

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Proposição de algoritmo para determinação da partição de fármacos em  
Formulações de Nanocápsulas de Núcleo Lipídico

Catiúscia Padilha de Oliveira

Porto Alegre, 2010.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Proposição de algoritmo para determinação da partição de fármacos em  
Formulações de Nanocápsulas de Núcleo Lipídico

Dissertação apresentada por **Catiúscia**  
**Padilha de Oliveira** para obtenção do  
GRAU DE MESTRE em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Adriana R. Pohlmann pela acolhida, por sua orientação dedicada e paciência prestada para a concretização deste trabalho. E, Sobretudo, aos ensinamentos transmitidos.

À Profa. Dra. Silvia S. Guterres, pela disponibilização de seu laboratório, possibilitando a utilização de equipamentos de alta tecnologia.

À minha família, especialmente meus pais, Paulo e Sirlei, e aos meus irmãos, Catlen e Juan, pelo suporte, pela compreensão, pela confiança e apoio irrestrito ao caminho que escolhi.

Aos meus amigos por toda dedicação e paciência sempre demonstrada. Pela agradável convivência e pelo conhecimento compartilhado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

Ao CNPq/MCT, pela bolsa de estudos concedida.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	VII
LISTA DE TABELAS .....	VIII
ABREVIATURAS .....	IX
RESUMO .....	XII
ABSTRACT .....	XIII
1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	17
2.1. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS .....	18
2.2. FÁRMACOS MODELO .....	20
2.2.1. INDOMETACINA .....	20
2.2.2. ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA .....	21
2.2.3. DICLOFENACO .....	22
2.2.4. ACICLOVIR .....	24
2.2.5. MELATONINA .....	25
2.2.6. METOTREXATO .....	27
2.4. DETERMINAÇÃO DA PARTIÇÃO DE FÁRMACOS .....	31
2.5. MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL EM FÁRMACOS PARA AUMENTAR A LIPOFILIA .....	34
3. OBJETIVOS .....	36
3.1. OBJETIVO GERAL .....	37

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	39
4.1. MATERIAIS .....	40
4.1.1. MATÉRIAS-PRIMAS .....	40
4.1.2. APARELHOS E EQUIPAMENTOS .....	40
4.1.3. SOLVENTES E OUTROS MATERIAIS .....	41
4.2. MÉTODOS .....	43
4.2.1. PREPARAÇÃO DO ÉSTER ETÍLICO DE INDOMETACINA .....	43
4.2.2. PREPARAÇÃO DO DICLOFENACO ÁCIDO .....	43
4.2.3. PREPARAÇÃO DO ÉSTER ETÍLICO DE METOTREXATO .....	43
4.2.4. PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO .....	44
4.2.5. DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO, TAMANHO MÉDIO, POLIDISPERSÃO, DIÂMETRO MÉDIO, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO DAS NCL .....	46
4.2.6. DETERMINAÇÃO DO pH EXPERIMENTAL DAS FORMULAÇÕES E CÁLCULO DO LOG D DOS FÁRMACOS .....	47
4.2.7. ESTABILIDADE ACELERADA DAS FORMULAÇÕES $NC_{MTX(OET)20,25}$ E $NC_{MTX(OET)20,5}$ .....	48
4.2.8. QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	48
4.2.8.1. LINEARIDADE .....	50
4.2.8.2. PRECISÃO .....	50
4.2.8.3. ESPECIFICIDADE .....	51

4.2.8.4. EXATIDÃO .....	51
4.2.8.5. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO .....	51
4.2.9. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SATURAÇÃO DOS FÁRMACOS EM ÁGUA E NA FASE AQUOSA .....	52
4.2.10. ULTRAFILTRAÇÃO-CENTRIFUGAÇÃO .....	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
5.1. CARACTERIZAÇÃO DO MTX(OET) <sub>2</sub> .....	55
5.2. SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO .....	56
5.3. ESTABILIDADE ACELERADA DAS FORMULAÇÕES NC <sub>MTX(OET)<sub>20,25</sub></sub> E NC <sub>MTX(OET)<sub>20,5</sub></sub> .....	59
5.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS.....	60
5.5. CONCENTRAÇÃO DE SATURAÇÃO EM ÁGUA E NA FASE AQUOSA.....	64
5.6. PROPOSTA DE ALGORITMO PARA ESTABELEECER A PARTIÇÃO DOS FÁRMACOS NAS NCL .....	65
6.CONCLUSÃO .....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da indometacina .....	20
Figura 2. Estrutura química do éster etílico de indometacina .....	21
Figura 3. Estrutura química do diclofenaco ácido .....	22
Figura 4. Estrutura química do diclofenaco sódico .....	23
Figura 5. Estrutura química do aciclovir .....	24
Figura 6. Estrutura química da melatonina .....	25
Figura 7. Estrutura química do metotrexato .....	27
Figura 8. Esquema da interpretação dos fenômenos de instabilidade analisados por espalhamento múltiplo de luz empregando o equipamento Turbiscan.....	48
Figura 9. Reação de esterificação do éster etílico de metotrexato .....	55
Figura 10. RMN H <sup>1</sup> metotrexato .....	56
Figura 11. RMN H <sup>1</sup> éster etílico de metotrexato .....	56
Figura 12. Gráficos de tamanho médio das formulações NC <sub>INDOET1</sub> ; NC <sub>INDOET2</sub> ; NC <sub>INDOH1</sub> ; NC <sub>INDOH2</sub> ; NC <sub>DICOH1</sub> ; NC <sub>DICOH2</sub> ; NC <sub>MTX(OEt)20,25</sub> ; NC <sub>MTX(OEt)20,5</sub> ; NC <sub>MEL0,5</sub> ; NC <sub>ACV0,4</sub> ; NC <sub>DICONa1</sub> ; NC <sub>MTX0,25</sub> .....	57
Figura 13. Perfil de retroespalhamento da NC <sub>MTX(OEt)20,25</sub> .....	59
Figura 14. Perfil de retroespalhamento da NC <sub>MTX(OEt)20,5</sub> .....	59
Figura 15. Especificidade do método analítico validado para o éster etílico de metotrexato .....	60
Figura 16. Cromatograma da formulação contendo éster etílico de metotrexato em solução de acetonitrila em 303 nm no método validado .....	61

Figura 17. Média das curvas de calibração dos fármacos utilizados neste estudo .....	62
Figura 18. Algoritmo para estabelecer a partição de fármacos em formulações aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico .....	67
Figura 19. Partição dos fármacos nas formulações de nanocápsulas. I- $NC_{ACV}$ ; II- $NC_{MEL}$ , $NC_{DICONa}$ ; $NC_{MTX}$ ; III – $NC_{MTX(OEt)_{20,5}}$ IV - $NC_{DICOH1}$ ; $NC_{INDOH3}$ ; V - $NC_{DICOH2}$ ; VI - $NC_{INDOEt1}$ ; $NC_{INDOH1}$ .....	70



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração final dos fármacos nas formulações de NCL .....	45
Tabela 2. Condições cromatográficas para análise dos fármacos utilizados no presente trabalho .....	50
Tabela 3. Diâmetros médios e teores de fármacos das suspensões de nanocápsulas .....	58
Tabela 4. Parâmetros analisados para validação dos métodos cromatográficos .....	63
Tabela 5. Concentração de saturação dos fármacos em água e na fase aquosa .....	64
Tabela 6. Dissolução dos fármacos após diluições das formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico .....	66

## ABREVIATURAS

HPLC - do inglês High Performance Liquid Chromatography

DCC - diciclohexilcarbodiimida

DICONa - diclofenaco sódico

DLS - do inglês Dynamic Light Scattering

PDI – do inglês Index Polidispersion

BS – do inglês backscattering

DSC – do inglês Differential scanning calorimetry

DMAP - 4-(N,N-dimetil)aminopiridina

DCU - diciclohexilureia

RA – do inglês Retinoic Acid

INDOEt - éster etílico de indometacina

INDOH - indometacina

MTX - metotrexato

ACV - aciclovir

MEL - melatonina

DICOH - diclofenaco ácido

MTX(OEt)<sub>2</sub> - éster etílico de metotrexato

NC<sub>INDOET1</sub> - nanocápsulas de núcleo lipídico contendo 1 mg mL<sup>-1</sup> de éster etílico de indometacina

NC<sub>INDOET2</sub> - nanocápsulas de núcleo lipídico contendo 2 mg mL<sup>-1</sup> de éster etílico de indometacina

NC<sub>INDOH1</sub> - nanocápsulas de núcleo lipídico contendo 1 mg mL<sup>-1</sup> de indometacina

NC<sub>INDOH3</sub> - nanocápsulas de núcleo lipídico contendo 3 mg mL<sup>-1</sup> de indometacina

NC<sub>DICOH1</sub> - nanocápsulas de núcleo lipídico contendo 1 mg mL<sup>-1</sup> de diclofenaco ácido

NC<sub>DICOH2</sub> - nanocápsulas de núcleo lipídico contendo 2 mg mL<sup>-1</sup> de diclofenaco ácido

NC<sub>DICONa1</sub> - nanocápsulas de núcleo lipídico contendo 1 mg mL<sup>-1</sup> de diclofenaco sódico

NC<sub>MEL0,5</sub> - nanocápsulas de núcleo lipídico contendo 0,5 mg mL<sup>-1</sup> de melatonina

NC<sub>ACV0,4</sub> - nanocápsulas de núcleo lipídico contendo 0,4 mg mL<sup>-1</sup> de aciclovir

NC<sub>MTX0,25</sub> - nanocápsulas de núcleo lipídico contendo 0,25 mg mL<sup>-1</sup> de metotrexato

NC<sub>MTX(OEt)20,25</sub> - nanocápsulas de núcleo lipídico contendo 0,25 mg mL<sup>-1</sup> de éster etílico de metotrexato

NC<sub>MTX(OEt)20,5</sub> - nanocápsulas de núcleo lipídico contendo 0,5 mg mL<sup>-1</sup> de éster etílico de metotrexato

MS - monoestearato de sorbitano

NCL - nanocápsula de núcleo lipídico

PCL - poli(epsilon-caprolactona)

PEG - poli(etilenoglicol)

PLA - poli(ácido láctico)

PLA-PEG - poli(D,L-lactídeo)-*b*-poli(etilenoglicol)

PAMAM - poliamidoamina

PLGA - poli(ácido láctico-co-glicólico)

PMMA - poli(metacrilato)

MPEG – poli(etilenoglicol)metoxilado

TGCC - triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico

Log D - logaritmo do coeficiente de distribuição

UV - ultravioleta

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MET – microscopia eletrônica de transmissão

## RESUMO

O conhecimento da partição do fármaco nas nanopartículas auxilia a prever seu comportamento físico-químico e biológico. No entanto, a determinação da localização do fármaco nos sistemas nanocarreadores é complexa. Assim, esse trabalho propõe um algoritmo para determinar a partição de fármacos, nas diferentes pseudofases das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico. Para isso preparou-se formulações empregando fármacos com diferentes características. Calculou-se o Log D e a concentração de saturação desses fármacos em água e na fase aquosa das formulações. As formulações foram diluídas de 0 a 1000 vezes e, utilizando a técnica de ultrafiltração-centrifugação, realizou-se a quantificação dos fármacos no ultrafiltrado. A partir desses dados formulou-se um algoritmo classificando as formulações em seis grupos conforme a partição dos fármacos. Tipo I: o fármaco encontra-se totalmente solubilizado na fase contínua. Tipo II: o fármaco está parcialmente solubilizado na fase aquosa e parcialmente encapsulado nas nanopartículas, provavelmente, adsorvido à parede polimérica. Tipo III: o fármaco encontra-se distribuído entre as diferentes pseudo-fases do sistema, parcialmente solubilizado na fase aquosa e parcialmente encapsulado nas nanopartículas, nestas, parte está adsorvido na parede polimérica e parte encapsulado no núcleo lipídico. Tipo IV: o fármaco está encapsulado nas nanopartículas, majoritariamente adsorvido à parede polimérica. Tipo V: o fármaco está encapsulado nas nanopartículas, majoritariamente adsorvido à parede polimérica, e o excesso dele encontra-se na forma de nanocristais. Tipo VI: o fármaco está totalmente encapsulado nas nanopartículas, majoritariamente presente no núcleo lipídico das nanocápsulas. Assim, o algoritmo demonstrou que pode ser utilizado para uma ampla gama de moléculas.

Palavras-chave: nanopartículas, nanocápsulas poliméricas, metotrexato, indometacina, éster etílico de indometacina, diclofenaco, aciclovir, melatonina.

## ABSTRACT

Drugs Partition in the nanoparticles can predict their physical, chemical and biological behavior. However, determining the amount of drug in the encapsulated nanoparticle systems is complex. Considering those, this work proposes an algorithm to determine the drugs partition in different pseudo-phases of the suspensions of nanocapsules of lipid core. Formulations content drugs with different characteristics were used. We calculated the log D and the saturation concentration these drugs in water and aqueous phase of the formulations. The nanocapsule formulations were diluted in water between 0 and 1000 and, using the technique of ultrafiltration-centrifugation, the drug content in the ultrafiltered was determined. An algorithm was obtained with those data. The formulations were categorized in six groups according the drugs partition. Group I: in this group, drug is totally dissolved in the aqueous phase instead of loading to the nanocapsules. Group II: drug is dissolved in the aqueous phase and adsorbed in the nanocapsule surface. Group III: drug in these formulations is dissolved in the aqueous phase, it encapsulated in the lipidic core and adsorbed in the nanocapsules surface. Group IV: drug is partially encapsulated in the nanoparticles, major adsorbed in the nanocapsules surface. Group V: drug is partially encapsulated in the nanoparticles, major adsorbed in the nanocapsules surface and the exceeding drug was organized as colloidal aggregates. Group VI: drug is encapsulated in the nanoparticles, major encapsulated in the lipidic core. Thus, the algorithm demonstrated that it can be used for various molecules.

Key-words: nanoparticles, polymeric nanocapsules, methotrexate, indomethacin, indomethacin ethyl ester, diclofenaco, acyclovir, melatonin.



Muitos estudos vêm sendo realizados para melhorar a eficiência de fármacos, buscando doses menores e maior especificidade. Além da busca por novas moléculas bioativas, estratégias como a associação dos fármacos a sistemas carreadores vem se mostrando promissoras (RAMTEKE e col., 2008; FAKLER e col., 2008; ALLARD e col., 2008; VEISEH e col., 2009). A utilização de carreadores micro- e nanoparticulados permite o melhor controle da taxa de liberação do fármaco em determinados sítios de ação (SCHAFFAZICK e col., 2003; PATEL, 2008; JANTARAT e col., 2008). Além desses benefícios, as nanoestruturas também são potencialmente capazes de proteger o fármaco frente à degradação enzimática, química ou imunológica (BARRATT, 2000). Dentre esses nanocarreadores, destacam-se as nanopartículas poliméricas (COUVREUR e col., 2002).

As nanocápsulas poliméricas são formadas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso e são estabilizadas por tensoativos (MAGENHEIM e BENITA, 1991; JAGER e col., 2007). A efetividade biológica das nanocápsulas está estritamente relacionada com suas características físico-químicas, tais como diâmetro, polidispersão, química de superfície, estabilidade e taxa de liberação do fármaco (SCHAFFAZICK e col., 2003). Além disso, a partição do fármaco na formulação de nanocápsulas influencia diretamente na sua eficácia biológica.

Nosso grupo de pesquisa vem se dedicando ao desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas inovadoras, utilizando o método de deposição interfacial, contendo como núcleo um lipídeo sólido disperso em um lipídeo líquido (MÜLLER e col., 2001; SCHAFFAZICK e col., 2003; CRUZ e col., 2006a; CRUZ e col., 2006b; JÄGER e col., 2009). Estudos de liberação de uma sonda lipofílica a partir destes nanossistemas demonstraram a difusão da sonda, que está dissolvida no núcleo, através da parede polimérica, sendo esta capaz de controlar a liberação juntamente com os dois lipídeos constituintes do núcleo destes nanocarreadores (CRUZ e col., 2006a; POLETTTO e col., 2008; JÄGER e col., 2009). Ainda, as propriedades de deformação das nanocápsulas lipídicas são diferenciadas (FIEL, 2010).

O metotrexato é um fármaco utilizado no tratamento de diferentes tipos de tumores, artrite reumatóide e psoríase. No entanto, o uso contínuo desse fármaco



pode causar vários efeitos colaterais, além de desenvolver o efeito de resistência ao mesmo. Considerando que formulações nanoencapsuladas podem reduzir a dose terapêutica em até 10 vezes e que sistemas nanoparticulados extravasam para tecidos inflamados (GUTERRES e col., 2007; SCHAFFAZICK e col., 2003), a obtenção de formulações nanoestruturadas contendo metotrexato podem diminuir potencialmente os efeitos colaterais do fármaco, maximizando seus efeitos terapêuticos.

Contudo, a localização dos fármacos em formulações nanoestruturadas é importante para prever o comportamento físico-químico e biológico do sistema. Para isso, podem ser utilizados os perfis de liberação *in vitro*, através de diversos métodos, entre outras técnicas. No entanto, até o momento, nenhum deles demonstrou poder ser utilizados para diferentes moléculas.

Desse modo, de forma inovadora, para determinar a partição de fármacos na formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico, propomos o desenvolvimento de um algoritmo. Além disso, com a finalidade de modificar e modular a partição do metotrexato nas diferentes pseudofases da suspensão aquosa de nanocápsulas de núcleo lipídico propomos o desenvolvimento de formulações de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico contendo metotrexato, e de um derivado seu, obtido através de uma reação de esterificação.



### 2.1. Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais com potencialidade como carreadores de fármacos (SCHAFFAZICK e col., 2003). O termo nanopartículas poliméricas inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e a organização estrutural. As nanocápsulas são sistemas vesiculares onde o núcleo oleoso é recoberto por uma parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas são sistemas matriciais e não apresentam óleo em sua composição (SOPPIMATH e col., 2001; SCHAFFAZICK e col., 2003; LOPES e col., 2000; CRUZ e col., 2006a; CRUZ e col., 2006b; MORA-HUERTAS e col., 2010). Também há as micelas poliméricas, cuja estrutura é mais simples, são compostas por uma região interna hidrofóbica e por cadeias externas de polímero hidrofílicas. (JONES, 1999; KUMAR, 2000; DAI, 2010; YANG, 2010; GÂRLEA, 2010). Uma ampla variedade de polímeros vem sendo utilizados para a preparação de nanopartículas poliméricas, podendo estes ser naturais como quitosana e gelatina, (LIU, 2005; LIU, 2008; MOTWANI, 2008; SANTANDER-ORTEGA, 2010) ou sintéticos como poli(epsilon-caprolactona) (PCL), poli(D,L-lactídeo) (PLA) e poli(etilenoglicol) (PEG) (MORA-HUERTAS e col., 2010).

As formulações de nanopartículas poliméricas podem ser preparadas por diferentes métodos como polimerização *in situ* de monômeros dispersos (GALLARDO e col., 1993), ou por precipitação de polímeros pré-formados como emulsificação-difusão (QUINTANAR-GUERRERO e col., 1998), nanoprecipitação e deposição interfacial de polímero (FESSI e col., 1989). Este último é largamente utilizado para a obtenção de nanocápsulas poliméricas, pois é simples de ser executável, é reprodutível e aplicável a diversos polímeros. O método consiste em dissolver o polímero, um óleo, um tensoativo e a substância ativa em um solvente orgânico miscível em água. Essa fase orgânica é injetada em uma fase aquosa contendo um tensoativo ou um estabilizador. As nanocápsulas são originadas espontaneamente pela rápida difusão do solvente orgânico na fase aquosa abandonando os materiais pouco solúveis na fase aquosa que se auto-estruturam como uma fase dispersa. O solvente orgânico é posteriormente eliminado da formulação, que é também concentrada em evaporador rotativo sob pressão

reduzida. Este método produz nanocápsulas com elevada eficiência de encapsulação de fármacos lipofílicos.

Ao escolher a técnica deve-se considerar que esta, assim como a composição quali-quantitativa dos sistemas (natureza e concentração do polímero, do tensoativo e do núcleo oleoso) podem alterar as características físico-químicas do sistema e do mesmo modo influenciar a ação *in vivo* da substância ativa (MU e col., 2004; JÄGER e col., 2009). A morfologia, tamanho e a estrutura das nanopartículas podem ser caracterizadas por técnicas como microscopia eletrônica de varredura MEV e de transmissão (MET) (SCHAFFAZICK e col., 2003). A associação da microscopia eletrônica de transmissão com a criofratura também é bastante útil (COUVREUR e col., 2002).

Rollot e col. (1986) prepararam nanocápsulas utilizando o polímero poli(cianoacrilato de iso-butila) e Miglyol 812<sup>®</sup> como núcleo oleoso, e as submetem à criofratura e analisaram por MET onde observaram uma fina (cerca de 5,0 nm) e irregular parede polimérica ao redor do núcleo oleoso. Mayer e col. (2002) observaram que em nanocápsulas com parede polimérica de menor espessura há maior permeabilidade das substâncias encapsuladas das nanocápsulas. Com a caracterização físico-química dos sistemas nanoparticulados pode-se conhecer a organização molecular destes sistemas, e o mecanismo de associação dos fármacos a nanopartículas (SCHAFFAZICK e col., 2003).

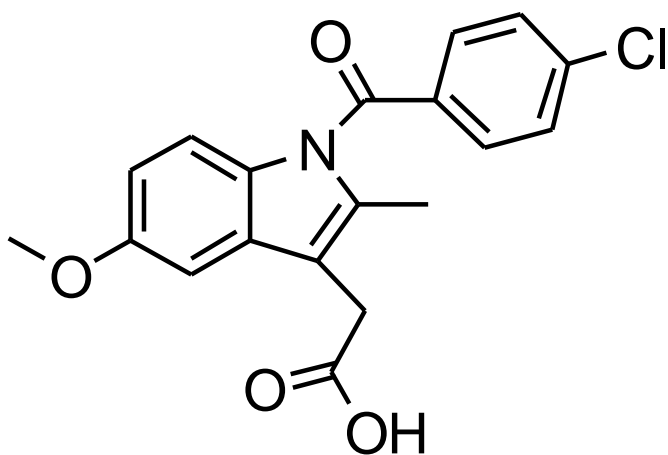
Alguns trabalhos relacionados com os fatores que influenciam na taxa de liberação de substâncias ativas já foram descritos na literatura por nosso grupo de pesquisa. Em todos esses estudos utilizou-se o éster etílico de indometacina (IndOEt) como modelo. A espessura da parede polimérica das nanocápsulas de núcleo lipídico teve uma influência significativa na liberação do IndOEt. A permeabilidade do IndOEt diminuiu com o aumento da concentração de polímero na suspensão de nanocápsulas (CRUZ e col., 2006a; POLETTTO e col., 2008). Jäger e colaboradores (2009) produziram nanocápsulas de núcleo lipídico compostas de monoestearato de sorbitano e triacilglicerol dos ácidos cáprico e caprílico e investigaram a influência da variação da concentração dos componentes do núcleo lipídico na liberação do IndOEt. Os autores observaram que aumentando a

concentração de monoestearato de sorbitano ocorreu um aumento na viscosidade do núcleo lipídico, conseqüentemente, diminuindo a permeabilidade. Entretanto, o aumento na concentração de óleo resultou na diminuição da área superficial sem alterar a permeabilidade da substância ativa.

## 2.2. Fármacos modelo

### 2.2.1. Indometacina

A indometacina (INDOH) (Figura 1), que possui massa molar de  $357,77 \text{ g.mol}^{-1}$ , é um anti-inflamatório não esteroidal (AINE), derivado do ácido indolacético. Possui ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética. Apesar de potente, o INDOH não é um fármaco de primeira escolha devido à toxicidade que apresenta, principalmente, gastrointestinal, sendo utilizado somente em doenças inflamatórias severas, como inflamações reumáticas, após a exclusão de outras alternativas (REYNOLDS, 1993).



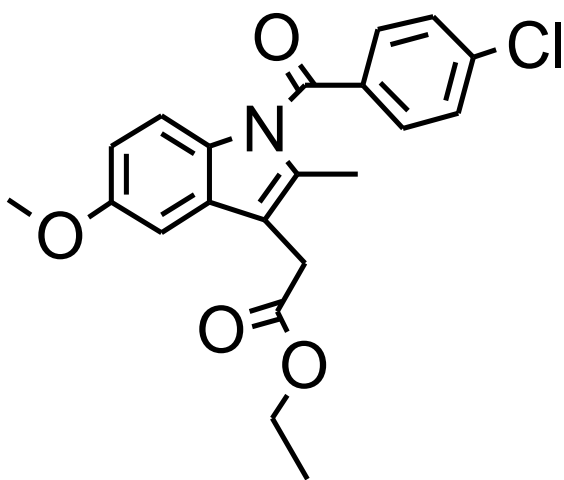
**Figura 1. Estrutura química da indometacina.**

A ação anti-inflamatória da indometacina ocorre pela inibição da COX-1 e da COX-2 (enzimas cicloxigenases) e, também, pela inibição da migração de neutrófilos (JACOBS & BIJLSMA, 1997; PESKAR, 2001; EL-GAMAL, 2010). Devido à inibição da COX-1, a INDOH pode gerar efeitos adversos graves, que são dose-dependentes, e variam com a forma farmacêutica utilizada para a administração (TIRKKONEN & PARONEN, 1993). Visando diminuir os efeitos adversos e tornar a ação do fármaco mais eficaz, diferentes estratégias têm sido estudadas, como, a

derivatização, por meio de esterificação ou amidação de seu grupamento ácido (BONINA e col., 1997; KALGUTKAR e col., 2000, SOARES, 2003) e, também, a incorporação da indometacina a sistemas carreadores, como micropartículas nanorrevestidas (DOMINGUES e col., 2008), microesferas lipídicas (SRINATH E DIWAN, 1998) e nanopartículas poliméricas (AMMOURY e col., 1990; AMMOURY e col., 1993; RAFFIN e col., 2003; BERNARDI e col., 2008; BERNARDI e col., 2009a; BERNARDI e col., 2009b).

### 2.2.2. Éster etílico de indometacina

Uma das estratégias utilizadas para a diminuição dos efeitos adversos da indometacina, foi a sua esterificação, realizada por Kalgutkar e col. (2000), produzindo o éster etílico de indometacina (INDOET) (Figura 2), possui massa molar de  $385,77 \text{ g.mol}^{-1}$ . Esta modificação aumentou a seletividade pela COX-2 e diminuiu os efeitos adversos gastrointestinais.



**Figura 2. Estrutura química do éster etílico de indometacina.**

Além de diminuir os efeitos adversos da INDOH, o INDOET é mais lipofílico, sendo um pró-fármaco promissor para ser utilizado na produção de nanocápsulas (POHLMANN e col., 2004). Bernardi e col. (2008) produziram nanocápsulas de INDOET e avaliaram sua atividade citotóxica em células de glioma, verificando a

morte celular em concentração de 25 $\mu$ M, sem danificar as células organotípicas, indicando seletividade dessa formulação.

### 2.2.3. Diclofenaco

O diclofenaco ácido (DICOH) (Figura 3), com massa molar de 296,14 g.mol<sup>-1</sup>, um derivado do ácido fenilacético, também é classificado como um AINE com ação antiinflamatória, analgésica e antipirética. É comercializado, em diversas formas farmacêuticas, na forma de sal, sódico (DICONa) (Figura 4), com massa molar de 319,14 g.mol<sup>-1</sup>, potássico (INSEL, 1990; OBERLE e col., 1994; ROBERTS II e MORROW, 2001). Como vários AINES, seus principais efeitos adversos ocorrem no trato gastrointestinal, como irritação, ulceração, dano à mucosa e perfuração, gerando limitação do seu uso (KOUROUNAKIS, 2000). Para reduzir esses efeitos várias estratégias têm sido descritas na literatura, entre estas estratégias, podem-se citar a complexação com ciclodextrinas (Lin, 1994), a nanoencapsulação (GUTERRES e col., 1995; MÜLLER e col., 2001), o desenvolvimento de formas farmacêuticas de ação modificada (GONZÁLEZ-RODRIGUEZ, 2003), nanorrevestimento (BECK e col., 2006), entre outras.

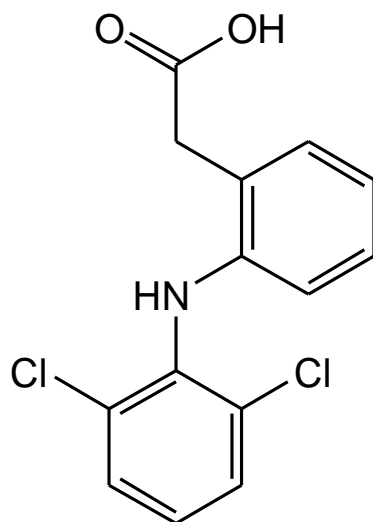
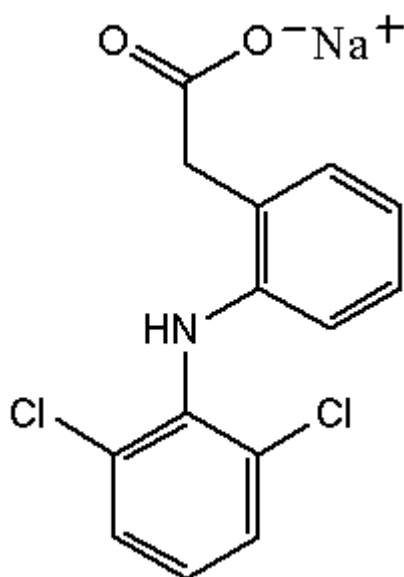


Figura 3. Estrutura química do diclofenaco ácido.



**Figura 4. Estrutura química do diclofenaco sódico.**

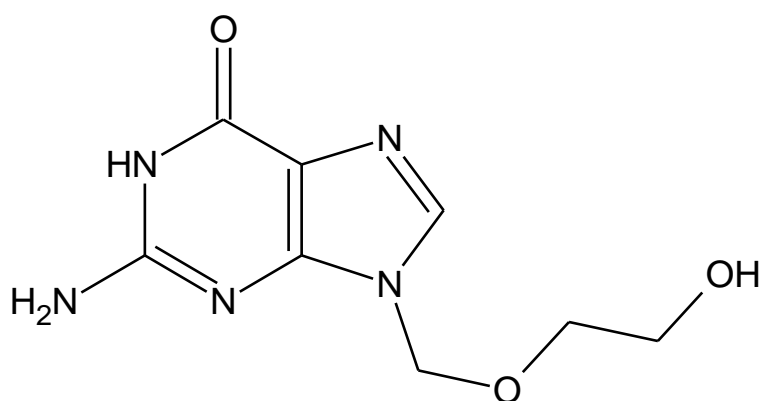
Em 1995, Guterres e col. avaliaram a incorporação do diclofenaco ácido em nanocápsulas de poli(ácido láctico), visando melhorar a tolerância gastrointestinal do fármaco após administração oral e intravenosa. Os autores demonstraram uma significativa capacidade de redução na toxicidade sobre a mucosa gastrointestinal quando o fármaco está associado às nanocápsulas, quando comparada a uma solução aquosa do sal do fármaco, apresentando concentrações plasmáticas similares. Porém, esse efeito protetor foi evidenciado somente no caso da administração oral, demonstrando que sua ação é decorrente da diminuição do efeito lesivo pelo contato direto do fármaco com a mucosa. Em outro estudo (GUTERRES, 2001) demonstrou-se a manutenção dos efeitos protetores sobre a mucosa gástrica dos produtos secos contendo nanocápsulas de diclofenaco, utilizando como comparação dados anteriores obtidos com suspensões de nanocápsulas. Ainda, foi demonstrada a completa absorção do diclofenaco a partir dos produtos secos, observando um perfil plasmático diferenciado, comparado ao obtido pela administração de uma solução aquosa do diclofenaco sódico. Schaffazick e col. (2002) avaliaram a utilização da liofilização na secagem de nanocápsulas e nanoesferas de poli(epsilon-caprolactona) e Eudragit S90®, para a obtenção de produtos secos e o efeito protetor destes liofilizados sobre a mucosa gastrointestinal. No estudo, demonstrou-se a potencialidade do uso da liofilização



para sistemas coloidais poliméricos. Quanto à toxicidade gastrointestinal, observou-se que os liofilizados contendo nanocápsulas de diclofenaco exerceram um efeito protetor significativo sobre a mucosa gastrointestinal de ratos, em comparação aos efeitos apresentados pela administração da solução aquosa do fármaco. Um efeito protetor similar (LIM, 2002) já havia sido relatado para a suspensão de nanocápsulas e nanoesferas de diclofenaco, bem como para os respectivos produtos secos (GUTERRES e col., 1995; THIES, 1996).

#### 2.2.4. Aciclovir

O aciclovir (ACV) (Figura 5), com massa molar de  $225,21 \text{ g.mol}^{-1}$ , é um nucleosídeo, análogo sintético da 2-deoxiguanosina. É largamente utilizado no tratamento de infecções virais por ser um potente e altamente seletivo inibidor da replicação do herpes vírus, incluindo herpes vírus simples tipo 1 (HSV-1) e o tipo 2 (HSV-2), varicela-zoster, Epstein-Barr e citomegalovírus tanto em humanos quanto em animais (O'BRIEN e CAMPOLI-RICHARDS, 1989; WAGSTAFF e col., 1994; KIM e col., 1998a; PÉRIGAUD e col., 1999). Esse fármaco exerce sua ação atravessando a membrana celular, pois o vírus está hospedado no compartimento intracelular, onde inibe a replicação do DNA viral.



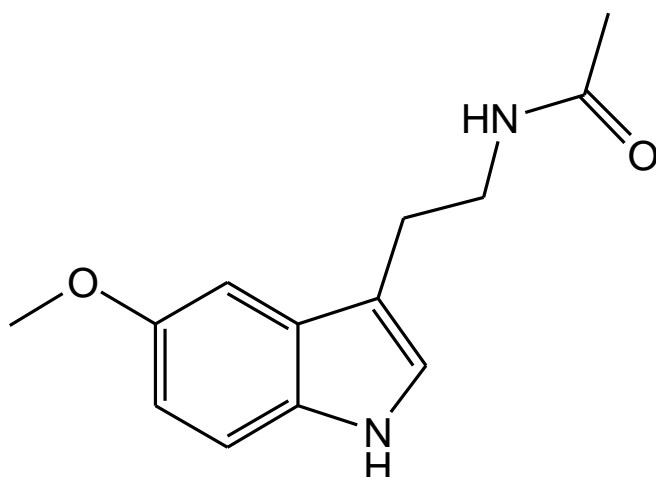
**Figura 5. Estrutura química do aciclovir.**

Jalón e col. (2001) produziram micropartículas contendo aciclovir para administração cutânea, via em que o fármaco tem uma absorção baixa (VOLPATO e col., 1995), e compararam com uma solução aquosa do fármaco. Os autores verificaram que após 88h a concentração de ACV liberado das micropartículas na membrana basal da epiderme da pele de porco foi 3,45 vezes maior que a do

fármaco em solução, podendo essa ser uma alternativa para liberação retardada do fármaco, diminuindo o intervalo entre as doses. Entretanto a liberação do fármaco apresentou um burst de 80% em pH 7,4, o que é esperado, conforme estudos anteriores (GENTA, 1997), que demonstraram um baixo percentual de encapsulamento do ACV nos sistemas coloidais. Para modular a associação do aciclovir nos sistemas coloidais poliméricos utilizam-se diferentes estratégias, como por exemplo a complexação do fármaco com derivados de ciclodextrina (CAVALLI, 2009; ZIELENKIEWICZ, 2010).

### 2.2.5. Melatonina

A melatonina (MEL) (Figura 6) é uma indolamina de massa molar 232,28 g.mol<sup>-1</sup>, é um hormônio natural, produzida principalmente pela glândula pituitária (BARRENETXE e col., 2004), a partir da serotonina, isolada na década de 1950, pelo dermatologista Aaron Lerner (CLAUSTRAT e col., 2005). Ela é secretada durante a fase escura do dia. Em adultos jovens a concentração de hormônio durante o dia está abaixo de 10 pg/mL e durante a noite sua concentração endógena média plasmática é de cerca de 50 a 70 pg mL<sup>-1</sup> (BÉNÈS e col., 1997; HOFFMANN e col., 1998; RANG e col., 2001; BARRENETXE e col., 2004).



**Figura 6. Estrutura química da melatonina.**

Há vários estudos para elucidar os processos fisiológicos controlados pela melatonina. Atualmente sabe-se que é responsável por importantes funções como regulação do ritmo circadiano, humor, sono, envelhecimento e reprodução

(EPSTEIN, 1997; REITER e col., 2002). A biossíntese de melatonina pode ser diminuída pelo uso inapropriado da luz (REITER, 2003). A utilização desse fármaco tornou-se bastante disseminada e tem sido usado como suplemento alimentar, mas também sendo prescrito (ARENDR, 2003).

A melatonina tem sido estudada para o tratamento de doenças em diversas áreas (GARCÍA-PATTERSON e col., 1996; BRZEZINSKI, 1997; EBADI e col., 1998; HOFFMANN e col., 1998; ESQUIFINO e col., 2004; BOUTIN e col., 2005; HARDELAND e col., 2006). Quando administrada por via oral, a melatonina possui meia-vida curta e baixa e variada biodisponibilidade (BÉNÈS e col., 1997; BARRENETXE e col., 2004), em função destas características a melatonina não é adequada para a incorporação de formas farmacêuticas convencionais (LEE e col., 1999; EL-GYBALI e col., 2003).

Microcápsulas de quitosana contendo melatonina foram produzidas por El-Gyballi (2002) e apresentaram percentual de encapsulamento que variou de 31-59% conforme a composição da formulação. Dubey e col. (2006) prepararam lipossomas contendo melatonina e verificaram percentual de encapsulação máximo de 67% mesmo variando a concentração do fármaco, 0,1-2%(m/m), sendo que nas concentrações de 1,2-2% (m/m) verificou-se a presença de cristais de melatonina.

Schaffazick e col. (2005) produziram suspensões de nanocápsulas contendo melatonina ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e avaliaram a influência do polímero, do óleo e do tensoativo nas características do sistema. O polímero foi o parâmetro que mais influenciou no percentual de encapsulamento, que variou de 37-56%, PCL-Eudragit S100<sup>®</sup>, respectivamente. Também neste estudo, na formulação que apresentou o maior percentual de encapsulamento (utilizando Eudragit S100<sup>®</sup> como polímero) foi feita a secagem por aspersão, visando aumentar a estabilidade física. O pó manteve-se estável por mais de 12 meses. Apresentou percentual de encapsulamento de 93% e permitiu o controle da liberação da melatonina, o que foi demonstrado em comparação ao fármaco puro.

### 2.2.6. Metotrexato

O metotrexato (MTX) (Figura 7) com massa molar de  $454,54 \text{ g.mol}^{-1}$ , também chamado de ametopterina, é um antagonista do ácido fólico que age inibindo competitivamente a enzima dihidrofolato redutase, bloqueando seus sítios catalíticos, dessa forma, reduzindo os níveis intracelulares de tetrahidrofolatos interrompendo a síntese de purinas, timidinas e outros aminoácidos afetando a síntese do DNA, RNA e a replicação celular (ZENG e col., 2001; SCHRODER E STEIN, 2003; VEZMAR e col., 2003). Como o crescimento das células tumorais é mais rápido do que o das células da maioria dos tecidos normais, elas têm uma maior necessidade de nucleotídeos para a síntese do DNA e RNA. Assim, as células tumorais mostram-se mais sensíveis aos inibidores da biossíntese de nucleotídeos (MIQUEL e col., 1980).

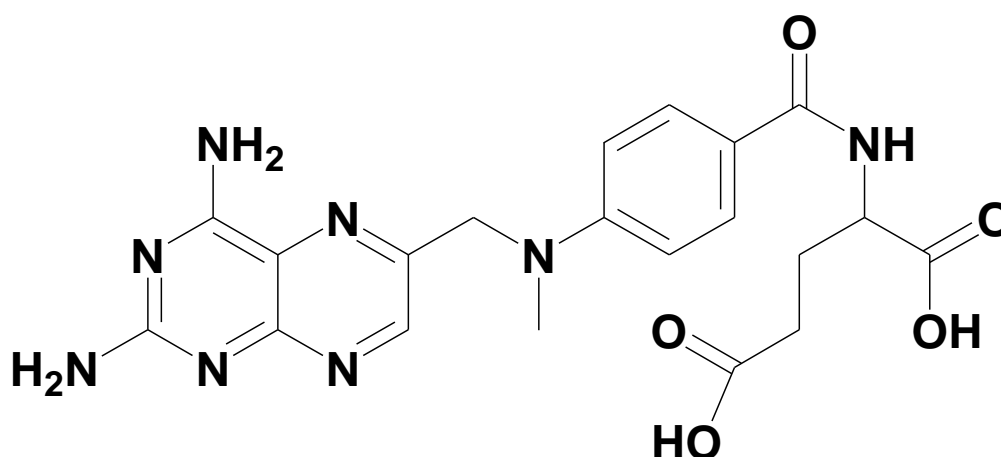


Figura 7. Estrutura química do metotrexato.

Devido a sua atividade citotóxica e imunossupressora, o MTX é utilizado desde 1940 no tratamento de tumores sólidos, leucemias e, mais recentemente, como um agente imunossupressor em transplantes de órgãos e no tratamento de doenças auto-imunes, tais como psoríase, lúpus eritematoso sistêmico e reumatismo, sendo nesta, um agente modificador da doença (ARMD) de primeira escolha (SMOLENSKA e col., 1999; BERTINO, 2000; RUBINO, 2001; RUIZ-IRASTORZA e col., 2001; CHAN E CRONSTEIN, 2002; STAMP e col., 2006). Baixas concentrações de metotrexato são usadas para exercer pressão seletiva favorecendo a proliferação das células hospedeiras obtidas por engenharia

recombinante, para o excesso da expressão da dihidrofolato redutase (KIM e col., 1998b).

As vias de administração do metotrexato são a oral, intramuscular, subcutânea, intravenosa e intratecal (SCHRODER E STEIN, 2003). A via dérmica é limitada pelas características do MTX, que se apresenta majoritariamente dissociado no pH fisiológico. A absorção oral varia com a dose. Doses menores são rapidamente absorvidas. No entanto, em doses maiores a absorção é irregular e por isso, a biodisponibilidade é variada (12-77%). A absorção pela via subcutânea é completa e pela via intramuscular há variação de 75 à 100% na biodisponibilidade. Após a administração intravenosa ou intramuscular as concentrações séricas máximas ocorrem 0,5 à 2 horas e diminuem rapidamente, 1 à 4 horas após a administração oral e 2 horas após administração intratecal (MADDEN E EATON, 1995; CALABRESI E CHABNER, 1991). A eliminação ocorre majoritariamente pela via renal (90%) (TAKEDA e col., 2002; SCHRODER E STEIN, 2003).

O uso contínuo desse fármaco pode desenvolver lesões na medula óssea e no intestino, como leucopenia, aplasia da medula óssea, enterocolites graves, perda de peso, anorexia e atrofia intestinal (CALABRESI E CHABNER, 1991; MIHRANIAN, 1984; GROSSIE, 1982). Também podem ocorrer lesões hepáticas e toxicidade pulmonar. Devido ao risco potencial de efeitos adversos os pacientes em tratamento com MTX fazem acompanhamento regular (exames) da função renal e hepática, além de hemograma (SCHNABEL E GROSS, 1994).

O metotrexato é um fármaco com massa molecular alta em comparação a outros fármacos, apresentando baixa lipossolubilidade. Desta forma, necessita ser transportado através do carregador de folato reduzido para alcançar o citoplasma das células. Em concentrações extracelulares altas, pode atravessar as membranas celulares por difusão (SPINELLA e col., 1996; ZENG e col., 2001; SCHRODER E STEIN, 2003). Quando dentro da célula, onde exerce sua ação, o MTX é poliglutamado pela folil-poliglutamato sintetase. Até quatro moléculas de glutamato podem ser adicionados ao fármaco. A enzima  $\gamma$ -glutamil-hidrolase, também presente nas células, remove os glutamatos e o MTX é removido das células por proteínas de resistência a múltiplos fármacos (KENNEDY e col., 1985; JOLIVET e col., 1987).

Por todos esses aspectos nos últimos anos, vem sendo investigada a utilização de nanocarreadores para a incorporação do MTX com objetivos de melhorar a resposta farmacológica e minimizar os efeitos adversos desse fármaco. Nanopartículas de gelatina e poli(metametilacrilato) (PMMA) contendo MTX foram produzidas por Cascone e col. (2002) através de uma técnica baseada na simples emulsão água/óleo. Os autores observaram uma percentagem de encapsulamento baixa, variando de 5 a 15%, dependendo da concentração MTX/gelatina (w/w). O teor de fármaco foi analisado por um método direto, em que 10 mg de nanopartículas foram adicionado em 20 mL de diclorometano após a completa dissolução o MTX foi quantificado por espectrofotometria. O percentual de encapsulamento foi determinado por um método indireto, no qual, 10 mg de nanopartículas foram suspensos em 10 mL de etanol centrifugado por 10 minutos e o sobrenadante quantificado por espectrofotometria. Os autores consideram que, como a gelatina é pouco solúvel em etanol a concentração de MTX no sobrenadante encontra-se na superfície das nanopartículas.

Lipossomas deformáveis para a administração dérmica de MTX foram produzidos por Trotta e col. (2004), tendo como matérias-primas Epikuron 200, lecitina hidrogenada e glicirrizinato de potássio para a formação das partículas. A associação do fármaco nos lipossomas variou de 20%, nos que continham apenas lecitina hidrogenada, até 33%, para os que foram produzidos utilizando Epikuron 200: glicirrizinato de potássio na proporção 2:1. Kukowska-Latallo e col. (2005) examinaram a eficácia de dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) conjugados com ácido fólico e acoplados covalentemente com MTX ou marcadores fluorescentes. Estes sistemas foram comparados com o fármaco livre e com o polímero sem ácido fólico. Os resultados mostraram que os polímeros conjugados com MTX aumentaram a atividade antitumoral e diminuíram significativamente a toxicidade sistêmica em relação ao fármaco livre em igual dose cumulativa.

No trabalho de Sartori (2007) foram produzidas nanocápsulas e nanoesferas de poli(D,L-lactídeo) (PLA) e de poli(D,L-lactídeo)-*b*-poli(etilenoglicol) (PLA-PEG) contendo metotrexato sódico com o objetivo de avaliar a viabilidade da administração ocular desse fármaco nas concentrações de 0,25 mg/mL. Os

resultados mostraram baixo percentual de encapsulamento nas nanocápsulas (20-25%). Na tentativa de aumentar o encapsulamento, a fase aquosa foi acidificada para um pH de 3,0, mas os resultados não foram superiores. Enquanto o encapsulamento do fármaco em nanoesferas ficou entre 40-42%. O baixo encapsulamento do metotrexato sódico nas nanoestruturas pode ser explicado pela alta afinidade deste pela fase contínua. A partir desses resultados, as nanoesferas foram selecionadas para a avaliação do uso da via ocular tópica. As nanoesferas contendo MTX não causaram lesões significativas ao epitélio corneal, demonstrando a viabilidade desta estratégia para a administração do fármaco. Nanopartículas de metotrexato conjugadas com ouro foram sintetizadas por Chen e col. (2007). Nos testes *in vitro* e *in vivo* as nanopartículas demonstraram ter alta afinidade pelas células cancerígenas exercendo alta atividade antitumoral.

Por outro lado, no trabalho desenvolvido por Seo e col. (2009) foram produzidas micelas poliméricas utilizando metoxi-polietileno-glicol (MPEG) enxertado à quitosana (ChitoPEG), as quais o MTX foi incorporado. Essas partículas apresentaram baixo teor de fármaco em relação ao peso teórico, variando de 6 a 24%. O percentual de encapsulamento variou de 65 a 94% conforme a proporção de ChitoPEG/MTX, 50/5, 50/10 50/20 (mg/mg) e, também conforme o grau de substituição do MPEG com quitosana. Sendo que o maior percentual de encapsulamento (94%) foi obtido na proporção 50/5 (mg/mg) com o menor grau de substituição do polímero de 2,5 ( $M_w = 17.000$ ) e a quantidade de fármaco associada foi de 8% (w/w). O menor percentual (65%) foi obtido na proporção 50/5 (mg/mg) no maior grau de substituição do MPEG de 11,5 ( $M_w = 44.600$ ) e a quantidade de fármaco associada foi de 6% (w/w). A maior quantidade de fármaco associada, 24%, foi obtida utilizando a proporção ChitoPEG/MTX 50/20 (mg/mg) com um grau de substituição de 7,3 ( $M_w = 29.000$ ), com percentual de encapsulamento de 78%. A quantidade de fármaco associada foi medida através da razão percentual entre a quantidade de MTX pelo peso das nanopartículas. O percentual de encapsulamento foi medido pela razão percentual entre a concentração quantificada e a teórica. Ao avaliar a eficácia dessas partículas frente a células de melanoma, verificou-se que estas possuem menor toxicidade quando a dose foi menor do que 0,1 $\mu$ g/mL em relação ao MTX livre e toxicidade semelhante nas doses acima de 1 $\mu$ g/mL.

### 2.4. Determinação da partição de fármacos

Nas suspensões de nanocápsulas o fármaco pode estar dissolvido ou disperso no núcleo lipídico, adsorvido na parede polimérica, ou, ainda, particionado entre as pseudo-fases do sistema (partícula, interface e fase contínua) ou, no caso de não apresentar afinidade pela fase dispersa, pode encontrar-se totalmente dissolvido na fase aquosa ou na forma de nanocristais (agregados coloidais) (CRUZ e col., 2006a). É fundamental saber a concentração total de fármaco e a sua concentração encapsulada nos sistemas nanoparticulados para prever o comportamento físico-químico e biológico da formulação. No entanto, a determinação da quantidade de fármaco encapsulada é complexa, devido às características das nanopartículas.

Uma técnica muito utilizada para a determinação da concentração de fármaco livre é a ultrafiltração-centrifugação, na qual a substância ativa livre é determinada no ultrafiltrado. A concentração total de fármaco é determinada após a completa dissolução/extração das nanopartículas em um solvente apropriado por técnicas espectroscópicas, envolvendo separação ou não da matriz. O percentual de encapsulamento do fármaco nas nanocápsulas é determinado em função da diferença entre a sua concentração total e a sua concentração livre. Esta técnica, entretanto apresenta limitações, pois, se houver nanocristais, estes, podem ser maiores que o poro da membrana filtrante (10KDA) gerando percentual de encapsulamento errôneo (LOSA e col., 1993; GUTERRES e col., 1995; POHLMANN e col., 2008).

Outra técnica que pode ser usada para essa finalidade é a ultracentrifugação, na qual após a centrifugação da suspensão a concentração de fármaco livre é determinada no sobrenadante (MARCHAL-HEUSSLER e col., 1990). O teor total de fármaco é determinado pela completa dissolução das nanopartículas em solvente adequado. Da forma que a técnica anterior, a quantidade de fármaco associado às nanoestruturas é calculada pela diferença entre as concentrações de fármaco total e livre (SCHAFFAZICK e col., 2003). Para a avaliação de nanopartículas sólidas, o percentual de encapsulamento é avaliado pela diferença entre o total da substância



ativa adicionada na formulação pela concentração total quantificada do mesmo (multiplicado por 100).

As técnicas anteriores são utilizadas para a determinação do percentual de encapsulamento. Para a determinação da forma como os fármacos estão associados nas suspensões são utilizadas diversas técnicas, como a calorimetria diferencial exploratória (DSC) e a termogravimetria. Também é bastante elucidativo a utilização de técnicas combinadas, como a difração de raios-X, estudos de adsorção do fármaco às nanopartículas, e o uso de sondas fluorescentes (SOPPIMATH e col., 2001; SCHAFFAZICK e col., 2003).

Calvo e col. (1996) utilizando as técnicas de calorimetria diferencial exploratória e difração de raios-X, demonstraram que a indometacina encontra-se molecularmente dispersa na matriz polimérica das nanoesferas e nanocápsulas de PCL. Por essas mesmas técnicas Kulkarni e col. (2000) constataram que o diclofenaco sódico está molecularmente disperso em nanocápsulas preparadas com uréia-formaldeído. Stella e col. (2007) prepararam nanoesferas e nanocápsulas contendo derivados lipofílicos da gencitabina e, após a produção das nanopartículas o pró-fármaco que apresentou maior percentual de encapsulamento, estearilgencitabina foi analisado, por DSC, para verificar a sua localização nas nanopartículas. Com a diminuição da temperatura e da entalpia de fusão de 47,41 °C e 66,93 J.g<sup>-1</sup> nas nanoesferas brancas para 46,51 °C e 54,85 J.g<sup>-1</sup> nas formulações contendo o pró-fármaco. E, de 46,55 °C e 39,39 J.g<sup>-1</sup> nas nanocápsulas brancas para 45,17 °C e 37,74 J.g<sup>-1</sup> e contendo estearilgencitabina, verificou-se que este está associado às nanopartículas. Hammady e col. (2009) demonstraram através da técnica de DSC, que o ácido retinóico (RA) está molecularmente disperso na matriz polimérica de nanoesferas de PCL e a presença de cristalóides de RA na superfície das nanoesferas de PLA, o que também foi confirmado pela microscopia de força atômica.

Jaiswal e col. (2004) verificaram a associação da ciclosporina à nanopartículas poliméricas também utilizando a técnica de DSC. Para estudar a forma de associação da ciclosporina A em nanoesferas sensíveis ao pH preparadas com diversos copolímeros do poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metila). DAI e

col. (2004) utilizaram difração e espectroscopia de raios-X, constatando que a ciclosporina A encontra-se molecularmente dispersa na matriz polimérica das nanoesferas e, também, está presente na superfície.

Guterres e col. (1995) verificaram redução no teor de diclofenaco (ácido livre) em formulações de nanocápsulas contendo  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  de fármaco após um período de estocagem de 30 dias. Essa redução não foi verificada para formulações contendo  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Dessa forma, os autores sugeriram que essa redução ocorreu devido à formação de nanocristais porque a concentração de fármaco teria excedido sua saturação. Para confirmar essa hipótese, Pohlmann e col. (2008) prepararam nanocápsulas com diferentes concentrações de indometacina ( $0, 1$  e  $3 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e avaliaram seu comportamento por espalhamento de luz estático, determinando a razão de Rayleigh das formulações em função do tempo. Os resultados mostraram que ocorreu a formação concomitante de nanocristais e nanocápsulas apenas na formulação contendo  $3 \text{ mg mL}^{-1}$  de indometacina devido à saturação do fármaco na fase dispersa e sua baixa solubilidade na fase aquosa. Os nanocristais se aglomeraram e precipitaram em função do tempo. Desta forma, uma análise por cromatografia líquida de alta eficiência da variação da concentração de fármaco em função do tempo de armazenamento comparando-se uma amostra agitada e outra parada corroborou o resultado da análise por espalhamento de luz.

O perfil de liberação também pode indicar a partição do fármaco nas nanopartículas. Ferranti e col. (1999) avaliaram o perfil de liberação *in vitro* de nanocápsulas de PCL contendo primidona e álcool benzílico como núcleo oleoso. As amostras de nanocápsulas e solução padrão de primidona em álcool benzílico (controle) foram colocadas em meio gástrico e meio intestinal simulados (pH 1,25 e pH 7,4, respectivamente). Toda a primidona contida na solução controle foi liberada em 8 horas. Nesse mesmo tempo,  $76,0 \pm 1,4 \%$  (pH 7,4) e  $83,0 \pm 4,5 \%$  (pH 1,25) de primidona foi liberado das nanocápsulas. A quantidade de primidona liberada das nanocápsulas foi significativamente menor em comparação ao controle, sugerindo que ocorra uma interação entre o fármaco e o polímero. Como ocorreu uma rápida liberação do fármaco na primeira hora, os autores sugeriram que uma parte da primidona estaria adsorvida na superfície das nanocápsulas. Suspensões

nanoestruturadas foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, o fármaco foi adicionado antes da formação das nanopartículas (incorporação) ou após a preparação das mesmas (incubação). Ocorreu uma liberação rápida e total do fármaco a partir das formulações obtidas por incubação e liberação de 80% e de 90% a partir das nanopartículas preparadas por incorporação. Desta forma, os autores consideraram que a adsorção na superfície das nanopartículas é o mecanismo preferencial de incorporação do fármaco (LOPES e col., 2000).

Pohlmann e col. (2004) avaliaram a influência da localização do fármaco (núcleo lipídico e/ou parede polimérica) na nanocápsula sobre a sua taxa de liberação. Neste trabalho foram empregados a indometacina (IndOH) e IndOEt como modelos de fármacos encapsulados em nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas com poli(epsilon-caprolactona). A hidrólise alcalina interfacial foi utilizada como método para simular uma condição *sink* perfeita. O consumo total da indometacina presente nas nanocápsulas foi de 2 minutos, enquanto que para o éster etílico de indometacina foi de 1440 minutos (24 horas). O consumo do éster foi dependente de sua difusão do interior das nanocápsulas para a interface partícula/água, e o consumo da indometacina foi devido à hidrólise alcalina em solução após sua rápida desorção da parede polimérica da nanocápsula. Outros estudos foram desenvolvidos para avaliar a diferença no perfil de liberação de diferentes nanoestruturas (nanocápsulas, nanoemulsões e nanoesferas) utilizando IndOH e IndOEt como modelos (CRUZ e col., 2006a). Observou-se que o perfil cinético foi similar quando o fármaco (IndOH) foi ensaiado, indicando que este está adsorvido nos nanocarreadores, enquanto que o perfil de liberação do IndOEt mostrou cinética de liberação prolongada e sustentada indicando sua localização no núcleo das nanocápsulas. O metotrexato, alvo de estudo deste trabalho ainda não tem sua partição determinada em formulações de nanocápsulas.

### **2.5. Modificação estrutural em fármacos para aumentar a lipofilia**

Uma estratégia que pode ser utilizada para aumentar a lipofilia de fármacos e assim, aumentar a afinidade destes com a fase lipídica das nanocápsulas é a modificação estrutural, através de derivatizações, formando pró-fármacos. Em nosso grupo de pesquisa, foi realizada a síntese do éster etílico de indometacina obtendo

assim, um pró-fármaco com alta lipossolubilidade. Este encontra presente majoritariamente no núcleo nas nanocápsulas de núcleo lipídico (SOARES, 2003; POHLMANN e col., 2004).

Stella e col. (2007) produziram derivados lipofílicos de gencitabina, modificando o LogD de, -1,24 da gencitabina para, 1,1 para o derivado valerilgencitabina, 4,74 para o laurilgencitabina e 7,91 do derivado estearilgencitabina, obtendo 67 e 100% de encapsulamento para as nanoesferas e nanocápsulas produzidas com laurilgencitabina, respectivamente e 100% de encapsulamento nas nanoesferas e nanocápsulas produzidas com estearilgencitabina.

Wang e col. (2009) produziram nanopartículas de lipídeos sólidos, carreadores lipídicos nanoestruturados e emulsão lipídica contendo buprenorfina e derivados lipofílicos para administração intravenosa. A buprenorfina possui logP de 2,03, enquanto seus derivados apresentaram log P de 4,98 (propionato de buprenorfina) ou acima, no caso do valerato e do enantato de buprenorfina o LogP foi muito alto, não tendo valor determinado, pois não foram detectados na fase aquosa. A elevada lipofilia dos derivados permitiu o encapsulamento dos mesmos.

O metotrexato é um fármaco com baixa solubilidade em óleo. Diferentes estratégias podem ser utilizados para a modificação na estrutura do metotrexato, entre elas a esterificação. Para encapsulá-lo em nanocarreadores várias estratégias já foram realizadas. Kaasgaard e col. (2009) sintetizaram dois derivados lipofílicos de metotrexato (C<sub>16</sub>-éster de MTX e C<sub>16</sub>-benzil éster de MTX) para incorporação em lipossomas. O derivado C<sub>16</sub>-benzil éster de MTX mostrou não ter atividade antitumoral e por isso, somente o derivado com atividade biológica, C<sub>16</sub>-éster de MTX, que demonstrou toxicidade similar ao MTX livre foi incorporado às nanopartículas.



### 3.1. Objetivo geral:

O objetivo deste trabalho é propor um algoritmo para a determinação e classificação da partição de fármacos, nas diferentes pseudo-fases das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico. Adicionalmente propõe-se realizar a esterificação do metotrexato e desenvolver formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo metotrexato e seu derivado com o objetivo de aumentar a lipofilia do fármaco e modificar sua distribuição nas pseudo-fases da suspensão coloidal.

### 3.2. Objetivos específicos:

- Sintetizar o éster etílico do metotrexato com o intuito de aumentar a lipofilia do fármaco.
- Preparar formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico, empregando-se poli(épsilon-caprolactona), monoestearato de sorbitano e mistura de triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (TCC) contendo diferentes fármacos.
- Preparar formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo o derivado diéster etílico de metotrexato.
- Caracterizar as formulações coloidais quanto à distribuição de tamanho, diâmetro médio, índice de polidispersão, teor dos fármacos, percentual de encapsulamento e pH.
- Determinar a concentração de saturação dos fármacos e pró-fármacos em água e na fase aquosa das suspensões coloidais.
- Determinar, utilizando a técnica de ultrafiltração-centrifugação, a concentração de fármaco/pró-fármaco no ultrafiltrado em diferentes diluições da suspensão em água.
- Verificar a concentração do derivado na fase contínua da suspensão através de ultrafiltração-centrifugação para classificar a formulação conforme o algoritmo gerado.

- Propor um algoritmo classificando as formulações conforme suas características de distribuição de diâmetro e percentual de fármaco na fase contínua após ultrafiltração-centrifugação.





### 4.1. Materiais

#### 4.1.1. Matérias-primas

- Poli(*epsilon*-caprolactona) (PCL)  $M_n = 42.500$  g/mol (Aldrich, França);
- Monoestearato de sorbitano (Span<sup>®</sup> 60) (Delaware - Brasil);
- Polissorbato 80 (Delaware - Brasil);
- Triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico (TCC) (Delaware - Brasil);
- Diclofenaco sódico (Galena - Brasil);
- Indometacina (Sigma - EUA);
- Melatonina (Sigma - EUA);
- Metotrexato  $C_{20}H_{22}N_8O_5$  (Pharma Nostra - Brasil);
- Aciclovir  $C_8H_{11}N_5O_3$  (São Paulo, Brasil);

#### 4.1.2. Aparelhos e equipamentos

*Laboratório de Micro - e Nanopartículas Aplicadas na Terapêutica, IQ/UFRGS:*

- Evaporador rotatório Büchi RE120 (Suíça);
- Placa de agitação magnética com 15 pontos Velp (Europa);
- Dispositivo de aquecimento e circulação de água, acoplado a termostato IKA EH4 (Alemanha);
- Potenciômetro Micronal B-474 (São Paulo, Brasil);
- Turbiscan LabExpert (Formulacion, Toulouse, França);
- Análise de cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada em equipamento Perkin Elmer S-200 com injetor S-200, detector UV-VIS;

- Microcentrífuga 1-14 (SIGMA - Alemanha)

*Grupo de pesquisa: Sistemas Nanoestruturados para a Administração de Fármacos, Faculdade de Farmácia/UFRGS, coordenado pela Profa. Dra. Sílvia S. Guterres:*

- Análises de espectroscopia de correlação de fótons foram realizadas utilizando um Zetasizer<sup>®</sup> Nanoseries, (Malvern, Reino Unido);
- Análises de difração a Laser foram realizadas utilizando um Mastersizer<sup>®</sup>, (Malvern, Reino Unido);

*Instituto de Química – UFRGS:*

- Aparelho para ponto de fusão PF-1000, GEHAKA<sup>®</sup>.
- Aparelho de RMN de <sup>1</sup>H (VARIAN<sup>®</sup> INOVA-300).

### **4.1.3. Solventes e Outros Materiais**

- Acetonitrila grau HPLC (Tedia - EUA)
- Metanol grau HPLC (Tedia - EUA)
- Metanol (Nuclear - Brasil)
- Acetona (Nuclear - Brasil)
- DMSO (Tedia - EUA)
- DMSO deuterado
- Água destilada
- Água Milli-Q (Destilador/deionizador Milliq-Q<sup>®</sup> - Millipore - EUA)
- Álcool etílico (Nuclear - Brasil)
- Ácido acético (Synth - Brasil)

- Ácido clorídrico (Nuclear - Brasil)
- Hidróxido de sódio (Merck – Alemanha)
- Diclorometano (Nuclear - Brasil)
- Clorofórmio (Nuclear - Brasil)
- Bicarbonato de sódio (Merck – Alemanha)
- 4-(*N, N*-dimetilamino)piridina (DMAP) (Sigma - EUA)
- Diciclohexilcarbodiimida (DCC) (Sigma - EUA)
- Acetato de etila (Quimex - Brasil)
- Ciclohexano (Quimex - Brasil)
- Membrana 0,45 µm (Millipore - EUA)
- MICROCON® Centrifugal Filter devices (10KDA). (Millipore – EUA)
- Sílica para enchimento de pré-coluna LiChrosorb RP-18 (Merck - Alemanha)
- Coluna Lichrosphere® 100 RP-18 (250 mm × 4 mm, 5 µm) (Merck - Alemanha) e pré-coluna (Merck - Alemanha);
- Coluna Spherisorb® ODS2, (150 mm x 4 mm, 4µm) (Waters, EUA) e pré-coluna SecurityGuardCartridges C18 phenomenex®.

Todos os produtos químicos e solventes empregados foram utilizados em grau farmacêutico. Todos os reagentes foram utilizados como fornecidos.

### 4.2. Métodos

#### 4.2.1. Preparação do éster etílico de indometacina

A síntese do INDOET foi realizada conforme já descrita por (KALGUTKAR e col., 2000; POHLMANN e col., 2004). Resumidamente, uma solução de indometacina em etanol foi adicionada de DMAP (catalisador). Após 10 minutos sob agitação magnética, DCC foi adicionado a 0 °C. A reação foi mantida a 25 °C por 20 horas. O produto foi isolado e purificado por coluna preparativa cromatográfica de sílica-gel e analisado por ponto de fusão.

#### 4.2.2. Preparação do diclofenaco ácido

Uma solução aquosa (400 mL) contendo diclofenaco sódico (3 g) foi acidificada com ácido clorídrico até turvar. O precipitado formado foi filtrado e cristalizado em etanol/água (1:1 v/v) (BECK e col., 2004). O produto foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho.

#### 4.2.3. Preparação do éster etílico de metotrexato

A esterificação do MTX foi realizada seguindo procedimentos convencionais já descritos na literatura, por Kalgutkar e col. (2000) e Soares (2003). Em uma solução etanólica, de 30 mL, contendo MTX (1,0 mmol) foi adicionado DMAP (0,04 mmol). A solução foi resfriada a 0 °C em um balão em atmosfera de argônio e, após 10 minutos, foi adicionado DCC (2,0 mmol). A reação permaneceu à temperatura de 0 °C por mais 30 minutos e após foi deixada à temperatura ambiente por mais 2 horas. Após esse período a temperatura foi aumentada para 40 °C e o sistema reacional foi mantido nessas condições durante aproximadamente 90 h. Alíquotas foram retiradas do meio reacional periodicamente para o acompanhamento da reação por cromatografia em camada delgada. Ao final da reação o excesso de solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O produto reacional foi dissolvido em diclorometano (30 mL) e filtrado para a retirada do subproduto (DCU). O filtrado foi lavado com solução aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 10 mL) e o precipitado de diciclohexiluréia foi descartado. A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e o solvente evaporado. O produto foi purificado através de coluna cromatográfica

de sílica-gel ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH, 99:1), levemente alcalinizada com hidróxido de amônio para a remoção de resíduos de MTX, do DMAP e dos subprodutos. O produto foi caracterizado por ponto de fusão e  $^1\text{H}$  RMN .

### 4.2.4. Preparação das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico

Nanocápsulas de núcleo lipídico foram preparadas conforme método descrito na literatura (FESSI e col., 1989; MÜLLER e col., 2001; JAGER e col., 2009). A fase orgânica foi preparada dissolvendo-se o fármaco (Tabela 1), 0,160 mL de mistura de triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico, 0,100 g de poli(epsilon-caprolactona) e 0,038 g de monoestearato de sorbitano (SPAN 60<sup>®</sup>) em 27 mL de acetona, à 40°C. A fase orgânica foi injetada na fase aquosa, contendo 0,077 g de polissorbato 80 dissolvidos em 53 mL de água MilliQ<sup>®</sup>. A suspensão permaneceu 10 minutos sob agitação, a 40°C. Após esse período, a acetona foi evaporada e a suspensão foi concentrada a 10 mL em evaporador rotatório sob pressão reduzida, a 40°C. A concentração utilizada dos fármacos em cada formulação está apresentada na Tabela 1. Os fármacos modelo foram adicionados em concentrações previamente descritas na literatura (GUTERRES e col., 1995; POHLMANN e col., 2004; POHLMANN e col., 2008; SARTORI, 2007).

Tabela 1. Concentração final dos fármacos nas formulações de NCL.

Fármaco	Concentração (mg mL <sup>-1</sup> )	Sigla
Éster etílico de indometacina	1,00	NC <sub>INDOEt1</sub>
	2,00	NC <sub>INDOEt2</sub>
Indometacina	1,00	NC <sub>INDOH1</sub>
	3,00	NC <sub>INDOH3</sub>
Diclofenaco ácido	1,00	NC <sub>DICOH1</sub>
	2,00	NC <sub>DICOH2</sub>
Diclofenaco sódico	1,00	NC <sub>DICONa1</sub>
Melatonina	0,50	NC <sub>MEL0,50</sub>
Metotrexato	0,25	NC <sub>MTX0,25</sub>
Aciclovir	0,40	NC <sub>ACV0,40</sub>
	0,25	NC <sub>MTX(OEt)20,25</sub>
Éster etílico de metotrexato	0,50	NC <sub>MTX(OEt)20,5</sub>

#### 4.2.5. Distribuição de tamanho, tamanho médio, polidispersão, Diâmetro médio, índice de polidispersão das NCL

Inicialmente foi analisada a distribuição de tamanho de partículas por difração de laser em Mastersizer, obtendo-se tamanhos de partículas por volume e o valor de tamanho médio, obtido pelo cálculo do valor médio de diâmetro de esfera equivalente ( $D_{[4,3]}$ ) conforme Equação 1, assim como os valores de polidispersão (SPAN) através da Equação 2.

$$D_{[4,3]} = \frac{\sum d^4}{\sum d^3}$$

(Equação 1)

$$SPAN = \frac{(D_{0.9} - D_{0.1})}{D_{0.5}}$$

(Equação 2)

em que  $D_{0.9}$  é o tamanho que abrange 90 % da curva de distribuição,  $D_{0.1}$  é o tamanho que abrange 10 % das partículas de menor tamanho sob a curva de distribuição e  $D_{0.5}$  é o tamanho que representa a mediana da curva de distribuição de tamanhos.

As determinações de diâmetro médio (z-average, calculado pela função de correlação) e o índice de polidispersão (PDI), Equação 3, foram realizadas por espalhamento de luz dinâmico em ZetaSizer após diluição das amostras em água MilliQ<sup>®</sup> e filtração utilizando membranas de 0,45  $\mu\text{m}$ . Para cada medida foram realizadas 7 varreduras de 10 segundos cada. As análises foram realizadas em triplicata de lote à temperatura ambiente (25 °C).

$$PDI = \frac{\sigma^2}{Z_D^2}$$

(Equação 3)

em que  $\sigma$  é o desvio padrão de uma gaussiana hipotética de distribuição e  $Z$  é o z-average, média da distribuição considerando a faixa de medida entre 0,6 e 3000 nm.

#### 4.2.6. Determinação do pH experimental das formulações e cálculo do Log D dos fármacos

O valor de pH das suspensões foi medido usando um potenciômetro com eletrodo de vidro a 25 °C sem diluição prévia das amostras.

A lipofilicidade dos fármacos foi estimada calculando o logaritmo do coeficiente de distribuição octanol:água (logD), que é definido como a razão das concentrações de equilíbrio de todas as espécies (ionizadas ou não ionizadas) da molécula em octanol e em água (equação 4).

$$\text{Log } D_{\text{oct/água}} = \log \left( \frac{[\text{soluto}]_{\text{octanol}}}{[\text{soluto}]_{\text{octanol}}^{\text{ionizada}} + [\text{soluto}]_{\text{água}}^{\text{neutra}}} \right)$$

(Equação 4)

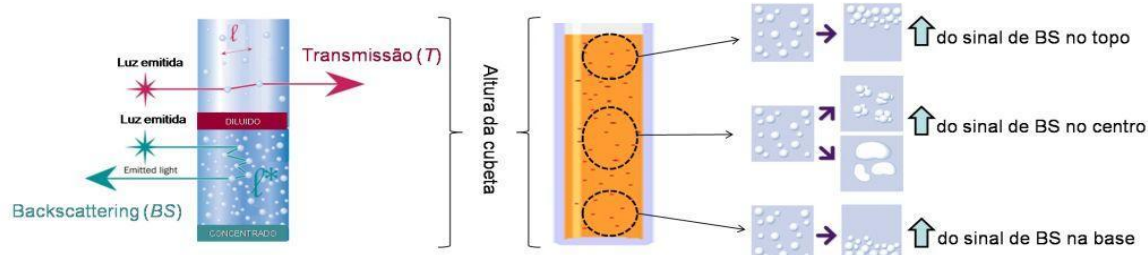
Espécies neutras apresentam log D igual ao log P (logaritmo do coeficiente de partição octanol:água). ACDLogD 6.0 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada) foi usado para o cálculo dos valores do log D. Os valores de pH usados para calcular o log D correspondem ao pH das formulações de nanocápsulas.



#### 4.2.7. Estabilidade acelerada das formulações $NC_{MTX(OEt)20,25}$ e $NC_{MTX(OEt)20,5}$

As análises de espalhamento múltiplo de luz foram realizadas no equipamento *TurbiscanLab*, em que o sistema de detecção consiste de um feixe de luz no infravermelho próximo ( $\lambda = 880$  nm) e dois detectores [um para detectar a luz transmitida e outro para detectar a luz retroespalhada, backscattering (*BS*)]. Os detectores de transmissão e de backscattering recebem luz em ângulos de  $180^\circ$  e  $45^\circ$ , respectivamente, em relação ao feixe de luz incidente. O sistema detector realiza uma varredura da base para o topo da cubeta óptica de altura de 55 mm, adquirindo os dados a cada 40  $\mu\text{m}$  de intervalo.

As amostras foram analisadas em uma temperatura constante, de  $25^\circ\text{C}$  por 1 hora, usando o modo de varreduras múltiplas (uma varredura a cada 5 min). As variações de sinal de *BS* de todas as varreduras em relação à primeira varredura foram utilizadas para acessar os perfis de variação de *BS* e, assim, visualizar os fenômenos de migração (sedimentação, cremagem) e/ou variação de tamanho de partícula (floculação, coalescência). Na Figura 8, está representado um esquema da avaliação da estabilidade física de sistemas nanoscópicos empregando o espalhamento múltiplo de luz.



**Figura 8. Esquema da interpretação dos fenômenos de instabilidade analisados por espalhamento múltiplo de luz empregando o equipamento *Turbiscan*.**

#### 4.2.8. Quantificação dos fármacos por Cromatografia Líquida de alta eficiência

A escolha de solvente ou mistura de solventes para a dissolução e recuperação total dos fármacos foi previamente testada para cada formulação, em estudos preliminares de exatidão. As suspensões  $NC_{INDOEt}$ ,  $NC_{INDOH1}$ ,  $NC_{INDOH3}$ ,  $NC_{DICOH1}$ ,  $NC_{DICOH2}$ ,  $NC_{DICONa}$ ,  $NC_{MEL}$ ,  $NC_{ACV}$ ,  $NC_{MTX(OEt)20,25}$  e  $NC_{MTX(OEt)20,5}$  foram

tratadas com acetonitrila, enquanto que a formulação NC<sub>MTX</sub> foi tratada com a mistura de acetonitrila e tetrahidrofurano [4:6 (v/v)]. Para tanto, alíquotas das formulações foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com o solvente apropriado. A solução foi filtrada (Millipore, 0,45 µm) e a concentração de fármaco foi determinado por HPLC utilizando detector UV.

Para a quantificação do éster etílico de indometacina, indometacina, diclofenaco ácido e sódico, melatonina e aciclovir foi utilizado pré-coluna e coluna (Lichrosphere® 100 RP-18, 250 mm x 4 mm, 5 µm). Para a quantificação do metotrexato foi utilizada pré-coluna e coluna (Waters Spherisorb® C18, 150 mm x 4,0 mm, 4µm).

Os métodos analíticos foram validados conforme ou adaptados de métodos descritos na literatura: INDOH e INDOET (POHLMANN e col., 2004), DICOH e DICONa (SCHAFFAZICK e col., 2002), MEL (SCHAFFAZICK e col., 2005), ACV (STULZER e col., 2009), MTX (SARTORI e col., 2008). Para o éster etílico de metotrexato o método foi desenvolvido e validado (Tabela 2). Todas as validações seguiram as normas do ICH (2005) através dos parâmetros: linearidade (r), repetibilidade, precisão intermediária, exatidão (% recuperação) e limite de quantificação.

**Tabela 2. Condições cromatográficas para análise dos fármacos utilizados no presente trabalho.**

Fármaco	Fase móvel	Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )	Comprimento de onda (λ) (nm)	Tempo de retenção (minutos)
INDOH	ACN: H <sub>2</sub> O (70:30 v/v) pH: 5,0±0,5	1,2	267	3,5
INDOEt	ACN: H <sub>2</sub> O (65:35 v/v) pH: 5,0±0,5	1,2	267	9,6
DICOH	ACN: H <sub>2</sub> O (65:35 v/v) pH: 5,0±0,5	1,0	280	0,7
DICONa	ACN: H <sub>2</sub> O (70:30 v/v) pH: 5,0±0,5	1,0	280	2,2
MEL	ACN: H <sub>2</sub> O (55:45 v/v) pH: 5,0±0,5	1,2	229	3,5
ACV	ACN: H <sub>2</sub> O (50:50 v/v)	1,0	254	2,3
MTX	MeOH: H <sub>2</sub> O: THF (20:70:10 v/v/v) pH: 6,0±0,5	0,8	303	9,2
MTX(OET) <sub>2</sub>	MeOH: H <sub>2</sub> O (80:20 v/v) pH: 4,0±0,5	1,0	303	22,4

#### 4.2.8.1. Linearidade

A linearidade foi avaliada através da construção de três curvas de calibração, em diferentes dias, com concentrações variando de 1 a 50 µg mL<sup>-1</sup>. A partir de uma solução-mãe dos fármacos foram preparadas diluições de 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50 µg mL<sup>-1</sup>, e de 100 µg mL<sup>-1</sup>, no caso do aciclovir. As curvas do metotrexato começaram em 2 µg mL<sup>-1</sup>. A equação da reta foi determinada por estudo de regressão linear.

#### 4.2.8.2. Precisão

A repetibilidade dos métodos foi verificada pela análise de seis amostras de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo os diferentes fármacos em um mesmo dia. A precisão intermediária, foi determinada pela análise de seis amostras na mesma

concentração realizadas em três dias diferentes. A precisão foi expressa pelos desvios padrões relativos obtidos.

#### 4.2.8.3. Especificidade

Amostras de NCLs brancas foram analisadas por cromatografia para verificar que os componentes das nanocápsulas não interferem na detecção e quantificação dos fármacos.

#### 4.2.8.4. Exatidão

A exatidão foi avaliada através de teste de recuperação. NCLs brancas foram adicionadas com concentrações conhecidas dos fármacos. As amostras foram injetadas em triplicatas. Para a indometacina e seu éster etílico foram utilizadas as concentrações de 12, 15 e 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para o diclofenaco ácido e seu sal sódico foram utilizadas concentrações de 3, 9 e 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para o aciclovir as concentrações foram de 5, 20 e 45  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para a exatidão da melatonina as concentrações avaliadas foram de 5, 10 e 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , para o MTX foram de 3, 23 e 39  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e, para o éster etílico de metotrexato de 2, 15 e 30  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As porcentagens de recuperação foram calculadas pela equação:

$$R\% = \frac{NC_F - NC_B}{S_F}$$

(Equação 5)

Em que, **R%** é o percentual de recuperação; **NC<sub>F</sub>** são as nanocápsulas acrescidas de fármaco; **NC<sub>B</sub>** são as nanocápsulas brancas e **S<sub>F</sub>** representa a solução de fármaco.

#### 4.2.8.4. Limite de quantificação

O limite de quantificação foi calculado pela formula preconizada pelo ICH (2005), sendo utilizando valores de desvio padrão e de inclinação das curvas de

calibração construídas no item 4.2.8.1. O limite de quantificação pode ser expresso pela equação:

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC}$$

(Equação 6)

Em que, **LQ** é limite de quantificação; **DP** é desvio padrão do intercepto com o eixo y; **IC** representa a inclinação da curva de calibração.

#### **4.2.9. Determinação da concentração de saturação dos fármacos em água e na fase aquosa**

A concentração de saturação foi determinada adicionando-se um excesso de fármaco a 1 mL de água e a 1 mL de fase aquosa (água e polissorbato 80), sonificado em ultrassom por 10 minutos, que após 48 horas foi centrifugado em microcentrífuga a 1844 ×g por 10 minutos. Alíquota do sobrenadante foi quantificada em HPLC. Os resultados foram expressos em mg mL<sup>-1</sup> e representam a média de triplicata de amostra para cada fármaco.

#### **4.2.10. Ultrafiltração-centrifugação**

Para determinar o percentual de encapsulamento (diluição 1:0) uma alíquota de 200 µL da suspensão foi transferida para uma unidade filtrante Microcon®. Após a ultrafiltração-centrifugação em microcentrífuga a 1844 ×g por 5 minutos, o ultrafiltrado foi analisado por HPLC. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) relativa ao teor e representam a média de triplicata de amostra para cada suspensão.

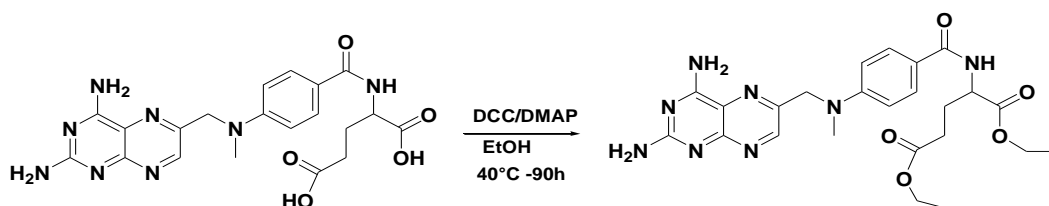
As nanocápsulas foram diluídas em água em uma faixa de 1:1 a 1:1000. Alíquotas de 200 µL das amostras diluídas foram transferidas para uma unidade filtrante Microcon® e ultrafiltradas-centrifugadas em microcentrífuga a 1844 ×g por 5 minutos. O ultrafiltrado foi retirado e analisado em cromatografia líquida de alta

eficiência (HPLC) co detector UV, na metodologia previamente validada. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) relativa ao teor e representam a média de triplicata de amostra para cada suspensão.



### 5.1. Caracterização do MTX(OEt)<sub>2</sub>

O MTX possui muitos grupamentos ionizáveis (grupos amina e ácidos formando amônio quaternário e carboxilatos). Desta forma, a afinidade pela fase aquosa é facilitada. Com a finalidade de aumentar a lipossolubilidade do fármaco foi realizada a sua esterificação (Figura 9). Os grupos ésteres deixam o derivado do MTX mais lipofílico por impedir a ionização das funções carboxílicas.



**Figura 9. Reação de esterificação do éster etílico de metotrexato.**

O rendimento obtido após a purificação ficou em torno de 65%. No espectro de RMN <sup>1</sup>H do MTX (Figura 10) não estão presentes os sinais correspondentes das etoxilas em 1,17 ppm (t.3H) e 4,05 ppm (q. 2H) que são visualizados no RMN <sup>1</sup>H do MTX(OEt)<sub>2</sub> (Figura 11) comprovando a formação do produto. Os sinais dos demais hidrogênios estão assinalados no espectro. O abaixamento do ponto de fusão do MTX(OEt)<sub>2</sub> (107-112 °C) em relação ao MTX (195°) também corrobora a esterificação.



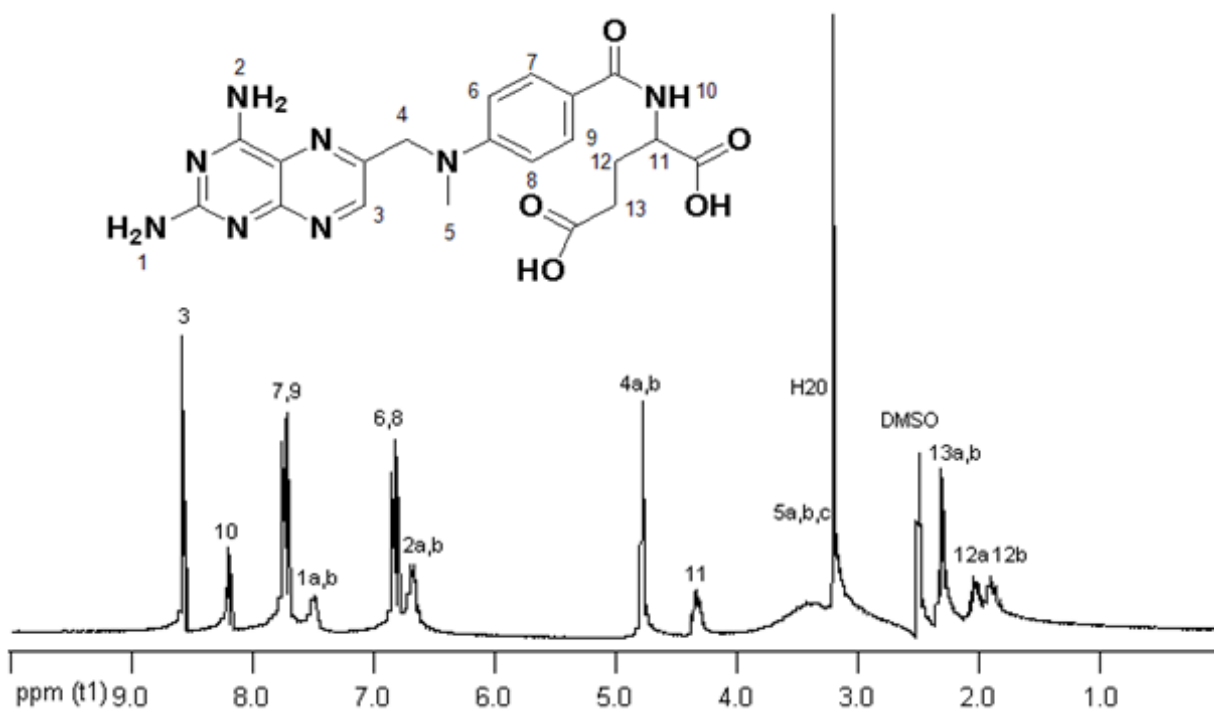


Figura 10. RMN H<sup>1</sup> metotrexato (300MHz, DMSO).

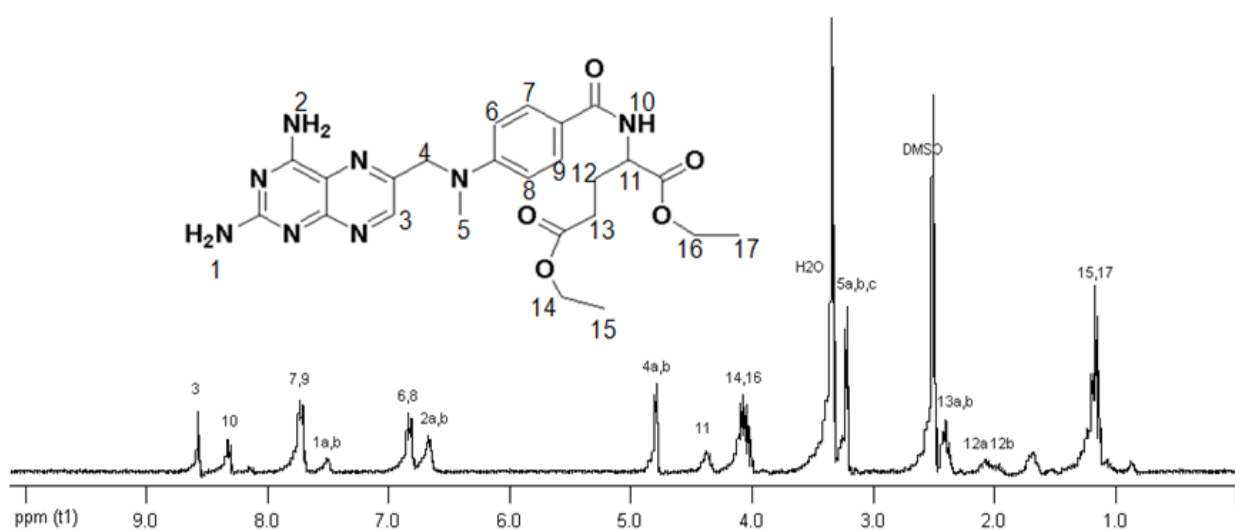
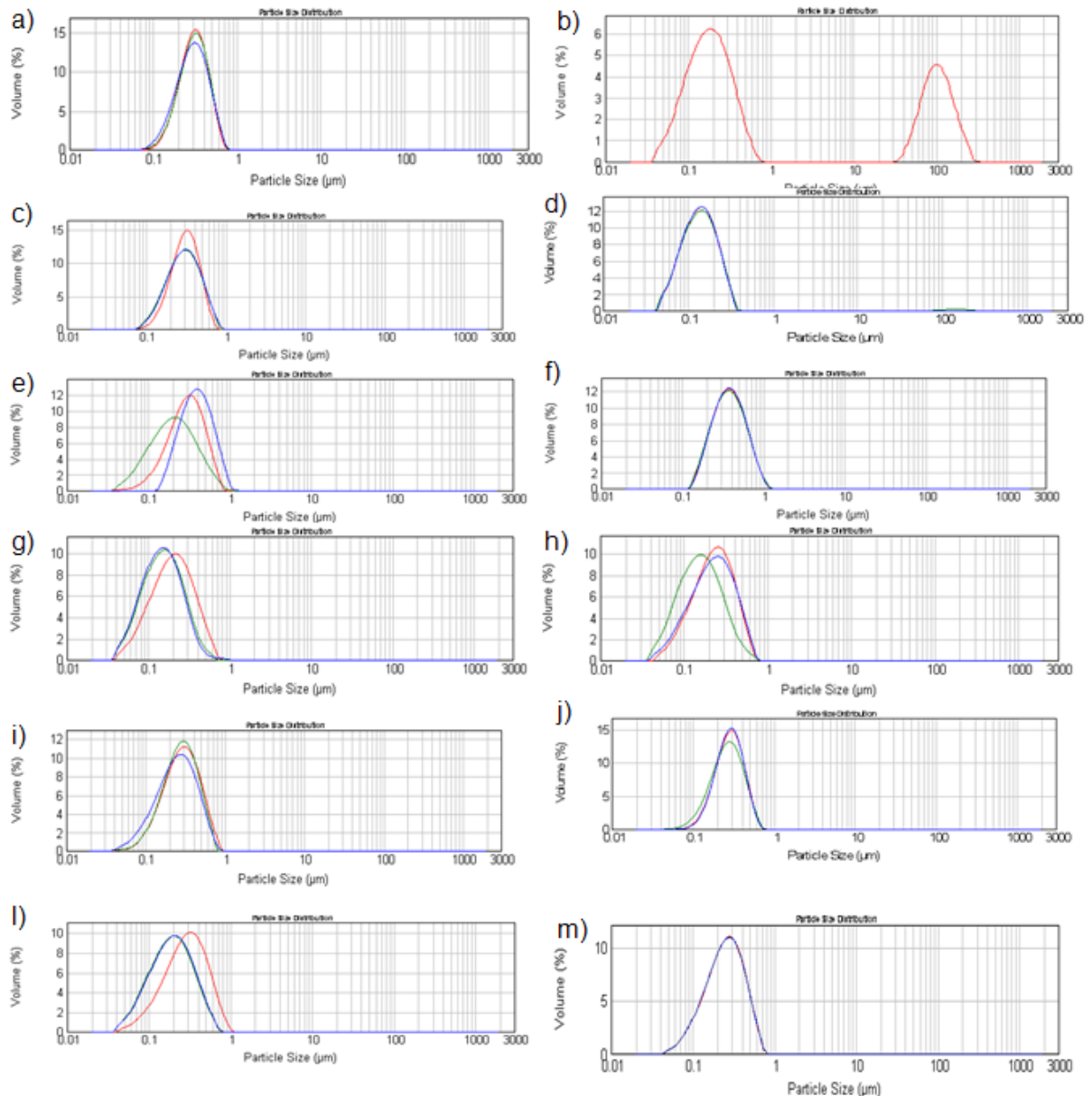


Figura 11. RMN H<sup>1</sup> éster etílico de metotrexato (300MHz, DMSO).

## 5.2. Suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico

Após a preparação, as suspensões de NC apresentaram aspecto macroscopicamente homogêneo e foram analisadas por difração de laser para se

verificar a distribuição de tamanho (Figura 12), os valores de tamanho médio e os valores SPAN (Tabela 3).



**Figura 12. Gráficos de tamanho médio. a)  $NC_{INDOET1}$ ; b)  $NC_{INDOET2}$ ; c)  $NC_{INDOH1}$ ; d)  $NC_{INDOH3}$ ; e)  $NC_{DICOH1}$ ; f)  $NC_{DICOH2}$ ; g)  $NC_{MTX(OEt)20,25}$ ; h)  $NC_{MTX(OEt)20,5}$ ; i)  $NC_{MEL0,5}$ ; j)  $NC_{ACV0,4}$ ; l)  $NC_{DICONa1}$ ; m)  $NC_{MTX0,25}$ .**

As distribuições de tamanho em volume cumulativo percentual, obtidas por difração de laser, mostraram-se na escala nanométrica, exceto  $NC_{INDOET2}$  (Figura 11b). Neste caso, esta formulação não atendeu os requisitos de formulação

nanotecnológica, tendo sido excluída do estudo. Para as demais formulações foi realizado na sequência análise de diâmetro de partícula e PDI por espectroscopia de correlação de fótons, quantificação do fármaco por HPLC e medida do pH (Tabela 3).

**Tabela 3. Diâmetros médios e concentração de fármacos das suspensões de nanocápsulas.**

Suspensão de nanocápsulas	<i>D</i> <sub>4,3</sub> (nm)	SPAN	Diâmetro (nm)	PDI	Teor (mg mL <sup>-1</sup> )	pH
NC <sub>INDOE1</sub>	357 ± 22	1,3 ± 0,3	281 ± 40	0,13 ± 0,04	0,98 ± 0,02	5,0 ± 0,6
NC <sub>INDOH1</sub>	322 ± 05	1,2 ± 0,2	271 ± 10	0,11 ± 0,02	1,01 ± 0,03	5,1 ± 0,5
NC <sub>INDOH3</sub>	160 ± 19	1,2 ± 0,1	266 ± 19	0,05 ± 0,01	2,87 ± 0,2	5,0 ± 0,5
NC <sub>DICOH1</sub>	325 ± 90	1,4 ± 0,3	264 ± 3	0,11 ± 0,01	1,02 ± 0,08	5,2 ± 0,4
NC <sub>DICOH2</sub>	359 ± 07	1,3 ± 0,1	269 ± 18	0,04 ± 0,02	2,02 ± 0,16	5,0 ± 0,5
NC <sub>DICONa</sub>	254 ± 60	1,6 ± 0,1	215±15	0,09 ± 0,06	1,01 ± 0,1	5,0 ± 0,5
NC <sub>MEL</sub>	333 ± 66	1,4 ± 0,1	300 ± 14	0,10 ± 0,01	0,48 ± 0,01	5,1 ± 0,3
NC <sub>MTX</sub>	170 ± 18	1,5 ± 0,3	179 ± 15	0,03 ± 0,01	0,24 ± 0,01	4,8 ± 0,5
NC <sub>ACV</sub>	230 ± 04	1,1 ± 0,1	232 ± 25	0,06 ± 0,07	0,41 ± 0,02	4,7 ± 0,3
NC <sub>MTX(OEt)20,25</sub>	190 ± 33	1,6 ± 0,1	191 ± 13	0,07 ± 0,03	0,27 ± 0,01	5,8 ± 0,3
NC <sub>MTX(OEt)20,5</sub>	169 ± 22	1,6 ± 0,1	180 ± 1	0,08 ± 0,02	0,52 ± 0,02	5,0 ± 0,4

Quanto à caracterização por espalhamento de luz dinâmico, os diâmetros médios variaram entre  $179 \pm 15$  e  $300 \pm 14$  nm e, as concentrações de fármacos situaram-se entre 0,25 e  $2,87 \text{ mg mL}^{-1}$  dentro dos limites aceitáveis de preparação, ou seja  $100 \pm 10\%$  em relação às massas utilizadas. Todas as formulações apresentaram pH entre 4,7 a 5,8.

### 5.3. Estabilidade acelerada das formulações $\text{NC}_{\text{MTX}(\text{OEt})20,25}$ e $\text{NC}_{\text{MTX}(\text{OEt})20,5}$

Nos testes de avaliação de estabilidade física, as formulações  $\text{NC}_{\text{MTX}(\text{OEt})20,25}$  e  $\text{NC}_{\text{MTX}(\text{OEt})20,5}$  apresentaram transmitância menor que 0,2 %. Dessa forma, apenas o perfil de luz retroespalhada foi analisado. A variação do sinal de luz retroespalhada no meio da cubeta ao longo de 1 h foi nula para ambas as formulações, demonstrando que não ocorre coalescência ou floculação das partículas nas condições da análise. A tendência à sedimentação é baixa, mas esperada, pois as partículas são mais densas do que a água. Isso é verificado pelo aumento do sinal de BS na base da cubeta (lado esquerdo do gráfico). A formulação  $\text{NC}_{\text{MTX}(\text{OEt})20,25}$  (Figura 13) apresentou menor tendência à sedimentação que a formulação  $\text{NC}_{\text{MTX}(\text{OEt})20,5}$  (Figura 14).

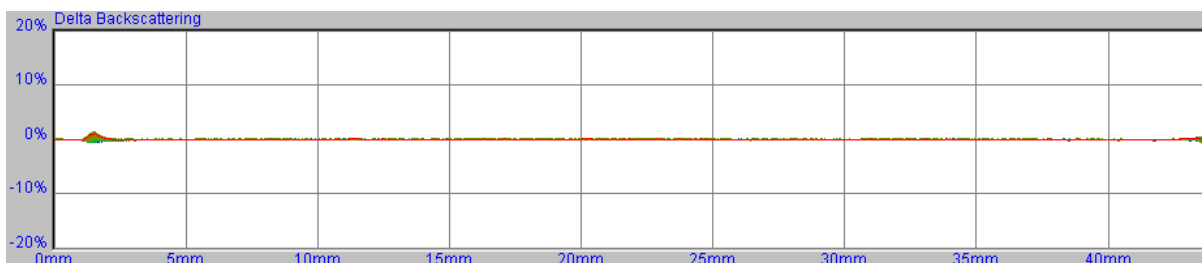


Figura 13. Perfil de retroespalhamento da  $\text{NC}_{\text{MTX}(\text{OEt})20,25}$ .

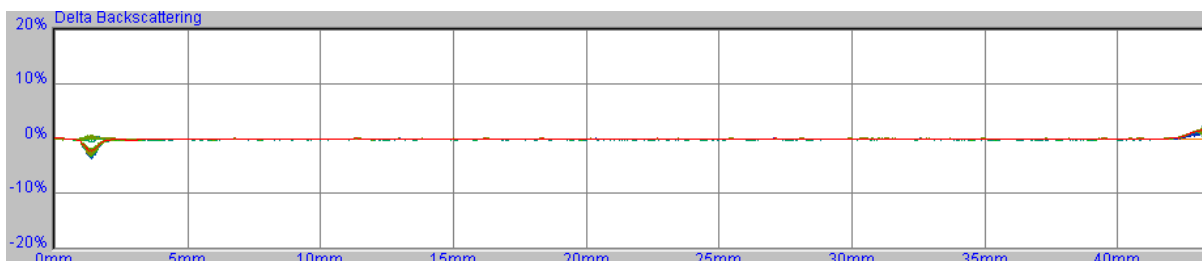


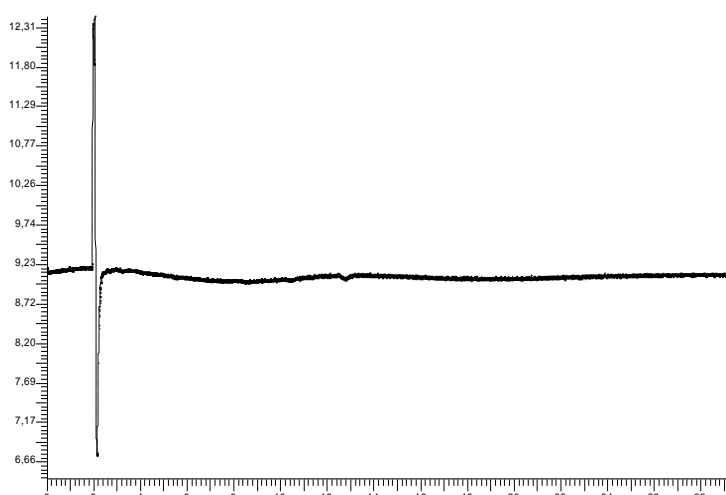
Figura 14. Perfil de retroespalhamento da  $\text{NC}_{\text{MTX}(\text{OEt})20,5}$ .

A baixa tendência à sedimentação corrobora a interpretação de tendência baixa de floculação, pois considerando a lei de Stokes de sedimentação, as nanopartículas ao flocularem sedimentariam por serem mais densas que a fase contínua. As formulações têm uma estabilidade alta.

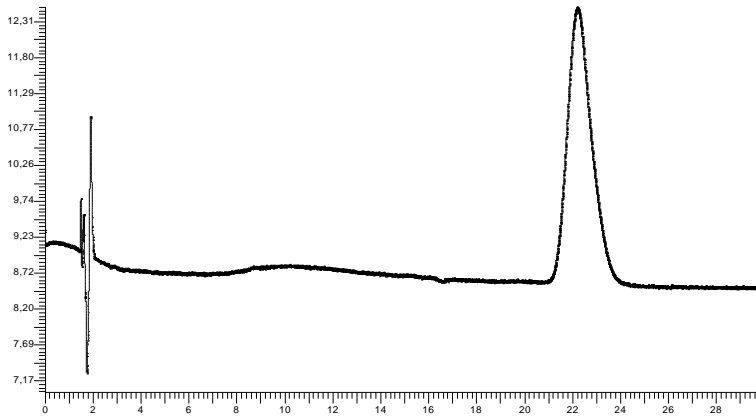
#### 5.4. Cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação dos fármacos

A validação dos métodos analíticos foi realizada conforme metodologia previamente validada para os fármacos INDOH, INDOEt, DICOH, DICONa, ACV, MEL e MTX. Para o MTX(OEt)<sub>2</sub> o método foi desenvolvido e validado. Os critérios utilizados foram estabelecidos pelo ICH (2005) através dos parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, exatidão (% recuperação) e limite de quantificação.

A especificidade de um método analítico é a sua capacidade em atribuir valor quantitativo inequívoco a substância analisada mesmo na presença de uma mistura complexa. Para a avaliação da especificidade do método, foram analisadas amostras de formulações brancas (Figura 15) e formulações contendo fármaco (Figura 16) para demonstrar que nenhum dos componentes dos sistemas absorve no mesmo comprimento de onda utilizado para as análises do éster etílico de metotrexato, pois este método está sendo desenvolvido neste trabalho.

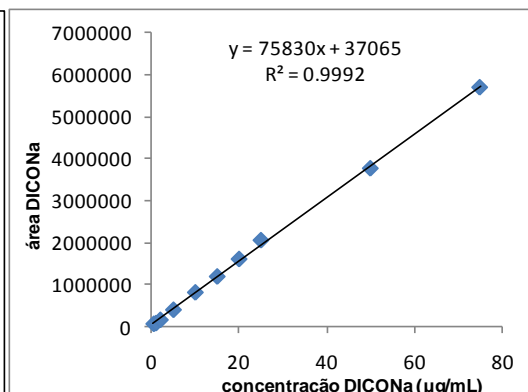
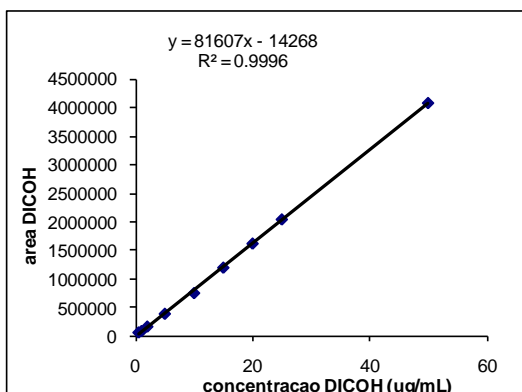
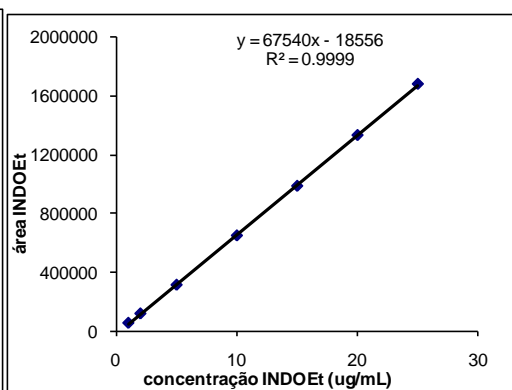
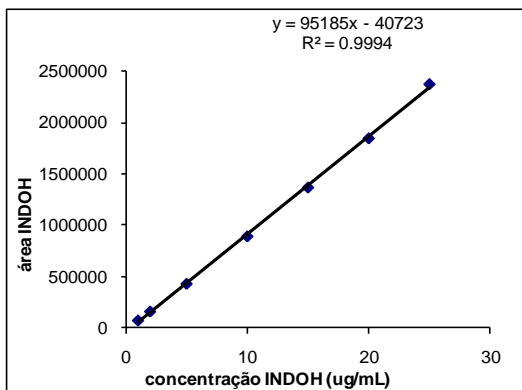


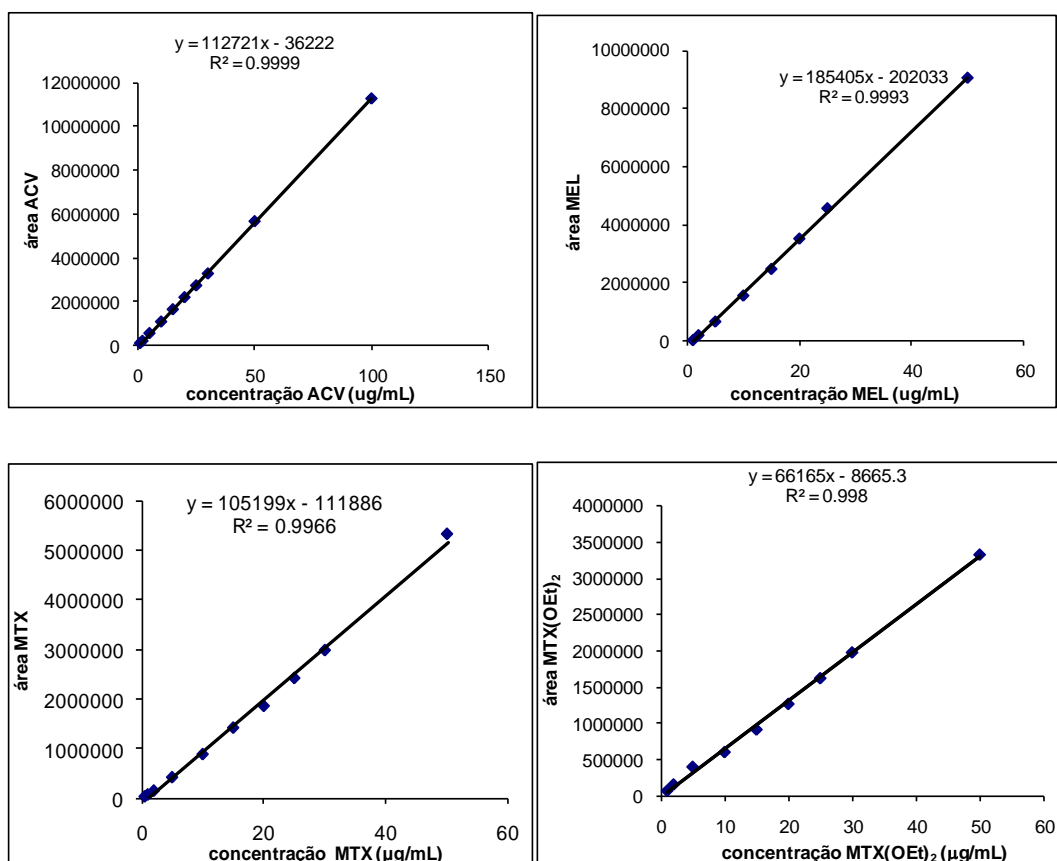
**Figura 15. Especificidade do método analítico validado para o éster etílico de metotrexato.**



**Figura 16. Cromatograma da formulação contendo éster etílico de metotrexato em solução de acetonitrila em 303 nm no método validado.**

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. As curvas de calibração médias podem ser visualizadas na Figura 17. Os coeficientes de correlação ( $r$ ) das curvas de calibração apresentaram valores acima de 0,99, estando de acordo com o que é preconizado pelo ICH (2005) (Tabela 4).





**Figura 17. Média das curvas de calibração dos fármacos utilizados neste estudo.**

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor adotado como verdadeiro. Foram preparadas amostras NC acrescidas dos fármacos para avaliar esse parâmetro. Para todas as amostras o percentual de fármaco recuperado teve desvio padrão máximo de 3%, estando de acordo com os padrões estipulados pelo ICH (1996) (Tabela 4).

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A repetibilidade (precisão intra-dia) é a concordância dos resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes. Os dados de repetibilidade e de precisão intermediária obtidos apresentaram valores abaixo de 5 % (Tabela 4).

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Foram obtidos por equação já descrita e variaram entre 0,3 e 2,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 4).

**Tabela 4. Parâmetros analisados para validação dos métodos cromatográficos.**

Fármaco	(r)	ponto baixo (%)	Recuperação ponto médio(%)	ponto alto (%)	Repetibilidade e precisão intermediária (%)	Limite de quantificação ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
INDOH	0,999	97	101	103	< 2	1,0
INDOEt	0,999	100	97	100	< 2	0,9
DICOH	0,999	98	99	99	< 5	0,5
DICONa	0,999	101	102	101	< 5	0,5
MEL	0,999	99	100	102	< 5	0,5
ACV	0,999	98	100	101	< 3	0,3
MTX	0,997	103	102	99	< 4	2,0
MTX(OEt) <sub>2</sub>	0,998	102	101	103	< 4	1,0

Os resultados referentes aos testes de exatidão, repetibilidade e precisão intermediária e os coeficientes de correlação obtidos das curvas de calibração apresentaram-se adequados, permitindo considerar os métodos validados.



### 5.5. Concentração de saturação em água e na fase aquosa

O diclofenaco sódico, o aciclovir e a melatonina, são os fármacos que apresentaram maior hidrofília, com solubilidade em água de 15,0; 8,0; 1,5 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A concentração de saturação na fase aquosa desses fármacos é de 22,0; 2,0; 1,7 mg mL<sup>-1</sup> (Tabela 5).

O metotrexato possui saturação em água de 1,4 (x 10<sup>-1</sup>) mg mL<sup>-1</sup> e na fase aquosa de 3 (x 10<sup>-1</sup>) mg mL<sup>-1</sup>, Já seu éster etílico apresentou saturação em água de 6,2 (x 10<sup>-2</sup>) mg mL<sup>-1</sup> e saturação na fase aquosa de 7 (x 10<sup>-2</sup>) mg mL<sup>-1</sup>. O IndOEt possui solubilidade em água e na fase aquosa inferior a 0,1 (x 10<sup>-2</sup>) mg mL<sup>-1</sup>, por sua vez a solubilidade em água da IndOH e do DicOH encontra-se entre 4-6 (x 10<sup>-2</sup>)mg mL<sup>-1</sup> e na fase aquosa, solubilidade entre 4 e 7 (x 10<sup>-2</sup>)mg mL<sup>-1</sup> (Tabela 5).

**Tabela 5. Concentração de saturação dos fármacos em água e na fase aquosa.**

Fármaco	saturação em água (mg mL <sup>-1</sup> )	saturação na fase aquosa (mg mL <sup>-1</sup> )
Éster etílico de indometacina	0,1 (x 10 <sup>-2</sup> )	0,1 (x 10 <sup>-2</sup> )
Indometacina	4,0 ± 0,7 (x 10 <sup>-2</sup> )	4,8 ± 1 (x 10 <sup>-2</sup> )
Diclofenaco ácido	6,0 ± 0,7 (x 10 <sup>-2</sup> )	6,5 ± 7 (x 10 <sup>-2</sup> )
Diclofenaco sódico	15,0 ± 1,6	22,0 ± 0,3
Melatonina	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,1
Metotrexato	1,4 ± 0,1 (x 10 <sup>-1</sup> )	3,1 ± 0,1 (x 10 <sup>-1</sup> )
Aciclovir	8,3 ± 0,4	2,0 ± 0,2
Éster etílico de metotrexato	6,2 ± 0,4 (x 10 <sup>-2</sup> )	7,0 ± 0,3 (x 10 <sup>-2</sup> )

Com base na Tabela 5, constatamos que o ACV, a MEL, o DICONa e o MTX foram adicionados nas formulações abaixo de sua concentração de saturação na fase aquosa. Enquanto que os demais fármacos foram utilizados em concentração acima da saturação na fase aquosa.

### 5.6. Proposta de algoritmo para estabelecer a partição dos fármacos nas NCL

As formulações  $NC_{MTX(OEt)20,25}$  e  $NC_{MTX(OEt)20,5}$  apresentaram percentual de encapsulamento de  $65,7 \pm 2,5 \%$  e  $62,1 \pm 2,5$ , respectivamente. A avaliação do percentual detectado no ultrafiltrado foi realizado com a formulação  $NC_{MTX(OEt)20,5}$  somente. A avaliação do percentual de encapsulamento, por ultrafiltração-centrifugação sem diluição, das formulações:  $NC_{INDOEt}$ ,  $NC_{INDOH1}$ ,  $NC_{INDOH3}$ ,  $NC_{DICOH1}$  e  $NC_{DICOH2}$  mostrou que não há presença dos respectivos fármacos no ultrafiltrado. Por outro lado, para as formulações  $NC_{DICONa}$ ,  $NC_{MEL}$ ,  $NC_{MTX}$  o fármaco foi detectado no ultrafiltrado em concentrações de acima de 50%. E, no ultrafiltrado da formulação  $NC_{ACV}$  o ACV foi 100% detectado (Tabela 6).

**Tabela 6. Dissolução dos fármacos após diluições das formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico.**

<b>NC/diluição (%)</b>	<b>1:0</b>	<b>1:1</b>	<b>1:10</b>	<b>1:100</b>	<b>1:1000</b>
NC <sub>ACV</sub>	100 ± 6	-	-	-	-
NC <sub>MTX</sub>	82 ± 3	93 ± 1	102 ± 7	-	-
NC <sub>MEL</sub>	61 ± 5	84 ± 12	99 ± 1	-	-
NC <sub>DICONa</sub>	55 ± 5	79 ± 7	102 ± 8	-	-
NC <sub>MTX(OEt)<sub>20,5</sub></sub>	38 ± 3	41 ± 6	49 ± 13	105 ± 3	-
NC <sub>INDOH1</sub>	0	3 ± 1	11 ± 1	70 ± 6	100 ± 8
NC <sub>INDOH3</sub>	0	2 ± 2	7 ± 1	35 ± 2	93 ± 10
NC <sub>DICOH1</sub>	0	4 ± 2	15 ± 4	62 ± 3	100 ± 3
NC <sub>DICOH2</sub>	0	1 ± 1	8 ± 3	53 ± 10	90 ± 8
NC <sub>INDOEt1</sub>	0	0	0	0	0

Com base nos dados, produzimos um algoritmo, apresentado na Figura 18, que pode ser usado para classificação do mecanismo de encapsulamento de fármacos em nanocápsulas de núcleo lipídico.

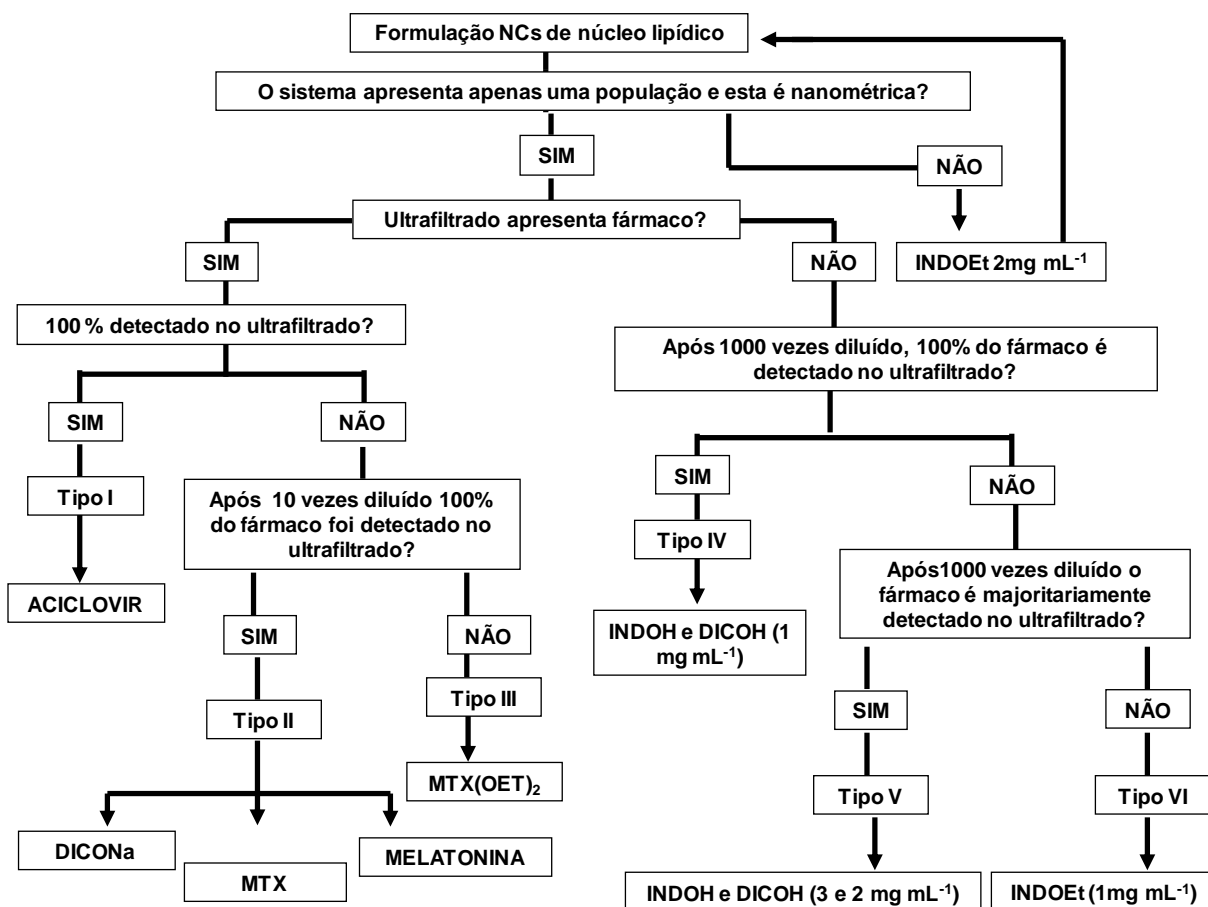


Figura 18. Algoritmo para estabelecer a partição de fármacos em formulações aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico.

O aciclovir é um fármaco hidrofílico, que possui apenas três centros doadores de ligação de hidrogênio. Tem log D de -3,19. Essas características fazem com que este fármaco tenha muita afinidade pela fase aquosa e não interage com as nanocápsulas, permanecendo na totalidade dissolvido na fase aquosa.

Por outro lado, a melatonina e o diclofenaco sódico, apesar de terem solubilidade alta e terem sido adicionados abaixo da concentração de saturação em água, possuem logD de 0,96 e 0,31, respectivamente, tendendo a estarem em equilíbrio nas diferentes pseudo-fases do sistema. Esses fármacos apresentaram percentual de encapsulamento (sem diluição) em torno de 50%, mas quando diluídos 10 vezes todo o fármaco é detectado no ultrafiltrado, sugerindo que além de interagirem parcialmente com a fase aquosa também interagem com as nanocápsulas provavelmente por ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals.

O metotrexato possui LogD de -2,43, ou seja, seu equilíbrio está totalmente voltado para a fase contínua. No entanto, apresentou percentual de encapsulamento do MTX, sem diluição, de 20% e quando diluídas 10 vezes todo o fármaco é detectado no ultrafiltrado. O MTX possui cinco centros doadores de ligação de hidrogênio, todos os outros fármacos têm no máximo 3. A PCL possui vários centros aceptores de ligação de hidrogênio e, devido a isso, o MTX interage dessa forma com as nanopartículas. A partir dos resultados observados pode-se propor que o MTX, a melatonina e o diclofenaco de sódio estejam parcialmente encapsulados nas nanocápsulas, provavelmente adsorvidos na parede polimérica.

O éster etílico de metotrexato foi detectado em torno de 40% no ultrafiltrado da formulação não diluída, no entanto valor semelhante é verificado nas diluições 1:1 e 1:10 e somente quando diluído 100 vezes foi totalmente detectado no ultrafiltrado. O MTX(OEt)<sub>2</sub> tem logD de 2,2, portanto, seu equilíbrio está voltado para a fase dispersa, no entanto, este fármaco possui uma parte mais apolar, parte esterificada da molécula, e uma parte mais polar, com dois grupamentos amins. Essas propriedades fazem com que o fármaco possa estar particionado entre as diferentes pseudo-fases do sistema, estando, parte solúvel na água, parte adsorvido à parede polimérica e parte presente no núcleo das NCL.

A indometacina e diclofenaco ácido apresentam equilíbrio voltado para as nanopartículas, pois possuem logD de 2,2 e 3,17, respectivamente e baixa solubilidade em água. Conforme demonstrado na Tabela 6, nas formulações NC<sub>INDOH1</sub> e NC<sub>DICOH1</sub> os fármacos não são detectados no ultrafiltrado não diluído e só ocorre a detecção de 100% do fármaco quando estes são diluídos 1000 vezes. Esses resultados sugerem que estes fármacos estão encapsulados nas nanopartículas, majoritariamente adsorvidos na parede polimérica, conforme já sugerido em outros estudos (Schaffazick e col., 2002; Pohlmann e col., 2004).

Nas formulações NC<sub>INDOH3</sub> e NC<sub>DICOH2</sub> após diluições de 1:1000 vezes, os respectivos fármacos, foram majoritariamente detectados no ultrafiltrado. Como já demonstrado em estudos anteriores, as formulações preparadas com concentração desses fármacos acima da concentração de saturação na fase dispersa (indometacina a 3 mg mL<sup>-1</sup>; e diclofenaco ácido a 2 mg mL<sup>-1</sup>) ocorre

concomitantemente a formação de nanocristais além das nanocápsulas (GUTERRES e col., 1995; POHLMANN e col., 2008).

As suspensões contendo éster etílico de indometacina ( $NC_{\text{INDOEt1}}$ ) foram diluídas de 1:1 a 1:1000 vezes em água e ultrafiltradas-centrifugadas. Ao contrário do que foi observado para as demais formulações em que os fármacos foram detectados no ultrafiltrado nas diferentes diluições, para as suspensões de nanopartículas contendo INDOEt, este não foi detectável no ultrafiltrado em nenhuma diluição. Esse resultado pode ser devido à baixa solubilidade em água do éster ou ao seu encapsulamento no núcleo oleoso das nanocápsulas. O INDOEt possui,  $\log D$  de 4,1, ou seja, seu equilíbrio está totalmente voltado para a fase dispersa, estando majoritariamente encapsulado no núcleo oleoso das nanocápsulas, proposto em outros estudos (Pohlmann e col., 2004; Cruz e col., 2006a). Se, a concentração de saturação do INDOEt exceder a saturação na fase dispersa, este precipita, como demonstrado para a formulação de NCL contendo INDOEt na concentração de  $2 \text{ mg mL}^{-1}$ .

O algoritmo permite, de modo inovador determinar a partição de diferentes fármacos nas suspensões de nanocápsulas, o que não é possível com outros métodos, pois estes apresentam limitações, como no caso do perfil de liberação, que é feito em condição sink, não distinguindo o que está solubilizado na fase aquosa dos nanocristais. Com base na classificação dos tipos de partição das substâncias ativas nas formulações de nanocápsulas conforme o algoritmo pode-se propor os modelos de distribuição apresentados na Figura 19.

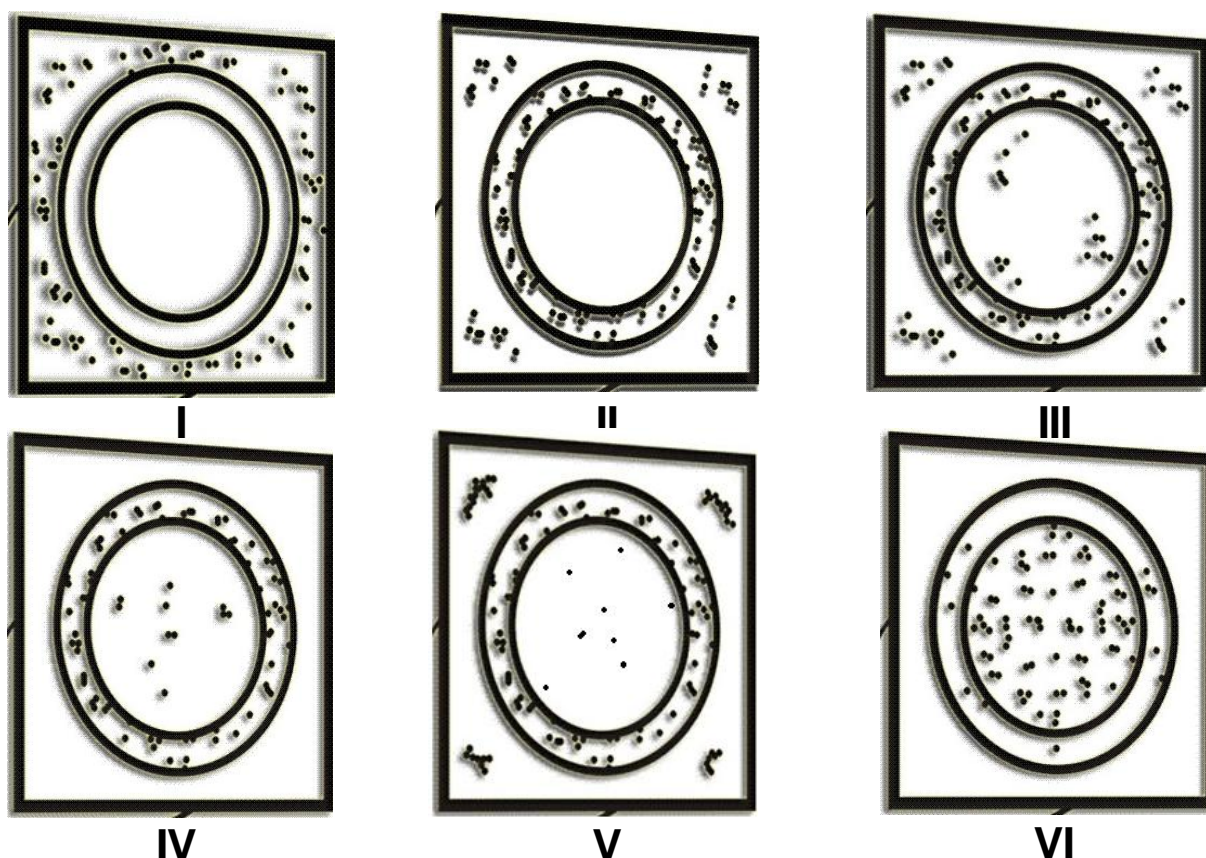


Figura 19. Partição dos fármacos nas formulações de nanocápsulas. I-  $NC_{ACV}$ ; II-  $NC_{MEL}$ ,  $NC_{DICONa}$ ;  $NC_{MTX}$ ; III –  $NC_{MTX(OEt)_{20,5}}$  IV -  $NC_{DICOH1}$ ;  $NC_{INDOH3}$ ; V -  $NC_{DICOH2}$ ;  $NC_{INDOH1}$ ; VI -  $NC_{INDOEt1}$ .

A representação da partição dos fármacos nos diferentes modelos seguiu a classificação estabelecida no algoritmo em que nas  $NC_{ACV}$ , o fármaco está totalmente dissolvido na fase aquosa, representada pelo balão I e assim, sucessivamente, até o balão VI, em que estão representadas as nanocápsulas de núcleo lipídico contendo éster etílico de indometacina, em que o fármaco encontra-se majoritariamente dissolvido na fase aquosa (Figura 19).





- A estratégia de aumento da lipofilia do MXT através de sua derivatização com etanol, formando o éster dietílico do MXT foi exitosa, tendo propiciado a diminuição de sua solubilidade em água com aumento de sua solubilidade na fase dispersa da suspensão de nanocápsulas de núcleo lipídico.
- A partir do algoritmo desenvolvido pode-se classificar os fármacos em diferentes grupos, considerando as suas partições nas pseudo-fases da suspensão de nanocápsulas de núcleo lipídico.
- O algoritmo proposto tem potencialidade de ser aplicado para uma ampla gama de moléculas. E, por meio dele podem-se propor diferentes mecanismos de encapsulações de fármacos com base nos resultados de solubilidade com e sem diluição e os respectivos logD das substâncias ativas.
- O modelo de encapsulação do metotrexato (amino-ácido) corresponde ao tipo II, onde a substância ativa se encontra dissolvida na fase aquosa e parcialmente adsorvida na parede polimérica, enquanto que o modelo de encapsulação para seu éster dietílico é classificado como do tipo III, onde a substância ativa encontra-se minoritariamente na fase aquosa e parcialmente adsorvido na parede polimérica e encapsulado no núcleo lipídico das NCL.



ALLARD, E.; PASSIRANI, C.; GARCION, E.; PIGEON, P.; VESSIÈRES, A.; JAOUEN, G.; BENOIT, J. Lipid nanocapsules loaded with an organometallic tamoxifen derivative as a novel drug-carrier system for experimental malignant gliomas. **Journal of Controlled Release**. V.130 P.146–153. 2008.

AMMOURY, N.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-Ph.; PUISIEUX, F.; BENITA, S. *In vitro* release kinetic pattern of indomethacin from poly(D,L-Lactide) nanocapsules. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 79. N.9. P. 763-767, 1990.

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

ARENDET, J. Importance and relevance of melatonin to human biological rhythms. **Journal of Neuroendocrinology**. V. 15. P. 427-431, 2003. BARRATT, G. M. Therapeutic Applications of Colloidal Drug Carriers. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, V. 3, n. 5, P. 163-171, 2000.

BECK, R.C.R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization. **Journal of Microencapsulation**. V. 21. N. 5. P. 499-512, 2004.

BECK, R.C.R.; HAAS, S. E.; GUTERRES, S. S.; RÉ, M. I.; BENVENUTTI, E. V.; POHLMANN, A. R. Nanoparticle-coated organic-inorganic microparticles: experimental design and gastrointestinal tolerance evaluation. **Química Nova**. V. 29. N. 5. P. 990-996, 2006.

BARRENETXE, J.; DELAGRANGE, P.; MARTINEZ, J.A. Physiological and metabolic functions of melatonin. **Journal of Physiology and Biochemistry**. V. 60. N. 1. P. 61-72, 2004.

BÉNÈS, L.; CLAUSTRAT, B.; HORRIÈRE, F.; GEORRIAU, M.; KONSIL, J.; PARROTT, K. A.; DEGRANDE, G. Transmucosal, oral controlled-release and transdermal drug administration in human subjects: A crossover study with melatonin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 86. N. 10. P. 1115-1119, 1997.

BERNARDI, A.; BRAGANHOL, E.; JÄGER, E.; FIGUEIRO, 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.

BERNARDI, A.; FROZZA, R. L.; JÄGER, E.; FIGUEIRÓ, F.; BAVARESCO, L.; SALBEGO, C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. O. Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: An in vitro study. **European Journal of Pharmacology**, v. 586, p. 24-34, 2008.

BERNARDI, A.; ZILBERSTEIN, A.; JÄGER, E.; CAMPOS, M. M.; MORRONE, F. B.; CALIXTO, J.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. O. Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, p. 1104-1111, 2009b.

BERTINO, J. R.; CRONSTEIN, B. N. **Methotrexate: historical aspects**. Nova Iorque. P. 1-2. 2000.

BONINI, F.; TROMBETA, D.; BORZI, A.; DE PASQUALE, A.; SAIJA, A. 1-ethylazacycloalkan-2-one indomethacin ethyl esters a new oral pro-drugs: chemical stability, enzymatic hydrolysis, anti-inflammatory activity and gastrointestinal toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 156. P. 245-250, 1997.

BOUTIN, J. A.; AUDINOT, V.; FERRY, G.; DELAGRANGE, P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. **Trends in Pharmacological Science**. V. 26. P. 412-419, 2005.

BRZEZINSKI, A. Melatonin in humans. **The New England Journal of Medicine**. V. 336. N. 3. P. 186-195, 1997.

CALABRESI, P., CHABNER, B.A. Chemotherapy of neoplastic diseases. In: Goodman, L.S., Gilman, A. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Ed: MacMillan, Nova Iorque. P. 1202–1227, 1991.

CALDERONE, V.; FIAMINGO, F. L.; GIORGI, I.; LEONARDI, M.; LIVI, O.; MARTELLI, A.; MARTINOTTI, E. Heterocyclic analogs of benzanilide derivatives as potassium channel activators. IX. **European Journal of Medicinal Chemistry**. V.41 P.761–767, 2006.

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

CASCONE, M.G.; LAZZERI, L.; CARMIGNANI, C.; ZHOUHAI, Z. Gelatin nanoparticles producer by a simple W/O emulsion as delivery system for methotrexate. **Journal of Materials science: Materials in medicine**. V. 13. P. 523-536, 2002.

CAVALLI, CIVRA, A.; FERRUTI, P.; RANUCCI, E.; TROTTA, F.; LEMBO, D. Enhanced antiviral activity of Acyclovir loaded into beta-cyclodextrin-poly(4-acryloylmorpholine) conjugate nanoparticles. **Journal of Control Release**. V. 137. N. 2. P.116-122, 2009.

CHAN, E. S. L.; CRONSTEIN, B. N. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. **Arthritis Research**. V. 4. P. 266-273, 2002.

CHEN, Y.; TSAI, C.; HUANG, P.; CHANG, M.; CHENG, P.; CHOU, C.; CHEN, D.; WANG, C.; SHIAU, A.; WU, C. Methotrexate Conjugated to Gold Nanoparticles Inhibits Tumor Growth in a Syngeneic Lung Tumor Model. **Molecular Pharmaceutics**. V. 4, N. 5, P. 713–722, 2007.

CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Medicine Reviews**. V. 9. P. 11-24, 2005.

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule Technology: A Review. **Therapeutic Drug Carrier Systems**. V. 19. N. 2. P. 99-134, 2002.

CRUZ, L., SOARES, L. U., DALLA COSTA, T., MEZZALIRA, G., SILVEIRA, N. P., GUTERRES, S. S., POHLMANN, A. R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**. V.313, P.198-205, 2006a.

CRUZ, L.; SCHAFFAZICK, S. R.; COSTA, T. D.; SOARES, L. U.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Physico-Chemical characterization and *in vivo* evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules by PCS, TEM, SAXS, interfacial alkaline hydrolysis and antiedematogenic activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, V. 6, P. 3154-3162, 2006b.

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

DAI, W. ZHANG, Y. DU, Z. RU, M. LANG, M. The pH-induced thermosensitive poly (NIPAAm-co-AAc-co-HEMA)-g-PCL micelles used as a drug Carrier. **Journal of Materials science: Materials in medicine**. V. 21 P.1881–1890, 2010.

DOMINGUES, S. G.; POLMANN, A.R.; BECK, R.C.R.; GUTERRES, S. Micropartículas nanorrevestidas contem um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química nova**. V. 31. N.8. P. 1966-1972, 2008.

DUBEY, V.; MISHRA, D.; ASTHANA, A.; JAIN, N. K. Transdermal delivery of a pineal hormone: Melatonin via elastic liposomes. **Biomaterials**. V. 27. P. 3491-3496, 2006.

EBADI, M.; GOVITRAPONG, P.; PHANSUWAN-PUJITO, P.; NELSON, F.; REITER, R. J. Pineal opioid receptors and analgesic action of melatonin. **Journal of Pinal Research**. V. 24. P. 193-200, 1998.

EL-GAMAL, M. I.; BAYOMI, S. M.; EL-ASHRY, S. M.; SAID, S. A; ABDEL-AZIZ, A. A.; ABDEL-AZIZ, N. I. Synthesis and anti-inflammatory activity of novel (substituted)benzylidene acetone oxime ether derivatives: Molecular modeling study. **European Journal of Medicinal Chemistry**. V. 45 P. 1403–1414,2010.

EL-GYBALI, I. Development and in vitro evaluation of novel floating chitosan microcapsules for oral use: comparison with non-floating chitosan microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 249. P. 7-21, 2002.

EL-GYBALI, I.; MEKI, A. M. A.; ABDEL-GHAFFAR, S. K. Novel B melatonin-loaded chitosan microcapsules: in vitro characterization and antiapoptosis efficacy for aflatoxin B1-induced apoptosis in rats liver. **International Journal of Pharmaceutics**. V.260. P. 5-22, 2003.

EPSTEIN, F. H. Mechanisms of disease – Melatonin in humans. **The New England Journal of Medicine**. V. 336. P. 186-195, 1997.

ESQUIFINO, A. I.; PANDI-PERUMAL, S. R.; CARDINALI, D. P. Circadian organization of the immune response: A role for melatonin. **Clinical and Applied Immunology Reviews**. V. 4. P. 423-433, 2004.

FAKLER B.; ADELMAN J. P. Control of K<sub>Ca</sub> Channels by Calcium Nano/Microdomains. **Neuron**. V. 59. P. 873-881. 2008.

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

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

FIEL, L.A. Espalhamento múltiplo de luz em temperatura variável: um método inovador para determinação dos parâmetros termodinâmicos de dispersões coloidais Dissertação pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio grande do Sul, 2010.

GALLARDO, M.; COURRAZE, G.; DENIZOT, B.; TREUPEL, L.; COUVREUR, P.; PUISIEUX, F. Study of the mechanisms of formation of nanoparticles and

nanocapsules of polyisobutyl-2-cyanoacrylate. **International Journal of Pharmacy**, v. 100, p. 55-64, 1993.

GARCIA-PATTERSON, A.; PUIG-DOMINGO, M.; WEBB, S. M. Thirty years of human pineal research: do we know its clinical relevance. **Journal of Pineal Research**. V. 20. P. 1-6, 1996.

GARLEA, A.; MELNIG, V.; POPA, M.I. Nanostructured chitosan–surfactant matrices as polyphenols nanocapsules template with zero order release kinetics. **Journal of Materials science: Materials in medicine**. V. 21 P. 1211–1223, 2010.

GENTA, I.; CONTI, B.; PERUGINI, P.; PAVANETTO, F.; SPADARO, A.; PUGLISI, G. Bioadhesive microspheres for ophtalmic administration of acyclovir, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. V. 49 P. 737–742, 1997.

GONZÁLEZ-RODRIGUEZ, M. L.; MAESTRELLI, F.; MURA, P.; RABASCO, A. M. *In vitro* release of sodium diclofenac from a central corematrix tablet aimed for colonic drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**., V. 20. P. 125-131, 2003.

GROSSIE, V. B., JR.; HO, D. H. W.; LOO, T. L. Effect of malnutrition on methotrexate toxicity and tissue levels of dihydrofolate reductase in the rat. **Cancer Treatment Report**, V.66 P. 85-89, 1982.

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

GUTERRES, S. S.; MÜLLER, C. R.; MICHALOWSKI, C. B.; POHLMANN, A. R.; DALLA COSTA, T. Gastrointestinal tolerance following oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. **S.T.P. Pharma Science**. V. 11. N. 3. P. 229-233, 2001.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. **Drugs Target Insights**. V. 2. P. 147-157, 2007.



HAMMADY, T.; EL-GINDYB, A.; LEJMIA, E.; DHANIKULAA, R.S.; MOREAUA, P.; HILDGEN, C, P. Characteristics and properties of nanospheres co-loaded with lipophilic and hydrophilic drug models. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 369 P. 185–195, 2009.

HARDELAND, r.; PANDI-PERUMAL, S. R.; CARDINALI, D. P. Molecules in focus: melatonin. **The International Journal of Biochemistry & cell Biology**. V. 38. P. 313-316, 2006.

HOFFMANN, H.; DITTGEN, M.; HOFFMANN, A.; BARTSCH, C.; BREITBARTH, H.; TIMPE, C.; FARKER, K.; SCHIMIDT, U.; MELLINGER, U.; ZIMMERMANN, H.; GRÄSER, T.; OETTEL, M. Evaluation of an oral pulsatile delivery system for melatonin in humans. **Pharmazie**. V. 53. N. 7. P. 462-466, 1998.

ICH- International Conference on Harmonization of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human use: Q2(R1)-Validation of Analytical procedures: methodology 2005.

INSEL, P.A. Substâncias analgésicas, antipiréticas e anti-inflamatórias; drogas empregadas no tratamento da artrite reumatóide e da gota. In: GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. (Eds). **Goldman and Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 8ª edição. RJ: Guanabara Koogan. Cap. 26. P.421-448, 1990.

JACOBS, J. W. G.; BIJLSMA, J. W.J. NSAIDs: a critical appraisal. **Netherlands Journal of Medicine**. V.51. P.198-204, 1997.

JÄGER, E., VENTURINI, C. G., POLETTO, F., COLOME, 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.

JÄGER, A., STEFANI, V., GUTERRES, S. S., POHLMANN, A. R. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal of Pharmaceutics**. V.338, P.297-305, 2007.

JAISWAL, J.; GUPTA, S. K.; KREUTER, J. Preparation of biodegradable cyclosporine nanoparticles by high-pressure emulsification-solvent evaporation process. **Journal of Controlled Release**. V. 96. P. 169–178, 2004.

JALÓN, E. G.; BLANCO-PRÍETO, M. J.; YGARTUA, P.; SANTOYO S. Topical application of acyclovir-loaded microparticles: quantification of the drug in porcine skin layers. **Journal of Controlled Release**. V. 75 P. 191–197, 2001.

JANTARAT, C.; TANGTHONG, N.; SONGKRO, S.; MARTIN, G. P.; SUEDEE, R. S-Propranolol imprinted polymer nanoparticle-on-microsphere composite porous cellulose membrane for the enantioselectively controlled delivery of racemic propranolol. **International Journal of Pharmaceutics**. P. 212–225. 2008.

JONES, M. C.; LEROUX, F.C. Polymeric micelles ± a new generation of colloidal drug carriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** V.48. P.101-111, 1999.

JOLIVET J, FAUCHER F, PINARD M. Influence of intracellular folates on methotrexate metabolism and cytotoxicity. **Biochemical Pharmacology**. V. 36 P. 3310–3312, 1987.

KAASGAARD, T.; ANDRESENA, T. L.; JENSENE, S. S.; HOLTEA, R. O.; JENSENA, L. T.; JØRGENSENA, K. Liposomes containing alkylated methotrexate analogues for phospholipase A2 mediated tumor targeted drug delivery. **Chemistry and Physics of Lipids**. V. 157, P. 94–103, 2009.

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

KENNEDY D, VAN DEN BERG H, CLARKE R. The effect of leucovorin on the synthesis of methotrexate polyglutamates in the MCF-7 human breast cancer cell line. **Biochemical Pharmacology**. V. 34 P. 2897–2903, 1985.

KIM, D.-K.; LEE, N.; IM, G.-J.; KIM H.-T.; KIM, K.H. Synthesis and evaluation of 2-amino-6-fluoro-9-(2-hydroxyethoxymethyl)purine esters as potential prodrugs of acyclovir **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. V. 6. P. 2525–2530, 1998a.

KIM, S. J.; KIM N. S.; RYU C. J.; HONG H.J.; LEE G.M. Characterization of chimeric antibody producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure. **Biothecnology Bioengineer**. V. 58. P.73-84. 1998b.

KOUROUNAKIS, P.N.; TSIAKITZIS, K.; KOUROUNAKIS, A. P.; GALANAKIS, D. Reduction of gastrointestinal toxicity of NSAIDs via molecular modifications leading to antioxidant anti-inflammatory drugs. **Toxicology**. V. 144. P. 205-210, 2000.

KUKOWSKA-LATALLO, J.F.; CANDIDO, K.A.; CAO, Z.; NIGAVEKAR, S.S.; MAJOROS, I.J.; THOMAS, T.P.; BALOGH, L.P.; KHAN, M.K.; BAKER JR., J.R. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. **Cancer Research**. V.65, P.5317–5324, 2005.

KULKARNI, A. R.; SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M. Urea-formaldehyde Nanocapsules for the Controlled Release of Diclofenac Sodium. **Journal Of Microencapsulation**, V. 17, N. 4, P.449, 2000.

KUMAR, M.N.V.R. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmacology and Pharmaceutics Science**. V. 3. P. 234-258, 2000.

LEE, B-J.; RYU, S-G.; CUI, J-H. Formulatoin and release characteristicsof hydroxypropyl methylcellulose matrix tablet containing melatonin. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. V. 25. N. 4. P. 493-501, 1999.

LIM, S-J.; KIM, C-K. Formulation parameters determining the physiochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid **International Jounal of Pharmaceutics**., V. 243. P. 135-146. 2002.

LIU, S.; ZHANG, Z.; HAN, M-Y. Nanometer-sized gold-loaded gelatin/silica nanocapsules. **Advanced Materiais**. V. 17. P.1862-1866 , 2005.

LIU,K.; CHEN, S.; LIU, D.; LIU, T. Self-Assembled Hollow Nanocapsule from Amphiphatic Carboxymethyl-hexanoyl Chitosan as Drug Carrier. **Macromolecules**. V. 41. P. 6511-6516, 2008.

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

LOSA, C.; MARCHAL-HEUSSLER, L.; ORALLO, F.; VILA JATO, J.L.; ALONSO, M. **Pharmaceutical Research**. V. 10. P. 80-87,1993.

MADDEN, T.; EATON, V. E. Methotrexate. In: SCHUMACHER, E. G. editor. Therapeutic drug monitoring. **Norwalk: Appleton Lage**. P. 527-553, 1995.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticles Characterization: A Comprehensive Physicochemical Approach. **S.T.P. Pharma Sciences**, V. 1, n. 4, P. 221-241, 1991.

MARCHAL-HEUSSLER, L.; MAICENT, P.; HOFFMAN, M.; SPITTLER, J.; COUVREUR, P. Antiglaucomatous Activity of Betaxolol Chlorhydrate Sorbed onto Different Isobutylcyanoacrylate Nanoparticle Preparation. **International Journal of Pharmaceutics**, V. 58, P. 115-122, 1990.

MAYER, C.; HOFFMANN, D.; WOHLGEMUTH, M. Structural Analysis of Nanocapsules by Nuclear Magnetic Resonance. **International Journal of Pharmaceutics**, V. 242, P. 37-46, 2002.

MIHRANIAN, M. H.; WANG, Y. M.; DALY, J. M. Effects of nutritional depletion and repletion on plasma methotrexate pharmacokinetics. **Cancer**. V. 54, P. 2268-2271, 1984.

MIQUEL, J.; ECONOMOS, A. C.; FLEMING, J.; JOHNSON Jr, J. E. Mitochondrial role in cell aging. **Experimental Gerontology**. V.15, N. 6. P.575-591, 1980.

MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymeric-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 385. P. 113-142, 2010.

MOTWANI, S. K.; CHOPRA, S.; TALEGAONKAR, S.; KOHLI, K.; AHMAD, F. J.; KHAR,R. K. Chitosan–sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimization and in vitro characterisation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. V.68 P. 513–525, 2008.

MU, L.; SEON, P-H.; ANG, S-H.; FENG, S-S. Study on surfactant coating of polymeric nanoparticles for controlled delivery of anticancer drug. **Colloid and Polymer Science**, V. 283, P. 58-65, 2004.

MÜLLER, C. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA COSTA, T.; PESCE DA SILVEIRA, N.; DE LUCCA FREITAS, L.; GUTERRES, S. S. Spray-dried diclofenac-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres. preparation and physicochemical characterization. **Pharmazie**, V. 56, P. 864–867, 2001.

OBERLE, R. L.; DAS, H.; WONG, S. L.; CHAN, K. K. H.; SAWCHUK, R. J. Pharmacokinetics and metabolism of diclofenac sodium in yucatan miniature pigs. **Pharmaceutical Research**. V.11. P. 698-703, 1994.

O'BRIEN, J. J.; CAMPOLI-RICHARDS, D. M. Acyclovir. An updated review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy, **Drugs** V. 37 P. 233–309, 1989.

PATEL Z. S. L.; UEDA H.; YAMAMOTO M.; TABATA Y.; MIKOS A. G. Vivo Release of Vascular Endothelial Growth Factor from Gelatin Microparticles and Biodegradable Composite Scaffolds. **Pharmaceutical Research**, V. 25. n.10. 2008.

PÉRIGAUD, C.; GOSSELIN, G.; GIRARDET, J.-L.; KORBA, B.E.; IMBACH, J.-L. The S-acyl-2-thioethyl pronucleotide approach applied to acyclovir. Part I. Synthesis and in vitro anti-hepatitis B virus activity of bis(S-acyl-2-thioethyl)phosphotriester derivatives of acyclovir. **Antiviral Research**.. V. 40 P. 167–178, 1999.

PESKAR, B. M. Role of cyclooxygenase isoforms in gastrical mucosal defense. **Journal of Physiology of Paris**. V. 95. P. 3-9. 2001.

POHLMANN, A. R., SOARES, L. U., CRUZ, L., PESCE DA SILVEIRA, N., GUTERRES, S. S. Alkaline hydrolysis as a tool to determine the association form of indomethacin in nanocapsules prepared with poly( $\epsilon$ -caprolactone). **Current Drug Delivery**. V.1, P.103-110, 2004.

POHLMANN, A. R.; MEZZALIRA, G.; VENTURINI, C. G.; CRUZ, L.; BERNARDI, A.; JÄGER, E.; BATTASTINI, A. O.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. Determining the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-loaded polymeric nanocapsule aqueous suspensions: A relation between light scattering and drug content. **International Journal of Pharmaceutics**, V. 359, P.288-293, 2008.

POLETTI, F. S. JAGER, E., CRUZ, L., POHLMANN, A. R., GUTERRES, S. S. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. **Materials Science and Engineering**. V, 28, P.472, 2008.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMAN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 12, p. 1113-1128, 1998.

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

RAMTEKE, S.; GANESH, N.; BHATTACHARYA, S.; JAIN, N. Triple therapy-based targeted nanoparticles for the treatment of Helicobacter pylori. **Journal of drug Targeting**. V.16., P. 694-705, 2008.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4<sup>a</sup> ed. RJ. Guanabara Koogan, 2001.

REITER, R. J.; TAN, D-X.; BURKHARDT, S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: Amelioration with melatonin. **Mechanism of Aging and Development**. V. 123. P. 1007-1019, 2002.

REITER, R. J. Melatonin: clinical relevance. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism**. V. 17. P. 273-285, 2003.

REYNOLDS, J. (Ed). **Martindale: the extra pharmacopoeia**. 30. ed. London: Pharmaceutical, 1993.

ROBERTS II, L. J.; MORROW, J. D. Analgesic-antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. (Eds). **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10. ed. USA: McGraw-Hill, 2001. cap. 27, p. 687-731.

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

RUBINO, F. M.; Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. **Journal Chromatografic Science**. V. 764: P.217-254. 2001.

RUIZ-IRASTORZA, G.; KHAMASHTA, M. A.; CASTELLINO, G.; HUGHES, G. R. Systemic lupus erythematosus. **Lancet**. V. 357. P. 1027-1032, 2001.

SANTANDER-ORTEGA, M.; LOZANO-LÓPEZ, M. V.; BASTOS-GONZÁLEZ, D.; PEULA-GARCÍA, J. M.; ORTEGA-VINUESA, J. L. Novel core-shell lipid-chitosan and lipid-poloxamer nanocapsules: stability by hydration forces. **Colloid and Polymer Science**. V. 288 P. 159–172, 2010.

SARTORI, T. Preparação e caracterização de nanopartículas contendo metotrexato. Avaliação da estabilidade e viabilidade do tecido corneal após administração tópica ocular. Florianópolis. Dissertação (Mestrado na área de fármaco medicamento) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

SARTORI, T.; SEIGI, M. F.; PINHEIRO, C. A.; MACHADO, C. A. Development and validation of a fast RP-HPLC method for determination of methotrexate entrapment efficiency in polymeric nanocapsules. **Journal of Chromatographic Science**. V. 46 N. 6 P. 505-509, 2008.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. V. 21, Nº 2, P.99-106, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**. V. 26, Nº 5, P.726-737, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; CORDOVA, C. A. S.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; GUTERRES, S. S. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 289 P. 209–213, 2005.

SCHRODER, O.; STEIN, J. Low dose methotrexate in inflammatory bowel disease: current status and future directions. **American Journal of Gastroenterology**. V. 98. P. 530-537, 2003.

SCHNABEL A, GROSS W. Low-dose methotrexate in rheumatic diseases efficacy, side effects, and risk factors for side effects. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. V. 23 N. 5 P.310–27, 1994.

SEO, D.; JEONG, Y.; KIM, D.; JANG, M.; JANG, M.; NAH, J. Methotrexate-incorporated polymeric micelles composed of methoxy poly(ethylene glycol)-grafted chitosan. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. V. 69 P.157–163, 2009.

SMOLENSKA, Z.; KASNOWSKA, Z.; ZARÓWNY, D.; SIMMONDS, H. A.; SMOLENSKI, R. T. Effect of methotrexate on blood purine and pyrimidine levels in patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology**. V. 38. P. 997-1002, 1999.

SRINATH, P.; DIWAN, P. V. Pharmacodynamic and pharmacokinetic and evaluation of lipid microspheres of indomethacin. **Pharm Acta Helvetiae**. V. 73. P. 199-203, 1998.



SOARES, L. Estudo Comparativo da Difusão do Éster Etilico de Indometacina Associado a Nanocápsulas, Nanoesferas ou Nanoemulsão Através de sua Hidrólise Alcalina. Dissertação pelo Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

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

SPINELLA, M. J.; BRIGLE, K. E.; FREEMANTLE, S. J.; SIERRA, E. E.; GOLDMAN, I. D.; Comparison of methotrexate poliglutamylation in L1210 leukemia cells when influx is mediated by the reduced folate carrier or the folate receptor. **Biochemical Pharmacology**. V. 52. P. 703-712, 1996.

STAMP, L.; ROBERTS, R.; KENNEDY, M.; BARCLAY, M.; O'DONNELL, J.; CHAPMAN, P. The use of low dose methotrexate in rheumatoid arthritis – are we entering a new era of therapeutic drug monitoring and pharmacogenomics? **Biomedicine and Pharmacotherapy**. V. 60. P. 678-687, 2006.

STELLA, B.; ARPICCO, S.; ROCCO F.; MARSAUD, V.; RENOIR, J-M.; CATTEL, L.; COUVREUR, P. Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics** V. 344. P. 71–77, 2007.

STULZER, H. K.; TAGLIARI, M. P.; PARIZE, A. L.; SILVA, M. A. S.; LARANJEIRA, M. C. M. Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing acyclovir obtained by spray-drying. **Materials Science and Engineering C**. V. 29 P. 387–392, 2009.

TAKEDA, M.; KHAMADANG, S.; NARIKAWA, S.; KIMURA, H.; HOSOYAMADA, M.; HO CHA, S.; SEKIRE, T.; ENDOU, H. Characterization of methotrexate transport and its drug interactions with human organic anion transporters. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. V. 302. P. 666-671, 2002.

THIES, C. A survey of microencapsulation processes. In: BENITA, S. **Microencapsulation: methods and industrial applications**. 10<sup>a</sup> ed. Nova Iorque: Marcel Dekker. Cap. 1. P. 1-19, 1996.

TROTTA, M.; PEIRA, E.; CARLOTTI, M. E.; GALLARATE, M. Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 270 P. 119–125, 2004.

WAGSTAFF, A.J.; FAULDS, D.; GOA, K.L., Aciclovir. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy, **Drugs** V. 47, P.. 153–205, 1994.

WANG, J-J.; LIU, K-S.; SUNG, K.C.; TSAI, C.-Y.; FANG, J-Y. Lipid nanoparticles with different oil/fatty ester ratios as carriers of buprenorphine and its prodrugs for injection. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 38 P. 138–146, 2009.

VEISEH, O.; KIEVIT, F. M.; GUNN, J. W.; RATNER, B. D.; ZHANG, M. A ligand-mediated nanovector for targeted gene delivery and transfection in cancer cells. **Biomaterials**. V.30, P.649-657, 2009.

VEZMAR, S.; BECKER, A.; BODE, U.; JAEHDE, U. Biochemical and clinical, aspects of methotrexate neurotoxicity. **Chemotherapy**. V. 49. P. 92-104, 2003.

VOLPATO, N.M.; SANTI, P.; COLOMBO, P. Iontophoresis enhances the transport of acyclovir through nude mouse skin by electrorepulsion and electroosmosis, **Pharmaceutical Research**. V. 12 P. 1623–1627, 1995

YANG, Y.; CAI, J.; ZHUANG, X.; GUO, Z.; JING, X.; CHEN, X. pH-dependent self-assembly of amphiphilic poly(L-glutamic acid)-block-poly-(lactic-co-glycolic acid) copolymers. **POLYMER**. V. 51 P. 2676-2682, 2010.

ZENG, H.; CHEN, Z. S.; BELINSKY, M. G.; REA, P.; A.; KRUIH, G. D. Transport of methotrexate (MTX) and folates by multidrug resistance protein (MRP) 3 and MRP1: effect of polyglutamylation on MTX transport. **Cancer Research**. V. 61. P. 7225-7232, 2001.

ZIELENKIEWICZ, W.; KOZBIAŁ, M.; GOLANKIEWICZ, B.; POZNANSKI, J. Enhancement of aqueous solubility of tricyclic acyclovir derivatives by their complexation with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. V. 101. N. 2. P. 555-560, 2010.