

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

Desenvolvimento de pós e grânulos facilmente redispersíveis contendo nanocápsulas
de núcleo lipídico

DIEGO FONTANA DE ANDRADE

PORTO ALEGRE, 2017

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

Desenvolvimento de pós e grânulos facilmente redispersíveis contendo nanocápsulas
de núcleo lipídico

Tese apresentada por **Diego Fontana de
Andrade** para obtenção do TÍTULO DE
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Porto Alegre, 2017

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 11.07.2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Karina Paese

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Letícia Cruz

Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

de Andrade, Diego Fontana

Desenvolvimento de pós e grânulos facilmente redispersíveis contendo nanocápsulas de núcleo lipídico / Diego Fontana de Andrade. -- 2017. 191 f.

Orientador: Ruy Carlos Ruver Beck.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. nanotecnologia. 2. leito fluidizado. 3. secagem por aspersão. 4. nanocápsulas poliméricas. 5. redispersão de formas farmacêuticas sólidas. I. Ruver Beck, Ruy Carlos, orient. II. Título.

Este trabalho foi realizado no laboratório 405, do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foram também realizadas análises no Instituto de Química e no Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Departamento de Tecnologia Farmacêutica e Biofarmacêutica da Universidade de Saarland e no Helmholtz Centro de Pesquisa de Infecções (HZI) e Instituto de Pesquisa Farmacêutica de Saarland (HIPS), em Saarbruecken, na Alemanha. Agradecimentos a CAPES, CNPq e FAPERGS pelo financiamento que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Esta Tese de doutorado é produto de esforços individuais e coletivos; é a concretização de um objetivo, traçado ao longo dos anos, e compartilhado com todas e todos que confiaram neste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador, Ruy Carlos Ruver Beck, pelo acolhimento, pelo apoio, pelo encorajamento frente aos obstáculos, pelas excelentes contribuições científicas.

À professora Irene Kulkamp Guerreiro, pelo carinho, gentileza e respeito com que me acolheu durante sua supervisão; pela motivação e disponibilidade em participar da construção deste trabalho.

Registro um agradecimento especial a quatro cientistas, mulheres e profissionais às quais tenho profunda admiração, que participaram ativamente da execução deste trabalho, contribuindo de forma substancial: Dra. Maike Windbergs, da *Saarland University*; Dra. Juliana Bender Hoppe, do Departamento de Bioquímica (UFRGS), Dra. Karine Coradini, egressa deste Programa de Pós-Graduação e a colega de doutorado, Me. Edilene Gadêlha. Vocês fizeram a diferença. Muito obrigado!

Agradeço também às professoras Adriana Raffin Pohlmann e Sílvia Staniçuaski Guterres, pela oportunidade de integrar a equipe do laboratório 405, pelos ensinamentos transmitidos, pelo exemplo e pelas colaborações científicas.

Aos professores que participaram da banca em meu exame de qualificação de doutorado: Letícia Cruz, Marcelo Dutra Arbo e Valquíria Bassani. Suas contribuições foram extremamente valiosas para enriquecer e valorizar este trabalho.

Aos órgãos de fomento à pesquisa, em especial à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento de recursos; também agradeço indiretamente a muitos e muitas que não medem esforços para que políticas públicas relacionadas à educação, ciência e tecnologia sejam implementadas e executadas em nosso país.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de cursar a Pós-Graduação em uma instituição pública de ensino gratuita e de qualidade,

em um Programa reconhecido nacional e internacionalmente pelo alto nível da ciência que produz. Pelos conhecimentos adquiridos quando tive o prazer de integrar, como representante discente, a Comissão deste PPG, acerca da administração e do funcionamento da máquina pública.

Aos servidores técnico-administrativos da Faculdade de Farmácia da UFRGS, responsáveis pela manutenção do bom funcionamento da instituição a fim de cumprir com seus objetivos relacionados ao ensino, pesquisa e extensão.

Agradeço imensamente aos meus queridos amigos e colegas do curso de Farmácia da Universidade Federal de Santa Maria, que acompanharam e compartilharam esta jornada, pelo apoio emocional, incentivo, pelo exemplo, pelas trocas de experiências e longos anos de amizade sincera: Aline Swchertner Palma, Claudia Schneider Romero, Fernando Araújo de Freitas, Izabelle de Mello Gindri e Luiza Lena Bastos.

Agradeço profundamente à minha família, minha mãe Giselda, meu pai Elemar, minha irmã Sabrina, minha sobrinha Laura, pela vida, pela cumplicidade, pelo amor incondicional. Pelo apoio nos momentos difíceis, por acreditarem neste projeto de vida, pelas alegrias compartilhadas nos momentos felizes que passamos juntos. Um obrigado muito especial aos meus pais, que desde muito cedo ensinaram o valor da educação na construção do indivíduo como humano e cidadão; nunca vou me cansar de aprender com vocês!

Agradeço finalmente ao Ricardo Citolin, meu companheiro, meu melhor amigo, o amor que eu escolhi para a vida. Obrigado pela compreensão, pela paciência, pelo estímulo e pelo companheirismo que contribuiu para tornar o caminho mais leve e agradável.

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

(SCHOPENHAUER, 2010, p.156-157)

RESUMO

Esta tese de doutorado trata do desenvolvimento inédito de formas farmacêuticas sólidas contendo nanocápsulas de núcleo lipídico, facilmente redispersíveis em água, empregando a secagem por aspersão ou granulação em leito fluidizado. A estratégia visa superar limitações tecnológicas associadas às suspensões de nanocápsulas poliméricas, pela sua natureza coloidal, e avançar na fronteira do conhecimento, buscando o desenvolvimento de formulações inovadoras para a administração oral de fármacos. Foram produzidos pós e grânulos contendo nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC), empregando a secagem por aspersão e granulação em leito fluidizado, respectivamente. A influência do número de partículas das suspensões de nanocápsulas nas propriedades de redispersão dos pós produzidos pela secagem por aspersão foi investigada. Uma mistura de maltodextrina e L-leucina (90:10 m/m) foi utilizada como adjuvante de secagem. A formulação que obteve os melhores perfis de redispersão consistiu de uma mistura da suspensão de nanocápsulas de núcleo lipídico e de uma solução contendo maltodextrina/L-leucina (10% m/v) em uma proporção 1:1 v/v. Após a redispersão dos pós produzidos em água, 75% do número inicial de partículas de nanocápsulas foi recuperado. Análises de área superficial, microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal Raman permitiram compreender as diferenças na organização estrutural destes pós. Estes dados, em conjunto com análises de diâmetro médio de partículas, obtidos por difratometria de laser, confirmaram a influência do número inicial de partículas das suspensões de nanocápsulas na qualidade de sua redispersão, a partir de formulações sólidas obtidas pela secagem por aspersão. Para compreender as influências dos processos de secagem e redispersão da formulação proposta no perfil de liberação *in vitro* e na atividade biológica de fármacos associados ao sistema, novos pós foram preparados, substituindo-se a suspensão de nanocápsulas sem fármaco (LNC) por nanocápsulas contendo uma substância ativa modelo (curcumina) (LNC-C 1 mg mL⁻¹). A formulação seca demonstrou adequada redispersão em água e o perfil de liberação *in vitro* manteve-se semelhante ao da suspensão original (LNC-C), seguindo um modelo cinético de ordem zero. A atividade da curcumina nanoencapsulada foi avaliada empregando um modelo

de inflamação induzida por LPS em cultura organotípica de cultura de hipocampo cerebral de ratos. Não houve alterações nas concentrações de biomarcadores pró-inflamatórios (TNF- α e IL-1 β) liberados nos meios de cultura, comparando-se as LNC-C em suspensão ou a redispersão dos pós secos. Portanto, a produção de pós facilmente redispersíveis não implica em alterações no controle da liberação *in vitro* e na atividade biológica da substância ativa nanoencapsulada. Na última etapa, a obtenção dos grânulos empregando granulador em leito fluidizado foi estudada utilizando maltodextrina, como material de suporte, e suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico estabilizadas com polissorbato 80 (LNC) ou com revestimento catiônico (C-LNC), como líquidos aglutinantes. A influência do revestimento catiônico das nanocápsulas nas características tecnológicas dos grânulos obtidos foi avaliada. Propriedades como o tamanho de partícula, rendimento, teor de umidade, características morfológicas, propriedades de fluxo e perfil de redispersão foram estudados. Os rendimentos do processo de granulação foram próximos a 90%, resultando em grânulos com teor de umidade inferior a 4%. Valores calculados de índice de Carr, fator de Hausner e índice de coesão indicaram que as formulações de grânulos propostas neste estudo apresentam melhores características de fluxo em relação à maltodextrina (matéria-prima). O revestimento catiônico das nanocápsulas melhorou tanto as propriedades de fluxo quanto o perfil de redispersão em água dos grânulos contendo C-LNC, demonstrado a partir das análises de diâmetro médio de partículas por difratometria de laser. Em conclusão, os processos de secagem por aspersão e granulação em leito fluidizado, empregados neste estudo, para a produção de formas farmacêuticas sólidas intermediárias e/ou finais contendo nanocápsulas de núcleo lipídico, mostraram-se alternativas viáveis para a produção de pós e grânulos facilmente redispersíveis em água, com potencial aplicação para administração oral de fármacos nanoencapsulados.

Palavras-chave: curcumina, grânulos, leito fluidizado, nanocápsulas de núcleo lipídico, redispersão, secagem por aspersão.

ABSTRACT

Development of powders and granules easily redispersible containing lipid-core nanocapsules.

This thesis proposes the development of novel easily redispersible solid dosage forms containing lipid-core nanocapsules, produced by spray drying or fluidized bed granulation. The strategy aims to overcome the technological limitations associated to polymeric nanocapsule suspensions, due to their colloidal nature, aiming the development of innovative oral formulations. Powders and granules containing lipid-core nanocapsules (LNC) were produced by spray-drying and fluidized bed granulation, respectively. The influence of the number of particles of the nanocapsule suspensions on the redispersion properties of the spray-dried powders was investigated. A mixture of maltodextrin and L-leucine (90:10 m/m) was used as a drying adjuvant. The formulation that obtained the best redispersion profiles consisted of a mixture of the lipid-core nanocapsule suspension and a solution containing maltodextrin/L-leucine (10% w/v) in a 1:1 v/v ratio. After the aqueous redispersion, 75% of the initial number of particles in the nanocapsules suspension was recovered. Analysis of surface area, by scanning electron microscopy and by Raman confocal microscopy allowed understanding the differences in the structural organization of the powders produced. These results along with the mean diameter analysis by laser diffractometry confirmed the influence of the initial number of particles of the nanocapsule suspensions on the redispersion properties of the spray-dried powders. In order to understand the influence of the drying and redispersion processes on the *in vitro* release profile and the biological activity of substances associated to this system, new powder formulations were prepared by replacing the unloaded suspension of nanocapsules (LNC) by nanocapsules containing an active substance (curcumin) (LNC-C 1 mg mL⁻¹). The spray-dried powder showed good aqueous redispersion profile and its *in vitro* release profile remained similar to that of the original LNC-C suspension, according to the zero-order kinetic model. The biological activity of nanoencapsulated curcumin was assessed by a model of LPS-induced inflammation in

organotypic hippocampal slice cultures. There were no changes in the concentration of pro-inflammatory biomarkers (TNF- α and IL-1 β) released in the culture media, comparing the LNC-C as the initial suspension or the aqueous redispersion of their spray-dried powders. The drying process does not imply changes in the control of in vitro release and in the biological activity of the nanoencapsulated active substance. In the last stage, granules were produced using a fluidized bed granulator and maltodextrin, as support material. Lipid-core nanocapsules suspensions stabilized with polysorbate 80 (LNC) or with a cationic coating (C-LNC) were used as binder liquids. The influence of the cationic coating of the nanocapsules on the technological characteristics of the produced granules was evaluated. Properties such as particle size, yield, moisture content, morphological characteristics, flow properties and redispersion profile were also studied. Granulation process yields were close to 90%, resulting in granules with moisture content of less than 4%. Calculated values of Carr index, Hausner ratio and cohesion index indicated that the granule formulations proposed in this study present better flow characteristics in relation to the maltodextrin raw material. The cationic coating of the nanocapsules improved the flow properties and the aqueous redispersion profile of the granules containing C-LNC, as demonstrated by laser diffraction analysis. In conclusion, the spray-drying and fluidized bed granulation processes used in this study are viable alternatives for the production of easily redispersible powders and granules containing lipid-core nanocapsules, showing potential application for oral administration of drug-loaded lipid-core nanocapsules.

Keywords: Curcumin, fluidized bed, granules, lipid-core nanocapsules, redispersion, spray drying.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1.** Representação da estrutura supramolecular das nanocápsulas de núcleo lipídico. (A) Nanocápsula de núcleo lipídico sem revestimento. (B) Nanocápsula de núcleo lipídico revestida com quitosana. Composição: 1) tensoativo hidrofílico (polissorbato 80); 2) parede polimérica (poly(ϵ -caprolactone)); 3) revestimento catiônico (quitosana); 4) núcleo lipídico (componente oleoso + monoestearato de sorbitano).....30
- Figura 2.** Fórmula estrutural da curcumina ((1E, 6E)-1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona).....33
- Figura 3.** Esquema de um equipamento para secagem por aspersão do tipo *spray dryer*.....34
- Figura 4.** Esquema de um granulador tipo leite fluidizado.....38

CAPÍTULO I

- Figure 1.** Particle size distribution profile of different candidates for redispersible spray- dried lipid-core nanocapsules formulation (F100, F75:25, F50:50) and original lipid-core nanocapsules suspension (LNC) obtained by laser diffraction directly after fabrication.....58
- Figure 2.** Particle size distribution profile of the F50:50M (without L-leucine) formulation obtained by laser diffractometry, before (0 min) and after 5 minutes stirring.....59
- Figure 3.** SEM images of F50:50B (A), F50:50 (B), F75:25 (C) and F100 (D) spray-dried formulations at 20,000 x magnification.....61
- Figure 4.** Single Raman spectra of individual compounds: L-leucine, maltodextrin and LNC. (bands for identification are highlighted).....62
- Figure 5.** False color Raman images of the F50:50 formulation. (A) a representative big agglomerate and (B) smaller particles. Maltodextrin and L-leucine are depicted in blue, while LNC are depicted in yellow.....63

Figure 6. False color Raman images of F75:25 (A) and F100 (B) agglomerates. LNC are depicted in yellow.....63

Figure 7. Particle size distribution profile of the F50:50 spray-dried formulation after aqueous redispersion (0.695g in 5 mL of ultrapure water) obtained by laser diffraction at 0 minutes. (A) Particle diameter expressed by volume of particles and (B) particle diameter expressed as number of particles.....64

Figure 8. TEM images of (A) LNC original suspension and (B) redispersed F50:50 (0.695g in 5 mL of water) at 250,000 x magnification.....65

CAPÍTULO II

Figure 1. SEM images of SD-LNC-C formulations (A) at 1,000 x magnification and (B) at 20,000 x magnification.....101

Figure 2. False color Raman images of spray-dried curcumin-loaded lipid-core nanocapsules. (A) agglomerates and (B) single spray-dried particle assembly. Maltodextrin and leucine are depicted in blue and LNC-C in yellow, respectively.....102

Figure 3. Particle size distribution profile of LNC-C suspension and SD-LNC-C formulation after aqueous redispersion (0.695g in 5 mL of ultrapure water) obtained by laser diffraction at 0 minutes, n = 3. Particle size expressed as number based distributions.....103

Figure 4. *In vitro* curcumin release/ diffusion profiles from curcumin-loaded lipid-core nanocapsules (LNC-C), redispersed spray-dried curcumin-loaded lipid-core nanocapsules (SD-LNC-C) and ethanolic solution (free curcumin) after 72 hours....
.....104

Figure 5. LPS-induced increase in TNF- α and IL-1 β levels in organotypic hippocampal cultures can be attenuated by LNC-C. (A) LNC-C and SD-LNC-C prevented the LPS-induced increase in TNF- α in the culture medium after exposure of hippocampal slices to LPS. (B) free curcumin, LNC-C and SD-LNC-C did not prevent the LPS-induced increase in IL-1 β levels by LNC-C in the culture medium after exposure of hippocampal slices to LPS. Pretreatment with vehicle (DMSO 0.5%), free

curcumin 5 μ M, LNC-C 5 μ M, SD-LNC-C 5 μ M, LNC-B or SD-LNC-B 1 hour before exposure to LPS for 48 h. The measured TNF- α and IL-1 β medium levels of control groups were below the method detection limit of 0.125 pg/mL. Results are expressed by mean \pm S.E.M., n = 5. Statistically significant differences were denoted as * to $p \leq 0.05$ (One-way ANOVA followed by Tukey's test post hoc)106

CAPÍTULO III

Figure 1. Scanning electron microscopy (SEM) images of (A) maltodextrin raw material (substrate), (B) maltodextrin fluid bed granules (FB-MD), (C) fluid bed granules containing lipid-core nanocapsules (FB-LNC), (c1) expanded photomicrograph (magnification of 20.000 x, with a bar of 1 μ m) FB-LNC showing its irregular surface, where the presence of nanosized structures can be observed and (D) fluid bed granules containing cationic lipid-core nanocapsules (FB-CS-LNC)134

Figure 2. Scanning electron microscopy (SEM) images after in situ maltodextrin solubilization of: (A) matodextrin raw material, (B) fluid bed maltodextrin granules (FB-MD), (C) fluid bed granules containing lipid-core nanocapsules (FB-LNC), and (D) fluid bed granules containing cationic lipid-core nanocapsules (FB-CS-LNC).....
.....135

Figure 3. Particle size distribution profiles by laser diffraction of the FB-LNC and FB-CS-LNC granules after their aqueous redispersion. (A) samples redispersed in ultrapure water and sonicated before adding to the wet dispersion unit (B) samples added directly into the wet dispersion unit and (n = 3)137

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

| | |
|--|----|
| Table 1. Composition of spray-dried lipid-core nanocapsules powders..... | 53 |
| Table 2. Surface area ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) and pore volume ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$) of different candidates for redispersible spray-dried lipid-core nanocapsules formulation (F100, F75:25, F50:50) and F50:50B (without lipid-core nanocapsules) evaluated by BET and BJH methods..... | 60 |

CAPÍTULO II

| | |
|---|-----|
| Table 1. Physicochemical characteristics of curcumin-loaded lipid-core nanocapsules (LNC-C)..... | 105 |
|---|-----|

CAPÍTULO III

| | |
|--|-----|
| Table 1. Particle size analysis by laser diffraction of the fluid bed granules (mean \pm SD, n = 3) | 133 |
| Table 2. Flow properties of maltodextrin raw material and the fluid bed granules (mean \pm SD, n = 3) | 136 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| 1. INTRODUÇÃO | 23 |
| 2. OBJETIVOS | 23 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 25 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 25 |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA..... | 27 |
| 3.1 Nanocápsulas de núcleo lipídico | 29 |
| 3.2 Secagem por aspersão (<i>spray-drying</i>)..... | 34 |
| 3.3 Granulação empregando leito fluidizado | 37 |
| CAPÍTULO I..... | 41 |
| 4.1 Apresentação | 43 |
| 5. CAPÍTULO II | 83 |
| 5.1 Apresentação | 85 |
| 6. CAPÍTULO III | 119 |
| 6.1 Apresentação | 121 |
| 7. DISCUSSÃO GERAL | 149 |
| 8. CONCLUSÕES..... | 163 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 167 |
| 10. ANEXO | 183 |
| Carta de aprovação – CEUA/UFRGS | 185 |
| 11. APÊNDICE | 187 |
| 11.1 Apresentação | 189 |
| ABSTRACT | 191 |

1. INTRODUÇÃO

A nanociência compreende uma área de conhecimento multidisciplinar, que envolve a manipulação de estruturas na escala molecular. Nas últimas décadas, tecnologias que se apropriam dos conhecimentos provenientes desta ciência têm sido amplamente empregadas nos mais diversos setores industriais, trazendo novas perspectivas nas áreas das engenharias, ciências da computação, tecnologias da informação, biotecnologia e ciências farmacêuticas (MANGEMATIN & WALSH, 2012).

No desenvolvimento de medicamentos, a nanotecnologia vem sendo aplicada para a produção de nanocarreadores, estruturas submicrométricas às quais fármacos podem ser associados, que apresentam vantagens na terapêutica em relação às formas farmacêuticas convencionais (SCHAFFAZICK et al., 2003a; FRANK et al., 2015). Formulações contendo diferentes tipos de nanoestruturas já se encontram no mercado farmacêutico e estudos projetam um maior investimento da indústria em produtos que contemplam esta tecnologia no seu processo de produção para a próxima década (BAMRUNGSAP et al., 2012).

A consolidação do interesse no desenvolvimento de plataformas nanoestruturadas para o controle da liberação de fármacos é atribuída à série de vantagens proporcionadas por estes sistemas. Estudos têm demonstrado ampla potencialidade dos sistemas contendo fármacos ou ativos associados à nanocarreadores, após sua administração empregando diferentes vias, como a melhora da solubilidade aparente de fármacos (FACHINETTO et al., 2008), o aumento da sua biodisponibilidade (MANCONI et al., 2013; AQIL et al.; 2013), a possibilidade de vetorização, incluindo um maior aporte de moléculas de interesse biológico ao sistema nervoso central (BERNARDI et al., 2009a; FROZZA et al., 2010; MAHAJAN et al., 2014; DIMER et al., 2014; HELM et al., 2015; RODRIGUES et al.; 2016), a alteração no perfil de distribuição tissular, incluindo a modificação da distribuição de ativos nas camadas da pele (SILVA et al., 2013; DE ANDRADE, 2015; ALIASGHARLOU et al., 2016), a melhora da permeação de substâncias através de barreiras biológicas (WHOLFART et al.; 2012), a melhora no índice terapêutico (ALONSO et al., 2004; BENVIGNÚ et al., 2011; DETONI et al., 2012), a proteção da mucosa gastrintestinal frente à toxicidade do fármaco (BECK et al., 2005), a proteção do fármaco frente a

inativação e degradação no meio gastrintestinal ou a outros fatores extrínsecos (OURIQUE et al., 2008. ALMEIDA et al., 2010; FONTANA et al., 2010; DETONI et al., 2012), o aumento da eficiência farmacológica (ZANOTTO-FILHO et al., 2013; FRIEDRICH et al., 2015; CHIU et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016), além do desenvolvimento de sistemas de liberação controlada (FONTANA et al., 2009).

Por definição, nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos com dimensões na escala nanométrica. Podem ser classificadas, de maneira geral, como nanocápsulas e nanoesferas, de acordo com a sua composição quali-quantitativa e sua organização supramolecular (BANIK et al., 2016). As nanoesferas são estruturas matriciais e as nanocápsulas estruturas vesiculares, onde um núcleo oleoso é envolto por uma parede constituída por um polímero biocompatível e biodegradável (MORA-HUERTAS et al., 2010). Recentemente nanocápsulas de núcleo lipídico foram propostas por VENTURINI e colaboradores (2011), com propriedades mecânicas distintas das nanocápsulas convencionais, devido ao núcleo oleoso ser composto por uma dispersão de um lipídio sólido, o monoestearato de sorbitano, em um lipídio líquido, no caso uma mistura de triglicerídeos de cadeia média (JÄGER et al., 2009; VENTURINI et al., 2011; FIEL et al., 2011). As vantagens biológicas das nanocápsulas de núcleo lipídico são relatadas em diversos trabalhos da literatura ao longo das duas últimas décadas. Entretanto, esses sistemas coloidais, assim como as nanoesferas e nanocápsulas convencionais, apresentam estabilidade físico-química limitada. Por serem suspensões coloidais aquosas, pode haver comprometimento da estabilidade dos sistemas por reações de hidrólise do polímero, do óleo, a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas, presença de tensoativos adsorvidos, a aglomeração das partículas em função do tempo, a liberação prematura da substância ativa, além da propensão da suspensão, pela alta quantidade de água, à proliferação microbiana (SCHAFFAZICK et al., 2003a). Além disto, formas farmacêuticas líquidas são mais dispendiosas para a indústria farmacêutica, devido aos maiores custos com transporte, demanda de maior área para armazenamento, riscos de quebras e vazamentos das embalagens.

Neste cenário, existem estudos que propõem técnicas de secagem das suspensões de nanocápsulas em pós micrométricos, como a liofilização

(SCHAFFAZICK et al., 2003a; KHAIATA et al., 2012; RIBEIRO et al., 2016) e a secagem por aspersão (MÜLLER et al., 2000; GUTERRES et al., 2009; BECK et al.; 2012; HOFFMEINSTER et al., 2012; MARCHIORI et al., 2013; RIBEIRO et al., 2016). Recentemente, a técnica de impressão 3D foi proposta por BECK e colaboradores (2017) para a incorporação de nanocápsulas poliméricas a formas farmacêuticas sólidas, como alternativa à etapa intermediária de conversão dos sistemas coloidais a pós micrométricos.

A técnica de granulação por via úmida também já foi proposta como alternativa para a obtenção de formas sólidas contendo nanocápsulas poliméricas (FRIEDRICH et al., 2010). Este estudo foi realizado pela técnica convencional de granulação por via úmida, utilizando mistura manual dos componentes e do sistema aglutinante (suspensão de nanocápsulas + polivinilpirrolina a 3%), seguida da granulação e secagem em estufa de ar circulante por 48 horas. Apesar de esta técnica convencional ser bastante utilizada pela indústria farmacêutica, sistemas automatizados, como sistemas de leito fluidizado, têm sido utilizados em substituição às técnicas convencionais.

O granulador de leito fluidizado permite que o processo de mistura dos pós e a etapa de granulação sejam realizados em uma única etapa. Esse granulador realiza a pré-mistura dos pós da formulação, incluindo substâncias ativas, diluentes, desintegrantes, em um leito de ar fluidizado, seguida da granulação da mistura por meio da atomização de um aglutinante líquido sobre o leito de pós e secagem dos grânulos até a obtenção do teor de umidade necessário (AULTON, 2005; ALLEN, 2007). Dentre as vantagens da utilização do sistema de leito fluidizado, podemos destacar a economia de custos, tempo e redução das perdas relacionadas às etapas de transferência, além da possibilidade de automação, em relação à técnica convencional de granulação por via úmida. Apesar de suas vantagens na produção de formas farmacêuticas sólidas intermediárias ou finais, não foram encontrados relatos na literatura técnica e científica do emprego desta estratégia no processo de granulação utilizando nanocápsulas poliméricas.

Muitas vantagens biológicas atribuídas às nanocápsulas poliméricas estão relacionadas às suas características físicas e de superfície (especialmente o tamanho de

partícula e área superficial). Portanto, no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas contendo nanocápsulas de núcleo lipídico, sejam intermediárias ou finais, é imprescindível considerar que a redispersão aquosa dos produtos obtidos deve ser simples, rápida e permitir a recuperação de estruturas na escala nanométrica com manutenção da integridade de sua estrutura supramolecular.

Neste contexto, considerando as potencialidades das nanocápsulas de núcleo lipídico como sistemas carreadores de fármacos, a necessidade de estratégias que viabilizem o aumento da estabilidade físico-química e microbiológica destes sistemas coloidais, os avanços descritos na literatura a respeito da conversão de sistemas nanoestruturados líquidos em sistemas sólidos como pós e grânulos, e a importância da etapa de redispersão aquosa destas formas farmacêuticas sólidas para garantir as vantagens dos sistemas nanoestruturados frente aos sistemas convencionais de administração de fármacos, o presente estudo apresenta como hipótese de trabalho a viabilidade de produção de formas farmacêuticas sólidas intermediárias e/ou finais contendo nanocápsulas poliméricas, que sejam facilmente redispersíveis em água, recuperando o tamanho nanométrico das suspensões coloidais originais, a partir da otimização da composição das formulações e dos parâmetros do processo empregados nas técnicas de secagem por aspersão e granulação em leito fluidizado.

Para a validação da hipótese, a presente tese de doutorado foi delineada contemplando três etapas principais: 1) a avaliação da influência do número de partículas em suspensão na redispersibilidade de pós obtidos por secagem por aspersão; 2) a avaliação dos processos de secagem e redispersão em água de pós obtidos por secagem por aspersão no controle da liberação e na manutenção da atividade biológica de um fármaco nanoencapsulado, empregando a curcumina como substância ativa modelo; 3) a avaliação do processo de granulação em leito fluidizado na obtenção de grânulos contendo nanocápsulas poliméricas e da influência das características de superfície das nanocápsulas poliméricas nas suas propriedades de redispersão aquosa.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o emprego das técnicas de secagem por aspersão e granulação em leito fluidizado na produção de formas farmacêuticas sólidas intermediárias e/ou finais (pós e grânulos) contendo nanocápsulas de núcleo lipídico, que sejam facilmente redispersíveis em água, recuperando a população nanométrica da suspensão coloidal original.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir e caracterizar nanocápsulas de núcleo lipídico contendo ou não curcumina;
- Produzir e caracterizar pós redispersíveis contendo nanocápsulas de núcleo lipídico empregando a técnica de secagem por aspersão, avaliando a influência dos adjuvantes e da concentração de nanopartículas nas características finais do pós;
- Avaliar a influência do processo de secagem por aspersão no perfil de liberação *in vitro* e na atividade biológica da curcumina nanoencapsulada oriunda da redispersão dos pós produzidos;
- Estudar a viabilidade de obtenção de grânulos contendo nanocápsulas de núcleo lipídico empregando granulação em leito fluidizado e a suspensão de nanocápsulas de núcleo lipídico como líquido aglutinante;
- Avaliar a influência do revestimento catiônico das nanocápsulas de núcleo lipídico nas características físico-químicas e no perfil de redispersão em água dos grânulos obtidos por granulação em leito fluidizado.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Nanocápsulas de núcleo lipídico

Por definição, nanocarreadores são caracterizados como sistemas coloidais que, no campo da medicina, podem ser explorados como vetores de fármacos, capazes de controlar sua liberação em sítios específicos e a sua velocidade de liberação a partir da forma farmacêutica (SCHAFFAZICK et al., 2003a; POHLMANN et al., 2013). Dentre os nanocarreadores de fármacos amplamente estudados nas últimas décadas, destacamos as nanopartículas poliméricas, estruturas orgânicas com diâmetro inferior a 1 μm , comumente produzidas através de polimerização “*in situ*” ou por precipitação de polímeros pré-formados (VAUTHIER & BOUCHEMAL, 2009; MORA-HUERTAS et al., 2010).

Nanocápsulas poliméricas são nanopartículas poliméricas vesiculares, onde gotículas nanométricas de um componente ou mistura de componentes oleosos são envoltas por uma parede polimérica, composta preferencialmente por polímeros biocompatíveis e/ou biodegradáveis, dependendo do uso e da via de administração proposta. Estes sistemas permitem a associação de fármacos à sua estrutura, inclusos ou dissolvidos no núcleo lipídico, dispersos ou adsorvidos na parede polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003; MORA-HUERTAS et al., 2010).

Nanocápsulas de núcleo lipídico, por sua vez, são nanocápsulas poliméricas que diferem das nanocápsulas convencionais pela natureza do seu núcleo, que é formado por um organogel (dispersão de um lipídio sólido, como o monoestearato de sorbitano, em um lipídio líquido) (Figura 1A).

A alteração na composição do núcleo das nanocápsulas de núcleo lipídico confere a esta plataforma propriedades mecânicas diferenciadas em relação às formulações convencionais de nanocápsulas. FIEL e colaboradores (2011) destacaram em seu trabalho a versatilidade deste sistema, uma vez que suas propriedades mecânicas e de deformabilidade podem ser moduladas, de acordo com o objetivo para os quais estas serão empregadas. Ainda, POLETTO e colaboradores (2015) demonstraram experimentalmente que o monoestearato de sorbitano, quando presente no núcleo das nanocápsulas de núcleo lipídico, é capaz de alterar as características das

pseudofases que constituem as nanocápsulas e aumentar significativamente a capacidade de carga de fármaco destes carreadores, ressaltando suas vantagens tecnológicas frente às estruturas convencionais.

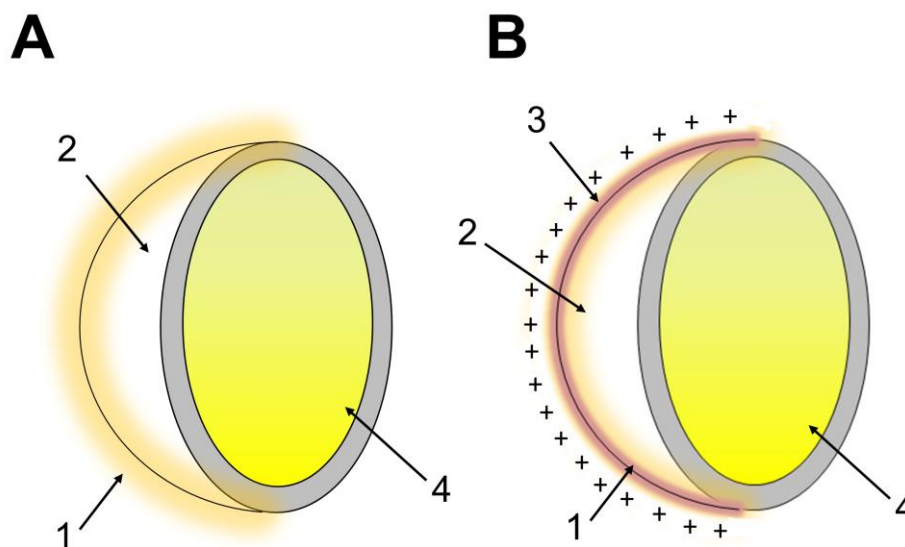


Figura 1. Representação da estrutura supramolecular das nanocápsulas de núcleo lipídico. (A) Nanocápsula de núcleo lipídico sem revestimento. (B) Nanocápsula de núcleo lipídico revestida com quitosana. Composição: 1) tensoativo hidrofílico (polissorbato 80); 2) parede polimérica (*poly(ϵ -caprolactone)*); 3) revestimento catiônico (quitosana); 4) núcleo lipídico (componente oleoso + monoestearato de sorbitano).

Além disso, JORNADA e colaboradores (2012) relataram a capacidade de controlar as variáveis do processo para a obtenção de formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico com características nanotecnológicas adequadas. Os autores propuseram estratégias que possibilitam o aumento da capacidade de carga de fármacos no sistema, sem comprometimento das suas características físico-químicas, o

que reforça o seu potencial promissor para a aplicação nas áreas cosmética e farmacêutica.

Além dos trabalhos citados acima, outros trabalhos publicados na literatura científica demonstram a versatilidade e as vantagens promovidas pela associação de substâncias ativas a nanocápsulas de núcleo lipídico, como o aumento do aporte de moléculas de interesse biológico ao sistema nervoso central (BERNARDI et al., 2009; FROZZA et al., 2010; DIMER et al., 2014), a alteração no perfil de distribuição tissular, incluindo a modificação da distribuição de ativos nas camadas da pele (SILVA et al., 2013; ANDRADE, 2015), o aumento do índice terapêutico (BENVEGNÚ et al., 2012; DETONI et al., 2012), a proteção do fármaco frente à inativação e degradação no meio fisiológico ou outros fatores extrínsecos (OURIQUE et al., 2008; ALMEIDA et al., 2010; FONTANA et al., 2009; DETONI et al., 2012) além do aumento da eficiência terapêutica (ZANOTTO-FILHO et al., 2013).

Recentemente foi demonstrado que as nanocápsulas de núcleo lipídico são capazes de atuar como facilitadores para o transporte de fármacos através da barreira hematoencefálica. RODRIGUES e colaboradores (2016) relataram que quando o éster etílico de indometacina é associado às nanocápsulas de núcleo lipídico, e administrado em camundongos, tanto pela via oral quanto pela via intravenosa, há maior efetividade no tratamento de glioblastoma quando comparado com a indometacina em solução, administrado pelas mesmas vias de administração.

Além disso, BENDER e colaboradores (2012) propuseram o desenvolvimento de uma formulação modificada de nanocápsulas de núcleo lipídico, estabilizadas por uma mistura de polissorbato 80 e lecitina, e revestidas com quitosana, um polissacarídeo catiônico biocompatível, capaz de conferir potencial zeta positivo à superfície das nanocápsulas poliméricas (Figura 1B). O revestimento de nanocápsulas poliméricas com polímeros catiônicos, como a quitosana, vem sendo propostos como uma estratégia inovadora a fim de promover interações eletrostáticas entre a superfície carregada positivamente dos nanocarreadores com superfícies biológicas que apresentam carga negativa (SIQUEIRA et al., 2011).

CÉ e colaboradores (2016) observaram que a formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico revestida com quitosana apresenta potencial aplicação na inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, obtido de isolados clínicos. A presença da quitosana nas nanocápsulas de núcleo lipídico contendo dapsona promoveu uma melhor resposta na inibição do microorganismo em relação ao fármaco encapsulado nas nanocápsulas de núcleo lipídico convencionais ou em sua forma livre.

Além disso, a hemocompatibilidade das nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com quitosana foi avaliada *in vitro*, sugerindo que tanto as nanocápsulas não revestidas quanto as revestidas são hemocompatíveis com células sanguíneas humanas. Esta observação reforça o potencial de aplicação terapêutica das nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com quitosana (BENDER et al., 2012).

Adicionalmente, estudos conduzidos nos últimos quatro anos sugerem potencial segurança no emprego das nanocápsulas de núcleo lipídico como sistemas carreadores de fármacos, a partir de avaliações toxicológicas considerando tratamentos agudos e subcrônicos empregando diferentes vias de administração de fármacos (intraperitoneal, intravenosa, intradérmica) em ratos (BULCÃO et al., 2013; BULCÃO et al., 2015; FRACASSO et al., 2016).

Ao longo dos últimos cinco anos, a associação da curcumina às nanocápsulas de núcleo lipídico tem se mostrado uma importante alternativa para contornar particularidades deste ativo que limitam seu emprego na clínica.

A curcumina é um polifenol derivado do rizoma *Curcuma longa*, comercializada como aditivo alimentar e amplamente estudado pelas suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Figura 2). Sua atividade anti-inflamatória está associada à inibição de metaloproteinases (MMP), diminuição do fator de necrose tumoral, inibição do fator de transcrição NF-κB, supressão da atividade da COX-2, entre outros (HENROTIN et al., 2010).

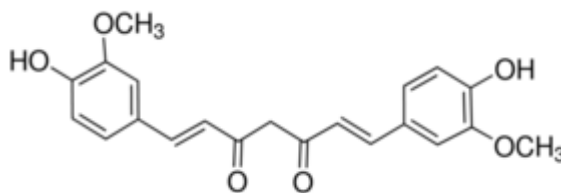


Figura 2. Fórmula estrutural da curcumina ((1E, 6E)-1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona).

Sua utilização é limitada em formulações farmacêuticas de uso oral pela sua baixa biodisponibilidade por essa via, devido ao extenso metabolismo intestinal e hepático (ANAND et al., 2007) e pela alta suscetibilidade à fotodegradação (HATCHER et al., 2008). No entanto, em estudo recente, ZANOTTO-FILHO e colaboradores (2013) encapsularam a curcumina em nanocápsulas de núcleo lipídico e demonstraram um aumento da atividade biológica desta molécula quando associada ao sistema nanoestruturado, no tratamento de modelos pré-clínicos de glioma, em relação à utilização da formulação contendo a molécula não encapsulada, utilizando a via intraperitoneal para administração, demonstrando a viabilidade e as vantagens da incorporação do polifenol às nanocápsulas poliméricas.

Ainda, JAQUES e colaboradores (2013) e HOPPE e colaboradores (2013) evidenciaram, através do emprego de modelos pré-clínicos de déficit cognitivo, induzidos por cigarro e A β (1-42) peptídeo, respectivamente, a eficiência da associação da curcumina às nanocápsulas de núcleo lipídico em aumentar a biodisponibilidade do ativo no sistema nervoso central. Através de administrações pelas vias oral (JAQUES et al., 2013) e intraperitoneal (HOPPE et al., 2013), as formulações foram capazes de prevenir, em maior extensão que a curcumina em solução, os danos cognitivos induzidos nos modelos estudados.

Diante dos excelentes resultados que vem sendo atribuídos à nanoencapsulação da curcumina como alternativa para seu emprego terapêutico, diversos pesquisadores tem centrado seus esforços no desenvolvimento e avaliação de sistemas nanoestruturados que sejam compatíveis com esse fim (APÊNDICE).

3.2 Secagem por aspersão (*spray-drying*)

A técnica de secagem por aspersão ou *spray-drying* é uma técnica amplamente utilizada para a conversão de soluções aquosas ou orgânicas, suspensões e emulsões em produtos púlvéreos, empregada em diversos setores industriais, tais como de alimentos, de insumos químicos, farmacêutico e biofarmacêutico. O processo de secagem por aspersão consiste na aspersão de uma formulação em uma câmara, geralmente cônica, onde há fluxo de ar ou de um gás inerte em temperaturas elevadas o suficiente para promover a secagem das gotículas formadas (Figura 3).

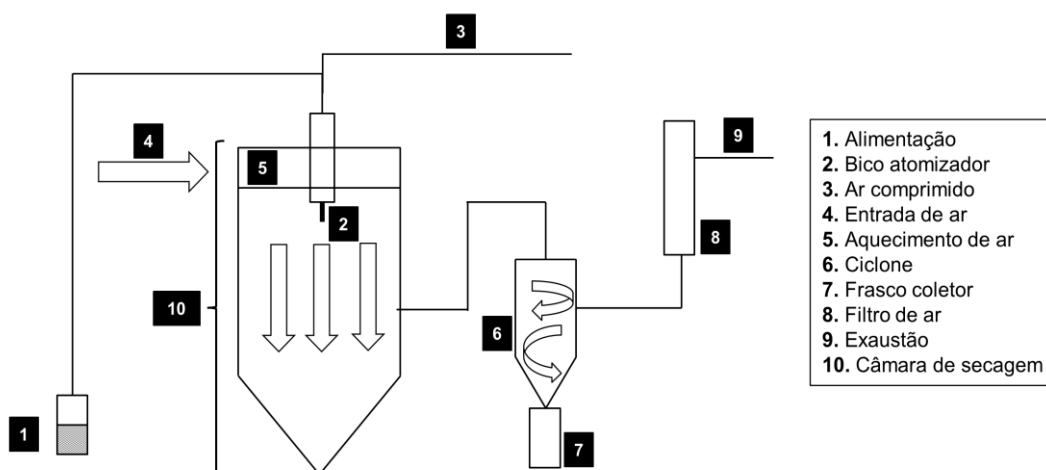


Figura 3. Esquema de um equipamento para secagem por aspersão do tipo *spray dryer*.

Segundo PATEL e colaboradores (2009), o processo de secagem por aspersão envolve cinco etapas principais: 1) a concentração do material a ser aspergido, garantindo a viabilidade da recuperação do produto seco ao término do processo; 2) a atomização, estágio onde as gotículas da formulação são formadas, criando condições ótimas para a evaporação e secagem do produto; 3) O contato da gotícula com o ar ou gás inerte aquecido, que ocorre na câmara de secagem e resulta na evaporação de aproximadamente, em condições bem definidas, 95% da água ou do solvente orgânico

que compõe a formulação; 4) A secagem das gotículas propriamente dita, onde em um primeiro estágio, há umidade suficiente na gotícula para substituir o líquido evaporado na superfície, proporcionando a evaporação do solvente a uma taxa constante e um segundo estágio, caracterizado pela ausência de umidade suficiente para manter as condições de saturação na superfície das gotículas, gerando um revestimento de material seco na superfície. Neste segundo estágio a evaporação do solvente depende da difusão da umidade remanescente através deste revestimento da gotícula; 5) A separação do produto, promovido por ciclones, filtros e precipitadores eletrostáticos, garantindo a separação e recuperação do produto seco do ar ou gás inerte empregado no sistema.

Dentre as vantagens da aplicação da técnica de secagem por aspersão, além da redução do conteúdo de água para conversão de formulações líquidas em produtos sólidos, pode-se destacar sua contribuição para manutenção da estabilidade microbiológica das formulações, a redução de riscos de degradações químicas e/ou biológicas, a redução de custos envolvidos no armazenamento e transporte dos produtos e a obtenção de produtos com propriedades específicas, como melhoria nas características de solubilidade (GHARSALLAOUI et al., 2007).

Dentre os parâmetros críticos capazes de influenciar as características do produto final da secagem por aspersão, podemos destacar as temperaturas de entrada do ar no sistema, a tensão superficial, a viscosidade e o conteúdo de sólidos que compõe a formulação a ser seca, e finalmente a volatilidade dos constituintes da solução, suspensão ou dispersão de alimentação (MICHAEL et al., 1993; MAURY et al., 2005; PATEL et al., 2007).

No âmbito da tecnologia farmacêutica e sistemas de liberação de fármacos, a técnica de secagem por aspersão vem sendo empregada na produção de excipientes a fim de controlar a distribuição de tamanho de partículas, o polimorfismo e conteúdo de umidade presente nestes produtos. Ainda, viabiliza a obtenção de substâncias de interesse biológico com melhores características de compressibilidade (DI MARTINO et al.; 2001). A microencapsulação também é uma abordagem que tem recebido grande interesse, no que diz respeito à aplicação da secagem por aspersão, possibilitando a

obtenção de sistemas capazes de controlar a liberação de fármacos a partir de formulações que combinam moléculas de interesse biológico a uma matriz, geralmente polimérica que promove a sua liberação em sítios específicos, dependendo da organização da estrutura e das características físico-químicas dos componentes da matriz (PALMIERI et al., 2002).

Por serem suspensões coloidais aquosas, as nanocápsulas poliméricas estão sujeitas ao comprometimento da estabilidade dos sistemas por reações de hidrólise do polímero e do óleo, à adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas, presença de tensoativos adsorvidos, à aglomeração das partículas em função do tempo, à liberação prematura da substância ativa, além da propensão da suspensão, pela alta quantidade de água, à proliferação microbiana (SCHAFFAZICK et al., 2003a).

Objetivando contornar estas limitações, neste cenário, existem estudos que propõem a aplicação da secagem por aspersão dessas suspensões a um pó micrométrico contendo nanocápsulas poliméricas, empregando diferentes adjuvantes de secagem (MÜLLER et al., 2000; GUTERRES et al., 2009; BECK et al.; 2012; HOFFMEINSTER et al., 2012; MARCHIORI et al., 2013; RIBEIRO et al., 2016). No entanto, até o presente, não existem estudos que objetivem o melhoramento das características de redispersão dos pós secos contendo nanocápsulas de núcleo lipídico, obtidos a partir da secagem por aspersão. Ainda, análises detalhadas, através da combinação de diversas técnicas analíticas, visando à comprovação da redispersão dos nanocarreadores, quando em contato com a água, garantindo o tamanho nanométrico das partículas redispersas, que assegura as vantagens no emprego destes sistemas como sistemas de liberação de fármacos, frente às propostas convencionais, não estão bem descritas na literatura científica.

Recentemente, uma nova técnica para a secagem por aspersão vem sendo proposta, baseada em uma tecnologia de atomização vibracional e separação de partículas por cargas eletrostáticas (Nano Spray-Dryer[®]). Esta técnica possibilita o emprego de pequenas quantidades de materiais para a obtenção de pós com alto rendimento de processo. No entanto, esta abordagem é voltada principalmente para a obtenção de partículas submicrométricas a partir de soluções ou dispersões diluídas e

não para a conversão de nanocápsulas poliméricas em formas farmacêuticas sólidas (FONTANA et al., 2014; DURLI et al., 2014; BEBER et al., 2014).

3.3 Granulação empregando leito fluidizado

A granulação é um processo amplamente empregado na produção de formas farmacêuticas sólidas intermediárias e/ou finais, que consiste em agregar pequenas partículas formando partículas de massas maiores, preservando a identificação das partículas primárias que compõe o grânulo. Na granulação por via úmida em leito fluidizado, estratégia empregada para aglomerar fármacos e substâncias de interesses biológicos e excipientes, um aglutinante líquido é pulverizado sobre partículas dos pós, enquanto fluidizadas em uma torre de processamento, para a produção de grânulos (MORIN & BRIENS, 2014) (Figura 4).

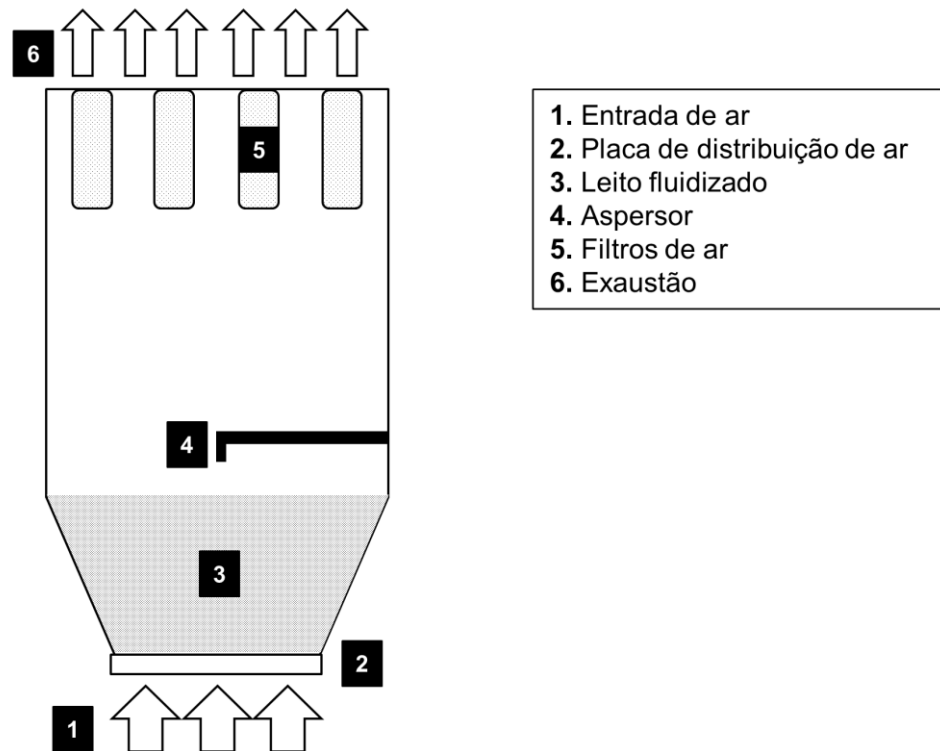


Figura 4. Esquema de um granulador em leito fluidizado.

O granulador em leito fluidizado permite que o processo de mistura dos pós, a granulação e a secagem se dêem em uma única etapa. Esse granulador realiza a pré-mistura dos pós da formulação, incluindo substâncias ativas, diluentes, desintegrantes, em um leito de ar fluidizado, seguida da granulação da mistura por meio da atomização de um aglutinante líquido sobre o leito de pós e a secagem dos grânulos até a obtenção do teor de umidade necessário (AULTON, 2005; ALLEN, 2007). Dentre as vantagens da utilização do sistema de leito fluidizado, podemos destacar a economia de custos, tempo e redução das perdas de transferência, além da possibilidade de automação, em relação à técnica convencional de granulação por via úmida.

Em trabalho recente, nosso grupo de pesquisa propôs o emprego da técnica de granulação por via úmida como alternativa para a obtenção de grânulos contendo nanocápsulas poliméricas (FRIEDRICH et al., 2010a). No referido estudo, uma combinação de suspensão de nanocápsulas com polivinilpirrolidona a 3% foi empregada como sistema aglutinante. No entanto, esses estudos foram realizados por técnica convencional de granulação por via úmida, utilizando-se mistura manual dos componentes e do sistema aglutinante. Além disso, os grânulos foram submetidos à secagem em estufas de ar circulante, durante 48 horas. Apesar de esta técnica convencional ser bastante utilizada pela indústria farmacêutica, sistemas automatizados como sistemas em leito fluidizado têm sido utilizados em substituição às técnicas convencionais.

YAMAMOTO e colaboradores (2007) propuseram a produção de grânulos de manitol contendo insulina associada a nanoesferas de PLGA, empregando um granulador que combina secagem por aspensão ao leito fluidizado (*Spray-drying fluidized bed granulator*). O produto obtido demonstrou propriedades físico-químicas favoráveis para a aplicação pela via inalatória, confirmadas por estudos *in vitro* e *in vivo*.

Além disso, alguns autores propuseram como alternativa para a conversão de sistemas nanoestruturados, mais precisamente nanoesferas fosfolipídicas (KAWASHIMA et al., 1992) e nanoemulsões (LEI et al., 2011), em formas farmacêuticas sólidas, o emprego do leito fluidizado para o revestimento de *pellets*. De acordo com os autores, o processo de revestimento de *pellets* empregando os diferentes sistemas nanoestruturados, possibilitou a obtenção de formas farmacêuticas sólidas que, após a redispersão, recuperaram nanoestruturas com diâmetro próximo ao diâmetro original dos nanocarreadores empregados. No entanto, nestes trabalhos a redispersão foi atestada exclusivamente através da análise de diâmetro médio de partícula por espalhamento de luz dinâmico. Além disso, foram empregadas estratégias como a utilização de água ultrapura aquecida e a incubação dos *pelletes* com água por tempo determinado, para que a redispersão fosse promovida.

BOSE e colaboradores (2012) propuseram a granulação de nanosuspensões de um composto de interesse biológico empregando o granulador de leito fluidizado. Neste estudo, os autores observaram que pela natureza hidrofóbica do composto nanoestruturado (nanosuspensão de um composto pouco solúvel em água), existe uma limitação na quantidade da substância que pode ser incorporada para a formação dos grânulos, pois a sua natureza hidrofóbica pode aumentar a hidrofobicidade dos aglomerados formados, prejudicando assim a sua redispersão em água. No que diz respeito à avaliação da influência do material de suporte empregado para a produção dos grânulos, os autores concluem que o manitol, comparado à lactose, foi capaz de promover uma melhor redispersão das partículas que integram a nanosuspensão.

Apesar das suas características como processo de produção de formas farmacêuticas sólidas intermediárias e ou finais (grânulos) e dos promissores resultados atribuídos à conversão de nanosuspensões, nanoemulsões e nanoesferas fosfolipídicas em formas farmacêuticas sólidas empregando o leito fluidizado já descritas, não foram encontrados relatos na literatura científica do emprego desta estratégia no processo de granulação como método de estabilização física e conversão em forma sólida de nanocápsulas poliméricas. Ainda, não estão disponíveis na literatura atual, estudos que aprofundem a discussão sobre a influência das características de organização supramolecular dos sistemas nanoestruturados no processo de redispersão de formas farmacêuticas sólidas obtidas empregando a granulação em leito fluidizado.

CAPÍTULO I

4.1 Apresentação

O trabalho desenvolvido por MULLER e colaboradores (2000) foi pioneiro na proposição do emprego da técnica de secagem por aspersão para a obtenção de formas farmacêuticas sólidas contendo nanopartículas poliméricas, empregando dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem. Este adjuvante de secagem foi empregado em trabalhos posteriores, tanto para o processo de liofilização (SCHAFFAZICK et al., 2003), quanto para a secagem por aspersão de suspensões de nanoesferas e nanocápsulas poliméricas (SCHAFFAZICK et al., 2006; BECK et al., 2007; GUTERRES et al., 2009).

TEWA-TAGNE e colaboradores (2007), por sua vez, propuseram diferentes adjuvantes de secagem hidrossolúveis para a secagem de nanocápsulas poliméricas, como lactose, maltose, maltodextrina, polivilpirrolidina, hidroximetilcelulose e hidroxipropilcelulose. Entretanto, neste estudo sistemas diluídos de suspensões coloidais foram utilizados para a secagem, compreendendo a relação de 1% (m/v) entre a massa total de nanocápsulas e o volume de formulação a ser seca.

Por sua vez, HOFFMEISTER e colaboradores (2012) e MARCHIORI e colaboradores (2013) também avaliaram o emprego de lactose e/ou maltodextrina, como adjuvantes de secagem, em concentrações de 10% (m/v) na produção de pós para a incorporação em sistemas semissólidos para uso tópico.

Para caracterização destes sistemas pulveréos, estudos publicados na literatura avaliam a redispersão dos pós contendo nanopartículas poliméricas empregando técnicas de difração de laser e espalhamento de luz dinâmica (TOMODA et al., 2008; HOFFMEISTER et al.; 2012; MARCHIORI et al.; 2013; SINSUEBPOL et al., 2013; RIBEIRO et al., 2016; LI et al., 2016). Muitas vezes a redispersão é atestada a partir de altas diluições do pó obtido, que não representam sistemas capazes de reproduzir formas farmacêuticas líquidas contendo o redisperso em volumes próprios para administração dos fármacos encapsulados, na dose e pelas vias pretendidas.

No primeiro capítulo desta tese, buscou-se responder questões a respeito da influência do número de partículas da suspensão de nanocápsulas de núcleo lipídico na redispersão de sistemas pulveréos obtidos através da técnica de secagem por aspersão. Além disso, objetivou-se compreender as características físico-químicas dos pós obtidos através da combinação de diversas técnicas analíticas.

Os resultados deste estudo estão apresentados na forma de um artigo, aceito para publicação no periódico *Pharmaceutical Development and Technology*.

O capítulo 1 é constituído por artigo científico aceito para a publicação, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 45 - 82.

Andrade DF, Vukosavljevic B, Benvenuti EV, Pohlmann AR, Guterres, SS, Windbergs M, Beck RCR. Redispersible spray-dried lipid-core nanocapsules intended for oral delivery: the influence of the particle number on redispersibility. Pharm. Dev. Technol. 2018. doi: 10.1080/10837450.2017.1400559

5. CAPÍTULO II

5.1 Apresentação

Muitas vantagens biológicas atribuídas às nanocápsulas poliméricas estão relacionadas às características específicas desses sistemas, como o tamanho de partícula, área superficial e a natureza dos componentes de sua superfície (SIQUEIRA et al., 2011; FRANK et al., 2015; CÉ et al., 2016). É necessário, portanto, que após a secagem e redispersão de sistemas nanoestruturados, suas características, bem como sua habilidade de atuar no controle da liberação de fármacos sejam preservadas.

Por esta razão, no capítulo dois desta tese, buscamos compreender o impacto dos processos de secagem por aspensão e redispersão das nanocápsulas de núcleo lipídico no controle da liberação *in vitro* de uma substância bioativa modelo, a curcumina, bem como sua influência na atividade biológica deste composto.

Estudos recentes publicados na literatura científica enumeram uma série de vantagens da associação da curcumina a nanocápsulas de núcleo lipídico na prevenção de doenças neurodegenerativas e associadas a processos oxidativos, através da avaliação frente a modelos biológicos bem consolidados (ZANOTTO-FILHO et al., 2013; JAQUES et al., 2013; HOPPE et al., 2013). Considerando suas potencialidades terapêuticas, bem como as recentes descobertas a respeito da propriedade das nanocápsulas de núcleo lipídico atuarem como facilitadores para o transporte de fármacos através da barreira hematoencefálica (RODRIGUES et al., 2016), a curcumina foi selecionada como molécula modelo para estudos envolvendo a produção de formas farmacêuticas sólidas facilmente redispersíveis para a administração pela via oral, atendendo às perspectivas do trabalho descrito no capítulo I desta tese.

No presente capítulo deste exemplar estudamos a produção e caracterização de formas farmacêuticas sólidas intermediárias e/ou finais contendo curcumina associada a nanocápsulas de núcleo lipídico, facilmente redispersíveis em água, e avaliamos a influência da presença da curcumina nas características físico-químicas da formulação proposta no capítulo anterior. Ainda, buscamos compreender o impacto dos processos de secagem e redispersão das nanocápsulas de núcleo lipídico no controle da liberação

in vitro do fármaco e na atividade neuroprotetora da curcumina, frente a um modelo biológico bem estabelecido (culturas primárias de hipocampo cerebral de ratos).

Os resultados apresentados estão organizados na forma de um artigo científico, em fase de redação.

O texto completo do capítulo 2, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo das páginas compreendido entre as páginas 87 - 118, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição, caracterização físico-química e avaliação biológica de uma formulação seca de curcumina associada a nanocápsulas de núcleo lipídico (1 mg.mL⁻¹), facilmente redispersível, obtida através da técnica de secagem por aspersão, objetivando a administração pela via oral. Após os processos de secagem e redispersão dos pós obtidos neste estudo, a formulação proposta foi capaz de controlar a liberação *in vitro* da curcumina e demonstrou atividade neuroprotetora frente a um modelo de resposta inflamatória induzida por LPS em cultura organotípica de hipocampo cerebral de ratos.

6. CAPÍTULO III

6.1 Apresentação

No âmbito da produção de formas farmacêuticas sólidas, a granulação é um processo bastante empregado na indústria farmacêutica para a preparação de grânulos. Inicialmente, os grânulos eram preparados a fim de melhorar o fluxo e as características relacionadas à compressão de pós, tanto para fármacos no estado sólido quanto adjuvantes farmacêuticos. Atualmente produz-se grânulos tanto como um produto intermediário empregado na produção de comprimidos, quanto como produto final para a administração direta pelo paciente, pela via oral (PARIKH et al., 1997; AGRAWAL et al., 2011).

Diversas outras vantagens podem ser atribuídas aos grânulos, em relação a pós e misturas de pós. Dentre elas, destacam-se a possibilidade do melhoramento da uniformidade da dose, o aumento da densidade bruta do produto, o controle da liberação de fármacos, a redução na geração de névoas e consequente redução da exposição dos trabalhadores no processo de produção de sólidos na indústria farmacêutica e a obtenção de produtos finais com melhor aparência (AGRAWAL et al., 2011).

Considerando estes fatores, somados à necessidade da avaliação de estratégias capazes de aumentar a estabilidade físico-química e microbiológicas de sistemas nanestruturados, em um trabalho recente, nosso grupo de pesquisa propôs o emprego da técnica de granulação por via úmida, como alternativa para a obtenção de grânulos contendo nanocápsulas poliméricas (FRIEDRICH et al., 2010). No entanto, esse estudo foi realizado por técnica convencional de granulação por via úmida, utilizando-se mistura manual dos componentes e do sistema aglutinante, demandando custos, tempos e perdas de rendimento em decorrência de particularidades do processo. Apesar de esta técnica convencional ser bastante utilizada pela indústria farmacêutica, sistemas automatizados, como sistemas de leito fluidizado, têm sido utilizados em substituição às técnicas convencionais.

O capítulo III deste exemplar propõe, de maneira inédita, a produção de grânulos contendo nanocápsulas de núcleo lipídico, como sistema aglutinante e

possível carreador de fármacos, empregando o granulador de leito fluidizado em substituição à técnica convencional de granulação. Ainda, foram empregadas nanocápsulas de núcleo lipídico com diferentes características de superfície a fim de obter respostas a respeito do impacto das características supramoleculares dos nanocarreadores nos processos de granulação e de redispersão aquosa dos produtos obtidos.

Os resultados apresentados serão organizados na forma de um artigo científico, em fase de redação.

O texto completo do capítulo 3, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo das páginas compreendido entre as páginas 123 - 148, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição e caracterização físico-química de formulações de grânulos facilmente redispersíveis, obtidos através do processo de granulação em leito fluidizado. Foram empregados maltodextrina como material de carga e suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico, sem e com revestimento catiônico, e conseqüentemente diferentes características de superfície, como líquidos aglutinantes. O rendimento dos processos foi próximo a 90%; o teor de umidade dos grânulos obtidos foi inferior a 4% e as formulações apresentaram boas características de fluxo. O revestimento catiônico das nanocápsulas poliméricas auxiliou a redispersão dos grânulos em água.

7. DISCUSSÃO GERAL

O interesse na obtenção de formas farmacêuticas sólidas contendo sistemas nanoestruturados é uma realidade no âmbito da pesquisa relacionada à tecnologia farmacêutica e desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, principalmente nas duas últimas décadas (SCHAFFAZICK et al., 2003a; KHAIATA et al.; 2012; BECK et al.; 2012; HOFFMEISTER et al., 2012; MARCHIORI et al.; 2013). A secagem por aspersão (TEWA-TAGNE et al., 2007; HOFFMEISTER et al.; 2012; MARCHIORI et al.; 2013), liofilização (ABDEWAHED et al., 2006), granulação por via úmida (FRIEDRICH et al., 2010) e granulação empregando leite fluidizado (BOSE et al., 2012; BHAKAY et al., 2013) são exemplos de processos que vem sendo estudados como alternativas para a conversão de sistemas nanoestruturados, como nanoesferas e nanocápsulas em formas farmacêuticas sólidas intermediárias e/ou finais de nanomedicamentos. Considerando a secagem por aspersão, é importante que a escolha dos adjuvantes de secagem atenda necessidades específicas para a obtenção de um produto seco com características compatíveis com o fim a que se destina o produto farmacêutico.

No âmbito do desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas contendo nanocápsulas de núcleo lipídico, é imprescindível considerar o fato de que muitas vantagens biológicas destes sistemas estão relacionados às características físico-químicas e de superfície das nanopartículas (tamanho de partícula e área superficial). Logo, é muito importante que pós contendo nanopartículas sejam facilmente redispersíveis em ambiente aquoso, liberando estas partículas no meio e protegendo a sua integridade após a redispersão.

Até o momento não existem protocolos bem estabelecidos que orientem quais técnicas devem ser empregadas para a avaliação da redispersão de um sistema nanoestruturado a partir de pós obtidos por secagem por aspersão. A maioria dos estudos relatados na literatura científica avalia a redispersão a partir de pequenas quantidades de pó dispersos em grandes volumes de água, empregando técnicas como a difratometria de laser ou espalhamento de luz dinâmica. É bastante comum também encontrar protocolos que empregam alta temperatura, o uso de tensoativos ou banho de ultrassom para favorecer a redispersão de nanopartículas, o que não reflete condições usuais para a realização destes procedimentos, considerando a aplicação destes

sistemas como formas farmacêuticas (TOMODA et al., 2008; TOMODA et al.; 2009; KAYE et al., 2009; SCHAFFROTH et al., 2012; SINSUEBPOL et al., 2013).

No capítulo I desta tese foi relatada a proposição de uma estratégia para a produção de pós facilmente redispersíveis contendo nanocápsulas de núcleo lipídico, como uma promissora forma farmacêutica para a administração pela via oral. O estudo foi delineado para investigar e avaliar a influência do número de partículas da suspensão original, empregada no processo de secagem, nas propriedades de redispersão do produto seco.

Segundo TEWA-TAGNE e colaboradores (2007), a solubilização dos adjuvantes de secagem, constituindo uma solução aquosa destes componentes, prévia à mistura com a suspensão de nanocápsulas, é fundamental para a obtenção de produtos secos contendo nanopartículas poliméricas. De acordo com os autores, esta é uma etapa importante do processo, capaz de evitar interações sólido/sólido entre os carreadores nanoestruturados e a superfície dos adjuvantes, que pode ocorrer no caso da dissolução direta dos adjuvantes na suspensão de nanocápsulas. Além disso, este procedimento favorece a homogeneidade do redisperso.

No presente trabalho avaliamos formulações onde esta pré-diluição dos adjuvantes foi realizada em diferentes proporções (F50:50, F75:25) e comparamos com uma formulação onde a solubilização dos adjuvantes foi realizada na própria suspensão de nanocápsulas de núcleo lipídico (F100). Considerando o mesmo volume de formulação a ser empregada no processo de secagem por aspersão, as três formulações diferiram entre si em função do número de partículas das nanocápsulas de núcleo lipídico na formulação inicial utilizada para a obtenção dos pós. Foram empregados como adjuvantes de secagem, para um volume final de 50 mL de formulação a ser seca, 2,25 g de maltodextrina e 0,25 g de L-leucina.

Somente uma das formulações avaliadas, representada como F50:50 (25 mL de solução aquosa dos adjuvantes para 25 mL de suspensão de nanocápsulas), resultou na recuperação de população de partículas na escala nanométrica a partir da sua redispersão em água, empregando a técnica de difratometria a laser.

A L-leucina, empregada neste estudo pelas suas propriedades lubrificantes e tensoativas, teve papel fundamental na recuperação das partículas na escala

nanométrica. Segundo GLINISKI e colaboradores (2000), a L-leucina quando em solução aquosa é capaz de reduzir rapidamente a tensão superficial, o que pode corroborar nossa hipótese. Após produzir uma formulação nas mesmas condições da formulação F50:50, omitindo a presença da L-leucina, não foi possível observar a recuperação de partículas na escala nanométrica empregando a técnica de difratometria de laser.

No entanto, as demais formulações avaliadas, apesar de conterem L-leucina em sua composição, não foram capazes de promover a redispersão das nanopartículas quando em meio aquoso. Por esta razão, buscamos o entendimento da influência do número de partículas na eficiência da redispersão das nanocápsulas de núcleo lipídico a partir dos pós produzidos neste estudo, empregando técnicas como a análise da área superficial e a microscopia confocal Raman.

Pela análise de área superficial das formulações propostas neste estudo, observamos uma relação inversa entre o número de partículas da suspensão de nanocápsulas empregado no processo de secagem e a área superficial dos pós obtidos. Desta forma, a formulação F50:50 demonstrou menor redução da área superficial em comparação com uma formulação preparada com os adjuvantes de secagem sob as mesmas condições, porém sem nanocápsulas em sua composição. Este resultado sugere a importância da não saturação da área superficial das partículas dos adjuvantes de secagem, com as nanocápsulas poliméricas, no perfil de redispersão dos pós obtidos pela técnica de secagem por aspersão.

A espectroscopia confocal Raman mostra-se uma promissora ferramenta, bastante útil na análise de processos tecnológicos envolvidos na produção de formas farmacêuticas sólidas, como cápsulas e comprimidos, como instrumento para a monitorização dos produtos intermediários após cada operação unitária (BEER e al., 2011; PAUDEL et al., 2015). No estudo da influência do número de partículas de nanocápsulas de núcleo lipídico nas características de redispersão de pós, esta técnica forneceu informações relevantes que auxiliam na compreensão do processo. A partir das análises podemos observar que aquelas formulações que não redispersaram facilmente em água (F75:25 e F100) possuíam sua superfície recobertas por nanopartículas de núcleo lipídico, não sendo possível a observação dos adjuvantes

hidrofílicos nesta superfície. No entanto, na formulação F50:50 LNC, tanto as nanocápsulas quanto a maltodextrina e a L-leucina puderam ser observadas em diferentes localizações da superfície dos aglomerados que compõe o produto seco. Esta informação facilita o entendimento das diferenças na redispersão das nanocápsulas de núcleo lipídico em água a partir dos diferentes pós obtidos e corroboram os resultados obtidos para a área superficial dos diferentes pós. A co-localização dos adjuvantes hidrofílicos na superfície dos aglomerados permite a melhor difusão da água através do pó, facilitando a ressuspensão das nanocápsulas para que se obtenha novamente uma população de partículas na escala nanométrica.

Finalmente, objetivando avaliar a extensão da redispersão alcançada a partir da reconstituição da formulação F50:50 em água, comparamos o número de partículas do redisperso com o número inicial de partículas das suspensões de nanocápsulas. Aproximadamente 75% do número estimado de partículas por unidade de volume de nanocápsulas de núcleo lipídico foram recuperados no redisperso, em comparação com a suspensão original, reforçando a característica da formulação proposta como facilmente redispersível em água.

No entanto, quando um fármaco ou um ativo é associado à estrutura das nanocápsulas de núcleo lipídico, é fundamental que os efeitos da secagem por aspersão e posterior redispersão em água da formulação proposta sejam avaliados. No capítulo II desta tese, foi empregada a curcumina, como substância ativa modelo, associada às nanocápsulas de núcleo lipídico, para realizar a avaliação destes efeitos.

A curcumina é um polifenol natural, derivado do rizoma da *Curcuma longa*, amplamente comercializada como aromatizante, preservante ou agente de cor em alimentos disponíveis em diversos países (GUPTA et al., 2013). Diversas pesquisas, ao longo dos últimos anos, atribuem uma série de efeitos benéficos a este polifenol e vem sendo conduzidas a fim de compreender sua ação farmacológica, muitas vezes associada às suas propriedades antioxidante e anti-inflamatória, para viabilizar o emprego desta molécula como um fármaco com potencial aplicação na prevenção e tratamento de diversas enfermidades, como doenças associadas a processos oxidativos e neurodegenerativos (SHISHODIA et al., 2005; BELKACEMI et al., 2011).

Trabalhos prévios publicados pelo nosso grupo de pesquisa sugerem a superioridade do desempenho da curcumina nanoencapsulada em relação ao polifenol em solução, no tratamento de manifestações relacionadas a processos neuroinflamatórios, a partir de observações em modelos *in vitro* e *in vivo*. JAQUES e colaboradores (2013) demonstraram a habilidade da formulação de curcumina nanoencapsulada em prevenir déficit cognitivo em ratos, quando animais expostos a fumaça de cigarro, tratados diariamente durante um período de 30 dias, através de administração por via oral de 4 mg/kg da suspensão de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo curcumina. HOPPE e colaboradores (2013), por sua vez, demonstraram a superioridade da formulação contendo curcumina nanoencapsulada através da avaliação de modelo *in vivo* de neuroinflamação induzida pelo peptídeo beta-amiloide, através do tratamento de ratos pela via intraperitoneal durante 10 dias consecutivos. Os autores sugerem a superioridade dos efeitos observados ao aumento da biodisponibilidade da curcumina em nível de sistema nervoso central, quando associada a sistemas nanoestruturados.

No entanto, apesar das potencialidades da formulação de curcumina associada às nanocápsulas de núcleo lipídico, a aplicação industrial da formulação em forma de suspensão é ainda restrita, devido às dificuldades associadas à manutenção da estabilidade físico-química e microbiológica destes sistemas. Neste contexto, estratégias tecnológicas usualmente empregadas para a obtenção de formas farmacêuticas sólidas, como a secagem por aspersão, vêm ao encontro das perspectivas da indústria farmacêutica para viabilizar a futura produção e comercialização destes sistemas nanoestruturados.

Os objetivos do capítulo II desta tese compreenderam a obtenção de uma forma farmacêutica sólida facilmente redispersível em água a partir de uma formulação contendo curcumina associada à nanocápsulas de núcleo lipídico (1 mg/mL) para a administração por via oral, a avaliação do impacto das etapas de secagem e redispersão em água do pó obtido nas características físico-químicas das nanocápsulas e a avaliação de sua influência na atividade biológica do polifenol empregando um modelo de neuroinflamação *in vitro*.

Em estudo recente, foi descrita, de maneira inovadora, a capacidade da formulação de nanocápsulas lipídicas de atuar como facilitador no transporte de fármacos através da barreira hematoencefálica. Estudos *in vivo* evidenciaram a habilidade das nanocápsulas de transpor esta barreira, atingindo assim o sistema nervoso central, tanto após administração intravenosa quanto oral da formulação em camundongos (RODRIGUES et al., 2016). Além disso, quando associada indometacina ou éster etílico de indometacina nestas formulações, foram observados resultados mais eficientes no tratamento de glioblastoma após administração intravenosa ou oral, comparando-se a solução de indometacina.

O conjunto destas evidências científicas nos encorajou a propôr o desenvolvimento de uma formulação de pó facilmente redispersível contendo nanocápsulas de núcleo lipídico para administração oral empregando a curcumina como molécula modelo. Com este objetivo, produzimos formulações obtidas pela técnica de secagem por aspersão e com composição semelhante à formulação F50:50, descrita no capítulo I deste trabalho, substituindo a formulação de nanocápsulas sem fármaco, por nanocápsulas contendo curcumina (1 mg/mL).

As suspensões de nanocápsulas foram previamente caracterizadas de acordo com suas características físico-químicas e os resultados estão em conformidade com estudos prévios (ZANOTTO-FILHO et al., 2013; HOPPE et al., 2013; JQUES et al., 2013). O processo de secagem deu origem a um pó amarelo brilhante, característica inerente à presença da curcumina, fino e homogêneo. Esta é a primeira vez que o procedimento de secagem por aspersão é empregado para a produção de pós contendo curcumina associada à nanocápsulas de núcleo lipídico.

O rendimento do processo foi em torno de 67%, considerado adequado para a técnica em questão e de acordo com os achados de pesquisadores que investigaram a secagem de sistemas contendo nanopartículas por secagem por aspersão (MARCHIORI et al., 2012; HOFFMEINSTER et al., 2012). Apesar da nossa preocupação em relação a possíveis perdas no teor da curcumina no produto final, decorrente de sua instabilidade frente ao calor (ESATBEYOGLU et al., 2015), obtivemos teor próximo a 100% do valor teórico calculado. Este resultado está de acordo com o resultado descrito por LIU e colaboradores (2016), que também

encontrou valores próximos a 100%, empregando temperatura de 150 °C na secagem de micropartículas contendo curcumina, sugerindo que a técnica de secagem por aspersão é uma abordagem viável à secagem de polifenóis sensíveis ao calor.

Análises morfológicas realizadas empregando microscopia eletrônica de varredura revelaram partículas esféricas, com superfície lisa, em concordância com os resultados observados no trabalho descrito no capítulo I deste exemplar. Na sequência, avaliamos a redispersão dos pós obtidos a partir da redispersão de quantidade suficiente de pó em volume pré estabelecido de água ultrapura, suficiente para recuperamos a concentração inicial de curcumina presente na suspensão de nanocápsulas (1 mg/mL). Os perfis de distribuição de tamanho de partícula observados através da técnica de difratometria de laser, entre a suspensão de nanocápsulas de curcumina e o redisperso, foram sobreponíveis, demonstrando a capacidade de redispersão dos sistemas carreadores novamente na escala nanométrica, quando redispersos em água.

Os estudos de liberação *in vitro* das formulações, conduzidos sobre as mesmas condições analíticas para as formulações de curcumina livre, suspensão de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo curcumina e a formulação do redisperso de nanocápsulas, demonstrou similaridade entre os perfis de liberação das duas últimas formulações, evidenciando o controle da liberação da curcumina nanoencapsulada em relação a sua forma livre, tanto para a suspensão original de nanocápsulas quanto para o redisperso. Conforme discutido previamente neste estudo e em trabalhos publicados na literatura científica, o controle da liberação é fundamental para a observação das vantagens do emprego de sistemas carreadores nanoestruturados (FONTANA et al., 2011; ZANOTTO-FILHO et al; 2013). No presente estudo, demonstramos que o processo de secagem das suspensões de nanocápsulas não afeta o controle da liberação *in vitro* da curcumina.

Além disso, é importante destacar que as formulações contendo curcumina nanoencapsulada, suspensão e redisperso, apresentam perfil de liberação *in vitro* compatível com um modelo de ordem zero. Um dos maiores objetivos na produção de sistemas de liberação controlada é a manutenção das concentrações plasmáticas do fármaco dentro da janela terapêutica durante um período estendido (ZHAO et al.,

2016). Desta forma, sistemas que promovem liberação controlada e constante do fármaco, como os sistemas que seguem a cinética de liberação de ordem zero, são extremamente desejáveis.

Para avaliar o impacto do processo de secagem e redispersão na atividade biológica da curcumina, empregamos o modelo de neuroinflamação induzida por LPS em culturas organotípicas de hipocampo cerebral. Este modelo apresenta vantagens em relação à avaliação frente à cultura de células isoladas, visto que as interações celulares são preservadas, possibilitando o estudo de respostas tanto de células neuronais quanto de células da glia (FROTSCHER et al., 1995; FROZZA et al., 2013).

A resposta inflamatória inclui a ativação da microglia e dos astrócios, resultando na liberação de mediadores como citocinas, neurotransmissores e espécies reativas de oxigênio (TUPPO et al., 2005). A partir da avaliação de biomarcadores como o TNF- α e a interleucina 1- β , comparando formulações de curcumina nanoencapsulada (suspensão e redisperso) e em sua forma livre, observamos que somente os pré-tratamentos com a formulação contendo a curcumina associada às nanocápsulas de núcleo lipídico foram capazes de atenuar os níveis de TNF- α liberados em relação aos grupos controle que não receberam tratamento, 48 horas após o estímulo inflamatório.

Pode-se sugerir que este melhor efeito observado para as nanocápsulas de núcleo lipídico contendo curcumina pode estar associado ao controle da liberação do polifenol a partir do sistema carreador, resultando em maior biodisponibilidade deste para as células (HOPPE et al., 2013). Assim, as nanocápsulas permitiram a entrega da curcumina de maneira controlada às células, resultando na persistência do seu efeito anti-inflamatório após 48 horas após o estímulo induzido por LPS.

Em relação aos níveis de IL 1- β , apesar de haver aumento na liberação do biomarcador quando há o estímulo inflamatório provocado pelo LPS, não houve diferença estatística entre níveis mensurados, considerando os diferentes pré-tratamentos (curcumina livre, suspensão de nanocápsulas ou redisperso). Como os níveis de IL-1 β liberados no meio de cultura foram muito inferiores em relação aos níveis de TNF- α , suas determinações foram realizadas bastante próximas ao limite de quantificação do método empregado (Ensaio Imunoenzimático). Possivelmente a

menor precisão dos dados próximos ao menor nível de concentração da curva analítica contribuiu para a maior dispersão dos dados obtidos e consequente não observação de diferenças estatísticas entre os diferentes pré-tratamentos.

Desta forma, os resultados obtidos demonstram que não há alterações nas características físico-químicas do sistema nanoestruturado após as etapas de secagem e redispersão em água, nem redução na atividade biológica do ativo decorrente dos processos empregados na obtenção da forma farmacêutica sólida.

O conjunto de resultados apresentados no capítulo II deste trabalho torna a formulação seca de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo curcumina candidata à produção de um sistema facilmente redispersível em água, visando à administração oral, uma vez que trabalhos anteriores demonstram a capacidade de observar efeitos em nível de sistema nervoso central quando esta formulação é administrada pela via proposta. Ainda, o estudo reforça o potencial da formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo curcumina de ser administrada não somente no tratamento, mas também na prevenção de quadros neurodegenerativos associados a processos inflamatórios. Na avaliação realizada, foi possível demonstrar a habilidade da curcumina nanoencapsulada em prevenir danos associados à indução de um quadro inflamatório em modelo de neuroinflamação induzida por LPS em cultura primária de hipocampo cerebral de ratos.

Além da secagem por aspersão (TEWA-TAGNE et al., 2007; HOFFMEINSTER et al.; 2012; MARCHIORI et al.; 2013), técnicas como a liofilização (ABDEWAHED et al., 2006), impressão 3D (BECK et al., 2017), granulação por via úmida (FRIEDRICH et al., 2010) e granulação empregando leito fluidizado (BOSE et al., 2012; BHAKAY et al., 2013) são exemplos de processos que vem sendo estudados como alternativas para a conversão de sistemas nanoestruturados aquosos em formas farmacêuticas secas. O emprego da secagem por aspersão foi previamente discutido nessa seção. A liofilização também é descrita como um bom método para a conversão de nanoesferas e nanocápsulas em formas sólidas, desde que os adjuvantes de secagem sejam selecionados adequadamente (ABDEWAHED et al., 2006). No entanto, sabe-se que este é um processo relativamente caro, que envolve um grande consumo de energia e tempo, tornando sua aplicação limitada no âmbito da

indústria farmacêutica. Ainda, os pós obtidos por liofilização, de maneira geral, apresentam fluxo deficiente, condicionando seu emprego para a produção de formas farmacêuticas sólidas para administração oral.

Há alguns anos, FRIEDRICH e colaboradores (2010) demonstraram a viabilidade da granulação por via úmida para a obtenção de formas farmacêuticas sólidas contendo nanocápsulas poliméricas. Contudo, a granulação por via úmida, quando realizada pelo método clássico, apresenta uma série de desvantagens, relacionadas principalmente a necessidade do emprego de mais de uma etapa, em diferentes equipamentos, para a obtenção do produto final (HANSULD et al., 2014). Neste contexto, a granulação empregando o granulador de leito fluidizado, desponta como uma alternativa moderna a ser considerada para a obtenção de grânulos pela via úmida. Este equipamento permite que as etapas de granulação sejam realizadas em um módulo único, permitindo a completa automatização do processo e otimização de seus parâmetros.

No capítulo III desta tese, propusemos a obtenção de grânulos contendo nanocápsulas de núcleo lipídico a partir do granulador em leito fluidizado; além disso, considerando a importância da manutenção das características estruturais dos nanocarreadores após o processo de redispersão em água, avaliamos a influência do revestimento catiônico das nanocápsulas de núcleo lipídico, tanto nas propriedades físico-químicas relacionadas à redispersão quanto às propriedades de fluxo dos grânulos obtidos.

Para a produção dos grânulos foram empregadas nanocápsulas de núcleo lipídico sem e com revestimento catiônico (LNC e CS-LNC), como líquido aglutinante. Como substrato, foi empregada a maltodextrina, considerando as suas características físico-químicas, principalmente sua alta solubilidade em água e compatibilidade com as nanocápsulas poliméricas (HOFFMEINSTER et al., 2012; PALZER et al., 2013). Os grânulos foram obtidos com rendimentos entre 80% e 90%, para todas as formulações avaliadas, excluindo possíveis influências do revestimento catiônico neste parâmetro do processo. Todas as formulações apresentaram teor de umidade inferior a 4%. A partir desta observação podemos sugerir que o processo de granulação empregando o granulador em leito fluidizado foi mais eficiente em relação

à granulação por via úmida pelo método clássico, uma vez que FRIEDRICH e colaboradores (2010) observaram teor de umidade entre 7% a 9% para os produtos obtidos.

Todas as formulações obtidas empregando o granulador de leito fluidizado apresentaram diâmetros médios superiores ao diâmetro médio da maltodextrina matéria-prima, através da análise de difratometria de laser. Esta observação evidencia a eficiência do processo, uma vez que um dos objetivos da granulação consiste no aumento do tamanho das partículas do produto através da aglomeração de partículas primárias (SHANMUGAM et al., 2015). As morfologias dos grânulos contendo ou não nanopartículas poliméricas também puderam ser avaliadas através de análises de microscopia eletrônica de varredura. Foi observado que, para todas as formulações, as estruturas eram formadas por aglomerados de partículas primárias de maltodextrina, com formato irregular. Além disso, os grânulos obtidos empregando as suspensões de nanocápsulas poliméricas como líquidos aglutinantes (LNC ou CS-LNC) apresentaram superfície mais irregular, em relação àqueles produzidos somente com água ultrapura. A sua estrutura mais irregular era acompanhada da presença de estruturas nanométricas na sua superfície.

Ainda, a partir das análises de microscopia eletrônica de varredura, empregando-se a técnica de solubilização *in situ* da maltodextrina, os grânulos contendo nanocápsulas de núcleo lipídico liberaram estruturas com contornos bem definidos e características morfológicas compatíveis com os nanocarreadores. Assim como observado em estudo prévio, empregando a granulação por via úmida pelo método clássico, a granulação em leito fluidizado não prejudica a recuperação das nanocápsulas poliméricas após a redispersão em água (FRIEDRICH et al., 2010).

No presente estudo, o revestimento catiônico das nanocápsulas de núcleo lipídico foi capaz de promover melhores características de fluxo e de redispersão em água para os grânulos obtidos empregando o granulador em leito fluidizado. Os menores valores de índice de Carr, fator de Hausner e índice de coesão, observados para os grânulos contendo as nanocápsulas revestidas, pode estar associado à presença da quitosana na superfície dos carreadores, que atuaria reduzindo as forças de atrito entre as partículas, ainda considerando a forma irregular dos aglomerados.

O revestimento das nanocápsulas de núcleo lipídico também se mostrou interessante para promover a redispersão aquosa das nanocápsulas de núcleo lipídico a partir dos grânulos. Esta observação pode estar associada às forças de repulsão que são promovidas pela presença da quitosana na superfície das nanocápsulas poliméricas, atuando de forma mais efetiva na estabilização do sistema do que a estabilização estérica conferida somente pela presença do polissorbato 80 nas nanocápsulas de núcleo lipídico não revestidas (LNC), evitando a aglomeração das partículas após sua redispersão em água (ZHANG et al., 2014).

Em suma, a L-leucina apresentou papel fundamental na facilitação da redispersão em água de nanocápsulas de núcleo lipídico, obtidas através da secagem por aspersão, por atuar como um agente tensoativo e contribuir para o processo, conforme apresentado no Capítulo I. De forma semelhante, o revestimento catiônico, empregando a quitosana, mostra-se também como uma estratégia de grande valia para a promoção de uma rápida redispersão de nanocápsulas de núcleo lipídico de produtos secos obtidos empregando a partir do granulador em leito fluidizado, pelas propriedades de superfície que são conferidas à estrutura dos nanocarreadores. Além disso, os processos de secagem por aspersão e granulação em leito fluidizado, empregados neste trabalho para a produção de formas farmacêuticas sólidas intermediárias e/ou finais contendo nanocápsulas de núcleo lipídico mostraram-se alternativas viáveis para a produção de pós e grânulos com boas propriedades de redispersão em água, destinados à administração oral de fármacos nanoencapsulados.

Contudo, como perspectivas deste trabalho, novos estudos devem ser delineados, a fim de avaliar a biodisponibilidade oral de fármacos associados às formas farmacêuticas sólidas desenvolvidas.

8. CONCLUSÕES

- Foi proposta uma formulação sólida, obtida por secagem por aspersão, facilmente redispersível em água, contendo nanocápsulas de núcleo lipídico empregando maltodextrina e L-leucina como adjuvantes de secagem, destacando a contribuição da presença da L-leucina no processo de redispersão da formulação;
- A combinação de diferentes técnicas analíticas (difratometria de laser, microscopia eletrônica de varredura, microscopia confocal Raman, determinação da área superficial e porosidade, análise do número de partículas) evidenciou a influência do número inicial de nanopartículas que integram a suspensão de nanocápsulas na capacidade de redispersão de pós obtidos através da técnica de secagem por aspersão;
- A formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo curcumina foi incorporada à formulação sólida obtida por secagem por aspersão, mantendo a sua propriedade de fácil redispersão aquosa, e demonstrando a viabilidade do processo para a obtenção de um produto contendo o polifenol associado a nanocarreadores para administração oral;
- Os processos de secagem por aspersão e redispersão em água não influenciaram a atividade biológica *in vitro* da curcumina nanoencapsulada, mantendo o seu potencial em atuar como neuroprotetor frente ao dano neuroinflamatório induzido por LPS em modelo de cultura primária de hipocampo cerebral;
- Foram produzidos, de forma inédita, grânulos contendo nanocápsulas de núcleo lipídico empregando o método de granulação em leito fluidizado, com alto rendimento, baixo teor de umidade e boas propriedades de fluxo;
- O revestimento catiônico de nanocápsulas de núcleo lipídico, com quitosana, promoveu melhores características de fluxo dos grânulos e de redispersão em água das nanocápsulas poliméricas a partir de grânulos produzidos por granulação em leito fluidizado.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEWAHED, W.; DEGOBERT, D.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 38, p. 1688 - 1713, 2006.

AGRAWAL, R.; NAVEEN, Y. Pharmaceutical Processing - A review on wet granulation technology. *International Journal of Pharmaceutical Frontier Research*, v. 1(1), p. 65-83, 2011.

ALIASGHARLOU, L.; GHANBARZADEH, S.; AZIMI, H.; ZARRINTAN, M. H.; HAMISHEHKAR, H. Nanostructured Lipid Carrier for Topical Application of N-Acetyl Glucosamine. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 6, 581-587, 2016.

ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*, Artmed: Porto Alegre, Brasil, 2005.

ALMEIDA, J. S.; LIMA, F.; DA ROS, S.; BULHÕES, L. O. S.; CARVALHO, L. C.; BECK, R. C. R. Nanostructured systems containing rutin: in vitro antioxidant activity and photostability studies. *Nanoscale Research Letters*, v. 5, p. 1603–1610, 2010.

ALONSO, M. J. Nanomedicines for overcoming biological barriers. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 58, p. 168–172, 2004.

ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A.B.; NEWMAN, R.A.; AGGARWAL, B.B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular Pharmaceutics*, v.4, p. 807–818, 2007.

AULTON, M. E. *Delineamento de Formas Farmacêuticas*, Artmed: Porto Alegre, Brasil, 2005.

BAMRUNGSAP, S.; ZHAO, Z.; CHEN, T.; WANG, L.; LI, C.; FU, T.; TAN, W. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine*, v. 7(8), p. 1253–1271, 2012.

BANIK, B. L.; FATTAHI, P.; BROWN, J. L. Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 8, 271-299, 2016.

BEBER, T. C.; ANDRADE, D. F.; KANN, B., FONTANA, M. C., CORADINI, K., WINDBERGS, M., BECK, R. C. R. Submicron polymeric particles prepared by vibrational spray-drying: semisolid formulation and skin penetration/permeation studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 88(3), p. 602-613, 2014.

BECK, R. C. R., OURIQUE, A. F.; GUTERRES, S. S., POHLMANN, A. R. Spray-Dried Polymeric Nanoparticles for Pharmaceutics: A Review of Patents. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, v. 6, p. 195–208, 2012.

BECK, R. C. R.; CHAVES, P. S.; GOYANEZ, A.; VUKOSAVLJEVIC, B.; BUANZ, A.; WINDBERGS, M.; BASIT, A. W.; GAISFORD, S. 3D printed tablets loaded with polymeric nanocapsules: an innovative approach to produce customized drug delivery systems, In Press, 2017.

BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; BENVENUTTI, E. V.; COSTA, T. D.; GUTERRES, S. S. Nanostructure-coated diclofenac-loaded microparticles: preparation, morphological, characterization, in vitro release and in vivo gastrointestinal tolerance. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 16, n. 6a, p. 1233-1240, 2005.

BELKACEMI, A.; DOGGUI, S.; DAO, L.; RAMASSAMY, C. Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine* v 4(13), p. e34 2013.

BENDER, E. A.; ADORNE, M. D.; COLOMÉ, L. M.; ABDALLA, D. S.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Hemocompatibility of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80 lecithin and uncoated or coated with chitosan. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 426, p. 271-279, 2012.

BENVEGNÚ, D. M.; BARCELOS, R. C. S.; BOUFLEUR, N.; RECKZIEGEL, P.; PASE, C. S.; OURIQUE, A. F.; BECK, R. C. R.; BÜRGER, M. E. Haloperidol-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules increase its efficacy in the antipsychotic treatment in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 77, p. 332–336, 2011.

BERNARDI, A.; BRAGANHOL, E.; JÄGER, E.; FIGUEIRÓ, F.; EDELWEISS, M. I.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. O. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer Letters*, v. 281, p. 53–63, 2009a

BHAKAY, A.; DAVÉ, R.; BILGILI, E. Recovery of BCS Class II drugs during aqueous redispersion of core–shell type nanocomposite particles produced via fluidized bed coating. *Powder Technology*, v. 236, p. 221–234, 2013.

BOSE, S.; SCHENCK, D.; GHOSH, I.; HOLLYWOOD, A.; MAULIT, E.; RUEGGER, C. Application of spray granulation for conversion of a nanosuspension into a dry powder form. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 47, p. 35–43, 2012.

BULCÃO, R. P.; BUBOLS, G. B.; NASCIMENTO, S. N.; GAUER, B.; SAUER, E.; BAIERLE, M.; CHARÃO, M. F.; MORO, A.; BRUCKER, N.; BRUINSMANN, F. A.; SCHNORR, C.; MOREIRA, J. C. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; GARCIA, S. C. Do poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules induce oxidatitive or inflammatory damage after in vivo subchronic treatment?. *Toxicology Reserarch*, v. 4, p. 994-1005, 2015.

BULCÃO, R. P.; FREITAS, F. A.; VENTURINI, C. G.; DALLEGRAVE, E.; DURGANTE, J.; GOETHEL, G.; CERSKI, C. T. S.; ZIELINSKY, P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; GARCIA, S. C. Acute and subchronic toxicity evaluation of Poly(ϵ -Caprolactone) lipid-core nanocapsules in rats. *Toxicological Sciences*, v. 132, p. 162-176, 2013.

CÉ, R.; MARCHI, J. G.; BERGAMO, V. Z.; FUENTEFRIA, A. M.; LAVAYEN, V.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Chitosan-coated dapsone-loaded lipid-core nanocapsules: Growth inhibition of clinical isolates, multidrug resistant *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus* ssp. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 511, p. 153-161, 2016.

CHIU, C. H.; CHANG, C. C.; LIN, S. T.; CHYAU, C. C.; PENG, R. Y. Improved Hepatoprotective Effect of Liposome-Encapsulated Astaxanthin in Lipopolysaccharide-Induced Acute Hepatotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, E1128.

DE ANDRADE, D. F.; FONTANA, M. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Nanoencapsulation of clobetasol propionate decreases its penetration to skin layers without changing its relative skin distribution. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 15(1), p. 875-879. 2015.

DETONI, C. B.; SOUTO, G. D.; SILVA, A. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Photostability and skin penetration of different E-resveratrol-loaded supramolecular structures. *Photochemistry and Photobiology*, v. 88(4), p. 913–921, 2012.

DI MARTINO, P.; SCOPPA, M.; JOIRIS, E.; PALMIERI, G. F.; ANDRES, C.; POURCELOT, Y.; MARTELLI, S. The spray drying of acetazolamide as method to modify crystal properties and to improve compression behaviour. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 213, p. 209-221, 2001.

DIMER, F. A.; ORTIZ, M.; PASE, C. S.; ROVERSI, K.; FRIEDRICH, R. B.; POHLMANN, A. R.; BURGER, M. E.; GUTERRES, S. S. Nanoencapsulation of olanzapine increases its efficacy in antipsychotic treatment and reduces adverse effects. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 10(9), p. 1137-1145. 2014.

DURLI, T.; DIMER, F. A.; FONTANA, M. C.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S. Innovative approach to produce submicron drug particles by

vibrational atomization spray drying: influence of the type of solvent and surfactant. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 40(8), p. 1011-1020, 2014.

FACHINETTO, J. M.; OURIQUE, A. F.; LUBINI, G.; TEDESCO, S. B.; SILVA, A. C. F.; BECK, R. C. R. Tretinoin-loaded polymeric nanocapsules: Evaluation of the potential to improve the antiproliferative activities on *Allium cepa* root-tip compared to the free drug. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 27, p. 668-673, 2008.

FIEL, L. A.; REBÊLO, L. M.; SANTIAGO, T. M.; ADORNE, M. D.; GUTERRES, S. S.; SOUSA, J. S.; POHLMANN, A. R. Diverse deformation properties of polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules. *Soft Matter*, v. 7, p. 7240–7247, 2011.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Nanocapsules prepared from amorphous polyesters: effect on the physicochemical characteristics, drug release and photostability. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 10, p. 3091-3099, 2010.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Nanoencapsulation as a Way to Control the Release and to Increase the Photostability of Clobetasol Propionate: Influence of the Nanostructured System. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 5, p. 1-10, 2009.

FONTANA, M. C.; DURLI, T. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Polymeric controlled release inhalable powder produced by vibrational spray-drying: one-step preparation and in vitro lung deposition. *Powder Technology*, v. 258, p. 49-59, 2014. FRACASSO, R.; BAIERLE, M.; GOETHEL, G.; BARTH, A.; FREITAS, F. A.; NASCIMENTO, S.; ALTKNECHT, L.; OLSEN, V.; PAESE, K.; DA SILVA, V. D.; CASTRO, I.; ANDRADES, M.; CLAUSELL, N.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; GARCIA, S. C. Evaluation of potential acute cardiotoxicity of biodegradable nanocapsules in rats by intravenous administration. *Toxicology Research*, v. 5, p. 168-179, 2016.

FRANK, L. A.; CONTRI, R. V.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. *Wiley Interdisciplinary Reviews - Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 7(5), p. 623-639, 2015.

FRIEDRICH, R. B., FONTANA, M. C., BASTOS, M. O., POHLMANN, A. R., GUTERRES, S. S., BECK, R. C. R. Drying polymeric drug-loaded nanocapsules: the wet granulation process as a promising approach. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 10, p. 616–621 , 2010.

FRIEDRICH, R. B.; CORADINI, K.; FONSECA, F. N.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Lipid-core nanocapsules improved antiedematogenic activity of tacrolimus in adjuvant-induced arthritis model. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 16, p. 1265-1274, 2016.

FROTSCHER, M.; ZAFIROV, S.; HEIMRICH, B. Development of identified neuronal types and of specific synaptic connections in slice cultures of rat hippocampus. *Progress in neurobiology*, v. 45, p. vii-xxviii, 1995.

FROZZA, R. L.; BERNARDI, A.; HOPPE, J. B.; MENEGHETTI, A. B.; BATTASTINI, A. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; SALBEGO, C. Lipid-core nanocapsules improve the effects of resveratrol against Abeta-induced neuroinflammation. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 9, p. 2086-2104, 2013.

FROZZA, R. L.; BERNARDI, A.; PAESE, K.; HOPPE, J. B.; SILVA, T.; BATTASTINI, A. M. O.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; SALBEGO, C. Characterization of trans-Resveratrol-Loaded Lipid-Core Nanocapsules and Tissue Distribution Studies in Rats. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 6, p. 1–10, 2010.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, v. 40, p. 1107-1121, 2007.

- GUPTA, S. C.; PATCHVA, S.; AGGARWAL, B. B. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *The AAPS Journal*, v. 15, p. 195-218, 2013.
- GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: a brief overview. *Brazilian Journal of Physics*, v. 39, p. 205–209, 2009.
- HANSULD, E. M.; BRIENS, L. A review of monitoring methods for pharmaceutical wet granulation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 472, p. 192-201, 2014.
- HATCHER, H.; PLANALP, R.; CHO, J.; TORTI, F. M.; TORTI, S. V. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, p. 1631–1652, 2008.
- HELM, F.; FRICKER, G. Liposomal conjugates for drug delivery to the central nervous system. *Pharmaceutics*, v. 7, 27-42, 2015.
- HENROTIN, Y.; CLUTTERBUCK, A.L.; ALLAWAY, D.; LODWIG, E.M.; HARRIS, P.; MATHY-HARTERT, M.; SHAKIBAEI, M.; MOBASHERI, A. Biological actions of curcumin on articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 18, p. 141–149, 2010.
- HOFFMEISTER, C. R. D.; DURLI, T. L.; SCHAFFAZICK, S. R.; RAFFIN, R. P.; BENDER, E. A.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery. *Nanoscale Research Letters*, v. 7, p. 251, 2012.
- JÄGER, E.; VENTURINI, C. G.; POLLETO, F. S., COLOMÉ, L. M.; POHLMANN, J. P.U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 5, p. 130-140, 2009.

JAQUES, E. A.; DOLESKI, P. H.; CASTILHOS, L. G.; DA ROSA, M. M.; SOUZA, C.; CARVALHO, F. B.; MARISCO, P.; THORSTENBERG, M. L.; REZER, J. F.; RUCHEL, J. B.; CORADINI, K.; BECK, R. C.; RUBIN, M. A.; SCHETINGER, M. R.; LEAL, D. B. Free and nanoencapsulated curcumin prevents cigarette smoke-induced cognitive impairment and redox imbalance. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 100, p. 98-107, 2013.

JORNADA, D. S.; FIEL, L. A.; BUENO, K.; GERENT, J. F.; PETZHOLD, C. L.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. *Soft Matter*, v. 8, p. 6646-6655, 2012.

JORNADA, D. S.; FRIEDRICH, R. B.; FERRARINI, S.; DE MARCHI, J. G.; GERENT, J. F.; FERREIRA, G.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Lipid-core nanocapsules: reducing the aqueous phase volume to increase encapsulation efficiency and to reduce the energy and time consuming of the production process. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, v. 4(1), p. 79-85, 2015.

KAWASHIMA, Y.; TOMOAKI, H.; TAKEUCHI, H.; NIWA, T.; KAWAKATSU, E.; KAYANO, M.; IDA, K.; OZAWA, H.; SAKAMOTO, H. Preparation of powdered phospholipid nanospheres by fluidized-bed granulating in an aqueous system with sugars. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 40(2), p. 472-478, 1992.

KHAYATA, N.; ABDELWAHED, W.; CHEHNA, M. F.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Stability study and lyophilization of vitamin E-loaded nanocapsules prepared by membrane contactor. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 439, p. 254-259, 2012.

LEI, Y.; LU, Y.; QI, J.; NIE, S.; HU, F.; PAN, W.; WU, W. Solid self-nanoemulsifying cyclosporin A pellets prepared by fluid-bed coating: preparation, characterization and in vitro redispersibility. *International Journal of Nanomedicine*, v. 6, p. 795-805, 2011.

- LI, M.; LOPEZ, N.; BILGILI, E. A study of the impact of polymer–surfactant in drug nanoparticle coated pharmatose composites on dissolution performance. *Advanced Powder Technology*, v. 27(4), p. 1625-1636, 2016.
- MAHAJAN, H. S.; MAHAJAN, M. S.; NERKAR, P. P.; AGRAWAL, A. Nanoemulsion based intranasal drug delivery system of saquinavir mesylate for brain targeting. *Drug Delivery*, v. 21, 148-154, 2014.
- MANCONI, M.; NÁCHER, A.; MERINO, V.; MERINO-SANJUAN, M.; MANCA, M. L.; MURA, C.; MURA, S.; FADDA, A. M.; DIEZ-SALES, O. Improving Oral Bioavailability and Pharmacokinetics of Liposomal Metformin by Glycerolphosphate–Chitosan Microcomplexation. *AAPS PharmSciTech*, v. 14, 485-496, 2013.
- MANGEMATIN, V.; WALSH, S. The future of nanotechnologies. *Technovation*, v. 32, p. 157–160, 2012.
- MARCHIORI, M. C.; OURIQUE, A. F.; SILVA, C. B.; RAFFIN, R. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Spray-dried powders containing tretinoin-loaded engineered lipid-core nanocapsules: development and photostability study. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 12(3), p. 2059–2067, 2012.
- MAURY, M.; MURPHY, K.; KUMAR, S.; SHI, L.; LEE, G. Effects of process variables on the powder yeild of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 59, p. 565-573, 2005.
- MICHAEL, J. K. Spray drying and spray congealing of pharmaceuticals. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Tehcnology*. Marcel Dekker INC, NY, 14, p. 2007-221, 1993.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for durg delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 385, 113-142, 2010.

MÜLLER, C. R.; BASSANI, V. L.; POHLMANN, A. R.; MICHALOWSKI, C. B.; PETROVICK, P. R.; GUTERRES, S. S. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocápsulas. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 26, n. 3, p. 343-347, 2000.

MORIN G.; BRIENS, L. A comparison of granules produced by high-shear and fluidized-bed granulation methods. *AAPS PharmSciTech*, v. 15(4), p. 1039-1048, 2014.

OURIQUE, A. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 352, p.1-4, 2008.

PALMIERI, G. F.; BONACUCINA, G.; DI MARTINO, P.; MARTELLI, S. Gastro-resistant microspheres containing ketoprofen. *Journal of Microencapsulation*, v. 19(1), p. 111-119, 2002.

PALZER, S.; DESCAMPS, N.; ROOS, Y.; FITZPATRICK, J. Glass transition and flowability/caking behavior of maltodextrin DE21. *Journal of Food Engineering*, v. 119, p. 809-813, 2013.

PARIKH, D. M. Theory of Granulation. *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*, Marcel Dekker INC, NY, p. 7-13, 1997.

PATEL, R. P.; PATEL, M. P.; SUTHAR, A. M. Spray drying technology: an overview. *Indian Journal of Science and Technology*, v. 2(10), p. 44-47, 2009.

POHLMANN, A. R.; FONSECA, F. N.; PAESE, K.; DETONI, C. B.; CORADINI, K.; BECK, R. C.; GUTERRES, S. S. Poly(epsilon-caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. *Expert Opinion in Drug Delivery*, v. 10(5), p. 623-630, 2013.

POLETTO, F. S.; DE OLIVEIRA, C. P.; WENDER, H.; REGENT, D.; DONLIDA, B.; TEIXEIRA, S. R.; GUTERRES, S. S.; ROSSI-BERGMANN, B.; POHLMANN,

A. R. How sorbitan monostearate can increase drug-loading capacity of lipid-core polymeric nanocapsules. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 15(1), p. 827-837, 2015.

RIBEIRO, R. F.; MOTTA, M. H.; HARTER, A. P. G.; FLORES, F. C.; BECK, R. C. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; DA SILVA, C. D. Spray-dried powders improve the controlled release of antifungal tioconazole-loaded polymeric nanocapsules compared to with lyophilized products. *Materials Science & Engineering C - Materials for Biological Applications*, v. 59, p. 875-884, 2016.

RODRIGUES S. F.; FIEL, L. A.; SHIMADA, A. L.; PEREIRA, N. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; FARSKY, S. H. Lipid-core nanocapsules act as drug shuttle through the blood brain barrier and reduce glioblastoma after intravenous or oral administration. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 12(5), p. 986-1000, 2016.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos para a administração de fármacos. *Química Nova*, v. 25 (5), p. 726–737, 2003a.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA-COSTA, T.C.; GUTERRES, S.S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 56, n. 3, p. 501-505, 2003b.

SHANMUGAM, S. Granulation techniques and technologies: recent progresses. *BioImpacts*, v. 5 p. 55-63, 2015.

SHISHODIA, S.; SETHI, G.; AGGARWAL, B. B. Curcumin: getting back to the roots. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1056, p. 206-217, 2005.

SILVA, A. L.; CONTRI, R. V.; JORNADA, D. S.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Vitamin K1-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical

characterization and in vitro skin permeation. *Skin Research and Technology*, v 19(1), p. 223–230, 2013.

SINSUEBPOL, C.; CHATCHAWALSAISIN, J.; KULVANICH, P. Preparation and in vivo absorption evaluation of spray dried powders containing salmon calcitonin loaded chitosan nanoparticles for pulmonary delivery. *Drug design, Development and Therapy*, v. 7, p. 861-873, 2013.

SIQUEIRA, N. M.; CONTRI, R. V.; PAESE, K.; BECK, R. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Innovative sunscreen formulation based on benzophenone-3-loaded chitosan-coated polymeric nanocapsules. *Skin Pharmacology and Physiology*, v. 24(3), p. 166-174, 2011.

TEWA-TAGNE, P. BRIANÇON, S.; FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: development and characterisation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 30(2), p. 124-135, 2006.

TOMODA, K.; OHKOSHI, T.; NAKAJIMA, T.; MAKINO, K. Preparation and properties of inhalable nanocomposite particles: effects of the size, weight ratio of the primary nanoparticles in nanocomposite particles and temperature at a spray-dryer inlet upon properties of nanocomposite particles. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*, v. 64, p. 70-76, 2008.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, v. 26(5), p. 1025-1058, 2009.

VENTURINI, C. G.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C. P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A.R. Formulation of lipid- core nanocapsules, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.375, p. 200–208, 2011.

WHOLFART, S.; GELPERINA, S.; KREUTER, J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, v. 161(2), p. 264-273, 2012.

YAMAMOTO, H.; HOSHINA, W.; KURASHIMA, H.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y.; YOKOYAMA, T.; TSUJIMOTO, H. Engineering of poly(DL-lactic-co-glycolic acid) nanocomposite particles for dry powder inhalation dosage forms of insulin with the spray-fluidized bed granulating system. *Advanced Powder Technology*, v. 18(2), p. 215-228, 2007.

ZANOTTO-FILHO, A.; CORADINI, K.; BRAGANHOL, E.; SCHRODER, R.; OLIVEIRA, C. M.; SIMÕES-PIRES, A.; BATTASTINI, A. M. O.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; FORCELINI, C. M.; BECK, R. C. R.; MOREIRA, J. C. F. Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.83(2) p. 156–167, 2013.

ZHANG, X.; GUAN, J.; NI, R.; LI, L. C.; MAO, S. Preparation and solidification of redispersible nanosuspensions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 103, p. 2166 - 2176, 2014.

ZHAO, Y. N.; GU, J.; JIA, S.; GUAN, Y.; ZHANG, Y. Zero-order release of polyphenolic drugs from dynamic, hydrogen-bonded LBL films. *Soft Matter*, v. 12. p. 1085-1092, 2016.

Carta de aprovação – CEUA/UFRGS

| | | | |
|---|--|--|---|
|  | UFRGS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL | PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética No Uso De Animais |  |
|---|--|--|---|

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 20005
Título: Investigação do potencial terapêutico da curcumina na neuroinflamação induzida pelo peptídeo beta-amilóide em modelos in vitro e in vivo da Doença de Alzheimer

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CHRISTIANNE GAZZANA SALBEGO - coordenador desde 01/03/2010
RUDIMAR LUIZ FROZZA - Aluno de Doutorado desde 01/03/2010
JULIANA BENDER HOPPE - Aluno de Doutorado desde 01/03/2010
Thaline da Silva - Aluno de Mestrado desde 01/03/2010
ANDRÉ BEVILACQUA MENEGHETTI - Aluno de Graduação desde 01/03/2010

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 28/03/2011 - Sala de Reuniões do 6º andar da Reitoria, Campus Central, em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 7 de Abril de 2011


FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética

11.APÊNDICE

11.1 Apresentação

O *Abstract* contido nesse apêndice consiste em um trabalho complementar, desenvolvido em coautoria à Doutora Karine Coradini, egressa do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte integrante de sua Tese de Doutorado e ao professor Doutor Ruy Carlos Ruver Beck.

Uma revisão bibliográfica sobre os estudos pré-clínicos de sistemas nanoencapsulados, contendo curcumina, foi realizada durante o primeiro ano de minhas atividades como doutorando e teve papel fundamental para nortear a seleção da curcumina como molécula bioativa modelo, para realização dos estudos descritos no capítulo dois deste exemplar.

Esta revisão bibliográfica resultou na publicação de um capítulo do livro "*Curcumin - Synthesis, Emerging Role in Pain Management and Health Implications*", da editora Nova Science Publishers, sob edição de Daniel Loic Pouliquen, 2014, intitulado "*Nanoencapsulated curcumin: in vivo findings of its implications for human health*".

Nanoencapsulated curcumin: *in vivo* findings of its implications for human health

Karine Coradini, Diego Fontana de Andrade, Ruy Carlos Ruver Beck*

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

* E-mail adress: ruy.beck@ufrgs.com.br

ABSTRACT

Curcumin is a natural diphenol with a wide range of pharmacological properties, including anti-inflammatory, antioxidant and antitumor activities. For this reason, this molecule shows great promise as a therapeutic agent. However, its clinical use and healing potential are still limited due to its low aqueous solubility, instability at physiological pH and extensive metabolism, mainly intestinal and hepatic, leading to poor bioavailability. In recent years, nanotechnological strategies have been successfully investigated to improve curcumin pharmacokinetic and bioavailability. In this scenario, curcumin-loaded nanostructured systems such as liposomes, nanoemulsions, polymeric micelles, solid lipid nanoparticles and polymeric nanoparticles have been shown to be promising approaches to overcome the obstacles associated with its physicochemical properties. In addition, different drug delivery systems are able to increase curcumin delivery to the brain and consequently improve its therapeutic effects against neurological diseases. Moreover, anticancer, anti-malaria, anti-inflammatory and antioxidant properties can be modulated by its nanoencapsulation. This chapter will present an overview of *in vivo* studies reported in the literature concerning curcumin-loaded nanoparticles. The development of nanoformulations for improving curcumin bioavailability, transport across the blood-brain barrier and therapeutic effects will be discussed.

Keywords: Curcumin, nanotechnology, bioavailability, cancer, inflammation, neurodegenerative diseases.