

**Universidade Federal de Ouro Preto**  
**Escola de Farmácia**  
**Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**Desenvolvimento, caracterização e liofilização  
de nanopartículas e encapsulamento de  
antibiótico de uso veterinário**

**Raquel Silva Araújo**

**Ouro Preto - MG**

**2009**

**Universidade Federal de Ouro Preto**  
**Escola de Farmácia**  
**Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**Desenvolvimento, caracterização e liofilização de  
nanopartículas e encapsulamento de antibiótico  
de uso veterinário**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito essencial à obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Vanessa Carla F. Mosqueira

**Ouro Preto - MG**

**2009**

**Local de realização do projeto:**

Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanotecnologia/ Departamento de Farmácia – Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

**Este trabalho contou com a colaboração de:**

Humberto de Mello Brandão

**Embrapa-Gado de Leite, Juiz de Fora, MG**

Dra. Margareth Spangler de Andrade

**Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, CETEC- MG**

Dr. José Mário Carneiro Vilela

**Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, CETEC- MG**

Dra. Eunice Kazue

**Departamento de Farmácia – UFOP**

Dra. Mônica Cristina Oliveira

**Departamento de Produtos Farmacêuticos - UFMG**

## DEDICATÓRIA

*Eu dedico este trabalho aos meus pais,  
Magna e José Raimundo,  
meus alicerces nessa vida, que me deram condições para que eu  
seguisse em frente na realização deste trabalho.  
Agradeço por acreditarem em mim.*

*Ao meu irmão Rafa sempre presente.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Vanessa pela orientação deste trabalho o qual me introduziu no mundo das nanopartículas, pela paciência, por esclarecer minhas dúvidas. E acima de tudo, por ter compartilhado comigo da sua experiência e conhecimentos científicos e pela sua amizade.

À Escola de Farmácia de Ouro Preto pela formação e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelas contribuições na minha formação profissional.

À Universidade Federal de Ouro Preto pela bolsa que foi importante para a realização deste trabalho.

Ao Humberto de Mello Brandão da Empraba - Gado de Leite, especialmente pelos materiais fornecidos para execução deste trabalho.

À Dra. Margareth Spangler, pela oportunidade de realização dos experimentos de microscopia de força atômica (MFA) no Centro tecnológico de Minas Gerais (CETEC) e ao Dr. Vilela pela colaboração na execução das imagens de MFA, pela dedicação e paciência.

Ao Professor Leonardo Lagoeiro do Laboratório de Microscopia/DEGEO/UFOP pela disponibilização do MEV, em especial à sua doutoranda Paola pela ajuda.

À professora Mônica Oliveira do Depto. de Produtos Farmacêuticos da UFMG pela colaboração nos experimentos de DSC e à sua doutoranda Elaine Leite pelo auxílio no uso do Zetasizer.

À Dr<sup>a</sup> Ilza Damazio pela paciência nos testes iniciais no HPLC.

À Dr<sup>a</sup> Eunice pela valiosa colaboração nos testes do HPLC.

Ao apoio financeiro da FAPEMIG e da Rede NANOBIOIMG/FAPEMIG que contribuiu para a realização deste trabalho.

À minha primeira orientadora de iniciação científica, Prof Dra Juliana Fietto, que me introduziu na pesquisa científica; e aos professores Ieso e Rogélio pela oportunidade de trabalhar no LBCM, laboratório que teve a gentileza de fornecer parte do nitrogênio líquido deste trabalho. E à Zezé pela disponibilidade sempre.

A todos os colegas do laboratório, com quem partilhei momentos de alegrias, ansiedades e descontração nos últimos tempos: Pollyana e Carina pela ajuda inicial. Ao Diego. Aos alunos Flávia, Giani, Alice, Raquel C. À Taynara pela ajuda na determinação de tamanho das partículas.

À minha colega de laboratório Líliam em especial, pela amizade conquistada, discussões científicas e ajuda nos momentos difíceis. Muito obrigada!

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo convívio, em especial à minha turma. À Paola, Gleicieli, Renata Branquinho e Patrícia, pelo companheirismo.

Aos funcionários desta Escola, em especial, aos porteiros mais especialmente aos do turno noturno pela atenção.

Aos anjos da guarda que apareceram no meu caminho: Luis e Zé Américo.

Agradeço às minhas amigas de longa data: Natália, Mila, Carol e Luana pelo carinho, paciência, palavras amigas e apoio tanto nos momentos fáceis quanto nos difíceis.

Aos meus pais e meu irmão pela compreensão, paciência, amor, generosidade, carinho, amizade e apoio em mais uma etapa da minha vida.

A toda minha família, em especial à minha avó Naná e tia Carminha por me ajudarem nos meus sonhos. À tia Lourdinha pelas hospedagens em BH, pelo carinho, amizade e por acreditar em mim.

E a todas as pessoas a quem não me referi, mas que sempre estiveram presentes com um sorriso e uma palavra amiga.

E acima de tudo agradeço a Deus e Santa Rita por terem me ajudado nos momentos difíceis e por chegar até aqui.

## Sumário

<b>RESUMO</b> .....	xvii
<b>ABSTRACT</b> .....	xix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xiv
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	xv
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	2
<b>CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA</b>	
<b>Liofilização de nanopartículas utilizando duas condições de congelamento</b> .....	7
1.1. Importância da secagem de suspensões nanoparticuladas.....	8
1.2. Spray drying.....	9
1.3. Liofilização.....	9
1.3.1. Crioprotetores.....	12
1.3.2. Novo crioprotetor: Polidextrose.....	14
1.3.3. Nanopartículas liofilizadas.....	15
1.3.3.1. Metodologia de preparo.....	18
1.4. Caracterização físico-química.....	19
1.4.1. Avaliação morfológica.....	21
1.4.2. Tamanho das partículas.....	22
1.4.3. Potencial zeta.....	22
<b>OBJETIVOS</b> .....	25
Objetivo Geral.....	25
Objetivos Específicos.....	25
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
2.1. Materiais.....	26

2.2. Preparação e caracterização físico-química.....	26
2.2.1. Preparação das nanopartículas.....	26
2.3. Liofilização.....	27
2.4. Caracterização.....	28
2.4.1. Análise de tamanho e potencial zeta.....	28
2.4.2. Análise da morfologia.....	28
2.4.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	29
2.4.4. Estatística.....	29
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
3.1. Análise da distribuição de tamanho e potencial zeta.....	30
3.2. Análise morfológica: microscopias de força atômica e eletrônica de varredura.....	38
3.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	44
Conclusão capítulo 1.....	49
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>50</b>
<b>CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA</b>	
Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas contendo cloxacilina.....	56
1.1. Aplicabilidade das nanoestruturas.....	57
1.2. Cloxacilina Benzatina.....	60
1.3. Vetores.....	61
1.4. Nanocápsulas.....	62
1.5. Nanocápsulas revestidas com quitosana.....	64
1.6. Teor de encapsulação.....	66
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>68</b>
Objetivo geral.....	68
Objetivo específico.....	68
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>69</b>
2.1. Materiais.....	69

2.2. Preparação da quitosana solúvel em água .....	69
2.3. Estudo da solubilidade da CLOXB em solventes e óleos.....	70
2.4. Preparação das nanocápsulas.....	70
2.5. Caracterização físico-química das nanocápsulas de cloxacilina benzatina.....	72
2.5.1. Análise de tamanho e potencial zeta.....	72
2.5.2. Análise da morfologia.....	72
2.6. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por cromatografia de alta eficiência (CLAE) para o doseamento da cloxacilina benzatina.....	73
2.6.1. Condições cromatográficas.....	73
2.6.2. Curvas analíticas da cloxacilina.....	73
2.6.3. Seletividade e especificidade.....	74
2.6.4. Precisão.....	74
2.6.5. Exatidão.....	74
2.7. Determinação do teor do fármaco encapsulado por CLAE.....	75
2.8. Determinação da cinética de liberação <i>in vitro</i> .....	76
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
3.1 Caracterização físico-química das nanocápsulas de cloxacilina benzatina.....	78
3.1.1. Solubilidade da CLOXB em solventes e óleos.....	78
3.1.2. Análise da distribuição de tamanho e potencial zeta.....	79
3.1.3. Análise da morfologia.....	82
3.2. Validação da metodologia de doseamento da cloxacilina benzatina por CLAE.....	87
3.2.1. Condições cromatográficas.....	87
3.2.2. Especificidade e seletividade.....	87
3.2.3. Linearidade.....	89
3.2.4. Exatidão.....	91
3.3. Eficiência de encapsulação.....	92

3.4. Cinética de liberação <i>in vitro</i> .....	93
Conclusões do capítulo 2.....	97
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	99
<b>ANEXOS</b> .....	109

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 1.1.	Fases da água.....	10
Figura 1.2.	Esquema do liofilizador e secagem.....	11
Figura 1.3.	Esquema de possíveis instabilidades que podem ocorrer durante o congelamento de nanoesferas e nanocápsulas.....	12
Figura 1.4.	Estrutura química da povidona.....	14
Figura 1.5.	Estrutura de poliésteres.....	18
Figura 1.6.	Desenho esquemático dos componentes de um microscópio de força atômica.....	20
Figura 1.7.	Esquema do funcionamento do ECF.....	23
Figura 1.8.	Representação de uma partícula de superfície positiva com uma camada de íons negativos adsorvidos na camada de Stern.....	24
Figura 1.9.	Imagem de MFA de nanoesferas antes da liofilização.....	38
Figura 1.10.	Imagem tridimensional de nanoesferas congeladas em nitrogênio líquido com 80% de povidona e posteriormente liofilizadas (A) e nanoesferas congeladas a -80°C com 80% de povidona e posteriormente liofilizadas (- 80°C) (B), após redispersão em água.....	39
Figura 1.11.	Imagens de MFA em modo contínuo (tapping mode) de nanoesferas liofilizadas (-80°C) depois de reconstituídas em água. Imagem da esquerda mostra altura e a da direita imagem de fase ou amplitude. (A)NS0,5G-amplitude, (B)NS2G-fase, (C)NS0,5S-amplitude (D)NS1S-amplitude, (E)NS2S-fase. Escala: 10x10 µm (imagens A, C, E) e 5x5 µm (imagens B, D).....	40
Figura 1.12.	Imagens de MFA em modo contínuo (tapping mode) de nanoesferas liofilizadas (nitrogênio líquido) depois de reconstituídas em água. Imagens de altura. (A)NS2G, (B)NS0,5S. Escala: 10x10 µm.....	42
Figura 1.13.	Micrografia de nanoesferas liofilizadas com 10% de sacarose (NS 1S) – congeladas em nitrogênio líquido (A); Micrografia de nanoesferas liofilizadas congeladas a -80°C: NS 0,5S (B), NS 0,5G (C) e NS 2P (D).....	44
Figura 1.14.	Termograma geral.....	45
Figura 1.15.	Termograma ampliado de -50 a 60°C.....	46
Figura 1.16.	Termograma ampliado de 100 a 180°C.....	46

### Capítulo 2

Figura 2.1.	Esquema da glândula mamária.....	58
Figura 2.2.	Estrutura química da cloxacilina benzatina.....	61
Figura 2.3.	Esquema dos vetores.....	62
Figura 2.4.	Estrutura molecular da quitosana.....	64
Figura 2.5.	Esquema do preparo da quitosana solúvel em água.....	70

Figura 2.6.	Figura ilustrativa da montagem do teste de liberação <i>in vitro</i> a 37°C de CLOXB das NC, contendo diferentes concentrações em salina tamponada com 1% de leite ou PEG em condições sink.....	77
Figura 2.7	Representação esquemática de nanocápsulas brancas e com fármaco mostrando a possível associação da CLOXB nas NC.....	81
Figura 2.8	Imagem MFA no software “section analysis” mostrando altura(Vert distance) e tamanho(Horiz distance). (A) NC PCL branca e (B) NC PCL 0,5 mg/mL.....	83
Figura 2.9	Imagem MFA no software “section analysis” mostrando altura (Vert distance) e tamanho (Horiz distance). (A) NC branca e (B) NC 2,5 mg/mL.....	84
Figura 2.10	Imagens de MFA em modo contínuo (tapping mode) de NC-PCL. Imagem de altura. (A) NC branca (B) NC0,5 mg/mL. Escala: 5x5 µm.....	85
Figura 2.11	Imagens de MFA em modo contínuo (tapping mode) de NC-PCL-QUIT. Imagem da esquerda mostra altura e a da direita imagem de fase (A e C) e amplitude (B). (A) NC-PCL-QUIT branca; (B) NC-PCL-QUIT 2,5 mg/mL; (C) NC-PCL-QUIT 5mg/mL. Escala: 10x10 µm.....	86
Figura 2.12	Espectro na região do UV apresentando o pico de absorção máxima da CLOXB em 225 nm.....	88
Figura 2.13	Curva de calibração da CLOX. (A) em acetonitrila para ensaios de dissolução; (B) em 50:50. acetonitrila:tampão pH~3,4 para ensaios de eficiência de encapsulação. Comprimento de onda de 225 nm; R <sup>2</sup> = coeficiente de correlação.....	89
Figura 2.14	Perfil de liberação <i>in vitro</i> de NC a 37°C contendo diferentes concentrações de CLOXB em salina tamponada em condições sink (10% da solubilidade máxima no meio) em meio contendo 1% de PEG (A) e 1% leite (B).....	93
Figura 2.15	Perfil de liberação da CLOXB <i>in vitro</i> a 37°C em meio PBS contendo 1% de PEG (azul) e 1% leite (vermelho) a partir de cloxacilina livre e das formulações de NC de PCL 0,5mg e NC PLC-QUIT 2,5mg em condições sink (10% da solubilidade máxima no meio).....	95

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1.	Formulações vetorizadas submetidas à liofilização.....	16
Tabela 1.2.	Formulações.....	27
Tabela 1.3.	Caracterização físico-química das NS congeladas a -80°C e liofilizadas por 24hs.....	30
Tabela 1.4.	Caracterização físico-química das NS congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas por 24hs.....	31
Tabela 1.5.	Caracterização físico-química das NC congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas por 24hs.....	33
Tabela 1.6.	Análise comparativa de tamanho de NS e NC redispersas depois de liofilizar (Tf) em relação ao tamanho inicial (Ti) e proporções de índice de polidispersão de nanoesferas reconstituídas depois de liofilizar (IPf) em relação ao IP inicial (IPi) por duas técnicas diferentes.....	34
Tabela 1.7.	Medida do potencial zeta.....	37
Tabela 2.1.	Emprego da quitosana em diversas áreas.....	65
Tabela 2.2.	Emprego da quitosana em nanopartículas.....	66
Tabela 2.3.	Natureza e concentração dos constituintes das NC.....	78
Tabela 2.4.	Análise do tamanho e potencial zeta das NC contendo diferentes concentrações de cloxacilina benzatina.....	79
Tabela 2.5.	Medidas de tamanho médio das NC obtidas pelas técnicas de ECF e MFA.....	82
Tabela 2.6.	Valores de absorbância média da CLOXB em função de sua concentração em acetonitrila: tampão fosfato pH=3 (50:50).....	90
Tabela 2.7.	Valores de absorbância média da CLOXB em função de sua concentração em acetonitrila.....	91
Tabela 2.8.	Exatidão do método de determinação da CLOXB.....	91
Tabela 2.9.	Eficiência e rendimento de encapsulação das NC contendo diferentes concentrações de CLOXB.....	92
Tabela 2.10.	Solubilidade da CLOX em diferentes meios.....	93

## Lista abreviaturas

$\zeta$  – Potencial zeta

**ALD** – Anemometria do Laser Doppler

**CETEC-MG** - Centro Tecnológico de Minas Gerais

**CLAE** - Cromatografia líquida de alta eficiência

**CLOX** – Cloxacilina

**CLOXB** - Cloxacilina benzatina

**CV** - Coeficiente de variação

**Da** – Dalton

**kDa** - kiloDaltons

**DNA** – Ácido desoxirribonucléico

**DP** – Desvio padrão

**ECF** – Espectroscopia de correlação de fótons

**EE** – Eficiência de encapsulação

**HPLC** – “High Performance Liquid Chromatography” ou cromatografia líquida de alta eficiência

**iv** – Via Intravenosa

**IP** – índice de polidispersão

**MET** – Microscopia eletrônica de transmissão

**MEV** – Microscopia eletrônica de varredura

**MFA** – Microscopia de Força Atômica

**m/v** – Massa por volume

**MM** – Massa molar

**NC** – Nanocápsulas

**NC-PCL** - Nanocápsula de poli- $\epsilon$ -caprolactona convencional

**NC-PCL-QUIT** - Nanocápsula de poli- $\epsilon$ -caprolactona revestida com quitosana

**NE** – Nanoemulsões

**NS** – Nanoesferas

**PBS** – salina tamponada

**PCL** – Poli-ε-caprolactona  
**PEG** – Polietilenoglicol  
**PLG** – ácido poliglicólico  
**PLGA** – Ácido poli-lático-co-glicólico  
**pH** – Potencial hidrogeniônico  
**PI** – Índice de polidispersão  
**PLA** – Ácido polilático  
**PM** – Peso molecular  
**PVP**- polivinilpirrolidona  
**R<sup>2</sup>** – Coeficiente de correlação  
**rpm** – Rotações por minuto  
**SFM** – Sistema fagocitário mononuclear  
**UV** – Ultravioleta

## RESUMO

Na primeira parte deste trabalho foi avaliado o processo de liofilização de nanoesferas e nanocápsulas, utilizando-se vários crioprotetores e duas condições de congelamento, tendo como parâmetro de investigação a eficiência do método na manutenção da distribuição de tamanho inicial. Diferentes crioprotetores como glicose, sacarose, manitol e polidextrose, e concentrações foram utilizadas. A distribuição de tamanho das nanopartículas e o índice de polidispersão foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons e a morfologia por microscopia de força atômica e eletrônica de varredura. As nanopartículas preparadas apresentaram-se com tamanho inferior a 300 nm e monodispersas. As amostras liofilizadas em presença de 5% (p/v) de sacarose forneceram como resultados de relação tamanho final/inicial valores de  $T_f/T_i=0,981$  e  $T_f/T_i=0,995$  a  $-80^\circ\text{C}$  e a  $-196^\circ\text{C}$ , respectivamente. Estudos por calorimetria diferencial exploratória confirmaram o efeito da sacarose sobre a interação entre tensioativos e polímeros na estrutura das nanoesferas. O uso da polidextrose, como novo crioprotetor forneceu valores adequados de  $T_f/T_i=1,006$ , possibilitando a produção de nanoesferas liofilizadas na ausência de mono e dissacarídeos. O uso de sacarose a 10% (p/v) forneceu resultados adequados  $T_f/T_i=1,059$  para nanocápsulas. Formulações nanoestruturadas contendo cloxacilina benzatina, um antimicrobiano de uso veterinário, foram desenvolvidas e caracterizadas. Uma nova metodologia de doseamento da cloxacilina benzatina por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvida e utilizada para determinação do fármaco em amostras contendo nanopartículas e outros componentes. A porcentagem de encapsulação foi de 37 e 87% para nanocápsulas de policaprolactona e de policaprolactona revestida com quitosana, respectivamente. O potencial zeta foi significativamente alterado pela presença de concentrações crescentes do fármaco evidenciando sua adsorção à superfície das nanopartículas. O perfil de liberação da cloxacilina benzatina a partir dos carreadores em condições *sink*, indicou uma maior eficiência na retenção do fármaco pelas nanocápsulas de policaprolactona e um perfil de

liberação prolongado nas primeiras 6 horas, seguido de retenção por mais 42 horas. As nanocápsulas de policaprolactona revestidas com quitosana liberaram mais rapidamente a cloxacilina benzatina em meio contendo leite em relação às nanocápsulas de policaprolactona.

## ABSTRACT

In this work, the process of freeze-drying of nanocapsules and nanospheres was evaluated using a range of cryoprotectors and two freezing conditions, evaluating their efficiency by the ability of maintaining the initial size distribution. The cryoprotectors, glucose, sucrose, mannitol and polydextrose, and different concentrations were used. The size distribution of poly- $\epsilon$ -caprolactone nanoparticles was determined by photon correlation spectroscopy and the morphology by atomic force microscopy and scanning electron microscopy. Their sizes were consistently lower than 300 nm and the populations were monodispersed. The sucrose at 5% (w/v) was considered the best cryoprotector providing final to initial sizes ratio as efficient as 0,981 and 0,995, at -80 and -196°C, respectively. Differential scanning calorimetry studies indicated that sucrose influenced the interactions between polymer and surfactants in nanoparticles during freeze-drying. The use of polydextrose as a new cryoprotector at -196°C provided also good size data  $S_f/S_i=1,006$  and allow the production of “sugar-free” nanoparticulate formulations. In respect to nanocapsules the best result was obtained with 10% (w/v) of sucrose with  $T_f/T_i=1,059$ . In the second part, nanocapsules containing cloxacillin benzathine (CLOXB), an antibiotic for veterinary use, were prepared. A new assay method of CLOXB based in high liquid chromatography was developed and used for the determination of the loading yield, loading efficiency and release kinetic of the drug from nanocapsules. The results showed that the percentage of CLOXB entrapment in polycaprolactone nanocapsules (PCL NC) and nanocapsules of polycaprolactone and chitosan (PCL-QUIT NC) was 37 and 87%, respectively. Zeta potential of nanocapsules changed after drug association, indicating a strong influency of CLOXB on the particle surface. The release kinetic results of CLOXB from NC showed linear release profile up to 6 hours for NC and a *plateau* until 48h with incomplete release, indicating the retention of CLOXB entrapped for longer time in nanocapsules compared with the fast diffusion of

free drug to the media. CLOXB release from PCL-QUIT NC was higher in saline with milk than PCL NC.

## **Apresentação**

Este trabalho está estruturado da seguinte forma:

- Introdução;
- Capítulo 1: revisão de literatura, objetivos, metodologia, resultados, discussão e referência bibliográfica referentes à liofilização de nanoesferas e nanocápsulas;
- Capítulo 2: revisão de literatura, objetivos, metodologia, resultados, discussão e referência bibliográfica referentes ao desenvolvimento de formulações nanoestruturadas contendo cloxacilina;
- Conclusões
- Anexo

# Introdução

## INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento de carreadores nanoestruturados de fármacos tem sido alvo de pesquisas intensas na área farmacêutica que visam otimizar a liberação de fármacos no organismo, reduzir a dose eficaz e muitas vezes reduzir a toxicidade (De Chasteigner *et al.*, 1996; Chacon *et al.*, 1999; Santos-Magalhães *et al.*, 2000; Schaffazick *et al.*, 2003). Dentre os carreadores nanoestruturados destacam-se as nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas), que são sistemas apresentando diâmetro inferior a 1  $\mu\text{m}$ . Esses dois sistemas se diferem na composição e na organização estrutural. As nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido (solubilizado ou disperso) ou adsorvido, enquanto as nanocápsulas poliméricas possuem um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica (Legrand *et al.*, 1999, Schaffazick *et al.*, 2003).

Apesar das vantagens destes sistemas, estudos relatam que a maior dificuldade em se produzir tais vetores é a instabilidade em meio aquoso (Chacon *et al.*, 1999), podendo ocorrer agregação e fusão das partículas após um longo período de estocagem (Auvillain *et al.*, 1989). Diante disso, várias metodologias estão sendo desenvolvidas para atenuar ou eliminar tais instabilidades, tais como a secagem destes sistemas por spray-drying (Pohlmann *et al.*, 2002; Sham *et al.*, 2004; Schaffazick *et al.*, 2006) e liofilização (Auvillain *et al.*, 1989; Schaffazick *et al.*, 2003a; Schaffazick *et al.*, 2003b; Bozdogan, *et al.*, 2005; Hirsjarvi *et al.*, 2009). A secagem por liofilização consiste em desidratar o sistema a partir de amostras congeladas, o que preserva amostras potencialmente termosensíveis. Um aspecto interessante no estudo da secagem destas novas formas farmacêuticas é a dificuldade técnica em se obter como produto final nanopartículas que mantenham suas características físico-químicas, como distribuição de tamanho e estrutura física frente aos diversos métodos de secagem.

A liofilização consiste em um processo industrial de secagem por congelamento e sublimação do gelo sob vácuo. É utilizada para converter soluções de materiais lábeis em sólidos com grau de umidade suficientemente baixo para distribuição e estocagem (Franks, 1998). Porém, o congelamento

provoca um estresse físico nas partículas, sendo necessária a adição de crioprotetores antes da liofilização, os quais conferem proteção durante o congelamento das amostras.

De acordo com a literatura, entre dos sistemas nanoestruturados, a liofilização é mais bem estudada quando aplicada aos lipossomas em relação às nanoesferas e nanocápsulas (Auvillain *et al.*, 1989; De Chasteigner *et al.*, 1996). Dentre os crioprotetores mais comuns na literatura estão os açúcares tais como a trealose, sacarose, glicose, manitol (Abdelwahed *et al.*, 2006b). O efeito protetor destes constituintes ainda não está elucidado, mas pode ser atribuído à formação de uma matriz amorfa ao redor das nanopartículas, promovendo um espaçamento entre as mesmas, evitando assim, a agregação durante o congelamento, tornando-as redispersíveis (Saez *et al.*, 2000). Porém a quantidade de crioprotetor a ser adicionada para promover essa estabilização varia muito na literatura. Tendo como base estas informações a primeira parte deste trabalho visou estudar a estabilidade da forma e da manutenção de tamanho de nanoesferas e nanocápsulas após os processos de secagem, empregando-se diferentes concentrações de 04 crioprotetores diferentes. Sabe-se que a estabilidade da forma e do tamanho é um requisito importante para a administração segura e para a liberação controlada e uniforme desses carreadores de fármaco nanoestruturados.

Além disso, uma das áreas promissoras dentro da nanotecnologia é a vetorização de fármacos antimicrobianos para humanos, e mais recentemente para uso animal. Sendo assim, a segunda parte deste trabalho foi destinada ao desenvolvimento de nanocápsulas contendo cloxacilina benzatina como fármaco modelo. As nanocápsulas são definidas como sistemas vesiculares em que um polímero reveste um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (Schaffazick *et al.*, 2003).

A cloxacilina benzatina, por sua vez, é um antibiótico  $\beta$ -lactâmico usado clinicamente na terapêutica veterinária devido à sua atividade antibacteriana gram-positiva e gram-negativa. Este fármaco é utilizado no tratamento e prevenção de mastite bovina causada por bactérias do gênero *Staphylococcus*

(Perez *et al.*, 1997). A mastite bovina é uma inflamação da glândula mamária que é causada principalmente por bactérias reduzindo a produção e a qualidade do leite. A mastite bovina produz perdas econômicas consideráveis, o que leva ao desenvolvimento de estratégias de controle da doença (Gehring *et al.*, 2006). Diferentes tipos de antibióticos e suas combinações são utilizadas para o tratamento da mastite (Gruet *et al.*, 2001) e a permanência de resíduos no leite dependerá do número de doses, do veículo, da via de aplicação e da concentração utilizada.

A vetorização da cloxacilina benzatina utilizando-se nanocápsulas tem por objetivo a obtenção de uma nova forma de tratamento da mastite com o uso de vetores de fármacos utilizando a administração convencional por via intramamária. Espera-se desta forma obter altas concentrações do fármaco no local da infecção com redução da absorção sistêmica, diminuição da dose e dos efeitos adversos e aumento da retenção no fármaco no úbere dos animais.. Para tal, a segunda parte desta dissertação teve como objetivo o desenvolvimento e a caracterização físico-química de nanocápsulas, utilizando-se dois polímeros diferentes, e seu estudo de encapsulação da cloxacilina benzatina. Os polímeros empregados na preparação das nanocápsulas foram a poli- $\epsilon$ -caprolactona e a quitosana. O interesse por este último polímero tem sido crescente nos últimos anos, principalmente pela sua abundância na natureza, pelas suas propriedades físico-químicas (Illum, 1998) Diversos estudos evidenciam as suas propriedades muco-adesivas, a sua capacidade de aumentar a permeabilidade das membranas, tornando-o um forte candidato à produção de nanocápsulas muco-adesivas e portadoras de carga positiva na sua superfície.

Assim, este trabalho visa a obtenção de formulações nanoestruturadas de nanocápsulas que posteriormente poderão aumentar a eficácia na administração intramamária, a distribuição mais adequada do fármaco no úbere do animal, a redução do risco de resíduos devido à menor absorção sistêmica e maior seletividade para o alvo de ação.

ABDELWAHED, W., G. DEGOBERT, FESSI, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. Eur J Pharm Biopharm, v.63, p.87-94. 2006b.

AUVILLAIN, M., CAVE, G., FESSI, H., DEVISSAGUET, P. J. Lyophilisation de vecteurs colloïdaux submicroniques. S.T.P. Pharma, v.5, p.738-744. 1989.

BOUREL, D., ROLLAND, A., LE VERGE, R., GENETET, B. A new immunoreagent for cell labeling. CD3 monoclonal antibody covalently coupled to fluorescent polymethacrylic nanoparticles. Journal of Immunological Methods, v.106, n.2, p.161-167. 1988.

BOZDAG, S., K. DILLEN, VANDERVOORT, J., LUDWIG, A. The effect of freeze-drying with different cryoprotectants and gamma-irradiation sterilization on the characteristics of ciprofloxacin HCl-loaded poly(D,L-lactide-glycolide) nanoparticles. J Pharm Pharmacol, v.57, n.6, p.699-707. 2005.

CHACON, M., J. MOLPECERES, BERGES, L., GUZMAN, M., ABERTURAS, M. R. Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers. Eur J Pharm Sci, v.8, n.2, p.99-107. 1999.

DE CHASTEIGNER, S., CAVÉ, G., FESSI, H., DEVISSAGUET, J.-P., PUISIEUX, F. Freeze-drying of itraconazole-loaded nanosphere suspensions: A feasibility study. Drug Dev. Res, v.38 n.2, p.116-124. 1996.

FRANKS, F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. Eur J Pharm Biopharm, v.45, n.3, May, p.221-9. 1998.

GEHRING, R., SMITH, G. W. An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis. J Vet Pharmacol Ther, v.29, n.4, p.237-41. 2006.

GRUET, P., P. MAINCENT., BERTHELOT, X., KALTSATOS, V. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. Adv Drug Deliv Rev, v.50, n.3, p.245-59. 2001.

HIRSJARVI, S., PELTONEN, L., HIRVONEN, J. Effect of sugars, surfactant, and tangential flow filtration on the freeze-drying of poly(lactic acid) nanoparticles. AAPS PharmSciTech, v.10, n.2, p.488-94. 2009.

ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. Pharm Res, v.15, n.9, Sep, p.1326-31. 1998.

LEGRAND, P., BARRATT, G., MOSQUEIRA, V. C. F., FESSI, H., DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review. S.T.P. Pharma Sci, v. 9, p.411-418, 1999.

- KREUTER, J. Application of nanoparticles for the delivery of drugs to the brain International Congress Series, v.1277, p.85-94. 2005.
- PEREZ, B., PRATS, C., CASTELLS, E., ARBOIX, M. Determination of cloxacillin in milk and blood of dairy cows by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, v.698, n.1-2, p.155-60. 1997.
- POHLMANN, A. R., WEISS, V., MERTINS, O., SILVEIRA, P. N., GUTERRES, S.S. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres development, stability evaluation and nanostructure models. Eur J Pharm Biopharm, v.16, p.305-312. 2002.
- PONCHEL, G., IRACHE, J.-M. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. Adv Drug Deliv Rev, v.34, n.2-3, p.191-219. 1998.
- SAEZ, A., GUZMAN, M., MOLPECERES, J., ABERTURAS, M. R. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. Eur J Pharm Biopharm, v.50, n.3, p.379-87. 2000.
- SANTOS-MAGALHÃES, N. S., PONTES, A., PEREIRA, V.M.W., CAETANO, M.N.P. Colloidal Carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. Int J Pharm, v.208, p.71-80. 2000.
- SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S., FREITA, L. L., POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. Quím. Nova, v.26, p.726-737. 2003a.
- SCHAFFAZICK, S. R., A. R. POHLMANN, DALLA-COSTA, T., GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. Eur J Pharm Biopharm, v.56, p.501-5. 2003b.
- SCHAFFAZICK, S. R., POHLMANN, A.R., MEZZALIRA, G., GUTERRES, S.S. Development of nanocapsules suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. J Braz Chem Soc, v.17, n.3, p.562-569. 2006.
- SHAM, -. H., O, J., ZHANG, Y., FINLAY, H. W., ROA, H. W., LOBENBERG, R. Formulation and characterization of spray-dried powders containing nanoparticles for aerosol delivery to the lung. Int J Pharm, v.269, p.457-467. 2004.

## ***CAPÍTULO 1***

***Liofilização de nanopartículas utilizando duas condições de congelamento.***

## Revisão de literatura

### 1.1. Importância da secagem de suspensões nanoparticuladas

Somente a descoberta de novos fármacos pode não trazer benefícios para a terapia, uma vez que a maioria destes, muitas vezes não possui propriedades físico-químicas adequadas para que atinjam uma biodisponibilidade adequada no organismo (Lipinski *et al.*, 2002; Bernard *et al.*, 2008). Sendo assim, faz-se necessária a busca de novas formas de administração de fármacos e de novas formas farmacêuticas que podem ser os fatores cruciais que permitirão o tratamento de diversas doenças de maneira mais eficaz. O desenvolvimento de carreadores de fármacos ou vetores tem sido muito estudado, nos últimos 30 anos, por suas características físico-químicas adequadas ao direcionamento das moléculas dos fármacos no organismo. Os vetores se destinam a alteração da distribuição de uma substância em determinado local no organismo, aumentando a especificidade de ação dos fármacos (Soppimath *et al.*, 2001). Conseqüentemente, esses reduzem a toxicidade, uma vez que as doses empregadas serão menores, como no caso da vetorização de fármacos anticancerígenos (Yoo *et al.*, 2000) e antibióticos (Espuelas *et al.*, 1997; Pinto-Alphandary *et al.*, 2000). Os vetores protegem os fármacos contra inativações químicas ou enzimáticas antes de atingir o local de ação, como os peptídeos (Jung *et al.*, 2000) e as proteínas (Vila *et al.*, 2002; Wolf *et al.*, 2003) e o DNA (Mao *et al.*, 2001).

Porém estes vetores possuem desvantagens relacionadas à transposição da escala laboratorial para a industrial e ao custo das matérias primas. Para o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas existe a dificuldade de incorporar fármacos, o que exige o desenvolvimento de formulações, e o estudo da estabilidade química e física em longo prazo, uma vez que estas são preparadas em meio líquido. Agregação e fusão das partículas dos vetores podem ocorrer após um longo período de estocagem (De Jaeghere *et al.*, 1999), além de degradação dos constituintes da formulação e contaminação microbiana (Auvillain *et al.*, 1989). Diante disso, várias metodologias estão

sendo desenvolvidas para atenuar ou reduzir tais instabilidades físico-químicas, tais como a técnica de spray-drying e a liofilização. A liofilização foi empregada neste trabalho, e consiste na desidratação do sistema, obtendo assim nanopartículas no estado sólido pulverulento.

## 1.2. Spray drying

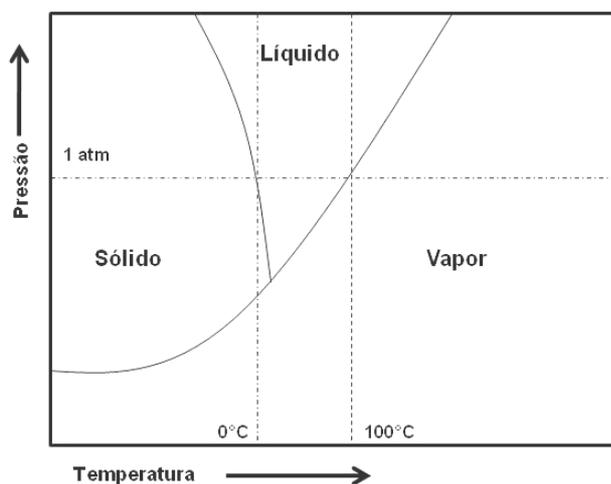
A técnica de spray-drying tem sido utilizada para preparação de pós onde suspensões são atomizadas em finas gotículas seguidas de um processo de secagem o que resultará em partículas sólidas (Schaffazick *et al.*, 2006; Van Eerdenbrugh *et al.*, 2007). A presença de adjuvantes se faz necessária para aumentar a estabilidade das nanopartículas, como os carboidratos (sacarose, manitol, lactose) ou polímeros (PVP). Entretanto, esta técnica não foi utilizada neste trabalho, pois possui desvantagens tais como necessidade de grandes volumes de formulação, emprego de altas temperaturas, além da perda de rendimento devido à adesão na torre de secagem.

## 1.3. Liofilização

Já a liofilização consiste em um processo industrial de secagem por congelamento e sublimação do gelo sob vácuo que transforma a água sólida diretamente em vapor. O congelamento é considerado o ponto mais importante do processo. Existem várias formas de congelamento de nanopartículas descritas na literatura. Para as nanoesferas é comum a utilização de nitrogênio líquido (-196°C) (Chacon *et al.*, 1999; De Jaeghere *et al.*, 1999 ; Auwillain *et al.*, 1989), em freezer a: -70°C (Chacon *et al.*, 1999), a -45°C (Saez, *et al.*, 2000; Abdelwahed *et al.*, 2006b) e a -60°C (Konan *et al.*, 2002). Para as nanocápsulas diferentes condições de congelamento foram estudadas, tais como em freezer: a -45 °C (Abdelwahed *et al.*, 2006a) , -20 (Schaffazick, Pohlmann *et al.*, 2003), -70°C e em nitrogênio líquido a -196°C (Auvillain *et al.*, 1989; Chacon *et al.*, 1999).

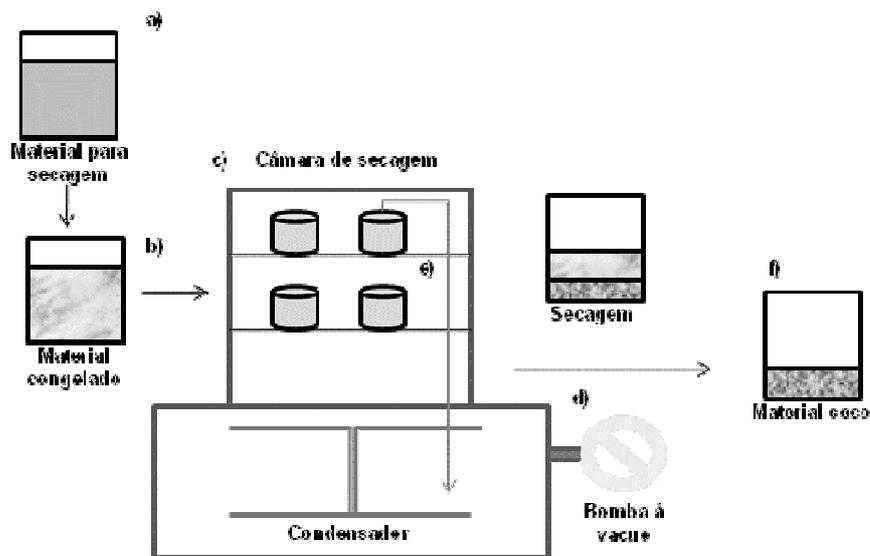
O calor e a pressão atmosférica precisam estar em um determinado intervalo e esses são os fatores que determinam em qual fase (sólido, líquido ou gás) uma substância permanecerá. De acordo com a figura 1.1, ao nível do

mar onde a pressão é de 1 atmosfera (atm), a água é um líquido se a temperatura estiver entre o ponto de congelamento (0°C) e o ponto de ebulição (100°C). Entretanto, abaixo de 0°C, sob pressão mui to reduzida, a água estará na forma de vapor.



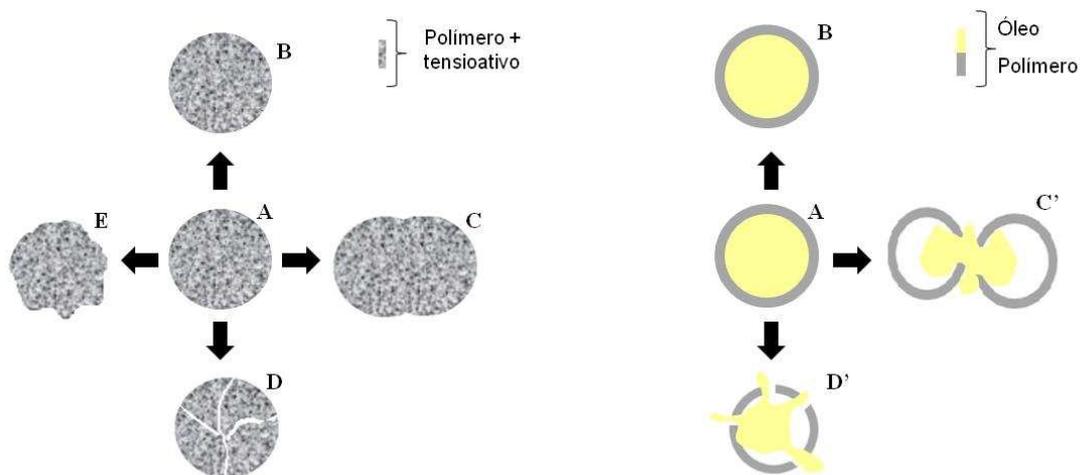
**Figura 1.1:** Fases da água. Adaptado de: <http://cftc.cii.fc.ul.pt>

A liofilização é utilizada para converter soluções de materiais lábeis em sólidos de estabilidade suficiente para distribuição e estocagem (Franks, 1998). O esquema do equipamento e a evolução da secagem (Boss, 2004) estão representados na figura 1.2. A primeira etapa do processo é o congelamento do produto (b) a ser seco em baixas temperaturas. Ele pode ser inserido congelado na câmara de secagem ou pode ser congelado na própria prateleira dependendo do equipamento. A segunda etapa é a secagem (e). O vácuo é iniciado (d) e o gelo é sublimado por pressão reduzida. À medida que o gelo sublima, a amostra fica porosa. O vapor originado na interface atravessa o material seco na câmara de liofilização e é condensado abaixo da câmara de secagem, no condensador. E por último, a segunda secagem na qual é retirada a água residual adsorvida ao pó obtendo-se o material seco.



**Figura 1.2:** Esquema do liofilizador e secagem.

A adição de adjuvantes ou crioprotetores na amostra a ser liofilizada é na maior parte das vezes necessária, para evitar que as baixas temperaturas possam danificar e/ou alterar as propriedades físico-químicas das partículas (figura 1.3). A agregação das nanopartículas após a liofilização se deve ao maior contato destas partículas durante o congelamento (estado sólido), e em alguns casos elas podem se fundir. A quebra e modificações na morfologia das partículas podem ocorrer devido a baixas temperaturas empregadas para o congelamento das mesmas e também pela formação de cristais de gelo que podem provocar um estresse mecânico na partícula.



**Figura 1.3.** Esquema de possíveis instabilidades que podem ocorrer durante o congelamento de nanoesferas (I) e nanocápsulas (II). Partícula antes de liofilizar com forma esférica (A). Partículas depois da liofilização: sem mudanças no tamanho e morfologia (B), com agregação/fusão (C), com ruptura da parede polimérica e consequente agregação/fusão (C'), com quebra (D), com ruptura da parede polimérica e extravasamento do conteúdo oleoso (D'), deformação de partícula (E).

### 1.3.1. Crioprotetores

Os crioprotetores conferem proteção para as nanopartículas durante o congelamento e são adicionados às suspensões coloidais antes da liofilização para amenizar o estresse do processo nas partículas. Dentre os crioprotetores mais comuns na literatura estão os açúcares tais como glucose (Konan *et al.*, 2002), sacarose (De Chasteigner *et al.*, 1996; Saez *et al.*, 2000; Hirsjärvi *et al.*, 2009), manitol (Konan *et al.*, 2002; Saez *et al.*, 2000), trealose (Auvillain *et al.*, 1989; Saez *et al.*, 2000; Konan *et al.*, 2002), lactose (Konan *et al.*, 2002; Saez *et al.*, 2000), e polímeros tais como o álcool polivinílico (Abdelwahed *et al.*, 2006c) e a gelatina (Saez *et al.*, 2000) que são utilizados para melhorar a qualidade dos pós liofilizados. Mas, a quantidade do crioprotetor a ser adicionada para promover essa estabilização/proteção durante a liofilização varia de formulação para formulação. Na literatura encontra-se desde 2% até 30% (p/v) como referência, principalmente para formulações para via oral. Por outro lado, são raras as publicações destes dados objetivando a via parenteral, uma vez que a concentração e o tipo de crioprotetor devem ser regulamentados (Strickley, 2004) e a sua toxicidade determinada.

Para o estudo de caracterização dos pós liofilizados, a técnica da calorimetria exploratória diferencial (DSC) tem sido empregada. Ela fornece parâmetros para o estudo do mecanismo de preservação das nanopartículas na presença de crioprotetores. Esta técnica se baseia nas variações térmicas do material em função da temperatura que permitem detectar alterações na estrutura cristalina ou amorfa da amostra, tais como transições entálpicas exotérmica ou endotérmica, ou ainda mudanças de estado físico tais como a fusão, mudanças de fase, variações de formas alotrópicas e de cristalinidade, decomposições, e outras alterações físicas do material ou das misturas analisadas (Wendlandt, 1986).

O mecanismo de proteção conferido pelos açúcares como crioprotetores é bem estudado em relação aos vetores de fármacos do tipo lipossomas (Crowe *et al.*, 1996). Esses envolvem a formação de pontes de hidrogênio entre os açúcares e o grupo polar dos fosfolípides, impedindo a fusão dos lipossomas durante o processo de desidratação.

Em relação às nanopartículas poliméricas o mecanismo de proteção conferido pelos crioprotetores ainda não está totalmente elucidado. Uma das hipóteses é a formação de uma matriz amorfa ao redor das nanopartículas, promovendo um espaçamento entre as mesmas, evitando assim, a agregação durante o congelamento, tornando-as redispersíveis (Saez *et al.*, 2000). Além disso, seu efeito protetor pode ser devido à formação de ligações de hidrogênio com a água fazendo com que grupos polares presentes na superfície das partículas, como o poloxamer 188, sejam parcialmente desolvatados pela água (Crowe *et al.*, 1993; Allison *et al.*, 1998). Sendo assim, o poloxamer é forçado a se adsorver na superfície da partícula. O estado amorfo das nanopartículas e do crioprotetor permite uma aproximação máxima entre ambos, permitindo a formação de várias ligações de hidrogênio, o que não ocorre quando o crioprotetor se cristaliza (Abdelwahed *et al.*, 2006b).

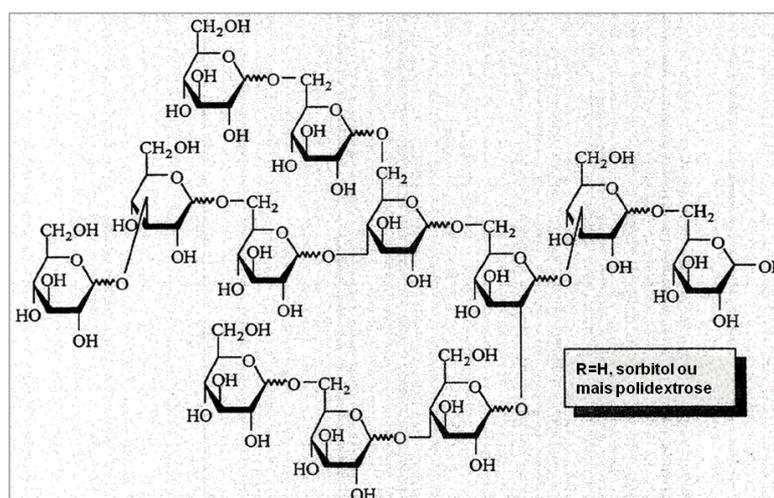
Os vetores poliméricos podem ser produzidos por diferentes metodologias, que de forma indireta interferem na sua liofilização como processo posterior de secagem. Como exemplo, o método de produção de nanocápsulas por emulsificação-difusão do solvente tem o potencial de gerar

nanocápsulas com uma parede polimérica de espessura variável em relação às nanocápsulas produzidas por outras metodologias. Paredes com maior espessura possuem resistência mecânica maior à ruptura (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998).

### 1.3.2. Polidextrose

Os açúcares são os componentes mais utilizados como crioprotetores durante a liofilização. Porém, é comum seu uso em altas concentrações o que dificulta a administração por via parenteral, devido à hipertonidade. Sendo assim, além da necessidade do estudo de formulações com baixas concentrações de açúcar, faz-se necessário o estudo da aplicabilidade de componentes já existentes como novos crioprotetores para as vias parenterais. Van Eerdenbrugh e colaboradores (2008) apresentaram o emprego da celulose microcristalina como crioprotetor de nanosuspensões, que é um polímero de baixo custo muito empregado na produção de comprimidos, que embora largamente utilizado pela via oral, é de uso controverso pelas vias parenterais.

A polidextrose é descrita como um polímero preparado pela condensação randômica de aproximadamente 90% p/p de *D*-glicose, 10% p/p de sorbitol e 1% de p/p de ácido cítrico ou 0,1% de p/p de ácido fosfórico (Figura 1.4).



**Figura 1.4:** Estrutura química da polidextrose.

A polidextrose é largamente utilizada como agente de espessamento de baixa caloria em alimentos (Flood *et al.*, 2004) e é um polissacarídeo resistente sendo considerado em muitos países como fibra alimentar. Um dos benefícios fisiológicos da polidextrose consiste no auxílio da formação do bolo fecal (Craig *et al.*, 1998). É também utilizada em produtos farmacêuticos de uso oral como aglutinante na granulação úmida para confecção de comprimidos sem açúcar (Herbert, 2000). Podendo ser uma opção de crioprotetor para formulações nanoestruturadas destinadas aos portadores de diabetes, por exemplo. Suas propriedades físico-químicas, como alta solubilidade em água, estado amorfo e ausência de cristalização a baixas temperaturas e em altas concentrações, são consideradas características desejáveis de um produto utilizado como crioprotetor. Neste trabalho, propõe-se o estudo da polidextrose como novo crioprotetor de suspensões poliméricas de nanoesferas ou nanocápsulas.

### **1.3.3. Nanopartículas liofilizadas**

De acordo com a literatura (ver tabela 1.1), é recente a tentativa de secagem das nanodispersões coloidais. A utilização de vários crioprotetores e diferentes concentrações em cada trabalho mostra a dificuldade de sucesso na liofilização de tais vetores. Micro e nanoesferas, nanocápsulas e lipossomas tem sido estudados. Porém, nota-se que a liofilização de nanoesferas traz bons resultados se comparados às nanocápsulas, uma vez que estas últimas possuem uma estrutura mais frágil (Abdelwahed *et al.*, 2006a; b).

Além disso, o estudo dos vetores vazios é maior em relação aos estudos de vetores contendo fármacos, uma vez que existe a necessidade de se entender as alterações que ocorrem no sistema para se conseguir uma melhor previsão do que ocorrerá quando o fármaco for adicionado, pois as características físico-químicas e estruturais dos vetores podem mudar completamente.

**Tabela 1.1:** Formulações vetorizadas submetidas à liofilização

<b>Crioprotetores</b>	<b>Vetor/Método</b>	<b>Congelamento</b>	<b>Referências</b>
Glicose anidra, trealose, manitol sorbitol	Microesfera e nanopartícula encapsuladas ou não com ciclosporina	-196°C por 15 min, -70°C por 72h	(Chacon <i>et al.</i> , 1999)
Sacarose, glicose anidra trealose, manitol PVA	Nanocápsulas	-45°C por 2h	(Abdelwahed <i>et al.</i> , 2006a)
Aerosil 200®	Nanocápsulas e nanoesferas de diclofenaco	-20°C	(Schaffazick <i>et al.</i> , 2003)
Trealose, lactose, glicose, manitol	Nanoesferas esterilizadas por filtro 0,22	-60°C por 10 min	(Konan <i>et al.</i> , 2002)
Glicose, sacarose, trealose, lactose, manitol, dextrano, gelatina, sorbitol	Nanoesferas com ciclosporina.	-45°C na prateleira do aparelho	(Saez <i>et al.</i> , 2000)
Sacarose, manitol, trealose, lactose, sorbitol, glicose, dextrano 70000, gelatina e PVP	Nanoesferas obtidas por emulsificação-difusão	-55 °C por 10 min -196 °C por 90s	(Quintanar-Guerrero <i>et al.</i> , 1998)
Glicose, sacarose, trealose, dextrano, manitol	Nanoesferas obtidas por nanoprecipitação	-60 °C por 3 h	(De Chasteigner <i>et al.</i> , 1996)
Maltose, lactose, sacarose	Lipossomas de budesonida	-70°C	(Joshi e Misra, 2001 )
Trealose e sacarose	Nanoesferas de PLA	-40°C	(Hirs järvi <i>et al.</i> , 2009)

Em relação aos vetores que possuem lipídeos, Joshi e Misra (2001) liofilizaram lipossomas na proporção de 1:04 a 1:16 (lipídeo/açúcar), sendo que a proporção de 1:10 foi a mais efetiva na preservação das partículas utilizando sacarose como crioprotetor. Del Pozo-Rodríguez e colaboradores (2008) liofilizaram nanopartículas lipídicas sólidas contendo DNA com diferentes

concentrações de trealose. Apesar da obtenção de pós com o uso de trealose de 5 a 40%, as partículas liofilizadas não apresentaram manutenção de tamanho e seu índice de polidispersão após o processo não foi apresentado.

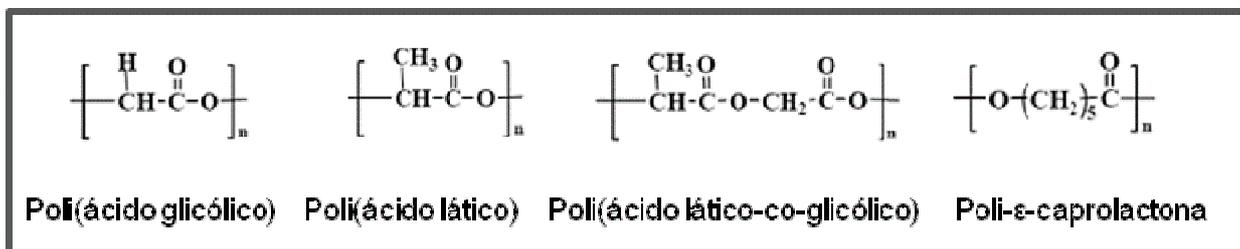
Já em relação às nanopartículas poliméricas, Abdelwahed e colaboradores (2006a) descreveram a liofilização de NC de PCL com sacarose e PVP a 5% (p/v). Shaffazick e colaboradores (2003) empregaram 3% (m/v) de Aerosil 200<sup>®</sup> como agente crioprotetor de nanocápsulas contendo diclofenaco produzidas à partir do PCL ou do Eudragit S90<sup>®</sup>. Entretanto, pela natureza química não biodegradável destes constituintes, eles não podem ser empregados pelas vias parenterais.

Para as nanoesferas, Hirsjarvi e colaboradores (2009) demonstraram a liofilização de nanoesferas de PLA preparadas por nanoprecipitação onde os melhores crioprotetores foram a trealose e a sacarose de 2 e 5% (p/v). Bozdag e colaboradores (2005) liofilizaram nanopartículas de PLGA contendo ciprofloxacino e a utilização de 5% (p/v) de manitol foi o método mais efetivo. A liofilização de nanoesferas de PCL contendo itraconazol por De Chasteigner e colaboradores (1996) mostram a utilização de 10% de sacarose como a mais efetiva e Quintanar-Guerrero e colaboradores (1998) mostraram sucesso da secagem das nanoesferas de PLA obtidas na presença de poloxamer 188 e 5% (p/v) de açúcares, principalmente glicose e sacarose.

Dentre os vetores comumente empregados, como já foi salientado, as nanoesferas se destacam por serem de natureza polimérica, possuindo uma matrix onde o fármaco pode ficar retido ou dissolvido, não apresentando óleo em sua composição (Schaffazick *et al.*, 2003). Este sistema consegue encapsular tanto fármacos lipofílicos quanto hidrofílicos, dependendo da característica do polímero empregada. As nanoesferas são matrizes rígidas que não se deformam tanto como as nanocápsulas de natureza capsular, o que favorece a liofilização dessas últimas com menor risco de ruptura.

Os polímeros mais comumente utilizados na produção destes carreadores são os poliésteres alifáticos tais como o ácido poliglicólico, ácido polilático, ácido poli-lático-co-glicólico e poli- $\epsilon$ -caprolactona devido à biocompatibilidade e biodegradabilidade. Esta classe de polímeros degrada via

quebra da ligação éster da cadeia. A estrutura química dos poliésteres mais representativos está mostrada na figura 1.5.



**Figura 1.5:** Estrutura de poliésteres.

O polímero utilizado para a preparação das nanoesferas neste trabalho foi a poli-ε-caprolactona (PCL), que é um polímero semicristalino biodegradável de baixa temperatura de transição vítrea (-60°C) e de ponto de fusão entre 58 e 64°C. Devido à sua cristalinidade e alta hidrofobicidade, sua degradação *in vitro* é lenta, fazendo com que seja um polímero adequado para dispositivos que exijam longos períodos de liberação e maior estabilidade, tais como as nanopartículas.

### 1.3.3.1. Metodologia de preparo

Existem diversos métodos descritos para a preparação de nanocápsulas que podem ser classificados, de uma forma geral, em métodos baseados na polimerização de monômeros e em métodos que empregam polímeros pré-formados. A preparação de nanocápsulas através de polímeros pré-formados evita algumas desvantagens dos processos de polimerização interfacial, tais como a falta de controle da massa molecular e da polidispersão do polímero obtido, presença de monômeros tóxicos residuais e reações cruzadas com o fármaco ou, ainda, a possibilidade de inativação do último (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998).

Dentre os métodos que empregam a deposição interfacial de polímeros pré-formados encontram-se a emulsificação-evaporação, a nanoprecipitação, o método de *salting-out* e a emulsificação seguida de difusão (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998; Soppimath *et al.*, 2001). Estas técnicas possuem em comum durante sua preparação uma solução orgânica que constitui a fase

interna das nanopartículas que é vertida sobre uma fase aquosa externa que apresenta agentes estabilizadores da dispersão de nanopartículas (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998; Soppimath *et al.*, 2001).

As formulações do presente estudo foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, considerada uma técnica simples de ser executada, reprodutível e facilmente transponível para a escala industrial. Foi descrita e patenteada por Fessi e colaboradores em 1989. O processo consiste na mistura, sob agitação moderada, de uma fase orgânica (contendo um solvente orgânico polar miscível com água, um tensoativo hidrofóbico, um ou mais polímeros insolúvel no óleo e na água e um fármaco lipofílico) miscível em uma fase aquosa (contendo um tensoativo hidrofílico). Após a adição da fase orgânica na fase aquosa, o polímero precipita na interface óleo-água pela redução da sua solubilidade na mistura de solventes, sendo que a difusão mútua dos solventes fornece uma energia favorável para formação de gotas nanométricas de óleo que servem como núcleo para a precipitação do polímero. Instantaneamente as nanopartículas são formadas surgindo uma suspensão leitosa, com elevada opalescência. Em seguida, o solvente é removido sob pressão reduzida e a suspensão concentrada através da evaporação da água (Fessi *et al.*, 1989, Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998). As nanoesferas foram preparadas pelo mesmo método, porém com ausência do óleo.

#### **1.4. Caracterização físico-química**

A determinação das características físico-químicas de nanopartículas é de fundamental importância para melhorar a compreensão destes sistemas e para o estabelecimento de parâmetros de fabricação que possam controlar a liberação dos fármacos a partir dos mesmos. Porém, necessita-se da utilização de várias técnicas a fim de caracterizar estes sistemas, para a análise da morfologia das partículas, determinação da distribuição de tamanho, do potencial elétrico superficial (potencial zeta), determinação da concentração do fármaco quando associado às nanoestruturas e sua cinética de liberação.

### 1.4.1. Avaliação morfológica

A microscopia de força atômica (MFA) tem sido muito utilizada para a caracterização de nanoestruturas tais como lipossomas (Ruozi *et al.*, 2005), nanoesferas (Park *et al.*, 2005) e nanocápsulas (Leite *et al.*, 2005; de Assis *et al.*, 2008; Mosqueira *et al.*, 2005). O microscópio de força atômica é constituído de uma sonda extremamente fina ( $\sim 100$  Å de diâmetro na extremidade da sonda) montada na extremidade de uma alavanca que varre a superfície da amostra, mantendo uma força pequena e constante entre a sonda e a amostra que faz a alavanca oscilar. À medida que a amostra se move em baixo da sonda, uma força constante é mantida através do mecanismo de feed-back, ou monitoramento sonda-amostra. As medidas das oscilações ou deflexões são detectadas por um sistema laser-fotodetector que converte os dados em um mapa topográfico da superfície da amostra (Garg e Kokkoli, 2005). Uma das vantagens do MFA é gerar imagens topográficas da amostra, que neste caso, são as nanopartículas poliméricas. Neste caso, a MFA tem particular vantagem por fazer imagens no mesmo meio que as partículas são fabricadas, sendo considerada uma técnica que não exige preparação laboriosa da amostra (Neves *et al.*, 1998). Além disso, esta técnica permite a avaliação do tamanho das partículas, sendo uma técnica de segunda escolha, principalmente para nanocápsulas, uma vez que estas se deformam quando depositadas sobre o suporte plano (Montasser *et al.*, 2002).



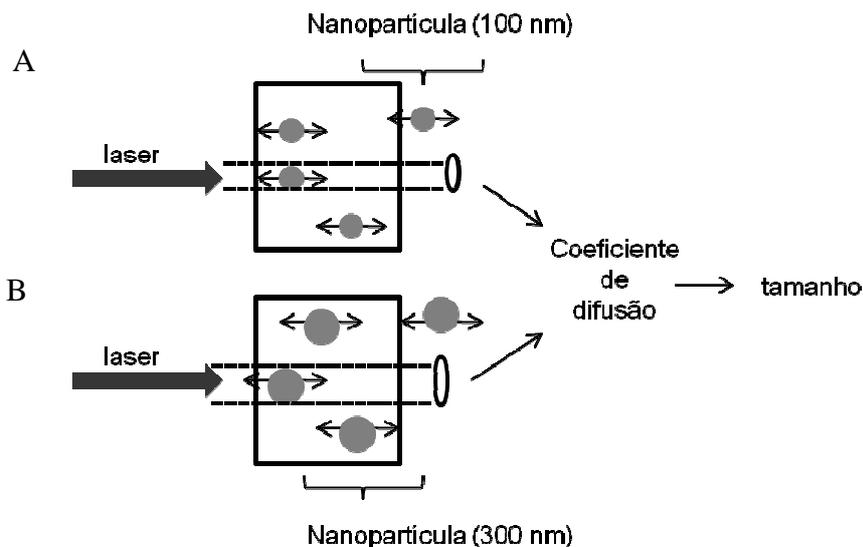
**Figura 1.6:** Desenho esquemático dos componentes de um microscópio de força atômica. Fonte: Garg & Kokkoli, 2005.

Os modos de operação do MFA mais comuns são o de contato (contact mode) e o de contato intermitente (tapping mode). No modo contato, a sonda toca continuamente a superfície da amostra, podendo gerar ruídos nas imagens ou imagens distorcidas devido a interações fortes com superfícies mais macias. Já no modo de contato intermitente, realizado neste trabalho, a sonda oscila sobre a superfície da amostra, eliminando ou diminuindo imagens deformadas, ou com ruídos, sendo este modo mais adequado

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido muito empregada para a caracterização de micro e nanoestruturas na forma de pós, o que facilita o estudo da morfologia da superfície destas, além de auxiliar na avaliação de mudanças na forma das nanoestruturas depois de terem sofrido secagem (Hirsjärvi *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2008; Abdelwahed *et al.*, 2006a,b; Schaffazick *et al.*, 2003). Nesta técnica, a amostra é depositada sobre uma fita de carbono dupla face e metalizada, ou seja, recoberta com uma fina camada de metal condutor. Em seguida, a amostra é submetida a um fluxo de elétrons sobre sua superfície que gera uma imagem da topografia da amostra. O princípio de funcionamento do MEV consiste na passagem de corrente elétrica por um filamento de tungstênio (eletrodo negativo) que promove uma elevação de temperatura ( $\sim 2.500^{\circ}\text{C}$ ), gerando uma emissão térmica de elétrons mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 KV, o que permite a variação da aceleração dos elétrons. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio (eletrodo positivo) atrai fortemente os elétrons gerados, resultando numa aceleração em direção ao eletrodo positivo. A correção do percurso dos feixes é realizada pelas lentes condensadoras que alinham os feixes em direção à abertura da objetiva. A objetiva ajusta o foco do feixe de elétrons antes deles atingirem a amostra incidindo sobre uma determinada área selecionada (Gonçalves, 2004; Bozzola e Russel, 1992).

### 1.4.2. Tamanho das partículas

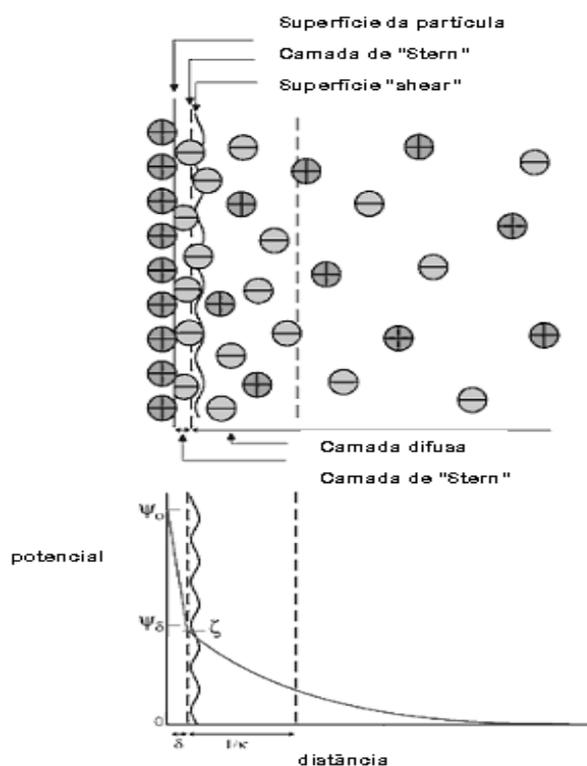
O tamanho médio das partículas e a distribuição do tamanho, medida pelo índice de polidispersão (IP) das nanodispersões são parâmetros muito importantes na área de nanotecnologia farmacêutica. O tamanho determina em muitos casos a distribuição das partículas *in vivo*. O tamanho das nanopartículas depende de vários fatores: método de preparação, natureza do material utilizado, peso molecular e concentração do polímero utilizado, características físico-químicas do fármaco encapsulado, concentração de tensoativos, proporção entre fase oleosa e aquosa, a viscosidade das fases utilizadas, a velocidade de agitação e também a velocidade de difusão da fase orgânica na aquosa em alguns métodos (Legrand *et al.*, 1999). Em relação à estabilidade, o tamanho das nanopartículas é importante, pois pode evidenciar a tendência destes sistemas à agregação ao longo do tempo (Schaffazick *et al.*, 2003). A espectroscopia de correlação de fótons (ECF) é considerada o método padrão para a determinação do diâmetro médio e da distribuição do tamanho (IP). Esta técnica baseia-se na análise do movimento das partículas na água que é inversamente proporcional ao seu tamanho, podendo ser detectado pela correlação do tempo das flutuações de intensidade da luz espalhada quando as nanopartículas são iluminadas por um feixe de laser. Estas flutuações na intensidade da luz espalhada são relacionadas à velocidade de difusão das partículas para dentro e para fora da região que está sendo estudada, e os dados podem ser analisados para fornecer coeficientes de difusão das partículas que fazem o espalhamento. Assim, a partir dos coeficientes de difusão, os dados são processados para fornecer o tamanho da partícula considerada esférica (Brown, 1993).



**Figura 1.7:** Esquema do funcionamento do ECF. Laser atingindo uma partícula, ocorrendo espalhamento de luz em partícula pequena (A) e em partícula grande (B).

### 1.4.3. Potencial zeta

O potencial zeta pode ser definido como o potencial de superfície das partículas que pode ser influenciado por mudanças na interface com o meio externo, decorrente da dissociação de grupos funcionais presentes na superfície ou da adsorção de espécies iônicas do meio de dispersão (Florence e Attwood, 2003). Geralmente o potencial zeta é calculado por medidas de mobilidade eletroforética que correspondem à velocidade das partículas em suspensão, quando submetidas a um campo elétrico. Quanto maior a carga superficial, maior será a velocidade com que as partículas deslocam em direção aos eletrodos de carga oposta, sendo esta velocidade medida através da técnica de espalhamento da luz. As partículas podem ter uma carga elétrica positiva ou negativa. Se ela for positiva, atrairá íons negativos (contra-íons) presentes na solução formando uma camada ou nuvem de elétrons ao seu redor. Se a partícula for negativa, atrairá íons positivos. A superfície que separa a camada de cargas da superfície da partícula da camada difusa em torno dela é chamada de plano de cisalhamento. O potencial eletrostático apresentado neste plano de cisalhamento é o potencial zeta. Os equipamentos medem o potencial zeta neste plano.



**FIGURA 1.8:** Representação de uma partícula de superfície positiva com uma camada de íons negativos adsorvidos na camada de Stern. São apresentados o potencial de superfície  $\Psi_0$  e o potencial na camada de "Stern"  $\Psi_\zeta$ . No ponto de cisalhamento entre as camadas (shear zone) é medido o potencial zeta ( $\zeta$ ). Adaptada de: [www.bic.com/whatiszetapotential.html](http://www.bic.com/whatiszetapotential.html).

Um valor em módulo de potencial zeta entre 30-60 mV é considerado como importante para a estabilidade de colóides uma vez que as forças repulsivas evitam agregações entre as partículas em dispersão. O potencial zeta pode ser afetado pelos componentes da formulação (Legrand *et al.*, 1999; Schaffazick *et al.*, 2003).

## **Objetivo geral**

Tendo como base as informações precedentes, este trabalho teve por objetivo estudar a liofilização de nanoesferas e nanocápsulas, utilizando-se quatro crioprotetores diferentes, e tendo como parâmetro de avaliação da eficiência do método a manutenção do tamanho e do índice de polidispersão após o processo de secagem.

## **Objetivos específicos**

- Preparar e caracterizar nanoesferas e nanocápsulas obtidas a partir da poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) como polímero biodegradável;
- Avaliar o impacto de duas condições de congelamento:  $-80^{\circ}\text{C}$  e congelamento em nitrogênio líquido na estabilidade física das nanopartículas após a liofilização;
- Determinar a eficiência da secagem das nanopartículas por liofilização com os diferentes crioprotetores e caracterizar o material seco produzido;
- Avaliar a eficácia de 4 crioprotetores: glicose, manitol, sacarose e polidextrose em diferentes concentrações durante a liofilização das nanoestruturas.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Materiais**

Foram utilizados para o preparo das nanopartículas o polímero poly-ε-caprolactona (PCL) (Mn 42500 g/mol), poloxamer 188 (Pluronic F68) (Sigma-Aldrich, EUA), lecitina de soja (lecitina com fosfatidilcolina ~70%) (Epikuron 170<sup>®</sup>, Lucas Meyer, França), Labrafac CC (triglicéride cáprico/caprílico) (Gattefosse, França). Como crioprotetores foram utilizados a glicose obtida da Synth (Brasil), sacarose (Isofar, Brasil), manitol (Vetec, Brasil), polidextrose (Litesse<sup>®</sup> Ultra Mw 2000g/mol) gentilmente doada pela Danisco Sweeteners LTDA (UK). Todas as outras substâncias e solventes utilizados foram de grau analítico. A água MilliQ foi obtida no sistema Symplicity/System 185 (Millipore<sup>®</sup>, EUA).

## **2.2. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA**

### **2.2.1. Preparação das nanopartículas**

A preparação das nanopartículas foi realizada pelo método de deposição interfacial de um polímero pré-formado seguido da evaporação do solvente, conhecido como nanoprecipitação e descrito por Fessi *et al.* (1989). Para o preparo das NC convencionais, foram dissolvidos 60 mg de polímero poli-ε-caprolactona (PCL) em uma solução de acetona (10 mL) contendo 0,75% p/v de lecitina de soja (Epikuron 170) e 2,5% v/v de óleo (Labrafac CC). A dissolução ocorreu por meio de agitação moderada com o auxílio de um agitador magnético e aquecimento até 40°C. Em seguida, a solução orgânica foi vertida em uma solução externa aquosa (20 mL) contendo 0,75% p/v de Poloxamer 188 (Pluronic F68), mantendo a mesma agitação por 10 minutos, a fim de promover a formação das nanocápsulas. Posteriormente, esta suspensão foi levada ao rotavapor (Heidolph Instruments, Alemanha), mantendo-se a temperatura do banho inferior a 45°C para evaporação do solvente à pressão reduzida. O volume foi reduzido a 10 mL. Para o preparo das nanoesferas segue-se o mesmo procedimento, porém sem a presença do óleo e da lecitina de soja na fase orgânica.

### 2.3. Liofilização

A liofilização das nanopartículas foi realizada no liofilizador L101 (Liobras, Brasil) que consiste principalmente de três prateleiras dentro de uma câmara, um condensador a  $-45 \pm 5^\circ\text{C}$  e uma bomba de vácuo. A pressão do sistema ficou abaixo de  $150 \mu\text{Hg}$ . O equipamento utilizado na liofilização forneceu boa estabilidade de temperatura no condensador e pressão baixa, requisitos importantes durante o processo (Hatley e Franks, 1991). Além disso, o volume de amostra inserida no recipiente neste estudo não ultrapassou 30% da capacidade do mesmo, sendo também este um parâmetro pré-fixado nos experimentos aqui descritos. As condições otimizadas para as nanoesferas e que foram aplicadas neste presente estudo foram:

- Congelamento por 24 hs a  $-80^\circ\text{C}$  seguido de liofilização por 24 horas;
- Congelamento em nitrogênio líquido ( $-196^\circ\text{C}$ ) por quatro (4) minutos seguidos de 24 horas de liofilização. Para as nanocápsulas, o método envolveu o congelamento da amostra por 5 minutos em nitrogênio líquido seguido de 24 hs de liofilização. Assim, 0,5 mL da suspensão de nanopartículas mais 0,5 mL da solução de cada crioprotetor foram colocados em recipientes de vidro para que atingissem uma concentração final de crioprotetor bem definida, como listado na tabela 1.2:

**Tabela 1.2:** Formulações

Açúcar	Açúcar % (p/v)	Formulação
Sacarose	5	NS 5S
	10	NS 10S
	10	NC 10S
	20	NS 20S
	20	NC 20S
Glicose	2,5	NS 2.5G
	5	NS 5G
	5	NC 5G
	10	NS 10G
	10	NC 10G
Polidextrose	27,7	NS 27,7P
	54,4	NS 54,4P
	80	NS 80P
	80	NC 80P
Manitol	10	NC 10M

## **2.4.CARACTERIZAÇÃO DE NANOESFERAS**

### **2.4.1.Análise de tamanho e potencial zeta**

O tamanho médio e o índice de polidispersão das nanopartículas foram medidos antes e depois da liofilização e foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons, utilizando o equipamento Nanosizer N5 Plus Analyser, Beckmann Coulter (Fullerton, EUA) utilizando-se o ângulo de 90° a temperatura de 20°C, com as amostras dispersas em água MilliQ. O índice de polidispersão reflete a distribuição de tamanho das nanopartículas na dispersão coloidal. Sendo assim, amostras que apresentaram índice de polidispersão inferior a 0,3 foram consideradas monodispersas (Mosqueira, Legrand *et al.*, 2000; Mosqueira, Legrand *et al.*, 2001). A microscopia de força atômica (MFA) também foi empregada como método de determinação e confirmação do tamanho de algumas amostras de nanopartículas. O potencial zeta foi determinado no equipamento Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Inglaterra) usando a técnica de microeletroforese acoplado a Anemometria do Laser Doppler (ALD). Esta medida foi realizada antes e após a liofilização das nanoesferas. Para a realização das medidas, 5 µl das amostras foram diluídas em uma solução de 10 mL de NaCl 1mM previamente filtrada em filtro 0,45 µm. As medidas foram efetuadas à temperatura de 20°C, utilizando-se um ângulo de 90°. Todas as medidas foram determinadas em triplicata e os valores apresentados foram expressos como a média ± desvio padrão.

### **2.4.2.Análise da morfologia**

A análise morfológica das nanoesferas foi realizada por microscopia de força atômica (MFA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) A MFA foi realizada à temperatura ambiente nos equipamentos Multimode e Dimension 300, ambos monitorados pelo controlador Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Bárbara, CA, EUA) do Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC, MG). As imagens foram obtidas no modo de contato intermitente (tapping mode) utilizando-se sonda de silício de comprimento 228 µm, com uma frequência de ressonância de 75-98 kHz, força constante de 3.0-7.1 N/m e raio de curvatura de 5 nm. Aproximadamente 10 ul de cada amostra liofilizada

e reconstituída em água foram depositadas em placas de mica e/ou lâminas de vidro e, logo após seguiu-se a secagem com jato de argônio. A análise das amostras foi realizada utilizando o programa de análise do sistema (Section Analysis).

Para análise em MEV JEOL/EO JSM-5510 (Tóquio, Japão), as nanoesferas secas foram distribuídas sobre uma fita dupla-face aderida a um suporte de metal e revestidas com ouro ou carbono durante 20 segundos sob vácuo.

#### **2.4.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

O comportamento térmico das nanoesferas foi analisado através da calorimetria exploratória diferencial (DSC) através do equipamento DSC 2910 (TA instruments, New Castle, USA). O elemento Índio foi utilizado para a calibração do equipamento. Amostras de 3 a 4 mg de pós secos foram escaneados de -50°C a 180°C a uma taxa de 5°C/min e m uma corrida.

#### **2.4.4. Estatística**

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Análise de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta foram comparados através do teste T seguido do teste de Dunett (Programa Prism 5.0), considerando significativos valores de  $p$  menores ou iguais a 0,05.

### 3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Análise da distribuição de tamanho e do potencial zeta

O tamanho das nanoesferas e das nanocápsulas antes e depois de liofilizadas e o potencial zeta das nanoesferas contendo diferentes concentrações de crioprotetores foram avaliados e os resultados estão apresentados nas tabelas 1.3, 1.4, 1.5, 1.6 e 1.7. A análise do tamanho médio e do índice de polidispersão das nanoesferas e nanocápsulas foi realizada por espectroscopia de correlação de fótons (ECF) e também por MFA em algumas amostras, uma vez que de acordo com a literatura é aconselhável que se utilize mais de um tipo de metodologia para a determinação do tamanho das partículas (Reis *et al.*, 2006).

**Tabela 1.3:** Caracterização físico-química das nanoesferas congeladas a -80°C e liofilizadas por 24h..

<b>Formulação</b>	<b>Tamanho médio</b>		<b>IP ± DP</b>	
	<b>antes da liofilização* ± DP<sup>a,c</sup>(nm)</b>	<b>da após liofilizar ± DP<sup>a,c</sup>(nm)</b>	<b>antes liofilizar<sup>b</sup></b>	<b>após liofilizar<sup>b</sup></b>
NS 5S	270,9 ± 5,5	265,8 ± 1,7	0,13 ± 0,03	0,09 ± 0,04
NS 10S	270,9 ± 5,5	280,7 ± 4,4	0,13 ± 0,03	↔ 0,18 ± 0,03 <sup>d</sup>
NS 20S	270,9 ± 5,5	260,3 ± 5,0	0,13 ± 0,03	0,16 ± 0,05
NS 2.5G	270,9 ± 5,5	284,5 ± 4,1	0,13 ± 0,03	0,14 ± 0,05
NS 5G	270,9 ± 5,5	270,4 ± 0,5	0,13 ± 0,03	0,10 ± 0,03
NS 10G	270,9 ± 5,5	258,4 ± 4,2	0,13 ± 0,03	0,19 ± 0,06
NS 80P	270,9 ± 5,5	↔ 432,9 ± 149,1 <sup>d</sup>	0,13 ± 0,03	↔ 0,76 ± 0,85 <sup>d</sup>
NS 54.4P <sup>#</sup>	ND	ND	ND	ND
NS 27.7P <sup>#</sup>	ND	ND	ND	ND

<sup>a</sup> Desvio Padrão (n=3) das populações definidas pelo equipamento; <sup>b</sup> Amostras monodispersas (<0.3); <sup>c</sup> n=3, Desvio Padrão determinado em três diferentes lotes; <sup>d</sup> p≤0,05; ND:não determinado.

\*tamanho medido sem crioprotetores

# material não totalmente seco.

É aconselhado que pelo menos um dos métodos seja baseado em microscopia para que sejam verificados a presença de agregados, ou outras formas de instabilidade nos colóides (Gaumet *et al.*, 2008). A MFA sozinha possui várias vantagens, entretanto, em alguns casos esta técnica pode não ser conclusiva, pois os métodos de secagem das amostras sobre o substrato

podem gerar artefactos ou alterar o formato e a organização estrutural das nanopartículas (Leite *et al.*, 2005). A comparação entre as duas técnicas está apresentada na tabela 1.6.

**Tabela 1.4:** Caracterização físico-química das nanoesferas congeladas a  $-196^{\circ}\text{C}$  e liofilizadas por 24h.

Formulação	Tamanho médio	Tamanho médio	IP $\pm$ DP	IP $\pm$ DP
	antes liofilizar $\pm$ DP <sup>ac</sup> (nm)	após liofilizar $\pm$ DP <sup>ac</sup> (nm)	antes liofilizar <sup>b</sup>	após liofilizar <sup>b</sup>
NS 5S	250,0 $\pm$ 0,97	248,8 $\pm$ 2,5	0,122 $\pm$ 0,02	0,115 $\pm$ 0,04
NS 10S	250,0 $\pm$ 0,97	241,6 $\pm$ 2,6	0,122 $\pm$ 0,02	0,112 $\pm$ 0,08
NS 20S	250,0 $\pm$ 0,97 $\longleftrightarrow$	335,2 $\pm$ 57,9 <sup>d</sup>	0,122 $\pm$ 0,02	0,312 $\pm$ 0,2
NS 2.5G	250,0 $\pm$ 0,97 $\longleftrightarrow$	242,0 $\pm$ 2,9 <sup>d</sup>	0,122 $\pm$ 0,02	0,141 $\pm$ 0,04
NS 5G	250,0 $\pm$ 0,97	253,5 $\pm$ 3,9	0,122 $\pm$ 0,02	0,084 $\pm$ 0,05
NS 10G	250,0 $\pm$ 0,97	247,7 $\pm$ 2,5	0,122 $\pm$ 0,02	0,134 $\pm$ 0,02
NS 80P	250,0 $\pm$ 0,97	254,9 $\pm$ 9,0	0,122 $\pm$ 0,02	0,117 $\pm$ 0,12
NS 54.4P	250,0 $\pm$ 0,97	251,5 $\pm$ 8,8	0,122 $\pm$ 0,02	0,159 $\pm$ 0,12
NS 27.7P	250,0 $\pm$ 0,97 $\longleftrightarrow$	270,0 $\pm$ 6,2 <sup>d</sup>	0,122 $\pm$ 0,02	0,194 $\pm$ 0,03

<sup>a</sup> Desvio Padrão (n=3) das populações definidas pelo equipamento; <sup>b</sup> Amostras monodispersas (<0.3); <sup>c</sup> n=3, Desvio Padrão determinado em três diferentes lotes; <sup>d</sup> p $\leq$ 0,05.

De acordo com os dados da literatura o tamanho das nanoestruturas é influenciado pela concentração do polímero na fase orgânica, pela viscosidade das fases; pela polaridade dos solventes, e pela relação de volume entre as duas fases, utilizando-se o método conhecido como nanoprecipitação (Fessi, 1989; Zili *et al.*, 2005). Além disso, quando nanopartículas sofrem processos de secagem, seu tamanho após a ressuspensão pode ser afetado, principalmente na ausência de crioprotetores.

De acordo com os resultados das tabelas 1.3 e 1.4, as duas condições de congelamento foram satisfatórias na manutenção do tamanho médio e do índice de polidispersão das NS após liofilização. Esses dados estão de acordo com os previamente descritos por Auvillain e colaboradores (1989), que utilizaram o congelamento a  $-196^{\circ}$  e os crioprotetores glicose e sacarose. Os resultados encontrados com as formulações congeladas a baixas temperaturas, descritas neste trabalho, são atribuídos ao congelamento rápido na presença de crioprotetores. Os açúcares em torno das nanoesferas formam uma matriz contendo pequenos cristais na amostra, que liofilizada resulta em

um material homogeneamente poroso. Esta porosidade favorece a reconstituição das nanoesferas pela facilidade de reintrodução da água após ressuspensão. Além disso, as nanoesferas são mecanicamente mais resistentes ao congelamento do que as nanocápsulas por possuírem uma matriz rígida polimérica (Abdelwahed *et al.*, 2006).

Como mostrado na tabela 1.3 todos os crioprotetores e concentrações utilizadas foram efetivas na manutenção do tamanho das NS quando congeladas a -80°C, exceto aquelas contendo 80% (p/v) de polidextrose. Foi observado neste trabalho que o uso de concentrações baixas de polidextrose induz à formação de aglomerados que não se redispersam. Além disso, na liofilização das nanocápsulas o uso da polidextrose não foi eficaz, uma vez que o produto final não resultou em pó seco e sim na formação de um gel (Tabela 1.5). Observou-se também que um excesso de sacarose (20%) e o uso de baixas concentrações de glicose (2,5%) são ineficientes para manutenção da estabilidade da dispersão quando NS são congeladas em nitrogênio líquido (Tabela 1.4).

Para as nanoesferas, Quintanar-Guerrero e colaboradores (1998) mostraram sucesso da secagem por liofilização de NS produzidas por emulsificação-difusão obtidas na presença de pluronic F68 e 5% de açúcares, principalmente glicose e sacarose. Hirsjarvi e colaboradores (2009) descreveram a liofilização de nanoesferas de PLA preparadas por nanoprecipitação onde os melhores crioprotetores foram a trealose e a sacarose de 2 a 5%, resultados que estão de acordo com os encontrados no presente trabalho. A liofilização de nanoesferas de PCL contendo itraconazol por De Chasteigner e colaboradores (1996) mostra a utilização de 10% de sacarose como a mais efetiva. Já Saez e colaboradores (2000) realizaram a liofilização de NS de PCL com vários tipos de crioprotetores a diferentes concentrações e os melhores resultados foram a utilização de 20% de glicose e de sacarose o que difere de alguns dos nossos resultados. Isso pode ser devido à diferença no tempo de imersão em nitrogênio líquido por eles descrito (1 h) em relação ao utilizado aqui (5 min), indicando que além da temperatura,

também o tempo de permanência das nanopartículas na etapa de congelamento influenciam na obtenção de partículas com boas características.

A literatura mostra que grandes quantidades de crioprotetores são necessárias para secar nanopartículas (Chacon *et al.*, 1999; Saez *et al.*, 2000), mas poucos estudos relatam a otimização da formulação com baixas concentrações de açúcar (Hirsjärvi *et al.*, 2009). Em relação a este fato, os melhores resultados neste trabalho ocorreram com a utilização de 5% de sacarose nos dois congelamentos e 2,5 e 5% de glicose a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O uso de baixas concentrações de açúcares é muito importante para formulações destinadas à via intravenosa, onde a isotonicidade é requisito importante. Além disso, a povidona utilizada como novo crioprotetor apresentou resultados promissores quando comparada aos demais crioprotetores (apesar do emprego de altas concentrações) permitindo sua aplicação para a produção de pós de micro/nanopartículas para diabéticos, uma vez que é a formulação pode ser considerada “*sugar free*”.

**Tabela 1.5:** Caracterização físico-química das nanocápsulas congeladas a  $-196^{\circ}\text{C}$  e liofilizadas por 24h

Formulação	Tamanho médio	Tamanho médio	IP $\pm$ DP	IP $\pm$ DP
	antes liofilizar $\pm$ DP <sup>ac</sup> (nm)	depois liofilizar $\pm$ DP <sup>ac</sup> (nm)	antes liofilizar <sup>b</sup>	depois liofilizar <sup>b</sup>
NC 10S	247,1 $\pm$ 0,85	261,6 $\pm$ 8,98	0,163 $\pm$ 0,040	0,285 $\pm$ 0,06
NC 20S	247,1 $\pm$ 0,85	271,6 $\pm$ 5,75	0,163 $\pm$ 0,040	0,276 $\pm$ 0,07
NC 5G	247,1 $\pm$ 0,85	604,1 $\pm$ 22,47 <sup>d</sup>	0,163 $\pm$ 0,040	0,927 $\pm$ 0,11 <sup>d</sup>
NC 10G	247,1 $\pm$ 0,85	659,2 $\pm$ 48,62 <sup>d</sup>	0,163 $\pm$ 0,040	0,866 $\pm$ 0,18 <sup>d</sup>
NC 10M	247,1 $\pm$ 0,85	741,5 $\pm$ 26,51 <sup>d</sup>	0,163 $\pm$ 0,040	0,773 $\pm$ 0,07 <sup>d</sup>
NC 80P	247,1 $\pm$ 0,85	305,2 $\pm$ 21,02 <sup>d</sup>	0,163 $\pm$ 0,040	0,527 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Desvio Padrão (n=3) das populações definidas pelo equipamento; <sup>b</sup> Amostras monodispersas (<0.3); <sup>c</sup> n=3, Desvio Padrão determinado em três diferentes lotes; <sup>d</sup> p $\leq$ 0,05.

Parte dos resultados está apresentada na tabela 1.5. As partículas foram congeladas em nitrogênio líquido utilizando como crioprotetores a glicose, sacarose, manitol e a povidona, mas somente as amostras contendo sacarose forneceram bons resultados. De acordo com a literatura, o estudo da liofilização de NC na ausência de fármacos incorporados é mais expressiva em

relação às NC carregadas com fármacos. Em relação às NC há uma grande dificuldade de estabelecimento de boas condições para liofilização. Abdelwahed e colaboradores (2006c) descreveram com sucesso a liofilização de nanocápsulas de PCL com sacarose e PVP a 5%. Auvillan e colaboradores (1989) estudaram a liofilização de NC de PLA e PCL com 30% de trealose e o emprego de diferentes tipos de óleos. A liofilização das nanocápsulas com 10% de sacarose congeladas em nitrogênio líquido apresentou-se mais adequada neste trabalho.

Comparando-se a MFA e ECF como metodologias de estudo e determinação da distribuição do tamanho, notou-se que as nanoesferas apresentaram redução do diâmetro na técnica de MFA em relação à ECF. Isto pode ser explicado pela desidratação da amostra na análise por MFA, o que reduz o volume da partícula em relação ao ECF que mede o volume hidrodinâmico. Em relação às nanocápsulas, o tamanho médio por ECF antes da liofilização foi de 247 nm e por MFA foi de 475 nm, indicando que estas amostras se deformaram, sofrendo um achatamento sobre a lâmina devido à pressão da sonda, uma vez que elas possuem uma natureza estrutural flexível contendo uma fase líquida oleosa como núcleo. Esses efeitos de achatamento de nanocápsulas por MFA foram bem documentados em trabalhos anteriores (Montasser *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2008).

Todos os pós ressuspenderam facilmente, com agitação manual. A proporção entre o tamanho final em relação ao inicial  $T_f/T_i$  e índice de polidispersão final em relação ao inicial  $IP_f/IP_i$  foram calculados e apresentados na tabela 1.6. Quando estes resultados se aproximam da unidade indicam manutenção do tamanho e do índice de polidispersão das partículas durante o processo. A manutenção desses parâmetros após liofilização é muito importante, principalmente para a via intravenosa, para que processos de como a embolia sejam evitados.

**Tabela 1.6:** Análise comparativa das razões de tamanho e do índice de polidispersão de NS e NC antes e após liofilização (Tf/Ti) e (IPf/IPi) utilizando-se a MFA e a ECF

Açúcar	Formulação	Açúcar/Polímero (w/v)	Tf/Ti				IPf/IPi	
			-80°C ECF	-80°C MFA	-196°C ECF	-196°C MFA	-80°C ECF	-196°C ECF
Sacarose	NS 5S	8:1	0.981	1.094	0.995	0.810	0.64	1.00
	NS 10S	16:1	1.036	ND	0.966	ND	<b>1.43</b>	0.92
	NC 10S		ND	ND	1.059	ND	ND	<b>1.75</b>
	NS 20S	32:1	0.961	0.935	1.341	ND	1.14	<b>2.58</b>
	NC 20S		ND	ND	1.099	ND	ND	<b>1.70</b>
Glicose	NS 2.5G	4:1	1.050	1.333	0.968	ND	1.00	1.17
	NS 5G	8:1	0.998	ND	1.014	0.794	0.86	0.67
	NC 5G		ND	ND	<b>2.445</b>	ND	ND	<b>5.70</b>
	NS 10G	16:1	0.954	ND	0.991	1.196	1.36	1.08
	NC 10G		ND	ND	<b>2.668</b>	ND	ND	<b>5.32</b>
Polidextrose	NS 80P	133:1	<b>1.598</b>	0.774	1.019	1.051	<b>5.43</b>	1.00
	NC 80P		ND	ND	1.235	ND	ND	<b>3.24</b>
	NS 54.4P	92:1	ND	ND	1.006	ND	ND	1.33
	NS 27.7P	46:1	ND	ND	1.080	ND	ND	<b>1.58</b>
Manitol	NC 10M	16:1	ND	ND	<b>3.001</b>	ND	ND	<b>4.75</b>

ND = não determinado.

Como pode ser visto na tabela 1.6, para as amostras congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , o resultado da maioria das formulações está próximo de 1, destacando-se as nanoesferas liofilizadas com 5% de glicose com relação de  $T_f/T_i=0,998$ . Em relação à manutenção do tamanho  $T_f/T_i$ , os valores estão próximos de 1 para as amostras liofilizadas com 10% de glicose e estão distantes de 1 para aquelas liofilizadas com 80% de povidona. O índice de polidispersão alterado indica que variou a homogeneidade de tamanho na população, ou seja, processos de agregação, ou mesmo ruptura podem ter ocorrido. Assim o IP de 5,43 com 80% de povidona indica que este crioprotetor nesta concentração não foi capaz de impedir a fusão das nanoesferas durante o processo.

Em relação ao congelamento em nitrogênio líquido, os índices estão próximos da unidade, exceto para as nanoesferas com 20% de sacarose. Houve menor variação dos índices em relação ao congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Em relação ao tamanho a variação foi de 0,966 até 1,341 com emprego de 10 e 20% de sacarose respectivamente. Quando a proporção  $T_f/T_i$  obtida por ECF foi comparada com MFA, observou-se resultados semelhantes, indicando que a MFA pode ser uma ferramenta útil para aprofundar os estudos de partículas liofilizadas não somente através da morfologia, mas também auxiliando na determinação do tamanho.

O potencial zeta das partículas também foi avaliado, uma vez que ele influencia na estabilidade das suspensões coloidais. Valores absolutos acima de 30 mV levam à maior estabilidade das dispersões de nanopartículas, devido à maior repulsão entre as partículas, evitando a agregação (Legrand *et al.*, 1999). O potencial zeta das nanopartículas é afetado principalmente pelo poloxamer, um tensoativo não-iônico que reduz, em valor absoluto, o potencial zeta e pelo tipo de polímero que faz parte da constituição das NP, como os poliésteres que apresentam uma carga negativa na interface (Legrand *et al.*, 1999). E apesar de pouco discutido na literatura, a liofilização também pode afetar este parâmetro, uma vez que os crioprotetores recobrem parcialmente a superfície das partículas (Packhaeuser *et al.*, 2009).

**Tabela 1.7:** Medida do potencial zeta

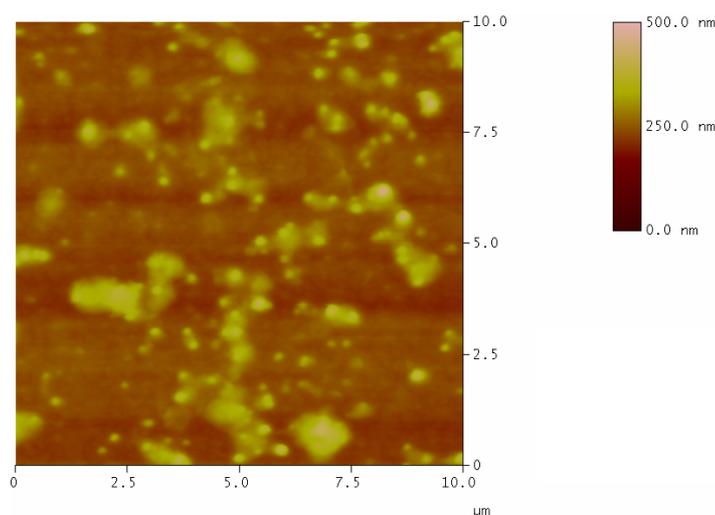
Formulação	Potencial zeta $\pm$ S.D. <sup>a</sup> (mV)		
	(antes da liofilização)	(após a liofilização)	
		-80°C	Nitrogênio líquido
NS 5S	-12.1 $\pm$ 1.5	-11.1 $\pm$ 0.5	-11.3 $\pm$ 0.9
NS 10S	-13.3 $\pm$ 1	-12.7 $\pm$ 0.6	-11.1 $\pm$ 0.8
NS 20S	-12.3 $\pm$ 0.5	-11.8 $\pm$ 2.3	-11.2 $\pm$ 0.8
NS 2,5G	-13.4 $\pm$ 0.8	-11.8 $\pm$ 0.1	-12.6 $\pm$ 1.1
NS 5G	-12.3 $\pm$ 0.9	-12.7 $\pm$ 0.6	-12 $\pm$ 0.6
NS 10G	-13.9 $\pm$ 2	-10.0 $\pm$ 1.7	-14.6 $\pm$ 0.8
NS 80P	-11.9 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>	-9.9 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup>	-10.4 $\pm$ 1.8
NS 54,4P	-12.8 $\pm$ 0.6	-11.1 $\pm$ 1.2	-10.3 $\pm$ 0.8
NS 27,7P	ND	ND	ND

<sup>a</sup> Desvio Padrão (n=3) das populações definidas pelo equipamento; <sup>b</sup> n=3, Desvio Padrão determinado em três diferentes lotes; <sup>c</sup> p $\leq$ 0,05.

De acordo com a tabela 1.7, a variação do potencial zeta das nanoesferas nas amostras com diferentes crioprotetores após liofilização não foi significativo nas duas condições de congelamento (p>0,05). Para as amostras congeladas em nitrogênio líquido os valores variaram de -10,3 a -14,6 mV e para as congeladas em -80°C os valores variaram de -9,9 a -12,7 mV. No entanto, no caso das nanoesferas com 80% de povidona congeladas a -80°C (NS 80P), o potencial de superfície diminuiu de forma significativa (p<0,05). Isto provavelmente está relacionado à grande quantidade de crioprotetor disponível na superfície das NS, o qual deve estar fortemente solvatado pela água mascarando os grupos ionizáveis do polímero e reduzindo o potencial zeta. Esta redução no potencial zeta pode levar ao fenômeno de fusão e agregação das NP, o que pode explicar o aumento do tamanho e do índice de polidispersão desta amostra após a liofilização.

### 3.2. Análise morfológica: microscopias de força atômica e eletrônica de varredura

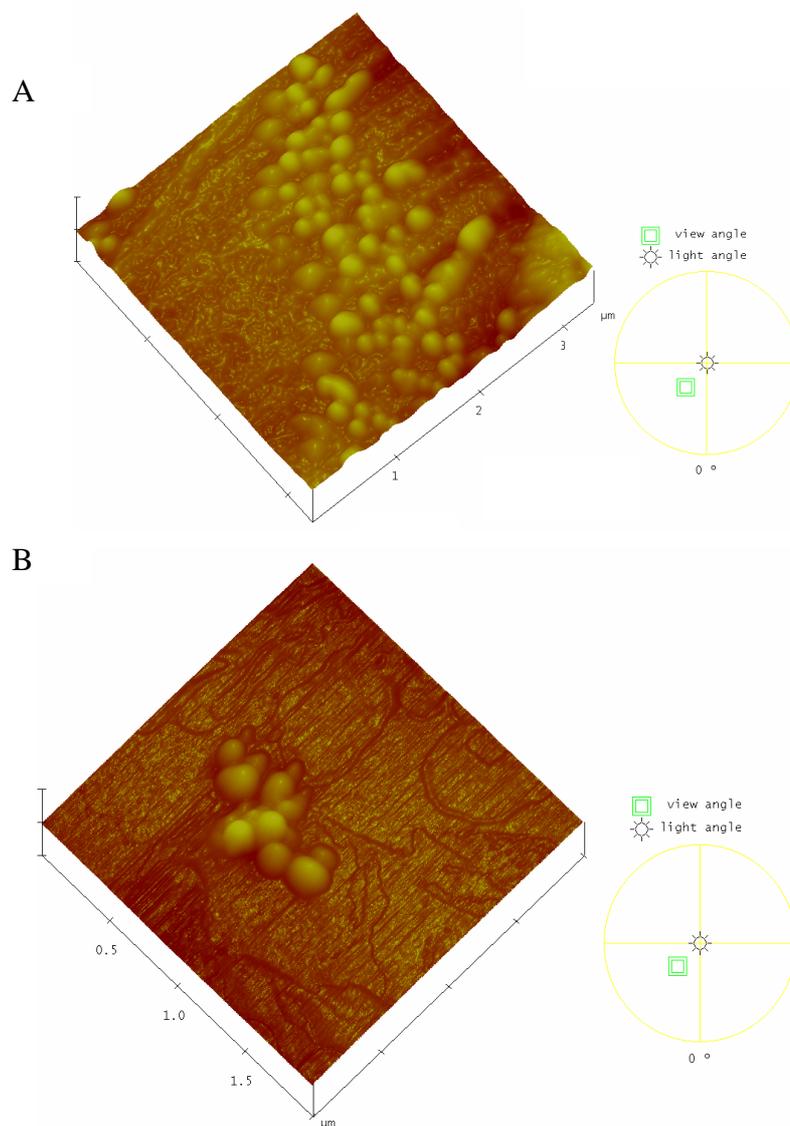
A microscopia de força atômica (MFA) permite observar a forma das partículas. Ela gera imagens tridimensionais topográficas da partícula numa escala nanométrica. É uma técnica não destrutiva que permite observações *in situ* (Garg e Kokkoli, 2005). Enquanto a técnica de ECF mede o raio hidrodinâmico da partícula, por MFA o diâmetro aproximado da partícula pode ser medido no estado seco. Isto tem como vantagens a maior exatidão na determinação do tamanho, a determinação das características de organização estrutural e da forma em si, da capacidade de deformação e da textura, parâmetros importantes para o desenvolvimento e acompanhamento da estabilidade das formulações nanométricas. Todas as formulações, tanto antes (figura 1.9) quanto depois de liofilizadas (figuras 1.10 a 1.12) mostraram forma esférica.



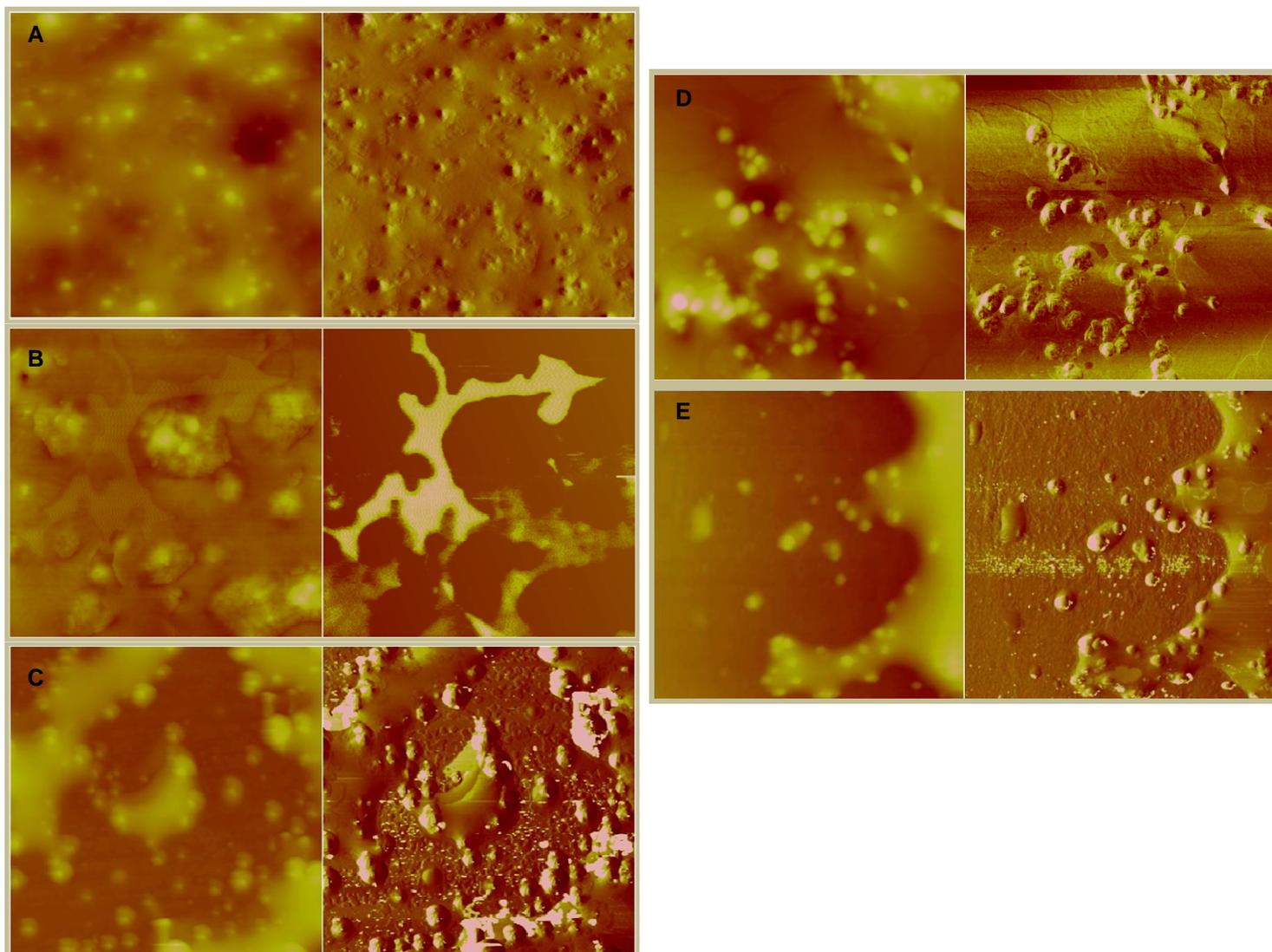
**Figura 1.9.** Imagem de MFA de nanoesferas de PCL antes da liofilização

A figura 1.9 mostra as nanoesferas antes da liofilização na ausência de crioprotetores. Podem ser vistas várias partículas espalhadas de forma heterogênea e aglomerados de partículas que se formam provavelmente durante a secagem, representados por pontos com maior altura. Na figura 1.10 podem ser observadas imagens tridimensionais das nanoesferas liofilizadas com 80% de polidextrose. O congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  não foi eficiente na manutenção de redispersibilidade das NS e levou a uma maior aglomeração

das partículas, que pode ser observado na figura 1.10B. Observam-se também camadas de material sobre a lâmina com baixa altura, que provavelmente são referentes às camadas de crioprotetores após secagem.



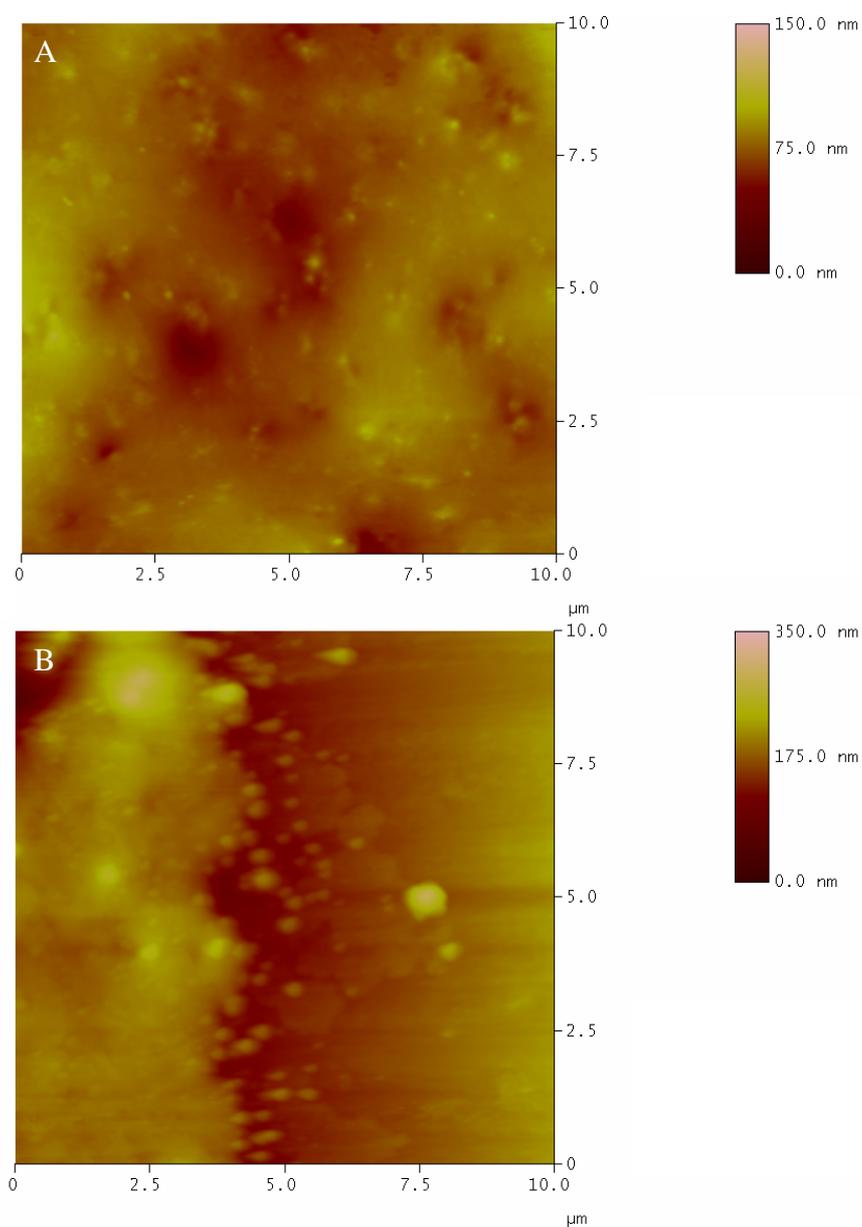
**Figura 1.10.** Imagem tridimensional de nanoesferas congeladas em nitrogênio líquido com 80% de polidextrose e posteriormente liofilizadas (A) e nanoesferas congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  com 80% de polidextrose e posteriormente liofilizadas ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) (B), após redispersão em água.



**Figura 1.11.** Imagens de MFA em *tapping mode* de nanoesferas liofilizadas ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) depois de redispersas em água. Imagem de altura à esquerda e de fase à direita (ou de amplitude). (A) NS 2.5G-amplitude, (B)NS 10G-fase, (C)NS 5S-amplitude (D)NS 10S-amplitude, (E)NS 20S-fase. Escala:  $10 \times 10 \mu\text{m}$  (imagens A, C, E) e  $5 \times 5 \mu\text{m}$  (imagens B, D).

Quando a glicose e a sacarose foram utilizadas como crioprotetores, observa-se uma “nuvem” ao redor das nanopartículas que é mais intensa quando a sacarose é utilizada (figuras 1.11 (C,D,E e 1.12). Os crioprotetores aparecem nas imagens como camadas envolvendo as partículas, que estão em maior ou menor espessura em dependência das concentrações utilizadas. Já para nas amostras contendo polidextrose, as nanopartículas são dificilmente distintas da matriz que ocupa toda a lâmina, na qual as NS parecem estar imersas. Este fato pode ser explicado pelo alto peso molecular da polidextrose e pela sua viscosidade. Na presença dos açúcares, as nanopartículas parecem reter mais água ao seu redor dificultando a obtenção de imagens com alta nitidez.

Observa-se uma melhor homogeneidade de distribuição das NS na figura 1.11A - nanoesferas congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  com 2,5% de glicose - do que em relação à figura 1.11B, essa com 10% de glicose. Este fato também ocorre para as amostras com maior concentração de sacarose (figura 1.11E), evidenciando que quanto maior a quantidade açúcar na suspensão, maior é a sua viscosidade e pior a facilidade de movimentação das partículas quando o jato de argônio é aplicado para a secagem das mesmas. Na figura 1.12 onde as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, percebe-se uma dificuldade na visualização das nanoesferas com 10% de glicose o que não acontece com as nanoesferas com 5% de sacarose. Mesmo com crioprotetores diferentes, aqui também nota-se que quanto maior a concentração de açúcar mais intenso é o recobrimento das partículas pelo crioprotetor. Os experimentos de MFA, de certa forma simulam o processo de secagem das nanopartículas em presença do crioprotetor e evidenciam o recobrimento e o espaçamento fornecido por eles que impede a agregação durante a liofilização.

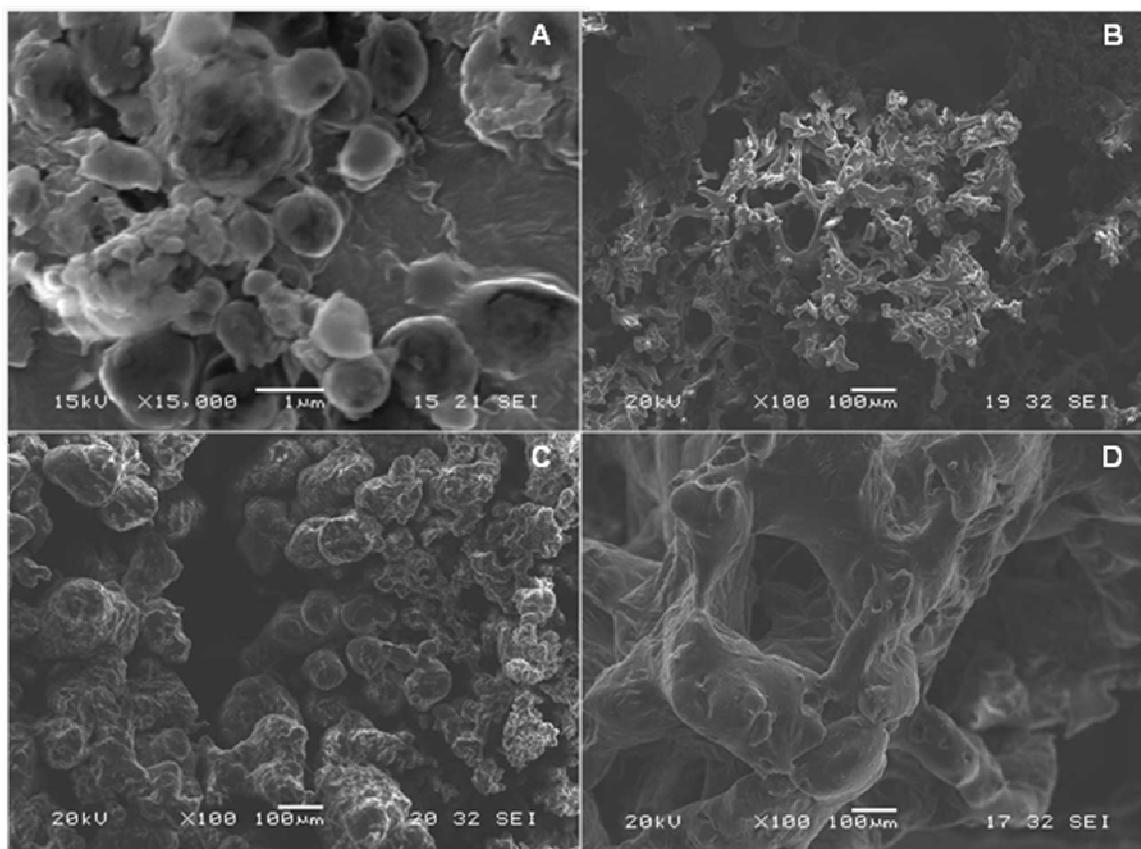


**Figura 1.12.** Imagens de altura de MFA em *tapping mode* de nanoesferas liofilizadas (-196°C) após redispersão em água. (A) NS 10G, (B) NS 5S. Escala: 10x10  $\mu\text{m}$ .

A MFA neste trabalho foi uma ferramenta muito útil para avaliar forma e tamanho e pareceu ser uma ferramenta melhor que a microscopia eletrônica de varredura, principalmente na avaliação das nanopartículas liofilizadas. Entretanto, o uso da MFA para avaliar partículas liofilizadas é raramente utilizado e foi recentemente reportado na literatura (Packhaeuser *et al.*, 2009).

As imagens de MEV das nanoesferas liofilizadas com 10% de sacarose e congeladas em nitrogênio líquido estão mostradas na figura 1.13. Podem ser observadas formas esféricas no pó e muitos agregados microparticulados, onde as nanoesferas se encontram. No maior aumento, figura 1.13A, as nanoestruturas estão mais evidentes. Entretanto, por esta técnica a medida de tamanho não é real, devido ao recobrimento metálico que as amostras são submetidas. Esta técnica tem sido empregada para o estudo da morfologia de nanopartículas secas (Schaffazick *et al.*, 2003). Abdelwahed e colaboradores (2006) mostraram imagens de MEV onde foi utilizada uma escala maior (200  $\mu\text{m}$ ) para obtenção da imagem, que permitiu estudar a superfície dos pós com PVP (polivinilpirrolidona). Nas imagens de MEV observa-se o mesmo aspecto das imagens de MFA, onde o aumento da concentração de crioprotetor reduz a visualização das NS individualizadas devido ao maior recobrimento (figura 1.13D).

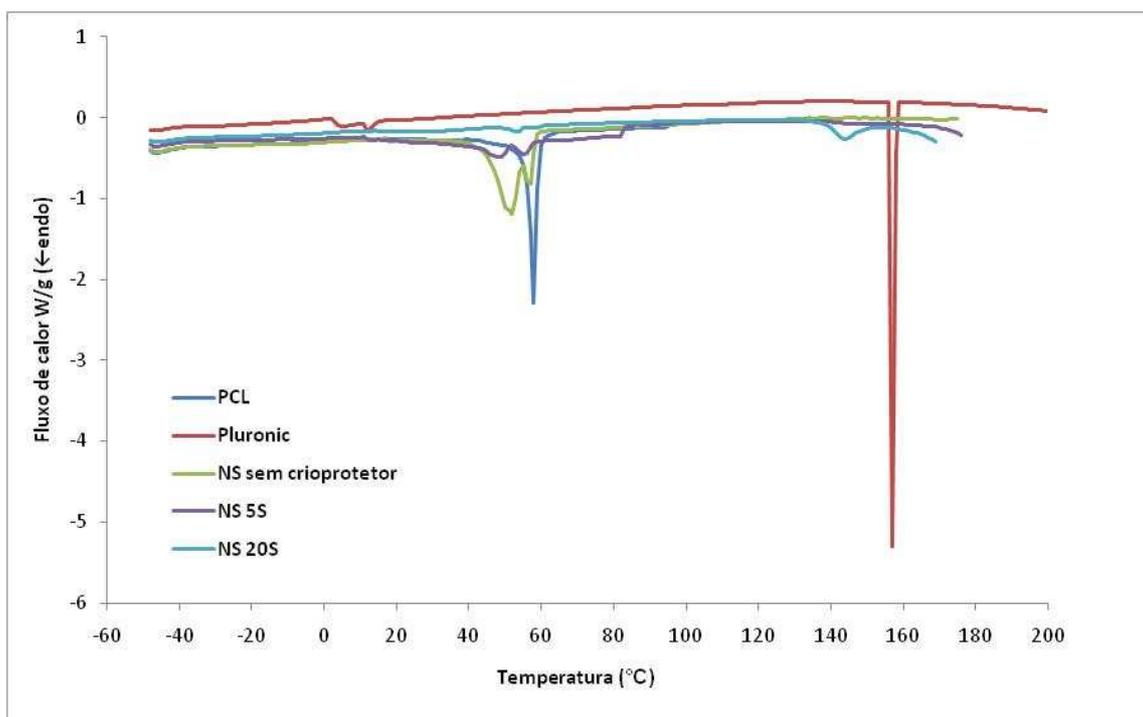
A topografia dos pós varia com a utilização de crioprotetores e com a concentração. A formulação com 5% de sacarose (figura 1.13B) apresentou bons resultados em relação ao tamanho por ECF, foi facilmente redispersível em água e apresentou maior organização estrutural nas imagens quando comparado com a formulação de 2,5% de glicose onde grandes partículas esféricas podem ser vistas (figura 1.13C). Nas imagens de MEV (figura 1.13 B,C e D) não distinguimos as nanopartículas, o que está de acordo com as imagens reportadas por Van Eerdenbrugh e colaboradores (2007). Para os pós de NS contendo povidona, neste trabalho, nota-se uma matriz sem distinção (figura 1.13D). A formação de cristais de gelo de tamanhos diversos nas diferentes concentrações de crioprotetores pode ser um dos fatores responsáveis pelos diferentes níveis de compactação dos pós de NS liofilizados.



**Figura 1.13:** Micrografia de nanoesferas liofilizadas com 10% de sacarose (NS 10S) – congeladas em nitrogênio líquido (A); Micrografia de nanoesferas congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  e liofilizadas: NS 5S (B), NS 2,5G (C) e NS 80P (D). Figura 17A: escala 1  $\mu\text{m}$ ; figuras 6B,C e D escala de 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.3. Análise térmica das amostras por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

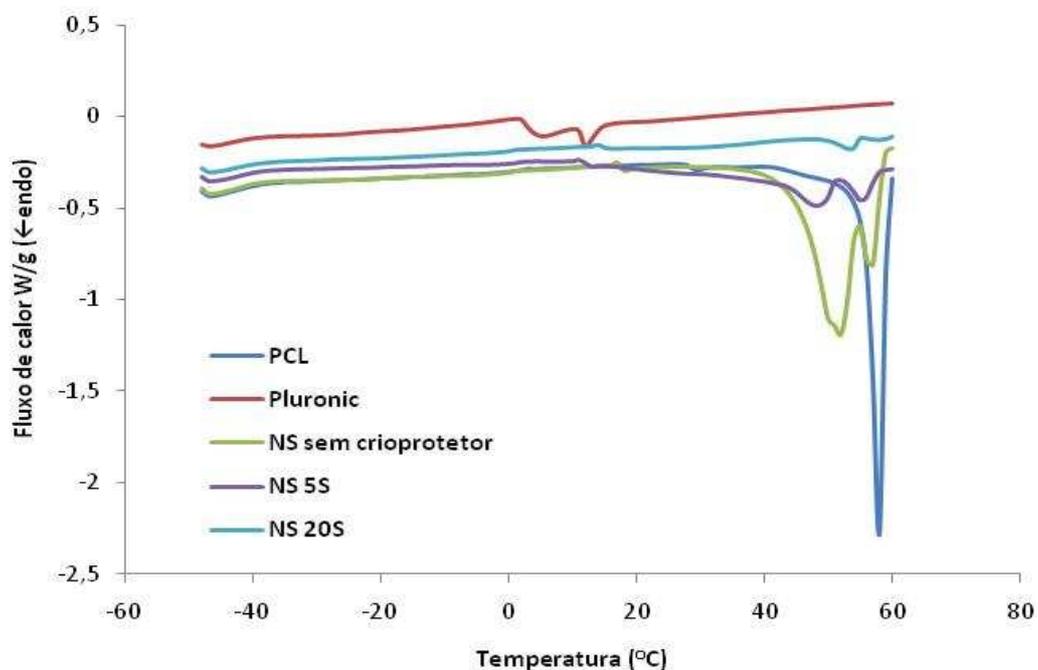
A técnica de DSC tem sido aplicada para elucidar mecanismos de criopreservação de nanopartículas em presença de açúcares durante a liofilização (Coffin e McGinity, 1992; De Chasteigner *et al.*, 1996; Van Eerdenbrugh *et al.*, 2007). No presente estudo, as amostras de nanoesferas foram avaliadas em baixas concentrações de sacarose, que foi considerada a condição de escolha para liofilização de nanoesferas. Termogramas dos constituintes das nanoesferas individualmente, PCL, poloxamer, nanoesferas sem crioprotetores e nanoesferas com crioprotetores, foram obtidos e estão apresentados na figura 1.14.



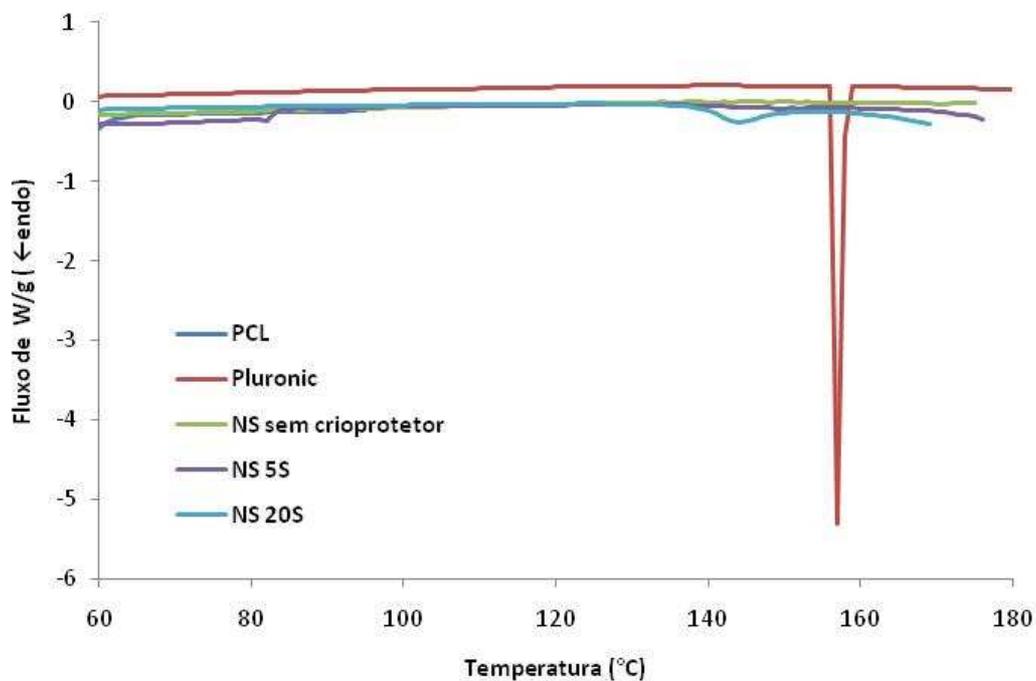
**Figura 1.14.** Termograma representando os dados de todos os constituintes avaliados por DSC.

O sinal endotérmico correspondente a fusão do PCL ( $T_m$ ) pode ser observado a 58°C e o sinal endotérmico de fusão do poloxamer próximo a 157°C ( $T_m$ ), que estão de acordo com dados da literatura (Espuelas *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2009). A interação com os demais componentes da formulação provoca um deslocamento do pico de fusão do PCL para temperaturas mais baixas na amostra de NS sem crioprotetor, indicando uma forte interação entre polímero e parte do tensioativo, referente à transição térmica em 52°C. O mesmo acontece quando as NS são criopreservadas com 5% de sacarose, entretanto, com o uso de 20% de sacarose há o desaparecimento quase completo do sinal de fusão do PCL e a manutenção do sinal de transição térmica próximo a 52°C, indicando aumento da interação polímero poloxamer na presença de maior teor de crioprotetor. Neste caso há também o deslocamento do pico de fusão do poloxamer presente nas NS 20S para 144°C (vide figura 1.16). Esses dados térmicos indicam que houve aumento da interação entre polímero e poloxamer quando quantidades crescentes de sacarose foram utilizadas. Esse aumento da adsorção do tensioativo pode resultar na desorção da sacarose da superfície

das NS reduzindo a eficiência de criopreservação, como foi observado anteriormente nos demais estudos de manutenção da distribuição de tamanho.



**Figura 1.15:** Termograma ampliado na região entre -50 a 60°C.



**Figura 1.16:** Termograma ampliado de 100 a 180°C

De acordo com a literatura, estudos sugerem que o poloxamer 188 que é usado como tensioativo em nanopartículas cristaliza durante a liofilização dificultando a manutenção das propriedades das nanopartículas (como o tamanho) na ausência de crioprotetores. Isto pode explicar a alta aglomeração das nanoesferas sem os crioprotetores. Entretanto, na presença de açúcares atuando como crioprotetores, o poloxamer é desolvatado, aumenta de hidrofobia e aumenta a adsorção sobre a superfície hidrofóbica polimérica das NS (De Chasteigner *et al.*, 1996; Quintanar Guerrero *et al.*, 1998). Além disso, na presença dos açúcares parte do poloxamer pode estar mais intimamente envolvida na trama polimérica das NS, sendo que a outra parte forma ligações de hidrogênio com os açúcares. Isto favorece a competição pelos sítios de ligação entre o açúcar e a superfície da nanopartícula, pré-requisito para uma boa lioproteção da partícula durante a liofilização (Abdelwahed *et al.*, 2006b). Nossos dados reforçam esta hipótese que foi também discutida por outros autores (Saez *et al.*, 2000; De Jaeghere *et al.*, 1999). Também foi observado neste estudo que o aumento da concentração de açúcar reduz a eficiência de crioproteção, pois houve maior variação do tamanho e do IP, no caso do congelamento a baixas temperaturas,  $-196^{\circ}\text{C}$ , quando comparado ao congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ , onde essas variações não foram tão evidentes. Sendo assim, não somente a proporção de açúcar/poloxamer é importante (De Jaeghere *et al.*, 1999), mas também as condições de congelamento dessas partículas, e a viscosidade fornecida por diferentes crioprotetores quando congeladas em diferentes temperaturas. É provável que o congelamento rápido impeça o rearranjo e a realocação dos constituintes das NS que favorecem uma boa crioproteção das NS, ou mesmo a interação açúcar-superfície das NS que favorece o recobrimento individualizado das partículas e a sua proteção contra fusões e agregações. Está é provavelmente a razão da diferença no pico do termograma do poloxamer nas amostras NS 5S e NS 20S na figura 1.16, uma vez que estas interações entre os componentes na solução podem alterar as propriedades da amostra congelada. O resultado satisfatório do emprego de 5% de sacarose está de acordo com o trabalho de Quintanar-Guerrero e colaboradores (1998) que também empregou 5% de sacarose em nanoesferas de PLA. Na maioria dos estudos térmicos o fator mais comumente analisado é a

variação do crioprotetor em uma mesma concentração. No entanto, são escassos os exemplos de estudos que investigam o mecanismo de proteção de nanopartículas poliméricas com o uso de diferentes concentrações de um mesmo crioprotetor, como realizado no presente trabalho.

De acordo com a literatura, a liofilização de nanopartículas é um trabalho criterioso, laborioso e mais baseado em métodos de tentativa-erro. A etapa mais importante é o congelamento que gera estresse físico na partícula, podendo mudar suas características. Os experimentos e resultados apresentados aqui usaram como ponto de partida dados prévios da literatura, os quais foram otimizados, com o uso de quatro tipos de crioprotetores e de dois tipos de congelamento.

No aspecto visual, os pós de NS e NC apresentaram cor branca. Os pós contendo povidona se assemelham a um pó compacto e macio, comparado aos pós obtidos a partir da glicose e sacarose que apresentaram um aspecto duro e poroso para ambos os congelamentos.

## Conclusões

- Foi possível preparar suspensões de nanoesferas e nanocápsulas poliméricas através do método de nanoprecipitação. Seus diâmetros antes e após a secagem variaram entre  $258,4 \pm 4,20$  nm e  $432,9 \pm 149,07$ nm para nanoesferas e entre  $247,1 \pm 0,85$  e  $741,5 \pm 26,51$  para nanocápsulas.
- O emprego das duas condições de congelamento foi satisfatório para a manutenção das características físico-químicas de nanoesferas
- O emprego do congelamento em nitrogênio líquido foi satisfatório para manutenção das características das nanocápsulas com o emprego da sacarose como crioprotetor.
- A utilização dos crioprotetores glicose e sacarose foram eficientes para liofilização das nanoesferas, sendo que a utilização de 5% de sacarose foi a mais eficiente tendo sua análise térmica realizada por DSC. Além disso, a utilização de 2,5; 5 e 10% de glicose também foi satisfatória em ambas as condições de congelamento.
- O emprego da povidona como novo agente crioprotetor forneceu resultados promissores apesar das altas concentrações testadas, 80 e 54,4%. Porém, bons resultados foram obtidos com estas concentrações quando as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido.
- Pela MFA foi possível avaliar a morfologia das nanoesferas contendo diferentes concentrações de diferentes crioprotetores. Esta técnica também foi útil como ferramenta complementar para determinação do tamanho de NS e NC.

## Referência bibliográfica

ABDELWAHED, W., DEGOBERT, G., FESSI, H. Freeze-drying of nanocapsules: impact of annealing on the drying process. Int J Pharm, v.324, n.1, p.74-82. 2006a.

ABDELWAHED, W., DEGOBERT, G., FESSI, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. Eur J Pharm Biopharm, v.63, n.2, p.87-94. 2006b.

ABDELWAHED, W., DEGOBERT, G., FESSI, H. A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): formulation and process optimization. Int J Pharm, v.309, n.1-2, p.178-88. 2006c.

ABDELWAHED, W., DEGOBERT, G., STAINMESSE, S., FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. Adv Drug Deliv Rev, v.58, n.15, p.1688-713. 2006.

AUVILLAIN, M., CAVE, G., FESSI, H., DEVISSAGUET, P. J. Lyophilisation de vecteurs colloïdaux submicroniques. S.T.P. Pharma v.5, p.738-744. 1989.

BOSS, A. E., FILHO, M. R., DE TOLEDO, V. C. E. Freeze drying process: real time model and optimization. Chemical Engineering and Processing, v.43, p.1475-1485. 2004.

BOZDAG, S., DILLEN, K., VANDERVOORT, J., LUDWIG, A. The effect of freeze-drying with different cryoprotectants and gamma-irradiation sterilization on the characteristics of ciprofloxacin HCl-loaded poly(D,L-lactide-glycolide) nanoparticles. J Pharm Pharmacol, v.57, n.6, p.699-707. 2005.

BOZZOLA, JOHN J., RUSSELL, LONNIE D. Electron Microscopy. 2. ed. Jones and Bartlett Publishers, Boston - USA 1992.

BROWN, W. Dynamic light scattering: the method and some applications. Oxford: University Press, 1993. ŠTĚPÁNEK, P. Cap. 4.

CHACON, M., MOLPECERES, J., BERGES, L., GUZMAN, M., ABERTURAS, M. R. Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers. Eur J Pharm Sci, v.8, n.2, p.99-107. 1999.

COFFIN, M. D. AND MCGINITY, J. W. Biodegradable pseudolatexes: the chemical stability of poly(D,L-lactide) and poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles in aqueous media. Pharm Res, v.9, n.2, p.200-5. 1992.

CRAIG, S. A. S., HOLDEN J.F., TROUP J.P., AUERBACH M. H., FRIER H.I. Polydextrose as soluble fibre: Physiological and analytical aspects. Cereal Foods World v.43, p.370–376. 1998.

CROWE, L. M., D. S. REID, CROWE, J. H. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? Biophys J, v.71, n.4, p.2087-93. 1996.

CROWE, L. M., REID, D. S., CROWE, J. H. Carpenter. Preserving dry biomaterials: the water replacement hypothesis. Biopharm, n.6, p.28-37. 1993.

DE ASSIS, D. N., MOSQUEIRA, V. C., VILELA, J. M., ANDRADE, M. S., CARDOSO, V. N. Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of 99mTechnetium-fluconazole nanocapsules. Int J Pharm, v.349, n.1-2, p.152-60. 2008.

DE CHASTEIGNER, S., CAVÉ, G., FESSI, H., DEVISSAGUET, J.-P., PUISIEUX, F. Freeze-drying of itraconazole-loaded nanosphere suspensions: A feasibility study. Drug Dev. Res v.38 n.(2), p.116-124. 1996.

DE JAEGHERE, F., ALLEMANN, E., FEIJEN, J., KISSEL, T., DOELKER, E., GURNY, R. Formulation and lyoprotection of poly(lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles: influence on physical stability and in vitro cell uptake. Pharm Res, v.16, n.6, p.859-66. 1999.

DEL POZO-RODRÍGUEZ, A., SOLINÍS, M.A., GASCÓN, A.R., PEDRAZ, J.L. Short and long-term stability study of lyophilized solid lipid nanoparticles. Eur.J.Pharm. Biopharm, v. 71, n. (2), p.181-189. 2008.

DULIEU, C. & BAZILE, D. Influence of lipid nanocapsules composition on their aptness to freeze-drying. Pharm Res, v.22, n.2, p.285-92. 2005.

ESPUELAS, S. M., LEGRAND, P., IRACHE, M.J., GAMAZO, C., ORECCHIONI, M.A., DEVISSAGUET, J., YGARTUA, P. Poly( $\epsilon$ -caprolacton) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity International Journal of Pharmaceutics, v.158, p.19-27. 1997.

FESSI, H., PIUSIEUX, F., DEVISSAGUET, J.P., AMMOURY, N., BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. Int. J. Pharm, v.55, n.1, p.R1-R4. 1989.

FLOOD, M. T., AUERBACH, M. H., CRAIG, S. A. A review of the clinical toleration studies of polydextrose in food. Food Chem Toxicol, v.42, n.9, p.1531-42. 2004.

FLORENCE A. T., ATTWOOD, D. Emulsões, Suspensões e Dispersões. In: Princípios Físico-Químicos em Farmácia. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, v.3 ed, n.cap. 7, p.345-411. 2003.

FRANKS, F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. Eur J Pharm Biopharm, v.45, n.3, p.221-9. 1998.

GARG, A AND KOKKOLI, E. Characterizing particulate drug-delivery carriers with atomic force microscopy. IEEE Eng Med Biol Mag, v.24, n.1, p.87-95. 2005.

GAUMET, M., VARGAS, A., GURNY, R., DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. Eur J Pharm Biopharm, v.69, n.1, p.1-9. 2008.

GONÇALVES, M. Microscopia eletrônica de varredura. In: Técnicas de caracterização de polímeros, São Paulo, 2004, p.165 – 175.

HATLEY, R. H. M AND FRANKS, F. Applications of DSC in the development of improved freeze-drying processes for labile biologicals. J. Thermal Anal v.37, p.1905-1914. 1991.

HERBERT, K. Handbook of Pharmaceuticals Excipients, London: Pharmaceutical Press, p.451-53. 2000.

HIRSJARVI, S., PELTONEN, L., HIRVONEN, J. Effect of sugars, surfactant, and tangential flow filtration on the freeze-drying of poly(lactic acid) nanoparticles. AAPS PharmSciTech, v.10, n.2, p.488-94. 2009.

JOSHI, M. R. AND MISRA, A. Liposomal budesonide for dry powder inhaler: preparation and stabilization. AAPS PharmSciTech, v.2, n.4, p.25. 2001.

JUNG, T., KAMM, W., BREITENBACH, A., KAISERLING, E., XIAO, J. X., KISSEL, T. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? Eur J Pharm Biopharm, v.50, n.1, p.147-60. 2000.

KONAN, Y. N., GURNY, R., ALLÉMANN, E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. Int. J. Pharm v.233, n.(1-2), p.239-252. 2002.

LEGRAND, P., BARRATT, G., MOSQUEIRA, V. C. F., FESSI, H., DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review. S.T.P. Pharma Sci, v.9, p.411-418. 1999.

LEITE, E. A., VILELA, J. M. C., MOSQUEIRA, V. C. F., ANDRADE, M. S. Polycaprolactone nanocapsules morphological features by atomic force microscopy. Microsc. Microanalysis v.11, p.48-51. 2005.

MILLER, S. C AND DRABIK, B.R. Rheological properties of poloxamer vehicles. Int.J.Pharm v.18, p.269-276. 1984.

MONTASSER, I., FESSI, H., COLEMAN, A. W. Atomic force microscopy imaging of novel type of polymeric colloidal nanostructures. Eur J Pharm Biopharm, v.54, n.3, p.281-4. 2002.

MOSQUEIRA, V. C., LEGRAND, P., MORGAT, J. L., VERT, M., MYSIKINE, E., GREF, R., DEVISSAGUET, J. P., BARRATT, G. Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: effects of PEG chain length and density. Pharm Res, v.18, n.10, p.1411-9. 2001.

MOSQUEIRA, V. C., LEGRAND, P., PINTO-ALPHANDARY, H., PUISIEUX, F., BARRATT, G. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. J Pharm Sci, v.89, n.5, p.614-26. 2000.

MOSQUEIRA, V. C F.; LEITE E. A.; BARROS C. M.; VILELA J. M. C.; ANDRADE M. S. Polymeric nanostructures for drug delivery: characterization by atomic force microscopy. Microscopy & Microanalysis, v. 1, n.3, p. 36-39, 2005.

NEVES, B. R. A.; VILELA J. M. C.; ANDRADE M. S. Microscopia de varredura por sonda mecânica : uma introdução. Cerâmica, v.44, n.290, p. 212-219, 1998.

PACKHAEUSER, C. B., LAHNSTEIN, K., SITTERBERG, J., SCHMEHL, T., GESSLER, T., BAKOWSKY, U., SEEGER, W., KISSEL, T. Stabilization of aerosolizable nano-carriers by freeze-drying. Pharm Res, v.26, n.1, p.129-38. 2009.

PARK, I. Y., KIM, E. J., PARK, H., FIELDS, K., DUNKER, A. K., KANG, C. Interaction between cardiac caldesmon and drugs with known cardiotoxicity. Mol Pharmacol, v.67, n.1, p.97-104. 2005.

PEREIRA, M. A., MOSQUEIRA, V. C. M., VILELA, J. M. C., ANDRADE, M. S., RAMALDES, G. A., CARDOSO, V. N. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with <sup>99m</sup>Techneium-HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy. Eur. J. Pharm. Sciences, v.33, p.42-51.2008.

PINTO-ALPHANDARY, H., ANDREMONT, A., COUVREUR, P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. Int J Antimicrob Agents, v.13, n.3, p.155-68. 2000.

QUINTANAR-GUERRERO, D., GANEM-QUINTANAR, A., ALLÉMANN, E., FESSI, H., DOELKER, E. Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion technique. J.Microencapsul v.15, p.107-119. 1998.

RUOZI, B., TOSI, G., FORNI, F., FRESTA, M., VANDELLI, M. A. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: two techniques for rapid characterization of liposomes. Eur J Pharm Sci, v.25, n.1, p.81-9. 2005.

ALLISON, S.D., RANDOLPH, T. W., MANNING, M.C., MIDDLETON, K., DAVIS, A., CARPENTER, J.F. Effects of drying methods and additives on structure and function of actin: mechanisms of dehydration-induced damage and its inhibition. Arch. Biochem. Biophys, v.358, p.171-181. 1998.

SAEZ, A., GUZMAN, M., MOLPECERES, J., ABERTURAS, M. R. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. Eur J Pharm Biopharm, v.50, n.3, p.379-87. 2000.

SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S., FREITA, L. L., POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. Quím. Nova v.26, p.726-737. 2003.

SCHAFFAZICK, S. R., POHLMANN, A. R., DALLA-COSTA, T., GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. Eur J Pharm Biopharm, v.56, n.3, p.501-5. 2003.

SCHAFFAZICK, S. R., POHLMANN, A.R., MEZZALIRA, G., GUTERRES, S.S. Development of nanocapsules suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. J Braz Chem Soc, v.17, n.3, p.562-569. 2006.

STRICKLEY, R. G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. Pharm Res, v.21, n.2, Feb, p.201-30. 2004.

VAN EERDENBRUGH, B., FROYEN, L., MARTENS, J. A., BLATON, N., AUGUSTIJNS, P., BREWSTER, M., VAN DEN MOOTER, G. Characterization of physico-chemical properties and pharmaceutical performance of sucrose co-freeze-dried solid nanoparticulate powders of the anti-HIV agent loviride prepared by media milling. Int J Pharm, v.338, n.1-2, p.198-206. 2007.

VAN EERDENBRUGH, B., VERCRUYSSSE, S., MARTENS, J. A., VERMANT, J., FROYEN, L., VAN HUMBEECK, J., VAN DEN MOOTER, G., AUGUSTIJNS, P. Microcrystalline cellulose, a useful alternative for sucrose as a matrix former during freeze-drying of drug nanosuspensions - a case study with itraconazole. Eur J Pharm Biopharm, v.70, n.2, p.590-6. 2008.

VILA, A., SANCHEZ, A., TOBIO, M., CALVO, P., ALONSO, M. J. Design of biodegradable particles for protein delivery. J Control Release, v.78, n.1-3, p.15-24. 2002.

WANG, Y., LU, X., DALAI, S., ZHANG, J. Thermophysical properties of polycaprolactone/chitosan blend membranes. Thermochimia Acta, v.487, p.33-38. 2009.

WENDLANDT, W. W. Thermal analysis. Anal Chem, v.58, n.5, p.1R-6R. 1986.

WOLF, M., WIRTH, M., PITTNER, F., GABOR, F. Stabilisation and determination of the biological activity of L-asparaginase in poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres. Int J Pharm, v.256, n.1-2, p.141-52. 2003.

YOO, H. S., LEE, K. H., OH, J. E., PARK, T. G. In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. J Control Release, v.68, n.3, p.419-31. 2000.

ZILI, Z., SFAR, S., FESSI, H. Preparation and characterization of poly-epsilon-caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. Int J Pharm, v.294, n.1-2, p.261-7. 2005.

## ***Capítulo 2***

*Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas contendo cloxacilina como fármaco modelo.*

## Revisão de literatura

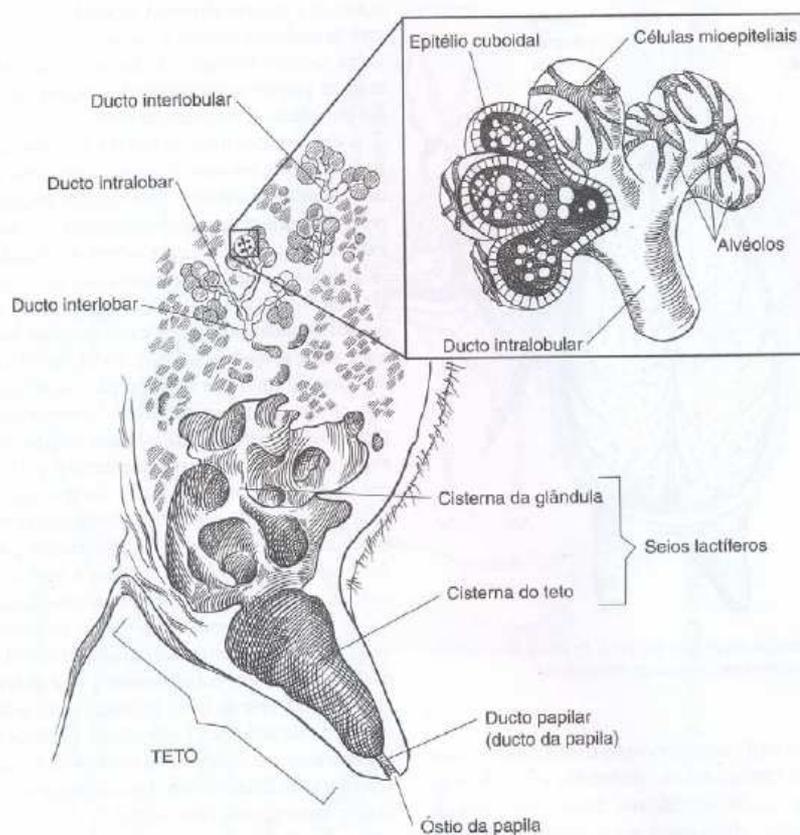
### 1.1. Aplicabilidade das nanoestruturas na veterinária

Uma das áreas mais promissoras de aplicação da vetorização de fármacos em nanoestruturas poliméricas é referente ao uso de antitumorais (Lu *et al.*, 2006) e antibióticos (Santos-Magalhães *et al.*, 2000; Zili *et al.*, 2005; Shanmuganathan *et al.*, 2008), principalmente para administração parenteral, visando uma distribuição mais direcionada com aumento do índice terapêutico. Fármacos antimicrobianos são empregados no tratamento de infecções em humanos e em animais. O aumento do uso de antibióticos na medicina veterinária está associado à produção intensiva objetivando o aumento da produção de carne, leite e derivados (Mckellar *et al.*, 2004).

A mastite ou mamite bovina é a doença que mais afeta a produção do leite produzindo grandes perdas. A mastite bovina é uma inflamação da glândula mamária associada à presença de microorganismos, principalmente bactérias tais como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, a *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium bovis*. Os principais agentes etiológicos da mastite foram classificados quanto à sua origem e modo de transmissão em dois grupos: microorganismos contagiosos presentes no corpo do animal tal como *Staphylococcus aureus*, transmitidos principalmente durante a ordenha e os microorganismos ambientais (Rebhum, 2000) que estão presentes no meio podendo ser transmitida para o animal em qualquer etapa da vida podendo ocorrer na lactação ou entre os períodos da lactação, onde um dos principais agentes causadores são a *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Streptococcus uberis* (Gruet *et al.*, 2001).

A mastite pode ser clínica – com sinais clínicos locais e leite anormal – ou sub-clínica com baixa produção e qualidade do leite (Gruet *et al.*, 2001). O úbere da vaca é constituída de dois pares de glândulas mamárias, cada uma drenada por uma teta. A produção do leite se dá por glândulas exócrinas que possuem alvéolos dilatados onde o leite é estocado. As células secretoras são responsáveis pela formação da barreira sangue-leite e pela difusão seletiva de fármacos entre ambos os compartimentos. O alvéolo libera o leite em pequenos ductos os quais convergem para ductos maiores os quais convergem para a cisterna da glândula a qual é conectada à cisterna do teto que abre para o canal

do teto. Este canal possui proteção imunológica local devido à presença de células linfóides, além de uma barreira física contra entrada de bactérias por causa da camada epitélio-queratinosa que reveste o canal da teta. Para que um fármaco seja efetivo no tratamento da mastite ele deverá alcançar uma concentração ótima no alvo da infecção. Os patógenos podem estar no leite, ou em compartimentos intracelulares (Gruet *et al.*, 2001; Gehring e Smith, 2006).



**Figura 2.1:** Esquema da glândula mamária bovina. Fonte: Frandson *et al.*, 2005

Todas as formas da mastite produzem perdas econômicas consideráveis o que levou ao desenvolvimento de estratégias de controle da doença. Antibióticos e antiinflamatórios são as drogas mais utilizadas para o tratamento da mastite (Gruet *et al.*, 2001). Portanto novas estratégias de cura que possam ser mais efetivas e mais seletivas para o local da infecção precisam ser desenvolvidas. Um dos problemas na obtenção da cura da mastite causada principalmente por *S.aureus* é a baixa captura do fármaco pelos macrófagos ou sua inativação no pH lisossomal.

Sendo assim, algumas possibilidades podem ser investigadas na tentativa de desenvolver medicamentos mais eficazes para o tratamento dos animais infectados, com menor difusão do fármaco para a corrente circulatória. A aplicação de antibióticos por via intramamária é grandemente utilizada (Gruet *et al.*, 2001; Mckellar *et al.*, 2004; Gehring e Smith, 2006). Desta forma, o desenvolvimento de uma nova formulação antibiótica para o tratamento da mastite deverá ter algumas características, tais como, facilidade de penetração nas células fagocitárias (Craven e Anderson, 1984), manutenção da atividade do antibiótico nos lisossomas das células fagocitárias cujo meio é ácido e a possibilidade de administração intramamária sem perda da atividade ou degradação do antibiótico e liberação prolongada no local de ação.

Uma estratégia bastante utilizada nos dias de hoje na terapêutica humana pode ser, neste caso, aplicada de forma eficaz para o tratamento da mastite bovina, que consiste na utilização de vetores de fármacos nanoestruturados. Esses vetores promovem a proteção do fármaco contra degradação, aumentam a captura de fármacos por células com alto índice fagocítico e podem ser administrados por várias vias com aumento de seletividade pelo local de ação. De acordo com a literatura, a utilização de vetores nanoestruturados na área veterinária é ainda pequena (Bodmeier *et al.*, 1997; Gruet, *et al.*, 2001) e possui possibilidades ilimitadas de aplicação.

As nanopartículas poliméricas, que possuem superfície hidrofóbica ou negativa, são rapidamente removidas da circulação sanguínea após administração parenteral, pelos fagócitos profissionais do sistema mononuclear fagocítico (SMF) (Gref *et al.*, 1994; Avgoustakis *et al.*, 2003; Oliveira, 2009). Esse efeito é devido principalmente às características de superfície das partículas que podem permitir a adsorção de proteínas (opsoninas, por exemplo) facilitando o reconhecimento pelos macrófagos. As características de superfície das nanopartículas podem ser ajustadas, ou mesmo moduladas, segundo o interesse terapêutico, o alvo de ação, a via de administração e outros fatores, tais como a localização do agente infeccioso que se quer atingir.

Polímeros como a poli-caprolactona (PCL) são bastante hidrofóbicos, o que torna as partículas com ele preparadas bastante hidrofóbicas e acessíveis à opsonização e posterior fagocitose. O uso dessas nanopartículas ou mesmo de

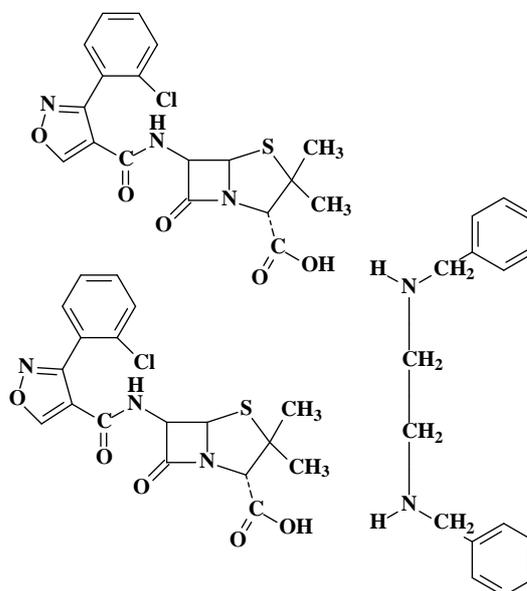
outras nanoestruturas, pode ter assim, uma aplicação na vetorização de antibióticos usados no tratamento da mastite, tais como a cloxacilina benzatina. A vetorização tem, portanto, o potencial de aumentar o direcionamento para as células infectadas, de aumentar a concentração local, de manter sustentada a liberação do antibiótico no local da infecção e de proteger o ativo da degradação no meio ácido dos lisossomos. A via de administração intramamária é uma opção viável para aplicação desses sistemas.

## 1.2.Cloxacilina Benzatina

O surgimento de formas de liberação prolongada das penicilinas ocorreu nas décadas de 40 e 50. Uma delas foi a formulação da penicilina G através da complexação da penicilina com uma base forte, a N,N'-dibenziletlenodiamina que forneceu um sal com menor taxa de degradação da penicilina e menor solubilidade, promovendo uma taxa de liberação reduzida e níveis plasmáticos sustentados por um longo período (Elias *et al.*, 1951). Em seguida, vários complexos derivados das penicilinas foram desenvolvidos, tais como a penicilina V e cloxacilina benzatina (Szabo *et al.*, 1951). As penicilinas pertencem à família química dos betalactâmicos que possuem uma estrutura semelhante a do dipeptídeo *D*-alanil-*D*-alanina presente no peptidoglicano da parede celular das bactérias. Seu mecanismo de ação se deve à ligação covalente das penicilinas a um resíduo do aminoácido serina da enzima transpeptidase a qual está relacionada à síntese da parede celular bacteriana, mais especificamente do peptidoglicano que a compõe. Assim, com a inibição desta enzima, a parede celular não é formada (Faure, 2008).

A cloxacilina benzatina (CLOXB) é um antibiótico  $\beta$ -lactâmico usado em práticas veterinárias por causa de sua atividade contra bactérias gram-positivas. A droga é utilizada no tratamento e prevenção de mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. (Perez *et al.*, 1997). Suas propriedades físico-químicas, tais como baixa solubilidade em água e em pH fisiológico, dificultam a administração e a elaboração de uma formulação efetiva na entrega seletiva do fármaco para o local de ação. No entanto, este é um fármaco de grande interesse na área veterinária. Para aumentar a disponibilidade da CLOXB no local, ou seja, dentro

das células infectadas, dentro das glândulas mamárias, onde reservatórios de bactérias se instalam e são de combate difícil, uma das alternativas é a encapsulação em vetores nanoestruturados.



**Figura 2.2:** Estrutura química da cloxacilina benzatina.

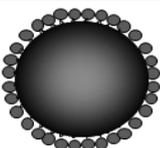
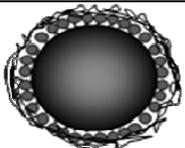
### 1.3.Vetores

Vetores nanométricos de fármacos tem sido alvo de numerosos estudos na área farmacêutica, com intuito de melhorar o sistema de liberação dos fármacos no organismo, diminuindo a dose necessária e conseqüentemente sua toxicidade (De Chasteigner *et al.*, 1996; Chacon *et al.*, 1999; Schaffazick *et al.*, 2003). Os sistemas nanométricos geralmente apresentam dimensões entre 10 e 1000 nm e se diferenciam de acordo com a composição - lipídico ou polimérico - e quanto à organização estrutural - vesicular (reservatório) ou matricial (Figura 2.3). Dentre os sistemas lipídicos, os lipossomas e as nanoemulsões são os mais estudados e dentre os poliméricos as nanocápsulas e nanoesferas. Como vantagem, estes últimos apresentam maior facilidade de produção, são mais estáveis *in vitro* e *in vivo* e durante o armazenamento (Schaffazick *et al.*, 2003).

As nanocápsulas (NC) são definidas como sistemas vesiculares em que o fármaco é confinado dentro de um núcleo oleoso revestido por uma parede polimérica (Legrand *et al.*, 1999, Fessi *et al.*, 1989). Esses sistemas são bastante adequados para o encapsulamento de fármacos lipofílicos, que podem estar dissolvidos neste núcleo e/ou adsorvidos à parede polimérica. As NC

apresentam excelente biodegradabilidade e biocompatibilidade (Schaffazick *et al.*, 2003). Estes sistemas têm diversas aplicações terapêuticas, podendo ser administrados por várias vias, inclusive as vias oral, tópica (Kim *et al.*, 2006), ocular (Calvo *et al.*, 1996; Agnihotri e Vavia, 2009) nasal e parenteral (Barratt, 2000).

**Figura 2.3:** Esquema dos vetores nanométricos mais utilizados e estudados.

<b>Estrutura</b>	<b>Encapsula</b>	<b>Esquema</b>
<b>Lipossoma</b> Estrutura vesicular de composição lipídica	Fármacos hidrofílicos, lipofílicos e anfifílicos	
<b>Nanoemulsão</b> Estrutura vesicular de composição lipídica	Fármacos lipofílicos	
<b>Nanocápsula</b> Estrutura vesicular de composição polimérica	Fármacos lipofílicos	
<b>Nanoesfera</b> Estrutura matricial de composição polimérica	Fármacos hidrofílicos ou lipofílicos (depende das características físico-químicas)	

#### 1.4.Nanocápsulas

As nanocápsulas são um sistema carreador de fármaco do tipo reservatório que contém no interior de sua estrutura uma nanogotícula oleosa, envolta por uma parede polimérica, que pode ser constituída de diferentes polímeros, dependendo da via a ser empregada. O emprego de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis são preferidos, principalmente quando a via a ser utilizada é a parenteral, evitando toxicidade. Eles são utilizados na concentração de 0,2 a 2% (p/p), assim como os tensoativos (Legrand *et al.*, 1999) empregadas na sua preparação. Estes últimos podem ser também de origem natural como as lecitinas ou sintéticos como o poloxamer (tensoativo hidrofílico não-iônico). Os tensoativos devem apresentar ausência de toxicidade,

não serem capazes de degradar o polímero e possuírem alta capacidade para dispersar e estabilizar as partículas (Legrand *et al.*, 1999).

As nanocápsulas podem ser preparadas por diferentes métodos (Legrand *et al.*, 1999; Reis *et al.*, 2006, Vauthier *et al.*, 2009). Dentre eles os principais são polimerização interfacial de monômeros e a deposição interfacial de polímeros pré-formados. A deposição interfacial de polímeros pré-formados emprega diferentes métodos, tais como a emulsificação-difusão, emulsificação-*evaporação*, *salting-out* e nanoprecipitação. As formulações do presente estudo foram preparadas pelo método de nanoprecipitação (Fessi *et al.*, 1989), por ser uma técnica rápida, simples, pouco onerosa, eficiente na produção de nanopartículas monodispersas e com emprego de solventes pouco tóxicos. Este método consiste na mistura de duas fases miscíveis: uma orgânica e a outra aquosa. A fase orgânica é composta por um solvente orgânico polar, óleo, polímero, fármaco e tensoativo. A fase orgânica é injetada na fase aquosa contendo um tensoativo. Imediatamente após mistura, formam-se as nanoestruturas, uma vez que o polímero precipita ao redor das nanogotículas de óleo por causa da diminuição da sua solubilidade na mistura dos solventes. A aparência da mistura torna-se leitosa. Por fim, o solvente orgânico é removido desta suspensão coloidal sob pressão reduzida.

A fim de caracterizar este sistema morfológicamente, a MFA como apresentada no capítulo 1, tem sido utilizada para a caracterização de nanopartículas, dentre elas, as NC (Montasser *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2005; De Assis *et al.*, 2008, Pereira *et al.*, 2008). A microscopia eletrônica de transmissão é a técnica mais utilizada para avaliação morfológica e estrutural das NC (Calvo *et al.*, 1997; Mosqueira *et al.*, 1999; Prego *et al.*, 2006).

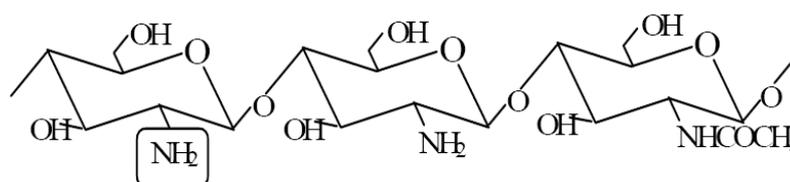
O potencial elétrico superficial das NC, conhecido como potencial zeta das NC pode ser positivo ou negativo, dependendo da natureza do polímero empregado e dos constituintes da sua formulação. Os fosfolípides (lecitinas), os tensoativo e os polímeros que são adsorvidos na sua superfície são os constituintes que podem afetar o potencial zeta por estarem envolvidos na formação do envoltório. Enquanto polímeros do tipo poliésteres e fosfolípides favorecem a indução de carga negativa na interface, o poloxamer tende a reduzir, em valor absoluto, o potencial zeta (Legrand *et al.*, 1999; Mosqueira *et*

*al.*, 2000). Além disso, o potencial zeta permite elucidar mecanismos de associação fármaco-vetor. Calvo *et al.* (1996) observaram os efeitos da composição de diferentes nanopartículas sobre os valores do potencial zeta e verificaram que a presença de fármaco conferiu um potencial zeta mais negativo ( $\sim -42$  mV) nas NC quando comparado às nanoemulsões ( $\sim 16$  mV). Por outro lado, Mosqueira *et al.* (2000) sugeriram que o óleo constituinte das NC está completamente encapsulado pela membrana polimérica, pois nenhuma alteração significativa no potencial zeta de NC foi observada em formulações preparadas com óleos de diferente natureza.

### 1.5. Nanocápsulas revestidas com quitosana

A quitosana é um polissacarídeo hidrofílico, amino derivado do processo de desacetilação da quitina que constitui a carapaça de insetos e crustáceos. Estruturalmente é semelhante à celulose sendo constituída por ligações de monômeros de glucosamina e N-acetilglucosamina unidos por uma ligação  $\beta(1\rightarrow4)$ . Por ser um polímero natural e biodegradável a quitosana tem sido proposta como um material atraente para usos diversos, principalmente em engenharia, biotecnologia e medicina (Hirano, 1999).

A quitosana é insolúvel em água, podendo ser caracterizada como um polieletrólito catiônico. É solúvel em ácidos orgânicos fracos ou diluídos como ácido acético 3% produzindo uma solução viscosa. Para se contornar o problema da insolubilidade em água que limita sua aplicação em vetores de fármacos principalmente para veicular peptídeos e genes, trabalhos têm sido publicados trazendo diferentes metodologias de obtenção de quitosanas solúveis em água (Signini e Campana, 2001; Garcia-Fuentes *et al.*, 2005).



**Figura 2.4.** Estrutura molecular da quitosana

**Tabela 2.1:** Emprego da quitosana em diversas áreas.

<b>Aplicabilidade</b>	<b>Referência</b>
Elemento para a formação géis para terapia do câncer	(Ta <i>et al.</i> , 2008)
Complexante de íons metálicos	(Kamiński e Modrzejewska, 1997)
Formação de coberturas com ação antifúngica e bactericida	(No <i>et al.</i> , 2002)
Agente ativo no emagrecimento humano por sua interação com gorduras e estruturas afins, entre outras possíveis aplicações sugeridas	(Pittler <i>et al.</i> , 1999)
Excipiente farmacêutico	(Illum, 1998)

Recentemente, vários trabalhos têm sido publicados na área de nanotecnologia empregando a quitosana como excipiente na produção de nanopartículas e como material de revestimento das mesmas (Tabela 2.2). Dados da literatura também mostram o aumento da entrega do fármaco pelas vias nasal (Fernandez-Hurrusuno *et al.*, 1999; Vila *et al.*, 2004), ocular (Calvo *et al.*, 1997; De Campos *et al.*, 2003) e parenteral (He *et al.*, 1998). Seu uso pela via oral também está sendo descrito, principalmente para veicular peptídeos (Garcia-Fuentes *et al.*, 2005; Prego *et al.*, 2005; Prego *et al.*, 2006) e para aumento da absorção de fármacos através da mucosa intestinal (Schipper *et al.*, 1999). Isto se deve à mucoadesividade apresentada pela quitosana (Lehr *et al.*, 1992). Sua carga positiva também está sendo estudada para aplicações na terapia gênica através da encapsulação de DNA, uma macromolécula de carga negativa (Mao *et al.*, 2001) e para tratamentos do câncer (Lu *et al.*, 2006). A secagem destes sistemas nanoestruturados contendo quitosana através da liofilização também é crescente na literatura (Kim *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006).

Para se obter partículas revestidas com quitosana diferentes metodologias estão sendo aplicadas, desde incubação até a incorporação da quitosana em métodos de produção de nanopartículas já existentes. Como exemplo, o revestimento de nanopartículas lipídicas, com carga de superfície negativa, possuem a carga invertida quando a quitosana é incubada no meio

(Garcia-Fuentes *et al.*, 2005). Assim, as partículas resultantes terão propriedades de superfície e estabilidade diferentes das originais.

**Tabela 2.2:** Emprego da quitosana em nanopartículas.

<b>Aplicabilidade</b>	<b>Referência</b>
Polímero empregado em microesferas de doxiciclina	(Shanmuganathan <i>et al.</i> , 2008)
Polímero empregado em nanoesferas de retinol	(Kim <i>et al.</i> , 2006)
Nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões revestidas	(Calvo <i>et al.</i> , 1996)
Nanocápsulas revestidas com quitosana	(Calvo <i>et al.</i> , 1997; De Campos <i>et al.</i> , 2003)
Nanocápsulas e nanoemulsões revestidas	PCT/ES 96/00116

A adaptação de metodologias de produção existentes para incorporação da quitosana pode ser avaliada no trabalho de Calvo *et al.*(1997) onde a adição da quitosana na fase aquosa permitiu obter nanoemulsões e nanocápsulas com quitosana adsorvida aos fosfolípidos utilizados em sua fabricação. De Campos *et al.* (2003) observaram diferença entre três nanocápsulas com diferentes características de superfície: NC de PCL, NC de PCL revestida com PEG e NC de PCL revestida com quitosana na retenção de um marcador fluorescente em córnea de coelhos. Foi observado que as NC revestidas com quitosana promoveram uma maior retenção do marcador na córnea.

### **1.6. Teor de encapsulação do fármaco em nanocápsulas**

A determinação do teor de encapsulação, ou seja, da quantidade de fármaco associado às nanoestruturas é importante, pois revela a eficiência do sistema em conseguir encapsular, reter ou associar o fármaco. Porém, devido ao reduzido tamanho das partículas, a separação do fármaco livre (não encapsulado) das partículas as quais ele está associado é tarefa bastante difícil. As técnicas mais utilizadas para a separação são a ultracentrifugação (Santos-Magalhães *et al.*, 2000) e a ultrafiltração-centifugação (Schaffazick *et al.*, 2006). Na primeira técnica, a concentração do fármaco livre na suspensão é obtida

através da ultracentrifugação e é determinada no sobrenadante. A concentração total do fármaco é determinada pela dissolução das nanopartículas em um solvente apropriado. Assim a concentração do fármaco associada às nanoestruturas é calculada pela diferença entre as concentrações do fármaco total e o livre. Já a segunda técnica, utilizada no presente trabalho também se utiliza da diferença entre a quantidade de fármaco total e do livre, porém a forma de separação das partículas é diferente, pois as NC não formam um pellet quando centrifugadas.

Na ultrafiltração-centrifugação, emprega-se uma membrana de ultrafiltração que retém as nanopartículas e no filtrado é dosado o fármaco que não se associou às nanoestruturas. O fármaco total é dosado da mesma maneira que na técnica anterior (Schaffazick *et al.*, 2003). Vários fatores influenciam a quantidade de fármaco que vai ser encapsulado, tais como: as características físico-químicas do fármaco, o pH do meio, as características de superfície das nanopartículas, a natureza e peso molecular do polímero, a quantidade de fármaco adicionada à formulação, a natureza do óleo empregado (no caso das NC) e o tipo de tensioativo adsorvido na parede polimérica (Schaffazick *et al.*, 2003). No caso das NC, o fármaco pode estar associado no núcleo oleoso, entretanto, em vários trabalhos, os dados mostram que ele pode também se adsorver à parede polimérica (Legrand *et al.*, 1999).

Diante do exposto, foi avaliado o emprego de nanocápsulas potencialmente capazes de encapsular a CLOXB, hidrofóbica, para aplicação na terapia da mastite bovina. Para essa finalidade foi considerada a modulação das características superficiais das NC, para que elas possuam carga superficial negativa ou positiva, com propriedades de fagocitose e bioadesivas, respectivamente. Essas propriedades podem ser úteis na manutenção do fármaco no local de aplicação, no caso, dentro da glândula mamária, por mais tempo e também dentro dos fagócitos presentes na glândula, onde as bactérias se alojam e apresentam suas formas de resistência.

## **OBJETIVO**

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver duas formulações de nanocápsulas contendo a cloxacilina benzatina, empregando-se dois polímeros, PCL e quitosana, visando à obtenção de propriedades biológicas diferentes de hidrofobicidade e bioadesão para futura aplicação no tratamento da mastite bovina por via intramamária. Além disso, foi também objetivo deste trabalho um estudo da caracterização desses nanosistemas visando uma maior reprodutibilidade do método.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desenvolver formulações de nanocápsulas contendo como polímeros constituintes a poli- $\epsilon$ -caprolactona e a quitosana;
- Caracterizar do ponto de vista físico-químico, por análise de distribuição de tamanho, do potencial zeta e da morfologia por microscopias de alta resolução, as novas nanoestruturas;
- Desenvolver uma metodologia de doseamento da cloxacilina benzatina para determinação do teor de encapsulação em nanocápsulas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Estudar a liberação *in vitro* da cloxacilina benzatina a partir das nanopartículas em diferentes meios.

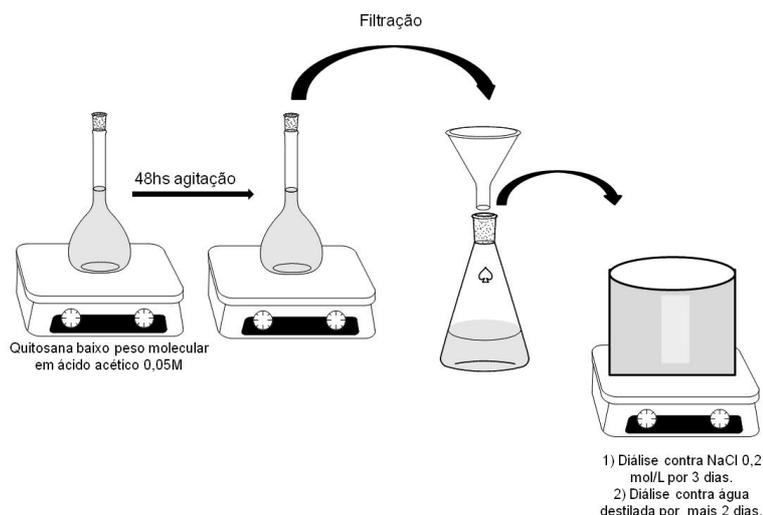
## **Materiais e métodos**

### **2.1. Materiais**

Foram utilizados os seguintes fármacos e reagentes: cloxacilina benzatina, gentilmente cedida pela EMBRAPA, cloxacilina sódica (Sigma), fosfolipídio de soja com 70% de fosfatidilcolina (EPIKURON 170® gentilmente cedido por Lucas Meyer, França), monooleato de sorbitan (Span 80) (Sigma, EUA), plurol oleique e Labrafac CC (triglicerídios do ácido cáprico/caprílico) gentilmente fornecidos pela Gattefosse (França), poloxamer 188 (Pluronic F68), poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) (PM 42500Da) (Sigma, USA), quitosana de baixo peso molecular (Sigma), fosfato monobásico e dibásico de potássio P.A (Riedel-deHaën®), cloreto de sódio (Synth, Brasil). O leite utilizado no experimento de cinética de liberação foi adquirido da marca Cotochês® desnatado (3% proteína, 5% de carboidratos, 0,06% sódio e 0,12% cálcio) (Brasil). Todas as outras substâncias utilizadas tais como acetonitrila, acetona, metanol grau CLAE (Tedia, Brasil), polietilenoglicol 300, ácido fosfórico foram de grau analítico e foram utilizadas sem posterior purificação. Água MilliQ foi purificada no sistema Symplicity/System 185 (Millipore®, EUA).

### **2.2. Preparação da quitosana solúvel em água**

A preparação da quitosana solúvel em água foi adaptada da metodologia de Signini e Campana (2001). Brevemente, 1g de quitosana de baixo peso molecular em torno de 389.000 g/mol (Takahashi *et al.*, 2005) foi disperso em 100 mL de ácido acético 0,05M e esta suspensão foi mantida sob agitação magnética constante durante aproximadamente 48 (quarenta e oito) horas. Logo em seguida, a solução foi filtrada duas vezes em papel de filtro, duas vezes em filtro sinterizados, e duas vezes em filtro de 0,45  $\mu$ m. Esta solução filtrada foi levada para diálise, empregando membrana poro 12.000-14.000 Da, por três dias contra solução aquosa de NaCl 0,2 M e dois dias contra água destilada e deionizada. Após a diálise, a amostra de cloridrato de quitosana foi liofilizada.



**Figura 2.5:** Esquema do preparo da quitosana solúvel em água.

### 2.3. Estudo da solubilidade da CLOXB em solventes e óleos

Como houve grande dificuldade na otimização da formulação com a introdução do fármaco, pois houve separação de fases das NC, a solubilidade do fármaco em diferentes solventes orgânicos e óleos foi investigada. Uma quantidade de 1 mg do fármaco foi pesada e 1 mL de uma mistura 1:1 de etanol:acetona e metanol:acetona foi adicionado a um eppendorf contendo o fármaco sob agitação magnética por 24 horas. Para a solubilidade em óleo 1 mg do fármaco foi pesada e adicionado em 1 mL de diferentes óleos a saber: óleo de rícino, plulol oleique, plulol oleique CC497, transcutoil, labrafac cc. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 8000 rpm por 5 min e 100  $\mu$ L do sobrenadante foi retirado. A ele foram acrescentados 1900  $\mu$ L de acetonitrila, e o tubo foi então homogeneizado com auxílio de vortex e logo em seguida centrifugado novamente. O sobrenadante foi retirado e filtrado em filtro 0,45  $\mu$ m diretamente em um vial. As amostras foram preparadas em triplicata e analisadas por CLAE.

### 2.4. Preparação das nanocápsulas

A preparação das nanocápsulas foi realizada pelo método de deposição interfacial de um polímero pré-formado seguido da evaporação do solvente – nanoprecipitação, descrito por Fessi *et al.* (1989). Várias formulações foram testadas a fim de otimizar a proporção e os constituintes da formulação. Para o

preparo das nanocápsulas brancas (sem fármaco) de carga positiva foram dissolvidos 80 mg de polímero poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) em uma solução de acetona (24 mL) e metanol (7 mL) contendo 0,4% p/v de lecitina de soja e 3% v/v de Labrafac cc. A dissolução ocorreu por meio de agitação com agitador magnético e aquecimento até 45°C. Em seguida, a solução orgânica foi vertida em uma solução aquosa (60 mL) contendo 0,6% p/v de poloxamer 188 e quitosana solúvel em água 0,1% p/v, como preparada anteriormente. Seguiu-se agitação em velocidade moderada com o auxílio de agitador magnético por dez minutos, a fim de promover a formação das nanocápsulas. Posteriormente esta suspensão foi levada ao rotavapor (Heidolph Instruments, Alemanha), mantendo-se a temperatura do banho em 45°C para evaporação do solvente à pressão reduzida, até um volume final de 10 mL. Para a preparação das nanocápsulas de cloxacilina benzatina, o fármaco foi solubilizado em metanol e adicionado para se obter diferentes concentrações finais.

Já para o preparo de nanocápsulas brancas (sem fármaco) de carga negativa foram dissolvidos 60 mg de polímero poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) em uma solução de acetona (20 mL) e metanol (6 mL) contendo 0,5% p/v de monooleato de sorbitan e 2,5% v/v de plurool oleique. Em seguida, a solução orgânica foi vertida em uma solução aquosa (52 mL) contendo 0,75% p/v de poloxamer 188. Seguiu-se agitação com velocidade moderada (250 rpm) com auxílio de agitador magnético por dez minutos, a fim de promover a formação das nanocápsulas. A evaporação do solvente foi feita de acordo com a metodologia acima, e o volume da suspensão final foi também de 10 mL. Para a preparação das nanocápsulas de cloxacilina benzatina, o fármaco foi solubilizado em metanol e adicionado à fase oleosa para se obter diferentes concentrações finais. Para a realização deste trabalho foram preparadas NC de CLOXB com concentrações de 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg/mL.

## 2.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS DE CLOXACILINA BENZATINA

### 2.5.1. Análise de tamanho e potencial zeta

O tamanho médio e o índice de polidispersão das nanocápsulas foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons, utilizando o equipamento NANOSIZER<sup>®</sup> N5 da Beckmann Coulter à temperatura de 20°C utilizando-se um ângulo de detecção de 90°. Já o potencial zeta foi determinado no Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Inglaterra) usando a técnica de microeletroforese acoplado a Anemometria do Laser Doppler (ALD). Para a realização das medidas, 5 µl das amostras foram diluídas em uma solução de 10 mL de NaCl 1mM previamente filtrada em filtro 0,45 µm. Todas as medidas foram determinadas em triplicata e os valores apresentados foram expressos como a média ± desvio padrão. O índice de polidispersão reflete a homogeneidade do tamanho das nanopartículas na suspensão. Sendo assim, amostras que apresentam índice de polidispersão inferior a 0,3 foram consideradas monodispersas (Mosqueira, *et al.*, 2000).

### 2.5.2. Análise da morfologia

A análise morfológica das nanocápsulas foi realizada por microscopia de força atômica (MFA) a qual foi realizada à temperatura ambiente nos equipamentos Multimode e Dimension 300, ambos monitorados pelo controlador Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Bárbara, CA, EUA) do Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC, MG). As imagens foram obtidas no modo de contato intermitente (*tapping mode*) utilizando-se sonda de silício de comprimento 228 µm, com uma frequência de ressonância de 75-98 kHz, força constante de 3.0-7.1 N/m e raio de curvatura de 5 nm. Aproximadamente 10 µl de cada amostra foram depositadas em lâminas de vidro e, logo após seguiu-se a secagem com jato de argônio. A análise das amostras foi realizada utilizando o programa de análise do sistema (Section Analysis).

## **2.6.Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por cromatografia de alta eficiência (CLAE) para o doseamento da cloxacilina benzatina.**

O desenvolvimento da metodologia analítica por CLAE foi realizado com o objetivo de padronizar e validar um método analítico de quantificação da cloxacilina benzatina nas nanocápsulas, além do seu doseamento no meio de dissolução dos ensaios de liberação *in vitro*. Os parâmetros utilizados para validação do método foram especificidade, seletividade, linearidade, precisão e exatidão.

### **2.6.1.Condições cromatográficas**

- Coluna cromatográfica de fase reversa MERCK, LiChroCart (250mm x 4mm x 5 $\mu$ m)
- Eluição isocrática;
- Vazão da fase móvel: 1mL/min;
- Detector espectrofotométrico UV-VIS a 225nm;
- Temperatura da coluna: 34°C;
- Volume de injeção: 25 $\mu$ L;
- Composição da fase móvel: acetonitrila:tampão fosfato pH=3 ajustado com ácido fosfórico (50:50).

A fase móvel foi previamente filtrada por membrana de poro 0,45  $\mu$ m e em seguida degaseificada através de sonicação em banho por 30min.

### **2.6.2.Curvas padrão da cloxacilina**

As curvas padrão foram construídas a partir de uma solução padrão estoque de cloxacilina benzatina a 100  $\mu$ g/mL. As soluções padrão de uso foram preparadas a partir da solução estoque em uma mistura de acetonitrila:tampão fosfato (50:50) pH=3 ajustado com ácido fosfórico com diferentes concentrações de cloxacilina benzatina (0,5-50  $\mu$ g/mL), com o objetivo de padronizar o método de quantificação do fármaco presente nas nanopartículas. Outra curva padrão foi construída em acetonitrila com diferentes concentrações de cloxacilina benzatina (0,5-50  $\mu$ g/mL), com o objetivo de padronizar o método de quantificação do fármaco presente no meio de liberação *in vitro*. Cada concentração foi analisada

em triplicata e as curvas foram construídas relacionando-se a média dos valores da área sob a curva obtida com as concentrações de cloxacilina benzatina utilizadas. Os valores foram plotados em gráfico de dispersão linear, sendo calculada a equação da reta onde o eixo x é a concentração e o eixo y é o da resposta (absorção de 225 nm). Também foram determinados os desvios padrão e coeficientes de variação para cada concentração.

### **2.6.3. Seletividade e especificidade**

A especificidade e a seletividade consistem na capacidade do método em determinar a concentração de uma substância na presença de outras (ANVISA 2003). Com o objetivo de se averiguar se houve interferência dos componentes da formulação das nanocápsulas no tempo de retenção da CLOX, nanocápsulas brancas foram submetidas às mesmas condições analíticas que as amostras de nanocápsulas com CLOX. Foram comparados os cromatogramas das NC brancas e de NC com fármaco.

### **2.6.4. Precisão**

A precisão foi determinada através do ensaio de repetibilidade, analisando-se o coeficiente de variação das determinações de três amostras de concentração conhecida, sendo uma baixa (10 µg), uma média (20 µg) e uma alta (30 µg), avaliando o intervalo linear da curva analítica (ANVISA 2003).

### **2.6.5. Exatidão**

A exatidão de um método é definida como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro (ANVISA 2003). Avaliou-se a exatidão por análise de amostra de concentração conhecida comparando-se o valor mensurado com o valor teórico. Realizaram-se determinações de três amostras de concentração conhecida, sendo uma baixa (10 µg), uma média (20 µg) e uma alta (30 µg), avaliando o intervalo linear da curva analítica. Os resultados foram expressos como percentagem de recuperação (ANVISA 2003)

## 2.7.Determinação do teor do fármaco encapsulado por CLAE

As análises foram realizadas em triplicata. Por este método determinou-se a concentração de fármaco não-associado às nanopartículas. A concentração de CLOX foi calculada, aplicando-se a média dos valores das áreas sob a curva do fármaco na equação da reta obtida pela curva analítica em acetonitrila:tampão fosfato pH=3 ajustado com ácido fosfórico (50:50). Alíquotas de 400 µl da suspensão de NC 0,5 e 2,5 mg/mL foram adicionadas separadamente ao sistema de ultrafiltração Microcon®-MC da Millipore contendo uma membrana de celulose de 10.000 Da. Logo após, o sistema foi submetido à centrifugação por 15 (quinze) minutos a 2300 rpm. As NCs ficaram retidas no filtro enquanto a cloxacilina benzatina livre na suspensão foi filtrada, passando para o ultrafiltrado. 50 µl deste ultrafiltrado foi retirado e 200 µl de tampão fosfato pH=3:acetonitrila (50:50) (grau CLAE) foi adicionado, agitados no vortex por 5 minutos, centrifugados a 8000 rpm por 15 minutos e a quantidade de fármaco no sobrenadante foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência. Para a determinação do fármaco total, 100 µl da suspensão das NC foram solubilizados em 9900 µl de uma solução PBS pH=3:acetonitrila (50:50) (grau CLAE), submetidos ao vortex por 10 minutos e logo em seguida centrifugados a 8000 rpm por 5 minutos. A quantidade de fármaco no sobrenadante foi determinada por CLAE.

O percentual de cloxacilina benzatina encapsulado pelas nanocápsulas foi determinado pela seguinte equação:

$$(1): \% \text{ de Cloxacilina benzatina encapsulada} = \frac{A_{total} - A_{ultrafiltrado}}{A_{total}} \times 100$$

$$(2): \text{Eficiência de encapsulação} = \frac{(1)}{A_{teórico}} \times 100$$

Onde:

*A total*= concentração do fármaco total na suspensão coloidal(mL)

*A ultrafiltrado*=concentração do fármaco filtrado(mL)

*A teórico*= quantidade de fármaco pesado para o preparo(mL)

## 2.8.Determinação da cinética de liberação *in vitro*

Após o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica, é necessário avaliar o perfil de liberação *in vitro* que irá determinar a quantidade de fármaco liberado por unidade de tempo. O estudo *in vitro* pode ser realizado em diferentes meios desde que obedeça a condição sink (onde o meio de dissolução possui o fármaco com até 20% da concentração de saturação, fornecendo assim a possibilidade de completa solubilização no meio). A solubilidade da CLOXB em diferentes meios foi determinada para que a condição sink fosse obedecida. Uma quantidade de 1 mg do fármaco foi pesada e 1 mL de meio foi adicionado a um eppendorf contendo o fármaco sob agitação magnética por 24 horas. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 8000 rpm por 5 min e 100 µl do sobrenadante foi retirado. A ele foram acrescentados 1900 µl de acetonitrila, e o tubo foi então homogeneizado com auxílio de vortex e logo em seguida centrifugado novamente. O sobrenadante foi retirado e filtrado em filtro 0,45 µm diretamente em um vial. As amostras foram realizadas em triplicata e analisadas por CLAE.

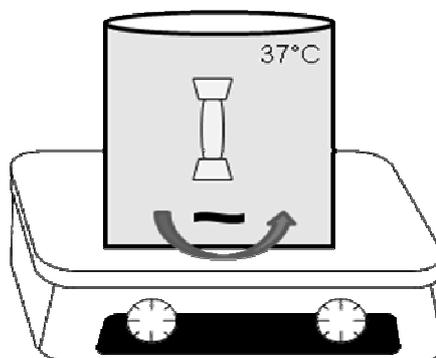
A avaliação do perfil de liberação *in vitro* da cloxacilina benzatina a partir das nanocápsulas foi realizado de acordo com a técnica de diálise direta em dois diferentes meios de liberação. Sacos de diálise foram inseridos em recipientes com 50 mL de solução salina tamponada contendo 1% (p/v) PEG 300 (PBS:PEG) ou salina tamponada contendo 1% (p/v) leite desnatado (PBS:leite) a 37°C com agitação moderada.

Em sacos de diálise distintos com poros de 12.000-14.000 Da foram inseridos:

- CLOXB livre no meio PBS:PEG
- CLOXB livre no meio PBS:leite
- 1 mL da suspensão de NC 0,5 mg/mL
- 0,2 mL da suspensão de NC 2,5 mg/mL.

Em intervalos de tempo pré-definidos (0,25; 0,5; 1,0; 3,0; 6,0; 9,0; 21; 24 e 48h), foram retiradas três (3) alíquotas de 1 mL em cada tempo e o meio foi readicionado com o mesmo volume retirado. Logo após, a cada uma destas amostras foi adicionado 1 mL de acetonitrila e seguiu-se homogeneização por 5 minutos em vortex. Após, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 8000

rpm. O sobrenadante foi dosado em CLAE a 225 nm. Os experimentos de cinética de liberação foram realizados em um banho-maria a 37°C com agitação (Banho Dubnoff mod.144, Fanem, Brasil).



**Figura 2.6:** Figura ilustrativa da montagem do teste de liberação *in vitro* a 37°C de CLOXB das NC, contendo diferentes concentrações em salina tamponada com 1% de leite ou PEG em condições sink (10% da solubilidade máxima do fármaco no meio).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NANOCÁPSULAS DE CLOXACILINA BENZATINA

#### 3.1.1. Solubilidade da CLOXB em solventes e óleos

A CLOXB tem baixa solubilidade em alcoóis e na acetona (Szabo, 1951) presentes na metodologia de preparo de NC por nanoprecipitação. Foram obtidos resultados satisfatórios de solubilidade da CLOXB em uma mistura de acetona e metanol e nos óleos labrafac e plurol oleique.

**Tabela 2.3:** Natureza e concentração dos constituintes das formulações de NC testadas

Constituintes	Formulações								
	NC1	NC2	NC4	NC5	NC6	NC7	NC8	NC9	NC10
<b>Fase orgânica</b>									
PCL (mg)	60	60	60	50	50	60	60	80	80
Epikuron (mg)	50	60	.	30	.	30	30	40	40
Span (mg)	.	.	50	.	40	.	.	.	.
Metanol (mL)	2,4	4	6	6	5	5	5	7	7
Acetona (mL)	7,6	12	20	20	16	16	16	23	23
Labrafac (ul)	250	.	.	250	250	250	250	250	250
Plurol Oleique	.	.	250	.	.	.	.	.	.
Fármaco (mg/mL)	0,5	0,5	0,5	.	0,5	.	3	.	2,5 5
<b>Fase aquosa</b>									
Água MilliQ	20	32	52	40	40	40	40	60	60
poloxamer (mg)	50	60	75	52	62,5	60	60	60	60
Quitosana (mg)	.	.	.	5	10*	10	10	10	10
Resultado <sup>#</sup>	-	-	+	-	-	+	-	+	+

\*Incubado.

<sup>#</sup> Amostras: + resultado positivo, sem quebra após 1 dia de armazenamento a 4°C; - resultado negativo com quebra da formulação instantaneamente ou após um dia de armazenamento a 4°C.

Porém, as formulações com quitosana que continham mais de 1 mg/mL de CLOXB solubilizadas em plulol oleique não podiam ter sua eficiência de encapsulação determinada pela oclusão do filtro Microcon®, devido à alta viscosidade do plulol oleique. Por isso, para estas formulações o labrafac foi utilizado. Apesar de solúvel em labrafac, a CLOXB ficou mais estável ao longo do tempo em plulol oleique. Algumas formulações estão apresentadas na tabela 2.3. As formulações NC4 e NC9 foram as que apresentaram maior estabilidade.

### 3.1.2. Análise da distribuição de tamanho e do potencial zeta

O tamanho e o potencial zeta das nanocápsulas foram avaliados e os resultados encontram-se na Tabela 2.4.

**Tabela 2.4:** Análise do tamanho e potencial zeta das NC contendo diferentes concentrações de cloxacilina benzatina.

	Concentração de CLOXB (mg/mL)	Tamanho médio $\pm$ DP <sup>1</sup> (nm)	I.P. <sup>2</sup>	Potencial zeta <sup>3</sup> $\pm$ DP <sup>2</sup> (mV)
NC- PCL	0	308,9 $\pm$ 8,19	0,238 $\pm$ 0,05	-30,47 $\pm$ 2,01
	0,5	322,4 $\pm$ 3,96	0,088 $\pm$ 0,05*	-28,20 $\pm$ 0,62
	2,5	instável	instável	instável
NC- PCL- QUIT	0	214,3 $\pm$ 1,47	0,106 $\pm$ 0,05	+21,00 $\pm$ 0,53
	2,5	291 $\pm$ 5,57* <sup>#</sup>	0,319 $\pm$ 0,05* <sup>#</sup>	+16,53 $\pm$ 2,75*
	5	242,9 $\pm$ 5,75* <sup>#</sup>	0,192 $\pm$ 0,05* <sup>#</sup>	+14 $\pm$ 2,75*

<sup>1</sup> DP = Desvio padrão (n = 3); <sup>2</sup> I.P = Índice de polidispersão (n=3); <sup>3</sup> Largura do pico igual a 1,6 em todas as amostras. A análise estatística foi realizada através do teste *t* student entre as diferentes formulações, em relação às NC brancas.  $P < 0,05$  para os parâmetros mostrados na tabela em relação à formulação branca \*.  $P < 0,05$  entre formulações #.

O tamanho das diferentes formulações de NC produzidas foi significativamente ( $P < 0,05$ ) afetado pela concentração de CLOXB adicionado tanto para NC de PCL quanto de PCL-QUI (Tabela 2.4). Porém, a diferença entre os diâmetros médios das NC sem CLOXB de PLC e as de PCL-QUIT de 95 nm pode ser atribuída à viscosidade maior do óleo plulol oleique presente na primeira formulação em relação ao labrafac CC utilizado na segunda formulação. A presença da quitosana, hipoteticamente, deveria ter produzido partículas

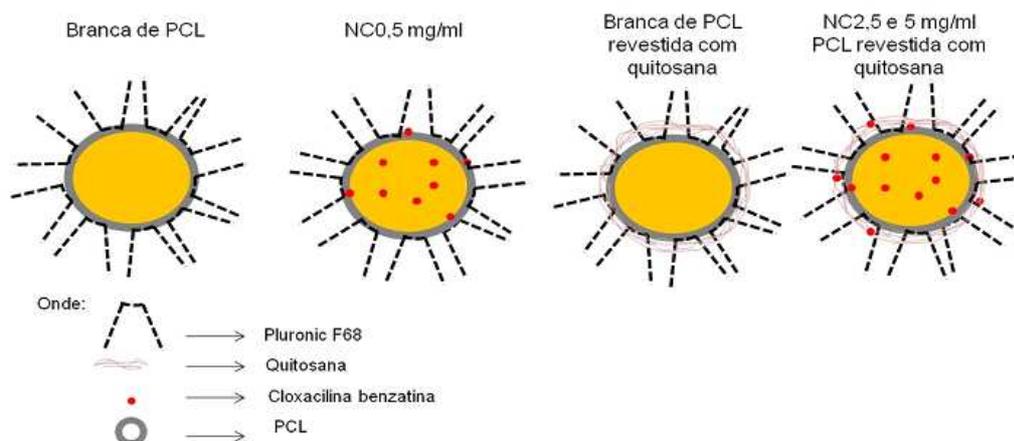
maiores que as NC-PCL, pois a viscosidade da fase aquosa aumenta com a inclusão da quitosana e interfere no fenômeno hidrodinâmico interfacial que é responsável pela difusão espontânea da solução orgânica na aquosa, gerando incremento do tamanho dos glóbulos (Davis e Rideal, 1963; Legrand *et al.*, 1999). Porém, neste trabalho isto não ocorreu, e menores tamanhos para formulações contendo quitosana como polímero de revestimento foram obtidos. Esse dados estão diferentes da maior parte dos artigos da literatura, provavelmente devido a otimização da formulação baseada na variação das concentrações de PCL, quitosana e lecitina, além da obtenção da quitosana por uma metodologia diferente das previamente citadas (Signini e Campana, 2001). A quitosana preparada parece possuir baixa viscosidade, porém seu valor não foi determinado. Outro fator que pode ter afetado o tamanho é o incremento da atividade interfacial da CLOXB associada ao PLC-QUIT, que pode ter gerado redução da tensão interfacial durante o processo da difusão do solvente, efeito que por sua vez, reduz o tamanho dos glóbulos.

Para as NC PCL-QUIT, a inclusão da CLOXB induziu um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) de tamanho médio em relação aos valores obtidos para as NC brancas (Tabela 2.4). De acordo com a literatura, o que mais influencia no tamanho destas partículas revestidas com quitosana são a sua viscosidade e concentração de PCL (Calvo *et al.*, 1997). Entretanto, com concentrações maiores de CLOXB houve uma redução significativa do tamanho ( $p < 0,05$ ), ao contrário do esperado, sugerindo que a CLOXB em altas concentrações pode ter propriedades tensioativas.

O índice de polidispersão, calculado pelo equipamento, reflete a homogeneidade na distribuição do diâmetro das partículas na amostra (Tabela 2.4). As formulações contendo de 0, 0,5 e 5 mg/mL de CLOXB mostraram-se monodispersas, considerando-se o índice de polidispersão menor que 0,3 (Mosqueira *et al.*, 2001; Malvern Inst., 2000).

Os valores de potencial zeta mostram um efeito evidente do polímero de revestimento sobre a carga de superfície das partículas (Tabela 2.4). As formulações de PCL possuem carga negativa devido à natureza do polímero constituinte. A inclusão de CLOXB com carga também negativa induziu pouca variação no potencial, porém não significativa. As NC de PCL revestidas com

quitosana apresentaram carga positiva, como esperado. Entretanto, a quitosana produziu um efeito intenso e significativo ( $P < 0,05$ ) reduzindo o potencial de superfície dessas partículas nas concentrações de 2,5 e 5 mg/mL de CLOXB (Tabela 2.4). Provavelmente, o fármaco encontra-se adsorvido à parede polimérica, além de estar também associado ao núcleo oleoso das NC (vide figura 2.7).



**Figura 2.7:** Representação esquemática de nanocápsulas brancas e com fármaco mostrando a possível associação da CLOXB nas NC.

Calvo e colaboradores (1997) mostraram que a proporção de quitosana em relação ao poloxamer pode fornecer partículas com potencial zeta de +20 a +60 mV e tamanho de 200 nm a 1  $\mu$ m respectivamente. Este aumento no tamanho e a ausência de modificações na energia de ligação (detectada através espectroscopia fotoelétrica de raio-x) sugeriram então que o poloxamer e a quitosana foram incorporados às nanoestruturas através de ligações de hidrogênio (Calvo, *et al.*, 1997). As NC revestidas de quitosana apresentaram menor estabilidade no que se refere à facilidade de quebra em relação ao tempo em relação às NC de PCL e maiores estudos envolvendo métodos de secagem para sua estabilização são necessários. Tanto para as NC brancas quanto para as NC contendo fármaco, observou-se formação de precipitado após uma semana de estocagem em geladeira. Este fato pode ser devido ao decréscimo da solubilidade da quitosana no meio ou à acidificação excessiva da amostra que catalisa a hidrólise do PCL. Porém, uma alternativa para contornar estas

instabilidades é a liofilização das NC logo após sua preparação. Estudos neste sentido foram iniciados com resultados preliminares satisfatórios.

### 3.1.2. Avaliação morfológica

As imagens obtidas pela MFA mostram estruturas nanométricas arredondadas depositadas sobre lâminas de vidro (Figuras 2.8, 2.9, 2.10 e 2.11). De acordo com a tabela 2.5, o tamanho médio observado por MFA apresentou-se significativamente maior que os valores obtidos pela ECF, ao contrário do que foi observado no capítulo anterior para as nanoesferas.

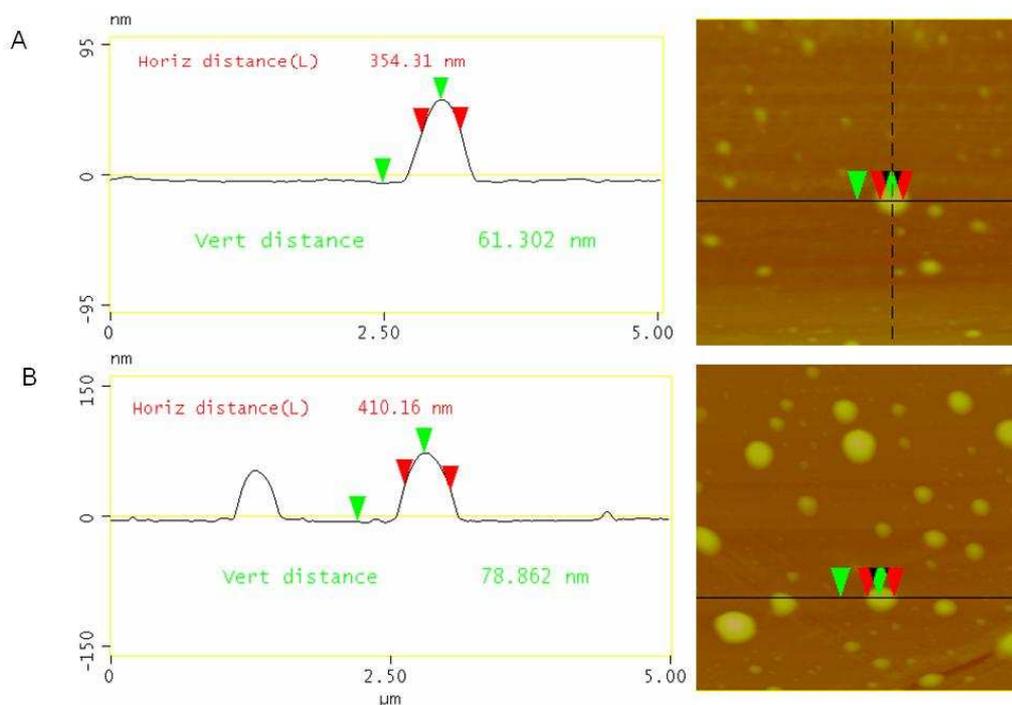
**Tabela 2.5:** Medidas de tamanho médio das NC obtidas pelas técnicas de ECF e MFA.

Concentração de CLOXB (mg/mL)	Tamanho médio $\pm$ DP <sup>1</sup> (nm)	
	ECF <sup>2</sup>	MFA <sup>3</sup>
0	308,9 $\pm$ 8,19	326,7 $\pm$ 35,42
0,5	322,4 $\pm$ 3,96	375,3 $\pm$ 80,81
0	214,3 $\pm$ 1,47	475,3 $\pm$ 83,48
2,5	291,0 $\pm$ 5,57	449,2 $\pm$ 74,78
5	242,9 $\pm$ 5,75	360,0 $\pm$ 94,63

<sup>1</sup>DP = Desvio padrão; <sup>2</sup>ECF = Espectroscopia de correlação de fótons; <sup>3</sup>MFA = Microscopia de força atômica. A análise estatística foi realizada através do teste *t* student entre as diferentes formulações, em relação às NC brancas.  $P < 0,05$  (em relação às NC brancas) para todos os parâmetros mostrados na tabela.

Isto pode ser devido ao achatamento das NC causado pela passagem da sonda da MFA sobre a amostra, uma vez que sua estrutura é mais maleável que as nanoesferas por ter em sua constituição um núcleo oleoso (Leite *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2008; De assis *et al.*, 2008). Para investigar este possível achatamento foi determinada a relação diâmetro/altura ( $D/h$ ) das nanopartículas pela MFA. O valor desta relação pode variar de acordo com a espessura da parede polimérica e da heterogeneidade da deposição do polímero sobre as nanopartículas durante o processo de fabricação (Leite *et al.*, 2005). De acordo com este trabalho, esta relação pode variar com o modo de associação do fármaco às nanoestruturas uma vez que ocorreu uma redução nesta relação  $D/h$

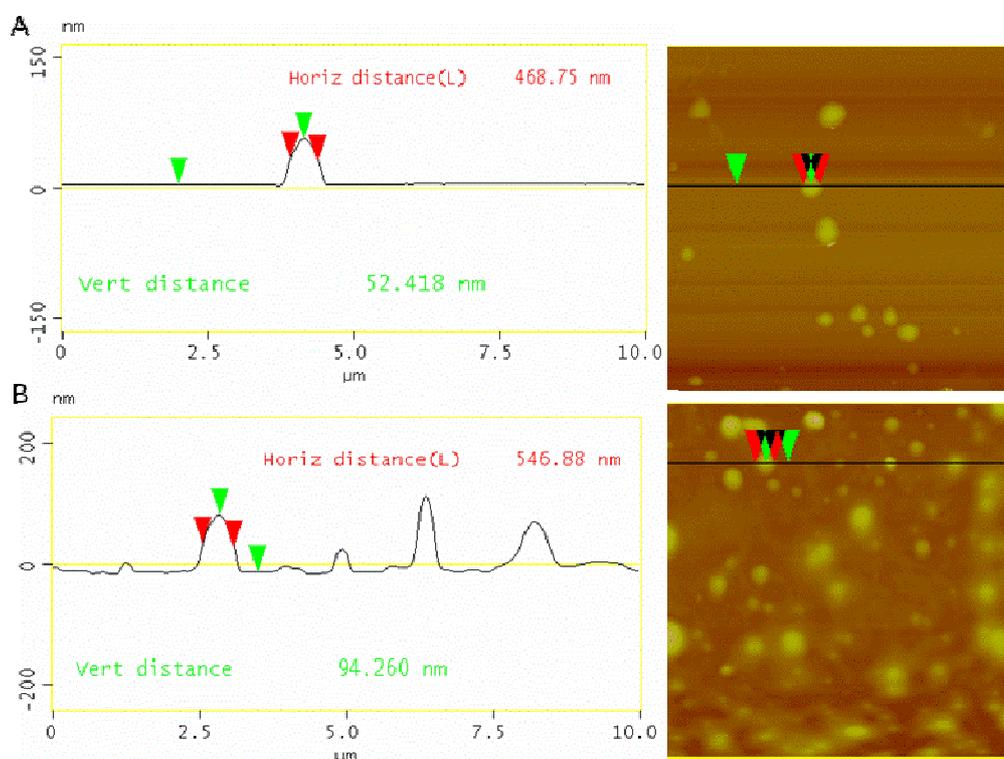
com a incorporação do fármaco o que reforça a idéia do potencial zeta obtido de que ele está adsorvido na parede polimérica, tornando-a mais rígida e menos deformável. O valor da relação  $D/h$  obtida variou para as diferentes formulações analisadas, e está de acordo com a hipótese de que as NC possam se achatar na superfície da mica (Montasser, *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2005; De Assis *et al.*, 2008). Para a NC-PCL branca esta relação  $D/h$  foi igual a 7 e para a mesma formulação contendo 0,5 mg/mL de CLOXB foi menor, igual a 5. Os valores das NC-PCL brancas estão menores que os valores encontrados na literatura devido à característica mais viscosa do óleo que constitui as NC deste trabalho. Leite e colaboradores (2005) encontraram um valor de  $D/h$  de aproximadamente 10 e de Assis e colaboradores (2008) encontraram um valor de aproximadamente 11.



**Figura 2.8:** Imagem MFA no software “section analysis” mostrando altura(Vert distance) e tamanho(Horiz distance). (A) NC PCL branca e (B) NC PCL 0,5 mg/mL.

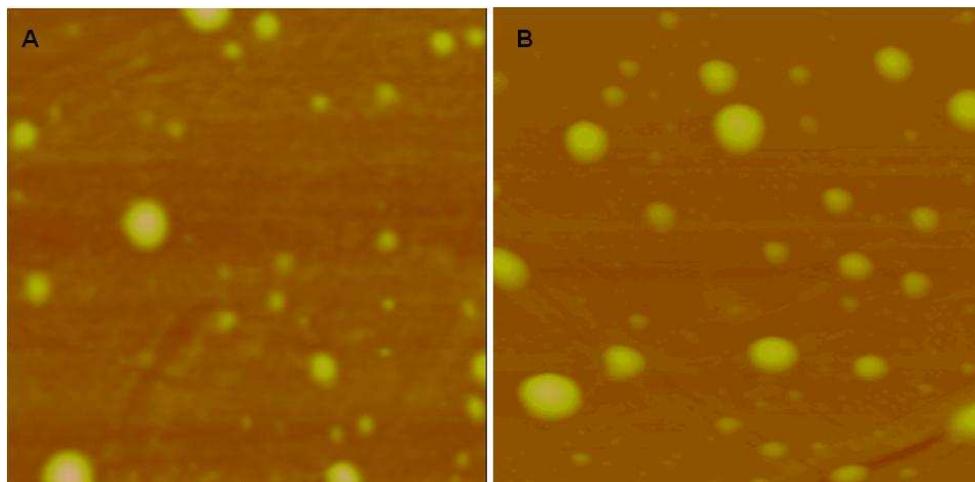
Já em relação às NC de PCL-QUIT brancas esta relação  $D/h$  foi igual a 11 de acordo com Leite e colaboradores (2005) e Assis e colaboradores (2008), e para a formulação com 2,5 e 5 mg/mL de CLOXB foi igual a 8 e 3 respectivamente, sendo esta última bem rígida, provavelmente devido à pela maior concentração de fármaco em sua parede.

O diâmetro médio determinado por MFA das NC-PCL brancas foi de  $326,7 \pm 144$  nm e o das NC contendo 0,5 de CLOXB foi de 375,3 nm maiores que os determinados por ECF que foram de 308,9 e 322,4 nm respectivamente (Figura 2.8). Já as NC-PCL-QUI tiveram seu diâmetro bem mais aumentado por MFA que por ECF, provavelmente devido à dificuldade de secagem das NC contendo QUI que possuem a superfície revestida por polímero altamente hidrofílico. A formulação branca e a com 2,5 mg/mL CLOXB tiveram variação no tamanho medido de mais de 250 e 150 nm. Já a formulação com 5 mg/mL alterou menos, em torno de 110 nm (Figura 2.9).



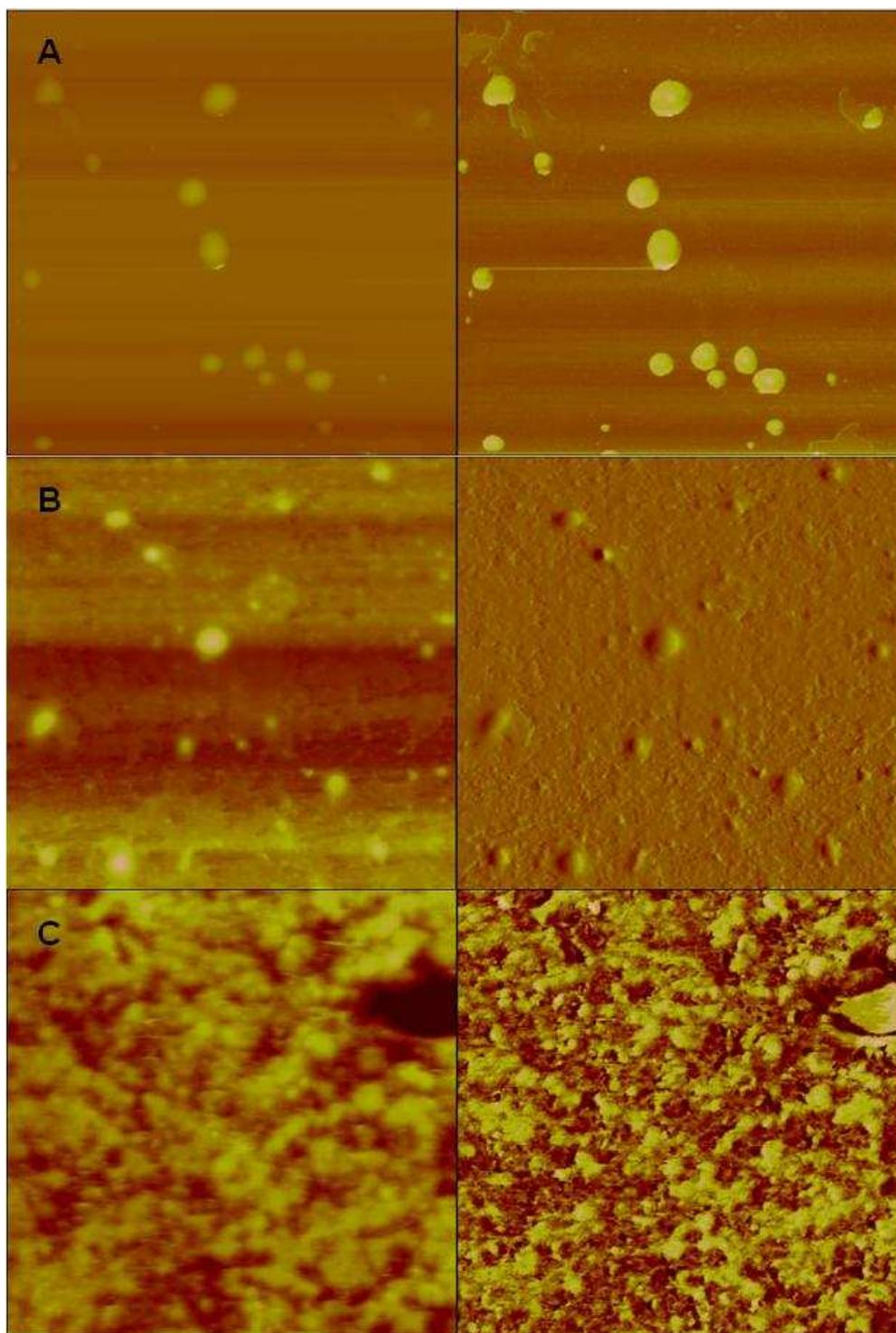
**Figura 2.9:** Imagem MFA no software “section analysis” mostrando altura (Vert distance) e tamanho (Horiz distance). (A) NC branca e (B) NC 2,5 mg/mL.

Os tamanhos aumentados por MFA só podem ser explicados pela deformação e achatamento das NC, o que demonstra claramente a natureza maleável e pouco rígida das NC em relação às NS estudadas no capítulo anterior.



**Figura 2.10:** Imagens de MFA em modo contínuo (tapping mode) de NC-PCL. Imagem de altura. (A) NC branca (B) NC0,5 mg/mL. Escala: 5x5  $\mu\text{m}$ .

Observam-se poucas variações nas imagens com a inclusão de CLOXB nas NC preparadas com PCL (Figura 2.10), provavelmente devido a uma incorporação do fármaco no interior da nanoestrutura, com mínimas alterações na interface, como já discutido em relação ao potencial zeta. Entretanto, na figura 2.11, a inclusão de CLOXB nas NC produz variações importantes na organização das NC vistas por MFA, que podem sugerir fortes interações entre o fármaco e a quitosana. A formação de estruturas bandadas pode sugerir a formação de colóides diferenciados das NC, como evidenciado na figura 2.11C. Estes aspectos serão posteriormente investigados em nossos trabalhos futuros.



**Figura 2.11.** Imagens de MFA em modo contínuo (tapping mode) de NC-PCL-QUIT. Imagem da esquerda mostra altura e a da direita imagem de fase (A e C) e amplitude (B). (A) NC-PCL-QUIT branca; (B) NC-PCL-QUIT 2,5 mg/mL; (C) NC-PCL-QUIT 5mg/mL. Escala: 10x10  $\mu\text{m}$ .

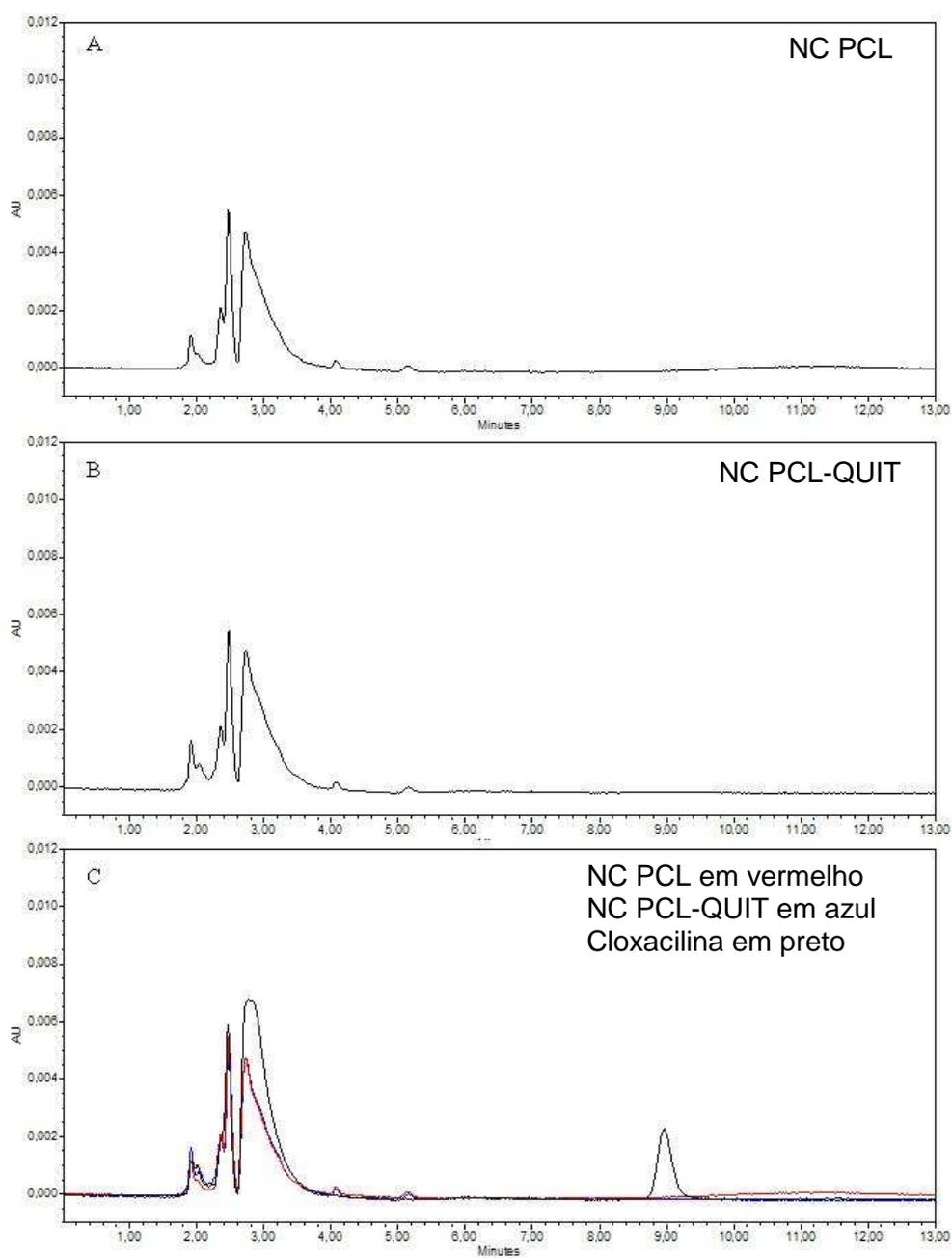
## **3.2.VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE DOSEAMENTO DA CLOXACILINA BENZATINA POR CLAE**

### **3.2.1.Condições cromatográficas**

As condições cromatográficas utilizadas foram adequadas para a determinação da CLOX no sobrenadante (proveniente da separação do fármaco livre das nanopartículas) e no meio de dissolução utilizado no ensaio de liberação *in vitro*.

### **3.2.2.Especificidade e seletividade**

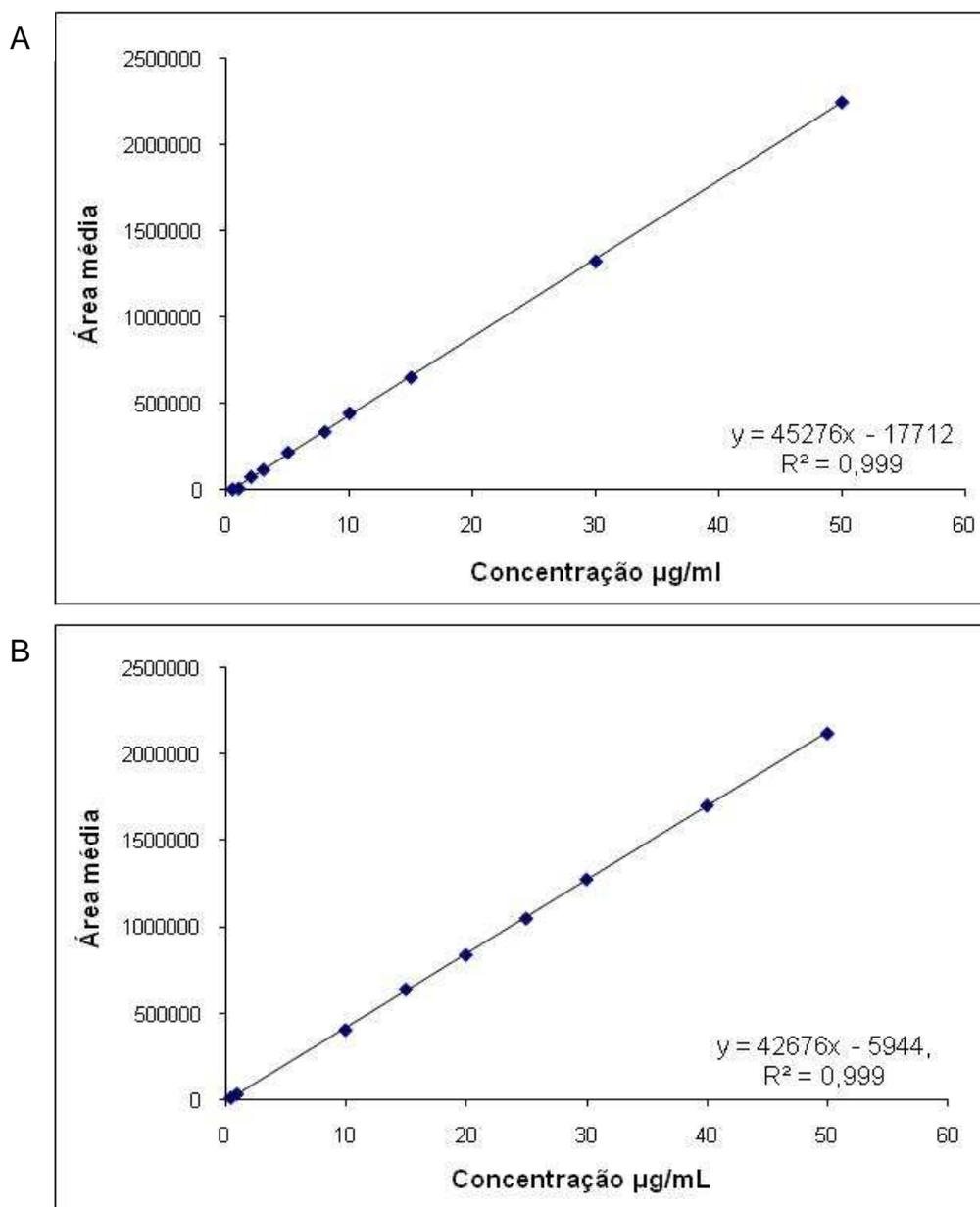
Neste trabalho, procurou-se avaliar se os componentes da formulação das nanocápsulas poderiam interferir no pico da CLOX. A interferência dos componentes do sistema nanoestruturado na leitura das absorvâncias da cloxacilina benzatina foi avaliada quando amostras de NC-PCL e NC-PCL-QUIT brancas foram utilizadas. De acordo com os cromatogramas apresentados na figura 2.12, pode-se observar que a fase móvel (acetonitrila: tampão fosfato pH=3 ajustado com ácido fosfórico (50:50) em 225nm) foi eficiente na separação dos componentes da formulação do pico da CLOXB, verificando-se ausência de interferentes da formulação no tempo de retenção da CLOXB (~9 min).



**Figura 2.12:** Espectro na região do UV apresentando o pico de absorção máxima da CLOXB em 225 nm.

### 3.2.3. Linearidade

As curvas padrão da cloxacilina benzatina em tampão fosfato pH=3:acetonitrila (50:50) (figura 2.13A) e em acetonitrila (figura 13B), ambas construídas a partir das médias das absorbâncias das concentrações 0,5; 1,0; 10; 15; 20; 25; 50 µg/mL, a equação da reta e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) estão representados na figura 2.13



**Figura 2.13:** Curva de calibração da CLOX. (A) em acetonitrila para ensaios de dissolução; (B) em 50:50 acetonitrila:tampão pH~3,4 para ensaios de eficiência de encapsulação. Comprimento de onda de 225 nm;  $R^2$  = coeficiente de correlação.

O valor de  $r^2$  encontrado significa que 99,9% dos dados são explicados pela curva. As curvas de calibração apresentaram valores de coeficiente de correlação  $r = 0,999$ , demonstrando a existência de correlação linear entre as concentrações e as absorbâncias, na faixa de 0,5 a 50  $\mu\text{g/mL}$ . De acordo com o Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da ANVISA (2003), os resultados mostram que houve linearidade, pois o valor do  $r$  foi próximo de 1. A equação da reta obtida para o ensaio de dissolução foi  $y = 42676x - 5944$  e para o ensaio de eficiência de encapsulação foi  $y = 45276x - 17712$ . Os valores da absorbância média a 225 nm das diferentes concentrações de cloxacilina benzatina em tampão fosfato pH=3:acetonitrila (50:50), estão representados na tabela 2.6 e os valores em acetonitrila estão representados na tabela 2.7.

**Tabela 2.6:** Valores de absorbância média da CLOXB em função de sua concentração em acetonitrila:tampão fosfato pH=3 (50:50).

<b>Cloxacilina benzatina (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Área média (a 225 nm)<sup>a</sup> <math>\pm</math> DP<sup>1</sup></b>	<b>CV<sup>2</sup> (%)</b>
<b>0,5</b>	17071 $\pm$ 570,27	3,341
<b>1</b>	39118 $\pm$ 1270,69	3,248
<b>10</b>	409688 $\pm$ 1281,26	0,313
<b>15</b>	644424 $\pm$ 394,25	0,061
<b>20</b>	843584 $\pm$ 1756,30	0,208
<b>25</b>	1053897 $\pm$ 2905,14	0,276
<b>30</b>	1280427 $\pm$ 1072,09	0,084
<b>40</b>	1707329 $\pm$ 3944,94	0,231
<b>50</b>	2123466 $\pm$ 466,55	0,022

<sup>a</sup> n = 3; <sup>1</sup>DP = desvio padrão; <sup>2</sup>CV = coeficiente de variação, dado por  $:(\text{DP}/\text{absorbância média}) \times 100$ .

**Tabela 2.7:** Valores de absorvância média da CLOXB em função de sua concentração em acetonitrila.

<b>Cloxacilina benzatina (µg/mL)</b>	<b>Área média (a 225 nm)<sup>a</sup> ± DP<sup>1</sup></b>	<b>CV<sup>2</sup> (%)</b>
<b>0,5</b>	6978± 1378,86	19,76
<b>1</b>	11323,5± 161,93	1,43
<b>2</b>	78585± 915,00	1,16
<b>3</b>	119796± 3671,30	3,06
<b>5</b>	219494± 7758,38	3,53
<b>8</b>	339509,5± 13565,84	4,00
<b>10</b>	447764± 18695,20	4,30
<b>15</b>	655184± 44824,91	6,84
<b>30</b>	1183815,5± 22888,3394	1,93

<sup>a</sup> n = 3; <sup>1</sup>DP = desvio padrão; <sup>2</sup>CV = coeficiente de variação, dado por  $:(DP/absorvância\ média) \times 100$ .

### 3.2.4.Exatidão

Analisaram-se em triplicata três diferentes amostras e os resultados estão expressos na tabela 2.8.

**Tabela 2.8:** Exatidão do método de determinação da CLOXB

<b>Concentração nominal (µg/mL)</b>	<b>Média da concentração determinada<sup>a</sup> ± DP<sup>1</sup></b>	<b>Exatidão (%)</b>
<b>10</b>	9,86 ± 0,2570	98,57
<b>20</b>	20,14 ± 0,2463	100,70
<b>30</b>	30,52 ± 0,0874	101,73
<b>10</b>	9,95 ± 0,1000	99,53
<b>20</b>	20,35 ± 0,2893	101,75
<b>30</b>	30,73 ± 0,4356	102,43

<sup>a</sup> n = 3; <sup>1</sup>DP = desvio padrão.

Os resultados mostraram que os valores obtidos para exatidão variaram de um valor mínimo de 98,57% para a concentração 0,5 mg/mL, até um valor máximo de 102,43%, para a concentração 2,5 mg/mL. Esses dados mostram que os valores encontrados nos experimentos diferiram no máximo em 3,43% dos valores teóricos, indicando uma boa exatidão para o doseamento da cloxacilina benzatina por CLAE.

### 3.3. Eficiência de encapsulação

A determinação da quantidade de fármaco associada às nanopartículas é especialmente complexa devido ao tamanho reduzido destas, que dificulta a separação da fração de fármaco livre da fração incorporada.

**Tabela 2.9:** Eficiência e rendimento de encapsulação das NC contendo diferentes concentrações cloxacilina benzatina.

Nanopartícula	EE(%)	Rendimento
NC PCL cloxacilina benzatina 0,5 mg/mL	34%	67%
NC PCL cloxacilina benzatina 2,5 mg/mL	instável	ND
NC PCL-QUIT cloxacilina benzatina 2,5 mg/mL	87%	67%
NC PCL-QUIT cloxacilina benzatina 5,0 mg/mL	instável	ND

ND – não determinado

EE- Eficiência de encapsulação

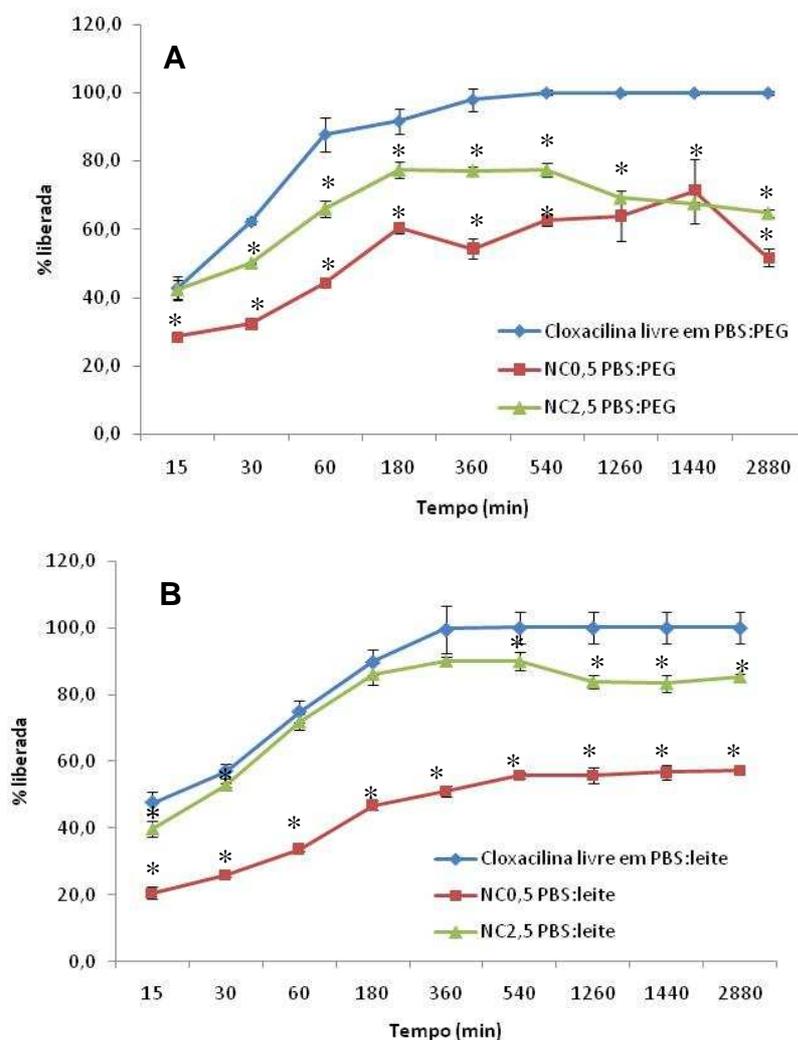
O valor baixo da EE para NC PCL 0,5 mg pode ser devido à competição entre a CLOXB e a lecitina na superfície das NC, pois devido à presença de cargas tanto na fosfatidilcolina (lecitina) quanto na CLOXB, pode haver competição entre as duas pelos sítios de adsorção na interface da partícula polimérica. No caso das NC PCL-QUIT, há a presença de quitosana na superfície das NC, um polímero carregado positivamente que pode interagir com o ânion cloxacilina e aumentar a adsorção desta na superfície dessas NC.

### 3.4. Cinética de liberação *in vitro*

O método utilizado para avaliar o perfil de liberação *in vitro* da CLOX livre e encapsulada baseado na diálise direta foi eficiente na comparação da cinética de liberação comparativa entre as duas formulações de NC e entre a CLOXB livre e encapsulada. Os resultados estão representados na figura 2.14

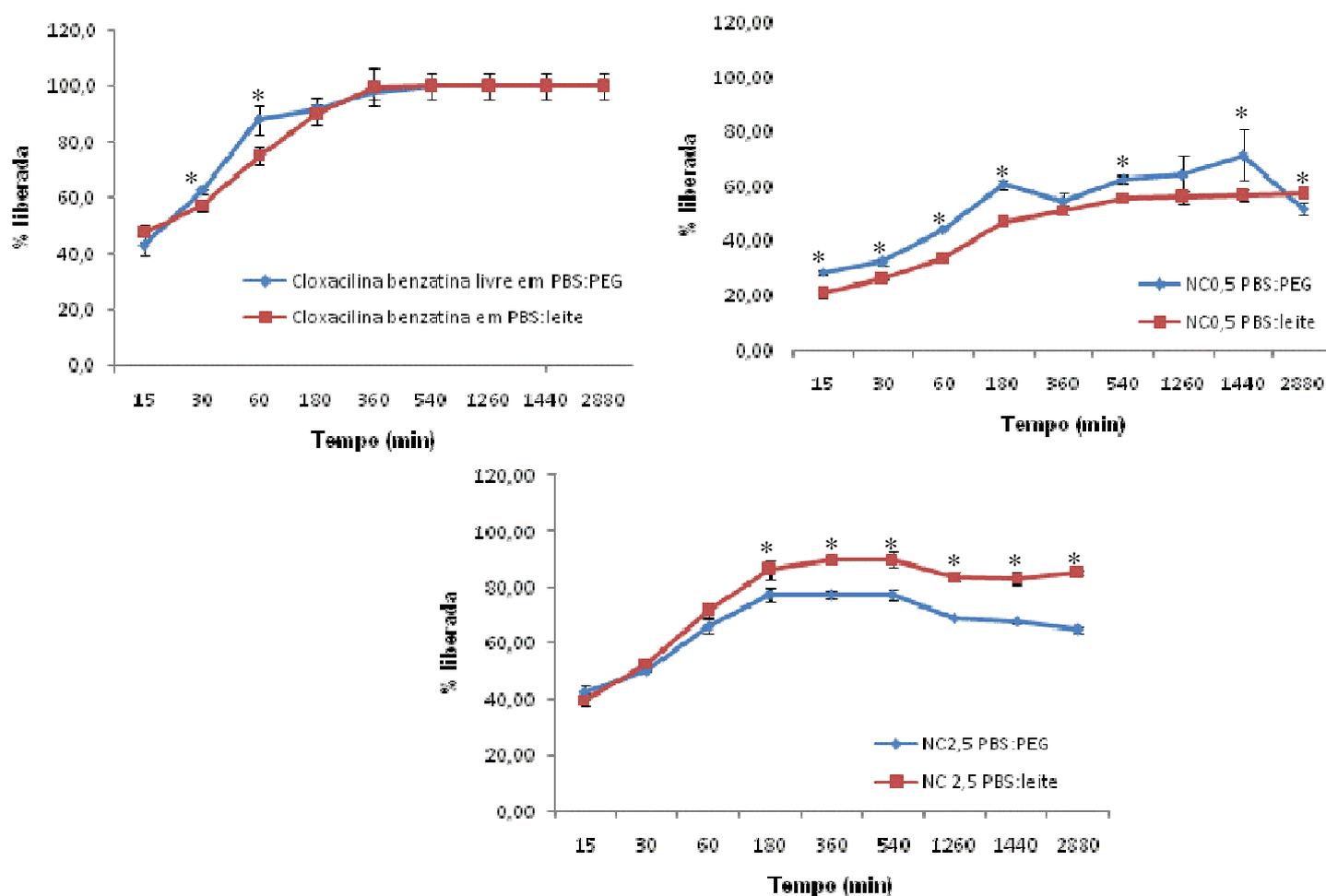
**Tabela 2.10:** Solubilidade da CLOX em diferentes meios.

Meio	Solubilidade (mg/mL)
Água	0,33
Tampão pH=7,4 + 1% leite	0,43
Tampão pH=7,4 + 1% PEG	0,42



**Figura 2.14:** Perfil de liberação *in vitro* de NC (PCL 0,5mg e NC PCL-QUI 2,5mg) a 37°C em salina tamponada em condições sink (10% da solubilidade máxima no meio) em meio contendo 1% de PEG (A) e 1% leite (B).

Os perfis de liberação da CLOXB em meio contendo PEG, um meio acceptor artificial, onde o fármaco possui maior solubilidade em relação ao PBS, mostram claramente que a CLOXB livre possui um perfil de dissolução rápido e que atravessa membranas em uma velocidade alta, terminando sua dissolução no PBS com 6h de incubação. As NC de CLOXB liberam o fármaco mais lentamente e não atingem uma liberação total do fármaco durante o período de estudo experimental. Esses dados mostram a eficiência dos dois tipos de NC na retenção do CLOXB em dois diferentes meios de liberação em relação a CLOXB livre. Paralelamente, e pensando na aplicação biológica, a administração de NC possui maior chance de manter níveis de CLOXB no interior das glândulas mamárias em relação à administração de CLOXB livre. A redução da liberação é bastante significativa em todos os pontos e tempos experimentais em relação a CLOXB livre, exceto para NC PCL QUIT 2,5 mg/ml entre os tempos 1 e 6 hs em meio contendo leite e significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) entre todas as formas de NC estudadas. Considerando-se que a solubilidade nos dois meios foi praticamente idêntica, efeito esse verificado pela velocidade de dissolução da CLOXB livre nos dois meios (Figura 2.15), observou-se que as NC de PLC 0,5 foram efetivas ( $p < 0,05$ ) na retenção da CLOXB mesmo em meio protéico contendo leite, meio este similar ao encontrado no local da administração. As proteínas são acceptoras de fármacos potentes e sua presença em meios de liberação pode acelerar a liberação de fármacos a partir das nanoestruturas (Mosqueira *et al.*, 2007). Com NC de PCL no meio contendo leite, a retenção da CLOXB é maior que 50%, mesmo após 48h de incubação, aspecto esse que evidencia a aplicabilidade desta formulação.



**Figura 2.15:** Perfil de liberação da CLOXB *in vitro* a 37°C em meio PBS contendo 1% de PEG (azul) e 1% leite (vermelho) a partir de cloxacilina livre e das formulações de NC de PCL 0,5mg e NC PLC-QUIT 2,5mg em condições sink (10% da solubilidade máxima no meio).

Observa-se um perfil de liberação mais lento com as NC de 0,5 de CLOXB, uma vez que provavelmente a quantidade de fármaco adsorvida na superfície e pronta para desorção é menor que nas NC de 2,5 de CLOXB. Essas últimas apresentam um perfil com *plateau*, provavelmente devido ao maior teor de fármaco adsorvido na superfície das NC contendo quitosana. Nas duas formulações de NC a liberação apresenta um perfil quase linear, o que indica liberação controlada, nas primeiras 6h, seguido do aparecimento de um *plateau*, com retenção do restante da CLOXB, provavelmente relativo à quantidade localizada no interior do núcleo oleoso das NC. Irwin e colaboradores (1984) observaram que a CLOXB possui sua dissolução dependente do valor de pH.

Seu grupo realizou um estudo de dissolução da CLOXB em meios com diferentes valores de pH: 2, 6 e 9, onde foi observado que em pH 2 e 9 a cloxacilina se degrada e em pH 6 a sua dissolução é dependente da solubilidade até 300 minutos de ensaio. Neste trabalho, a dissolução foi realizada em pH 7,4 pois encontra-se na faixa de pH do leite de animais com mastite que varia de 6,8 a 7,4 (Gruet *et al.*, 2001). Não se observou degradação do fármaco até 540 minutos de ensaio por CLAE nessas condições experimentais.

Já em relação à liberação do fármaco das nanocápsulas nos diferentes meios, observa-se que seus perfis são diferentes. As NC-PCL-QUIT 2,5mg contendo CLOXB apresentaram uma liberação mais rápida, mais de 70% em 6hs em meio contendo 1% de leite do que no meio contendo 1% de PEG. Ao contrário, as NC-PCL com CLOXB apresentaram liberação mais rápida em meio contendo 1% de PEG do que em meio contendo 1% de leite. Entre os três gráficos nota-se semelhança no perfil de liberação da CLOXB livre e da encapsulada em NC-PCL e NC-PCL-QUIT na presença de 1% de leite. A liberação foi maior em meio contendo 1% de PEG, diferentemente da NC-PCL-QUIT que possuiu maior liberação em leite (Figura 2.15).

## Conclusões capítulo 2

- Foi possível preparar suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo cloxacilina benzatina através do método de nanoprecipitação.
- NC de quitosana foram preparadas para encapsulamento da CLOXB a partir de uma quitosana preparada de forma modificada neste trabalho.
- A utilização do polímero poli- $\epsilon$ -caprolactona com revestimento de quitosana conduziu a obtenção de nanocápsulas com % de associação de CLOXB mais elevadas em relação às NC somente de poli- $\epsilon$ -caprolactona: 87% e 37% respectivamente.
- Os estudos de potencial zeta e de liberação evidenciaram a associação da CLOXB à superfície das NC.
- Foi desenvolvida e validada uma nova metodologia de doseamento da cloxacilina benzatina baseada na cromatografia líquida de alta eficiência, que permitiu que as nanopartículas de CLOXB fossem caracterizadas com relação à eficiência de encapsulação e sua cinética de liberação em presença de nanocápsulas e de diferentes meios tamponados, inclusive em presença de leite.
- A MFA foi uma técnica precisa para determinar a variabilidade na relação diâmetro/altura devido às deformações das nanocápsulas sob pressão, determinando também a influência das quantidades de CLOXB na formulação.
- A velocidade de liberação da CLOXB a partir das NC-PCL-QUIT em salina tamponada apresentou-se mais lenta na presença de 1% de PEG em relação à NC-PCL e CLOXB livre que obtiveram uma liberação mais rápida.

- A associação da CLOXB às NC-PCL foi inferior a NC-PCL-QUIT, provavelmente pela presença de interações CLOXB e quitosana, ainda não amplamente investigadas neste trabalho.

## Referências bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. Resolução nº899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

AGNIHOTRI, S. M. AND VAVIA, P. R. Diclofenac-loaded biopolymeric nanosuspensions for ophthalmic application. Nanomedicine, v.5, n.1, p.90-5. 2009.

ALLISON, S.D., T. W. R., MANNING, M.C., MIDDLETON, K., A., DAVIS, J. F. C. Effects of drying methods and additives on structure and function of actin: mechanisms of dehydration-induced damage and its inhibition. Arch. Biochem. Biophys, v.358, p.171-181. 1998.

AUVILLAIN, M., CAVE, G., FESSI, H., DEVISSAGUET, P. J. Lyophilisation de vecteurs colloïdaux submicroniques. S.T.P. Pharma v.5, p.738-744. 1989.

AVGOUSTAKIS, K., BELETSI, A., PANAGI, Z., KLEPETSANIS, P., LIVANIOU, E., EVANGELATOS, G., ITHAKISSIOS, D. S. Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA-mPEG nanoparticles. Int J Pharm, v.259, n.1-2, p.115-27. 2003.

BARRATT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. Pharm Sci Technolo Today, v.3, n.5, p.163-171. 2000.

BARROS, C.M. Desenvolvimento e avaliação biológica de formulações de nanocápsulas para tratamento da doença de chagas em modelo murino. 2007.101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

BODMEIER, R., CHEN, H., DAVIDSON, R. G., HARDEE, G. E. Microencapsulation of antimicrobial ceftiofur drugs. Pharm Dev Technol, v.2, n.4, p.323-34. 1997.

BOSS, A. E., FILHO, M.R., DE TOLEDO, V.C.E. Freeze drying process: real time model and optimization. Chemical Engineering and Processing, v.43, p.1475-1485. 2004.

BOUREL, D., ROLLAND, A., LE VERGE, R., GENETET, B. A new immunoreagent for cell labeling. CD3 monoclonal antibody covalently coupled to fluorescent polymethacrylic nanoparticles. Journal of Immunological Methods, v.106, n.2, p.161-167. 1988.

BOZDAG, S., DILLEN, K., VANDERVOORT, J., LUDWIG, A. The effect of freeze-drying with different cryoprotectants and gamma-irradiation sterilization on the characteristics of ciprofloxacin HCl-loaded poly(D,L-lactide-glycolide) nanoparticles. J Pharm Pharmacol, v.57, n.6, p.699-707. 2005.

CALVO, P., REMUNAN-LOPEZ, C., VILA-JATO, J. L., ALONSO, M. J. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. Pharm Res, v.14, n.10, p.1431-6. 1997.

CALVO, P., REMUÑÁN-LÓPEZ, G., VILA-JATO, J.L., ALONSO, M.J. Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. Colloid Polym Sci, v.53, p.46-53. 1997.

CALVO, P., SANCHEZ, A., MARTINEZ, J., LOPEZ, M. I., CALONGE, M., PASTOR, J. C., ALONSO, M. J. Polyester nanocapsules as new topical ocular delivery systems for cyclosporin A. Pharm Res, v.13, n.2, p.311-5. 1996.

CALVO, P., VILA-JATO, J. L., ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. J Pharm Sci, v.85, n.5, p.530-6. 1996.

CHACON, M., MOLPECERES, J., BERGES, L., GUZMAN, M., ABERTURAS, M. R. Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers. Eur J Pharm Sci, v.8, n.2, p.99-107. 1999.

COFFIN, M. D., J. W. MCGINITY. Biodegradable pseudolatexes: the chemical stability of poly(D,L-lactide) and poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles in aqueous media. Pharm Res, v.9, n.2, p.200-5. 1992.

CRAIG, S. A. S., HOLDEN J.F., TROUP J.P., AUERBACH M.H., FRIER H.I. Polydextrose as soluble fibre: Physiological and analytical aspects. Cereal Foods World, v.43, p.370-376. 1998.

CRAVEN, N., ANDERSON, J.C. Phagocytosis of Staphylococcus aureus by bovine mammary gland macrophages and intracellular protection from antibiotic action in vitro and in vivo. J Dairy Res, v.51, p.513-523. 1984.

CROWE, L. M., REID, D. S., CROWE, J. H. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? Biophys J, v.71, n.4, p.2087-93. 1996.

CROWE, J.H., CROWE, L.M., CARPENTER, J.F. Preserving dry biomaterials: the water replacement hypothesis. Biopharm, n.6, p.28-37. 1993.

DAVIS, J. T., RIDEAL, E.K. Interfacial Phenomena. Academic Press, p. New York. 1963.

DE ASSIS, D. N., MOSQUEIRA, V. C., VILELA, J. M., ANDRADE, M. S., CARDOSO, V. N. Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of <sup>99m</sup>Techne- tium-fluconazole nanocapsules. Int J Pharm, v.349, n.1-2, p.152-60. 2008.

DE CAMPOS, A. M., SANCHEZ, A., GREF, R., CALVO, P., ALONSO, M. J. The effect of a PEG versus a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa. Eur J Pharm Sci, v.20, n.1, p.73-81. 2003.

DE CHASTEIGNER, S., CAVÉ, G., FESSI, H., DEVISSAGUET, J.-P., PUISIEUX, F. Freeze-drying of itraconazole-loaded nanosphere suspensions: A feasibility study. Drug Dev. Res v.38 n.2, p.116-124. 1996.

DE JAEGHERE, F., ALLEMANN, E., LEROUX, J. C., STEVELS, W., FEIJEN, J., DOELKER, E., GURNY, R. Formulation and lyoprotection of poly(lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles: influence on physical stability and in vitro cell uptake. Pharm Res, v.16, n.6, p.859-66. 1999.

DEL POZO-RODRÍGUEZ, A., SOLINÍS, M.A., GASCÓN, A.R., PEDRAZ, J.L. Short and long-term stability study of lyophilized solid lipid nanoparticles. Eur.J.Pharm. Biopharm, v. 71, n. 2, p.181-189. 2008.

DULIEU, C., BAZILE, D. Influence of lipid nanocapsules composition on their aptness to freeze-drying. Pharm Res, v.22, n.2, p.285-92. 2005.

ELIAS, W., PRICE, A.H., MERRION, H.J. N,N'-Dibenzylethylenediamine penicillin: a new repository form of penicillin. Antibiot. Chemother, v.1, p.491-498. 1951.

ESPUELAS, S. M., LEGRAND, P., IRACHE, M.J., GAMAZO, C., ORECCHIONI, M.A., DEVISSAGUET, J., YGARTUA, P. Poly( $\epsilon$ -caprolacton) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity International Journal of Pharmaceutics, v.158, p.19-27. 1997.

FAURE, S. Les pénicilines. Actualités pharmaceutiques, v.476, p.43-46. 2008.

FERNANDEZ-HURRUSUNO, R., CALVO, P., REMUNAN-LOPEZ, C., VILA-JATO, J.L., ALONSO, M.J. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. Pharm Res, v.16, p.1576-1581. 1999.

FESSI, H., PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J.P., AMMOURY, N., BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. Int. J. Pharm, v.55, n.1, p.R1-R4. 1989.

FLOOD, M. T., AUERBACH, M. H., CRAIG, S. A. A review of the clinical toleration studies of polydextrose in food. Food Chem Toxicol, v.42, n.9, p.1531-42. 2004.

FLORENCE A. T., ATTWOOD, D. Emulsões, Suspensões e Dispersões. In: Princípios Físico-Químicos em Farmácia. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, v.3 ed, cap. 7, p.345-411. 2003.

FRANDSON, R.D., WILKE, W., FAILS, A.D. Anatomia e fisiologia das glândulas mamárias. In:\_\_\_\_. Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.399-410.

FRANKS, F. Freeze-drying: from empiricism to predictability. The significance of glass transitions. Dev Biol Stand, v.74, p.9-18; discussion 19. 1992.

GARCIA-FUENTES, M., TORRES, D., ALONSO, M. J. New surface-modified lipid nanoparticles as delivery vehicles for salmon calcitonin. Int J Pharm, v.296, n.1-2 , p.122-32. 2005.

GARG, A., KOKKOLI, E. Characterizing particulate drug-delivery carriers with atomic force microscopy. IEEE Eng Med Biol Mag, v.24, n.1, p.87-95. 2005.

GAUMET, M., VARGAS, A., GURNY, R., DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. Eur J Pharm Biopharm, v.69, n.1, p.1-9. 2008.

GEHRING, R., SMITH, G. W. An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis. J Vet Pharmacol Ther, v.29, n.4, p.237-41. 2006.

GRAF, R., MINAMITAKE, Y., PERACCHIA, M. T., TRUBETSKOY, V., TORCHILIN, V., LANGER, R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. Science, v.263, n.5153, p.1600-3. 1994.

GRUET, P., MAINCENT, P., BERTHELOT, X., KALTSATOS, V. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. Adv Drug Deliv Rev, v.50, n.3, p.245-59. 2001.

HATLEY, R. H. M., FRANKS, F. Applications of DSC in the development of improved freeze-drying processes for labile biologicals. J. Thermal Anal, v.37, p.1905-1914. 1991.

HE, P., DAVIS, S.S., ILLUM, L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. Int J Pharm, v.166, p.75-88. 1998.

HIRANO, S. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. Polym Int, v.48, p.732-734. 1999.

HIRSJARVI, S., PELTONEN, L., HIRVONEN, J. Effect of sugars, surfactant, and tangential flow filtration on the freeze-drying of poly(lactic acid) nanoparticles. AAPS PharmSciTech, v.10, n.2, p.488-94. 2009.

ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. Pharm Res, v.15, n.9, p.1326-31. 1998.

IRWIN, W. J., HEMPENSTALL, J.M., PO, A.L.W., ANDREWS, A.H. Controlled-release penicillin complexes: dissolution and stability of benzathine cloxacillin. International Journal of Pharmaceutics, v.20, p.25-41. 1984.

JOSHI, M. R., MISRA, A. Liposomal budesonide for dry powder inhaler: preparation and stabilization. AAPS PharmSciTech, v.2, n.4, p.25. 2001.

JUNG, T., KAMM, W., BREITENBACH, A., KAISERLING, E., XIAO, J. X., KISSEL, T. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? Eur J Pharm Biopharm, v.50, n.1, p.147-60. 2000.

KAMIŃSKI, W., MODRZEJEWSKA, Z. Application of Chitosan Membranes in Separation of Heavy Metal Ions, Separation. Science and Technology, v.32, n.16, p.2659-2668. 1997.

KIM, D. G., JEONG, Y. I., CHOI, C., ROH, S. H., KANG, S. K., JANG, M. K., NAH, J. W. Retinol-encapsulated low molecular water-soluble chitosan nanoparticles. Int J Pharm, v.319, n.1-2, p.130-8. 2006.

KONAN, Y. N., GURNY, R., ALLÉMANN, E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. Int. J. Pharm, v.233, n.1-2, p.239-252. 2002.

KREUTER, J. Application of nanoparticles for the delivery of drugs to the brain International Congress Series, v.1277, p.85-94. 2005.

LEGRAND, P., BARRATT, G., MOSQUEIRA, V. C. F., FESSI, H., DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review. S.T.P. Pharma Sci, v.9, p.411-418. 1999.

LEHR, C. M., BOWSTRA, J.A., SCHACHT, E.H., JUNGINGER, H.E. In vitro evaluation of mucohesive properties of chitosan and some other natural polymers. Int.J.Pharm, v.78, p.43-48. 1992.

LEITE, E. A., VILELA, J. M. C., MOSQUEIRA, V. C. F., ANDRADE, M. S. Polycaprolactone nanocapsules morphological features by atomic force microscopy. Microsc. Microanalysis, v.11, p.48-51. 2005.

LU, B., XIONG, S. B., YANG, H., YIN, X. D., ZHAO, R. B. Mitoxantrone-loaded BSA nanospheres and chitosan nanospheres for local injection against breast cancer and its lymph node metastases. I: Formulation and in vitro characterization. Int J Pharm, v.307, n.2, p.168-74. 2006.

MACHERAS, P. E., KOUPPARIS, M.A., ANTIMISIARIS, S.G. Drug binding and solubility in milk. Pharmaceutical Research, v.7, n.5, p.537-541. 1990.

MAO, H. Q., ROY, K., TROUNG-LE, V. L., JANES, K. A., LIN, K. Y., WANG, Y., AGUST, J. T., LEONG, K. W. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. J Control Release, v.70, n.3, p.399-421. 2001.

MCKELLAR, Q. A., SANCHEZ BRUNI, S. F., JONES, D.G. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. J Vet Pharmacol Ther, v.27, n.6, p.503-14. 2004.

MONTASSER, I., FESSI, H., COLEMAN., A. W. Atomic force microscopy imaging of novel type of polymeric colloidal nanostructures. Eur J Pharm Biopharm, v.54, n.3, p.281-4. 2002.

MOSQUEIRA, V. C., LEGRAND, P., MORGAT, J. L., VERT, M., MYSIKINE, E., GREF, R., DEVISSAGUET, J. P., BARRATT, G. Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: effects of PEG chain length and density. Pharm Res, v.18, n.10, p.1411-9. 2001.

MOSQUEIRA, V. C., LEGRAND, P., PINTO-ALPHANDARY, H., PUISIEUX, F., BARRATT, G. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. J Pharm Sci, v.89, n.5, p.614-26. 2000.

MOSQUEIRA, V.C.F., LEGRAND, P., BARRAT, G. J.Nanosci.Nanotechnol. v.6.doi:10.1166/jnn.2006.444. 2006.

NO, H. K., PARK, N. Y., LEE, S. H., MEYERS, S. P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. Int J Food Microbiol, v.74, n.1-2, p.65-72. 2002.

OLIVEIRA, L.T. Desenvolvimento de formulações de nanocápsulas com características superficiais modificadas e avaliação da interação com sistema fagocitário após administração intravenosa. 2009. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

PACKHAEUSER, C. B., LAHNSTEIN, K., SITTERBERG, J., SCHMEHL, T., GESSLER, T., BAKOWSKY, U., SEEGER, W., KISSEL, T. Stabilization of aerosolizable nano-carriers by freeze-drying. Pharm Res, v.26, n.1, p.129-38. 2009.

PARK, I. Y., KIM, E. J., PARK, H., FIELDS, K., DUNKER, A. K., KANG, C. Interaction between cardiac calsequestrin and drugs with known cardiotoxicity. Mol Pharmacol, v.67, n.1, p.97-104. 2005.

PEREIRA, M. A., MOSQUEIRA, V. C. M., VILELA, J. M. C., ANDRADE, M. S., RAMALDES, G. A., CARDOSO, V. N. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with

99mTechnetium-HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy. Eur. J. Pharm. Sciences, v.33, p.42-51. 2008.

PEREZ, B., PRATS, C., CASTELLS, E., ARBOIX, M. Determination of cloxacillin in milk and blood of dairy cows by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, v.698, n.1-2, p.155-60. 1997.

PINTO-ALPHANDARY, H., ANDREMONT, A., COUVREUR, P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. Int J Antimicrob Agents, v.13, n.3, p.155-68. 2000.

PITTLER, M. H., ABBOT, N. C., HARKNESS, E. F., ERNST, E. Randomized, double-blind trial of chitosan for body weight reduction. Eur J Clin Nutr, v.53, n.5, p.379-81. 1999.

POHLMANN, A. R., WEISS, V., MERTINS, O., SILVEIRA, P. N., GUTERRES, S.S. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres development, stability evaluation and nanostructure models. Eur J Pharm Biopharm, v.16, p.305-312. 2002.

PONCHEL, G., IRACHE, J.-M. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. Advanced Drug Delivery Reviews, v.34, n.2-3, p.191-219. 1998.

PREGO, C., FABRE, M., TORRES, D., ALONSO, M. J. Efficacy and mechanism of action of chitosan nanocapsules for oral peptide delivery. Pharm Res, v.23, n.3, p.549-56. 2006.

PREGO, C., GARCIA, M., TORRES, D., ALONSO, M. J. Transmucosal macromolecular drug delivery. J Control Release, v.101, n.1-3, p.151-62. 2005.

PREGO, C., TORRES, D., ALONSO, M. J. Chitosan nanocapsules as carriers for oral peptide delivery: effect of chitosan molecular weight and type of salt on the in vitro behaviour and in vivo effectiveness. J Nanosci Nanotechnol, v.6, n.9-10, p.2921-8. 2006.

QUINTANAR-GUERRERO, D., GANEM-QUINTANAR, A., ALLÉMANN, E., FESSI, H., DOELKER, E. Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion technique. J.Microencapsul, v.15, p.107-119. 1998.

REBHUN, W.C. Doenças das tetas e do úbere. In: REBHUN, W.C., GUARD, C., RICHARDS, C.M. Doenças do gado leiteiro. São Paulo: Roca, 2000. 642p.

REIS, C. P., NEUFELD, R. J., RIBEIRO, A. J., VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 2, v.2, p.8-21. 2006.

RUOZI, B., TOSI, G., FORNI, F., FRESTA, M., VANDELLI, M. A. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: two techniques for rapid characterization of liposomes. Eur J Pharm Sci, v.25, n.1, p.81-9. 2005.

SAEZ, A., GUZMAN, M., MOLPECERES, J., ABERTURAS, M. R. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. Eur J Pharm Biopharm, v.50, n.3, p.379-87. 2000.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S., PONTES, A., PEREIRA, V.M.W., CAETANO, M.N.P. Colloidal Carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. Int J Pharm, v.208, p.71-80. 2000.

SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S., FREITA, L. L., POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. Quím. Nova, v.26, p.726-737. 2003.

SCHAFFAZICK, S. R., POHLMANN, A. R., DALLA-COSTA, T., GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. Eur J Pharm Biopharm, v.56, n.3, p.501-5. 2003.

SCHAFFAZICK, S. R., POHLMANN, A.R., MEZZALIRA, G., GUTERRES, S.S. Development of nanocapsules suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. J Braz Chem Soc, v.17, n.3, p.562-569. 2006.

SCHIPPER, N. G., VARUM, K. M., STENBERG, P., OCKLIND, G., LENNERNAS, H., ARTURSSON, P. Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs. 3: Influence of mucus on absorption enhancement. Eur J Pharm Sci, v.8, n.4, p.335-43. 1999.

SHAM, -. H., O, J., ZHANG, Y., FINLAY, H. W., ROA, H. W., LOBENBERG, R. Formulation and characterization of spray-dried powders containing nanoparticles for aerosol delivery to the lung. Int J Pharm, v.269, p.457-467. 2004.

SHANMUGANATHAN, S., SHANUMUGASUNDARAM, N., ADHIRAJAN, N., LAKSHMI, T.S.R., BABU, M. Preparation and characterization of chitosan microspheres for doxycycline delivery. Carbohydrate Polymers, v.73, p.201-211. 2008.

SIGNINI, R., CAMPANA F, S, P. Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. Polímeros: Ciência e Tecnologia, v.11, n.2, p.58-64. 2001.

STRICKLEY, R. G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. Pharm Res, v.21, n.2, p.201-30. 2004.

SPÓSITO, P.A. Nanocápsulas e Nanoemulsões contendo antifúngicos: desenvolvimento farmacotécnico, caracterização e avaliação biológica em modelo de candidíase sistêmica. 2008. 176 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

SZABO, J. L., EDWARDS, C.D., BRUCE, W.F. N,N'-Dibenzylethylenediamine penicillin: preparation and properties. Antibiot. Chemother, v.1, p.499-503. 1951.

TA, H. T., DASS, C. R., DUNSTAN, D. E. Injectable chitosan hydrogels for localised cancer therapy. J Control Release, v.126, n.3, p.205-16. 2008.

TAKAHASHI, T., IMAI, M., SUZUKI, I. High-potential molecular properties of chitosan and reaction conditions for removing p-quinone from the aqueous phase. Biochemical Engineering Journal, v.25, p.7-13. 2005.

TROTTA, M., CAVALLI, R., CHIRIO, D. Griseofulvin nanosuspension from triacetin-in-water emulsions. S.T.P.Pharma Sci, v.13, p.423-426. 2003b.

VAN EERDENBRUGH, B., FROYEN, L., MARTENS, J. A., BLATON, N., AUGUSTIJNS, P., BREWSTER, M., VAN DEN MOOTER, G. Characterization of physico-chemical properties and pharmaceutical performance of sucrose co-freeze-dried solid nanoparticulate powders of the anti-HIV agent loviride prepared by media milling. Int J Pharm, v.338, n.1-2, p.198-206. 2007.

VAN EERDENBRUGH, B., VERCRUYSSSE, S., MARTENS, J. A., VERMANT, J., FROYEN, L., VAN HUMBEECK, J., VAN DEN MOOTER, G., AUGUSTIJNS, P. Microcrystalline cellulose, a useful alternative for sucrose as a matrix former during freeze-drying of drug nanosuspensions - a case study with itraconazole. Eur J Pharm Biopharm, v.70, n.2, p.590-6. 2008.

VAUTHIER, C., BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. Pharm. Res, v.26, n.5, p.1025-1058, 2009.

VILA, A., SANCHEZ, A., EVORA, C., SORIANO, I., VILA JATO, J. L., ALONSO, M. J. PEG-PLA nanoparticles as carriers for nasal vaccine delivery. J Aerosol Med, v.17, n.2, p.174-85. 2004.

VILA, A., SANCHEZ, A., TOBIO, M., CALVO, P., ALONSO, M. J. Design of biodegradable particles for protein delivery. J Control Release, v.78, n.1-3, p.15-24. 2002.

WANG, Y., LU, X., DALAI, S., ZHANG, J. Thermophysical properties of polycaprolactone/chitosan blend membranes. Thermochimia Acta, v.487, p.33-38. 2009.

WENDLANDT, W. W. Thermal analysis. Anal Chem, v.58, n.5, p.1R-6R. 1986.

WOLF, M., WIRTH, M., PITTNER, F., GABOR, F. Stabilisation and determination of the biological activity of L-asparaginase in poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres. Int J Pharm, v.256, n.1-2, p.141-52. 2003.

YOO, H. S., LEE, K. H., OH, J. E., PARK, T. G. In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. J Control Release, v.68, n.3, p.419-31. 2000.

ZILI, Z., S. SFAR, FESSI, H. Preparation and characterization of poly-epsilon-caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. Int J Pharm, v.294, n.1-2, p.261-7. 2005.

# ANEXOS

## **Anexo 1 – Produção científica associada a esta dissertação**

ARAÚJO, R. S. *et al.* Characterization of freeze-dried polymeric nanospheres by AFM. In: V Latin American Symposium on Scanning Probe Microscopy (LASPM), Vila Del Mar/Chile, 2009.

ARAÚJO, R. S.: MOSQUEIRA, V. C. F. Evaluation of freezing conditions to freeze-dry polymeric nanospheres. In: 7<sup>th</sup> Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas (CIFARP), Ribeirão Preto/SP, 2009.

### **Embrapa**

Premiação Nacional de Equipes (2007) pelo sistema de avaliação e premiação por resultados da Embrapa.

### **Artigo submetido**

Araújo, R. S. *et al.* Comparative study of a new and conventional cryoprotectors for freeze-drying of nanoparticles using two freezing conditions. (Submetido ao International Journal of Pharmaceutics).

### **Pedido de patente**

Metodologia de preparo e propriedades físico-químicas de nanocápsulas poliméricas contendo cloxacilina benzatina.



Sistema de Avaliação e Premiação por Resultados da Embrapa – 2008

Premiação Nacional de Equipes – ano base 2007

Categoria: Criatividade

## DIPLOMA DE RECONHECIMENTO

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
parabeniza

**Raquel Silva Araújo**

Universidade Federal de Ouro Preto

pela sua participação como *Colaboradora Externa* na equipe do Projeto Desenvolvimento de uma  
formulação nanoestruturada de cloxacilina com potencial de uso intramamário para o controle da  
mamite bovina na secagem.

Brasília, 16 de março de 2009.

Silvio Crestana

Tatiana Deane de Abreu Sá

José Geraldo Eugênio de França

Kepler Eudides Filho