

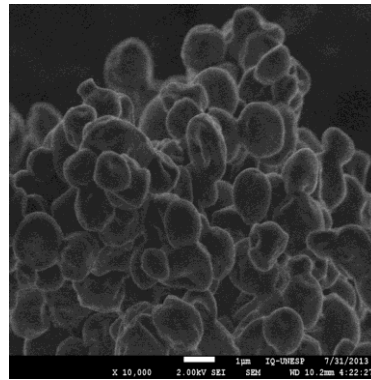


**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA**



Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS OBTIDAS POR *SPRAY DRYING* PARA LIBERAÇÃO INTRAOCULAR DE IBUPROFENO



CRISTIANE PATRICIA PISSINATO PERE

ARARAQUARA- SP

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**

**MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS OBTIDAS POR
SPRAY DRYING PARA LIBERAÇÃO INTRAOCULAR DE
IBUPROFENO**

CRISTIANE PATRICIA PISSINATO PERE

ARARAQUARA- SP

2014

CRISTIANE PATRICIA PISSINATO PERE

**MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS OBTIDAS POR
SPRAY DRYING PARA LIBERAÇÃO INTRAOCULAR DE
IBUPROFENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio e Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira.

ARARAQUARA- SP

2014

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

P434m *Pere, Cristiane Patricia Pissinato*
Micropartículas Lipídicas Sólidas obtidas por Spray Drying para liberação
intraocular de ibuprofeno / Cristiane Patrícia Pissinato Pere. – Araraquara, 2014.
77 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêuticas. Área Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Anselmo Gomes de Oliveira.

1. Doenças vítreoretinianas. 2. Spray dryer. 3. Micropartículas lipídicas sólidas.
4. Liberação controlada. 5. Ibuprofeno. I. Oliveira, Anselmo Gomes de, orient. II. Título.

CAPES: 40500005

CRISTIANE PATRICIA PISSINATO PERE

**“MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS OBTIDAS POR
SPRAY DRYING PARA LIBERAÇÃO INTRAOCULAR DE
IBUPROFENO”**

**A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de mestrado,
em sessão pública realizada em 17/02/2014, considerou a candidata
Cristiane Patricia Pissinato Pere**

() REPROVADA

(X) APROVADA

- 1) Examinadora (profa. Dra. Leila Aparecida Chiavacci)_____
- 2) Examinador (prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro)_____
- 3) Presidente (Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira)_____

DEDICATÓRIA

À minha querida mãe Maria Rosa Pissinato que sempre acreditou nos meus sonhos e me ensinou as coisas mais valiosas da vida: amor, respeito, honestidade e simplicidade.

Ao meu noivo Marcelo F. Mazzero que ao longo destes anos esteve ao meu lado me apoiando e dando forças para continuar em frente.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus pela oportunidade desta existência e por sempre estar presente em minha vida.

À minha querida mãe, Maria Rosa Pissinato, minha melhor amiga e companheira, com a qual dividi os melhores e os piores momentos de minha vida e que me ensinou que não importa quanto dinheiro você tenha ou em que posição social você esteja, nada disso faz sentido se você não é capaz de valorizar os pequenos milagres da vida.

Ao meu pai, que mesmo ausente e com seus problemas, me ensinou a ver a vida sob outro ângulo.

Ao meu querido noivo Marcelo F. Mazzero, meu melhor amigo e companheiro, pela paciência, carinho e amizade.

Aos meus irmãos Juliane e Fernando pelo apoio, carinho e amizade.

Ao professor Dr. Anselmo Gomes de Oliveira com quem aprendi muitas lições profissionais e pessoais. Pela paciência, amizade e ensinamentos a mim dedicados.

Ao professor Marco Vinícius Chaud, que me introduziu na pesquisa e me incentivou a entrar no mestrado.

Ao prof. Dr. Marco Vinícius Chaud e prof. Dr. Marcos Antônio Correa pelas contribuições no exame geral de Qualificação.

À profa. Dr. Leila Aparecida Chiavacci e ao prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro e pelas discussões e participação na banca de defesa desta dissertação.

Às minhas queridas amigas Vanessa Meyagusku, Kamila Negri, Lilian Barbassa, Karisa Belotto e Gisela Rolfsen, pelas discussões e amizade. Sem vocês tenho certeza de que teria sido mais difícil a minha jornada aqui.

Ao Gustavo Rossanezi, Ana Luíza, à Beatriz Curry, Fabíolla Prezotti e Fernanda Kolenyak pelas discussões e amizade.

Às amigas Andreia Bagliotti, Márcia Oyafuso, Aline Martins, Valéria Cardoso, Andressa Fugimura, Ana Luíza, Charlene Kill, Mariana Sato e João Oshiro pela amizade, ajuda e momentos divertidos.

Às meninas do laboratório de controle de qualidade Natália Ferri, Ana Cláudia Depaoli e Kamila Rotolo pelas discussões e amizade.

À todos amigos e colegas de laboratório que sempre estiveram presentes e que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Aos técnicos e funcionários do departamento de fármacos e medicamentos, especialmente à Natália Santos, Margareti, Fátima e Queila.

Ao Prof. Dr. Celso V. Santilli e ao Departamento de físico-química do Instituto de Química da UNESP-Araraquara pela utilização do DSC, TG e DR-X. Ao Celso Jesus e a técnica do laboratório Danúbia pela paciência e auxílio nas análises de DSC e TG; e ao técnico Ricardo, pelas análises de DR-X.

Ao prof. Dr. Paulo Roberto Bueno pela parceria e pelas análises de MEV e ao Laboratório de Microscopia Avançada do Instituto de Química da UNESP-Araraquara (LMA-IQ) pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura.

À todas as funcionárias da secretaria de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas que sempre foram muito atenciosas e prestativas.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Doenças vítreoretinianas são doenças graves do segmento posterior do olho caracterizadas por manifestações inflamatórias importantes e que se não tratadas adequadamente evoluem para perda irreversível da visão. Embora grandes avanços tenham ocorrido nas áreas médicas e tecnológicas, o tratamento de doenças que acometem o segmento posterior do olho continua sendo um desafio, em virtude das barreiras anatômicas e fisiológicas desse órgão que dificultam a entrada de substâncias exógenas. Uma alternativa é a administração local de fármacos veiculados em sistemas de liberação prolongada, capazes de prolongar o tempo de liberação do fármaco dentro da faixa terapêutica, reduzindo o número de administrações requeridas e proporcionando maior conforto e segurança ao paciente. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e a caracterização de Micropartículas Lipídicas Sólidas contendo ibuprofeno obtidas por spray dryer para potencial aplicação intraocular. MLS de fosfatidilcolina de soja hidrogenada modificadas por monoestearato de glicerila ou álcool estearílico, adicionadas de 15 ou 30% de ibuprofeno foram obtidas. De acordo com a microscopia eletrônica de varredura, as MLS apresentaram morfologias predominantemente esféricas e homogêneas. As análises de infravermelho, calorimetria exploratória diferencial e difração de raios X sugerem que o fármaco esteja disperso ou dissolvido na matriz da MLS. Tais resultados também mostraram que o método foi capaz de reduzir a cristalinidade do fármaco e dos demais componentes da micropartícula, favorecendo a eficiência de encapsulação e a subsequente difusão do fármaco no estudo de liberação. O estudo de liberação mostrou uma saída rápida de fármaco das MLS nos tempos iniciais, seguido por uma liberação mais lenta, podendo ser interessante tanto em tratamentos de pós-operatórios como em tratamentos de outras doenças vitreoretinianas.

Palavras-chave:doenças vitreoretinianas, ibuprofeno, micropartículas lipídicas sólidas, *spray dryer*, liberação controlada.

ABSTRACT

Vitreoretinal diseases are serious disease of the posterior segment of the eye. They are characterized by important inflammatory manifestations and if it is not treated properly they develop into irreversible blindness. Although major advances have occurred in the medical and technological fields, the treatment of diseases that affecting the posterior segment of the eye remains a challenge, because of the anatomical and physiological barrier's eyes that hinder the entrance of exogenous substances. An alternative is the local drug delivery in drug delivery systems, whom are able to prolong release of the drug within the therapeutic range systems, reducing the number of administrations and providing more confort and safety for patient. The aim of this work was the development and characterization ibuprofen loaded solid lipid microparticles obtained by spray drying method for a potential intraocular application. Hydrogenated soy phosphatidylcholine SLM modified by glyceryl monostearate or stearyl alcohol, added 15 to 30% of ibuprofen were obtained. According to scanning electron microscopy, the MLS showed mostly spherical and homogeneous morphologies. The infrared analysis, differential scanning calorimetry and x-ray diffraction suggest that the drug is solubilized in the MLS array. These results also showed that the method was able to reduce the crystallinity of the drug and other components of the microparticle, favoring the encapsulation efficiency and the subsequent diffusion of the drug release study. The release study showed a burst release followed by a sustained release, that may be useful not only in the treatment of postoperative cataract surgery and in the treatment of diseases vitreoretinianas itself.

Keywords: Vitreoretinal disease, ibuprofe, Solid lipid microparticles, spray dryer, drug delivery systems.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - - Modelos de incorporação de fármacos nos três tipos de MLS. Adaptado de MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000	16
Figura 2- Fotomicrografia de MLS com fosfatidilcolina de soja hidrogenada e monoestearato de glicerila (D2).....	35
Figura 3 - Fotomicrografias de MLS com fosfatidilcolina de soja hidrogenada e monoestearato de glicerila, adicionadas de 15% de ibuprofeno (D2-15).....	35
Figura 4 - Fotomicrografia de MLS com fosfatidilcolina de soja hidrogenada e monoestearato de glicerila, adicionadas de 30% de ibuprofeno (D2-30).	36
Figura 5 - Fotomicrografia de MLS com fosfatidilcolina de soja hidrogenada e álcool estearílico (E4).....	36
Figura 6 - Fotomicrografia de MLS com fosfatidilcolina de soja hidrogenada e álcool estearílico, adicionadas de 15% de ibuprofeno.....	37
Figura 7 - Bandas características do ibuprofeno no espectro de infravermelho.....	38
Figura 8 – Espectro de infravermelho do ibuprofeno por transformada de Fourier (FTIR). ...	38
Figura 9 - Espectro de infravermelho da fosfatidilcolina de soja hidrogenada por transformada de Fourier (FTIR).	39
Figura 10 - Espectro de infravermelho do monoestearato de glicerila por transformada de Fourier (FTIR).	39
Figura 11 - Espectro de infravermelho do álcool estearílico por transformada de Fourier (FTIR).....	40
Figura 12 - Espectros de infravermelho das misturas físicas nas mesmas proporções dos componentes das MLS D2-15 e D2-30 por transformada de Fourier (FTIR).	40
Figura 13 - Espectros de infravermelho das MLS D2, D2-15 e D2-30 por transformada de Fourier (FTIR).	41
Figura 14 - Espectro de infravermelho da mistura física nas mesmas proporções dos componentes das MLS E4-15 por transformada de Fourier (FTIR).....	42
Figura 15 - Espectros de infravermelho das MLS E4 e E4-15 por transformada de Fourier (FTIR).....	43
Figura 16 - – Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG do Ibuprofeno.....	44
Figura 17 - Curva DSC do Ibuprofeno atomizado.....	44
Figura 18 - Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG da fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FSH). ..	45
Figura 19 - Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG do monoestearato de glicerila (MEG).....	46
Figura 20 - Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG do álcool estearílico (AE).	46
Figura 21 – Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG das misturas físicas nas mesmas proporções dos componentes das MLS D2-15.....	47
Figura 22 - Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG das misturas físicas nas mesmas proporções dos componentes das MLS D2-30.....	47
Figura 23 - Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG das MLS com FSH e MEG (D2).....	48
Figura 24 - Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG das micropartículas com FSH e MEG, adicionadas de 15% de Ibuprofeno (D2-15).	49
Figura 25 - Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG das micropartículas com FSH e MEG, adicionadas de 30% de Ibuprofeno (D2-30).	49

Figura 26 - Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG das misturas físicas nas mesmas proporções dos componentes das MLS E4-15	51
Figura 27 - Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG das MLS de FSH e AE (E4).....	51
Figura 28 - Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG das micropartículas com FSH e AE, adicionadas de 15% de Ibuprofeno (E4-15).....	52
Figura 29 - Difratoogramas dos componentes das micropartículas lipídicas sólidas.....	53
Figura 30 - Difratoogramas das misturas físicas nas mesmas proporções dos componentes das MLS D2-15 e D2-30.....	54
Figura 31 - Difratoogramas das MLS sem fármaco D2	55
Figura 32 - Difratoogramas das MLS D2-15 e D2-30.....	55
Figura 33 - Difratoograma da mistura física nas mesmas proporções dos componentes das MLS E4-15.....	56
Figura 34 - Difratoograma das MLS E4 e E4-15.	57
Figura 35 - Perfil de liberação do ibuprofeno nas MLS de FSH:MEG com 30% de Ibuprofeno ; nas MLS de FSH:MEG com 15% de Ibuprofeno e e nas MLS de FSH:AE com 15% de Ibuprofeno	59
Figura 36 - Espectro de absorção do ibuprofeno na região do UV-Vis em clorofórmio.....	60
Figura 37 - Espectros de absorção na região de UV-Vis de MLS (A) D2 e (B) E4 em clorofórmio.....	61
Figura 38 - Curva analítica da absorbância em função da concentração de ibuprofeno em clorofórmio.....	62
Figura 39 - Espectro de absorção na região do UV-Vis de uma solução de 20 µg/ml de ibuprofeno em tampão fosfato 0,05M, pH 7.2.	64
Figura 40 - Espectro de absorção na região de UV-Vis de micropartículas lipídicas sólidas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e monoestearato de glicerila (D2) em tampão fosfato 0,05 M, pH7,2.....	65
Figura 41 - Espectro de absorção na região de UV-Vis de micropartículas lipídicas sólidas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e álcool estearílico (E4) em tampão fosfato 0,05 M, pH7,2.....	65
Figura 42 - Curva analítica da absorbância em função da concentração de ibuprofeno em tampão fosfato 0,05 M, pH 7.2.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das formulações estudadas.....	25
Tabela 2 - Nomenclatura e composição das micropartículas lipídicas sólidas contendo ibuprofeno obtidas pela técnica de spray dryer.....	34
Tabela 3 -Dados das curvas de DSC das misturas físicas e das micropartículas lipídicas sólidas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e monoestearato de glicerila com e sem ibuprofeno.....	50
Tabela 4 - Dados das curvas de DSC das misturas físicas e das micropartículas lipídicas sólidas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e álcool estearílico com e sem ibuprofeno..	52
Tabela 5 – Eficiência de encapsulação do ibuprofeno nas micropartículas	57
Tabela 6 - Dados da curva analítica obtida em clorofórmio	62
Tabela 7 - Resultados obtidos para o teste de repetibilidade	63
Tabela 8 - Resultados obtidos para o teste de precisão intermediária.....	63
Tabela 9 - Resultados obtidos para o teste de exatidão	63
Tabela 10 - Dados da curva analítica obtida em clorofórmio	64
Tabela 11- Dados da curva analítica obtida em tampão fosfato 0,05M, pH 7.2.	66
Tabela 12 - Resultados obtidos para o teste de repetibilidade	67
Tabela 13 - Resultados obtidos para o teste de precisão intermediária.....	67
Tabela 14 - Resultados obtidos para o teste de exatidão.....	68
Tabela 15 - Dados da curva analítica obtida em tampão fosfato 0,05M, pH7.2.	68

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

AE Álcool estearílico
AIE Anti-inflamatório esteroideal
AINE Anti-inflamatório não esteroideal
DSC Calorimetria exploratória diferencial
DTG Termogravimetria derivada
FSH Fosfatidilcolina de soja hidrogenada
FTIR Espectrometria no infravermelho por transformações de Fourier
IBU Ibuprofeno
LD Limite de detecção
LQ Limite de quantificação
MEG Monoestearato de glicerila
MEV Microscopia eletrônica de varredura
MLS Micropartícula lipídica sólida
PLU poloxamer 407
r Coeficiente de correlação linear
r² Coeficiente de determinação
STA estearilamina
TG Termogravimetria
Tonset Temperatura de início do evento
Tpico Temperatura do pico
TRI Triestearina
UV Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.2 Micropartículas Lipídicas Sólidas	15
1.3 Spray Drying.....	18
1.4 Ibuprofeno	19
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Materiais.....	24
3.1.1 Matérias-primas e reagentes	24
3.1.2 Equipamentos analíticos e acessórios.....	24
3.2 Métodos.....	25
3.2.1 Obtenção das MLS.....	25
3.2.2 Caracterização das MLS	25
3.2.3 Validação dos métodos analíticos	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Obtenção das MLS	34
4.2 Caracterização das MLS	34
4.2.1 Estudo morfológico.....	34
4.2.2 Espectroscopia de absorção na região de infravermelho	37
4.2.3 Análise Térmica	43
4.2.4 Difração de Raios X	53
4.2.5 Análise quantitativa do Ibuprofeno nas MLS.....	57
4.2.6. Avaliação Solubilidade do fármaco em tampão fosfato 0,05M pH 7.2	58
4.3 Estudo de liberação.....	58
4.4 Validação dos métodos analíticos.....	60
4.4.1 Validação de metodologia analítica para quantificação do Ibuprofeno em clorofórmio por espectrofotometria de UV-Vis.....	60
4.4.2 Validação de metodologia analítica para quantificação do Ibuprofeno em tampão fosfato 0,05 M, pH 7.2 por espectrofotometria de UV-Vis.	64
5. CONCLUSÕES	70

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Olho

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a retinopatia diabética, o glaucoma e a degeneração macular relacionada à idade são doenças crônicas de origem multifatorial que acometem o segmento posterior do olho, estando entre as 10 maiores causas de comprometimento visual mundial.

O olho humano pode ser dividido anatomicamente em segmento anterior formado pela córnea, humor aquoso, corpo ciliar, íris e cristalino; e segmento posterior formado pela retina, coróide e corpo vítreo (WADHWA *et al.*, 2009).

Geralmente, o tratamento de doenças do segmento anterior do olho é simples, através de colírios; enquanto o tratamento de doenças que acometem o segmento posterior do olho é mais complexo e merece atenção especial, uma vez que se não tratadas adequadamente podem evoluir para a perda irreversível da visão.

A perda parcial ou total da visão geralmente está relacionada à dificuldade de tratamento de tais doenças, uma vez que o tratamento de doenças do segmento posterior do olho é limitado pelas barreiras anatômicas e fisiológicas desse órgão que dificultam a biodisponibilidade adequada do fármaco nestes tecidos. Assim, várias vias de administração são propostas conforme descritas a seguir.

O tratamento de doenças oftálmicas por via sistêmica é limitado, principalmente, pela barreira hemato-ocular, a qual constitui um obstáculo anatômico importante à entrada de substâncias exógenas. Apenas uma pequena fração do fármaco administrado por essa via atinge o vítreo, sendo necessárias altas doses e administrações repetidas para se alcançar e manter níveis terapêuticos intravítreos, o que pode exaltar os efeitos colaterais e a toxicidade do fármaco (GAUDANA *et al.*, 2010).

Medicamentos administrados por via ocular tópica geralmente não são empregados no tratamento de doenças do segmento posterior do olho, uma vez que não atingem níveis terapêuticos nesses tecidos. A baixa biodisponibilidade é decorrente da rápida eliminação do fármaco da superfície ocular devido à dinâmica do sistema lacrimal, associado à dificuldade de permeação através da córnea,

conjuntiva e humor aquoso, estimando-se que menos de 5% da dose administrada sofre absorção intraocular (CHASTAIN, 2003; GAUDANA *et al.*, 2009).

Nesse sentido, a administração local de fármacos por meio de injeções intravítreas é uma alternativa eficiente para obtenção de níveis terapêuticos diretamente no vítreo, além da minimização dos efeitos colaterais derivados da distribuição sistêmica (CARDILLO; SOUZA-FILHO; OLIVEIRA, 2006; BOCHOT; FATTAL, 2012). Entretanto, a duração do efeito farmacológico é determinada pela curta meia-vida do fármaco livre nos tecidos locais, devido à rápida circulação sanguínea, sendo necessário injeções repetidas para manutenção dos níveis terapêuticos, o que pode ocasionar complicações adicionais, tais como endoftalmites, deslocamento da retina e catarata (THRIMAWITHANA *et al.*, 2011).

Uma das alternativas para se tentar contornar as dificuldades encontradas no tratamento de doenças do segmento posterior do olho é a administração intravítrea de fármacos veiculados em Sistemas de Liberação Controlada, os quais, de acordo com suas características, podem transportar substâncias com diferentes graus de hidrofília/lipofília, reduzirem a toxicidade do fármaco e promoverem liberação controlada ou sustentada do mesmo (GEROSKI; GILMAN, 2000; CARDILLO; SOUZA-FILHO; OLIVEIRA, 2006; SAHOO *et al.*, 2008).

1.2 Micropartículas Lipídicas Sólidas

As nano e micropartículas lipídicas sólidas (NLS e MLS, respectivamente) são sistemas lipídicos de liberação controlada de fármacos constituídos por lipídios sólidos à temperatura ambiente e corporal e estabilizadas por tensoativos (GASCO, 1993; MEHNERT; MÄDER, 2001), podendo apresentar tamanho nanométrico ou micrométrico, respectivamente.

A literatura relata a obtenção de tais sistemas por Eldem e colaboradores em 1991, mas o termo “micropartículas lipídicas sólidas” só foi introduzido por Gasco em 1993 e foi desenvolvida como um sistema alternativo às nanopartículas poliméricas, lipossomas, nanosuspensões e nanoemulsões lipídicas, uma vez apresentam como vantagens baixa toxicidade, possibilidade de transposição de escala e esterilização, além da possibilidade de transportar tanto fármacos hidrofílicos quanto hidrofóbicos.

Tipos de MLS e modelos de incorporação de fármacos

De acordo com a literatura, há três modelos diferentes para explicar os mecanismos de incorporação de fármacos nas NLS/MLS – matriz homogênea, cápsula rica em fármaco e núcleo rico em fármaco, conforme mostra a figura 1 (MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000).

Figura 1 - - Modelos de incorporação de fármacos nos três tipos de MLS. Adaptado de MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000



A matriz homogênea geralmente é obtida pela técnica de homogeneização a frio e o fármaco encontra-se molecularmente disperso na matriz ou em aglomerados amorfos. A distribuição uniforme do fármaco na matriz gera uma liberação mais sustentada do mesmo, podendo ou não apresentar efeito “burst”, dependendo da interação fármaco-lipídio (MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000; KAMBLE et al, 2012).

A cápsula rica em fármaco normalmente é obtida pela técnica de homogeneização a quente, na qual a matriz lipídica geralmente se recristaliza antes, forçando o fármaco a se distribuir na superfície da partícula, formando uma cápsula. Devido à alta concentração de fármaco na superfície da partícula, este modelo de partícula geralmente apresenta efeito “burst” (MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000; KÜCHLER *et al.*, 2010).

O núcleo rico em fármaco também é obtido pela técnica de homogeneização a quente, entretanto, neste caso, o fármaco precipita antes da recristalização do lipídio, formando uma espécie de reservatório. Geralmente a liberação do fármaco deste sistema é mais sustentada e governada por difusão de Fick do fármaco através da camada de lipídio que o cerca (KAMBLE et al, 2012).

A solubilidade do fármaco no lipídio, a proporção e a interação fármaco/lipídio são fatores que devem ser considerados, uma vez que apresentam grande influência sobre o perfil de liberação do fármaco, quanto maior a interação, mais controlada será a liberação (WISSING, KAYSER, MÜLLER, 2004; KÜCHLER *et al.*, 2010).

Aplicações

A utilização de lipídios sólidos biocompatíveis e biodegradáveis para obtenção de micro e nanopartículas lipídicas sólidas com baixa toxicidade é uma estratégia bastante interessante e que vem sendo amplamente explorada por diversas áreas médicas (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; CHIME *et al.*, 2013; MOHAMED *et al.*, 2013; SALJOUGHIAN *et al.*, 2013).

Estudos recentes envolvendo a administração tópica ocular de NLS contendo diferentes fármacos, tais como, tobramicina (CAVALLI, 2002), diclofenaco (ATTAMA *et al.*, 2008), Timolol (ATTAMA *et al.*, 2009), ciclosporina A (GÖKÇE, 2009; SANDRI *et al.* 2010, BASARAN *et al.*, 2010; WOLSKA, 2013), gatifloxacina (KALAM, 2010 e 2012), baicalin (LIU, 2011) e Metazolamina (LI *et al.*, 2011) têm mostrado resultados promissores, gerando novas perspectivas para o tratamento de doenças oftálmicas.

Embora as NLS/MLS sejam um sistema relativamente novo, a utilização de lipídios biodegradáveis para obtenção de sistemas de liberação controlada, tais como microemulsões e lipossomas (HIRONAKA *et al.*, 2009; YING *et al.*, 2013;) vêm sendo há tempos estudada para o tratamento de doenças do segmento posterior do olho. Entretanto, ainda não há relato na literatura sobre estudos para administração local das NLS/MLS nos tecidos do segmento posterior dos olhos.

A obtenção de nanopartículas lipídicas em escala nanométrica (NLS) ou micrométrica (MLS) depende da via de administração pretendida, do delineamento do sistema e da técnica de obtenção utilizada, sendo as mais comuns, a microemulsão a quente, emulsificação e evaporação do solvente, difusão do solvente e a homogeneização à alta pressão.

Independente do método utilizado, o produto resultante é uma dispersão aquosa e, com o objetivo de aumentar a estabilidade físico-química e microbiológica

durante o armazenamento, tais sistemas geralmente são secos por liofilização (DELPIAZ et al., 2008; VARSHOSAZ; ESKANDARI; TABBAKHIAN, 2012; SILVA et al., 2013; SOARES et al., 2013), cujas desvantagens são o tempo e a aglomeração das partículas.

Como alternativa, a secagem de dispersões de NLS por spray dryer e a obtenção de micropartículas redispersíveis têm sido recentemente descrita (MEZZENA et al., 2009; LI et al., 2010), entretanto, a obtenção de dispersões de NLS apresenta como desvantagem a necessidade de, no mínimo, duas etapas de produção, considerando a obtenção do sistema e a sua posterior secagem.

1.3 Spray Drying

A secagem por atomização, também conhecida por “Spray drying”, consiste em dissolver ou dispersar o fármaco e os demais componentes em um solvente volátil, que após ser atomizado via aspersor, gera pequenas gotículas que são rapidamente secas devido à rápida evaporação do solvente (PATEL; PATEL; SUTHAR, 2009; SILVA-JUNIOR *et al.*, 2008 e 2009).

O método de secagem por “spray drying” é bastante difundido e empregado na secagem de diversos produtos e, recentemente, tem sido utilizado com sucesso para microencapsulação de fármacos (CARDILLO, SOUZA-FILHO, OLIVEIRA, 2006), a qual tem proporcionado novas perspectivas para desenvolvimento de novos sistemas de liberação controlada, promovendo avanços significativos na área farmacêutica.

A obtenção de MLS diretamente pelo método de spray drying seria uma técnica interessante, não só pelo reduzido número de etapas de produção, mas também pelas próprias vantagens que o spray dryer pode oferecer, como alta eficiência de encapsulação e possibilidade de transposição de escala.

A baixa eficiência de encapsulação e a reduzida estabilidade das NLS e MLS têm sido relatadas como desvantagens, mas que poderiam ser superadas pela técnica de spray drying.

Outra vantagem seria a utilização de lipídios com ponto de fusão e cristalização relativamente baixos, permitindo a solidificação dos lipídios na matriz lipídica em temperatura ambiente, não sendo necessário submetê-las a baixas

temperaturas para a formação das micropartículas. Contrapondo os métodos convencionais de obtenção das MLS, os quais geralmente necessitam de um resfriamento abaixo da temperatura crítica de cristalização do sistema para a formação das NLS (BUNJES, 2011).

Devido ao seu caráter de biocompatibilidade e biodegradabilidade, a fosfatidilcolina de soja tem sido amplamente estudada como componente estrutural de sistemas organizados, tais como lipossomas, emulsões, microemulsões e nanoemulsões lipídicas (CORREA et al., 2005; FORMARIZ *et al*, 2006; FRANZINI *et al.*, 2012; OLIVEIRA et al., 2004, 2009; PESTANA et al. 2008; TROTTA; PATTARINO; IGNONI, 2002; SOUZA et al., 2004). O derivado hidrogenado da fosfatidilcolina de soja (FSH) possui as mesmas características biológicas da fosfatidilcolina e, devido às cadeias carbônicas saturadas apresenta maior estabilidade química e ponto de fusão elevado (107 °C), comportando-se como um sólido em temperatura ambiente. Essas propriedades revelam boas características para a extensão de suas aplicações como núcleo lipofílico para nano e micropartículas lipídicas sólidas.

1.4 Ibuprofeno

O ibuprofeno é um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) que inibe a enzima ciclooxigenase (COX) de forma não seletiva e, conseqüentemente, a síntese de substâncias inflamatórias, tais como as prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, reduzindo o processo inflamatório (GOODMAN; GILMAN, 2010).

Além da ação anti-inflamatória, os AINEs apresentam também efeito analgésico e têm sido utilizados como alternativa aos anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) em muitos processos inflamatórios, devido aos efeitos adversos que estes apresentam, tais como surgimento de infecções devido à sua ação imunossupressora entre outros (GOODMAN; GILMAN, 2010).

Nesse sentido, o ibuprofeno tem sido proposto para o tratamento de doenças oftálmicas caracterizadas por manifestações inflamatórias, tais como retinopatia (SHARMA et al. 2003).

Entretanto, a principal desvantagem da administração de ibuprofeno é a sua veiculação em sistemas de liberação convencionais, devido às flutuações da

concentração plasmática e a dificuldade de manutenção de concentrações terapêuticas por tempos prolongados.

O ibuprofeno é um fármaco ácido com características lipofílicas, classificado como classe II pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica, isto é, baixa solubilidade e alta permeabilidade, cujo pKa é 4,91 e o log P é 3.75 (TSRLINC, 2013).

O desenvolvimento de MLS contendo ibuprofeno para administração intraocular no tratamento de doenças inflamatórias do segmento posterior do olho visa prolongar o tempo de liberação do fármaco dentro da faixa terapêutica, reduzindo o número de administrações, proporcionando maior segurança no tratamento e comodidade ao paciente.

Objetivos

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e a caracterização de micropartículas lipídicas sólidas contendo ibuprofeno obtidas por spray drying para potencial liberação intraocular.

Materials

e

Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Matérias-primas e reagentes

- ✓ Água deionizada (purificada em equipamento Milliuni, Millipore).
- ✓ Álcool estearílico (HenriFarma)
- ✓ Clorofórmio (Synth®, Brasil)
- ✓ Fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FSH) (Epikuron 200 SH® Lucas Meyer, Alemanha);
- ✓ Fosfato de sódio monobásico (HenriFarma)
- ✓ Ibuprofeno (Henrifarma)
- ✓ Monoestearato de glicerila (AUFAZ)

3.1.2 Equipamentos analíticos e acessórios

- ✓ Balança Analítica (Mettler Toledo)
- ✓ Balança termoanalítica TA Instruments, modelo SDT-Q600;
- ✓ Célula calorimétrica TA Instruments, modelo DSC – Q100;
- ✓ Difratorômetro D 5000 (SIEMENS)
- ✓ Espectrofotômetro UV-Visível (Hewlett Packard-Kayak XA)
- ✓ Espectrômetro FTIR-8300 (Shimadzu)
- ✓ Microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-7500F)
- ✓ Peagômetro digital (Micronal)
- ✓ Spray Dryer B191 (Buchi)

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção das MLS

Inicialmente, várias formulações contendo FSH como componente estrutural para obtenção de MLS pela técnica de spray drying foram propostas, e adicionadas de diferentes agentes estruturantes para modificação da morfologia das MLS (Tabela 1).

Soluções clorofórmicas dos componentes com diferentes proporções foram obtidas e em seguida atomizadas em equipamento de spray dryer, utilizando aspersor de 0,7 mm, nas seguintes condições operacionais: Temperatura de entrada: 70 °C; Temperatura de saída: 45-49 °C, Fluxo de ar de atomização: 400L/h; Fluxo da bomba de atomização: 30% e eficiência do aspirador: 90%.

Tabela 1 – Composição das formulações estudadas

Amostra	Componentes	Proporção (m/m)
A	FSH:PLU	100:00; 98:2; 94:6; 90:10; 88:12; 86:14; 83:17; 80:20
B	FSH:TRI	50:50; 80:20; 90:10
C1	PLU:FSH:TRI	10:45:45
C2	STA:FSH:TRI	10:45:45
D	FSH:MEG	10:90; 30:70; 50:50; 70:30; 90:10
E	FSH:AE	10:90; 30:70; 50:50; 70:30; 90:10

Nota: FSH: Fosfatidilcolina de soja hidrogenada; PLU: Poloxamer 407; TRI: Triestearina; STA: estearilamina; MEG; Monoestearato de glicerila; AE: Álcool estearílico.

As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e armazenadas em dessecador até a realização da MEV.

3.2.2 Caracterização das MLS

3.2.2.1 Morfologia

A análise morfológica das MLS obtidas foi realizada em microscópio eletrônico de varredura de alta resolução JEOL JSM-7500F. As amostras foram fixadas em fita de carbono dupla face e, dependendo da amostra, fotomicrografadas em diferentes aumentos (50 a 10.000X).

3.2.2.2 Espectroscopia de absorção na região de infravermelho

Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos para o fármaco, para os componentes estruturais das micropartículas isoladamente, para as MLS e para as misturas físicas nas mesmas proporções das MLS. As análises foram realizadas em temperatura ambiente, na região de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando pastilhas da amostra com brometo de potássio em Espectrômetro Shimadzu FTIR-8300.

3.2.2.3 Análise Térmica

Com o intuito de se estudar possíveis interações entre o fármaco e os lipídios bem como o estado físico em que se encontram na matriz da micropartícula, além de possíveis alterações na estabilidade térmica dos componentes após o processo de obtenção de tais sistemas, as curvas de DSC, TG/DTG foram obtidas.

3.2.2.3.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC de aquecimento do fármaco, dos componentes estruturais das micropartículas isoladamente, das MLS e das misturas físicas nas mesmas proporções dos componentes das MLS no intervalo de 25-250 $^{\circ}\text{C}$ foram obtidas sob atmosfera de nitrogênio (50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) com razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. O experimento foi conduzido utilizando-se padrão de índio para calibração e cadinhos de alumínio fechados com aproximadamente 3,00 mg de amostra.

As entalpias (ΔH) foram determinadas pelo software TA Instruments Universal Analysis 2000) com base na massa de amostra informada no momento da análise.

3.2.2.3.2 Termogravimetria (TG) e Termogravimetria derivada (DTG)

As curvas de TG/DTG do fármaco, dos componentes estruturais das micropartículas isoladamente e das MLS foram obtidas no intervalo de 25-600 $^{\circ}\text{C}$ sob atmosfera de nitrogênio (50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) com razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}$.

min¹. O experimento foi conduzido utilizando cadinhos de platina contendo aproximadamente 5 mg de amostra.

As curvas de termogravimetria derivada foram obtidas pelo Software TA Instruments Universal Analysis 2000 e determinadas para cada amostra para a delimitação e cálculo dos eventos de perda de massa.

3.2.2.4 Difração de Raios X

A análise por difração de raios X foi realizada para o fármaco, para todos os componentes estruturais das micropartículas isoladamente, para as MLS e para as misturas físicas nas mesmas proporções dos componentes das MLS. Foi utilizado um difratômetro Rikugu® modelo Dmax 2500PC com difração em angulo 2θ , variando de 4° a 70°, usando radiação CuKa de $\lambda=1,5406 \text{ \AA}$, com monocromador de grafite.

3.2.2.5 Análise quantitativa do Ibuprofeno nas MLS

Massas específicas de micropartículas foram pesadas, transferidas para balão volumétrico de 5 mL e o volume completado com clorofórmio. Os espectros na região de ultravioleta das micropartículas contendo ibuprofeno foram obtidos em 242 nm, utilizando as micropartículas sem fármaco como branco e realizadas em triplicata. O teor de fármaco encapsulado foi calculado utilizando-se a curva analítica obtida nas mesmas condições de análise e previamente validada, a eficiência de encapsulação foi calculada utilizando-se a Eq. 1.

$$EE (\%) = \frac{\text{Quantidade de fármaco determinada analiticamente}}{\text{Quantidade teórica de fármaco}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

3.2.2.6 Avaliação solubilidade do ibuprofeno em tampão fosfato 0,05M pH 7.2

O estudo de solubilidade do ibuprofeno foi realizado para determinação das condições *sink* a serem utilizadas no estudo de liberação *in vitro* e foi determinado através do método do equilíbrio de solubilidade do fármaco em tampão fosfato 0,05 M pH 7.2 (TONG e WEN, 2008). Para garantir a saturação do meio, um excesso de Ibuprofeno foi adicionado ao meio e mantido sob agitação em homogeneizador rotatório de soluções por 48 h e posteriormente centrifugado a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi coletado, filtrado em filtro com poro de 0,45 µm e o fármaco dissolvido foi analisado por espectrofotometria UV-Visível em 222 nm. A determinação da concentração do fármaco solúvel no meio foi obtida a partir da respectiva curva analítica construída e validada nas mesmas condições do ensaio em temperatura ambiente.

3.2.2.7 – Estudo de Liberação

O estudo de liberação *in vitro* foi realizado utilizando o modelo estático, no qual micropartículas correspondentes à 300 µg de ibuprofeno foram colocadas em frascos eppendorf com 1,5 mL de tampão fosfato 0,05M, pH 7.2 (condições *sink*) e mantidas em banho termostaticado com agitação a 37° C. Em intervalos de tempos pré-determinados (5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360, 480 e 720min), os conteúdos dos eppendorfs foram filtrados em filtros com poro de 0,45 µm e o filtrado foi analisado por espectrofotometria UV-Visível, utilizando as soluções das respectivas micropartículas vazias como branco. Tal estudo foi realizado em duplicata.

3.2.3 Validação dos métodos analíticos

3.2.3.1 Validação de metodologia analítica para quantificação do ibuprofeno em clorofórmio por espectrofotometria de UV-Vis.

A validação da metodologia analítica foi realizada conforme preconizado pela Anvisa na RE 899 de 2003 e pela USP 2011. Cujos parâmetros considerados

durante a validação do processo analítico foram: Especificidade e seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

O clorofórmio foi utilizado como solvente universal capaz de solubilizar todos os compostos das micropartículas para posterior quantificação do ibuprofeno.

3.2.3.1.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção (λ_{\max}) do Ibuprofeno

Soluções de concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ de Ibuprofeno em clorofórmio foram submetidas a uma varredura entre 200 e 400 nm, em espectrofotômetro UV-Vis, a fim de se verificar o comprimento de onda no qual o fármaco apresenta sua máxima absorção.

3.2.3.1.2 Especificidade e Seletividade

Com o objetivo de se avaliar a possível interferência dos constituintes da micropartícula na quantificação do ibuprofeno encapsulado e demonstrar que o resultado do teste não é afetado pelos mesmos, determinou-se a especificidade e a seletividade através da avaliação dos espectros de absorção das micropartículas contendo fármaco entre 200 e 400 nm.

3.2.3.1.3 Linearidade

A linearidade foi determinada a partir da obtenção da curva analítica do Ibuprofeno em clorofórmio. Diluições com concentrações entre 150 e 500 $\mu\text{g/mL}$ foram obtidas a partir de uma solução estoque de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de Ibuprofeno em clorofórmio. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.3.1.4 Precisão

A precisão foi avaliada conforme preconizado pela resolução 899/03 da Anvisa, através da determinação em triplicata e em dias diferentes de três níveis de concentração, baixa (150 $\mu\text{g/mL}$), média (300 $\mu\text{g/mL}$) e alta (500 $\mu\text{g/mL}$) em

clorofórmio a partir de uma solução estoque de 1000 µg/mL de ibuprofeno em clorofórmio, contemplando o intervalo linear do método.

3.2.3.1.5 Exatidão

A exatidão foi calculada (Eq. 2) a partir da média dos resultados das concentrações baixa (150 µg/mL), média (300 µg/mL) e alta (500 µg/mL), contemplando a faixa de linearidade do método.

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Concentração média determinada experimentalmente}}{\text{Concentração teórica}} \quad (\text{Eq. 2})$$

3.2.3.1.6 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados por meio da análise de concentrações de soluções de concentrações decrescentes de ibuprofeno (100, 75, 50 e 25 µg/mL) em triplicata e calculados através das equações 3 e 4.

$$\text{Limite de detecção} = \frac{3 \times \text{Desvio padrão de } b}{IC} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\text{Limite de quantificação} = \frac{10 \times \text{Desvio padrão de } b}{IC} \quad (\text{Eq. 4})$$

em que, *b* é o intercepto com o eixo Y da curva analítica média construída com as concentrações decrescentes e, *IC* é o coeficiente angular da curva analítica obtida pela determinação da linearidade.

3.2.3.2 Validação de metodologia analítica para quantificação do ibuprofeno em tampão fosfato 0,05 M, pH 7.2 por espectrofotometria de UV-Vis.

Os parâmetros considerados durante a validação do processo analítico foram: Especificidade e seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, conforme preconizado pela Anvisa (2003).

Todas as análises foram realizadas a partir de diluições de soluções-estoque de concentrações de 50 µg/mL de ibuprofeno em tampão fosfato 0,05M, pH 7.2, submetidas a banho de ultrasson por 30 minutos para solubilização total do fármaco.

3.2.3.2.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção (λ_{\max}) do Ibuprofeno

Soluções de concentração de 20 µg/mL de Ibuprofeno em tampão fosfato 0,05 M, pH7,2 foram submetidas a uma varredura entre 200 e 400 nm, em espectrofotômetro UV-Vis, a fim de se verificar o comprimento de onda no qual o fármaco apresenta sua máxima absorção

3.2.3.2.2 Especificidade e Seletividade

Para se avaliar a possível interferência dos constituintes da micropartícula na quantificação do ibuprofeno liberado, determinou-se a especificidade e a seletividade através da avaliação dos espectros de absorção das micropartículas vazias.

Aproximadamente 1,0 mg de micropartículas foi pesado e transferido para um balão volumétrico de 5 mL e o volume completado com tampão fosfato 0,05 M, pH 7.2. As amostras foram filtradas em filtros com poro de 0,45 µm e o filtrado submetido a uma varredura entre 200 e 400 nm, em espectrofotômetro UV-Vis.

3.2.3.2.3 Linearidade

A linearidade foi determinada a partir da obtenção da curva analítica do ibuprofeno em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,2. Diluições com concentrações entre 10 e 30 µg/mL foram obtidas a partir de uma solução estoque de 50 µg/mL de Ibuprofeno no mesmo meio. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.3.2.4 Precisão

A precisão foi avaliada conforme preconizado pela resolução 899/03 da Anvisa, através da determinação em triplicata e em dias diferentes de três níveis de concentração, baixa (10 µg/mL), média (20 µg/mL) e alta (30 µg/mL) de ibuprofeno em tampão fosfato 0,05M, pH7,2 a partir de uma solução estoque de 50 µg/mL.

3.2.3.2.5 Exatidão

A exatidão foi calculada (equação 5) a partir da média dos resultados das concentrações baixa (10 µg/mL), média (20 µg/mL) e alta (30 µg/mL), contemplando a faixa de linearidade do método.

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Concentração média determinada experimentalmente}}{\text{Concentração teórica}} \quad (\text{Eq. 5})$$

3.2.3.2.6 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados por meio da análise de concentrações de soluções de concentrações decrescentes de ibuprofeno (5, 4, 3 e 2 µg/mL) em triplicata e calculados através das equações 6 e 7:

$$\text{Limite de detecção} = \frac{3 \times \text{Desvio padrão de } b}{IC} \quad (\text{Eq.6})$$

$$\text{Limite de quantificação} = \frac{10 \times \text{Desvio padrão de } b}{IC} \quad (\text{Eq. 7})$$

em que, b é o intercepto com o eixo Y da curva analítica média construída com as concentrações decrescentes e, IC é o coeficiente angular da curva analítica obtida pela determinação da linearidade.

Resultados

e

Discussões

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção das MLS

O estudo da influência dos diferentes agentes estruturantes na formação e modificação das MLS foi realizado.

O método proposto originou micropartículas com diferentes características morfológicas. Apresentando-se como um pó branco, fino e homogêneo.

As micropartículas obtidas foram inicialmente caracterizadas por MEV e aquelas cujos formatos eram mais esféricos e homogêneos foram selecionadas e adicionadas de 15 ou 30% de Ibuprofeno em relação à mistura lipídica. As partículas foram coletadas do equipamento e acondicionadas em frascos de vidro âmbar e armazenadas em dessecador. A tabela 2 mostra a composição das amostras selecionadas para o estudo.

Tabela 2 - Nomenclatura e composição das micropartículas lipídicas sólidas contendo ibuprofeno obtidas pela técnica de spray dryer.

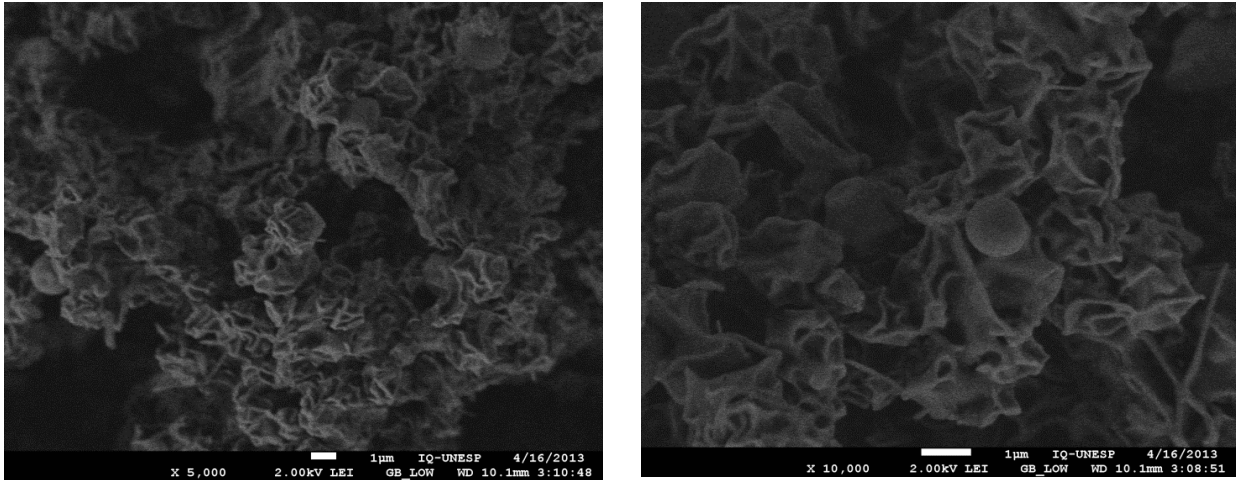
Amostra	Composição	Proporção (m/m/m)
D2	FSH:MEG	30:70
D2-15	FSH:MEG:IBU	(30:70):15
D2-30	FSH:MEG:IBU	(30:70):30
E4	FSH:AE	70:30
E4-15	FSH:AE:IBU	(70:30):15

4.2 Caracterização das MLS

4.2.1 Estudo morfológico

A figura 2 apresenta as micropartículas com fosfatidilcolina de soja hidrogenada e monoestearato de glicerila (D2). Observa-se a tendência de formação de partículas esféricas, porém com predominância de partículas com superfícies rugosas.

Figura 2- Fotomicrografia de MLS com fosfatidilcolina de soja hidrogenada e monoestearato de glicerila (D2).



Já nas figuras 3 e 4 observamos que a incorporação do ibuprofeno contribuiu significativamente para a estruturação da micropartícula, conferindo-lhe características morfológicas mais esféricas e homogêneas. Observa-se que com o aumento da proporção de ibuprofeno nas micropartículas melhor foi a organização estrutural esférica das mesmas. Essa melhoria na organização provavelmente esteja relacionada com a interação favorável do ibuprofeno com os lipídios estruturais das MLS, conforme mostram os resultados de DSC e DRx.

Figura 3 - Fotomicrografias de MLS com fosfatidilcolina de soja hidrogenada e monoestearato de glicerila, adicionadas de 15% de ibuprofeno (D2-15).

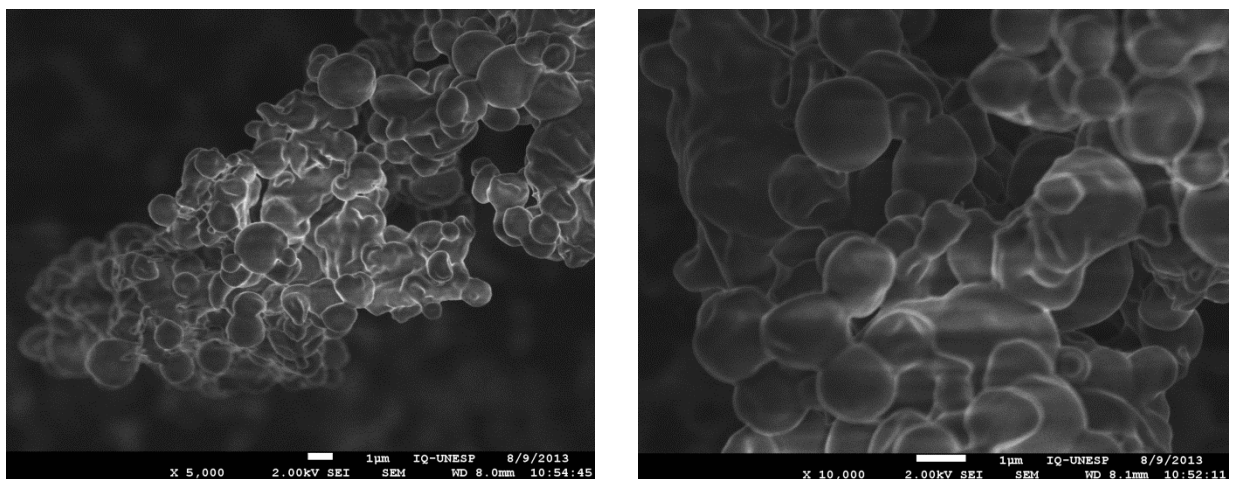
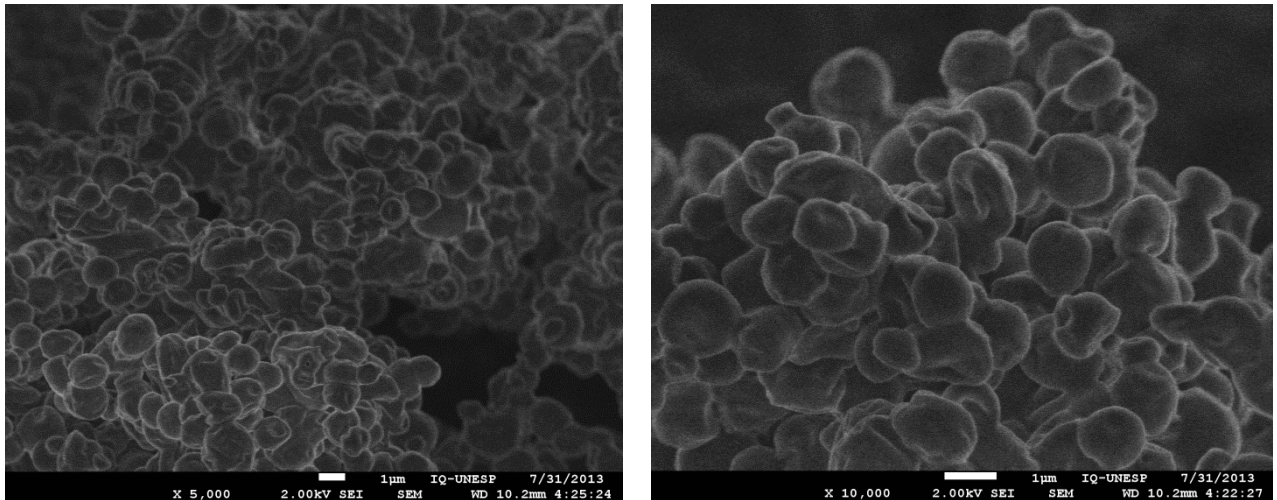
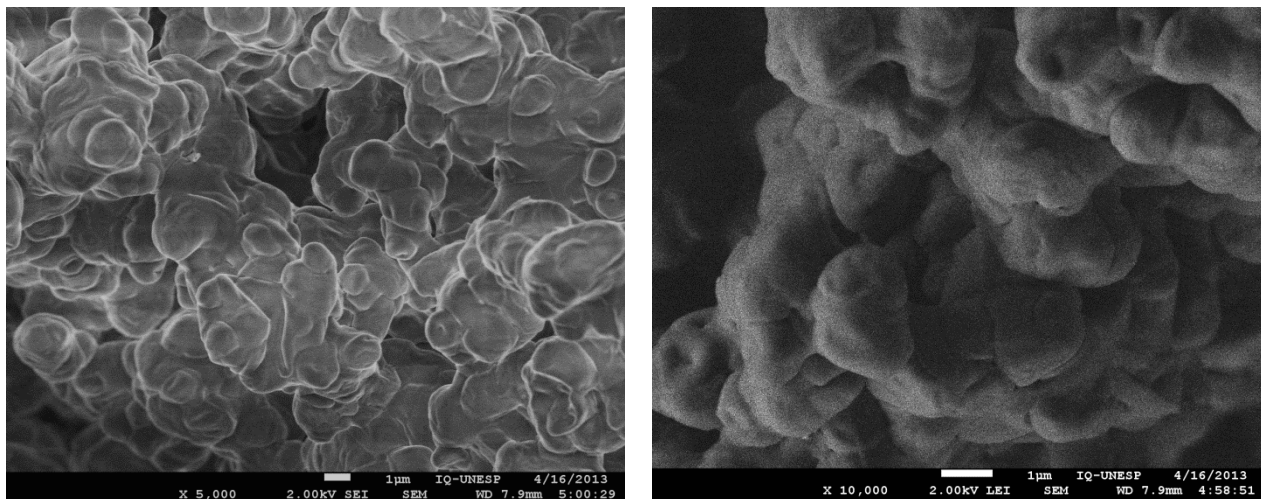


Figura 4 - Fotomicrografia de MLS com fosfatidilcolina de soja hidrogenada e monoestearato de glicerila, adicionadas de 30% de ibuprofeno (D2-30).



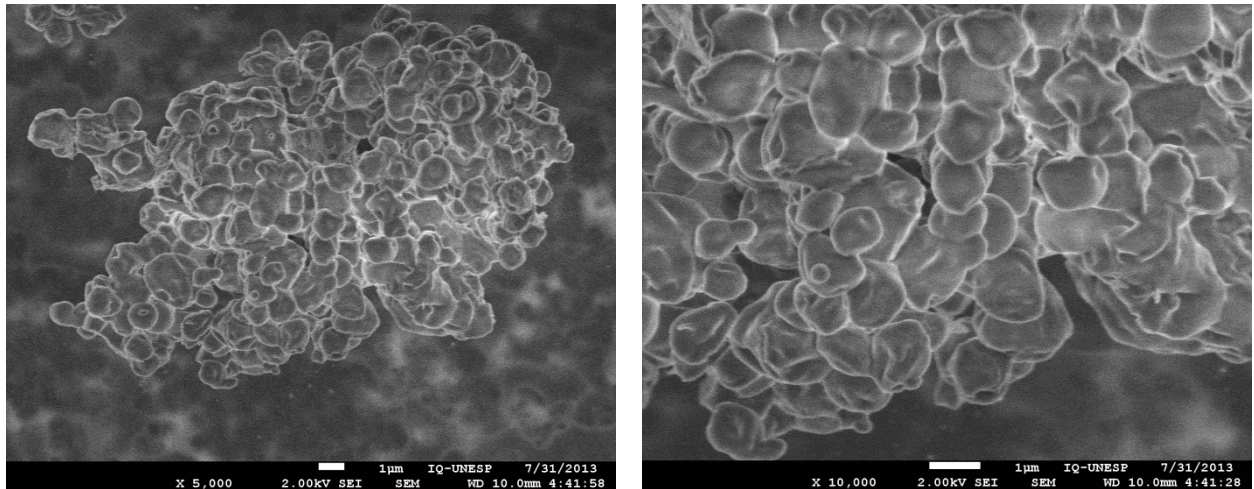
A figura 5 apresenta as micropartículas com fosfatidilcolina de soja hidrogenada e álcool estearílico, com favorecimento da esferoinização, embora ocorra certa agregação entre elas.

Figura 5 - Fotomicrografia de MLS com fosfatidilcolina de soja hidrogenada e álcool estearílico (E4).



A incorporação de 15% de ibuprofeno (Figura 6) neste sistema contribui para estruturação das partículas, bem como para a redução da agregação, provavelmente devido à interação do ibuprofeno com os lipídios.

Figura 6 - Fotomicrografia de MLS com fosfatidilcolina de soja hidrogenada e álcool estearílico, adicionadas de 15% de ibuprofeno.



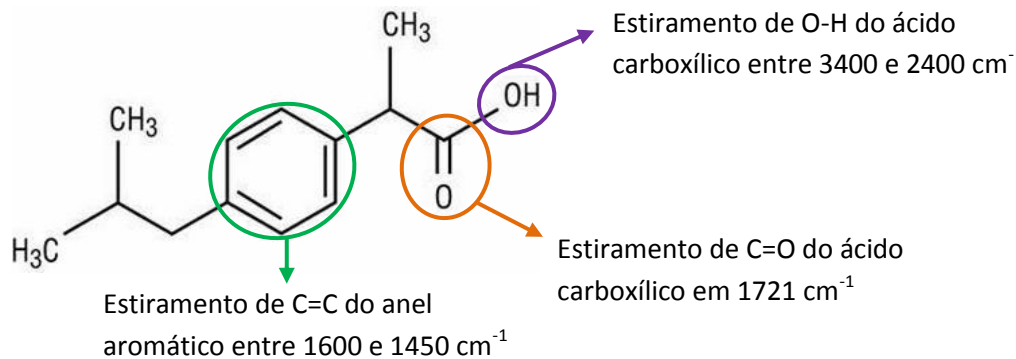
Observa-se que para todas as formulações apresentadas a presença do ibuprofeno contribui de forma significativa com a organização estrutural das micropartículas, assim como para a redução da aglomeração entre elas. Esse fenômeno sugere que o ibuprofeno esteja interagindo fortemente com os demais componentes da formulação.

4.2.2 Espectroscopia de absorção na região de infravermelho

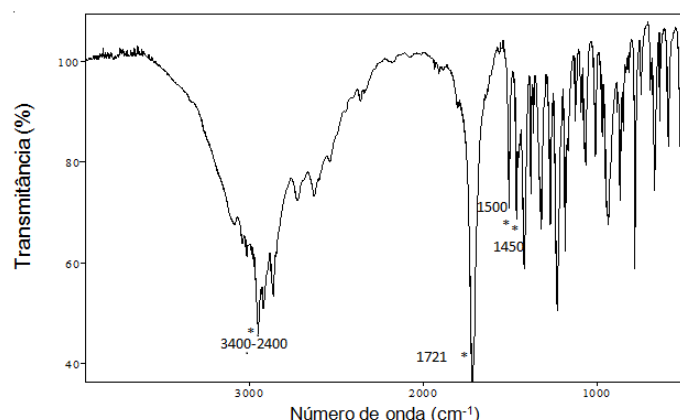
A espectroscopia na região de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica que permite a caracterização substâncias a partir das ligações moleculares que elas apresentam, o que nos permite estudar possíveis interações entre as substâncias (PAVIA et al. 2010).

Para investigar possíveis interações entre o fármaco e os lipídios, analisou-se o fármaco puro, os lipídios isoladamente, as MLS vazias, as MLS contendo ibuprofeno e as misturas físicas nas mesmas proporções dos componentes das MLS.

O ibuprofeno apresenta em sua estrutura dois grupos funcionais (Figura 7) os quais podem ser claramente identificados no espectro de infravermelho (Figura 8).

Figura 7 - Bandas características do ibuprofeno no espectro de infravermelho.

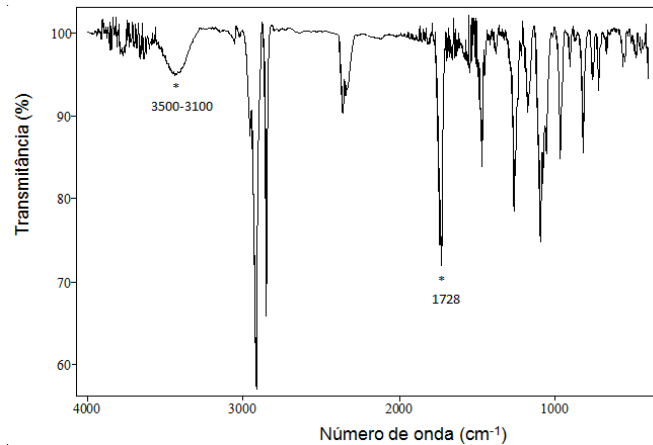
No espectro de FTIR do ibuprofeno (Figura 8) é possível identificar uma banda larga e intensa entre 3400 e 2400 cm^{-1} referente ao estiramento da hidroxila do ácido carboxílico, chegando a encobrir parcialmente as bandas de estiramento de C-H dos carbonos sp^2 e sp^3 . Uma banda intensa e característica em 1721 cm^{-1} pode ser vista e corresponde à deformação axial da carbonila do ácido carboxílico. Bandas em 1450 e 1500 cm^{-1} podem ser observadas e são indicativas do estiramento das ligações C=C do anel aromático e outra banda próxima a 800 cm^{-1} indica a sua substituição na posição *PARA*. Os dados obtidos são semelhantes aos dados relatados na literatura (MARIANECCI *et al.*; 2013).

Figura 8 – Espectro de infravermelho do ibuprofeno por transformada de Fourier (FTIR).

A Figura 9 mostra que o espectro de FTIR da fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FSH) apresenta uma banda larga entre 3500 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} referente ao estiramento de O-H, seguida pelas bandas de estiramento de C-H dos

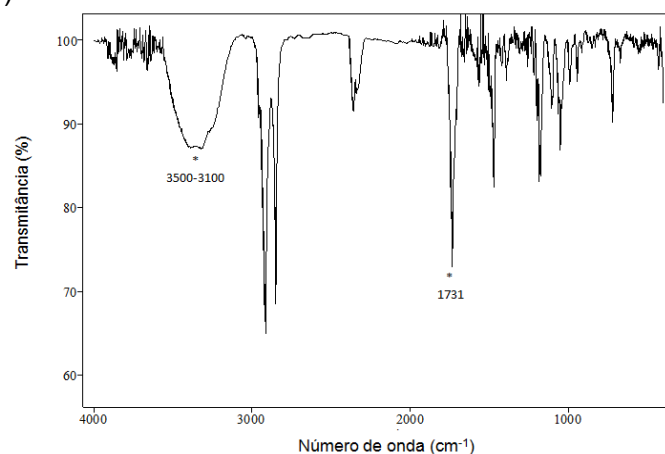
carbonos sp^3 entre 3000 cm^{-1} e 2840 cm^{-1} . Uma banda intensa em 1728 cm^{-1} decorrente do estiramento de $C=O$ do ester também pode ser observado.

Figura 9 - Espectro de infravermelho da fosfatidilcolina de soja hidrogenada por transformada de Fourier (FTIR).



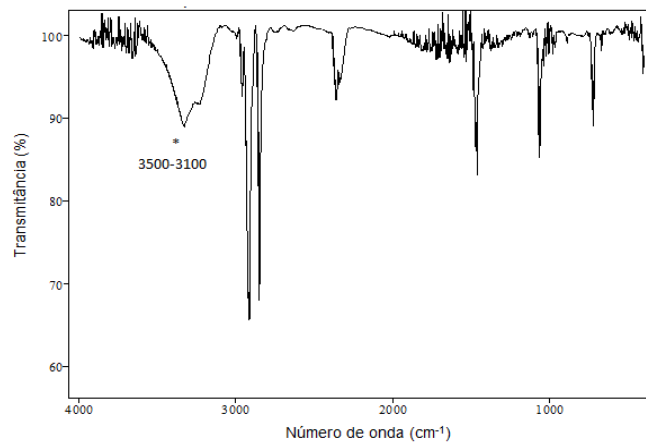
O espectro de FTIR do monoestearato de glicerila (MEG) (Figura 10) apresenta uma banda larga entre 3500 e 3100 cm^{-1} decorrente do estiramento de OH e bandas de estiramento de $C-H$ dos carbonos sp^3 entre 3000 e 2840 cm^{-1} . Observamos também uma banda intensa em 1731 cm^{-1} decorrente do estiramento de $C=O$ do ester.

Figura 10 - Espectro de infravermelho do monoestearato de glicerila por transformada de Fourier (FTIR).



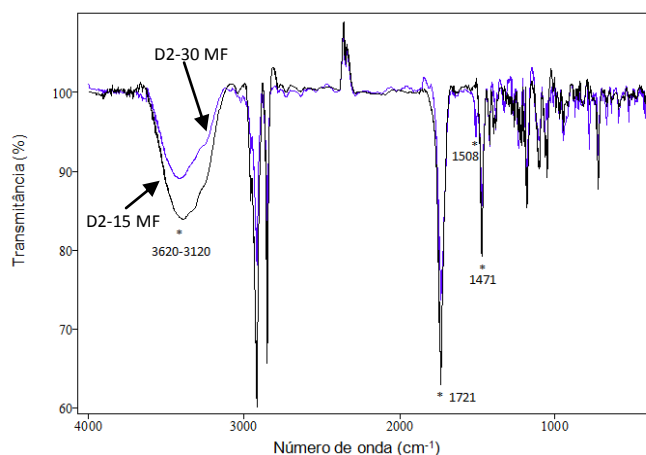
O espectro de FTIR do álcool estearílico (AE), Figura 11, apresentou uma banda larga decorrente do estiramento do OH entre 3500 e 3100 cm^{-1} e bandas de estiramento de $C-H$ dos carbonos sp^3 entre 3000 e 2840 cm^{-1} .

Figura 11- Espectro de infravermelho do álcool estearílico por transformada de Fourier (FTIR).



Os espectros de FTIR das misturas físicas nas mesmas proporções dos componentes das MLS D2-15 (fosfatidilcolina de soja hidrogenada e monoestearato de glicerila, adicionadas de 15% de ibuprofeno) e D2-30 (fosfatidilcolina de soja hidrogenada e monoestearato de glicerila, adicionadas de 30% de ibuprofeno) são mostrados na figura 12.

Figura 12 - Espectros de infravermelho das misturas físicas nas mesmas proporções dos componentes das MLS D2-15 e D2-30 por transformada de Fourier (FTIR).



Os espectros de FTIR das misturas físicas nas mesmas proporções dos componentes das MLS D2-15 e D2-30, figura 12, apresentam o mesmo padrão de transmitância. Observa-se uma banda larga e intensa entre 3620 a 3120 cm^{-1} referente ao estiramento de O-H; uma banda intensa em 1731 cm^{-1} característica do

estiramento de C=O e duas bandas características em 1508 e 1471 cm^{-1} referentes ao estiramento de C=C do anel aromático do ibuprofeno.

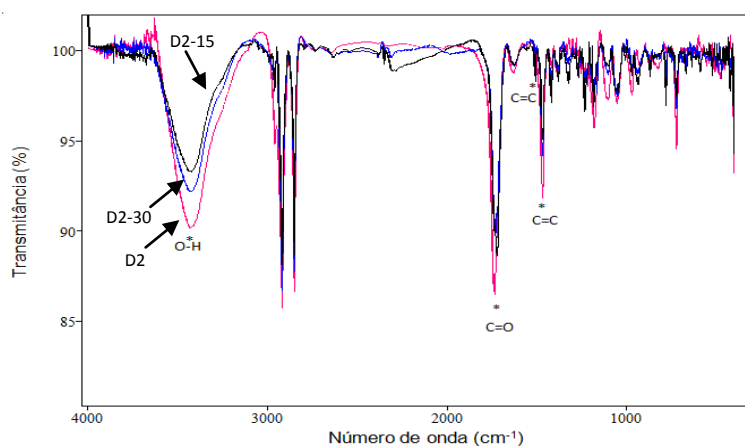
Em relação ao fármaco puro, observou-se estreitamento e o deslocamento das bandas de O-H para números de onda de maior energia; e o deslocamento das bandas de C=O e C=C também para números de onda de maior energia, sugerindo a interação entre o fármaco e os componentes na mistura física.

A figura 13 apresenta os espectros das MLS D2, D2-15 e D2-30. O espectro das MLS D2 apresenta uma banda larga entre 3620 e 3070 cm^{-1} referente ao estiramento de O-H e uma banda intensa em 1736 cm^{-1} , característica do estiramento de C=O.

Os espectros das MLS D2-15 e D2-30 apresentam bandas entre 3620 e 3070 cm^{-1} referentes ao estiramento de O-H e duas bandas características em 1508 e 1471 cm^{-1} referentes ao estiramento de C=C do anel aromático do ibuprofeno. As bandas referentes ao estiramento de C=O também podem ser observadas para as MLS D2-15 em 1730 cm^{-1} e D2-30 em 1722 cm^{-1} .

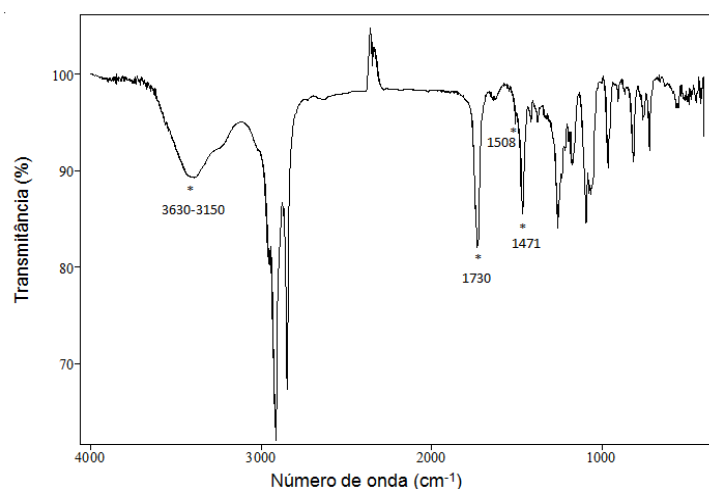
Em relação ao fármaco puro, observou-se também estreitamento e o deslocamento das bandas de O-H para números de onda de maior energia; e o deslocamento das bandas de C=O e C=C também para números de onda de maior energia, sugerindo a interação entre o fármaco e os componentes na MLS.

Figura 13 - Espectros de infravermelho das MLS D2, D2-15 e D2-30 por transformada de Fourier (FTIR).



Na sequência, são apresentados os espectros de infravermelho da mistura física nas mesmas proporções dos componentes das MLS E4-15 e das MLS E4 e E4-15.

Figura 14 - Espectro de infravermelho da mistura física nas mesmas proporções dos componentes das MLS E4-15 por transformada de Fourier (FTIR).



A figura 14 mostra o espectro de FTIR da mistura física E4-15. Observa-se uma banda larga em 3630-3150 cm^{-1} referente ao estiramento de O-H e bandas de estiramento de C-H dos carbonos sp^3 e sp^2 entre 3000 e 2840 cm^{-1} .

Uma banda intensa e característica em 1730 cm^{-1} pode ser vista e corresponde ao estiramento de C=O. Duas bandas em 1508 e 1471 cm^{-1} também podem ser observadas e correspondem ao estiramento de C=C do anel aromático do ibuprofeno.

Em relação ao ibuprofeno puro, observou-se também estreitamento e o deslocamento das bandas de O-H para números de onda de maior energia; e o deslocamento das bandas de C=O e C=C também para números de onda de maior energia, sugerindo a interação entre o fármaco e os componentes na mistura física.

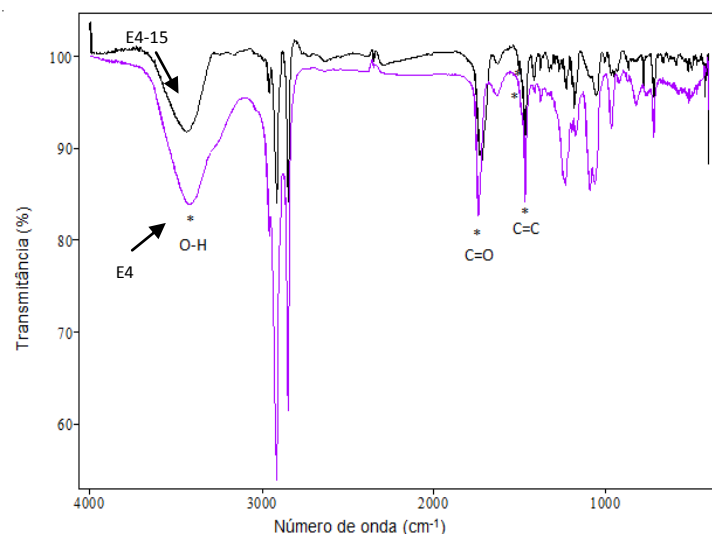
A figura 15 apresenta os espectros de FTIR das MLS sem fármaco E4 (fosfatidilcolina de soja hidrogenada e álcool estearílico) e das MLS adicionadas de 15% de ibuprofeno E4-15.

O espectro das MLS E4 mostra uma banda larga entre 3715 e 3115 cm^{-1} referente ao estiramento de O-H e uma banda intensa em 1739 cm^{-1} característica do estiramento de C=O.

O espectro das MLS E4-15 mostra uma banda larga entre 3715 e 3285 cm^{-1} referente ao estiramento de O-H, uma banda intensa em 1723 cm^{-1} característica do estiramento de C=O e duas bandas em 1508 e 1471 cm^{-1} referentes ao estiramento de C=C do anel aromático do ibuprofeno.

Foi possível observar que para ambas as MLS houve um estreitamento e um deslocamento das bandas de O-H para números de onda de maior energia; e o deslocamento das bandas de C=O e C=C (E4-15) também para números de onda de maior energia, em relação ao fármaco puro, sugerindo a interação entre o fármaco e os componentes na micropartícula.

Figura 15 - Espectros de infravermelho das MLS E4 e E4-15 por transformada de Fourier (FTIR).

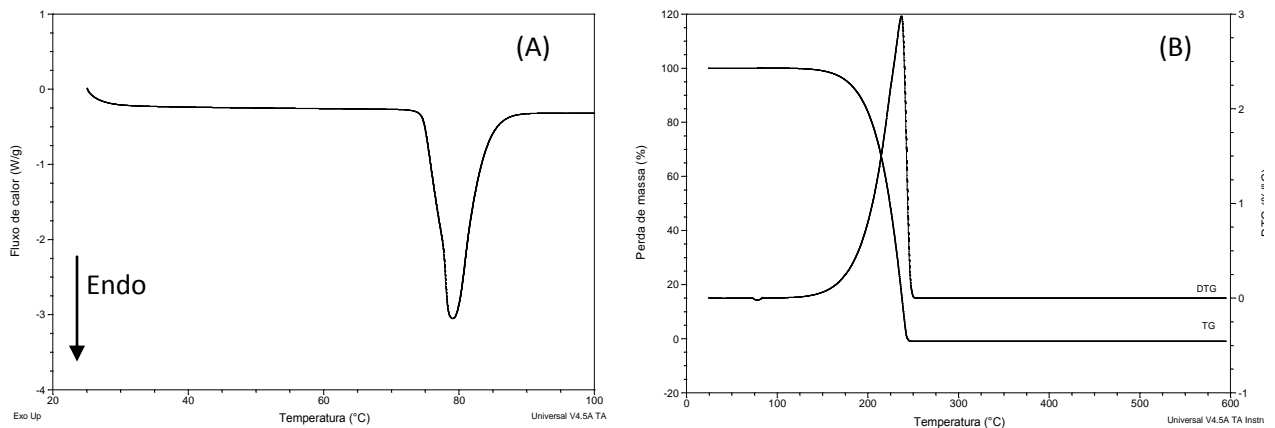


4.2.3 Análise Térmica

4.2.3.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG)/ Termogravimetria derivada (DTG).

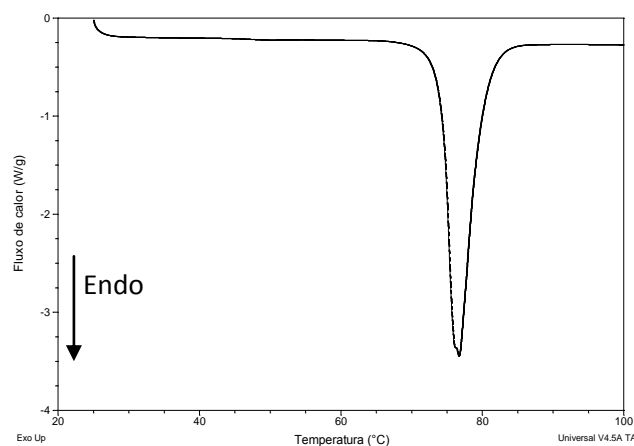
A fim de se investigar possíveis interações entre o fármaco e os lipídios e possíveis modificações na cristalinidade dos componentes durante o processo de obtenção das micropartículas, bem como a estabilidade térmica dos mesmos, os métodos termoanalíticos de DSC e TG/DTG foram empregados.

A curva DSC do IBU (figura 16 A) apresenta um único evento endotérmico de fusão, com início em 76,47°C, T_{pico} em 78,99°C e entalpia de 93,94 J/g, estando acordo com a literatura (MARIANECCI *et al.*, 2013). Observa-se pelas curvas TG/DTG, figura 16 B, uma perda de massa de aproximadamente 100% no intervalo de 150 a 250 °C, sugerindo a vaporização do ibuprofeno.

Figura 16 -- Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG do Ibuprofeno.

Ainda que a estabilidade térmica do ibuprofeno não seja muito alta, com início de degradação em 150 °C, ela não é um fator limitante no processo de obtenção das MLS pelo método de spray dryer, uma vez que a temperatura utilizada é 70 °C. Para confirmação de tal hipótese, foi realizada a análise de DSC do ibuprofeno puro atomizado nas mesmas condições de estudo (figura 17).

A curva DSC mostra que o comportamento térmico do ibuprofeno puro atomizado é muito semelhante ao comportamento térmico do ibuprofeno puro não atomizado, apresentando apenas um pequeno deslocamento da curva para temperaturas mais baixas. De acordo com a curva DSC, o Ibuprofeno puro atomizado apresenta um $T_{\text{início}}$ de 74,18°C, T_{pico} de 76,67°C e entalpia de 85,32 J/g.

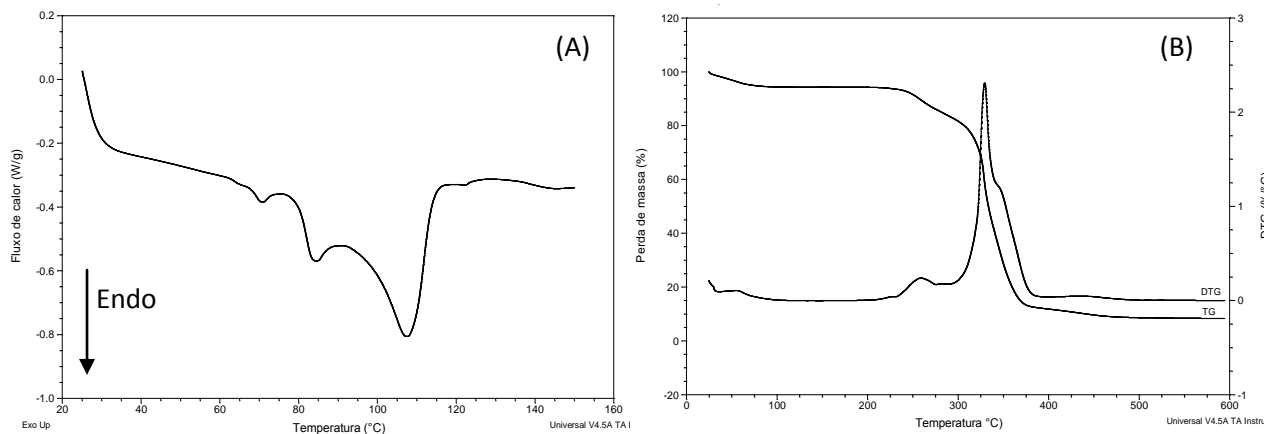
Figura 17 - Curva DSC do Ibuprofeno atomizado.

A curva DSC da FSH, apresentada na figura 18 A, mostra um evento endotérmico com início em 67,51 °C e T_{pico} em 70,34 °C (ΔH 0,4423 J/g) seguido

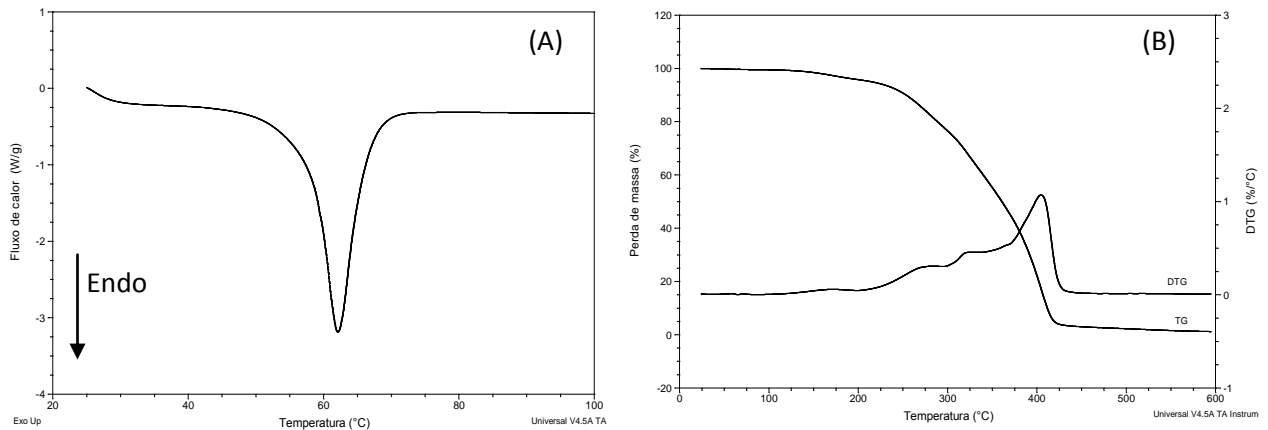
pelos eventos de fusão do mesmo. Observa-se que o primeiro evento endotérmico na curva DSC corresponde à uma perda de massa de 5,32% nas curvas TG/DTG, sugestivo da dessolvatação da FSH. A sobreposição de eventos endotérmicos de fusão da FSH podem ser observados, cujo início se dá em 79,68 °C e a temperatura do pico em 107,67 °C (ΔH 53,74 J/g), cujos resultados estão de acordo com o estudo de CHENG *et al.* (2013).

A figura 18 B apresenta as curvas TG/DTG da FSH, cuja degradação térmica ocorre em várias etapas no intervalo de 230 a 470 °C, com perda de massa de aproximadamente 85%.

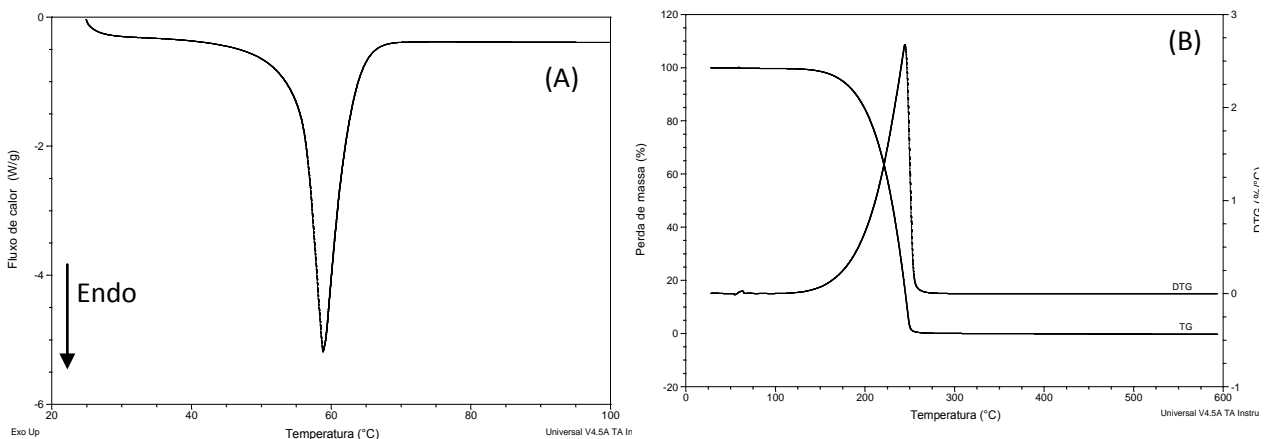
Figura 18 - Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG da fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FSH).



A curva DSC do MEG, (Figura 19 A) apresenta um único evento endotérmico de fusão, com início em 58,16 °C e T_{pico} em 62,12 °C (ΔH 116,6 J/g), possivelmente correspondente ao polimorfo β , conforme relatado por Müller e colaboradores (2008). De acordo com as curvas TG /TDG, Figura 19 B, o início de degradação térmica do MEG é em aproximadamente 250°C, ocorrendo em várias reações secundárias menores sobrepostas por uma reação principal que é finalizada em aproximadamente 450°C.

Figura 19 - Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG do monoestearato de glicerila (MEG)

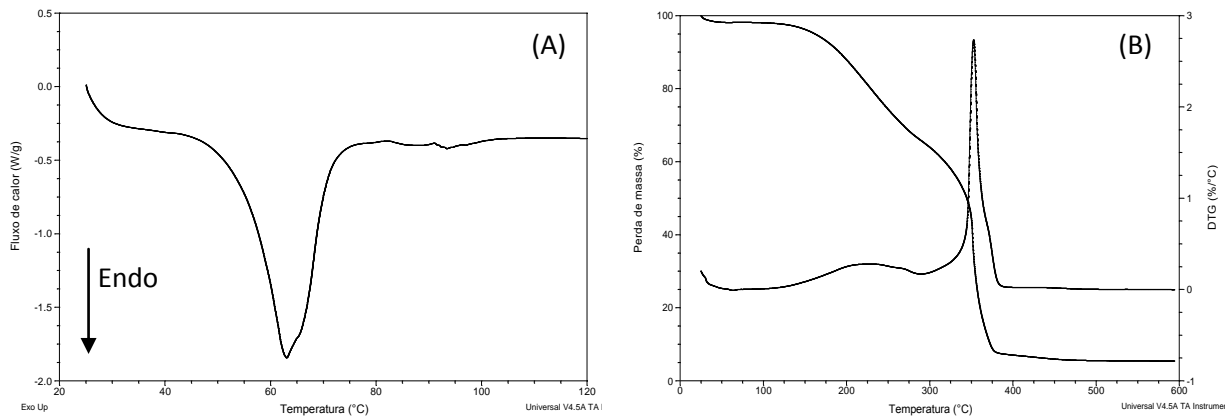
Na curva DSC do AE (figura 20 A) observa-se um único evento endotérmico de fusão com temperatura de início em 55,75°C, T_{pico} em 58,80°C e entalpia de 157,6 J/g, conforme relatado por Gandolfo; Bot ; Flöte (2003). De acordo com as curvas TG/ TDG (figura 20 B), a degradação térmica do AE inicia-se em aproximadamente 130°C e ocorre em uma única etapa, com perda de massa de 98%.

Figura 20 - Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG do álcool estearílico (AE).

A estabilidade térmica das misturas físicas nas mesmas proporções dos componentes das MLS também foi estudada. A figura 21 A apresenta as curvas DSC, TG/DTG da mistura física nas mesmas proporções dos componentes das MLS D2-15 (FSH + MEG, adicionadas 15% de IBU). A curva DSC mostra dois eventos endotérmicos, sendo um principal, seguido por um pequeno evento endotérmico secundário, sugestivos de fusão. O primeiro evento endotérmico teve início em 55,14 °C e T_{pico} em 63,03 °C, apresentando uma entalpia de 103,70J/g; e o segundo

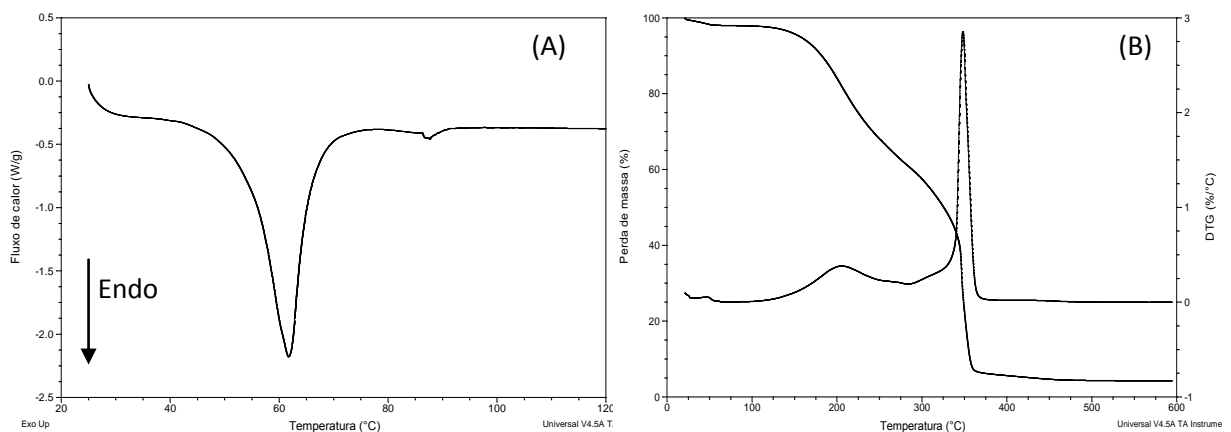
evento teve início em 91,24 °C, com T_{pico} em 93,39 °C e entalpia de 3,55 J/g. De acordo com as curvas TG/DTG (figura 21 B) a degradação térmica tem início em 125 °C, ocorre em várias etapas e apresenta uma perda de massa de aproximadamente 90%.

Figura 21 – Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG das misturas físicas nas mesmas proporções dos componentes das MLS D2-15



De forma semelhante à curva DSC da mistura física da respectiva MLS D2-15, a mistura física nas mesmas proporções dos componentes das MLS D2-30 (FSH + MEG, adicionadas de 30% de IBU), figura 22 A, apresentou 2 eventos endotérmicos, sendo o primeiro evento mais intenso com T_{pico} em 61,37 °C e $T_{\text{início}}$ em 54,34 °C (ΔH 97,59J/g). O segundo evento endotérmico tem início em 87,26 °C, com T_{pico} em 87,60 °C e entalpia de 1,78 J/g.

Figura 22 - Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG das misturas físicas nas mesmas proporções dos componentes das MLS D2-30



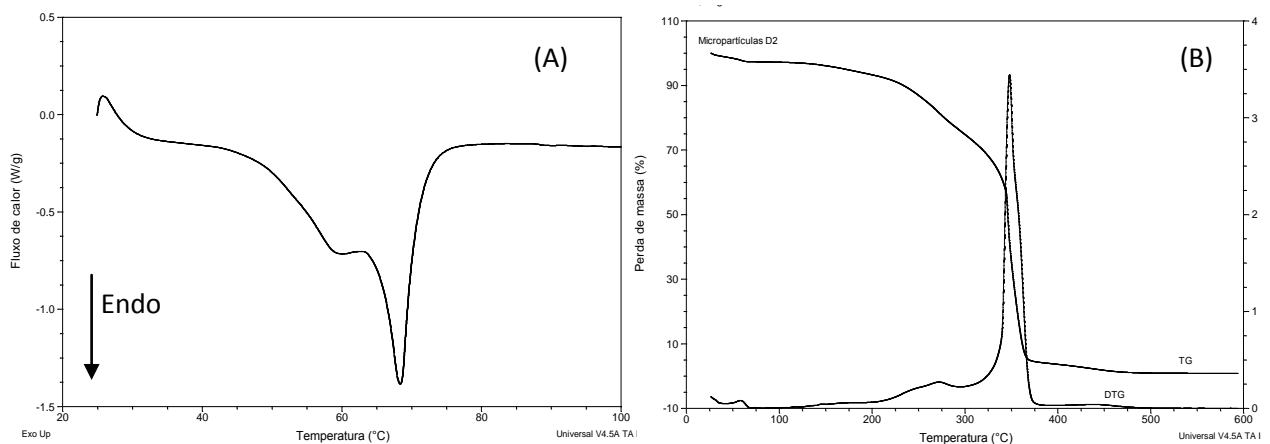
De acordo com as curvas TG/DTG (figura 22 B) a degradação térmica tem início em 125 °C, ocorre em várias etapas e apresenta uma perda de massa de aproximadamente 90%.

De acordo com as análises de DSC das misturas físicas nas mesmas proporções dos componentes das MLS D2-15 e D2-30, ambas apresentam um evento endotérmico intenso seguido por outro evento endotérmico pouco intenso, sugerindo que o fármaco não esteja homogeneamente disperso na mistura física. Comportamento semelhante também foi relatado por Müller e colaboradores (2008) quando estudavam nanopartículas lipídicas sólidas de monoestearato de glicerila contendo ciclosporina.

É possível observar também que o aumento da concentração de fármaco no sistema reduz a $T_{início}$, a T_{pico} e a entalpia de fusão dos dois eventos endotérmicos durante o primeiro aquecimento, sugerindo sua melhor interação com a mistura lipídica.

O DSC das MLS com FSH e MEG (D2) (Figura 23 A) apresentou um evento endotérmico de pré-fusão seguida por um evento de fusão com T_{pico} em 68,33 °C e entalpia de 74,13 J/g, sugerindo a presença de diferentes polimorfos. A degradação térmica das MLS D2 ocorre em duas etapas com início em aproximadamente 125 °C e perda de massa de aproximadamente 92%, conforme as curvas de TG/DTG apresentadas na figura 23 B.

Figura 23 - Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG das MLS com FSH e MEG (D2).

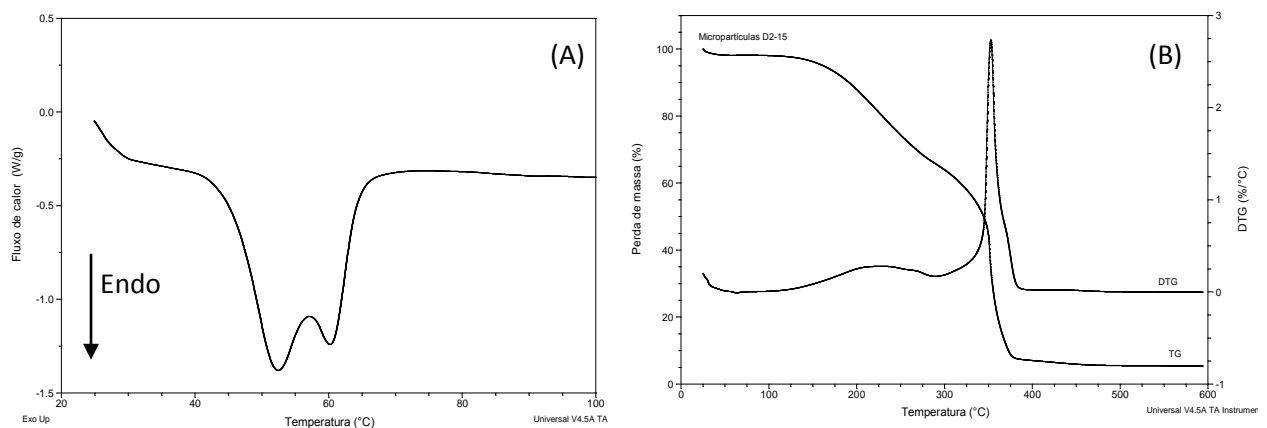


A figura 24 A apresenta o DSC das micropartículas de FSH e MEG, adicionadas de 15% de ibuprofeno (D2-15). Observa-se dois eventos endotérmicos

de fusão sobrepostos com início em 45,14 °C e T_{pico} em 52,35°C e entalpia de 87,42 J/g, sugerindo a presença de diferentes polimorfos do MEG na matriz lipídica.

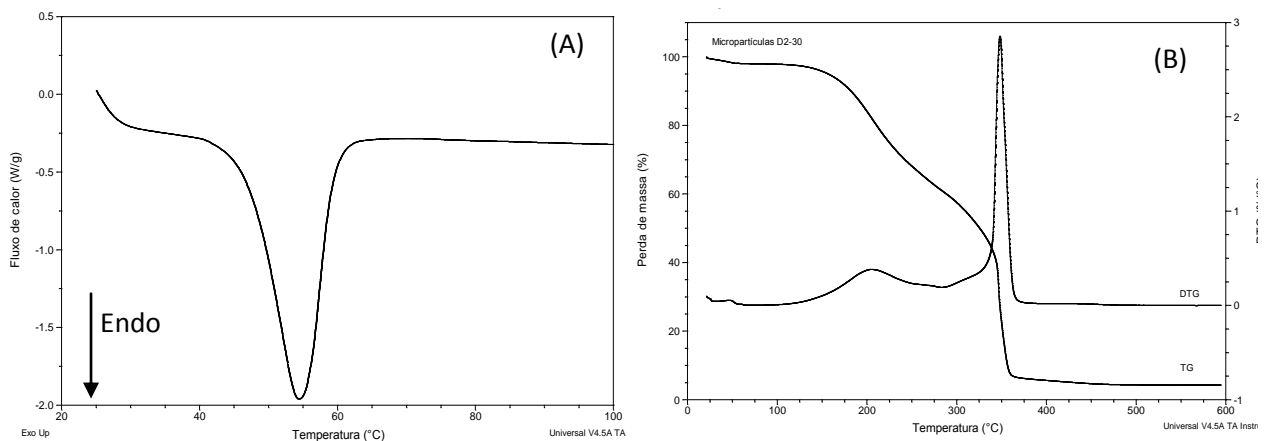
De acordo com as curvas TG/DTG (Figura 24 B) a degradação térmica das MLS D2-15 ocorre em duas etapas com início em aproximadamente 120 °C e perda de massa de aproximadamente 90%.

Figura 24 - Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG das micropartículas com FSH e MEG, adicionadas de 15% de Ibuprofeno (D2-15).



Já o Conforme mostra a figura 25 A, a curva DSC das micropartículas de FSH e MEG, adicionadas de 30% de ibuprofeno (D2-30) apresentou um único evento endotérmico de fusão com início em 46,96 °C, T_{pico} em 54,49°C e entalpia de 82,37 J/g. De acordo com as curvas TG/DTG (figura 25 B), o início de degradação térmica das micropartículas é em aproximadamente 120 °C, ocorre em duas etapas, com perda de massa de aproximadamente 90%.

Figura 25 - Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG das micropartículas com FSH e MEG, adicionadas de 30% de Ibuprofeno (D2-30).



Para melhor visualização dos dados, os valores obtidos da Temperatura de início, Temperatura do pico e entalpia das MLS e das respectivas misturas físicas podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3 -Dados das curvas de DSC das misturas físicas e das micropartículas lipídicas sólidas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e monoestearato de glicerila com e sem ibuprofeno.

Amostra	T início (°C)	Tpico (°C)	Entalpia (J/g)
D2	63,78	68,33	74,13
D2-15	45,14	52,35	87,42
D2-30	46,96	54,49	82,37
D2-15-MF	55,14	63,03	103,70
D2-30-MF	54,34	61,67	97,59

De acordo as curvas DSC apresentadas na tabela 3, as MLS apresentam temperatura de fusão e entalpia nitidamente menores em comparação com suas respectivas misturas físicas, demonstrando uma diminuição da cristalinidade da matriz. Tal fato sugere que a técnica de obtenção por spray dryer favorece a recristalização dos componentes da micropartícula em formas menos estáveis, conforme relatado por Craig, 2007.

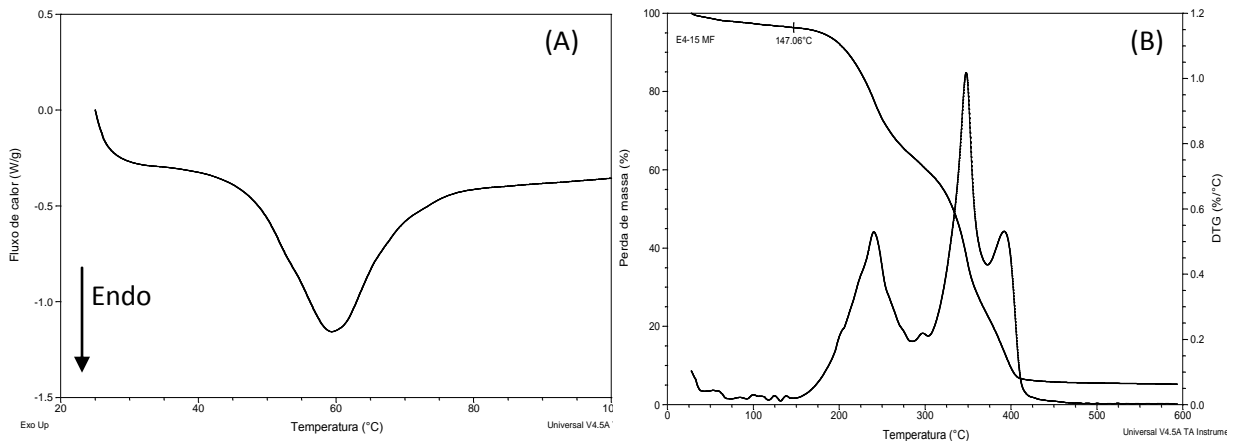
Tais resultados sugerem que as micropartículas obtidas apresentem menor cristalinidade, com predominância do polimorfo α do MEG na matriz da micropartícula, em contraste com o lipídio a granel das misturas físicas correspondentes, cujas matrizes apresentam predominância da forma β . Ambos os resultados foram confirmados pela difração de raios-X e resultado semelhante também foi observado por Müller *et al.* (2008).

Foi possível observar também que nenhum evento endotérmico de fusão do ibuprofeno foi observado nas curvas de DSC das micropartículas contendo o fármaco, o que sugere que o fármaco esteja solubilizado ou molecularmente disperso na matriz (BODMEIER; CHEN, 1989; SILVA *et al.*; 2011).

Em relação às formulações de FSH e AE, as curvas DSC, TG/DTG da mistura nas mesmas proporções dos componentes das MLS E4-15 estão ilustradas a seguir. A curva DSC, figura 26 A, apresenta um único evento endotérmico de fusão com início em 47,49 °C, Tpico em 59,22 °C e entalpia de 69,80J/g. De acordo com as

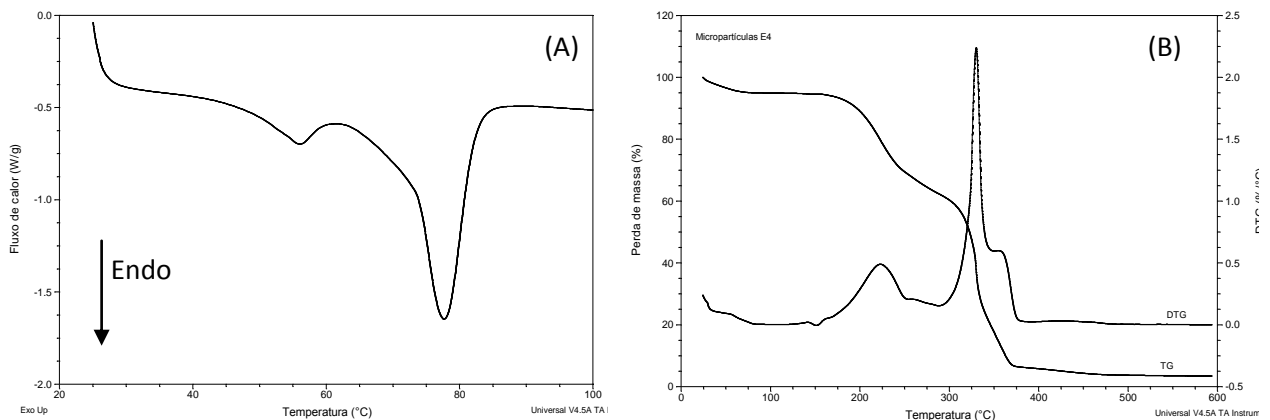
curvas TG/DTG (figura 26 B), o início de degradação térmica ocorre em aproximadamente 145 °C, em várias etapas, com perda de massa de aproximadamente 90%.

Figura 26 - Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG das misturas físicas nas mesmas proporções dos componentes das MLS E4-15



A curva DSC das MLS E4, figura 27 A, apresenta um evento endotérmico de pré-fusão seguida por um evento de fusão com $T_{\text{início}}$ em 71,17 °C, T_{pico} em 77,62 °C e entalpia de 60,54 J/g, sugerindo a presença de diferentes polimorfos, semelhante ao relatado pela literatura (MILTENBURG E OONK, 2001; GANDOLFO; BOT E FLÖTER, 2003).

Figura 27 - Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG das MLS de FSH e AE (E4).



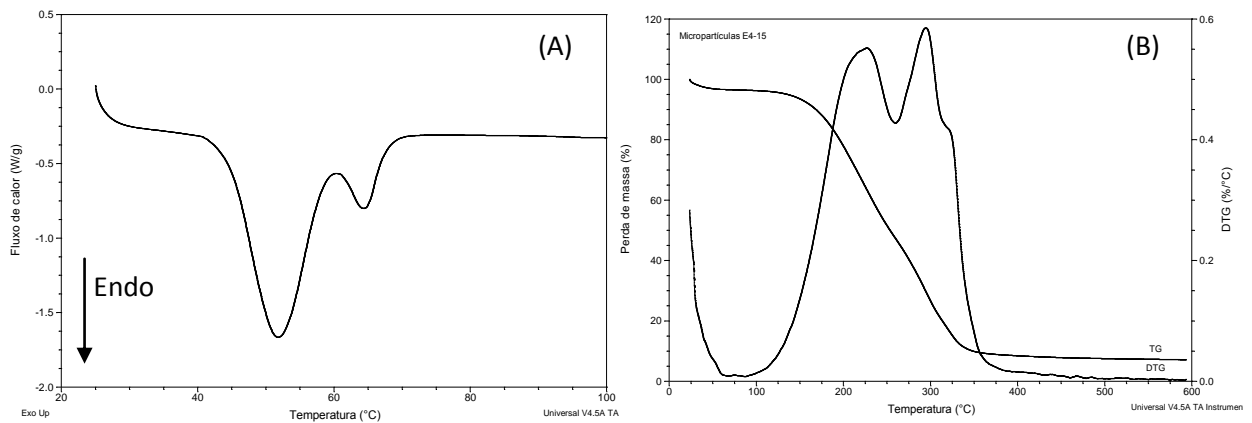
Observa-se nas curvas TG/DTG, figura 27 B uma perda de massa inicial de aproximadamente 5% referente ao aquecimento até 65 °C, sugestivo de dessolvatação. As curvas também mostram que a degradação térmica das MLS

ocorre em várias etapas, com início em 125 °C e perda de massa de aproximadamente 90%.

A curva DSC das micropartículas de FSH e AE adicionadas de 15% de ibuprofeno (E4-15), figura 28 A, apresenta dois eventos endotérmicos sobrepostos de fusão, com início em 41,30°C, temperatura do pico em 62,02 °C e entalpia de 66,01 J/g.

As curvas TG/DTG, figura 28 B, mostram uma perda de massa inicial de 3% até aquecimento de 60 °C, sugestivo de dessolvatação; seguida da decomposição térmica das MLS, que ocorre em várias etapas, com início em 100 °C e perda de massa de aproximadamente 90%.

Figura 28 - Curvas (A) DSC e (B) TG/DTG das micropartículas com FSH e AE, adicionadas de 15% de Ibuprofeno (E4-15).



Para melhor visualização dos dados, os valores obtidos da Temperatura de início, Temperatura do pico e entalpia das MLS E4 e E4-15 e da mistura física nas mesmas proporções dos componentes das MLS E4-15 (E4-15 MF) podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4 - Dados das curvas de DSC das misturas físicas e das micropartículas lipídicas sólidas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e álcool estearílico com e sem ibuprofeno

.Amostra	T início (°C)	Tpico (°C)	Entalpia (J/g)
E4	71,17	77,62	60,54
E4-15	41,30	62,02	66,01
E4-15-MF	47,49	59,22	69,80

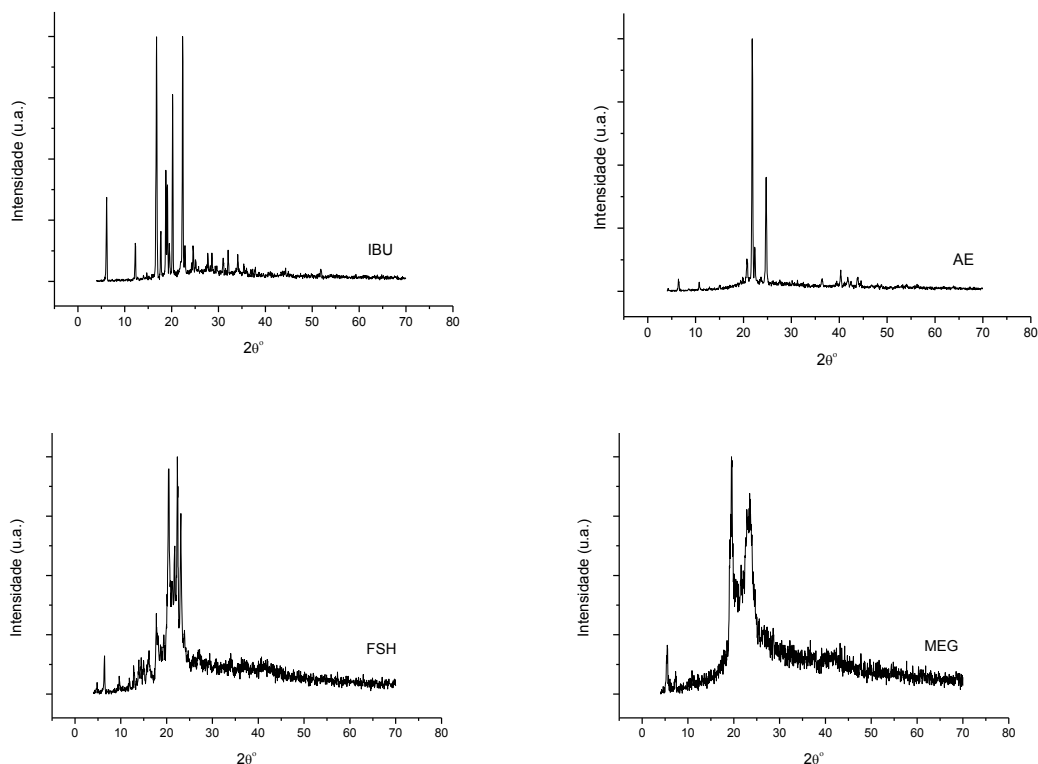
De acordo os dados apresentado na tabela 4, a incorporação do fármaco reduz a temperatura de fusão do sistema, sugerindo maior interação entre o fármaco e os lipídios. Foi possível observar também que as MLS E4-15 apresentaram temperatura de fusão e entalpia menores em comparação com sua respectiva mistura físicas sugerindo uma diminuição da cristalinidade da matriz, o que sugere que a técnica de obtenção por spray dryer também favorece a recristalização dos componentes desta micropartícula em formas menos estáveis, conforme relatado por Craig, 2007

4.2.4 Difração de Raios X

Os resultados da difração de raios X colaboram para o melhor entendimento da estrutura física da partícula e de seus componentes.

De acordo com a literatura (GAREKANI *et al.*, 2001) diferentes hábitos cristalinos do ibuprofeno podem ser obtidos a partir de diferentes solventes e diferentes métodos de cristalização.

Figura 29 - Difratomogramas dos componentes das micropartículas lipídicas sólidas



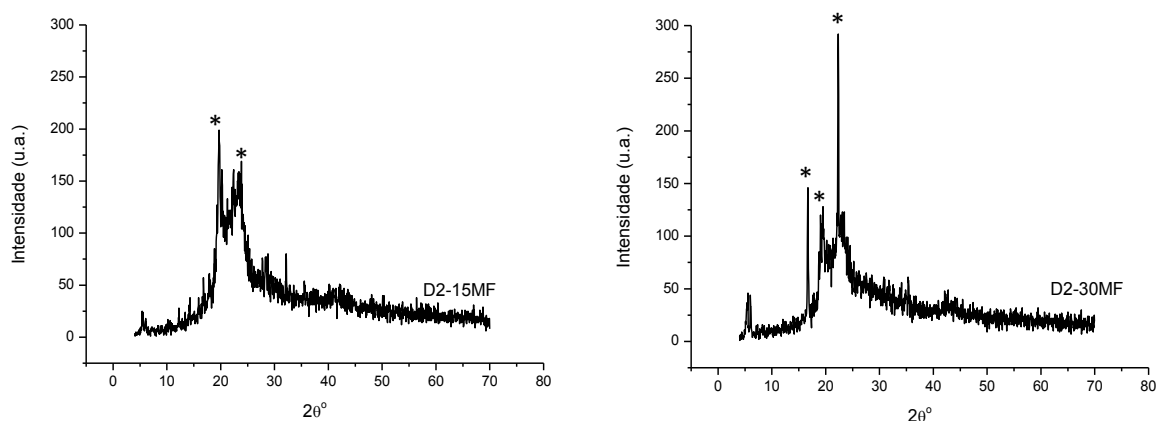
Na difração de raios X, figura 29, observa-se a alta cristalinidade do ibuprofeno, com presença de inúmeros picos entre 4 e 30° (GAREKANI *et al.* 2001), em particular, picos intensos podem ser observados em 6,15 °; 12,30 °; 16,83 °; 18,81 °; 20,22 ° e 22,40°, sendo os picos em 16° e 22° utilizados para identificação do ibuprofeno nas MLS e nas respectivas misturas físicas.

A FSH apresenta 3 picos característicos em 20,36°, 22,22° e 23, 23°. Enquanto o AE mostra picos intensos e característicos em 20,74°, 21,87° e 24,87°.

O difratograma do MEG apresentou 2 picos de difração bem definidos em em 19,50° e 23,55°, que de acordo com a literatura (YAJIMA *et al.*, 2002) são característicos da estrutura cristalina do seu polimorfo β.

O difratograma da mistura física nas mesmas proporções dos componentes das MLS D2-15 (D2-15 MF), figura 30, apresentou pico 22,44°, característico do ibuprofeno e picos em 19,70° e 23,89°, característicos da forma β do MEG. A mistura física nas mesmas proporções dos componentes das MLS D2-30 (D2-30 MF), figura 30, apresentou picos intensos em 16,78 ° 22,44°, característicos do ibuprofeno, e picos em 19,70° e 23,89°, característicos da forma β do MEG. Observa-se a maior cristalinidade da mistura física correspondente às MLS D2-30, provavelmente devido à maior concentração de ibuprofeno na mistura.

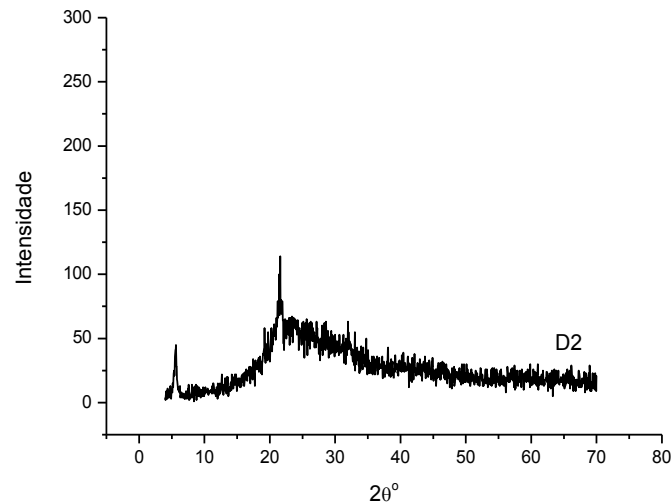
Figura 30 - Difratogramas das misturas físicas nas mesmas proporções dos componentes das MLS D2-15 e D2-30.



No difratograma das MLS de FSH e MEG sem fármaco, D2, (figura 31) é possível observar picos em 21,52°, característicos do polimorfo α do MEG,

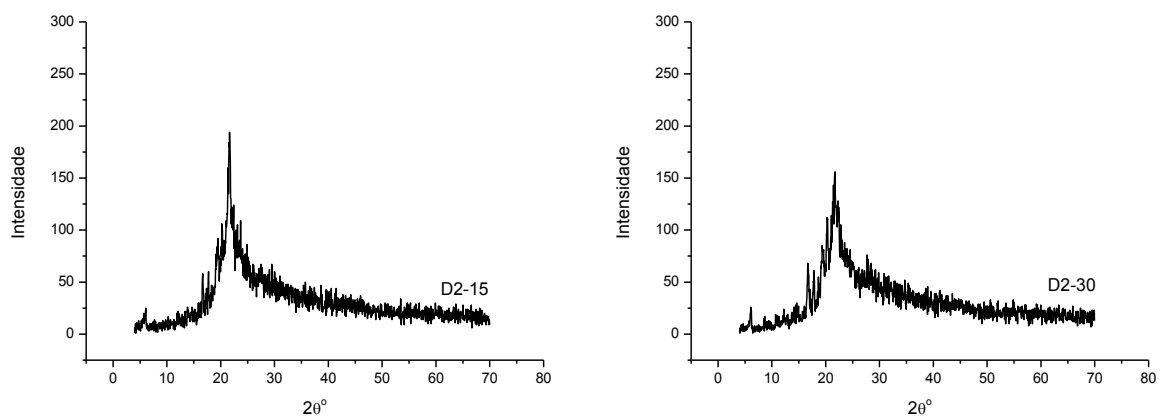
corroborando os dados de DSC que o processo de obtenção das micropartículas favorece a obtenção de sistemas menos cristalinos.

Figura 31 - Difratomogramas das MLS sem fármaco D2



A figura 32 apresenta os difratogramas das MLS D2-15 e D2-30. As MLS D2-15 apresentam pico em 16,61°, característico do ibuprofeno e pico em 21,64, característico do polimorfo α do MEG. Já as MLS D2-30 apresentaram pico em 16,78, referente ao ibuprofeno e pico em 21,77, referente ao polimorfo α do MEG. Assim, é possível observar que houve uma redução da cristalinidade dos componentes em relação às suas respectivas misturas físicas.

Figura 32 - Difratomogramas das MLS D2-15 e D2-30.



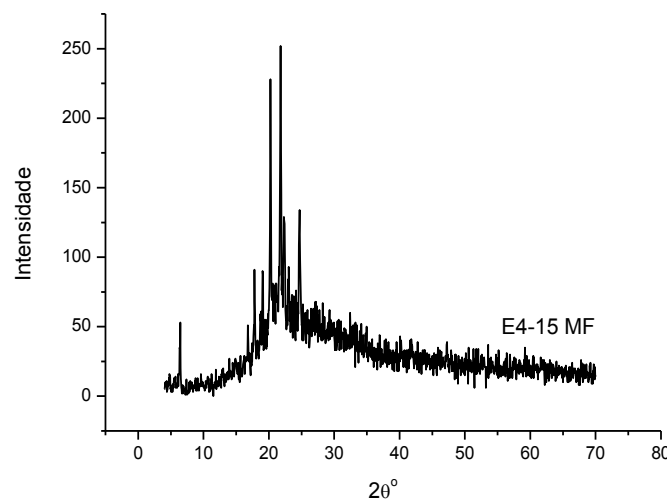
Os dados da difração de raios-x corroboram, juntamente com os resultados obtidos da DSC, a hipótese de mudanças quanto a cristalinidade dos materiais em função do método de obtenção das MLS por spray dryer.

Considerando que é possível observar picos de cristalinidade do ibuprofeno nos difratogramas das MLS e que não é possível observar eventos endotérmicos de fusão do fármaco no DSC é possível que o fármaco esteja disperso ou dissolvido na matriz lipídica.

A seguir, estão os difratogramas da mistura física nas mesmas proporções dos componentes das MLS e das MLS referentes às formulações contendo FSH e AE.

De acordo com a figura 33, a mistura física nas mesmas proporções dos componentes das MLS E4-15 apresenta vários picos difratométricos, $6,59^\circ$, $17,70^\circ$, $18,71^\circ$, $20,26^\circ$, $21,72^\circ$ e $24,49^\circ$, possivelmente referentes ao IBU, FSH e AE.

Figura 33 - Difratograma da mistura física nas mesmas proporções dos componentes das MLS E4-15

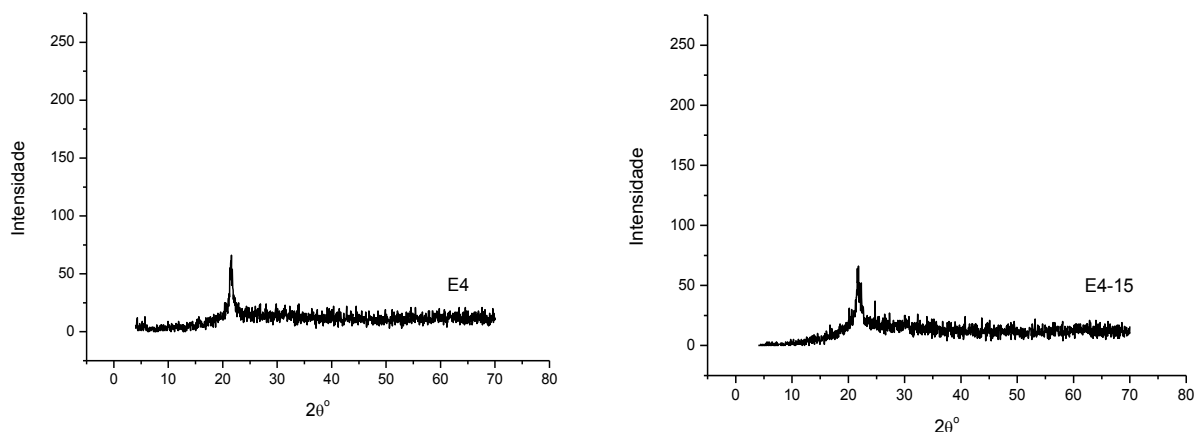


A figura 34 mostra o difratograma das micropartículas de FSH e AE sem fármaco (E4). Observa-se que a micropartícula obtida apresenta pico em $21,51^\circ$, sendo pouco cristalina.

Na difração de Raios-X das micropartículas de FSH e AE, adicionadas de 15% de ibuprofeno (E4-15), figura 34, observa-se que houve uma alteração significativa no sistema, com redução da cristalinidade da micropartícula em relação

à sua respectiva mistura física, sugerindo uma redução da cristalinidade do sistema e função da técnica de obtenção por spray dryer.

Figura 34 - Difratoograma das MLS E4 e E4-15.



Os dados da difração de raios-X corroboram, juntamente com os resultados obtidos da DSC, a hipótese das mudanças das propriedades físicas do material em função do método de obtenção das MLS por spray dryer.

4.2.5 Análise quantitativa do Ibuprofeno nas MLS

A partir da curva padrão obtida (item 4.4.2), foram determinadas as concentrações médias das amostras e as respectivas eficiências de encapsulação das micropartículas contendo ibuprofeno (tabela 5).

Tabela 5 – Eficiência de encapsulação do ibuprofeno nas micropartículas

Amostra	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração analítica (µg/mL) ± DP	Eficiência de encapsulação (%) ± DP
D2-15	294,00	267,04 ± 2,68	90,82 ± 0,9
D2-30	300,46	267,50 ± 0,38	89,03 ± 0,12
E4-15	300,26	288,93 ± 0,30	96,23 ± 0,10

4.2.6. Avaliação Solubilidade do fármaco em tampão fosfato 0,05M pH 7.2

A determinação da solubilidade do fármaco no meio é um parâmetro importante para o estudo de liberação *in vitro*, uma vez que as condições *sink* devem ser mimetizadas.

A solubilidade encontrada para o ibuprofeno em tampão fosfato 0,05M pH 7.2 foi de 3,586 mg/mL. Tal estudo foi realizado em triplicata a partir da respectiva curva analítica construída e validada nas mesmas condições do ensaio (item 4.4.2).

4.3 Estudo de liberação

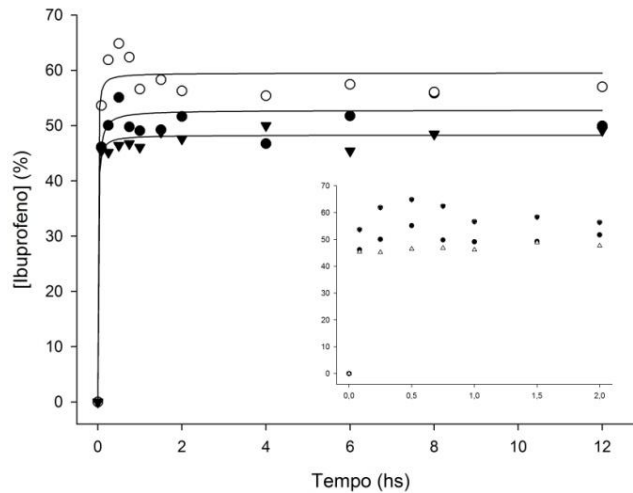
O estudo do perfil de liberação *in vitro* é uma etapa importante na caracterização de novos sistemas de liberação de fármacos, uma vez que ela permite avaliar comparativamente os parâmetros tecnológicos em relação às formulações. Dessa forma, espera-se que os excipientes mais favoráveis forneçam uma distribuição homogênea do fármaco no interior da matriz e, conseqüentemente, uma liberação com baixa flutuação de valores em relação ao tempo.

O perfil de liberação de fármacos a partir de MLS está diretamente relacionado com o perfil de distribuição do fármaco no ambiente restrito da matriz hidrofóbica da micropartícula e, portanto, diretamente dependente da semelhança das propriedades físico-químicas de ambos, fármaco e matriz hidrofóbica.

O processo de liberação de fármacos a partir de MLS e NLS estruturadas com excipientes entumescíveis pode ocorrer por difusão do fármaco do interior para o exterior da matriz hidrofóbica. Entretanto, a intensidade da interação fármaco-lipídio e as propriedades físico-químicas da micropartícula podem influenciar diretamente o perfil e na velocidade de liberação do fármaco (KÜCHLER *et al.*, 2010).

O perfil de liberação do ibuprofeno a partir das diferentes composições das MLS está apresentado na Figura 35.

Figura 35 - Perfil de liberação do ibuprofeno nas MLS de FSH:MEG com 30% de Ibuprofeno ; nas MLS de FSH:MEG com 15% de Ibuprofeno e \blacktriangledown e nas MLS de FSH:AE com 15% de Ibuprofeno \bullet .



Os resultados obtidos mostram um perfil de liberação com saída rápida do ibuprofeno nos tempos iniciais, (30 minutos), seguida de liberação muito lenta nos tempos subsequentes. Verifica-se que o aumento da proporção de fármaco nas micropartículas favoreceu a liberação *in vitro*. Por outro lado, comparando-se a liberação das micropartículas adicionadas de 15% de ibuprofeno, verifica-se que a substituição da matriz lipídica de monoestearato de glicerila por álcool estearílico provocou uma inibição da liberação, provavelmente pelo aumento da interação do fármaco com a matriz lipídica ou pelo aumento de microviscosidade local da micropartícula organizada.

Esse fenômeno de liberação rápida, nos tempos iniciais, pode estar relacionado com uma distribuição preferencial do ibuprofeno na região superficial das micropartículas. Entretanto, os resultados obtidos através das análises de DSC e de difração de raios-X sugerem que o fármaco esteja homogeneamente disperso ou dissolvido na matriz lipídica.

Outro parâmetro que poderia estar contribuindo para a obtenção desse perfil de liberação é a metodologia de secagem por atomização, a qual poderia modificar a característica cristalina tanto do fármaco quanto dos materiais estruturais das micropartículas, produzindo um sistemas menos cristalino. É bastante conhecido na literatura que as formas amorfas de fármacos favorecem a solubilidade e a absorção, em decorrência da maior atividade termodinâmica (CORRIGAN, 1996).

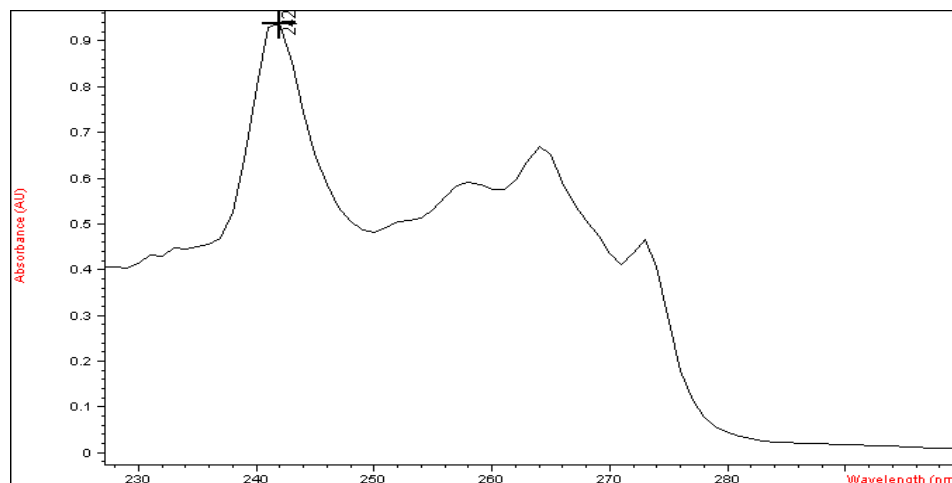
4.4 Validação dos métodos analíticos

4.4.1 Validação de metodologia analítica para quantificação do Ibuprofeno em clorofórmio por espectrofotometria de UV-Vis.

4.4.1.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção (λ_{\max}) do Ibuprofeno.

A Figura 35 mostra o espectro de absorção do ibuprofeno na região do UV-Vis em clorofórmio com o comprimento de absorção máxima em 242 nm.

Figura 36 - Espectro de absorção do ibuprofeno na região do UV-Vis em clorofórmio.

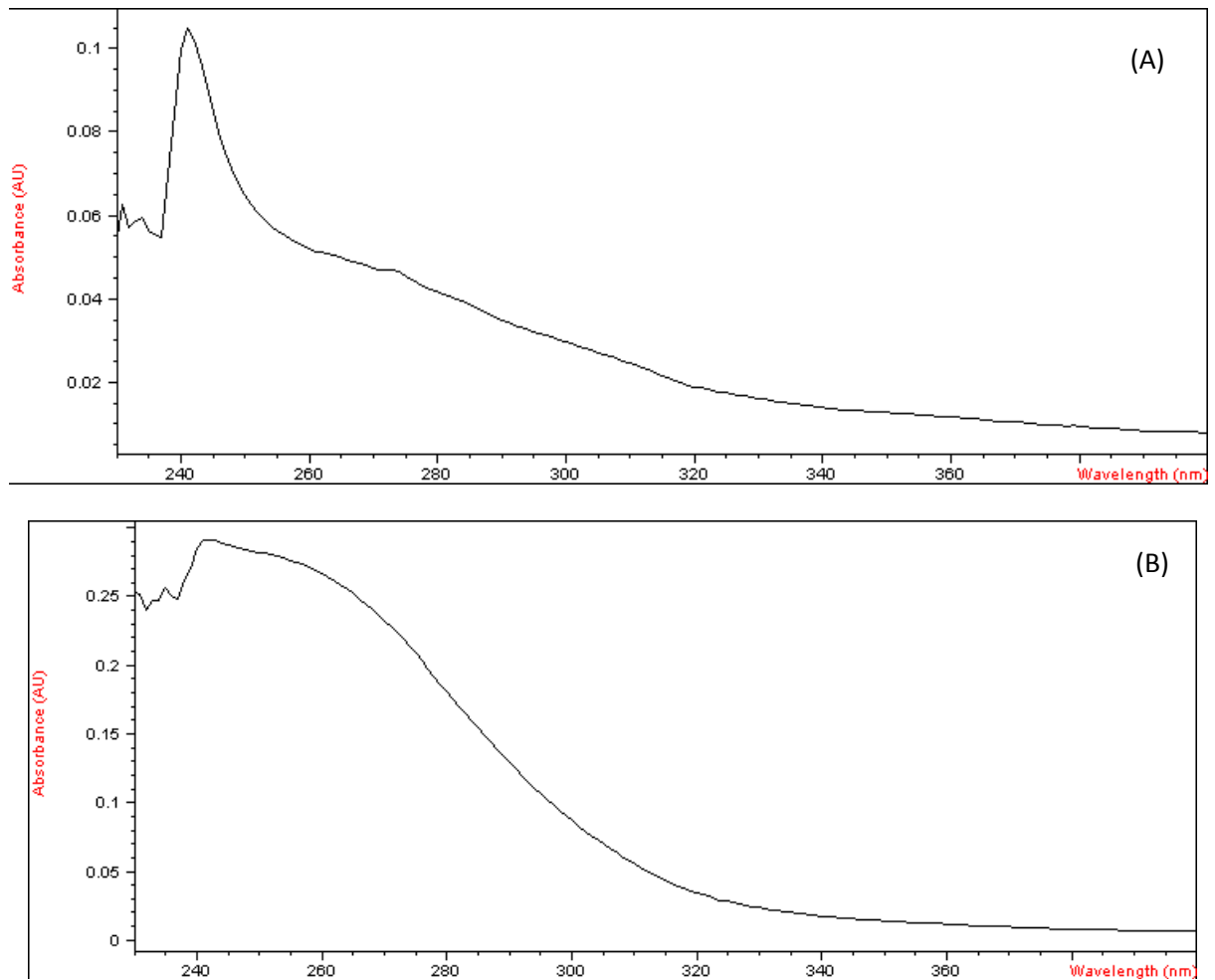


4.4.1.2 Especificidade e Seletividade

A especificidade e a seletividade avaliam a capacidade do método em quantificar o fármaco na presença de possíveis interferentes e pode ser determinada pela análise de amostras contendo possíveis interferentes que compõem o sistema (ANVISA, 2003; USP, 2011).

A figura 36 mostra os espectros de absorção na região de UV-Vis das micropartículas lipídicas sólidas D2 e E4 em clorofórmio.

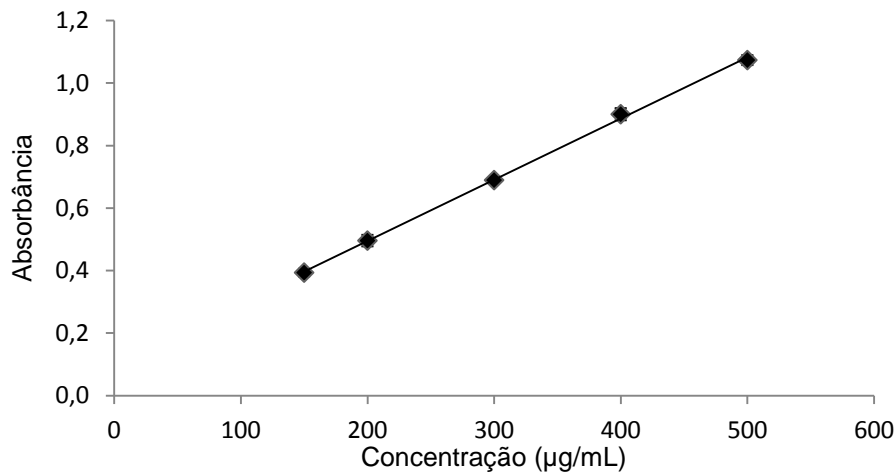
Figura 37 - Espectros de absorção na região de UV-Vis de MLS (A) D2 e (B) E4 em clorofórmio.



4.4.1.3 Linearidade

A curva analítica da absorbância em função da concentração de ibuprofeno (Figura 37) foi obtida no comprimento de onda máxima de absorção do fármaco a partir da média dos valores das absorbâncias para cada concentração.

Figura 38 - Curva analítica da absorbância em função da concentração de ibuprofeno em clorofórmio



Os dados obtidos a partir da regressão linear da curva analítica estão representados na tabela 6.

Tabela 6 - Dados da curva analítica obtida clorofórmio

Parâmetros	Valores
Faixa de linearidade (µg/mL)	150 a 500
Coefficiente angular	0,002
Intercepto	0,1035
Coefficiente de correlação	0,9991

4.4.1.4 Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis, quanto à repetibilidade (precisão intra-corrída) e quanto à precisão intermediária (precisão inter-corrída). Enquanto a repetibilidade avalia a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação, a precisão intermediária avalia a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2011).

As Tabelas 7 e 8 mostram os resultados obtidos para o teste de repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente.

Tabela 7 - Resultados obtidos para o teste de repetibilidade

Meio	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Abs média	DP	CV%
Clorofórmio	150	0,393	0,003	0,647
	300	0,684	0,007	1,029
	500	1,076	0,003	0,257

Tabela 8 - Resultados obtidos para o teste de precisão intermediária

Meio	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Abs média	DP	CV%
Clorofórmio	150	0,039	0,013	3,272
	300	0,689	0,008	1,156
	500	1,074	0,017	1,579

De acordo com os resultados, o método proposto é preciso uma vez que os coeficientes de variação obtidos, tanto para o teste de repetibilidade quanto para o teste de precisão intermediária, para as diferentes concentrações foram menores que 5%.

4.4.1.5 Exatidão

Os valores obtidos no teste de exatidão (Tabela 9) demonstram que a metodologia desenvolvida é adequada para a quantificação de ibuprofeno.

Tabela 9 - Resultados obtidos para o teste de exatidão

Meio	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração média experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (%)
Clorofórmio	150	145,99	97,33
	300	293,54	97,85
	500	485,96	97,19

4.4.1.6 Limite de detecção e limite de quantificação

Os resultados obtidos pela análise do LD e LQ (Tabela 10) demonstraram que o método desenvolvido é capaz de detectar e quantificar baixas concentrações do fármaco clorofórmio.

Tabela 10 - Dados da curva analítica obtida em clorofórmio

Parâmetros	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
Limite de detecção	20,22
Limite de quantificação	67,39

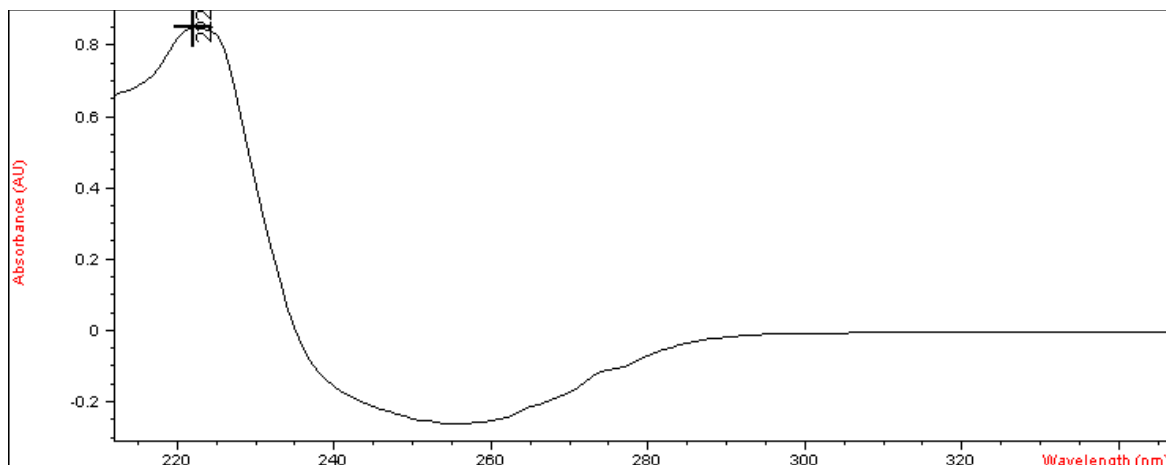
4.4.2 Validação de metodologia analítica para quantificação do Ibuprofeno em tampão fosfato 0,05 M, pH 7.2 por espectrofotometria de UV-Vis.

A validação da metodologia analítica visa avaliar se os métodos empregados para quantificação do fármaco liberado pelas micropartículas são adequados e confiáveis.

4.4.2.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção (λ_{max}) do Ibuprofeno

A Figura 38 mostra o espectro de absorção na região do UV-Vis de uma solução de 20 $\mu\text{g/ml}$ de ibuprofeno em tampão fosfato 0,05 M, pH 7.2, cujo comprimento de onda de máxima absorção é em 222 nm.

Figura 39 - Espectro de absorção na região do UV-Vis de uma solução de 20 $\mu\text{g/ml}$ de ibuprofeno em tampão fosfato 0,05M, pH 7.2.



4.4.2.2 Especificidade e Seletividade

A especificidade e a seletividade avaliam a capacidade do método em quantificar o fármaco na presença de possíveis interferentes e pode ser determinada

pela análise de amostras contendo possíveis interferentes que compõem o sistema (ANVISA, 2003; USP, 2011b).

As figuras 39 e 40 mostram os espectros de absorção na região de UV-Vis das micropartículas lipídicas sólidas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e monoestearato de glicerila (D2) e de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e álcool estearílico (E4) em tampão fosfato 0,05M, pH7.2.

Figura 40 - Espectro de absorção na região de UV-Vis de micropartículas lipídicas sólidas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e monoestearato de glicerila (D2) em tampão fosfato 0,05 M, pH7,2.

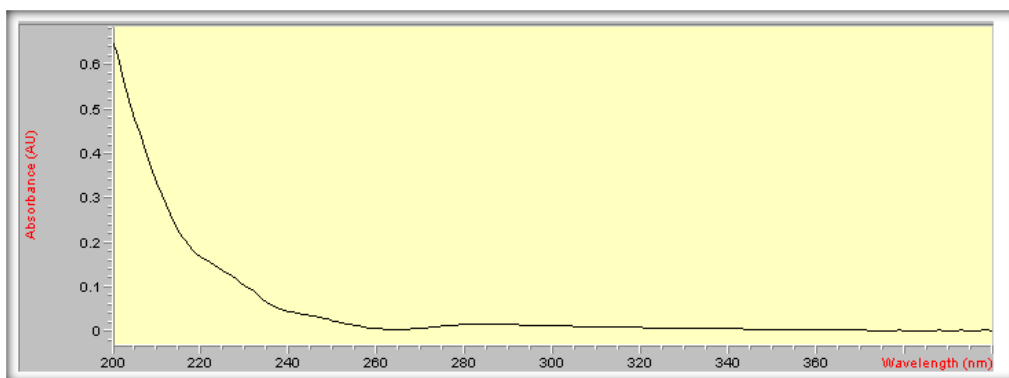
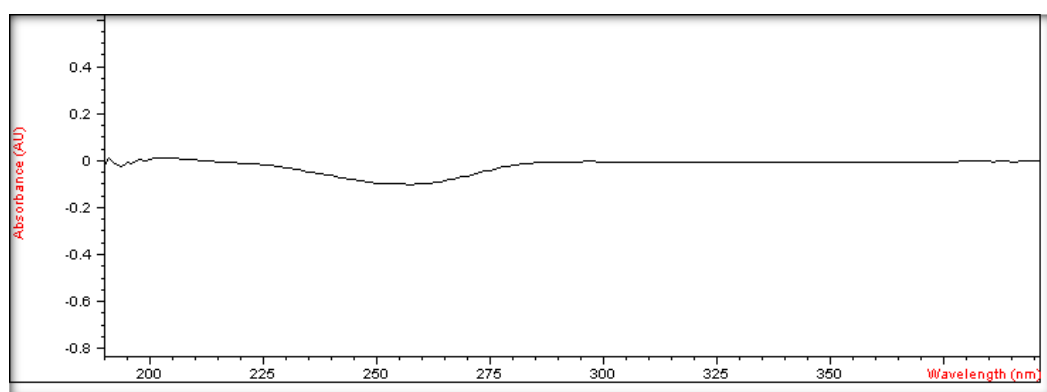


Figura 41 - Espectro de absorção na região de UV-Vis de micropartículas lipídicas sólidas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e álcool estearílico (E4) em tampão fosfato 0,05 M, pH7,2.



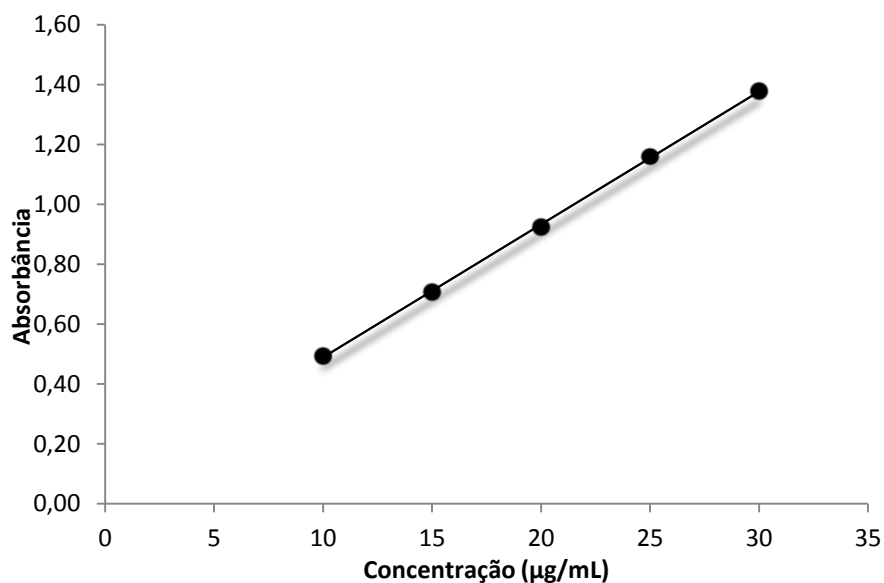
Apesar das micropartículas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e monoestearato de glicerila (D2) absorverem no UV, elas foram utilizadas como branco no ensaio de liberação, de maneira a reduzir qualquer interação.

4.4.2.3 Linearidade

A linearidade de um método analítico é definida como a sua capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um dado intervalo (ANVISA, 2003; ICH, 2005; USP, 2011).

A curva analítica da absorbância em função da concentração de ibuprofeno (Figura 41) foi obtida no comprimento de onda máxima de absorção do fármaco a partir da média dos valores das absorbâncias para cada concentração.

Figura 42 - Curva analítica da absorbância em função da concentração de ibuprofeno em tampão fosfato 0,05 M, pH 7.2.



Os dados obtidos a partir da regressão linear da curva analítica estão representados na tabela 11.

Tabela 11- Dados da curva analítica obtida em tampão fosfato 0,05M, pH 7.2.

Parâmetros	Valores
Faixa de linearidade (µg/mL)	10 a 30
Coefficiente angular	0,0444
Intercepto	0,0453
Coefficiente de correlação	0,9997

4.4.2.4 Precisão

De forma semelhante à validação de metodologia analítica para quantificação de ibuprofeno em clorofórmio (ver sessão 5.3.1.4). A precisão do método de análise quantitativa do ibuprofeno em tampão fosfato 0,05M pH 7.2 foi avaliada quanto à repetibilidade (precisão intra-corrída) e quanto à precisão intermediária (precisão inter-corrída).

As tabelas 12 e 13 mostram os resultados obtidos para o teste de repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente.

Tabela 12 - Resultados obtidos para o teste de repetibilidade

Meio	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Abs média	DP	CV%
Tampão fosfato 0,05 M pH 7.2	10	0,49653	0,0001	0,02
	20	0,92461	0,0001	0,02
	30	1,37613	0,0003	0,02

Tabela 13 - Resultados obtidos para o teste de precisão intermediária

Meio	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Abs média	DP	CV%
Tampão fosfato 0,05 M pH 7.2	10	0,4945	0,0015	0,29
	20	0,9248	0,0010	0,11
	30	1,3788	0,0022	0,16

Uma vez que os coeficientes de variação obtidos para as diferentes concentrações analisadas foram menores que 5%, conforme preconizado pela ANVISA (2003) conclui-se que o método proposto é preciso.

4.4.2.5 Exatidão

A exatidão avalia a proximidade dos resultados obtidos pelo método analítico em relação ao valor verdadeiro, sendo aceitáveis variações entre 80 – 120% (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Os valores obtidos no teste de exatidão (Tabela 14) demonstram que a metodologia desenvolvida é adequada para a quantificação de ibuprofeno.

Tabela 14 - Resultados obtidos para o teste de exatidão

Meio	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração média experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (%)
Tampão fosfato 0,05 M pH 7.2	10	10,11	101,16
	20	19,81	99,04
	30	30,03	100,11

4.4.2.6 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor concentração de analito que pode ser detectada por um dado método, mas não necessariamente quantificada com exatidão. Já o limite de quantificação (LQ) refere-se a menor concentração de analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis.

Os resultados obtidos pela análise do LD e LQ (Tabela 15) demonstraram que o método desenvolvido é capaz de detectar e quantificar baixas concentrações do fármaco em tampão fosfato 0,05M, pH7.2.

Tabela 15 - Dados da curva analítica obtida em tampão fosfato 0,05M, pH7.2.

Parâmetros	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
Limite de detecção	0,49
Limite de quantificação	1,62

As metodologias desenvolvidas e validadas para análise quantitativa do fármaco se mostraram adequadas, garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Através dos estudos realizados, concluímos que a obtenção de Micropartículas Lipídicas Sólidas diretamente pelo método de spray drying não só é possível, como também, apresenta várias vantagens frente aos métodos de obtenção convencionais, tais como, uma única etapa de produção, tempo de obtenção reduzido, alta eficiência de encapsulação e obtenção das MLS na forma de pó, o que pressupõe estabilidade físico-química e microbiológica superior.

As metodologias desenvolvidas e validadas para análise quantitativa do fármaco se mostraram adequadas, garantindo a confiabilidade dos resultados de eficiência de encapsulação e do estudo de liberação.

Apesar de haver escassa literatura que explique alguns fenômenos descritos nos estudos de liberação, os resultados da caracterização, amparados pela literatura, convergem para as mesmas conclusões: a obtenção de MLS com matrizes homogêneas e cujos perfis de liberação apresentam um efeito burst inicial seguido por uma liberação mais sustentada do fármaco, podendo ser interessante tanto em tratamentos de pós-operatórios como em tratamentos de outras doenças vitreoretinianas.

REFERÊNCIAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, 2003.
- ATTAMA, A. A.; REICHL, S.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Diclofenac sodium delivery to the eye: in vitro evaluation of novel solid lipid nanoparticle formulation using human cornea construct. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 355, n. 1-2, p. 307-13, 2008.
- ATTAMA, A. A.; REICHL, S.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Sustained release and permeation of timolol from surface-modified solid lipid nanoparticles through bioengineered human cornea. *Current Eye Research*, v. 34, n. 8, p. 698-705, 2009.
- BASARAN, E.; DEMIREL, M.; SIRMAGÜL, B.; YAZAN, Y. Cyclosporine-A incorporated cationic solid lipid nanoparticles for ocular delivery. *Journal of Microencapsulation*, v. 27, n.1, p. 37-47, 2010.
- BOCHOT, A.; FATTAL, E. Liposomes for intravitreal drug delivery: A state of the art. *Journal of Controlled Release*, v. 20, n. 16, p. 628-634, 2012.
- BUNJES, H. Structural of solid lipid nanoparticle based drug delivery systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 16, n.5, p.405-411, 2011.
- CARDILLO, J. A.; PAGANELLI, F.; MELO JR., L. A. S.; SILVA JR., A. A.; PIZZOLITTO, A. C.; OLIVEIRA, A. G. Subconjunctival Delivery of Antibiotics in a Controlled-Release System: A Novel Anti-infective Prophylaxis Approach for Cataract Surgery. *Arch Ophthalmol*, v. 128, n. 1, p. 81-87, 2010.
- CARDILLO, J. A.; SOUZA-FILHO, A. A.; OLIVEIRA, A. G. Intravitreal bioerudível sustained-release triamcinolone microspheres system (RETAAC). Preliminary report of its potential usefulness for the treatment of diabetic macular edema. *Arch Soc Esp Oftalmol*, v. 81, p. 675-682, 2006.
- CAVALLI, R.; GASCO, M. R.; CHETONI, P. BURGALASSI, S.; SAETTONI, M. F. Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 15, n. 1-2, p. 241-5, 2002.
- CHASTAIN, J. E. General Considerations in Ocular Drug Delivery . In: MITRA, A.K. *Ophthalmic Drug Delivery Systems*. 2. ed. rev. and expand. Kansas : Marcel Dekker Inc., 2003. p. 335-354.
- CHEN, J.; CHENG, D.; LI, J.; WANG, Y.; GUO, J-X.; CHEN, Z-P.; CAI, B-C. YANG, T. Influence of lipid composition on the phase transition temperature of liposomes composed of both DPPC and HSPC. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 39, n.2, p. 197-204, 2013.
- CHIME, S. A.; ATTAMA, A. A.; BUILDERS, P. F.; ONUNKWO, G. C. Sustained-release diclofenac potassium-loaded solid lipid microparticle based on solidified reverse micellar solution: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Microencapsulation*, v. 30, p. 335-345, 2013.

- CORREA, M. A.; SCARPA, M. V.; FRANZINI, M. C.; OLIVEIRA, A.G. On the incorporation of the non-steroidal anti-inflammatory naproxen into cationic O/W microemulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 43, p. 108–114, 2005.
- CRAIG, D. Q. M. Pharmaceutical Applications of DSC. In: CRAIG, D. Q. M.; READING, M. Thermal analysis of pharmaceuticals. New York: Taylor & Francis Group, 2007, p. 87-91.
- DALPIAZ, A.; MEZZENA, M.; SCATTURIN, A.; SCALIA, S. Solid lipid microparticles for the stability enhancement of the polar drug N6-cyclopentyladenosine. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 355, p. 81-86, 2008
- DIEBOLD, Y.; CALONGE, M. Applications of nanoparticles in ophthalmology. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 29, n. 6, p. 596-609, 2010.
- ELDEM, T.; SPEISER, P.; HINCAL, A. Optimization of spray-dried and congealed electron microscopy. *Pharm. Res.*, v. 8, p. 47–54, 1991.
- FORMARIZ, T. P.; SARMENTO, V. H. V.; SILVA-JUNIOR, A. A.; SCARPA, M. V.; SANTILLI, C. V. ; OLIVEIRA, A. G. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 51, p. 54–61, 2006.
- FRANZINI, A. M.; PESTANA, K. C.; MOLINA, E. F.; SCARPA, M. V.; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, A. G. Structural Properties Induced by the Composition of Biocompatible Phospholipid-Based Microemulsions and Amphotericin B Associations. *J. Biomed Nanotech.*, v. 8, n. 2, p. 350-359, 2012.
- GANDOLFO, F. G.; BOT, A.; FLÖTER, E. Phase diagram of mixtures of stearic acid and stearyl alcohol. *Thermochimica Acta* 404, p. 9-17, 2003.
- GAREKANI, H. A.; SADEGHI, F.; BADIIE, A.; MOSTAFA, S. A.; RAJABI-SIAHBOOMI, A. R. Crystal Habit Modifications of Ibuprofen and Their Physicomechanical Characteristics. *Drug development and Industrial Pharmacy*, v. 27, n. 9, p. 803-809, 2001.
- GASCO, M. R. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow distribution. US Patent N° 5250236, 1993.
- GAUDANA, R.; ANANTHULA, H. K.; PARENKY, A.; MITRA, A. K. Ocular Drug Delivery. *The AAPS Journal*, v. 12, n. 3, p.348-360, 2010.
- GAUDANA, R.; JWALA, J.; BODDU, S. H. S.; MITRA, A. K. Recent Perspectives in Ocular Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*, Stuttgart, v. 26, n. 5, p. 1197-1216, 2009.
- GEROSKI, D. H.; EDELHAUSER, H. F. Drug Delivery for Posterior Segment Eye Disease. *IOVS*, v. 41, n. 5, p. 961-964, 2000.
- GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, v. 40, p. 1107–1121, 2007.

- GÖKÇE, E. H.; SANDRI, G.; EGRILMEZ, S.; BONFERONI, M. C.; GÜNERI, T.; CARAMELLA, C. Cyclosporine a-loaded solid lipid nanoparticles: ocular tolerance and in vivo drug release in rabbit eyes. *Current eye research*, v. 34, n. 11, p. 996-1003, 2009
- GOODMAN, L.S; GILMAN, A. *As bases farmacológicas da terapêutica*. [tradução de Carlos Henrique de Araújo et al]. 11. ed. Porto Alegre: AMGH, 2010.
- HERRERO-VANRELL, R.; REFOJO, F. M. Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery. *Adv. Dug Deliv. Rev.*, v. 52, n. 1, p. 5-16, 2001.
- HIRONAKA, K; INOKUCHI, Y.; TOZUKA; Y.; SHIMAZAWA, M.; HARA, H.; TAKEUCHI, H. Design and evaluation of a liposomal delivery system targeting the posterior segment of the eye. *Journal of Controlled Release*, v. 136, p. 247–253, 2009.
- ICH. International Conference on Harmonisation. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*, 2005.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. *Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008 - revisão 04*, 2011.
- KALAM, M. A.; SULTANA, Y.; ALI, A.; AQIL, M.; MISHRA, A. K.; CHUTTANI, K. Preparation, characterization, and evaluation of gatifloxacin loaded solid lipid nanoparticles as colloidal ocular drug delivery system. *Journal of Drug Targeting*, v. 18, n. 3, p. 191-204, 2010.
- KALAM, M. A.; SULTTANA, Y.; ALI, A.; AQIL, M.; MISHRA, A. K.; CHUTTANI, K.; ALJUFFALI, I. A.; ALSHAMSAN, A. Part II: Enhancement of transcorneal delivery of gatifloxacin by solid lipid nanoparticles in comparison to commercial aqueous eye drops. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 2012.
- KAMBLE, M. S.; VAIDYA, K. K.; BHOSALE, A. V.; CHAUDHARI,P. D. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers – An overview. *International Journal of Pharmaceutical, chemical and biological sciences*, v.2, n.4, p. 681-691, 2012.
- LI, R.; JIANG, S.; LIU, D.; BI, X.; WANG, F.; ZHANG, Q.; XU, Q. A potential new therapeutic system for glaucoma: solid lipid nanoparticles containing methazolamide. *Journal of Microencapsulation*, v. 28, n.2, p. 134-41, 2011.
- LI, Y-Z; SUN, X.; GONG, T.; LIU, J.; ZUO, J.;ZHANG, Z-R. Inhalable Microparticles as Carriers for Pulmonary Delivery of Thymopentin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles. *Pharm Res*, v. 27, p. 1977-1986, 2010.
- LIU, Z.; ZHANG, X.;WU, H.; LI, J.; SHU, L.; LIU, R.;LI, L.; LI, N.Preparation and evaluation of solid lipid nanoparticles of baicalin for ocular drug delivery system in vitro and in vivo. *Drug Dev Ind Pharm*, v. 37, n. 4, p. 475-81, 2011.
- MARIANECCI, C.; RINALDI, F.; ESPOSITO, S.; MARZIO, L.; CARAFA, M. Niosomes Encapsulating Ibuprofen–Cyclodextrin Complexes: Preparation and Characterization. *Current Drug Targets*, v. 14, p. 1070-1078, 2013.

- MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 47, p. 165-196, 2001.
- MEZZENA, M.; SCALIA, S.; YOUNG, P. M.; TRAINI, D. Solid Lipid Budesonide Microparticles for Controlled Release Inhalation Therapy. *The AAPS Journal*, v. 11, n. 4, 2009.
- MILTENBURG, J. C. V.; OONK, A. J. Heat Capacities and Derived Thermodynamic Functions of 1-Octadecanol, 1-Nonadecanol, 1-Eicosanol, and 1-Docosanol between 10 K and 370 K. *Journal of Chem Eng. Data*, v. 46, p. 90-97, 2001.
- MOHAMED, R. A.; ABASS, H. A.; ATTIA, M. A.; HEIKAL, O. A. Formulation and evaluation of metoclopramide solid lipid nanoparticles for rectal suppository. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 65, p. 1607-1621, 2013.
- MULLER, R. H., MADER, K., GOHLA, S., Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery- a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* v. 50, n. 1, p.161-177, 2000.
- MÜLLER, R. H.; RUNGE, S. A.; RAVELLI, V.; THÜNEMANN, A. F.; MEHNERT, W.; SOUTO, E. B. Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics*, v. 68, p. 535-544, 2008.
- MÜLLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations *Advanced drug delivery reviews*, v. 54, p. S231-S155, 2002
- OLIVEIRA, A. G., SCARPA, M. V., CORREA, M. A. ; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Quim. Nova*, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.
- OLIVEIRA, A. G.; CHIAVACCI, L. A.; SCARPA, M. V.; EGITO, E. S. T. Microemulsions: Physico-chemical approaches on the system for pharmaceutical applications. In: Songjun Li (Ed.). *Current Focus on Colloidal and Surfaces*, Kerala: Transworld Research Network, 2009, 379p.
- PAGANELLI, F.; CARDILLO, J. A.; MELO JR., L. A. S.; LUCENA, D. R.; SILVA JR., A. A.; OLIVEIRA, A. G.; HÖFLING-LIMA, A. L.; NGUYEN, Q. D.; KUPPERMANN, B. D.; BELFORT JR, R. A. Single Intraoperative Sub-Tenon's Capsule Injection of Triamcinolone and Ciprofloxacin in a Controlled-Release System for Cataract Surgery. *IOVS*, v. 50, n. 7, p. 3041-3047, 2009.
- PAGANELLI, F.; CARDILLO, J. A.; MELO JR., L. A. S.; OLIVEIRA, A. G. SKAF, M.; COSTA, R. A. A. Single Intraoperative Sub-Tenon's Capsule Triamcinolone Acetonide Injection for the Treatment of Post-Cataract Surgery Inflammation. *Ophthalmology*, v. 111, n. 11, p. 2102-2108, 2004.
- PATEL, R. P.; PATEL, M. P.; SUTHAR, A. M. Spray drying technology: an overview. *Indian Journal of Science and Technology*, v. 2, n.10, 2009.

- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. *Introdução à espectroscopia*. [Tradução de Pedro Barros]. 4 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- PESTANA, K. C.; FORMARIZ, T. P.; FRANZINI, C. M.; SARMENTO, V.H.V.; CHIAVACCI, L. A.; SCARPA, M. V.; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, A. G. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 66, p. 253–259, 2008.
- SAHOO, S. K.; DILNAWAZ, F.; KRISHNAKUMAR, S. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug Discovery Today*, v. 13, n. 3-4, p. 144-151, 2008.
- SALJOUGHIAN, N.; ZAHEDIFARD, F.; DOROUD, D.; DOUSTDARI, F.; VASEI, M.; PAPADOPOULOU, B.; RAFATI, S. Cationic solid-lipid nanoparticles are as efficient as electroporation in DNA vaccination against visceral leishmaniasis in mice. *Parasite immunology*, v. 35, p. 397-408, 2013.
- SANDRI, G.; BONFERONI, M.C.; GÖKÇE, E.H.; FERRARI, F.; ROSSI, S.; PATRINI, M.; CAMELLA, C. Chitosan-associated SLN: in vitro and ex vivo characterization of cyclosporine A loaded ophthalmic systems. *Journal of Microencapsulation*, v. 27, n. 8, p. 735-46, 2010.
- SHARMA, J.; BARR, S. M.; GENG, Y.; YUN, Y.; HIGGINS, R. Ibuprofen improves oxygen-induced retinopathy in a mouse model. *Current Eye Research*, v. 27, n.5, p. 309-314, 2003.
- SILVA, A. C.; GONZÁLEZ-MIRA, E.; GARCÍA, M. L.; EGEA, M. A.; FONSECA, J.; SILVA, R.; SANTOS, R.; SOUTO, E. B.; FERREIRA, D. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 86, p. 158-165, 2011.
- SILVA, L. F. C.; KASTEN, G.; CAMPOS, C. E. M.; CHINELATTO, A. L.; LEMOS-SENNA, E. Preparation and characterization of quercetin-loaded solid lipid microparticles for pulmonary delivery. *Powder Technology*, v. 2399, p. 183-192, 2013.
- SILVA-JUNIOR, A. A.; MATOS, J. R.; FORMARIZ, T. P.; ROSSANEZI, G.; SCARPA, M. V.; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, A. G. Thermal behavior and stability of biodegradable spray-dried microparticles containing triamcinolone. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 368, p. 45–55, 2009.
- SILVA-JUNIOR, A. A.; SCARPA, M. V.; PESTANA, K. C.; MERCURI, L. P.; MATOS, J. R.; OLIVEIRA, A. G. Thermal analysis of biodegradable microparticles containing ciprofloxacin hydrochloride obtained by spray drying technique. *Thermochimica Acta*, v. 467, p. 91–98, 2008.
- SOARES, S.; FONTE, P.; COSTA, A.; ANDRADE, J.; SEABRA, V.; FERREIRA, D.; REIS, S.; SARMENTO, B. Effect of freeze-drying, cryoprotectants and storage conditions on the stability of secondary structure of insulin-loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 456, p. 370–381, 2013.

SOUZA, S. M. B. ; OLIVEIRA JR; O. N.; SCARPA, . B, M. V., OLIVEIRA, A. G. Study of the diclofenac/phospholipid interactions with liposomes and monolayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 36, p. 13–17, 2004.

Terapeutic Systems Research Laboratories (TSRL inc.). Disponível em <<http://www.tsrlinc.com/>>. Acesso em 03 de out 2013.

THRIMAWITHANA, T. R.; YOUNG, S.; BUNT, C. R.; GREEN, C.; ALANY, R. G. Drug delivery to the posterior segment of the eye. *Drug Discovery Today*, v. 16, n. 5-6, p. 270- 277, 2011.

TONG, W.-Q.; WEN, H. Preformulation Aspects of Insoluble Compounds. In: LIU, R. (Ed.). *Water-Insoluble Drug Formulation*. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap. 4, p.61-90.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. *Eur J Pharm Biopharm.*, v. 53, n. 2, p. 203-208, 2002.

UAP. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 34–NF 29) *Chapter <1225> Validation of compendial procedures*, 2011.

VARSHOSAZ, J.; ESKANDARI, S.; TABBAKHIAN, M. Freeze-drying of nanostructure lipid carriers by different carbohydrate polymers used as cryoprotectants. *Carbohydrate Polymers*, v. 88, p.1157–1163, 2012.

WADHWA, S.; PALIWAL, R.; PALIWAL, S. R.; VYAS, S. P. Nanocarriers in Ocular Drug Delivery: An Update Review. *Current Pharmaceutical Design*, v.15, p. 2724-2750, 2009.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 1257-1272, 2004.

WOLSKA, E.; SZNITOWSKA, M. Technology of stable, prolonged-release eye-drops containing Cyclosporine A, distributed between lipid matrix and surface of the solid lipid microspheres (SLM). *International Journal of Pharmaceutics*, v. 441, p. 449–457, 2013.

YAJIMA, T.; ITAI, S.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Determination of Optimum Processing Temperature for Transformation of Glyceryl Monostearate¹. *Chem. Pharm. Bull*, v. 50, n. 11, p. 1430-1433, 2002.

YING, L.; TAHARA, K.; TAKEUCHI, H. Drug delivery to the ocular posterior segment using lipid emulsion via eye drop administration: Effect of emulsion formulations and surface modification. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 453 p. 329– 335, 2013.