intuito de verificar a diferença no sabor de saquinavir promovido pela sua encapsulação em vesículas nanométricas, foi proposto junto à Embrapa Instrumentação Agrária a experimentação da língua eletrônica.

Na Figura 4.13 encontram-se os gráficos das análises de PCA e distância euclidiana obtidos a partir da comparação entre o fármaco na sua forma livre e nanoencapsulado.

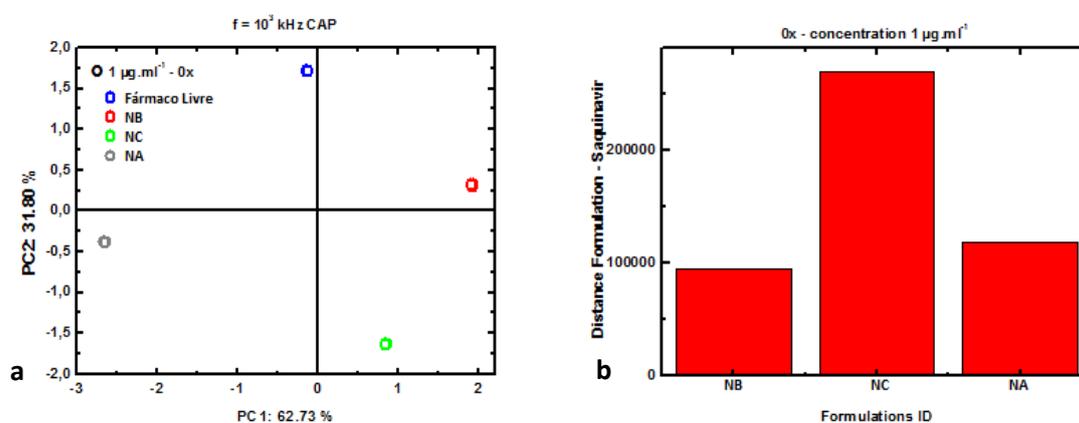


Figura 4. 13: Representação da análise das Componentes Principais (PCA) de saquinavir na forma livre e nanoencapsulada (a) e representação da distância euclidiana obtida a partir do ponto médio dos cluster da PCA (b). Dados obtidos a partir de medidas de capacitância

Conforme a Figura 4.13a, a análise das Componentes Principais abrangue mais de 94% das características principais do sistema (PC1 + PC2) e é possível observar que há uma clara tendência de separação das formulações nanoencapsuladas em relação ao saquinavir na sua forma livre sendo que as formulações nanotecnológicas sempre se localizam em quadrantes diferentes de saquinavir livre. Conforme a Figura 4.13b é possível observar que a

formulação NC possui maior distância euclidiana frente ao fármaco puro, o que a torna mais diferente em relação ao mascaramento do sabor de saquinavir.

4.5 Conclusão

Todas as formulações desenvolvidas apresentaram características nanotecnológicas adequadas para a veiculação de saquinavir. A utilização concomitante dos dois polímeros (PCL-PCL-T) foi eficaz para a encapsulação do fármaco sendo que as formulações que mostraram ser mais estáveis foram as com maior proporção do polímero poli (ϵ -caprolactona).

Os ensaios realizados foram capazes de demonstrar as vantagens das formulações frente ao perfil de liberação e mascaramento do sabor de saquinavir. As formulações desenvolvidas não mostraram ser tóxicas nas concentrações testadas. Espera-se com isso que sua utilização possa aumentar a taxa de adesão ao tratamento antirretroviral.

4.6 Agradecimentos

Nossos agradecimentos aos órgãos de fomento CAPES, CNPq, e FAPERGS. À empresa Cristália pelo fornecimento de saquinavir base e à Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres e à Profa. Dra. Adriana Pohlmann por conceder os equipamentos necessários à realização deste trabalho.

4.7 Referências

CATTANI, V. B. et al. 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, n. 1, p. 116-124, 2010.

CHUEH, P. J. et al. Differential cytotoxic effects of gold nanoparticles in different mammalian cell lines. **Journal of hazardous materials**, v. 264, p. 303-312, 2014.

CONTRI, R. V. et al. Simultaneous control of capsaicinoids release from polymeric nanocapsules. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, v. 11, n. 3, p. 2398-2406, 2011.

DE JAEGHERE, F. et al. Oral bioavailability of a poorly water soluble HIV-1 protease inhibitor incorporated into pH-sensitive particles: effect of the particle

size and nutritional state. **Journal of controlled release**, v. 68, n. 2, p. 291-298, 2000.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International journal of pharmaceuticals**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FESSI, H. D., J-PH; PUISIEUX, F.; THIES, C. **Procéde de preparation des systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules**. European Patent. 0274961 A1 1988.

FERREIRA, A. **Preparação, caracterização e avaliação da atividade in vitro antileucêmica de nanocápsulas de camptotecina convencionais e furtivas**. 2007. Dissertação (Mestrado em Farmácia), 2007-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis

FILIPPE, V.; HAWES, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. **Pharmaceutical research**, v. 27, n. 5, p. 796-810, 2010.

FLEXNER, C. HIV-protease inhibitors. **The New England journal of medicine** v. 338, n. 12, p. 1281-1292, 1998.

FORD, J.; KHOO, S.; BACK, D. The intracellular pharmacology of antiretroviral protease inhibitors. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 982-990, 2004.

HOET, P. H.; BRÜSKE-HOHLFELD, I.; SALATA, O. V. Nanoparticles—known and unknown health risks. **Journal of nanobiotechnology**, v. 2, n. 1, p. 12, 2004.

JÄGER, E. et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 130-140, 2009.

KIM, R. B. et al. The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 2, p. 289, 1998.

KOURROUSKI, M. F. C.; DE LIMA, R. A. G. Adesão ao tratamento: vivências de adolescentes com HIV/AIDS. **Rev Latino-am Enfermagem**, v. 17, n. 6, 2009.

KRIESER, K. et al. **Nanocapsulation of saquinavir aiming antiretroviral therapy improvement**. XI Brazilian MRS Meeting. Florianópolis, RS 2012.

LEGRAND, P. et al. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. A review. **STP pharma sciences**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.

LEMARCHAND, C. et al. Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan. **International journal of pharmaceuticals**, v. 254, n. 1, p. 77-82, 2003.

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

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Braz. J. Pharm. Sci**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MEDINA, C. et al. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. **British journal of pharmacology**, v. 150, n. 5, p. 552-558, 2007

MELVIN, A. J. et al. Clinical, virologic and immunologic responses of children with advanced human immunodeficiency virus type 1 disease treated with protease inhibitors. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 16, n. 10, p. 968-974, 1997.

MULLER, C. R. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação biológica de nebulizados de nanocápsulas e nanoesferas contendo diclofenaco**. 1999. Universidade federal do rio grande do sul, Porto Alegre.

MUSIO, F.; FERRARA, M. C. Low frequency ac response of polypyrrole gas sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 41, n. 1, p. 97-103, 1997.

NAIME, J. D. M.; SHINYA, V. T.; MATTOSO, L. H. C. **Automação da Língua Eletrônica de Polímeros Condutores**: Set 2005.

NETO, J. M. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.

NOBLE, S.; FAULDS, D. Saquinavir. **Drugs**, v. 52, n. 1, p. 93-112, 1996.

PAESE, K. Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea in vitro da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos. 2008.

PATHAK, S. M. et al. Enhanced oral absorption of saquinavir with methyl-beta-cyclodextrin—preparation and in vitro and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 440-451, 2010.

SANTOS, G. C. M. **Desenvolvimento de culturas tridimensionais de células e sua aplicação na avaliação de biocompatibilidade de materiais poliméricos**. 2012. Universidade de São Paulo

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHIFFMAN, S. S. et al. Effect of protease inhibitors on the sense of taste. **Nutrition**, v. 15, n. 10, p. 767-772, 1999.

SHEN, J.; BURGESS, D. J. In vitro dissolution testing strategies for nanoparticulate drug delivery systems: recent developments and challenges. **Drug delivery and translational research**, v. 3, n. 5, p. 409-415, 2013.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 163-174, 2012.

SIQUEIRA, N. M. Desenvolvimento tecnológico e avaliação da penetração cutânea de benzofenona-3 a partir de nanocápsulas revestidas com quitosana. 2008.

STONE VE, H. L., BOSWELL SL. . **Discontinuation of protease inhibitor therapy: reasons and risk factors**. 12th World AIDS Conference. Geneva, Switzerland 1998.

VICINI, L.; SOUZA, A. M. Análise multivariada da teoria à prática. **Santa Maria: UFSM, CCNE**, 2005.

WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 58, n. 1, p. 1-12, 1990.

WESSLER, K. **Sistemas de p(3hb) e p(3hb-co-3hv) com policaprolactona-triol: comportamento de fases, reologia, propriedades mecânicas e processabilidade**. 2007. Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville.

WILLIAMS, P.; SAMPSON, A.; GREEN, C. Disposition and bioavailability of the HIV-proteinase inhibitor, Ro 31-8959, after single doses in healthy volunteers. **Br J Clin Pharmacol**, v. 34, n. 2, p. 155P-6P, 1992.

A infecção pelo vírus HIV é um grande problema de saúde pública, uma vez que mais de 35 milhões de pessoas no mundo encontram-se infectadas. Em 2013, quase 13 milhões de pessoas infectadas pelo vírus estavam recebendo tratamento antirretroviral. O acesso ao tratamento em crianças infectadas é preocupante, pois o cuidado pediátrico ainda está atrasado com menos de 1 a cada 4 crianças recebendo terapia antirretroviral em comparação com 1 a cada 3 adultos (WHO, 2014).

A terapia antirretroviral surgiu como uma forma de controle da infecção pelo HIV, porém os medicamentos desenvolvidos possuem várias limitações que dificultam a adesão ao tratamento. Com isso surge a necessidade de novas formulações capazes de contornar esses problemas a fim de que se tenha uma terapia adequada com menor resistência viral.

Saquinavir foi o antirretroviral escolhido para o desenvolvimento de uma nova formulação devido aos problemas de baixa absorção e por não existir em formas farmacêuticas que facilitam o processo de deglutição em crianças.

A veiculação de fármacos a nanocarreadores surge como uma nova perspectiva de melhoramento das características biofarmacêutica de fármacos com problemas de baixa absorção e biodisponibilidade (BHANDARI; KAUR, 2013; DAS NEVES et al., 2010). Além disso, possui a vantagem de ser produzida em formas farmacêuticas que facilitam o processo de deglutição.

Devido a pequena quantidade de polímeros que podem ser utilizados *in vivo* e devido a necessidade de pesquisa sobre novos dispositivos que possam ser utilizados na área farmacêutica, foi proposto uma mistura polimérica como inovação. Tanto a PCL quanto a PCL-T são polímeros biodegradáveis e, portanto, compatíveis com o uso *in vivo*. Um grande número de estudos tem apontado o desenvolvimento de nanocápsulas de PCL (JÄGER et al., 2009; KÜLKAMP et al., 2009; SCHAFFAZICK et al., 2002) porém pouco tem-se estudado sobre a PCL-T.

Com o objetivo de melhorar as características biofarmacêuticas de saquinavir, nanocápsulas poliméricas com diferentes proporções dos polímeros poli(ϵ -caprolactona) e poli(ϵ -caprolactona) triol foram desenvolvidas,

caracterizadas, analisadas quanto a sua estabilidade e foi avaliado o seu potencial citotóxico, liberação *in vitro*, mascaramento de sabor.

Para uma melhor compreensão dos resultados a dissertação foi escrita na forma de capítulo. No capítulo 1 encontra-se a revisão bibliográfica com descrição detalhada dos principais assuntos abordados.

No capítulo 2 encontra-se o artigo que contempla o processo de desenvolvimento da formulação incluindo a preparação, caracterização e ensaios de liberação *in vitro*, citotoxicidade, mascaramento do sabor e estabilidade.

As formulações foram desenvolvidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado. Através dessa técnica, as nanocápsulas são formadas instantaneamente devido à rápida difusão do solvente orgânico na fase aquosa. O polímero é insolúvel tanto na fase aquosa quanto no óleo e, portanto, precipita na interface óleo-água (SCHAFFAZICK, S. R., 2006).

Todas as formulações desenvolvidas apresentaram tamanho nanométrico na faixa de 172-225 nm. A determinação do diâmetro foi realizada por várias técnicas e em todas foram obtidos valores próximo e condizentes entre si. Foi observada uma tendência de um maior valor de diâmetro médio para as nanocápsulas contendo uma maior concentração do polímero PCL-T.

O valor de pH das formulações apresentou-se levemente ácido e a presença do fármaco contribuiu para leve aumento do pH quando comparado com as formulações controle. Um valor de pH próximo de 6,0 como foi encontrado é condizente com as matérias-primas utilizadas bem como com o processo de preparação das nanocápsulas (PAESE, 2008; SCHAFFAZICK et al., 2003).

O potencial zeta apresentou-se negativo, em torno de -10mV, em função das características do polímero e do tensoativo utilizado. Os poliésteres fornecem um potencial negativo à interface (LEGRAND et al., 1999). Um valor de potencial zeta alto (em módulo) é importante para uma boa estabilidade físico-química da formulação, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação das partículas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Os valores de teor total obtidos ficaram próximos do valor teórico de 1mg/mL e a taxa de encapsulação obtida foi próxima de 100 %, indicando que os sistemas desenvolvidos são eficientes na encapsulação do fármaco. Valores próximos a 100 % de encapsulação foram encontrados em nanocápsulas de PCL contendo Indometacina em trabalho desenvolvido por Calvo e colaboradores (1997). Fatores como composição quali-quantitativa dos sistemas, métodos de preparação, solubilidade e partição dos fármacos no sistema são capazes de influenciar os teores e as taxas de associação. No caso de nanocápsulas, o fármaco pode se encontrar tanto na cavidade interna quando adsorvido a parede polimérica e neste caso essas formas de associação dependem tanto da interação do fármaco com o polímero quanto com o óleo (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A estabilidade foi realizada para um tempo de estocagem de 90 dias. Os parâmetros avaliados foram pH, teor, diâmetro e potencial zeta. Os valores de diâmetro das formulações permaneceram constantes no tempo analisado, houve diferença no diâmetro apenas para a formulação NA, porém o valor de diâmetro retornou ao valor inicial após 90 dias. O índice de polidispersão também variou apenas para a formulação NA, sendo que os valores também retornaram ao inicial após 90 dias de estocagem. Os valores de potencial zeta continuaram próximos dos valores iniciais com manutenção da carga e prevenção da agregação das partículas. Os valores de teor total permaneceram constantes, confirmando a estabilidade do fármaco nas formulações desenvolvidas.

A estabilidade acelerada foi verificada também a fim de identificar possíveis fenômenos de instabilidade nas formulações. As formulações apresentaram uma leve tendência à sedimentação quando verificada por essa técnica, contudo, cabe colocar que este fenômeno é reversível.

Fatores como adsorção de moléculas à superfície das nanopartículas bem como a presença de tensoativos podem influenciar a estabilidade das formulações sendo que as limitações encontradas são devido, principalmente, a agregação das partículas, a estabilidade química dos constituintes da formulação e também a liberação prematura da substância ativa (GUTERRES et al., 1995; MOLPECERES et al., 1996; SCHAFFAZICK et al., 2002).

Foi realizado o teste de citotoxicidade com o propósito de verificar o potencial efeito citotóxico das nanocápsulas desenvolvidas. Em relação a viabilidade celular, todas as formulações desenvolvidas incluindo as formulações controle não se mostraram citotóxicos em linfócitos T humanos nas concentrações testadas, apresentando viabilidade próxima a 90%. Foi realizado a microscopia dos linfócitos com o propósito de verificar a morfologia das células expostas às formulações e ao fármaco na sua forma livre. O resultado encontrado corrobora com o alto percentual de viabilidade celular encontrado para o teste de citotoxicidade uma vez que as células expostas mantiveram sua morfologia quando comparadas com o controle negativo.

A maioria dos estudos de nanotoxicologia tem focado no estudo do efeito de nanopartículas principalmente do tipo inorgânicas como nanopartículas de dióxido de zinco e de titânio (SAYES, 2006; PULSKAMP *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2009, DIAZ *et al.* 2008). Por exemplo, PUJALTÉ e colaboradores (2011) demonstraram a influência da escala de tamanho de nanopartículas inorgânicas na viabilidade celular, bem como a ocorrência de toxicidade relacionada à produção intracelular de espécies reativas ao oxigênio destas mesmas partículas. Por outro lado, poucos trabalhos tem explorado o efeito de diferentes nanopartículas poliméricas na toxicidade de sistemas *in vitro* com linhagens celulares diversas.

Perfis diferentes de liberação de saquinavir foram observados entre o fármaco livre e as formulações nanoestruturadas. Não houve diferença na liberação entre as formulações e, com isso, tem-se que as diferentes proporções de polímeros utilizadas foram capazes de controlar e retardar a liberação de saquinavir. Através da aplicação do modelo matemático de Korsmeyer-Peppas foi possível identificar os mecanismos envolvidos na liberação de saquinavir. Tanto o processo de difusão quanto de erosão do polímero permitem a liberação do fármaco através das nanocápsulas.

Segundo Cruz (2005), esse modelo é um dos mais utilizados para descrever os processos de liberação e é utilizado para formas farmacêuticas na qual o mecanismo de liberação é desconhecido, analisa quando ocorre mais de um tipo de mecanismo de liberação.

Jagër e colaboradores (2009), aplicou o modelo de Korsmeyer-Peppas a fim de determinar o mecanismo de liberação do éster de indometacina das nanocápsulas de PCL desenvolvidas. Como resultado obteve que o processo é anômalo, ou seja, tanto difusão quanto erosão são os mecanismos de liberação do fármaco.

O teste da língua eletrônica foi realizado com o propósito de verificar uma possível mudança no sabor provocado pela encapsulação do fármaco. Foi verificado através da análise das componentes principais e da distância euclidiana que existe diferença de todas as formulações desenvolvidas em relação ao fármaco na sua forma livre e a formulação que apresentou uma maior diferença no sabor frente ao fármaco livre foi a formulação NC.

A descontinuidade do tratamento com antirretrovirais tem várias causas, entre elas em relação às crianças a forma farmacêutica e o sabor estão ligadas a baixa adesão. A nanotecnologia é capaz de auxiliar no contorno desse problema, uma vez que o fármaco, encapsulado, encontra-se protegido e, dessa forma, seu sabor pode ser mascarado.

Os resultados encontrados demonstram que as formulações desenvolvidas são capazes de encapsular saquinavir e promover um perfil controlado de liberação do mesmo, além de mascarar seu sabor. As formulações que mostraram ser mais estáveis são as que contem maior quantidade do polímero PCL. Com isso, esse trabalho tem como perspectiva a continuação através de um estudo *in vivo* com o propósito de verificar as mudanças provocadas pela encapsulação de saquinavir em relação a melhora da absorção e conseqüente biodisponibilidade.

6. CONCLUSÕES GERAIS

- No presente trabalho foi possível desenvolver e caracterizar formulações nanotecnológicas com diferentes proporções de polímeros PCL e PLC-T contendo o antirretroviral saquinavir com proposta de melhora de suas características biofarmacêuticas.
- Todas as formulações desenvolvidas apresentaram tamanho nanométrico, boa distribuição de tamanho, teor total e taxa de encapsulação próximos a 100%.
- Em relação à estabilidade, a formulação NA, a qual possui maior concentração do polímero PCL-T, foi a que teve uma maior variação de diâmetro e do índice de polidispersão durante o período de estocagem. Quando verificada a estabilidade acelerada através do equipamento Turbiscan Lab® as formulações apresentaram uma leve tendência a sedimentação.
- A liberação *in vitro* mostrou um perfil diferente de liberação do fármaco nanoencapsulado quando comparado com o fármaco livre. Não houve diferença entre as formulações desenvolvidas, todas são capazes de retardar e controlar a liberação de saquinavir. Através da modelagem matemática foi possível observar dois fenômenos de liberação da saquinavir a partir das nanocápsulas, difusão e erosão dos polímeros.
- Em relação ao potencial citotóxico, ficou demonstrado que as nanocápsulas desenvolvidas não são citotóxicas nas concentrações testadas e, na microscopia foi possível observar que não houve diferença na morfologia dos linfócitos expostos à saquinavir nanoencapsulado e à nanocápsulas controle.
- Através da experimentação com a língua eletrônica foi possível observar que as formulações desenvolvidas, ao encapsular saquinavir, podem melhorar a adesão ao tratamento ao permitir uma modificação em relação ao sabor amargo e adstringente característico do fármaco, além disso é uma formulação líquida que pode facilitar o processo de deglutição, principalmente em crianças.
- Todas as formulações apresentaram características nanotecnológicas adequadas, porém as formulações que apresentaram uma melhor estabilidade foram NB e NC.

- Com isso sugere-se que as formulações desenvolvidas possam ser utilizadas com propósito de aumentar a adesão de crianças ao tratamento antirretroviral, uma vez que se trata de uma formulação líquida e capaz de mascarar o sabor desagradável de saquinavir.

7. REFERÊNCIAS GERAIS

ABERG, J. A. et al. Primary care guidelines for the management of persons infected with human immunodeficiency virus: 2009 update by the HIV medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 49, n. 5, p. 651-681, 2009.

AGARWAL, S.; PAL, D.; MITRA, A. K. Both P-gp and MRP2 mediate transport of Lopinavir, a protease inhibitor. **International journal of pharmaceutics**, v. 339, n. 1, p. 139-147, 2007.

AGRAWAL, U. et al. Is nanotechnology a boon for oral drug delivery? **Drug discovery today**, v. 19, n. 10, p. 1530-1546, 2014.

AHLIN, P. et al. Investigation of polymeric nanoparticles as carriers of enalaprilat for oral administration. **International journal of pharmaceutics**, v. 239, n. 1, p. 113-120, 2002.

AMIJI, M. M.; VYAS, T. K.; SHAH, L. K. Role of nanotechnology in HIV/AIDS treatment: potential to overcome the viral reservoir challenge. **Discovery medicine**, v. 6, n. 34, p. 157-162, 2009.

AMMOURY, N. et al. Indomethacin-loaded poly (d, l-lactide) nanocapsules protection from gastrointestinal ulcerations and anti-inflammatory activity evaluation in rats. **Clinical Materials**, v. 13, n. 1, p. 121-130, 1993.

ATAMAN-ÖNAL, Y. et al. Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. **Journal of controlled release**, v. 112, n. 2, p. 175-185, 2006.

BAJPAI, A. et al. Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 11, p. 1088-1118, 2008.

BARRY, M. et al. Pharmacokinetics and potential interactions amongst antiretroviral agents used to treat patients with HIV infection. **Clinical pharmacokinetics**, v. 36, n. 4, p. 289-304, 1999.

BELOQUI, A. et al. Mechanism of transport of saquinavir-loaded nanostructured lipid carriers across the intestinal barrier. **Journal of Controlled Release**, v. 166, n. 2, p. 115-123, 2013.

BHANDARI, R.; KAUR, I. P. Pharmacokinetics, tissue distribution and relative bioavailability of isoniazid-solid lipid nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 441, n. 1, p. 202-212, 2013.

BIJU, S. et al. Vesicular systems: an overview. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 2, p. 141, 2006.

BILELLO, J. A. et al. Relevance of Plasma Protein Binding to Antiviral Activity and Clinical Efficacy of Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Protease [with Reply]. **The Journal of infectious diseases**, p. 1524-1526, 1996.

BLANKSON, J. N.; PERSAUD, D.; SILICIANO, R. F. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. **Annual review of medicine**, v. 53, n. 1, p. 557-593, 2002.

BRANHAM, M. L.; MOYO, T.; GOVENDER, T. Preparation and solid-state characterization of ball milled saquinavir mesylate for solubility enhancement. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 1, p. 194-202, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Mesilato de saquinavir - base de dados. 2008.

_____. Ministério da Saúde – Protocolo Clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília, 2013. Acesso em: 27 de fevereiro de 2015.

BUGELSKI, P.; KIRSH, R.; HART, T. HIV protease inhibitors: effects on viral maturation and physiologic function in macrophages. **Journal of leukocyte biology**, v. 56, n. 3, p. 374-380, 1994.

BUSS, N. et al. Saquinavir and ritonavir pharmacokinetics following combined ritonavir and saquinavir (soft gelatin capsules) administration. **British journal of clinical pharmacology**, v. 52, n. 3, p. 255-264, 2001.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. A. J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 153, n. 1, p. 41-50, 1997.

CARR, A. HIV protease inhibitor-related lipodystrophy syndrome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. Supplement 2, p. S135-S142, 2000.

CARR, A. et al. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. **Aids**, v. 12, n. 7, p. F51-F58, 1998.

CATTANI, V. B. et al. 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, n. 1, p. 116-124, 2010.

CHAOWANACHAN, T. et al. Drug synergy of tenofovir and nanoparticle-based antiretrovirals for HIV prophylaxis. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61416, 2013.

CHENG, L.; LEI, L.; GUO, S. In vitro and in vivo evaluation of praziquantel loaded implants based on PEG/PCL blends. **International journal of pharmaceutics**, v. 387, n. 1, p. 129-138, 2010.

CHENG, Y. et al. Dendrimers as drug carriers: applications in different routes of drug administration. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 1, p. 123-143, 2008.

CHUEH, P. J. et al. Differential cytotoxic effects of gold nanoparticles in different mammalian cell lines. **Journal of hazardous materials**, v. 264, p. 303-312, 2014.

CLAVEL, F.; MAMMANO, F. Role of Gag in HIV resistance to protease inhibitors. **Viruses**, v. 2, n. 7, p. 1411-1426, 2010.

COHEN, M. S. et al. The spread, treatment, and prevention of HIV-1: evolution of a global pandemic. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 4, p. 1244, 2008.

CONDRA, J. H. et al. Genetic correlates of in vivo viral resistance to indinavir, a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. **Journal of virology**, v. 70, n. 12, p. 8270-8276, 1996.

CONTRI, R. V. et al. Simultaneous control of capsaicinoids release from polymeric nanocapsules. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 11, n. 3, p. 2398-2406, 2011.

CONTROL, C. F. D.; PREVENTION. Clinical update: impact of HIV protease inhibitors on the treatment of HIV-infected tuberculosis patients with rifampin. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 45, n. 42, p. 921, 1996.

COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 7, p. 1417-1450, 2006.

CRUZ, L. Estudo físico-químico comparativo de sistemas nanoestruturados contendo indometacina ou seu éster etílico e avaliação in vivo da atividade antiedematogênica. 2005.

DAMHORST, G. L.; WATKINS, N. N.; BASHIR, R. Micro-and Nanotechnology for HIV/AIDS Diagnostics in Resource-Limited Settings. **Biomedical Engineering, IEEE Transactions on**, v. 60, n. 3, p. 715-726, 2013.

DANEL, C. et al. CD4-guided structured antiretroviral treatment interruption strategy in HIV-infected adults in west Africa (Trivacan ANRS 1269 trial): a randomised trial. **The Lancet**, v. 367, n. 9527, p. 1981-1989, 2006.

DAS NEVES, J. et al. Nanotechnology-based systems for the treatment and prevention of HIV/AIDS. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 4, p. 458-477, 2010.

DATE, A. A. et al. Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances. **Nanomedicine**, v. 5, n. 10, p. 1595-1616, 2010.

DE CLERCQ, E. The design of drugs for HIV and HCV. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 12, p. 1001-1018, 2007.

DE JAEGHERE, F. et al. Oral bioavailability of a poorly water soluble HIV-1 protease inhibitor incorporated into pH-sensitive particles: effect of the particle size and nutritional state. **Journal of controlled release**, v. 68, n. 2, p. 291-298, 2000.

DE SILVA, T. I.; COTTEN, M.; ROWLAND-JONES, S. L. HIV-2: the forgotten AIDS virus. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 12, p. 588-595, 2008.

DEEKS, S. G. et al. HIV-1 protease inhibitors: a review for clinicians. **Jama**, v. 277, n. 2, p. 145-153, 1997.

DELIE, F. Evaluation of nano-and microparticle uptake by the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 34, n. 2, p. 221-233, 1998.

DEVISSAGUET, J.-P.; FESSI, H.; PUISIEUX, F. **Process for the preparaton of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanocapsules**: Google Patents 1991.

DIAZ, B. et al. Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates. **Small**, v. 4, n. 11, p. 2025-2034, 2008.

DINGLER, A. et al. Solid lipid nanoparticles (SLNTM/LipopearlsTM) a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products. **Journal of microencapsulation**, v. 16, n. 6, p. 751-767, 1999.

DODIYA, S. S. et al. Solid lipid nanoparticles and nanosuspension formulation of Saquinavir: preparation, characterization, pharmacokinetics and biodistribution studies. **Journal of microencapsulation**, v. 28, n. 6, p. 515-527, 2011.

DOMINGUES, G. S. Caracterização físico-química e avaliação dos perfis de liberação in vitro de micropartículas revestidas com nanocápsulas poliméricas. 2006.

DONBROW, M. **Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy**. CRC press, 1991. ISBN 084936986X.

ESTÉ, J. A.; CIHLAR, T. Current status and challenges of antiretroviral research and therapy. **Antiviral research**, v. 85, n. 1, p. 25-33, 2010.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. **ACS nano**, v. 3, n. 1, p. 16-20, 2009.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; DE PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. 2008.

FEITOSA, A. C. et al. Terapia anti-retroviral: fatores que interferem na Adesão de crianças com HIV/AIDS. **Esc Anna Nery Rev Enferm**, v. 12, n. 3, p. 515-21, 2008.

FERNÁNDEZ-URRUSUNO, R. et al. Evaluation of hepatic antioxidant systems after intravenous administration of polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v. 18, n. 6, p. 511-517, 1997.

FERREIRA, A. **Preparação, caracterização e avaliação da atividade in vitro antileucêmica de nanocápsulas de camptotecina convencionais e furtivas**. 2007. Dissertação (Mestrado em Farmácia), 2007-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International journal of pharmaceuticals**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FESSI, H. D., J-PH; PUISIEUX, F.; THIES, C. **Procédé de preparation des systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules**. European Patent. 0274961 A1 1988.

FIGGITT, D. P.; PLOSKER, G. L. Saquinavir Soft-Gel Capsule. **Drugs**, v. 60, n. 2, p. 481-516, 2000.

FILIFE, V.; HAWES, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. **Pharmaceutical research**, v. 27, n. 5, p. 796-810, 2010.

FLEXNER, C. HIV-protease inhibitors. **The New England journal of medicine** v. 338, n. 12, p. 1281-1292, 1998.

FLEXNER, C.; BATE, G.; KIRKPATRICK, P. Tipranavir. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 12, p. 955-956, 2005.

FORD, J. et al. The intracellular accumulation of the protease inhibitors in subpopulations of lymphocytes with P-glycoprotein expression ex vivo. British Pharmacology Society: Winter Meeting, London, 2003.

FORD, J.; KHOO, S.; BACK, D. The intracellular pharmacology of antiretroviral protease inhibitors. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 982-990, 2004.

GAGNÉ, J.-F. et al. Targeted delivery of indinavir to HIV-1 primary reservoirs with immunoliposomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1558, n. 2, p. 198-210, 2002.

GOUVEIA, M. J. G. P. D. Manifestações cutâneas de infecções virais em indivíduos infectados pelo VIH. 2010.

GOVENDER, T. et al. Polymeric nanoparticles for enhancing antiretroviral drug therapy. **Drug delivery**, v. 15, n. 8, p. 493-501, 2008.

GUTERRES, S. et al. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International journal of pharmaceuticals**, v. 113, n. 1, p. 57-63, 1995.

HAASE, A. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. **Annual review of immunology**, v. 17, n. 1, p. 625-656, 1999.

HAMMER, S. M. et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society–USA panel. **Jama**, v. 300, n. 5, p. 555-570, 2008.

HOET, P. H.; BRÜSKE-HOHLFELD, I.; SALATA, O. V. Nanoparticles—known and unknown health risks. **Journal of nanobiotechnology**, v. 2, n. 1, p. 12, 2004.

HOFFMANN. -LA ROCHE. Ro 31-8959 Saquinavir Inivirase. **Investigational Drug Brochure**, 1996.

HSU, A. et al. Pharmacokinetic interactions between two human immunodeficiency virus protease inhibitors, ritonavir and saquinavir*. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 63, n. 4, p. 453-464, 1998.

HUGEN, P. et al. Simultaneous determination of the HIV-protease inhibitors indinavir, nelfinavir, saquinavir and ritonavir in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 727, n. 1, p. 139-149, 1999.

HUSSAIN, N.; JAITLEY, V.; FLORENCE, A. T. Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. **Advanced drug delivery reviews**, v. 50, n. 1, p. 107-142, 2001.

JÄGER, E. et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 130-140, 2009.

JONES, K. et al. P-Glycoprotein and transporter MRP1 reduce HIV protease inhibitor uptake in CD4 cells: potential for accelerated viral drug resistance? **Aids**, v. 15, n. 11, p. 1353-1358, 2001.

JONES, K. et al. Effect of α 1-acid glycoprotein on the intracellular accumulation of the HIV protease inhibitors saquinavir, ritonavir and indinavir in vitro. **British journal of clinical pharmacology**, v. 51, n. 1, p. 99-102, 2001.

JOSEPHSON, F. et al. The relation between treatment outcome and efavirenz, atazanavir or lopinavir exposure in the NORTHIV trial of treatment-naive HIV-1 infected patients. **European journal of clinical pharmacology**, v. 66, n. 4, p. 349-357, 2010.

JUSTESEN, U. S. Protease inhibitor plasma concentrations in HIV antiretroviral therapy. **Dan Med Bull**, v. 55, n. 4, p. 165-85, 2008.

KANIS, L. A.; GENEROSO, M.; SOLDI, V. Filmes de poli (etileno-co-metil acrilato)/poli (caprolactona triol): caracterização e propriedades mecânicas. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 700, 2007.

KANIS, L. A.; SOLDI, V. Poly (ethylene-co-methyl acrylate)/poly (caprolactone) triol blends for drug delivery systems: characterization and drug release. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 297-300, 2012.

KASHUBA, A. D. et al. Antiretroviral-drug concentrations in semen: implications for sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 8, p. 1817-1826, 1999.

KILBY, J. M. et al. Safety and pharmacokinetics of once-daily regimens of soft-gel capsule saquinavir plus minidose ritonavir in human immunodeficiency virus-negative adults. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 10, p. 2672-2678, 2000.

KIM, R. B. et al. The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 2, p. 289, 1998.

KOHL, N. E. et al. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 13, p. 4686-4690, 1988.

KOURROUSKI, M. F. C.; DE LIMA, R. A. G. Adesão ao tratamento: vivências de adolescentes com HIV/AIDS. **Rev Latino-am Enfermagem**, v. 17, n. 6, 2009.

KREUTER, J. Peroral administration of nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 7, n. 1, p. 71-86, 1991.

KRIESER, K. et al. **Nanocapsulation of saquinavir aiming antiretroviral therapy improvement**. XI Brazilian MRS Meeting. Florianópolis, RS 2012.

KROLL, A. et al. Cytotoxicity screening of 23 engineered nanomaterials using a test matrix of ten cell lines and three different assays. **Particle and fibre toxicology**, v. 8, n. 1, p. 1-19, 2011.

KÜLKAMP, I. C. et al. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, v. 32, n. 2078, 2009.

KUO, Y.-C.; KO, H.-F. Targeting delivery of saquinavir to the brain using 83-14 monoclonal antibody-grafted solid lipid nanoparticles. **Biomaterials**, v. 34, n. 20, p. 4818-4830, 2013.

KUO, Y.-C.; YU, H.-W. Expression of ornithine decarboxylase during the transport of saquinavir across the blood-brain barrier using composite polymeric nanocarriers under an electromagnetic field. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, n. 2, p. 627-634, 2011.

LABET, M.; THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 12, p. 3484-3504, 2009.

LAMPRECHT, A. et al. Biodegradable microparticles as a two-drug controlled release formulation: a potential treatment of inflammatory bowel disease. **Journal of Controlled Release**, v. 69, n. 3, p. 445-454, 2000.

LANAO, J. M.; BRIONES, E.; COLINO, C. I. Recent advances in delivery systems for anti-HIV1 therapy. **Journal of drug targeting**, v. 15, n. 1, p. 21-36, 2007.

LEGRAND, P. et al. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. A review. **STP pharma sciences**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.

LEMARCHAND, C. et al. Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan. **International journal of pharmaceutics**, v. 254, n. 1, p. 77-82, 2003.

LEVY, J. A. **HIV and the Pathogenesis of AIDS**. ASM press Washington, DC, USA:, 2007. ISBN 1555813933.

LI, X.; CHAN, W. K. Transport, metabolism and elimination mechanisms of anti-HIV agents. **Advanced drug delivery reviews**, v. 39, n. 1, p. 81-103, 1999.

LOGSDON, B. C. et al. Crystal structures of a multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 protease reveal an expanded active-site cavity. **Journal of virology**, v. 78, n. 6, p. 3123-3132, 2004.

LÖTSCHE, J. et al. Association of saquinavir plasma concentrations with side effects but not with antiretroviral outcome in patients infected with protease inhibitor-susceptible human immunodeficiency virus type 1. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3264-3272, 2007.

LUZZI, L.; PALMIERI, A.; LIM, F. An overview of pharmaceutical applications. **Biomedical Applications of Microencapsulation**, p. 1-18, 1984.

LYU, S.-P. et al. Adjusting drug diffusivity using miscible polymer blends. **Journal of controlled release**, v. 102, n. 3, p. 679-687, 2005.

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

MAHAJAN, S. D. et al. Enhancing the delivery of anti retroviral drug "Saquinavir" across the blood brain barrier using nanoparticles. **Current HIV research**, v. 8, n. 5, p. 396, 2010.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MCDONALD, C. K.; KURITZKES, D. R. Human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. **Archives of internal medicine**, v. 157, n. 9, p. 951-959, 1997.

MEDINA, C. et al. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. **British journal of pharmacology**, v. 150, n. 5, p. 552-558, 2007.

MELVIN, A. J. et al. Clinical, virologic and immunologic responses of children with advanced human immunodeficiency virus type 1 disease treated with protease inhibitors. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 16, n. 10, p. 968-974, 1997.

MERRILL, D. P. et al. Antagonism between human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors indinavir and saquinavir in vitro. **Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 1, p. 265-268, 1997.

MERRY, C. et al. Saquinavir pharmacokinetics alone and in combination with ritonavir in HIV-infected patients. **Aids**, v. 11, n. 4, p. F29-F33, 1997.

MOLLA, A. et al. Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. **Nature medicine**, v. 2, n. 7, p. 760-766, 1996.

MOLPECERES, J. et al. Application of central composite designs to the preparation of polycaprolactone nanoparticles by solvent displacement. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 85, n. 2, p. 206-213, 1996.

MORA-HUERTAS, C.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 385, n. 1, p. 113-142, 2010.

MOYLE, G. J. Saquinavir-soft gel: establishing saquinavir in HAART regimens. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 7, n. 8, p. 1313-1322, 1998.

MUIRHEAD G. J., S. T., WILLIAMS P. E. O., ET AL. Pharmacokinetics of the HIV proteinase inhibitor, Ro 31-8959, after single and multiple oral doses in healthy volunteers. **Br J Clin Pharmacol**, v. 34, p. 170-1, 1992.

MULLER, C. R. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação biológica de nebulizados de nanocápsulas e nanoesferas contendo diclofenaco**. 1999. Universidade federal do rio grande do sul, Porto Alegre.

MUSIO, F.; FERRARA, M. C. Low frequency ac response of polypyrrole gas sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 41, n. 1, p. 97-103, 1997.

NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 11, p. 1423-1430, 2010.

NAIME, J. D. M.; SHINYA, V. T.; MATTOSO, L. H. C. **Automação da Língua Eletrônica de Polímeros Condutores**: Set 2005.

NETO, J. M. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.

NOBLE, S.; FAULDS, D. Saquinavir. **Drugs**, v. 52, n. 1, p. 93-112, 1996.

OJEWOLE, E. et al. Exploring the use of novel drug delivery systems for antiretroviral drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 3, p. 697-710, 2008.

OLIVEIRA, M. A.; SANTOS, E. M. D.; MELLO, J. M. C. AIDS, ativismo e regulação de ensaios clínicos no Brasil: o protocolo 028. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 4, p. 863-875, 2001.

PAESE, K. Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea in vitro da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos. 2008.

PARBOOSING, R. et al. Nanotechnology and the Treatment of HIV Infection. **Viruses**, v. 4, n. 4, p. 488-520, 2012.

PATHAK, S. M. et al. Enhanced oral absorption of saquinavir with methyl-beta-cyclodextrin—preparation and in vitro and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 440-451, 2010.

PAWI—SKI, T. et al. Pharmacokinetic monitoring of HIV-1 protease inhibitors in the antiretroviral therapy. **Acta. Pol. Pharm**, v. 65, n. 1, p. 93-100, 2008.

PERRY, C. M.; NOBLE, S. Saquinavir soft-gel capsule formulation. **Drugs**, v. 55, n. 3, p. 461-486, 1998.

PETTIT, S. C. et al. Ordered processing of the human immunodeficiency virus type 1 GagPol precursor is influenced by the context of the embedded viral protease. **Journal of virology**, v. 79, n. 16, p. 10601-10607, 2005.

PETTIT, S. C. et al. Processing sites in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag-Pro-Pol precursor are cleaved by the viral protease at different rates. **Retrovirology**, v. 2, n. 1, p. 66, 2005.

PETTIT, S. C.; MICHAEL, S. F.; SWANSTROM, R. The specificity of the HIV-1 protease. **Perspectives in Drug Discovery and Design**, v. 1, n. 1, p. 69-83, 1993.

PLOSKER, G. L.; SCOTT, L. J. Saquinavir. **Drugs**, v. 63, n. 12, p. 1299-1324, 2003.

POHLMANN, A. R. et al. Poly (ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**, v. 10, n. 5, p. 623-638, 2013.

POKORNÁ, J. et al. Current and novel inhibitors of HIV protease. **Viruses**, v. 1, n. 3, p. 1209-1239, 2009.

POLLI, J. W. et al. Role of P-glycoprotein on the CNS disposition of amprenavir (141W94), an HIV protease inhibitor. **Pharmaceutical research**, v. 16, n. 8, p. 1206-1212, 1999.

PONCHEL, G.; IRACHE, J.-M. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. **Advanced drug delivery reviews**, v. 34, n. 2, p. 191-219, 1998.

PORTER, C. J.; CHARMAN, W. N. Intestinal lymphatic drug transport: an update. **Advanced drug delivery reviews**, v. 50, n. 1, p. 61-80, 2001.

PRABU-JEYABALAN, M. et al. Substrate envelope and drug resistance: crystal structure of RO1 in complex with wild-type human immunodeficiency virus type 1 protease. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1518-1521, 2006.

PRABU-JEYABALAN, M. et al. Structural basis for coevolution of a human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid-p1 cleavage site with a V82A drug-resistant mutation in viral protease. **Journal of virology**, v. 78, n. 22, p. 12446-12454, 2004.

PRABU-JEYABALAN, M. et al. Mechanism of substrate recognition by drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 protease variants revealed by a novel structural intermediate. **Journal of virology**, v. 80, n. 7, p. 3607-3616, 2006.

PUJALTÉ, I. et al. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. **Part Fibre Toxicol**, v. 8, n. 10, p. 1-16, 2011.

PULSKAMP, K.; DIABATÉ, S.; KRUG, H. F. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. **Toxicology letters**, v. 168, n. 1, p. 58-74, 2007.

QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. **Pharmaceutical research**, v. 15, n. 7, p. 1056-1062, 1998.

RANDOLPH, J. T.; DEGOEY, D. A. Peptidomimetic inhibitors of HIV protease. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 4, n. 10, p. 1079-1095, 2004.

RAWAT, M. et al. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 9, p. 1790, 2006.

REDSHAW, S. Inhibitors of HIV proteinase. 2008.

SANTOS, G. C. M. **Desenvolvimento de culturas tridimensionais de células e sua aplicação na avaliação de biocompatibilidade de materiais poliméricos**. 2012. Universidade de São Paulo

SAYES, C. M. et al. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. **Toxicological Sciences**, v. 92, n. 1, p. 174-185, 2006.

SCHAFFAZICK et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHAFFAZICK et al. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R. Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antioxidante de sistemas nano e microparticulados contendo melatonina. 2006.

SCHIFFMAN, S. S. et al. Effect of protease inhibitors on the sense of taste. **Nutrition**, v. 15, n. 10, p. 767-772, 1999.

SCHRAGER, L. K.; D'SOUZA, M. P. Cellular and anatomical reservoirs of HIV-1 in patients receiving potent antiretroviral combination therapy. **Jama**, v. 280, n. 1, p. 67-71, 1998.

SHAH, L. K.; AMIJI, M. M. Intracellular delivery of saquinavir in biodegradable polymeric nanoparticles for HIV/AIDS. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 11, p. 2638-2645, 2006.

SHARMA, P.; GARG, S. Pure drug and polymer based nanotechnologies for the improved solubility, stability, bioavailability and targeting of anti-HIV drugs. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 4, p. 491-502, 2010.

SHAW T. M., M. T. J., PARISH N, ET AL. Tolerability and pharmacokinetics of single oral doses of Ro 1-8959, an HIV proteinase inhibitor. **Br J Clin Pharmacol**, v. 34, p. 166-7, 1992.

SHEN, J.; BURGESS, D. J. In vitro dissolution testing strategies for nanoparticulate drug delivery systems: recent developments and challenges. **Drug delivery and translational research**, v. 3, n. 5, p. 409-415, 2013.

SHIBUYAMA, S. et al. Understanding and avoiding antiretroviral adverse events. **Current pharmaceutical design**, v. 12, n. 9, p. 1075-1090, 2006.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 163-174, 2012.

SIQUEIRA, N. M. Desenvolvimento tecnológico e avaliação da penetração cutânea de benzofenona-3 a partir de nanocápsulas revestidas com quitosana. 2008.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of controlled release**, v. 70, n. 1, p. 1-20, 2001.

SOUZA, M. V. N.; ALMEIDA, M. V. Drogas anti-VIH: passado, presente e perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 366-372, 2003.

STONE VE, H. L., BOSWELL SL. . **Discontinuation of protease inhibitor therapy: reasons and risk factors**. 12th World AIDS Conference. Geneva, Switzerland 1998.

THOMSON, M. M.; NÁJERA, R. Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. **AIDS Rev**, v. 7, n. 4, p. 210-224, 2005.

TOMAR, L. K. et al. Poly (PEGDMA-MAA) copolymeric micro and nanoparticles for oral insulin delivery. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 22, n. 12, p. 1760-1767, 2011.

TORCHILIN, V. P.; TRUBETSKOY, V. S. Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating? **Advanced drug delivery reviews**, v. 16, n. 2, p. 141-155, 1995.

TYMCHUK, C. N.; CURRIER, J. S. The safety of antiretroviral drugs. 2008.

VELLA, S.; FLORIDIA, M. Saquinavir. **Clinical pharmacokinetics**, v. 34, n. 3, p. 189-201, 1998.

VICINI, L.; SOUZA, A. M. Análise multivariada da teoria à prática. **Santa Maria: UFSM, CCNE**, 2005.

VON BRIESEN, H.; RAMGE, P.; KREUTER, J. Controlled release of antiretroviral drugs. **AIDS Rev**, v. 2, n. 1, p. 31-38, 2000.

VYAS, T. K.; SHAH, L.; AMIJI, M. M. Nanoparticulate drug carriers for delivery of HIV/AIDS therapy to viral reservoir sites. 2006.

WASHINGTON, C. Evaluation of non-sink dialysis methods for the measurement of drug release from colloids: effects of drug partition. **International journal of pharmaceutics**, v. 56, n. 1, p. 71-74, 1989.

_____. Drug release from microdisperse systems: a critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 58, n. 1, p. 1-12, 1990.

WEISS-ANGELI, V. Desenvolvimento e caracterização de formulações fotoprotetoras contendo nanocápsulas. 2007.

WESSLER, K. **Sistemas de p(3hb) e p(3hb-co-3hv) com policaprolactona-triol: comportamento de fases, reologia, propriedades mecânicas e processabilidade**. 2007. Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville.

WHO. World Health Organization. Global HIV/AIDS Response: Epidemic update and health sector progress towards Universal Access: progress report 2011. **Geneva, Switzerland: World Health Organization**. Accessed, v. 15, p. 2012, 2011.

_____. World Health Organization. HIV/AIDS. 2014. Acesso em: 04 março 2015.

WILLIAMS, P.; SAMPSON, A.; GREEN, C. Disposition and bioavailability of the HIV-proteinase inhibitor, Ro 31-8959, after single doses in healthy volunteers. **Br J Clin Pharmacol**, v. 34, n. 2, p. 155P-6P, 1992.

WINSTON, A.; BOFFITO, M. The management of HIV-1 protease inhibitor pharmacokinetic interactions. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 1-5, 2005.

WOHL, D. A. et al. Current concepts in the diagnosis and management of metabolic complications of HIV infection and its therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 5, p. 645-653, 2006.

WONG, H. L. et al. Nanotechnology applications for improved delivery of antiretroviral drugs to the brain. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 4, p. 503-517, 2010.

WOODROW, K. A. et al. Intravaginal gene silencing using biodegradable polymer nanoparticles densely loaded with small-interfering RNA. **Nature materials**, v. 8, n. 6, p. 526-533, 2009.

WU, X. et al. HIV protease inhibitors in gut barrier dysfunction and liver injury. **Current opinion in pharmacology**, v. 19, p. 61-66, 2014.

XIA, H. et al. Penetratin-functionalized PEG-PLA nanoparticles for brain drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 436, n. 1, p. 840-850, 2012.

XIA, T. et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. **Nano letters**, v. 6, n. 8, p. 1794-1807, 2006.

XIA, T.; LI, N.; NEL, A. E. Potential health impact of nanoparticles. **Annual review of public health**, v. 30, p. 137-150, 2009.

XU, L.; DESAI, M. C. Pharmacokinetic enhancers for HIV drugs. **Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)**, v. 10, n. 8, p. 775-786, 2009.

YANG, H. et al. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. **Journal of applied Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 69-78, 2009.

ZHA, W. et al. The Cellular pharmacokinetics of HIV protease inhibitors: current knowledge and future perspectives. **Current drug metabolism**, v. 13, n. 8, p. 1174-1183, 2012.