



**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**

Campus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos



# **Obtenção e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas como sistema de transporte para ibuprofeno**

**ANA CLÁUDIA DA CUNHA DEPAOLI**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Virgínia Scarpa

Araraquara-SP

2013



**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**  
Campus de Araraquara  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas  
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos



## **Obtenção e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas como sistema de transporte para ibuprofeno**

**ANA CLÁUDIA DA CUNHA DEPAOLI**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Virgínia Costa Scarpa

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 de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara-SP  
2013

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**D419o**

Depaoli, Ana Cláudia da Cunha

Obtenção e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas como sistema de transporte para ibuprofeno / Ana Claudia da Cunha Depaoli. — Araraquara, 2014  
105 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Maria Virginia Costa Scarpa

1. Liberação controlada. 2. Nanopartícula lipídica sólida 3. Ibuprofeno. I. Scarpa, Maria Virginia Costa, orient. II. Título.

**CAPES: 40300005**

*De tudo ficaram três coisas:  
a certeza de que estava sempre começando,  
a certeza de que havia que seguir  
e a certeza de que seria interrompido antes de terminar  
Fazer da interrupção um caminho novo,  
Fazer da queda um passo de dança,  
Do medo uma escada,  
Do sonho uma ponte,  
Da busca um encontro...*"

*Fernando Sabino*

## *DEDICATÓRIA*

*Dedico este trabalho a Deus  
aos meus pais José Geraldo e Silvelena  
e a minha querida irmã Flaviane pelo grande amor, apoio, incentivo,  
carinho e ativa participação em todos os momentos da minha vida.  
Amo vocês!*

## ***AGRADECIMENTOS***

Primeiramente agradeço a Deus por me dar forças para superar as dificuldades e seguir o meu caminho e em cada superação que eu pudesse amadurecer.

**“As pessoas podem fazer seus planos, porém é o Senhor Deus quem dá a última palavra”**

*Provérbios 16.1*

Agradeço aos meus pais José Geraldo Depaoli e Silvelena da Cunha Depaoli, por compartilharem comigo minhas alegrias e tristezas, incentivando-me sempre a prosseguir. Apesar da distância e da saudade sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me animando. Não bastam palavras para expressar meus mais sinceros agradecimentos, portanto lhes ofereço essa vitória, tudo que tenho é devido a vocês.

**“Ainda que eu fale a língua dos homens e a língua dos anjos, sem amor, eu nada seria. Ainda que eu conheça todos os mistérios e toda a ciência se não tiver amor, nada serei”**

*1-Coríntios, 13*

A minha irmã Flaviane Isabel da Cunha Depaoli que sempre esteve presente em minha vida, desde a nossa infância. Agradeço o apoio, o carinho e a compreensão nos momentos difíceis da minha vida.

A toda minha família, em especial as minhas tias Ângela, Maria Aparecida, Rosa, Rosângela e Terezinha, ao meu primo Mateus Augusto, aos meus avôs Isabel (*in memorian*), João (*in memorian*), Geraldo (*in memorian*) e Regina. Agradeço pelo amor, carinho, apoio, força e pelas palavras sábias na hora das dúvidas e indecisões.

Aos meus amigos em especial a Adriana, Daiana Locatelli, Onés, Émilly, Camila Cassani e Mariana Libone que sempre me deram força para continuar e nunca desistir dos meus sonhos e objetivos e que apesar da distância sempre estavam ao meu lado me apoiando, e torcendo por mim. Além de serem sempre preocupados comigo, com certeza sem essa cumplicidade e carinho tudo seria mais difícil.

A minha querida orientadora Maria Virgínia Costa Scarpa por me receber de braços abertos, pela oportunidade concebida de realizar este trabalho com a senhora. Agradeço pela orientação, dedicação, confiança, paciência e aprendizado compartilhado. Simplesmente, muito obrigado por tudo!!!

**“Paciência e perseverança têm o efeito mágico de fazer as dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem.”**

*John Quincy Adams*

## ***AGRADECIMENTOS***

A técnica do nosso laboratório Fátima, pela receptividade, acolhimento, paciência nos ensinamentos e carinho em cuidar do nosso laboratório.

Aos meus colegas pesquisadores do laboratório Kamila Rotolo, Natália Ferri, Mirela Garcia e Márcia Vilchenski, obrigada pelo aprendizado, pelo trabalho em grupo, cumplicidade, pela companhia nas viagens de congressos, pelas risadas e convivência compartilhadas no laboratório.

A amiga de laboratório e faculdade Kamila Rotolo Mussarelli que sempre, me encorajou, estimulou, ajudou e foi presente, além de ter tido paciência e acreditado no meu potencial mesmo nos momentos mais difíceis. E também é companheira de moradia, agradeço a você por tornar a minha estadia em Araraquara menos cansativa e mais divertida. Obrigada por todo apoio, risadas, aprendizados compartilhado e convivência neste tempo todo. Sou eternamente grata à esta amizade, que será levada no meu coração!!!

Aos colegas do Controle Microbiológico, Andressa Figueiredo, Camila Tavares, Mariane Curbete, pelo conhecimento transmitido, além de se tornarem amigas pessoais e especiais em minha vida. Eliane, Flávia, Danilo, Carol, Josi, Lucas e Thaisa pelas conversas e auxílios com os equipamentos.

Aos colegas do laboratório de Ciências de Materiais Aplicado a Farmácia (CMAF), Juliana Mendes, Danila, Mariana Sato, Nathalia Rissi, em especial ao João Augusto e Eloísa pelas risadas, conversas e ajuda compartilhada.

Aos colegas da Farmacotécnica Vanessa Meyaguski, Karisa, Crisitane, Charlene Kill, Ana Luiza Ribeiro, que me ajudaram e esteve nos momentos de alegria e de desabafo. A Márcia Oyafuso, Fernanda Kolenyak, Leonardo, Lilian, Roberta, Andressa Fujimura, Fabíola, Gustavo pelas conversas, sugestões e auxílio. Tatiana Andreani de Portugal pela ajuda e estímulo inicial deste trabalho. Em fim, pela contribuição indispensável de cada um de vocês para a realização deste trabalho.

As amigas Natália Ferri, Charlene e Ana Luiza (Velma) por tanto me ajudarem nos momentos finais para a entrega desta dissertação.

Aos colegas de Araraquara Lia Teodoro, Vinícius Boen, Gabriel. Sou grata por todos os momentos que passamos juntos, pelas risadas e por essa linda amizade.

Aos professores da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, pela contribuição em minha formação científica em especial ao

## ***AGRADECIMENTOS***

Prof. Marcos Antônio Corrêa, Prof André Gonzaga dos Santos, Prof. Raul Cesar Evangelista (*in memorian*), pela atenção e ajuda que sempre prestaram.

Ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira pelo aprendizado compartilhado, auxílio dado ao desenvolvimento deste projeto e atenção concebida com as minhas dúvidas nos momentos finais para a entrega desta dissertação.

A Prof. Dra. Fabiana Testa Moura de Carvalho Vicentini e o Prof. Dr. Clovis Augusto Ribeiro pelas sugestões na minha banca de qualificação.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli e pela Prof. Maria Palmira Daflon Gremião, por permitir a utilização do aparelho Malvern Zetasizer Nano ZS e do Microette.

A Prof. Hérica Regina Nunes Salgado por abrir as portas do laboratório para utilização de alguns equipamentos e disponibilizar alunas para ajuda no manuseio.

Ao Prof. Dr. Celso Santilli e ao Departamento de físico-química do Instituto de Química da UNESP-Araraquara pela utilização do DSC e TG. A técnica do laboratório Danúbia e ao aluno Douglas Cassimiro pelo auxílio e ajuda na interpretação dos dados de análises térmicas realizadas neste trabalho. E a todos do departamento de química analítica em especial ao Ademir, pela paciência e auxílio nas análises.

A Prof. Dra Renata Fonseca Vianna por abrir as portas do laboratório permitindo o uso do aparelho Malvern Zetasizer Nano ZS e a técnica do laboratório Patrícia por auxiliar no manuseio do equipamento.

Ao Prof. Dr. Roberto Mendonça Faria e ao Instituto de Física da USP de São Carlos- Departamento de polímeros por permitir a utilização do Microscópio de Força Atômica e ao Prof. Dr. Marcelo Assunção por me auxiliar na discussão de análise morfológica.

Aos Professores e alunos do laboratório de Biologia Molecular da faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, por disponibilizar o uso do freezer -80°C.

A todos professores da Faculdade Hermínio Ometo - UNIARARAS de Araras, principalmente pela Prof. Cristina Maria Franzini pela orientação no TCC e todo ensinamento me propiciando a oportunidade de trilhar os meus primeiros passos profissionais. Ao Coordenador do curso de Farmácia Ismar Rodrigues, pelo auxílio e aprendizado oferecido.

A todas as funcionárias da secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP.



## ***AGRADECIMENTOS***

Aos técnicos e secretária do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Araraquara, por toda a colaboração e auxílio prestado, em especial as técnicas Margareth e Natália e pela secretária Keila.

Aos funcionários da biblioteca que sempre prestaram seus serviços com muito carinho e dedicação. A Neuzinha que sempre cuidou da limpeza do nosso departamento. Aos funcionários da portaria da UNESP e do Residencial Marina que sempre zelaram por todos nós.

A Capes agradeço a bolsa concedida.

Confesso que esta foi uma página bem difícil de ser escrita, pois é impossível lembrar-se de todos que contribuíram ao longo deste tempo. Deixo meu Obrigado, meu carinho e minha gratidão a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

"Havia um homem que costumava ter em cima de sua cama uma placa escrita: ISSO TAMBÉM PASSA... Então perguntaram à ele o por quê disso... ele disse que era para se lembrar que, quando estivesse passando por momentos ruins, poder se lembrar de que eles iriam embora, e que ele teria que passar por aquilo por algum motivo. Mas essa placa também era pra lembrá-lo que quando estivesse muito feliz, que não deixasse tudo pra trás, porque esses momentos também iriam passar e momentos difíceis viriam de novo...E é exatamente disso que a vida é feita: MOMENTOS!

Momentos os quais temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso próprio aprendizado. Por algum motivo... Nunca esqueça do mais importante: NADA É POR ACASO! Absolutamente nada. Por isso temos que nos preocupar em fazer a nossa parte da melhor forma possível."

*Chico Xavier*

## RESUMO

O ibuprofeno (IBU), antiinflamatório não esteroideal (AINE), possui ação analgésica, antipirética e antiinflamatória. É indicado clinicamente para alívio sintomático de cefáleias, mialgias e no tratamento de doenças crônico-degenerativas como osteoartrite e artrite reumatóide. É fato conhecido na literatura que o IBU apresenta um tempo de meia vida relativamente curto e baixa solubilidade em água. Além disso, o tratamento com IBU pode resultar em elevados níveis de toxicidade gastrointestinal. Para contornar tais limitações, uma alternativa seria a encapsulação do IBU em sistema de liberação, como as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). Nos últimos tempos as NLS vêm sendo desenvolvidas como transportadores de fármacos lipofílicos, a fim de se obter uma liberação controlada e direcionada do fármaco com reduzido efeito colateral, aumentando, portanto, a eficácia do tratamento. Assim, o objetivo deste trabalho foi a obtenção e caracterização de NLS contendo IBU. As NLS foram preparadas pela técnica de sonicação na qual foi utilizado o monoestearato de glicerila (GMS), fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FSH) e poloxamer 188 (P-188) como excipientes para o desenvolvimento da formulação. As NLS sem e com fármaco apresentaram diâmetro médio de partícula em escala nanométrica, o diâmetro foi maior conforme aumentou a concentração de fármaco no sistema. A caracterização morfológica demonstrou formato irregular da NLS e conforme aumentou a concentração de fármaco no sistema o formato se aproximou do esférico. As formulações apresentaram uma alta eficiência de encapsulação. O estudo de estabilidade mostrou que as NLS contendo IBU foram estáveis no período de 60 dias. A calorimetria exploratória diferencial (DSC) demonstrou que o fármaco está molecularmente disperso na matriz lipídica e a matriz se encontra no estado sólido. A termogravimetria (TG) demonstrou que o IBU incorporado na NLS têm uma maior estabilidade térmica em relação ao fármaco puro. A liberação do fármaco foi controlada para todas as concentrações e apresentaram perfil de liberação *in vitro* segundo o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas, sendo que o transporte de IBU através das NLS ocorre por um processo de difusão fickiana. Esta análise juntamente com os resultados de DSC e TG mostrou que conforme aumenta a concentração de fármaco na NLS maior é a interação do IBU com a matriz lipídica e mais lenta é a liberação. Estes resultados demonstrados fazem das NLS um promissor sistema de liberação de IBU.

**Palavras chave:** liberação controlada, nanopartícula lipídica sólida, ibuprofeno.

## ABSTRACT

The ibuprofen (IBU), a non-steroidal anti-inflammatory (NSAID), has analgesic, antipyretic and anti-inflammatory action. It is clinically recommended for symptomatic relief of headache, myalgia and of chronic degenerative diseases such as osteoarthritis and rheumatoid arthritis. It is well known in the literature that the IBU has a short half-life, and is a poorly water soluble drug. In addition, the treatment with IBU can result in high levels of gastrointestinal toxicity. To work around these limitations, an alternative would be the encapsulation of IBU in delivery systems, such as solid lipid nanoparticles (SLN). Currently SLN have been developed as carriers for lipophilic drugs, in order to obtain a controlled release and targeted drug with reduced side effects, thus having an increasing efficacy of the treatment. The objective of this work was obtaining and characterization of SLN containing IBU. The SLN were prepared by sonication technique, glyceryl monostearate (GMS), hydrogenated soy phosphatidylcholine (FSH) and poloxamer 188 (P-188) were used as excipients for the development of formulation. The SLN without and with drug showed mean particle size in the nanometer range, the size was greater as increased the concentration of drug in the system. Morphological characterization showed irregular shape of the SLN and when increased as the concentration of drug in the system approached the spherical shape. The formulations showed high encapsulation efficiency. Stability study showed that the SLN containing IBU were stable over the period of 60 days. The differential scanning calorimetry (DSC) showed that the drug is molecularly dispersed in the lipid matrix and the matrix is in solid state. The thermogravimetric analyzer (TG) showed that the IBU incorporated in SLN have a greater thermal stability compared to pure drug. The release of drug was controlled for all concentrations and showed an *in vitro* release profile according to Korsmeyer-Peppas mathematical model and the transport of IBU from the SLN occurs through a process of diffusion fickiana. This analysis with the results of DSC and TG showed that with increasing concentration of drug in the SLN is greater interaction of IBU with the lipid matrix and slower is the release. These results demonstrated make the SLN a promising delivery system to IBU.

**Keywords:** controlled release, solid lipid nanoparticles, ibuprofen.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ibuprofeno .....	21
Figura 2. Três modelos de incorporação de fármaco nas NLS .....	25
Figura 3. Monoestearato de glicerila.....	27
Figura 4. Poloxamer 188 .....	28
Figura 5. Fosfatidilcolina .....	28
Figura 6. Espectro de varredura do IBU em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,4, por espectrofotometria UV-Visível entre o comprimento de onda de 200 e 600 nm.....	45
Figura 7. Representação gráfica da curva analítica do IBU por espectrofotometria na região do UV-Visível .....	46
Figura 8. Comparação do diâmetro médio de partícula e Pdi das NLS sem fármaco aplicando tempos de sonicação de 10, 15 e 20 minutos .....	48
Figura 9. Distribuição do diâmetro médio das NLS sem fármaco .....	49
Figura 10. Distribuição do diâmetro médio das NLS contendo 2% IBU.....	49
Figura 11. Distribuição do diâmetro médio das NLS contendo 3% IBU.....	50
Figura 12. Distribuição do diâmetro médio das NLS contendo 5% IBU.....	50
Figura 13. Distribuição do diâmetro médio das NLS contendo 10% IBU.....	50
Figura 14. Distribuição do diâmetro médio das NLS contendo 15% IBU.....	51
Figura 15. Perfil de eluição de NLS isenta de fármaco, $\lambda = 410$ nm .....	54
Figura 16. Perfil de eluição de NLS contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU, $\lambda = 223$ nm .....	54
Figura 17. Imagem de amplitude de AFM da NLS sem fármaco na escala de 5,0 $\mu\text{m}$ .....	56
Figura 18. Imagem topográfica da NLS sem fármaco na escala de 5,0 $\mu\text{m}$ .....	57
Figura 19. Imagem de amplitude de AFM da NLS contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU na escala de 10,0 $\mu\text{m}$ .....	58
Figura 20. Comparação do diâmetro médio das NLS sem fármaco e contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU em função do tempo .....	63
Figura 21. Comparação do índice de polidispersividade das NLS sem fármaco e contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU em função do tempo .....	64
Figura 22. Comparação do potencial zeta das NLS sem fármaco e contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU em função do tempo .....	64

Figura 23. Curva DSC do Ibuprofeno. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C.	66
Figura 24. Curva DSC do GMS, (A) Aquecimento (B) Resfriamento. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C .....	66
Figura 25. Curva de DSC da mistura física GMS/IBU contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU, (A) Aquecimento (B) Resfriamento. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C.	67
Figura 26. Curva de DSC da FSH, (A) Aquecimento (B) Resfriamento. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C .....	69
Figura 27. Curva de DSC da mistura física FSH/IBU contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU, (A) Aquecimento (B) Resfriamento. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C.	70
Figura 28. Curva de DSC da mistura física FSH/IBU 50/50, Aquecimento (A) Resfriamento (B) Reaquecimento (C). Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C .....	72
Figura 29. Curva de DSC do P-188, (A) Aquecimento (B) Resfriamento. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C .....	73
Figura 30. Curva de DSC da mistura física P-188/IBU contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU, (A) Aquecimento (B) Resfriamento. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C.	73
Figura 31. Dados do DSC da mistura física (P-188, FSH e GMS), (A) Aquecimento (B) Resfriamento. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10° C/min no intervalo de 0 a 120°C .....	75
Figura 32. Curva DSC da mistura física P-188/FSH/GMS contendo 2, 3, 5, 10 3 15% de IBU, (A) Aquecimento (B) Resfriamento. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C.....	76

Figura 33. Curva DSC da NLS sem fármaco, (A) Aquecimento (B) Resfriamento. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C .....	78
Figura 34. Curva DSC da NLS/IBU contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU, (A) Aquecimento (B) Resfriamento. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C .....	79
Figura 35. Curva de TG/DTG do ibuprofeno. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo temperatura ambiente a 600°C .....	81
Figura 36. Curvas de TG dos excipientes: FSH, GMS e P-188. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo temperatura ambiente a 600 °C .....	82
Figura 37. Curva TG/DTG da mistura física (P-188/FSH/GMS) sem fármaco. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo temperatura ambiente a 600 °C .....	83
Figura 38. Curva TG da mistura física (P-188/FSH/GMS) com 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo temperatura ambiente a 600 °C .....	84
Figura 39. Curva TG da nanopartícula lipídica sólida sem fármaco. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10°C/min no intervalo temperatura ambiente a 600°C .....	85
Figura 40. Curvas de TG da NLS+IBU2%, NLS+IBU3%, NLS+IBU5%, NLS+IBU10% e NLS+IBU15%. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo temperatura ambiente a 600°C .	85
Figura 41. Perfil de liberação (% liberada) do IBU nas NLS contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de fármaco e solução de ibuprofeno controle (média n=6).....	90
Figura 42. Porcentagem liberada do IBU das NLS contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU nos tempos de 8 e 12 horas .....	91
Figura 43. Entalpia obtida total (J/g) da curva de DSC da NLS contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU .....	92

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudo de solubilidade utilizando o Ácido esteárico, Imwitor <sup>®</sup> 900 e Precirol <sup>®</sup> ATO5.....	43
Tabela 2. Estudo de solubilidade do IBU utilizando o Witepsol <sup>®</sup> E85 .....	44
Tabela 3. Estudo de solubilidade do IBU utilizando o Dynasan <sup>®</sup> 114.....	44
Tabela 4. Estudo de solubilidade do IBU utilizando o Softisan <sup>®</sup> 100.....	44
Tabela 5. Valores obtidos na determinação da precisão intracorrída (n=3).....	46
Tabela 6. Valores obtidos na determinação da precisão intercorrída (n=3).....	47
Tabela 7. Determinação da exatidão de metodologia analítica para quantificação do IBU (n=3). ..	47
Tabela 8. Composição das Nanopartículas Lipídicas Sólidas .....	48
Tabela 9. Valores obtidos na análise do diâmetro médio da partícula, Pdi e potencial zeta (Pz) com os respectivos desvio padrão.....	52
Tabela 10. Valores obtidos para a eficiência de encapsulação (EE%) e capacidade de carga (CC%) das NLS com fármaco, (n=3).....	55
Tabela 11. Resultados das análises de diâmetro médio, Pdi e potencial zeta da NLS sem fármaco (n=3).....	60
Tabela 12. Resultados das análises de diâmetro médio, Pdi e potencial zeta da NLS contendo 2% IBU (n=3).....	61
Tabela 13. Resultados das análises de diâmetro médio, Pdi e potencial zeta da NLS contendo 3% IBU (n=3).....	61
Tabela 14. Resultados das análises de diâmetro médio, Pdi e potencial zeta da NLS contendo 5% IBU (n=3).....	62
Tabela 15. Resultado da análise de diâmetro médio, Pdi e potencial zeta da NLS contendo 10% IBU (n=3).....	62
Tabela 16. Resultados das análises de diâmetro médio, Pdi e potencial zeta da NLS contendo 15% IBU (n=3).....	63
Tabela 17. Dados de DSC da mistura física de GMS/IBU contendo o ponto de fusão, temperatura onset e os valores de entalpias .....	68
Tabela 18. Dados de DSC da mistura física de GMS/IBU contendo a cristalização, temperatura onset e os valores de entalpias .....	69
Tabela 19. Dados de DSC da mistura física de FSH/IBU contendo o ponto de fusão, temperatura onset e os valores de entalpias .....	70

Tabela 20. Dados de DSC da mistura física de FSH/IBU com 2, 3, 5, 10 e 15% do fármaco, contendo a cristalização, temperatura onset e os valores de entalpias.....	71
Tabela 21. Dados de DSC da mistura física P-188/IBU contendo o ponto de fusão, temperatura onset e os valores de entalpias .....	74
Tabela 22. Dados de DSC da mistura física P-188/IBU contendo a cristalização, temperatura onset e os valores de entalpias.....	75
Tabela 23. Dados de DSC da mistura física (P-188/FSH/GMS) e da mistura física contendo fármaco com o ponto de fusão, temperatura onset e os valores de entalpias.....	77
Tabela 24. Dados de DSC da mistura física (P-188/FSH/GMS) e da mistura física contendo fármaco com a cristalização, temperatura onset e os valores de entalpias.....	77
Tabela 25. Dados de DSC da NLS sem e com fármaco (2, 3, 5, 10 e 15% de IBU), com o ponto de fusão, temperatura onset e os valores de entalpias.....	80
Tabela 26. Dados de DSC da NLS sem e com fármaco com a cristalização, temperatura onset e os valores de entalpias .....	81
Tabela 27. Porcentagem de perda de massa das curvas de TG da FSH, GMS e P-188 .....	82
Tabela 28. Porcentagem de perda de massa das curvas de TG para IBU, MF (P-188/FSH/GMS) e MF (P-188/FSH/GMS) contendo 2, 3, 5, 10 e 15 de IBU%.....	84
Tabela 29. Porcentagem de perda de massa das curvas de TG para IBU, NLS e NLS+IBU 2, 3, 5, 10 e 15% .....	86
Tabela 30. Liberação do IBU a partir da NLS 2% com Q real ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), porcentagem de IBU liberada e DPR (média de n=6).....	88
Tabela 31. Liberação do IBU a partir da NLS 3% com Q real ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), porcentagem de IBU liberada e DPR (média de n=6).....	88
Tabela 32. Liberação do IBU a partir da NLS 5% Q real ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), porcentagem de IBU liberada e DPR (média de n=6) .....	89
Tabela 33. Liberação do IBU a partir da NLS 10% Q real ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), porcentagem de IBU liberada e DPR (média de n=6).....	89
Tabela 34. Liberação do IBU a partir da NLS 15% Q real ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), porcentagem de IBU liberada e DPR (média de n=6).....	90
Tabela 35. Valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) calculado pela fórmula de cada modelo matemático.....	94



## LISTA DE ABREVIATURA

AFM – Microscopia de força atômica  
AR – Artrite reumatóide  
CC% – Capacidade de carga  
DP – Desvio padrão  
DPR – Desvio padrão relativo  
DSC – Calorimetria exploratória diferencial  
DTG – Termogravimetria derivada  
EE% – Eficiência de encapsulação  
FSH – Fosfatidilcolina de soja hidrogenada  
GMS – Monoestearato de glicerila  
IBU – Ibuprofeno  
LD – Limite de detecção  
LQ – Limite de quantificação  
MF – Mistura física  
NLS – Nanopartículas lipídicas sólidas  
P-188 – Poloxamer 188  
Pdi – Índice de polidispersividade  
Pz – Potencial zeta  
r – Coeficiente de correlação  
R<sup>2</sup> – Coeficiente de determinação  
TG – Termogravimetria  
UV – Ultravioleta  
ΔH – Entalpia

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	20
1.1	Ibuprofeno	20
1.1.1	Mecanismo de ação	21
1.2	Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)	22
1.2.1	Métodos de desenvolvimento das NLS	22
1.2.2	Tipos de NLS	25
1.2.3	Excipientes utilizados para a obtenção das NLS	27
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b>	30
2.1	Objetivo geral	30
2.2	Objetivos específicos	30
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	32
3.1	Material	32
3.1.1	Equipamentos	32
3.2	Métodos	33
3.2.1	Estudo de solubilidade do ibuprofeno em diferentes lipídios	33
3.2.2	Padronização da metodologia analítica para quantificação do ibuprofeno por espectrofotometria UV - Visível	33
3.2.3	Preparação das nanopartículas lipídicas sólidas	35
3.2.4	Avaliação morfológica das nanopartículas lipídicas sólidas por microscopia de força atômica	37
3.2.5	Análise térmica	38
3.2.6	Avaliação da solubilidade do IBU em tampão fosfato de potássio 0,1M; pH 7,4	39
3.2.7	Estudo <i>in vitro</i> de liberação do ibuprofeno incorporado nas NLS	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	43
4.1.1	Estudo de solubilidade do ibuprofeno em diferentes lipídios	43

4.1.2	Padronização da metodologia analítica para quantificação do ibuprofeno por espectrofotometria UV-Visível.....	45
4.1.3	Desenvolvimento das NLS .....	47
4.2	Resultado da Caracterização físico-química das NLS .....	49
4.2.1	Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas lipídicas sólidas .....	49
4.2.2	Eficiência de Encapsulação e Capacidade de Carga.....	53
4.2.3	Microscopia de Força Atômica.....	55
4.3	Avaliação da estabilidade das nanopartículas lipídicas sólidas contendo ou não o ibuprofeno.....	60
4.4	Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	65
4.5	Termogravimetria.....	81
4.6	Avaliação da solubilidade do IBU em tampão fosfato de potássio 0,1M; pH 7,4 .....	87
4.7	Estudo <i>in vitro</i> de liberação do ibuprofeno incorporado nas NLS.....	87
5	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	97
6	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	100

# *INTRODUÇÃO*

---

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) vêm sendo estudadas, como sistemas de liberação prolongada de fármaco, pois apresentam inúmeras vantagens, tais como, proteção das substâncias ativas contra degradações químicas, efeitos colaterais minimizados, melhores propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas e permitem modular a velocidade de liberação do fármaco (SANTOS-MAGALHAES *et al.*, 2000). As NLS reúnem as principais vantagens encontradas nos sistemas lipossomais e nas micro e nanopartículas poliméricas (OLBRICH *et al.*, 2001). São sistemas compostos por substâncias fisiologicamente bem toleradas possuindo baixa citotoxicidade, possibilitando a obtenção de partículas nanométricas sem o uso de solventes orgânicos.

O ibuprofeno (IBU) é um antiinflamatório não esteroideal indicado clinicamente para o alívio sintomático de cefaleias, mialgias, osteoartrite, artrite reumatóide, febre associada com inflamação, luxações, entre outros (COSTA *et al.*, 2006). Estratégias terapêuticas para as doenças crônico-degenerativas, encontram obstáculos no tratamento com o ibuprofeno, devido aos efeitos indesejáveis deste fármaco que causa irritação da mucosa gástrica podendo levar a formação de úlcera e apresenta meia vida relativamente curta o que faz com que tenha que ser administrado várias vezes ao dia para a manutenção dos níveis terapêuticos (JONES *et al.*, 2008). Para superar estas limitações, os sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos têm sido aplicados para este fim.

A administração oral é a via mais comumente utilizada para administração de fármacos devido a maior facilidade e adesão do paciente ao tratamento. Segundo ROGER e colaboradores (2010), a absorção oral é limitada por várias barreiras fisiológicas, que necessitam ser moduladas para alterar a biodisponibilidade de vários fármacos e o direcionamento alvo no sítio de ação. Com isto sistemas nanotransportadores de liberação prolongada têm sido proposto para direcionar o fármaco, minimizar os efeitos adversos e por fim, para que o efeito terapêutico seja atingido de forma prolongada através da liberação contínua de fármaco após a sua administração oral.

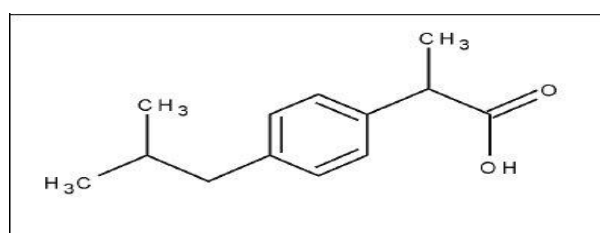
### 1.1 IBUPROFENO

O ibuprofeno (ácido 2-(4-isobutilfenil) propiônico) é um antiinflamatório não esteroideal (AINE) pertencente à classe do ácido propiônico, que apresenta atividade antiinflamatória, antipirética e analgésica (BERAJANO, 2006).

Possui características anfifílicas e é utilizado para reduzir a dor, febre e inflamação; indicado principalmente no alívio dos sinais e sintomas da artrite reumatóide, osteoartrite e reumatismo articular (COSTA *et al.*, 2006).

O ibuprofeno apresenta-se como um pó branco ou como cristais incolores, com leve odor característico, sendo praticamente insolúvel em água, mas solúvel em soluções aquosas diluídas de hidróxidos alcalinos e de carbonatos, e em alguns solventes orgânicos como o etanol, acetona, metanol e clorofórmio. Possui peso molecular de 206,28 e pKa de 5,3. (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

**Figura 1.** Estrutura química do ibuprofeno (CARVALHO *et al.*, 2006)



### 1.1.1 Mecanismo de ação

Os AINEs são inibidores específicos da enzima ciclooxygenase (COX), que possui duas formas ligeiramente diferentes, designadas COX-1 e COX-2. O ibuprofeno é um inibidor não seletivo da COX-2, ou seja, inibe simultaneamente a COX-1 e a COX-2, que são enzimas chave na produção de substâncias pró-inflamatória como as prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, na qual causam inflamação e contribuem para a percepção de dor pelo cérebro (OSSWALD e GUIMARÃES, 2001).

O ibuprofeno liga-se no sítio ativo destas enzimas impedindo a ligação do ácido araquidônico, uma substância formada a partir de lipídios presentes na membrana celular pela ação da fosfolípase A<sub>2</sub>, de formar as prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos inibindo o processo de inflamação e dor (NEWA *et al.*, 2008).

A administração oral do ibuprofeno, como a dos demais AINEs, pode levar a erosões gástricas, úlceras, sangramentos e morte por hemorragia gastrointestinal. Pelo fato que as prostaglandinas têm efeito citoprotetor e com sua inibição há uma diminuição da proteção gastrointestinal. Os AINEs também interferem em algumas funções da coagulação sanguínea (BEJARANO, 2006).

## 1.2 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (NLS)

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são sistemas de liberação de fármacos, compostos, como o próprio nome diz, por partículas com tamanho nanométrico entre 50 e 1000 nm, cuja matriz é formada por lipídios que na temperatura corpórea encontram-se no estado sólido. As NLS podem ser utilizadas como sistemas transportadores de fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos, possuindo limitada capacidade de carga para fármacos hidrossolúveis (FRICKER *et al.*, 2010; VIGHI *et al.*, 2010).

Normalmente as NLS são compostas por lipídios (ácidos graxos, ésteres graxos, glicerídeos e ceras biodegradáveis), tensoativos (anfóteros, não-iônicos) e fármaco, podendo também ser adicionado um co-tensoativo à formulação (MÜHLEN; SCHAWRZ; MEHNERT, 1998). A fase externa da NLS é composta pelo tensoativo, água e co-tensoativo e a fase interna pela matriz lipídica na qual o fármaco encontra-se disperso (MANJUNATH; REDDY; VENKATESWARLU, 2005).

O crescimento contínuo na área de medicamentos tem buscado o desenvolvimento de novos sistemas, a descoberta das NLS tem sido objeto de pesquisa como um sistema de liberação controlada de fármacos administrados por diferentes vias, como oral, parenteral, tópica, retal, nasal entre outras. Este novo sistema oferece inúmeras vantagens quando comparados com as formas farmacêuticas convencionais. (MEHNERT e MÄDER, 2001; WONG *et al.*, 2007).

As NLS têm como vantagens a possibilidade de controle de liberação de fármaco, o direcionamento do fármaco para alvos específicos (“drug targeting”), o aumento da estabilidade dos fármacos encapsulados, a atoxicidade de seus componentes; uso de materiais biodegradáveis em sua produção, a incorporação de fármacos lábeis e sensíveis a degradação e coalescência; a não utilização de solventes orgânicos em sua produção além da facilidade de produção em larga escala industrial e de esterilização (MAIA; SCHAFER-KORTING; MEHNERT, 2000; LIPPACHER; MÜLLER; MÄDER, 2001; MEHNERT e MÄDER, 2001; NICOLI *et al.*, 2001).

### 1.2.1 Métodos de desenvolvimento das NLS

As nanopartículas podem ser obtidas por diversas técnicas, que por sua vez podem interferir nas características da partícula. A seguir será descrito os principais métodos descritos na literatura de obtenção das NLS.

### ***Microemulsão***

O método de microemulsão inicia-se fundindo o lipídio a uma temperatura de 5 a 10°C acima de seu ponto de fusão, e posteriormente a fase aquosa, contendo tensoativo e co-tensoativo aquecidos a mesma temperatura, é vertida sobre a fase oleosa formando uma microemulsão, que por sua vez é dispersada na água gelada (2 a 3°C) sob agitação vigorosa. O excesso de água é removido pela técnica de ultrafiltração ou liofilização. Este método foi desenvolvido e introduzido por GASCO (1993), tem a finalidade de encapsular fármacos lipofílicos. Para encapsular fármacos hidrofílicos é necessário o desenvolvimento de uma emulsão inicial A/O/A ao invés de uma simples emulsão O/A. A desvantagem deste método é a dificuldade na remoção do excesso de água e a utilização de agentes tensoativos e co-tensoativos em altas concentrações (HOU *et al.*, 2003; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; UNER, 2006).

### ***Método de dupla emulsão A/O/A***

Este método consiste na solubilização de fármacos hidrofílicos para ser encapsulado na fase aquosa interna da dupla emulsão A/O/A, com um estabilizador capaz de prevenir menos fármaco na fase externa durante a evaporação do solvente. Primeiramente uma solução contendo alta concentração de fármaco é dispersa na fase oleosa contendo o lipídio e tensoativo, formando-se uma emulsão O/A. Esta primeira emulsão é dispersa em uma solução aquosa contendo outro tensoativo sob vigorosa agitação, formando-se uma emulsão A/O/A. Por fim, esta emulsão a quente é dispersa em água gelada e agitada vigorosamente para a obtenção das NLS (MÜHLEN; SCHAWRZ; MEHNERT, 1998; CORTESI *et al.*, 2002).

### ***Emulsificação e evaporação do solvente***

Na técnica de emulsificação e evaporação o lipídio é solubilizado em um solvente orgânico imiscível com a água e é incorporado o princípio ativo, por dissolução ou por dispersão. A fase orgânica é então emulsificada numa fase aquosa, que contém um tensoativo do tipo O/A. A evaporação do solvente da fase orgânica é realizada sob baixa pressão formando assim as NLS através da precipitação do lipídio no meio aquoso. É uma técnica bastante utilizada para a incorporação de fármacos termolábeis, pois não há necessidade de aplicação de calor durante o processo de obtenção das nanopartículas, porém tem a desvantagem da presença residual de solvente orgânico na dispersão final e presença de



micropartículas lipídicas na formulação (MEHNERT e MÄDER, 2001; WISSING; KAYSERB; MÜLLER, 2004).

### ***Difusão de solvente***

De maneira geral nesta técnica utiliza-se solvente orgânico parcialmente miscível com a água. Inicialmente os solventes são saturados pela água com a finalidade de obter um equilíbrio termodinâmico entre os líquidos, logo então o lipídio é dissolvido nesta solução que é subsequente dispersa e emulsificada em uma solução aquosa saturada de tensoativo em temperatura acima do ponto de fusão do lipídio. A obtenção da dispersão de NLS ocorre após a evaporação do solvente orgânico em baixa pressão (MENDOZA *et al.*, 2009). Este método é simples e fornece tamanho de partícula cerca de 100 nm com distribuição estreita do tamanho de partícula, porém pode apresentar resíduo de solvente orgânico no produto final e dificuldade de escalonamento (HU; JIANG; DU, 2005; HU *et al.*, 2006).

### ***Homogeneização a quente empregando alto cisalhamento e/ou ultrasonicação***

Para a técnica de homogeneização à quente empregando alto cisalhamento e/ou ultrasonicação, a fase oleosa é aquecida a uma temperatura de 5 a 10°C acima do ponto de fusão do lipídio. A fase aquosa é aquecida à mesma temperatura e vertida sobre a fase oleosa sob agitação e submetida ao homogeneizador de alto cisalhamento como o Ultra-turrax e/ou sonicador. A emulsão obtida é resfriada em temperatura ambiente. A grande vantagem desta técnica é o fato que o equipamento é comum em todos os laboratórios e o preparo é de fácil manuseio, sendo uma técnica altamente difundida, além de não requerer utilização de solventes orgânicos, grande quantidade de surfactante ou aditivos. A qualidade da dispersão das nanopartículas produzidas por esta técnica é muitas vezes afetada pela presença de micropartículas levando a uma instabilidade física durante o armazenamento. (MEHNERT e MÄDER, 2001; UNER, 2006; MENDOZA *et al.*, 2009). Outra desvantagem é que a concentração lipídica é baixa (<1%) e a concentração do surfactante é comparativamente alta. A contaminação de metal é outro importante problema da técnica de ultrasonicação (WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004).

### ***Homogeneização por alta Pressão***

Esta técnica pode desenvolver nanopartículas a elevadas temperaturas (homogeneização a quente) ou a baixas temperaturas (homogeneização a frio). Para ambas as

técnicas, o fármaco é dissolvido ou solubilizado no lipídio fundido a uma temperatura de 5 a 10°C, acima do seu ponto de fusão.

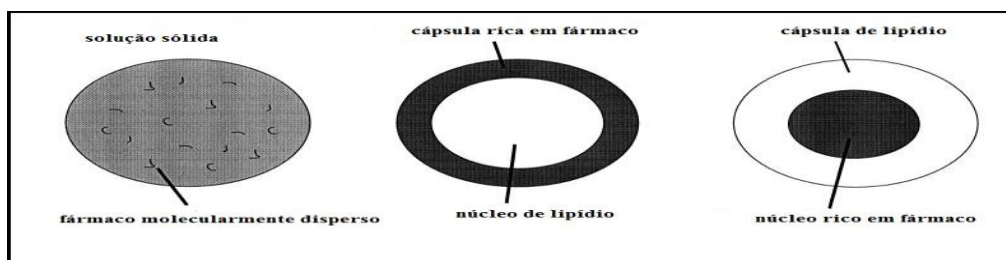
Na homogeneização a quente, o fármaco é disperso ou dissolvido no lipídio sólido fundido e a mistura é dispersa em uma solução aquosa de tensoativo mantida na mesma temperatura e agitada a alta velocidade, formando uma pré-emulsão O/A. A pré emulsão é passada através do homogeneizador de alta pressão por uma pressão de 100 a 1500 bar, e normalmente um ou três ciclos são suficientes para obtenção da nanoemulsão O/A quente. A solidificação da nanoemulsão por resfriamento em temperatura ambiente leva a formação das NLS. Esta técnica pode ser utilizada para encapsulação de fármacos lipofílicos. (SIEKMANN e WESTERSEN, 1992; UNER, 2006).

Na homogeneização a frio, o fármaco é disperso ou dissolvido no lipídio fundido, o tensoativo pode ser utilizado para melhorar a solubilização. Em seguida a mistura é solidificada por gelo seco ou nitrogênio líquido que facilita o processo de moagem para a obtenção de micropartículas de tamanho de aproximadamente 50 a 100 µm. As micropartículas são dispersas em uma solução aquosa de tensoativos e emulsionadas sob agitação para a obtenção da pré-emulsão. Por fim a pré-emulsão é passada pelo homogeneizador de alta pressão em temperatura próxima a 0°C ou em temperatura ambiente para obtenção das nanopartículas. Esta é uma técnica utilizada para encapsulação de fármacos hidrofílicos (MEHNERT e MÄDER, 2001; LANDER *et al.*, 2000).

### 1.2.2 Tipos de NLS

Existem três tipos de mecanismo de incorporação do fármaco nas nanopartículas. A Figura 2 representa três modelos: matriz homogênea (modelo 1), na qual o fármaco está molecularmente disperso na matriz, cápsula rica em fármaco (modelo 2) e núcleo rico em fármaco (modelo 3).

**Figura 2.** Três modelos de incorporação de fármaco nas NLS (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000)



O primeiro mecanismo de incorporação de fármaco nas NLS ocorre quando as partículas são produzidas pela técnica de homogeneização a frio formando uma solução de sólido, ou seja, o fármaco está molecularmente disperso na matriz lipídica (Modelo 1), não se utiliza tensoativo que solubiliza o fármaco na formulação. Os outros modelos são obtidos pela técnica de homogeneização a quente.

O modelo 2 representa a cápsula rica em fármaco que é caracterizada por uma camada externa rica em fármaco e a camada interna é de lipídio. Este modelo pode ocorrer devido à solubilidade do fármaco na mistura de tensoativo e água da fase aquosa quando o sistema encontra-se em temperaturas elevadas no processo de desenvolvimento das NLS, assim, parte do fármaco deixa a matriz lipídica e solubiliza na fase aquosa. Normalmente a matriz lipídica cristaliza-se antes do fármaco devido ao seu maior ponto de cristalização, com isto o fármaco ao invés de distribuir-se no interior da matriz lipídica, distribui-se na superfície. O mecanismo reverso acontece para o terceiro modelo em que o fármaco é precipitado antes da cristalização do lipídio. Isto ocorre porque a concentração do fármaco está próxima da sua concentração de saturação no lipídeo fundido e o resfriamento da nanoemulsão O/A leva a uma supersaturação do fármaco no lipídio e subsequente a cristalização do fármaco acontece primeiro que a recristalização do lipídio, formando assim um sistema reservatório com núcleo rico em fármaco (FRICKER *et al.*, 2010; MEHNERT e MÄDER, 2001; MENDOZA *et al.*, 2009).

O perfil de liberação do fármaco depende do método de produção da nanopartícula lipídica sólida, da composição da formulação e concentração do tensoativo, da propriedade de solubilização do tensoativo para incorporar o fármaco e da solubilização do fármaco na matriz lipídica. Dependendo da estrutura da matriz, o perfil de liberação pode variar de muito rápido, médio ou extremamente prolongado (SOUTO e MÜLLER, 2008). O modelo 2 (cápsula rica em fármaco) pode promover um “*efeito burst*”, ou seja uma liberação imediata do fármaco, enquanto que a liberação prolongada ocorre quando o fármaco está localizado no núcleo da nanopartícula (modelo 3). Para o sistema reservatório composto pela mistura fármaco e lipídio a liberação pode apresentar dois perfis de liberação: liberação imediata e prolongada. (KÜCHLER *et al.*, 2010; WONG *et al.*, 2007).

A liberação do fármaco nas nanopartículas geralmente ocorre por dois mecanismos: o primeiro acontece por um processo de difusão do fármaco através da matriz lipídica, na qual a água difunde-se para a matriz e o fármaco dissolve-se e difunde-se para o exterior da matriz. O segundo mecanismo ocorre pela erosão gradual e contínua da superfície do sistema por

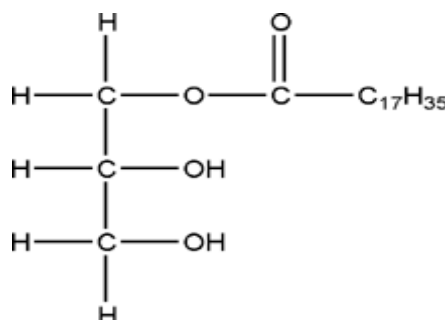
lipólise enzimática, pela degradação do lipídio, por hidrólise ou solubilização por ionização (MENDOZA *et al.*, 2009).

### 1.2.3 Excipientes utilizados para a obtenção das NLS

As NLS geralmente são compostas por lipídios, tensoativos e fármaco. Neste estudo para obtenção das NLS foi utilizado os seguintes componentes:

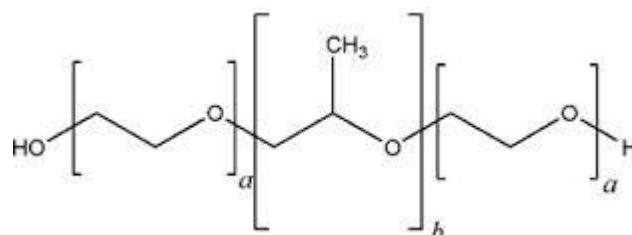
O monoestearato de glicerila (GMS) é conhecido pelo nome comercial de Imwitor<sup>®</sup> 900 é um monoglicerídeo não-iônico de característica lipofílica que apresenta um equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) igual a 3,8. O GMS é utilizado como agente emulsificante, estabilizante, emoliente, solubilizante. Possui ação lubrificante no desenvolvimento de comprimidos e cápsulas e tem sido utilizado em matriz lipídica de sistema de liberação controlada de fármaco. Têm ponto de fusão em torno de 55–60 °C. A formula estrutural do GMS está representado pela figura 3 (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

**Figura 3.** Monoestearato de glicerila



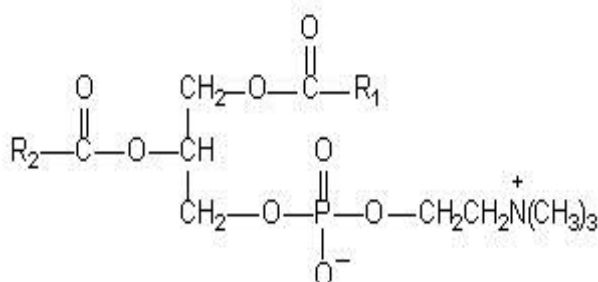
O Poloxamer 188 (P-188) conhecido com o nome comercial de Lutrol<sup>®</sup> F68 é um tensoativo hidrofílico não iônico constituído de copolímero de polioxietileno-polioxipropileno. O segmento polioxipropileno é a porção hidrofóbica enquanto que a porção hidrofílica é representada pelo segmento de polioxietileno. O P-188 possui diversas funções sendo utilizado como agente dispersante, emulsionante, solubilizante, molhante e lubrificante (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

O P-188 é utilizado na administração oral, parentérica e em formulações tópica farmacêutica. Recentemente está sendo um excipiente utilizado em sistema de liberação de fármaco. O P-188 é um material não tóxico e não irritante. O P-188 não é metabolizado pelo organismo. Tem ponto de fusão em 52–57 °C. A figura 4 representa a formula estrutural do P-188 (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

**Figura 4.** Poloxamer 188

A fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FSH) é uma mistura complexa de fosfolípidios e de outros materiais e é referida como 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina. A estrutura química é representada por duas longas cadeias de hidrocarbonetos que caracteriza a porção apolar da molécula e também possui cabeças de grupamentos zwitteriônicos polares. É comumente utilizada em cosméticos, produtos farmacêuticos e alimentícios, como agente dispersante, emulsionante e estabilizante. Pode ser utilizada como adjuvante farmacotécnico para formas farmacêuticas injetáveis de administração intravenosa e intramuscular, para dietas enterais e parenterais, para a administração pulmonar e oftálmica e produtos tópicos como creme e pomadas (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

A molécula da FSH possui EHL entre 3-4, com isto é considerada bastante lipofílica, portanto para gerar uma estabilidade eletrostática plena às nanopartículas, deve-se utilizar em associação com um tensoativo hidrofílico como o P-188 que possui EHL igual 29 (PARK et al., 1999). A figura 5 representa a estrutura química da fosfatidilcolina.

**Figura 5.** Fosfatidilcolina

Este trabalho propõe desenvolver nanopartículas lipídicas sólidas como transportadores do IBU, visando uma menor incidência dos importantes efeitos colaterais relacionados a este fármaco e uma liberação modificada, aumentando assim, o tempo de meia vida do IBU a partir da administração oral.

***OBJETIVO***

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Obter e caracterizar as Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) contendo o fármaco ibuprofeno.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Obtenção de NLS contendo ibuprofeno;

Caracterização físico-química das NLS;

Validação de metodologia analítica para quantificação de ibuprofeno nas NLS;

Avaliação da estabilidade das NLS;

Avaliar o perfil de liberação “*in vitro*” do ibuprofeno a partir das NLS.

---

*MATERIAL E  
MÉTODOS*



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

- Ácido esteárico (Sigma Aldrich<sup>®</sup>);
- Água ultra pura;
- Trimiristina - Dynasan<sup>®</sup> 114 (Sigma Aldrich<sup>®</sup>);
- Fosfatidilcolina de soja hidrogenada, Epikuron 200SH, (Lucas Meyer);
- Fosfato de Potássio dibásico anidro, (J.T.Baker<sup>®</sup>);
- Fosfato de potássio monobásico anidro PA, (Quemis<sup>®</sup>);
- Ibuprofeno (pó), (Henrifarma<sup>®</sup>);
- Membrana sintética de acetato de celulose 0,45  $\mu\text{m}$  (Sigma Aldrich<sup>®</sup>);
- Monoestearato de glicerila, Imwitor<sup>®</sup> 900, (Synth);
- Poloxamer 188 - Lutrol<sup>®</sup> F68, (BASF);
- Palmitoestearato de glicerila - Precirol<sup>®</sup> ATO5 (Sigma Aldrich<sup>®</sup>);
- Sephadex G-25, (Pharmacia Biotech);
- Cocoglicerídio hidrogenado - Softisan<sup>®</sup> 100 (Sigma Aldrich<sup>®</sup>);
- Triglicerídeo de ácido graxo - Witepsol E85<sup>®</sup> (Sigma Aldrich<sup>®</sup>).

##### 3.1.1 Equipamentos

- Agitador-aquecedor FANEM, modelo 258;
- Analisador de partículas por Light Scattering Malvern, Zetasizer Nano ZS Malvern Instruments;
- Balança analítica, METTLER<sup>®</sup>, modelo H51;
- Balança semi-analítica Sartorius BP 210S;
- Célula calorimétrica TA Instruments, modelo DSC – Q100;
- Centrífuga Fisher Modelo 225;
- Espectrofotômetro de UV-VIS, Kayak XA – Hewlett, Packard 89090;
- Graph Pad Prism<sup>®</sup> software;
- Liofilizador JJ Científica, modelo KJJ04;
- Microette Plus (HANSON Microette 0700-1251);
- Microscópio de Força Atômica Bruker-Dimension Icon Scan Asyst do Instituto de Física de São Carlos;

- Peagômetro Micronal;
- Purificador de água (Milli-Q Plus - Millipore<sup>®</sup>);
- Software TA Instruments Universal Analysis 2000;
- Sonicador BRANSON Sonifier 250;
- Termobalança TA Instruments, modelo SDT-Q600;
- Termômetro Inconterm.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Estudo de solubilidade do ibuprofeno em diferentes lipídios

A análise da solubilidade do IBU em 6 diferentes lipídios sólidos, (ácido esteárico, Dynasan<sup>®</sup> 114, Imwitor<sup>®</sup> 900, Precirol<sup>®</sup> ATO5, Softsan<sup>®</sup> 100 e Witepsol<sup>®</sup> E85) foi verificada por meio da homogeneização, em concentrações crescentes do IBU (2, 5, 10, 15, 20 e 30%) no lipídio fundido à temperatura de  $75 \pm 2^\circ\text{C}$ , a qual foi mantida durante todo o experimento. A solubilidade do IBU foi determinada visualmente durante o aquecimento, observando a presença (+) ou ausência (-) de cristais do fármaco a cada 15 min por um período de 1h.

### 3.2.2 Padronização da metodologia analítica para quantificação do ibuprofeno por espectrofotometria UV - Visível.

#### 3.2.2.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do IBU em tampão fosfato de potássio 0,1M; pH 7,4

O comprimento de onda de máxima absorção do IBU foi determinado a partir de uma solução de 20  $\mu\text{g/mL}$  do fármaco em tampão fosfato de potássio 0,1M; pH 7,4; analisada por espectrofotometria na região do ultravioleta na região entre 200 a 600 nm.

#### 3.2.2.2 Validação da metodologia analítica por espectrofotometria UV-Visível

A validação, utilizando a metodologia espectrofotométrica por UV-Visível para o IBU, foi realizada de acordo com a RDC nº 899 de 29 de maio de 2003 publicado pela ANVISA (BRASIL, 2003) e o ICH (2005).

##### 3.2.2.2.1 Linearidade

A linearidade foi obtida com as concentrações 1,0; 1,5; 2,5; 5,0; 7,0; 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$ . Para a realização do ensaio foi preparada primeiramente uma solução estoque de 500  $\mu\text{g/mL}$

de IBU e desta foram transferidas alíquotas para balões volumétricos de 10 mL, completando com tampão fosfato de potássio 0,1M; pH 7,4 obtendo as concentrações desejadas. Foram construídas curvas analíticas relacionando-se as absorbâncias obtidas com as suas respectivas concentrações. A linearidade foi avaliada por meio do cálculo da regressão linear através dos mínimos quadrados.

#### 3.2.2.2.2 *Precisão*

A precisão intracorrída (repetibilidade) foi avaliada no mesmo dia, sendo uma feita no período da manhã e outra no período da tarde, sob as mesmas condições experimentais e mesmo analista. A precisão intercorrída (intermediária) foi analisada com analistas diferentes e em dias diferentes. As duas precisões foram avaliadas usando três concentrações diferentes da curva analítica 1, 5 e 20 µg/mL. Os ensaios da precisão foram realizados em triplicata e analisou-se o valor do desvio padrão relativo percentual (DPR%) entre as determinações.

#### 3.2.2.2.3 *Exatidão*

A exatidão do método foi determinada a partir de nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, no qual quantidades conhecidas de padrão nas concentrações de 1, 5 e 20 µg/mL foram analisadas no espectrofotômetro em triplicada. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

#### 3.2.2.2.4 *Limite de detecção e quantificação*

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados com base no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva a partir das equações 1 e 2, respectivamente (BRASIL, 2003). Foram realizadas três curvas diferentes para a obtenção dos dados necessários para os cálculos.

$$LD = \frac{Dpa * 3}{IC} \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = \frac{Dpa * 10}{IC} \quad \text{Equação 2}$$

nas quais:

Dpa= desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva analítica

### 3.2.3 Preparação das nanopartículas lipídicas sólidas

As concentrações percentuais (%) de lipídio, tensoativos e água foram obtidas como proposto por ANGELIERI (2013), trabalho desenvolvido por nosso grupo com nanopartículas lipídicas sólidas contendo terpinen-4-ol, nas quais foram utilizadas concentrações ideais para a formação de um sistema estável e de baixa viscosidade.

O lipídio utilizado para o preparado da NLS foi escolhido a partir do ensaio de solubilidade do ibuprofeno em diferentes lipídios. No preparo das NLS utilizou-se 5% do lipídio monoestearato de glicerila (GMS), 3% dos tensoativos na proporção 1:1 de poloxamer 188 (P-188) e fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FSH) e q.s.p água.

A emulsão obtida foi desenvolvida aquecendo, em agitador-aquecedor, a fase oleosa (GMS, FSH) a  $70 \pm 2^\circ\text{C}$ , ou seja,  $10^\circ\text{C}$  acima do ponto de fusão do GMS ( $60^\circ\text{C}$ ). A fase aquosa (água e P-188) foi aquecida à mesma temperatura. A fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa e agitada manualmente até obter uma emulsão e submetida ao sonicador a uma potência nominal com amplitude de 50% em pulso contínuo. Foi realizado estudo preliminar para determinar o tempo de sonicação. As nanopartículas obtidas foram resfriadas a temperatura ambiente  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Por fim, as amostras foram levadas à centrifuga por 20 minutos, a 5000 rpm, para retirada do titânio residual.

Para a produção de NLS contendo ibuprofeno, o fármaco foi adicionado diretamente na fase lipídica utilizando a mesma abordagem experimental descrita anteriormente. As concentrações de fármaco utilizadas foram de 2, 3, 5, 10, 15, 20 e 30%.

#### 3.2.3.1 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersividade das nanopartículas lipídicas sólidas

O diâmetro médio e índice de polidispersividade (Pdi) das NLS sem fármaco e NLS com diferentes concentrações de IBU foram determinados pela técnica de “Dynamic Light Scattering”, utilizando equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd) a  $25^\circ\text{C}$  sob ângulo de  $173^\circ$  e comprimento de onda do feixe de laser de 633 nm. Para as análises as amostras foram diluídas em água ultra pura na proporção de 1:100. As medidas foram feitas em triplicata e os valores médios e desvios padrões foram calculados. A análise

estatística foi feita pelo Tukey, one-way da variância (ANOVA) sendo estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

### **3.2.3.2 Determinação do potencial zeta das nanopartículas lipídicas sólidas**

O potencial zeta (Pz) das NLS sem fármaco e NLS com diferentes concentrações de IBU também foi determinado utilizando o equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd). Para a realização da medida do Pz as amostras foram diluídas em água ultra pura na proporção de 1:100. As análises foram feitas em triplicata com 10 determinações de potencial zeta para cada uma delas. Foram calculados os valores médios e os respectivos desvios padrões.

### **3.2.3.3 Eficiência de encapsulação, capacidade de carga**

Para determinação da eficiência de encapsulação foi necessário primeiramente separar o IBU não encapsulado das NLS pela metodologia de cromatografia por exclusão utilizando gel de Sephadex G-25 (gel dextrana) como fase estacionária.

Cerca de 10 g de Sephadex G-25 foram pesados em um béquer e hidratados com tampão fosfato de potássio 0,1M; pH 7,4; por 24 horas. Em seguida o gel hidratado foi transferido para uma coluna de vidro (25 x 1cm) e iluídos 500 mL de tampão fosfato de potássio na coluna para favorecer o empacotamento.

Para aplicação das amostras na coluna de Sephadex G-25, primeiramente foi eluído 2 mL de NLS isentas de fármaco sobre a coluna para saturar os sítios de ligação do Sephadex, sendo a preparação escoada até o nível do Sephadex. O meio de eluição (fase móvel) foi sempre o tampão fosfato de potássio 0,1M; pH 7,4. Em seguida diluiu-se 0,5 mL de NLS, contendo concentrações crescentes de IBU, em 2 mL de tampão fosfato de potássio 0,1M; pH 7,4; e aplicou-se sobre a coluna, utilizando o tampão para a eluição. Foram coletadas 50 frações de aproximadamente 1,0 mL cada, sendo o fluxo de 1 mL/min.

Cada fração coletada foi diluída com 1,0 mL de tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,4, e analisadas por técnica espectrofotométrica UV-VIS em 410 e 223 nm. No comprimento de onda de 410 nm observou-se o perfil de eluição das NLS e no comprimento de onda de 223 nm a eluição do fármaco.

A eficiência de encapsulação foi feita com as NLS contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de fármaco.

### 3.2.3.3.1 Cálculo da eficiência de encapsulação

As frações que apresentaram turbidez em 410 nm correspondem àquelas contendo NLS com fármacos. As frações que apresentaram absorvância em 223 nm correspondem ao IBU livre. Tais frações foram reunidas e suas absorvâncias foram determinadas por espectrofotometria utilizando comprimento de onda de 223 nm. A quantidade livre (Q livre) do IBU foi calculada pela curva analítica do fármaco aplicando-se a equação de reta do IBU, levando em consideração o fator de diluição para determinação da concentração teórica da Q livre. A quantidade de fármaco encapsulado nas NLS (Q encaps.) foi calculada pela diferença entre o total de IBU na formulação (Q teórica) e a quantidade de IBU não encapsulada (Q livre) (Equação 3). O cálculo da eficiência de encapsulação (EE%) foi realizado pela Equação 4.

$$Q_{\text{encap.}} = Q_{\text{teórica}} - Q_{\text{livre}} \quad \text{Equação 3}$$

$$\% \text{ encap.} = (Q_{\text{encap.}} / Q_{\text{teórica}}) \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

### 3.2.3.3.2 Capacidade de Carga

A “capacidade de carga” percentual (CC%) do processo ou “loading capacity” relaciona a quantidade de fármaco encapsulado em função da quantidade de lipídio presente na formulação. Foi calculado com a equação 5.

$$CC\% = (Q_{\text{encap.}} / Q_{\text{lipídios}}) \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

### 3.2.3.3.3 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Nas análises estatísticas foram utilizadas o Tukey, one-way da variância (ANOVA) empregando-se o programa Graph Pad Prism<sup>®</sup> software, considerando estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

## 3.2.4 Avaliação morfológica das nanopartículas lipídicas sólidas por microscopia de força atômica

Na análise de microscopia de força atômica (AFM) o substrato utilizado foi a mica, previamente clivada com fita adesiva para obter-se uma superfície o mais uniforme possível e livre de impurezas. Foi utilizado o equipamento de microscopia de força atômica (Bruker-

Dimension Icon Scan Asyst) do Instituto de Física de São Carlos. Os ensaios foram realizados em parceria com o Prof. Dr. Roberto Mendonça Faria e Dr. Marcelo de Assunção Pereira da Silva.

As amostras foram diluídas em água ultra pura na proporção de 1:100 e a técnica utilizada foi a de “gotejamento” na qual 10 µL da diluição foi gotejada sobre a mica e a amostra foi seca por um período de 20 minutos na temperatura de  $22 \pm 3^\circ\text{C}$  antes dos ensaios. O ensaio foi conduzido em operação de “não contato” com sondas de silicone e cantilever triangular, com frequência de varredura de 1Hz.

As amostras analisadas por AFM foram as NLS sem e contendo fármaco (2, 3, 5, 10 e 15% de IBU).

#### **3.2.4.1 Avaliação da estabilidade das nanopartículas lipídicas sólidas sem e com ibuprofeno**

A estabilidade física da NLS sem fármaco e NLS com 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU foram avaliadas por um período de 1, 7, 30, 45 e 60 dias pelas medidas de diâmetro médio e potencial zeta após armazenamento a temperatura ambiente ( $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ). As análises foram feitas em triplicata com 10 determinações de diâmetro médio, Pdi e potencial zeta para cada uma delas. Foram calculados os valores médios e os respectivos desvios padrões.

#### **3.2.5 Análise térmica**

##### **3.2.5.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

Foram obtidas curvas DSC em atmosfera de nitrogênio (50 mL/min), em equipamento TA (modelo: DSC Q100). Primeiramente as amostras foram passadas em um granulometro com abertura livre de 0,59 mm e malha 28, para uniformizar o tamanho das partículas. Pesou-se 4-5mg da amostra e adicionou-se em cadinho de alumínio com tampa e como referência um similar vazio. A condição operacional seguiu os seguintes procedimentos: razão de aquecimento e resfriamento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  no intervalo de 0 a  $120^\circ\text{C}$ . Convencionalmente adotou-se como exotérmico a disposição dos picos indicados no sentido ascendente.

As amostras analisadas por DSC foram o ibuprofeno, as matérias primas GMS, FSH e P-188, misturas físicas (GMS/IBU, FSH/IBU, P-188/IBU) com 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU, mistura física sem fármaco (P-188/GMS/FSH) e com concentração crescente de IBU e NLS liofilizadas com e sem o fármaco.

Para a liofilização, alíquotas de 5mL das dispersões de NLS com e sem fármaco foram congeladas por 3 horas a  $-80 \pm 0,2^\circ\text{C}$  e em seguida foram liofilizada por mais 60 horas no equipamento JJ Científica, modelo LJJ04.

Os cálculos de entalpia ( $\Delta H$ ) obtidos foram feitos empregando o “software” TA Instruments Universal Analysis 2000 e o  $\Delta H$  esperado foi calculado pela equação 6.

$$ci = \frac{100}{i(\%)} \qquad \Delta H \text{ esperado} = \frac{\Delta H \text{ obtido}}{ci} \qquad \text{Equação 6}$$

No qual:  $i(\%)$  = concentração ponderal percentual do componente na mistura.

### 3.2.5.2 Termogravimetria (TG)

As curvas TG foram obtidas empregando a termobalança modelo SDT Q600 TA Instruments sob atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$ . Realizou a granulometria das amostras em tamis com abertura livre de 0,59 mm e malha 28. Foram adicionadas 4-5 mg das amostras em cadinho de platina. As condições operacionais utilizadas foram: razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  no intervalo de temperatura ambiente a  $600^\circ\text{C}$ , com vazão média de 50 mL/min. Os cálculos de perda de massa e termogravimetria derivada (DTG) foram feitos empregando o “software” TA Instruments Universal Analysis 2000.

As amostras analisadas para a determinação das curvas termogravimétricas foram o IBU, matérias primas isoladas GMS, P-188 e FSH, MF sem e com fármaco (P-188/GMS/FSH) e a NLS liofilizada sem e contendo fármaco (2, 3, 5, 10 e 15%). As NLS foram liofilizadas pelo mesmo procedimento descrito no item 3.2.5.1.

### 3.2.6 Avaliação da solubilidade do IBU em tampão fosfato de potássio 0,1M; pH 7,4

Para a realização do teste de solubilidade do IBU em tampão fosfato de potássio 0,1M; pH 7,4; excesso do fármaco foi adicionado ao meio para garantir a saturação, e mantido sob agitação em homogeneizador rotatório por 48 horas. Em seguida foi centrifugado a 3000 rpm por 10 min. Coletou-se o sobrenadante, filtrou-se em filtro com poro de  $0,45 \mu\text{m}$  e foi analisado por espectrofotometria UV-VIS em 223 nm. A determinação da concentração do fármaco solúvel no meio foi obtida a partir da respectiva curva analítica do IBU através da validação do método descrito no item 3.2.2.



. As análises foram feitas em triplicata.

### 3.2.7 Estudo *in vitro* de liberação do ibuprofeno incorporado nas NLS

O estudo de liberação foi realizado no equipamento Microette Plus (HANSON Microette, 0700-1251), utilizando células de difusão vertical tipo “Franz”.

Para este teste foi utilizado membrana sintética de acetato de celulose com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e como meio receptor o tampão fosfato de potássio 0,1 M; pH 7,4; que foi previamente validado quanto a condição *sink* conforme descrito no item 3.2.6.

Primeiramente o compartimento receptor foi preenchido com 7 mL de solução receptora, colocou a membrana sintética, hidratada previamente com água por um período de aproximadamente 12 horas, entre o compartimento doador e receptor da célula de difusão. Alíquotas de 300  $\mu\text{L}$  da formulação foram colocadas no anel dosador com área de exposição de 1,77  $\text{cm}^2$ . A solução receptora foi agitada a 300 rpm por meio de agitador magnético e mantida à  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  por banho circulante.

Foi utilizado no experimento seis células de difusão de Franz modificada. Alíquotas de 2 mL foram coletadas nos intervalos de  $\frac{1}{2}$ , 1, 2, 4, 8, 10, 12, 18 e 24 horas para avaliar a cinética de liberação, sendo que o mesmo volume da solução receptora fresca foi repostado. Um volume de 0,8 mL foi desprezado antes do início de cada coleta. O volume coletado e o volume desprezado foram utilizados nos cálculos da quantidade real liberada por tempo em função da área de exposição.

A quantificação do IBU na solução receptora foi realizada por espectrofotometria UV-VIS em 223 nm, utilizando a curva analítica obtida do fármaco, levando em consideração o fator de diluição, através da validação do método descrito no item 3.2.2.

As amostras analisadas no estudo *in vitro* de liberação foi as NLS contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU.

O perfil de liberação foi avaliado, seguindo modelos matemáticos para determinação da ordem de reação, seguindo modelos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Weibull e Hixson-Crowell. Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) da fração linear das curvas de liberação foram estabelecidos pela inclinação da reta obtida por regressão linear (AULTON, 2005).

A quantidade real de fármaco liberado (Q real) em determinado tempo, foi determinada equação 7:

$$Q_{\text{real}, t} = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c \quad \text{Equação 7}$$

Na qual:

$Q_{\text{real}, t}$  = quantidade real liberada referente ao tempo  $t$ ;

$C_t$  = concentração obtida referente ao tempo  $t$ ;

$V_r$  = Volume da solução receptora (7ml);

$C_c$  = concentração de amostragem anterior;

$V_c$  = volume amostrado (coletado + limpeza).

---

*RESULTADOS  
E DISCUSSÃO*

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1.1 Estudo de solubilidade do ibuprofeno em diferentes lipídios

O teste de solubilidade do IBU foi realizado com 6 lipídios diferentes com a finalidade de selecionar o lipídio mais adequado para o desenvolvimento da NLS que permitisse maior eficiência de encapsulação do fármaco.

**Tabela 1.** Estudo de solubilidade utilizando o Ácido esteárico, Imwitor<sup>®</sup> 900 e Precirol<sup>®</sup> ATO5

% IBU	Ácido esteárico 15 min	Imwitor <sup>®</sup> 900 15 min	Precirol <sup>®</sup> ATO5 15 min
2	+	+	+
5	+	+	+
10	+	+	+
15	+	+	+
20	+	+	+
30	+	+	+

(+): Solúvel; (-): Presença de cristais de IBU

A tabela 1 apresenta a solubilidade do IBU no ácido esteárico (ácido octadecanóico), Imwitor<sup>®</sup> 900 (monoestearato de glicerila) e Precirol<sup>®</sup> ATO5 (palmitoestearato de glicerila). Observou-se que o IBU foi solúvel em todas as concentrações em 15 min devido a formação de uma mistura homogênea, enquanto que os outros lipídios solubilizaram o IBU em tempos crescentes, na qual podem ser observados na tabela 2, 3 e 4. Estes resultados podem ser atribuídos não só à elevada afinidade do IBU com as cadeias do ácido esteárico ou dos seus respectivos ésteres (Imwitor<sup>®</sup> 900, Precirol<sup>®</sup> ATO5), mas principalmente pela interação dos grupos carboxílicos do IBU, com as hidroxilas livres dos glicerídeos presentes na cadeia lipídica (KUNTSCHKE e MÄDER, 2010).

Nas tabelas 2, 3 e 4 é possível observar o perfil de solubilidade do IBU no Witepsol<sup>®</sup> E85 (triglicerídeo de ácido graxo), Dynasan<sup>®</sup> 114 (trimiristina) e Softisan<sup>®</sup> 100 (cocoglicerídeo hidrogenado).

**Tabela 2.** Estudo de solubilidade do IBU utilizando o Witepsol<sup>®</sup> E85

<b>% IBU</b>	<b>15 min</b>	<b>30 min</b>	<b>45 min</b>	<b>60 min</b>
<b>2</b>	+	+	+	+
<b>5</b>	+	+	+	+
<b>10</b>	-	-	+	+
<b>15</b>	-	-	-	-
<b>20</b>	-	-	-	-
<b>30</b>	-	-	-	-

(+): Solúvel; (-): Presença de cristais de IBU

**Tabela 3.** Estudo de solubilidade do IBU utilizando o Dynasan<sup>®</sup> 114

<b>% IBU</b>	<b>15 min</b>	<b>30 min</b>	<b>45 min</b>	<b>60 min</b>
<b>2</b>	+	+	+	+
<b>5</b>	+	+	+	+
<b>10</b>	-	+	+	+
<b>15</b>	-	-	-	+
<b>20</b>	-	-	-	+
<b>30</b>	-	-	-	+

(+): Solúvel; (-): Presença de cristais de IBU

**Tabela 4.** Estudo de solubilidade do IBU utilizando o Softisan<sup>®</sup> 100

<b>% IBU</b>	<b>15 min</b>	<b>30 min</b>	<b>45 min</b>	<b>60 min</b>
<b>2</b>	+	+	+	+
<b>5</b>	+	+	+	+
<b>10</b>	-	+	+	+
<b>15</b>	-	-	-	+
<b>20</b>	-	-	-	+
<b>30</b>	-	-	-	+

(+): Solúvel; (-): Presença de cristais de IBU

Analisando os valores apresentados nas tabelas 2, 3 e 4 podemos verificar que conforme aumentou-se a concentração do fármaco a solubilização foi mais lenta. Na tabela 2 observa-se que as concentrações de 15, 20 e 30% de IBU não foram solúveis no lipídio Witepsol<sup>®</sup> E85, na qual observou-se a presença de uma mistura imiscível. O Dynasan<sup>®</sup> 114 e Softisan<sup>®</sup> 100 solubilizaram a concentração de 15, 20 e 30% de IBU no tempo de 60 min como pode ser observado na tabela 3 e 4.

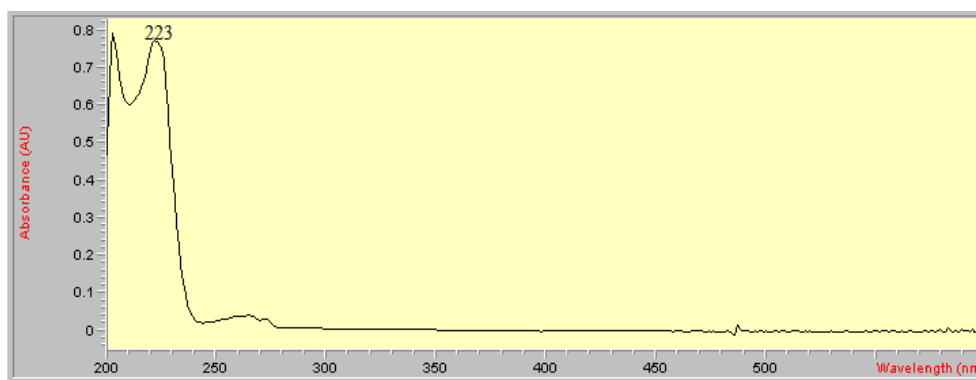
Deste modo, devido à solubilização mais rápida de todas as concentrações de IBU no ácido esteárico, Imwitor<sup>®</sup> 900 e Precirol<sup>®</sup> ATO5, estes podem ser os lipídios de escolha para o desenvolvimento de uma NLS com elevadas concentrações de fármaco permitindo assim maior eficiência de encapsulação.

O monoestearato de glicerila, conhecido com o nome comercial de Imwitor<sup>®</sup> 900, foi o selecionado para o desenvolvimento das NLS contendo IBU devido ao custo baixo e de fácil obtenção. Além de que este lipídio já foi testado com sucesso para administração oral por MÜLLER e colaboradores (2006) que avaliaram *in vivo* o aumento da biodisponibilidade oral da ciclosporina incorporada nas nanopartícula lipídica sólida utilizando Imwitor<sup>®</sup> 900 como fase lipídica.

#### 4.1.2 Padronização da metodologia analítica para quantificação do ibuprofeno por espectrofotometria UV-Visível.

Foi feita a varredura da solução de IBU em tampão fosfato de potássio 0,1M; pH 7,4. O pico de máxima absorção de IBU na concentração de 20 µg/mL foi verificado em 223nm conforme pode ser observado na figura 6.

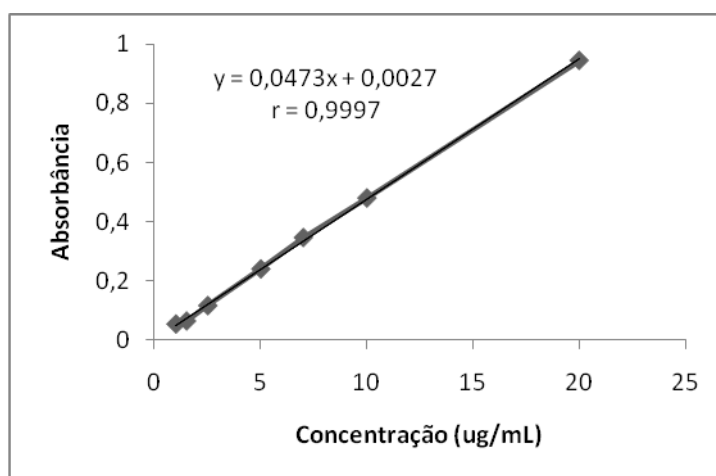
**Figura 6.** Espectro de varredura do IBU em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,4, por espectrofotometria UV-Visível entre o comprimento de onda de 200 e 600 nm.



#### 4.1.2.1 Linearidade

A Figura 7 apresenta a curva analítica obtida para o IBU, na faixa de concentração de 1 a 20 µg/mL, determinado por espectrofotometria no UV/Vis, no comprimento de onda de 223 nm. A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, é:  $y = 0,0473x + 0,0027$ , com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9997. O critério mínimo aceitável pela ANVISA (2003) é  $(r) = 0,99$ .

**Figura 7.** Representação gráfica da curva analítica do IBU por espectrofotometria na região do UV-Visível



#### 4.1.2.2 Precisão

Os resultados encontrados para a análise da precisão (intradia e interdia) mostraram desvio padrão relativos (DPR%) menores que 5%, conforme pode ser verificado nos valores que se encontram nas tabelas 5 e 6.

**Tabela 5.** Valores obtidos na determinação da precisão intracorrida (n=3)

Concentração teórica em µg/ml	Média da Concentração encontrada	DP*	DPR (%)**
1	1,09	0,01	0,75
5	4,92	0,08	1,65
20	20,03	0,05	0,26

\*DP: desvio padrão

\*\*DPR: desvio padrão relativo

**Tabela 6.** Valores obtidos na determinação da precisão intercorrida (n=3)

Concentração teórica em ug/ml	Média da Concentração encontrada	DP*	DPR (%)**
1	1,08	0,02	1,58
5	4,98	0,05	0,94
20	19,76	0,04	0,20

\*DP: desvio padrão

\*\*DPR: desvio padrão relativo

#### 4.1.2.3 Exatidão

A exatidão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro. O resultado expresso pelo limite de recuperação demonstrou exatidão do método de 100,20%, como podem ser constatado pelos resultados que se encontram na tabela 7.

**Tabela 7.** Determinação da exatidão de metodologia analítica para quantificação do IBU (n=3)

Concentração média teórica (µg/mL)	Concentração média real (µg/ml)	Exatidão (%)	Média Exatidão (%)	DPR*
1	1,02	102,1%		
5	4,95	99,1%	100,20	1,65
20	19,88	99,4%		

\*DPR: desvio padrão relativo.

#### 4.1.2.4 Limite de Detecção e Quantificação

O LD calculado para o método analítico foi de 0,222 µg/mL enquanto que o LQ foi de 0,671 µg/mL.

#### 4.1.3 Desenvolvimento das NLS

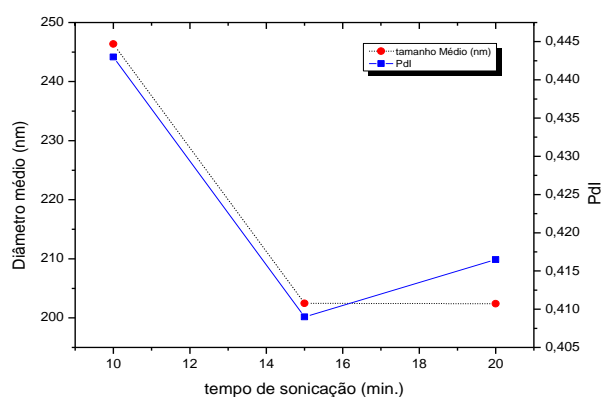
As NLS foram desenvolvidas pelo método de sonicação sendo preparada 5 ml de formulação total. A porcentagem de IBU incorporada nas NLS está diretamente relacionada à concentração em massa de lipídio.

Inicialmente, para o desenvolvimento das NLS por sonicação foi realizado um estudo preliminar para avaliar o melhor tempo de sonicação. O diâmetro médio e Pdi das NLS foram comparados nos tempos de 10, 15 e 20 min de sonicação. Na Figura 8 pode-se observar que



com o aumento do tempo de sonicação ocorreu diminuição no diâmetro e Pdi das partículas. Para os tempos entre 15 e 20 minutos pode se verificar que o diâmetro e o Pdi estão muito próximos e praticamente constantes. Portanto, o tempo de 15 minutos foi escolhido para o desenvolvimento das NLS, conforme citado anteriormente, pois neste intervalo não ocorreu redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) do diâmetro médio e Pdi das nanopartículas.

**Figura 8.** Comparação do diâmetro médio de partícula e Pdi das NLS sem fármaco aplicando tempos de sonicação de 10, 15 e 20 minutos



As concentrações de fármaco utilizadas para o desenvolvimento das nanopartículas foram de 2, 3, 5, 10, 15, 20 e 30% em relação à massa lipídica, porém as NLS com concentrações de 20 e 30% de IBU apresentaram separação de fase após centrifugação para retirada do titânio residual. Sendo assim, não foi possível prosseguir os estudos com estas concentrações.

As formulações desenvolvidas utilizadas neste estudo contendo porcentagem crescente de fármaco estão representadas na tabela 8.

**Tabela 8.** Composição das Nanopartículas Lipídicas Sólidas

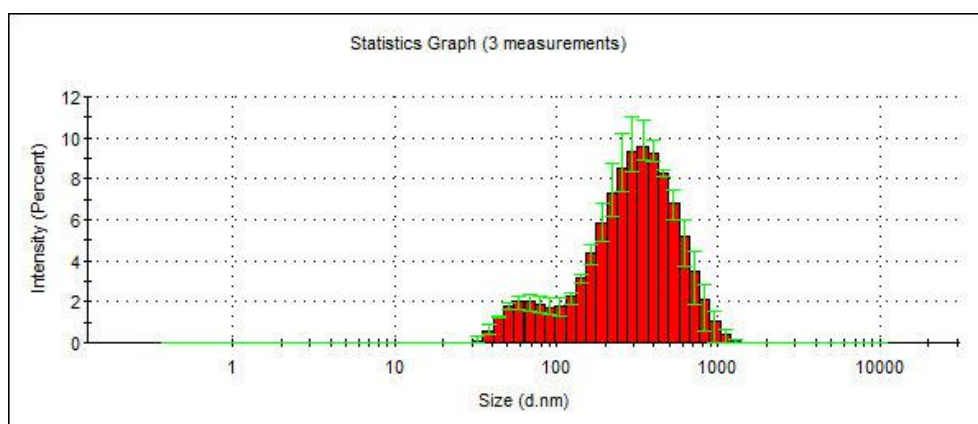
Formulações com %IBU	Composição (p/v) (%)				
	IBU	GMS	FSH	P-188	ÁGUA q.s.p.
NLS 2	0,10	4,90	1,50	1,50	100
NLS 3	0,15	4,85	1,50	1,50	100
NLS 5	0,25	4,75	1,50	1,50	100
NLS 10	0,50	4,50	1,50	1,50	100
NLS 15	0,75	4,25	1,50	1,50	100

## 4.2 RESULTADO DA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NLS

### 4.2.1 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas lipídicas sólidas

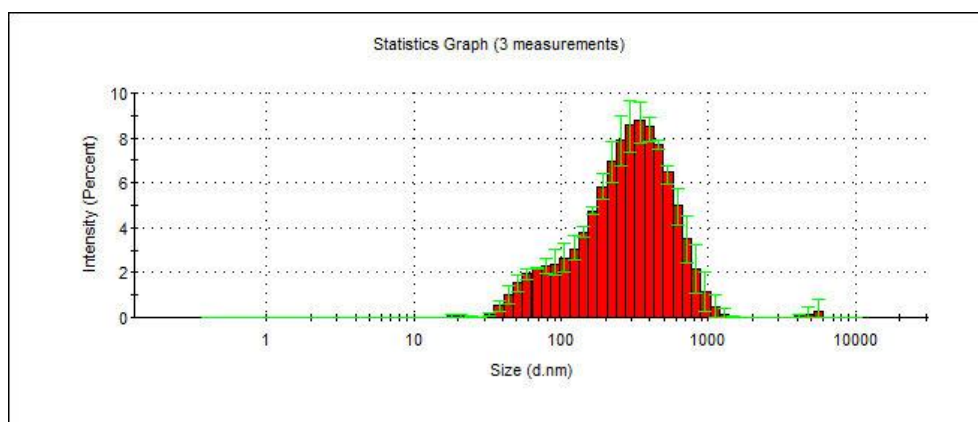
As figuras 9 a 14 representam os resultados da distribuição do diâmetro médio em função da intensidade de espalhamento de luz das NLS sem e contendo fármaco. As análises foram realizadas 1 dia após a obtenção das NLS. As medidas foram feitas em triplicata para cada uma delas, e os valores médios e desvios padrão foram calculados.

**Figura 9.** Distribuição do diâmetro médio das NLS sem fármaco

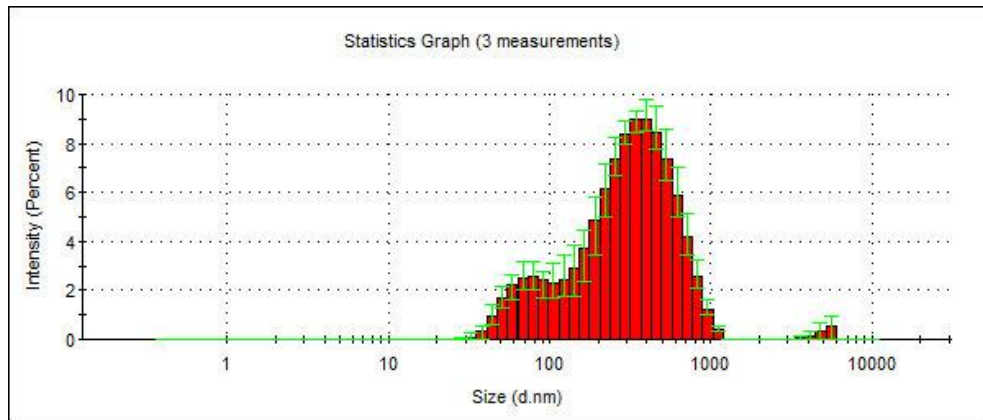


Conforme ilustrado na Figura 9, a NLS sem fármaco apresentou distribuição bimodal de diâmetro de partículas. O maior pico apresentou 315,5 nm com intensidade de 90,1% e o menor pico apresentou 56,19 nm com intensidade de 9,9%. A média dos resultados do diâmetro de partícula foi de 203,00 nm e Pdi 0,438.

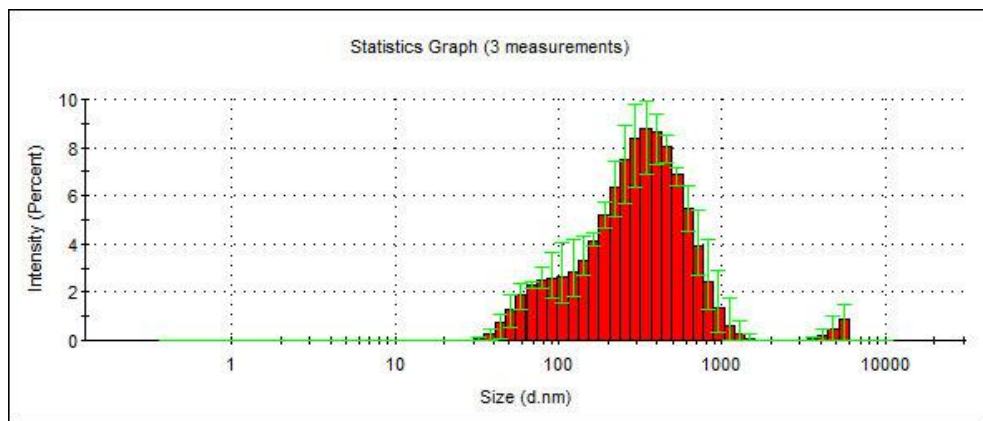
**Figura 10.** Distribuição do diâmetro médio das NLS contendo 2% IBU



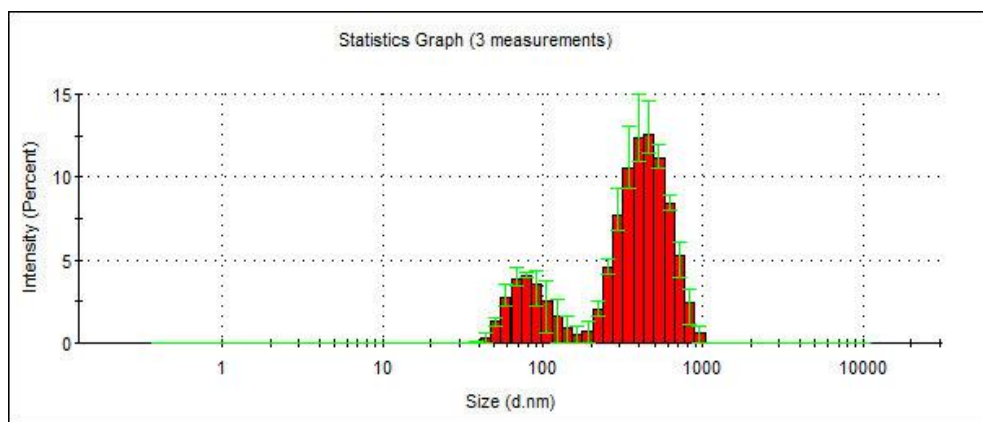
**Figura 11.** Distribuição do diâmetro médio das NLS contendo 3% IBU

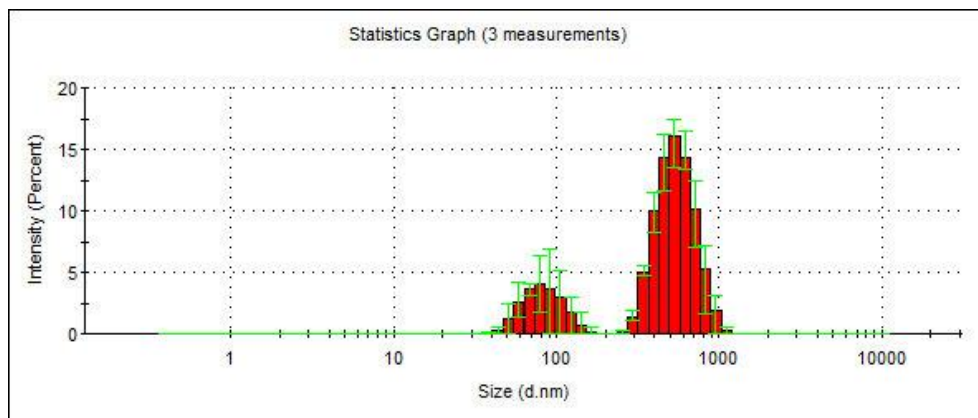


**Figura 12.** Distribuição do diâmetro médio das NLS contendo 5% IBU



**Figura 13.** Distribuição do diâmetro médio das NLS contendo 10% IBU



**Figura 14.** Distribuição do diâmetro médio das NLS contendo 15% IBU

Pode-se observar nas figuras 10 a 12 que a distribuição do diâmetro médio das nanopartículas contendo fármaco nas concentrações de 2, 3 e 5 % respectivamente, apresentaram uma distribuição trimodal de tamanhos e podemos identificar uma pequena intensidade de partículas em escalas micrométricas. Segundo UNER (2006), a qualidade da dispersão das NLS produzidas pela técnica tradicional de sonicação é muitas vezes afetada pela presença de micropartículas, o que não acontece com outras técnicas modernas. Porém a sonicação não envolve a utilização de solventes orgânicos e não se utiliza grande quantidade de surfactante, fato vantajoso quando se pensa em desenvolver a formulação em um laboratório de pesquisa científica, já que é uma técnica simples, barata e geralmente o equipamento é disponível em muitos laboratórios.

Vários estudos vêm sendo desenvolvidos por grupos de pesquisadores para melhorar a estabilidade da dispersão das nanopartículas obtidas pela técnica de sonicação. HOU e colaboradores (2003) modificaram o método de sonicação para obtenção de nanopartículas lipídica sólida contendo mifepristone, na qual o lipídio foi aquecido a temperatura de aproximadamente  $80^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  e posteriormente a fase aquosa foi aquecida na mesma temperatura e vertida sobre a fase oleosa, resfriando-se a dispersão à temperatura refrigerada ( $10^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) para obtenção das NLS. Desta forma, os autores verificaram que com a modificação do método foi possível preparar sistema de NLS com tamanhos menores e baixo índice de polidispersidade.

Para a NLS contendo 10 e 15% de IBU a distribuição é bimodal, porém observa-se uma maior intensidade de nanopartículas lipídicas sólidas com diâmetro maiores comparados as NLS contendo 2, 3 e 5% de IBU, esse resultado pode ser observado nas figuras 13 e 14. As NLS contendo 10% de IBU apresentaram um pico menos intenso com partículas de 71,46 nm

com intensidade de 16,4% e outro mais intenso com partícula de 436,6 nm com intensidade de 83,6%. A concentração 15% de IBU apresentou pico menor com diâmetro médio da NLS de 64,05 nm com intensidade de 12,8% e um pico maior com diâmetro médio da nanopartícula de 471,4 nm com intensidade de 87,2%.

Na tabela 9 encontram-se os resultados da análise de diâmetro médio da partícula, Pdi e Pz da NLS sem fármaco e NLS contendo diferentes concentrações de IBU (2, 3, 5, 10 e 15%). As medidas foram feitas em triplicata para cada uma delas, Os valores entre parênteses representam o desvio padrão da amostragem em triplicata.

**Tabela 9.** Valores obtidos na análise do diâmetro médio da partícula, Pdi e potencial zeta (Pz) com os respectivos desvio padrão

Formulação	Diâmetro Médio de Partícula (nm)	Pdi	Potencial Zeta (mV)
NLS sem fármaco	223,4 ( $\pm 2,81$ )	0,438 ( $\pm 0,015$ )	- 30,0 ( $\pm 0,51$ )
NLS 2%IBU	210,6 ( $\pm 2,11$ )	0,423 ( $\pm 0,005$ )	-26,8 ( $\pm 0,25$ )
NLS 3%IBU	226,3 ( $\pm 8,20$ )	0,389 ( $\pm 0,050$ )	-30,4 ( $\pm 0,60$ )
NLS 5%IBU	231,4 ( $\pm 1,48$ )	0,430 ( $\pm 0,003$ )	-18,4 ( $\pm 0,67$ )
NLS 10%IBU	272,7 ( $\pm 8,62$ )	0,458 ( $\pm 0,070$ )	-19,3 ( $\pm 0,61$ )
NLS 15%IBU	312,1 ( $\pm 10,15$ )	0,520 ( $\pm 0,100$ )	-21,7 ( $\pm 0,47$ )

Pode-se observar nos resultados encontrados na tabela 9 que o diâmetro médio das NLS com menores concentrações de fármaco (2 e 3%) não possui diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação a NLS sem fármaco. Porém ocorreu um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) no diâmetro médio das nanopartículas em função do aumento da concentração de fármaco nas formulações contendo 5, 10 e 15%.

O índice de polidispersividade das formulações foram maiores que 0,3 indicando que o sistema possui dispersão heterogênea, pois, segundo MEHNERT e MADER (2001), somente Pdi menores que 0,3 podem ser considerados sistema homogêneos. Não houve variância significativa ( $p > 0,05$ ) do Pdi nas formulações em relação ao aumento da concentração de fármaco.

O resultado do Pz mostrou que as NLS sem fármaco apresentaram Pz de -30 mV. As NLS contendo 2 e 3% de fármaco apresentaram Pz parecido com o da NLS sem fármaco, porém com o aumento da concentração de IBU nas formulações houve diminuição do potencial zeta (Tabela 9). Sabe-se que o Pz é uma medida de carga elétrica da superfície da partícula muito

utilizado para caracterização das NLS, pois prevê a estabilidade de sistemas coloidais. O valor de Pz maiores que  $\pm 30$  mV indica de modo geral a presença de estabilidade termodinâmica do sistema em longo prazo (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; UNER, 2006). Assim, neste caso, o Pz das NLS contendo 5, 10 e 15% de IBU comparada com as outras concentrações, possui tendência de menor estabilidade do sistema nesta faixa de concentração. Porém esta regra não pode ser aplicada irrestritamente, pois a utilização de estabilizante estereoquímico na formulação pode resultar em um potencial zeta menor e não é por isto que a formulação não é estável (MÜLLER *et al.*, 1996).

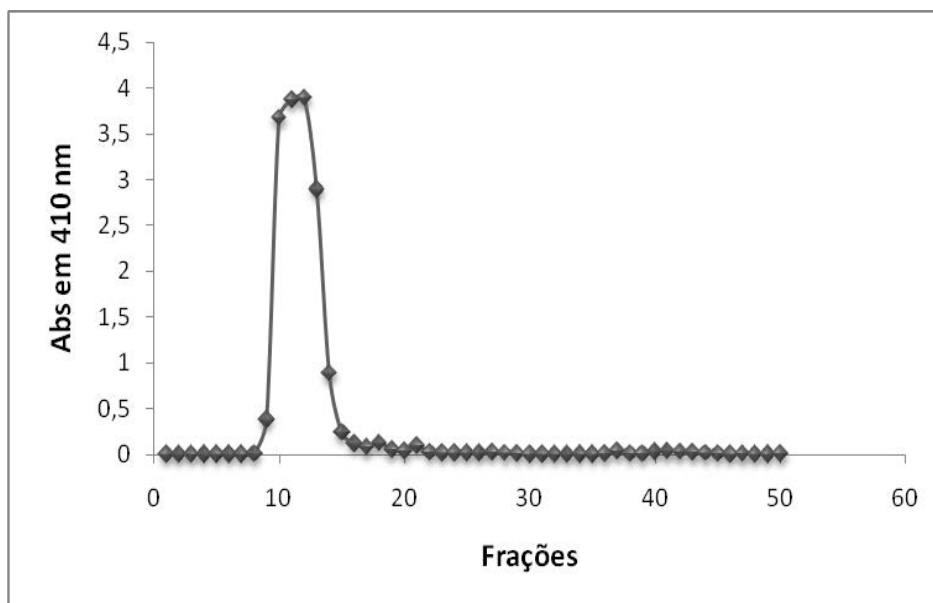
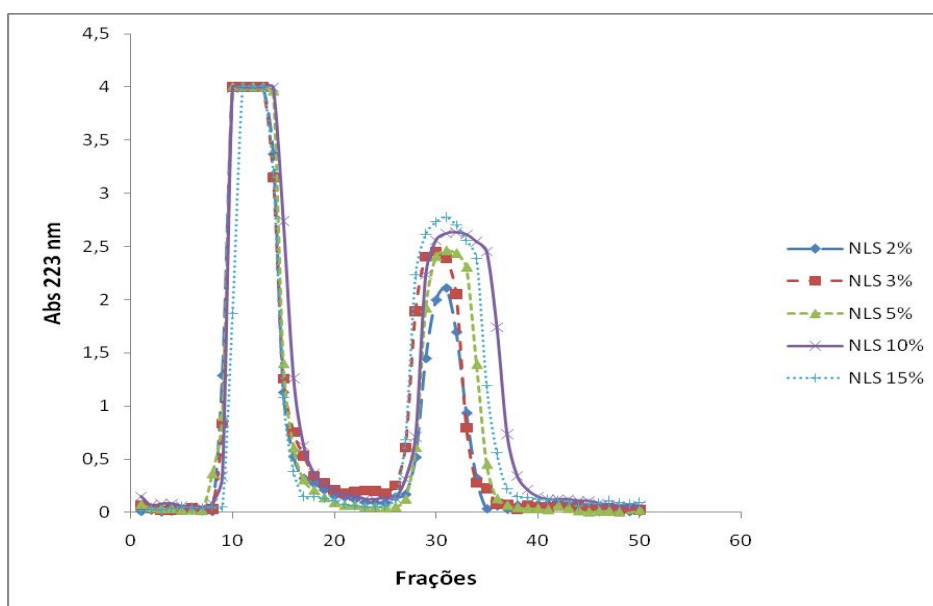
Outro fato é que o uso de fosfolipídio (como a fosfatidilcolina) na fase oleosa e um estabilizante estereoquímico (por exemplo, o poloxamer) na fase aquosa externa da formulação, forma uma barreira mecânica e/ou elétrica que impede a coalescência das partículas durante a sua formação e também a sua agregação durante o armazenamento, quando comparado com formulações que contêm apenas um tensoativo (YANG *et al.*, 1999).

#### 4.2.2 Eficiência de Encapsulação e Capacidade de Carga

Na cromatografia por exclusão conhecida também como “filtração em gel”, “permeação em gel” ou “cromatografia em peneira molecular de difusão restrita” as estruturas maiores eluem mais rapidamente, enquanto que as menores ficam retidas no gel, tendo sua eluição retardada. Trata-se de uma técnica simples, que permite o uso de diferentes solventes e temperaturas e possibilita a separação de substâncias com massas molares abaixo de 1.000 ou de vários milhões, quando se varia a matriz do gel (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

As figuras 15 e 16 mostram a absorvância das 50 frações recolhidas após eluição pela coluna de Sephadex G-25 saturada com NLS isenta de fármaco e tampão fosfato de potássio 0,1M; pH 7,4 como eluente. A eluição da NLS pode ser observada no comprimento de onda de 410 nm, enquanto que o IBU é visualizado em 223 nm. O comprimento de onda de 410 nm foi escolhido, pois permite observar o espalhamento de luz das nanopartículas.

Desta forma, observa-se na figura 16 um pico de eluição nas frações recolhidas de 10 a 18, que corresponde a eluição das NLS sem fármaco. Em seguida de modo mais lento, ocorre a saída do IBU não encapsulado nas NLS nas frações recolhidas de 25 a 35.

**Figura 15.** Perfil de eluição de NLS isenta de fármaco,  $\lambda = 410$  nm**Figura 16.** Perfil de eluição de NLS contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU,  $\lambda = 223$  nm

A cromatografia de exclusão em gel utilizando Sephadex G-25 mostrou-se eficiente na separação do fármaco não encapsulado para todas as formulações.

Após separação do fármaco livre das NLS contendo fármaco encapsulado foi possível reunir as frações contendo ibuprofeno livre, que foram analisadas no comprimento de onda de 223 nm e quantificadas por espectrofotometria UV-VIS. A absorbância obtida foi aplicada a equação da reta da curva analítica do IBU, levando em consideração o fator de diluição, para

determinação da quantidade de fármaco livre. Foi calculada também a eficiência de encapsulação (EE%) e capacidade de carga (CC%) para as NLS contendo fármaco.

Na tabela 10 encontram-se os valores obtidos para a (EE%) e a (CC%) das NLS com diferentes concentrações de fármaco, na qual as concentrações de IBU em “%” representam a quantidade relativa de IBU em relação à quantidade de lipídio na formulação.

**Tabela 10.** Valores obtidos para a eficiência de encapsulação (EE%) e capacidade de carga (CC%) das NLS com fármaco, (n=3)

IBU (%)	EE%	CC%
2	60,04 ( $\pm 0,89$ )	0,12% ( $\pm 0,12$ )
3	59,48 ( $\pm 3,01$ )	0,18% ( $\pm 0,89$ )
5	59,78 ( $\pm 3,61$ )	0,32% ( $\pm 0,20$ )
10	71,81 ( $\pm 2,47$ )	0,80% ( $\pm 1,52$ )
15	72,53 ( $\pm 2,52$ )	1,28% ( $\pm 1,78$ )

Observa-se na tabela 10 que a eficiência de encapsulação foi aproximadamente de 60 à 72% conforme aumentou-se a concentração de fármaco no sistema. Segundo DINGLER e colaboradores (1999), a capacidade de encapsulação das NLS pode ser superior a 50% em caso de fármacos lipofílicos. Portanto os resultados obtidos da EE % estão de acordo com dados da literatura.

Os valores de EE % para as concentrações de fármaco de 2, 3 e 5%, não apresentaram diferença significativa entre si ( $p > 0,05$ ). Nas concentrações de 10 e 15% de fármaco ocorreu aumento significativo da EE% ( $p \leq 0,05$ ) comparada com as concentrações de 2, 3 e 5% de IBU. Conforme aumenta a concentração de fármaco de 10 e 15%, aumentam a EE (%) e também a capacidade de incorporação do fármaco em relação à quantidade total de lipídio na formulação.

Vale ressaltar que a quantidade de IBU encapsulada na formulação de 10 e 15% é maior que na de 2, 3 e 5% simplesmente por ter sido adicionada maior quantidade de fármaco ao processo de produção das NLS.

#### 4.2.3 Microscopia de Força Atômica

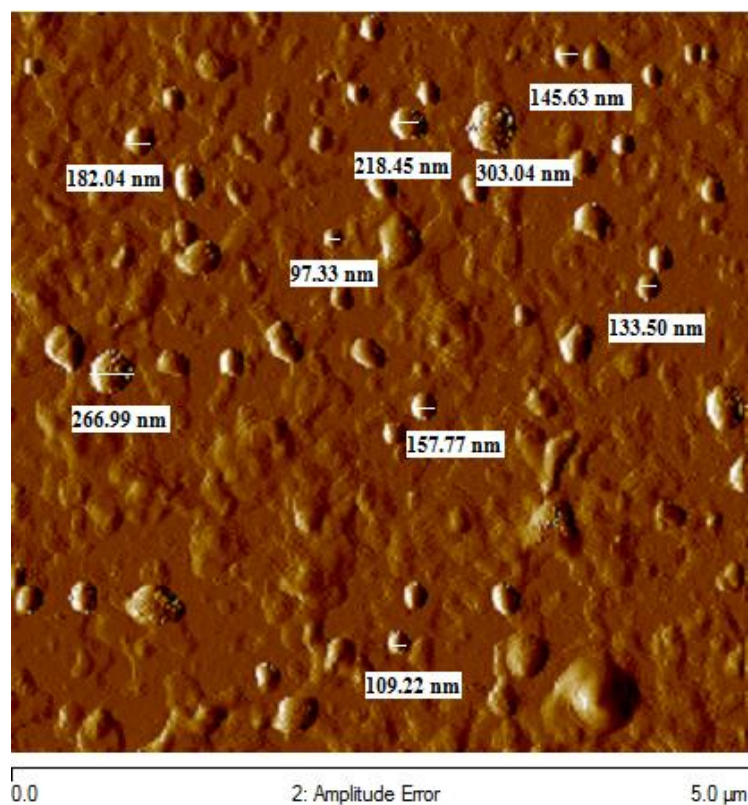
A microscopia de Força Atômica (AFM) foi realizada a fim de verificar a morfologia e o tamanho das nanopartículas lipídicas sólidas. Esta técnica possui a vantagem de não precisar



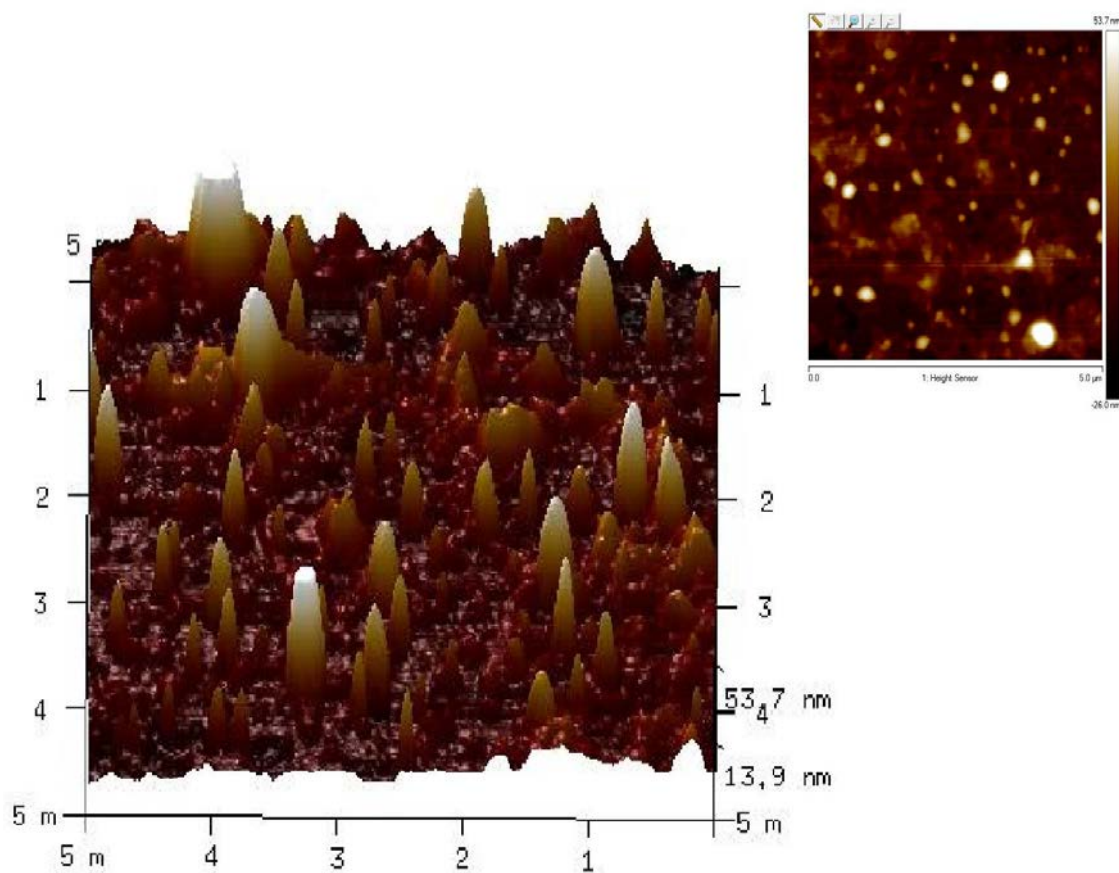
fazer pré-tratamento da amostra, não existe necessidade de recobrimento com material indutivo, não se utiliza vácuo, permite quantificação direta da rugosidade da amostra e fornece informações com alta resolução, em três dimensões e em escala nanométrica, porém o método de deposição utilizado para a AFM faz com que as NLS formem pequenos aglomerados (DUBES *et al.*, 2003; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A Figura 17 mostra a imagem da amplitude da AFM obtida da NLS sem fármaco. O tamanho de partícula obtido na análise morfológica da NLS sem fármaco apresenta resultado próximo ao obtido no espalhamento de luz. Foi possível observar que as partículas apresentam formato anisométrico, ou seja, irregular (Teeranachaideekul *et al.*, 2007; Teeranachaideekul *et al.*, 2008). Observa-se na imagem a heterogeneidade do sistema, que ilustra a característica bimodal da amostra, com distribuição de tamanho que varia entre 97,33 a 303,04 nm.

**Figura 17.** Imagem de amplitude de AFM da NLS sem fármaco na escala de 5,0  $\mu\text{m}$



**Figura 18.** Imagem topográfica da NLS sem fármaco na escala de 5,0  $\mu\text{m}$

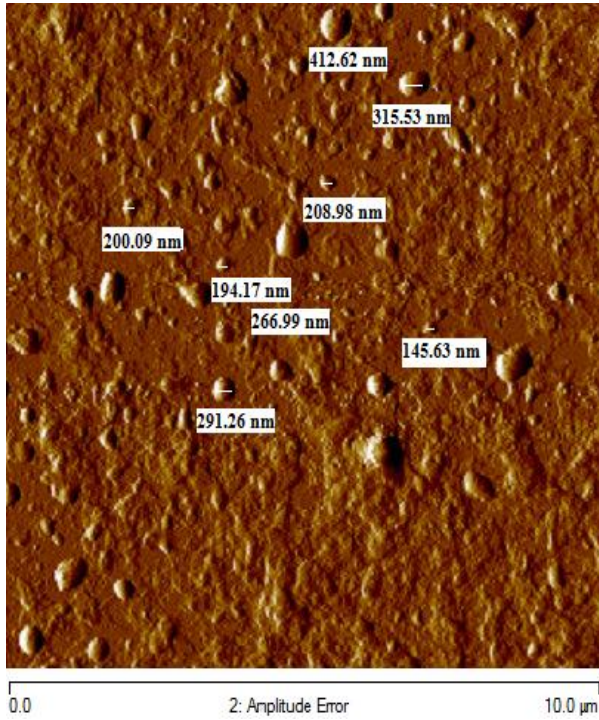


Na imagem topográfica da figura 18 da NLS sem fármaco, obtida pela AFM foi possível observar que a altura máxima das nanopartículas foi de 53,7 nm, porém o diâmetro médio apresentado na imagem de amplitude (Figura 17) é maior. Isto pode ser devido as NLS não apresentarem uma matriz completamente rígida e com isto espalham-se e achatam-se sobre o substrato da mica aumentando de tamanho. (WESTESEN e SIEKMANN, 1997; BUNJES; STEINIGER; RICHTER, 2007).

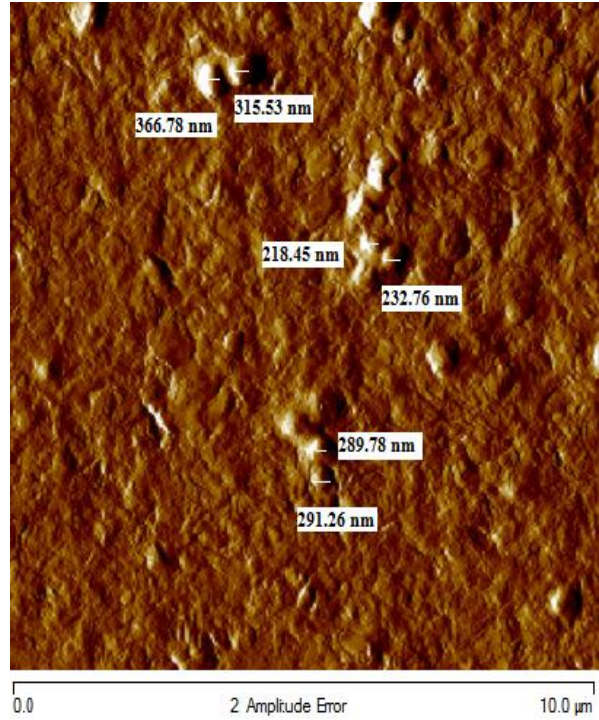
A Figura 19 apresenta as imagens das nanopartículas contendo fármaco em que A, B, C, D e E representam as concentrações de 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU respectivamente.

**Figura 19.** Imagem de amplitude de AFM da NLS contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU na escala de 10,0  $\mu\text{m}$

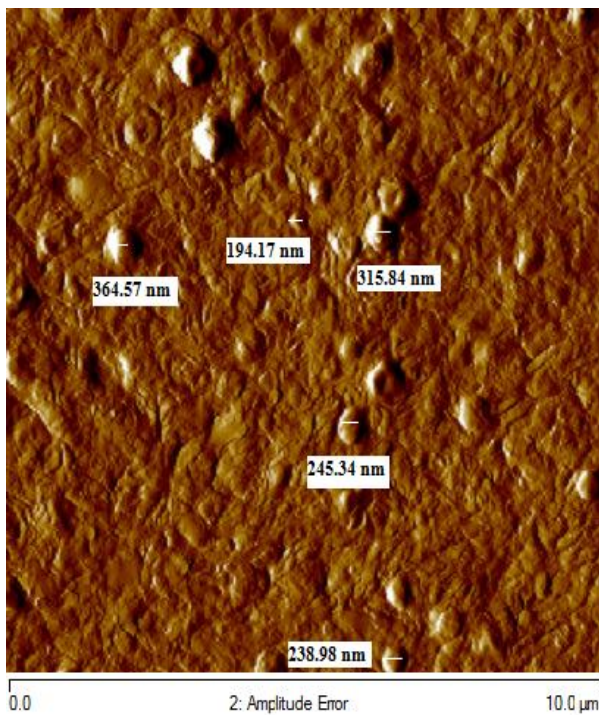
(A)



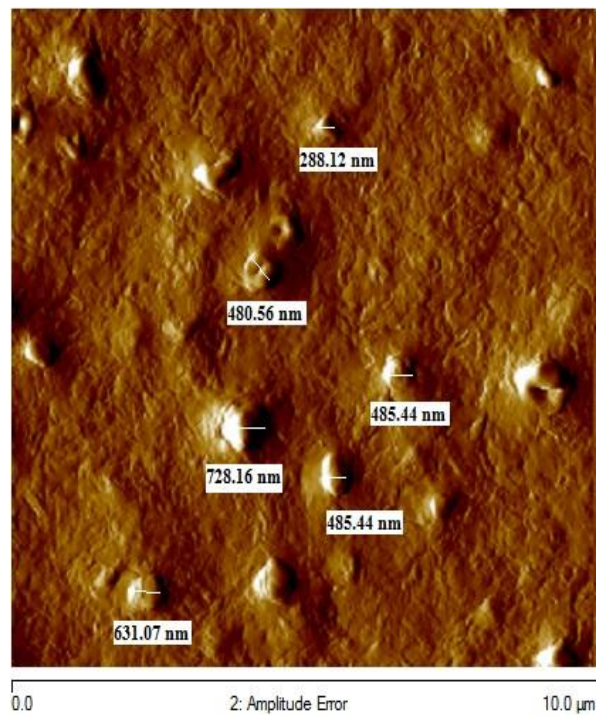
(B)



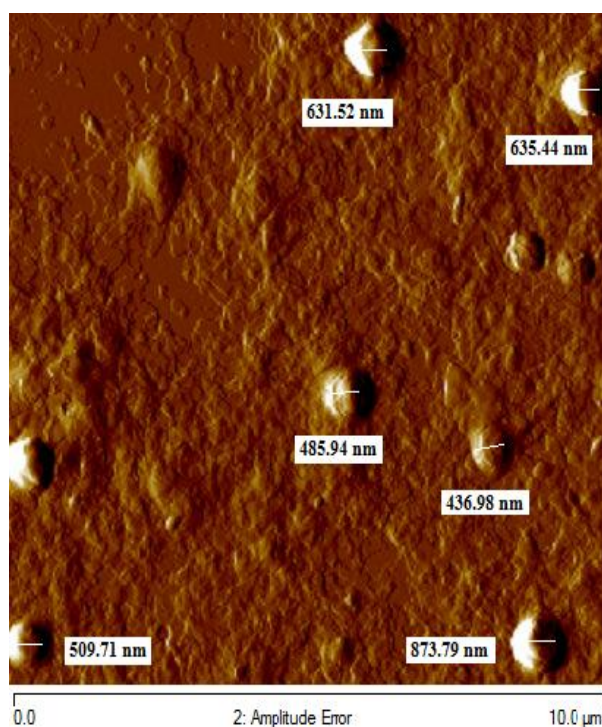
(C)



(D)



(E)



As imagens de amplitude da figura 19 (A, B e C) representam as NLS contendo 2, 3 e 5% de IBU, na qual observou-se que conforme aumentou a concentração de fármaco na formulação maior foram os tamanhos de partículas obtidos. Observou-se uma heterogeneidade no sistema das NLS de 2, 3 e 5%. Partículas em escala micrométrica não foram encontradas. Estas nanopartículas apresentaram formatos irregulares. AJI ALEX e colaboradores (2011), ao analisarem a microscopia de força atômica das nanopartículas lipídicas sólidas contendo lopinavir desenvolvidas com o Compritol 888 ATO como lipídio e Pluronic F127 como tensoativo pela técnica de sonicação, encontram resultados similares com este estudo. A imagem da AFM demonstrou que as NLS contendo fármaco apresentaram tamanho médio de partícula de 200 nm e apresentou formato não esférico da partícula.

As formulações com concentração de 10 e 15% de fármaco apresentaram tamanho de partícula maior, em torno de 728,16 e 873,79 nm, respectivamente. Não se observou agregados com partículas de tamanhos em escala micrométrica. Observou-se que conforme aumenta a concentração do fármaco na NLS a partícula apresenta um formato aproximadamente esférico, como pode ser visualizado na figura 19D e 19E. Portanto sugere que o aumento da concentração de IBU contribui para a formação de um sistema com grau de esferinização maior. Resultados semelhantes foram encontrados por SOUZA e colaboradores (2012), na qual

observaram na análise morfológica da NLS, uma maior homogeneidade de partículas esféricas quando o praziquantel foi incorporado nas NLS, sugerindo assim que o fármaco aumentava o grau de esferoinização do sistema.

Um trabalho que exemplifica a utilização da AFM foi o realizado por FENG e HUANGB (2001), que ao utilizarem a microscopia eletrônica de transmissão perceberam que precisavam utilizar outra técnica auxiliar para visualizar a superfície em nível atômico da partícula. Logo, empregou a AFM visando um estudo morfológico mais detalhado de nanoesferas de PLGA, sendo possível observarem as estruturas com resolução muito elevada da superfície das partículas revelando a presença de pequenas cavidades e de poros.

### 4.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO OU NÃO O IBUPROFENO

A NLS sem fármaco e NLS contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU foram armazenadas na temperatura ambiente e analisadas por 60 dias quanto ao diâmetro médio de partícula, Pdi e potencial zeta.

Nas tabelas 11 a 16 encontram-se os resultados do diâmetro médio, Pdi e Pz da NLS sem fármaco e NLS contendo 2, 3, 5, 10 e 15 % de IBU, com os respectivos desvio padrão da amostragem em triplicata.

**Tabela 11.** Resultados das análises de diâmetro médio, Pdi e potencial zeta da NLS sem fármaco (n=3)

Tempo (dias)	Diâmetro Médio Partícula (nm)	Pdi	Potencial Zeta (mV)
1	223,3 ( $\pm 2,51$ )	0,438 ( $\pm 0,027$ )	- 30,0 ( $\pm 0,51$ )
7	227,6 ( $\pm 1,01$ )	0,432 ( $\pm 0,01$ )	-29,1 ( $\pm 0,55$ )
15	224,9 ( $\pm 4,27$ )	0,422 ( $\pm 0,01$ )	-27,3 ( $\pm 0,32$ )
30	236,7 ( $\pm 3,34$ )	0,454 ( $\pm 0,01$ )	-29,6 ( $\pm 0,26$ )
45	244,0 ( $\pm 2,30$ )	0,448 ( $\pm 0,02$ )	- 28,6 ( $\pm 0,53$ )
60	247,9 ( $\pm 1,96$ )	0,458 ( $\pm 0,04$ )	-29,8 ( $\pm 0,01$ )

Observou-se nos resultados encontrados na tabela 11 que houve um leve aumento de diâmetro médio das NLS, se estabilizando por volta dos 45 dias. O Pdi e o Pz mantiveram-se praticamente constante durante o período de 60 dias.

**Tabela 12.** Resultados das análises de diâmetro médio, Pdi e potencial zeta da NLS contendo 2% IBU (n=3)

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Diâmetro Médio Partícula (nm)</b>	<b>Pdi</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
<b>1</b>	210,6 ( $\pm 2,11$ )	0,423 ( $\pm 0,005$ )	- 26,8 ( $\pm 0,25$ )
<b>7</b>	210,3 ( $\pm 3,20$ )	0,464 ( $\pm 0,01$ )	-24,1 ( $\pm 0,4$ )
<b>15</b>	217,7 ( $\pm 2,44$ )	0,47 ( $\pm 0,02$ )	-24,9 ( $\pm 0,4$ )
<b>30</b>	208,3 ( $\pm 1,56$ )	0,497 ( $\pm 0,01$ )	- 25,8 ( $\pm 0,56$ )
<b>45</b>	304,4 ( $\pm 8,56$ )	0,554 ( $\pm 0,04$ )	- 24,6 ( $\pm 0,53$ )
<b>60</b>	315,2( $\pm 5,94$ )	0,564 ( $\pm 0,04$ )	-25,1 ( $\pm 0,51$ )

Analisando-se os resultados obtidos de diâmetro médio das partículas da NLS contendo 2% de IBU, que se encontram na tabela 12, houve um leve aumento do diâmetro da partícula. O Pdi manteve-se constante em 60 dias. Na análise do Pz os resultados se mantiveram próximos entres si.

**Tabela 13.** Resultados das análises de diâmetro médio, Pdi e potencial zeta da NLS contendo 3% IBU (n=3)

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Diâmetro Médio Partícula (nm)</b>	<b>Pdi</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
<b>1</b>	226,3 ( $\pm 8,20$ )	0,389 ( $\pm 0,05$ )	- 30,4 ( $\pm 0,60$ )
<b>7</b>	249,7 ( $\pm 10,21$ )	0,463 ( $\pm 0,01$ )	-24,1 ( $\pm 0,40$ )
<b>15</b>	222,6 ( $\pm 3,14$ )	0,425 ( $\pm 0,01$ )	-42,9 ( $\pm 1,35$ )
<b>30</b>	210,0 ( $\pm 1,88$ )	0,393 ( $\pm 0,005$ )	- 37,0 ( $\pm 0,40$ )
<b>45</b>	319,7 ( $\pm 9,10$ )	0,488 ( $\pm 0,05$ )	- 38,6 ( $\pm 0,40$ )
<b>60</b>	343,7( $\pm 3,14$ )	0,498 ( $\pm 0,07$ )	-37,1 ( $\pm 0,50$ )

Analisando-se os resultados apresentados na tabela 13 pode-se observar que o diâmetro médio da NLS contendo 3% de IBU apresentou aumento com o tempo. Na análise do Pdi observou um leve aumento, mantendo-se constante por volta de 45 dias. Na análise do Pz foi possível observar que ocorreu aumento do PZ com o passar do tempo.

**Tabela 14.** Resultados das análises de diâmetro médio, Pdi e potencial zeta da NLS contendo 5% IBU (n=3)

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Diâmetro Médio Partícula (nm)</b>	<b>Pdi</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
<b>1</b>	231,4 ( $\pm 1,48$ )	0,430 ( $\pm 0,003$ )	- 18,4 ( $\pm 0,67$ )
<b>7</b>	195,4 ( $\pm 3,30$ )	0,453( $\pm 0,01$ )	- 21,4 ( $\pm 0,40$ )
<b>15</b>	214,2 ( $\pm 4,81$ )	0,464( $\pm 0,02$ )	- 29,7 ( $\pm 0,80$ )
<b>30</b>	275,3 ( $\pm 4,06$ )	0,478( $\pm 0,01$ )	- 27,1 ( $\pm 1,21$ )
<b>45</b>	326,8 ( $\pm 3,60$ )	0,504( $\pm 0,01$ )	-30,1 ( $\pm 2,47$ )
<b>60</b>	346,3 ( $\pm 14,01$ )	0,625( $\pm 0,08$ )	-31,7 ( $\pm 2,67$ )

As NLS contendo 5% de IBU apresentaram aumento do diâmetro de partícula conforme resultados que se encontram na tabela 14. No decorrer do experimento foi possível observar que o Pdi da partícula aumentou. Na análise do Pz observou-se que houve um aumento gradativo do PZ com o decorrer do tempo.

**Tabela 15.** Resultado da análise de diâmetro médio, Pdi e potencial zeta da NLS contendo 10% IBU (n=3)

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Diâmetro Médio Partícula (nm)</b>	<b>Pdi</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
<b>1</b>	272,7 ( $\pm 8,62$ )	0,458 ( $\pm 0,07$ )	- 19,3 ( $\pm 0,61$ )
<b>7</b>	255,1 ( $\pm 7,80$ )	0,536 ( $\pm 0,01$ )	- 25,3 ( $\pm 0,50$ )
<b>15</b>	289,3 ( $\pm 4,67$ )	0,543 ( $\pm 0,06$ )	- 33,6 ( $\pm 1,14$ )
<b>30</b>	296,4 ( $\pm 2,15$ )	0,513 ( $\pm 0,01$ )	- 25,6 ( $\pm 1,44$ )
<b>45</b>	346,7 ( $\pm 8,60$ )	0,576 ( $\pm 0,11$ )	- 29,7 ( $\pm 1,67$ )
<b>60</b>	341,8 ( $\pm 2,55$ )	0,597 ( $\pm 0,48$ )	- 30,0 ( $\pm 2,03$ )

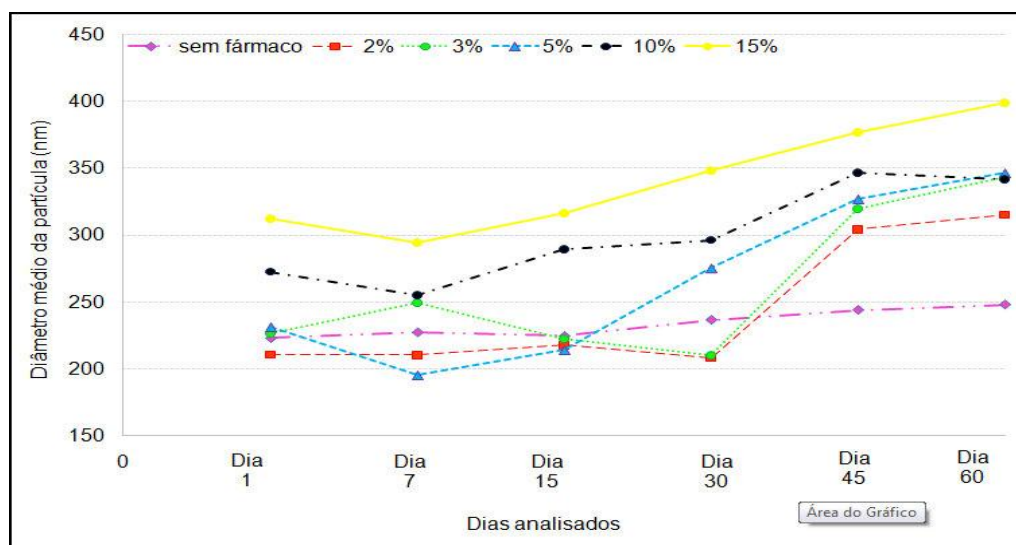
**Tabela 16.** Resultados das análises de diâmetro médio, Pdi e potencial zeta da NLS contendo 15% IBU (n=3)

Tempo (dias)	Diâmetro Médio Partícula (nm)	Pdi	Potencial Zeta (mV)
1	312,1 ( $\pm 10,15$ )	0,520 ( $\pm 0,10$ )	- 21,7 ( $\pm 0,47$ )
7	294,5 ( $\pm 8,72$ )	0,481 ( $\pm 0,03$ )	-27,5 ( $\pm 0,64$ )
15	316,3 ( $\pm 27,40$ )	0,666 ( $\pm 0,01$ )	-30,7 ( $\pm 1,14$ )
30	348,1 ( $\pm 8,47$ )	0,579 ( $\pm 0,03$ )	-34,3 ( $\pm 0,67$ )
45	377,0 ( $\pm 6,50$ )	0,629 ( $\pm 0,06$ )	- 32,1 ( $\pm 2,03$ )
60	399,0 ( $\pm 3,02$ )	0,637 ( $\pm 0,06$ )	- 33,9 ( $\pm 1,67$ )

Foi possível observar pela análise dos resultados que se encontram nas tabelas 15 e 16 que as NLS contendo 10 e 15% de IBU apresentaram aumento do diâmetro médio da partícula. É importante ressaltar que estas formulações possuem um maior diâmetro de partícula comparado com as NLS contendo 2, 3 e 5% de IBU. Não ocorreu diferença significativa na análise do Pdi com o decorrer do tempo para as concentrações de 10 e 15% como pode ser observado nas tabelas 15 e 16. O Pz para as NLS contendo 10% de IBU foi de -19,3 a -30,0 mV no tempo de 1 a 60 dias e a concentração de 15% foi de -21,7 a -33,9 mV. Logo houve um aumento gradativo do PZ com o decorrer do tempo.

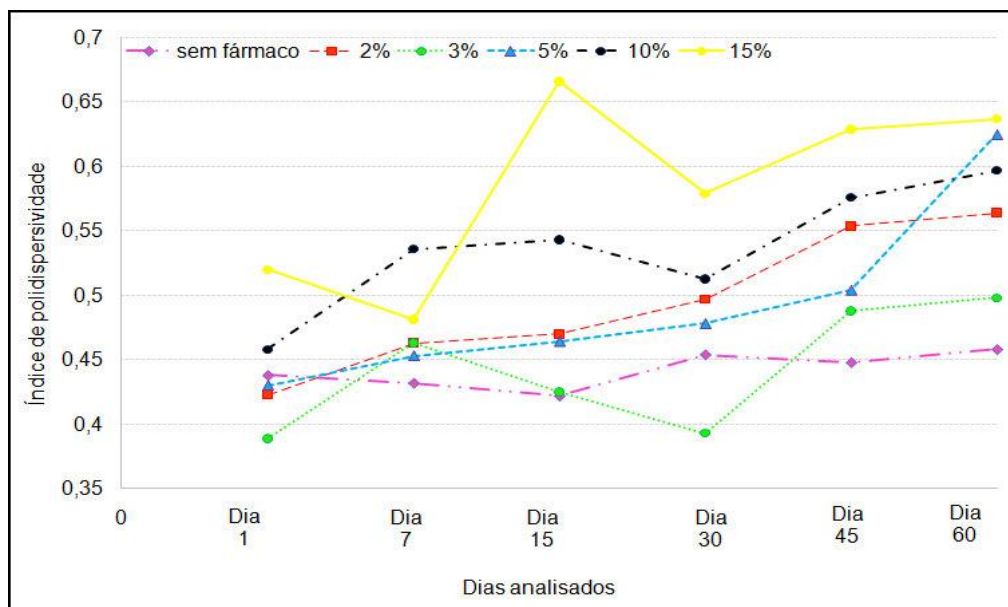
As figuras 20 a 22 apresentam os resultados obtidos do diâmetro médio, Pdi e Pz das NLS sem fármaco e NLS contendo 2, 3, 5, 10 e 15 % de IBU.

**Figura 20.** Comparação do diâmetro médio das NLS sem fármaco e contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU em função do tempo

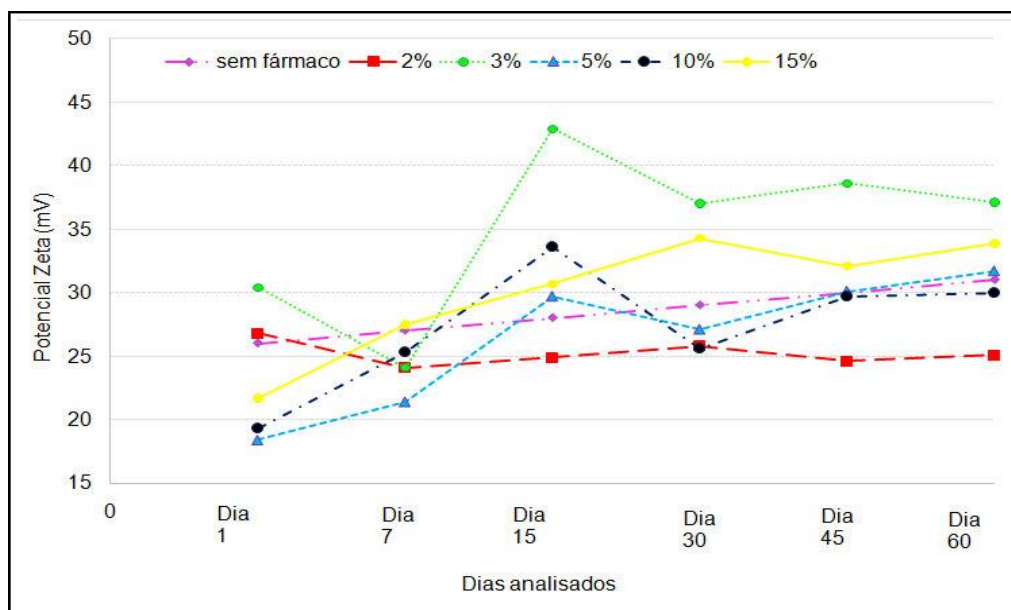




**Figura 21.** Comparação do índice de polidispersividade das NLS sem fármaco e contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU em função do tempo



**Figura 22.** Comparação do potencial zeta das NLS sem fármaco e contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU em função do tempo



Foi possível observar nas figuras 20 a 21 que ocorreu aumento do diâmetro médio da partícula e Pdi das NLS sem e com fármaco, estabilizando após 30 dias. Este fato é comum acontecer devido à técnica de obtenção das NLS, na qual inicialmente obtêm-se uma emulsão e depois emprega-se uma energia necessária para diminuir a energia interfacial do sistema para

poder quebrar as gotículas em tamanhos nanométricos. Após o processamento das NLS as partículas tendem a entrar nas condições de equilíbrio, com isto ocorre aumento da energia interfacial aumentando assim o tamanho da partícula. Diante disto o aumento nos parâmetros analisados em todas as formulações ocorre pelo fato que o sistema está se rearranjando e quando entram em equilíbrio os parâmetros mantêm-se constante. Este fenômeno geralmente ocorre para nanosuspensões e nanopartículas lipídicas sólidas que tem um núcleo sólido (KOCBEK; BAUMGARTNER; KRISTL, 2006).

Foi possível analisar na figura 22 que os valores obtidos do potencial zeta em função do tempo das NLS mantiveram-se por volta dos  $-25$  a  $-37$  mV no período de 60 dias, indicando uma boa estabilidade física das NLS.

Com isto as NLS sem fármaco e contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU armazenadas na temperatura ambiente ( $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ), apresentaram um sistema estável termodinamicamente no período de 60 dias.

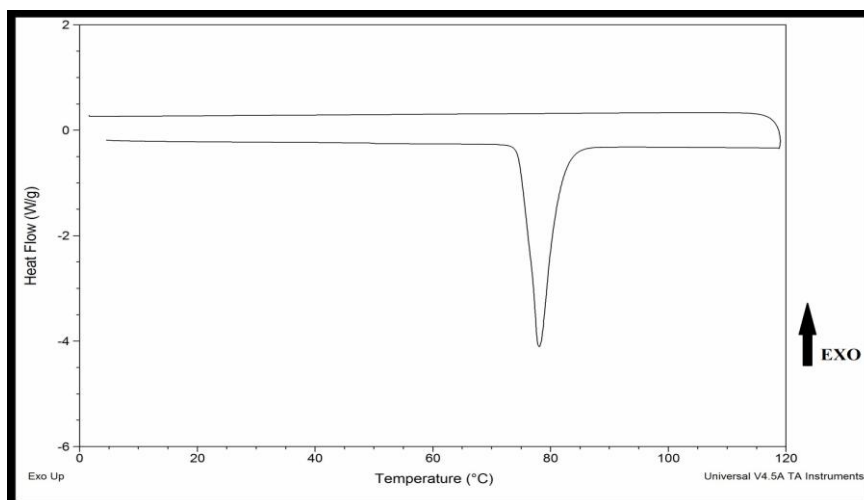
#### 4.4 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é uma técnica bastante empregada na caracterização das NLS pelo fato de fornecer informações sobre o estado físico e o grau de cristalinidade da amostra por meio do comportamento térmico. Esta técnica também possibilita obter informações sobre o comportamento de fusão e cristalinização do material cristalino e, por conseguinte, é utilizada para avaliar o polimorfismo, a ordenação do cristal, misturas eutéticas e/ou interações entre o lipídio e o fármaco (ZIMMERMANN; SOUTO; MULLER, 2005).

Para obtenção das curvas de DSC foi programado aquecimento e posterior resfriamento para verificar a ocorrência de possíveis interações do fármaco com os respectivos excipientes das NLS e modificações durante o processo de produção das NLS.

A Figura 23 apresenta a curva de DSC de aquecimento e resfriamento obtida para o fármaco ibuprofeno. Foi considerada como exotérmico a disposição dos picos indicados no sentido ascendente.

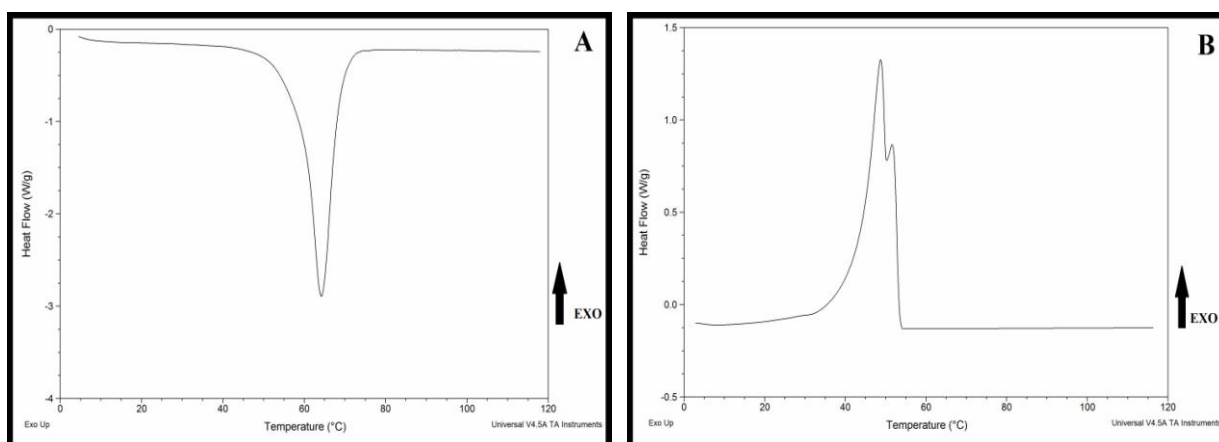
**Figura 23.** Curva DSC do Ibuprofeno. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C



A figura 23 exibe o dado do comportamento térmico do ibuprofeno, em que no evento de aquecimento, o IBU apresenta um pico único, bem definido e endotérmico na temperatura de 78,07 °C (T-onset 75,55 °C) com entalpia de fusão ( $\Delta H$ ) de 100,4 J/g. No resfriamento não houve nenhum evento térmico. Estes resultados estão de acordo com a literatura (XU *et al.*, 2004).

A Figura 24 mostra a curva de DSC da matéria prima GMS, utilizada para o desenvolvimento da NLS.

**Figura 24.** Curva DSC do GMS, (A) Aquecimento (B) Resfriamento. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10°C/min no intervalo de 0 a 120°C



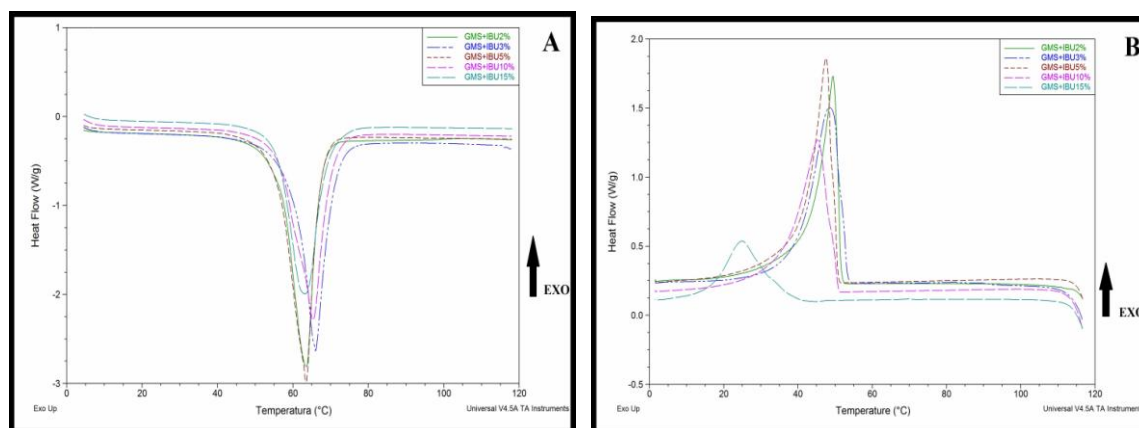
No evento de aquecimento o GMS apresenta um pico de fusão em 64,22 °C (T-onset 59,12 °C) e  $\Delta H$  igual a 124,2 J/g. Na curva de resfriamento observa-se dois picos exotérmicos, o primeiro em 52,39 °C e o segundo em 48,78 °C com  $\Delta H$  -77,82 J/g referente a cristalização do lipídio. O que corresponde com dados da literatura (YAJIMA *et al.*, 2002).

ZIMMERMANN e colaboradores (2005) desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas com o lipídio monoestearato de glicerila (Imwitor<sup>®</sup> 900) e verificaram pela curva de DSC do lipídio que o ponto de fusão de 56-61°C diminuía o risco da formação de “supercooled melts” no processo de cristalinização da matriz lipídica. Este fenômeno tem sido observado nos triacilglicerol, pois possuem baixo ponto de fusão e na cristalização não formam matriz sólida e sim sistemas líquidos super-resfriados.

Os resultados de DSC deste estudo mostraram que o ponto de fusão do GMS é relativamente alto, com isto ocorre a cristalinização da matriz lipídica e conseqüentemente a formação de nanopartículas lípicas sólidas. Segundo BUNJES e colaboradores (1998), a formação de matriz cristalina na temperatura ambiente do GMS pode ser atribuída ao fato de que o lipídio é uma mistura complexa de triacilglicerol. Assim a tendência de formação de “supercooled melts” em misturas de triacilglicerol é bem menor comparado ao triacilglicerol puro.

A figura 25 representa as curvas de DSC da mistura física GMS/IBU contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU em que a figura 25 (A) representa o primeiro evento de aquecimento e a figura 25 (B) o evento de resfriamento. A tabela 17 exhibe os dados de temperatura de fusão, T-onset,  $\Delta H$  e as curvas de DSC das misturas física GMS/IBU contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU.

**Figura 25.** Curva de DSC da mistura física GMS/IBU contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU, (A) Aquecimento (B) Resfriamento. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C



Nos valores listados na tabela 17 é possível observar que ocorreu diminuição na temperatura onset da mistura física do GMS/IBU 2, 5, 10 e 15% de fármaco em relação ao lipídio puro, porém para a concentração de 3% ocorreu leve aumento.

Houve diminuição na entalpia de fusão obtida em relação à entalpia esperada para as amostras, com exceção para o GMS/IBU 5 e 15% (Tabela 17). Todas as concentrações apresentaram alargamento do pico como mostra na figura 25 (A), sendo mais acentuado para as concentrações maiores (10 e 15%).

O efeito do alargamento do pico acontece devido formação da mistura do GMS com IBU. Este efeito é mais evidente nas concentrações maiores de fármaco (10 e 15%). Além disso, não se observou evento de fusão do IBU na mistura física, estes resultados demonstram que o fármaco está solubilizado no lipídio, o que correlaciona com o teste de solubilidade do lipídio descrito no item 4.1.1.

**Tabela 17.** Dados de DSC da mistura física de GMS/IBU contendo o ponto de fusão, temperatura onset e os valores de entalpias

Componente	Ponto de Fusão(°C)	Onset (°C)	$\Delta H$ [obtido] (J/g)	$\Delta H$ [esperado] (J/g)
<b>GMS</b>	64,22	59,12	124,2	-
<b>GMS/2%IBU</b>	63,55	56,39	112,8	121,1
<b>GMS/3%IBU</b>	66,01	60,77	110,6	120,5
<b>GMS/5%IBU</b>	63,53	55,56	123,7	118,0
<b>GMS/10%IBU</b>	65,27	58,19	108,0	111,8
<b>GMS/15%IBU</b>	63,24	55,85	107,5	105,5

Na tabela 18 observa-se que na cristalização da mistura física ocorre um único pico exotérmico diferindo do GMS puro que acontece em dois eventos e também ocorre uma diminuição na temperatura onset para todas as amostras.

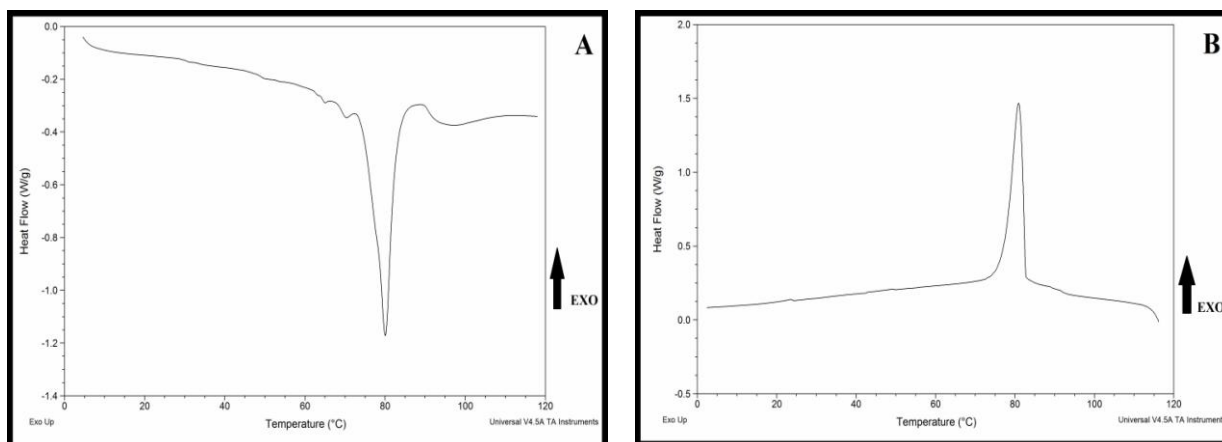
Observa-se na figura 25 (B), que ocorreu uma diminuição da entalpia de cristalização obtida em relação à entalpia esperada para todas as amostras, porém, para a mistura física de IBU 15% a diminuição foi bem acentuada e a característica do pico foi alterada. A cristalização do GMS foi dificultada pela presença de IBU, demonstrando a solubilização deste no lipídio.

**Tabela 18.** Dados de DSC da mistura física de GMS/IBU contendo a cristalização, temperatura onset e os valores de entalpias

Componente	Cristalização(°C)		Onset (°C)		$\Delta H$ [obtido] (J/g)	$\Delta H$ [esperado] (J/g)
GMS	52,39	48,78	53,32	53,37	- 77,82	-
GMS/2%IBU	49,46		51,59		- 64,52	- 75,87
GMS/3%IBU	48,54		52,39		- 71,95	- 75,49
GMS/5%IBU	47,54		49,88		- 72,35	- 73,93
GMS/10%IBU	45,32		50,87		- 65,27	- 70,04
GMS/15%IBU	24,96		35,05		- 33,90	- 66,15

A Figura 26 mostra a curva de DSC da matéria prima FSH, utilizada para o desenvolvimento da NLS.

**Figura 26.** Curva de DSC da FSH, (A) Aquecimento (B) Resfriamento. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C

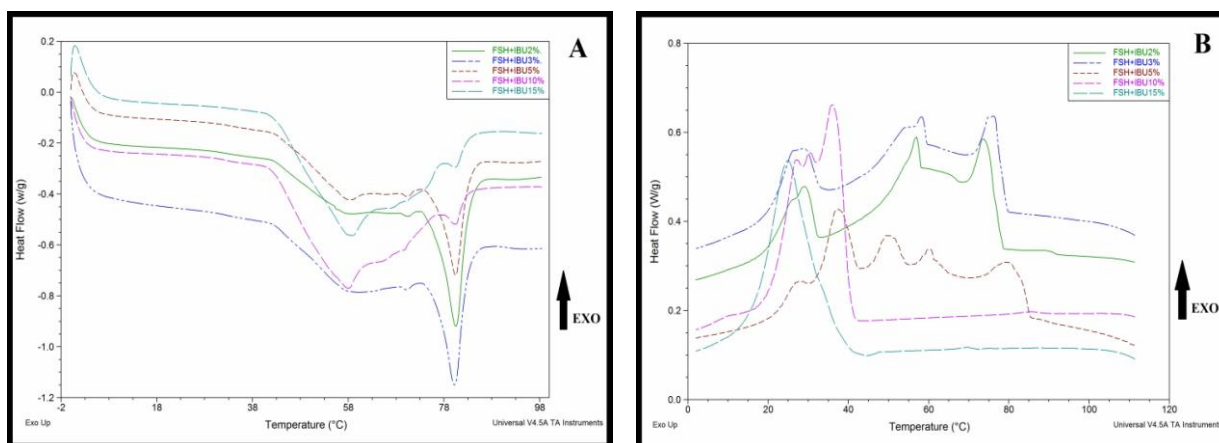


Na Figura 26 observa-se que a FSH possui dois picos menos intensos entre 65,01°C e 70,16 °C e um pico intenso em 80,10°C (T-onset 76,53°C) que é referente à fusão da FSH, com  $\Delta H$ 32,56 J/g. No resfriamento observa-se um único pico que se encontra em 80,81°C com  $\Delta H$  - 26,30 J/g. Observa-se que a fusão e cristalização da FSH foram à mesma temperatura e com  $\Delta H$  parecidos.

A figura 27 representa as curvas de DSC da mistura física FSH/IBU contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU em que a figura 27 (A) representa o primeiro evento de aquecimento e a figura 27

(B) o evento de resfriamento. A tabela 19 exibe os dados de temperatura de fusão, T-onset,  $\Delta H$  e as curvas de DSC das misturas físicas FSH/IBU contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU.

**Figura 27.** Curva de DSC da mistura física FSH/IBU contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU, (A) Aquecimento (B) Resfriamento. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C



Como demonstra na tabela 19 o  $\Delta H$  obtido é maior do que o esperado para todas as misturas físicas de FSH/IBU contendo fármaco.

Observa-se na figura 27 (A) que ocorreu mudança dos eventos em relação a curva da FSH pura. Para a mistura física de 2, 3 e 5% de IBU o primeiro pico presente na curva é levemente alargado e para 10 e 15% de IBU a mudança foi mais significativa, na qual o primeiro pico é acentuadamente alargado e o segundo pico que era responsável pela fusão da FSH diminui. Com isto é possível observar que o IBU solubiliza na FSH.

**Tabela 19.** Dados de DSC da mistura física de FSH/IBU contendo o ponto de fusão, temperatura onset e os valores de entalpias

Componente	Ponto de Fusão(°C)			Onset (°C)			$\Delta H$ [obtido] Total (J/g)	$\Delta H$ [esperado] Total (J/g)
	FSH	65,01	70,16	80,10	63,73	68,43	76,53	32,56
FSH/2%IBU	55,50	70,83	80,61	48,02	69,26	76,44	47,79	37,79
FSH/3%IBU	54,98	70,56	80,34	43,67	69,25	76,59	52,23	38,73
FAH/5%IBU	56,38	70,63	80,53	45,06	69,37	76,92	45,58	42,26
FSH10%IBU	57,58		80,79	42,24		78,53	59,31	49,52
FSH15%IBU	57,59		81,00	42,59		78,90	65,85	55,17

Na Figura 27 (B) pode-se observar que no resfriamento a FSH pura apresentou um único evento e na mistura física em todas as concentrações de IBU houve mudança dos eventos formando mais de um pico de cristalização.

Pode-se observar também na tabela 20 que a entalpia de cristalização obtida foi maior que a esperada para todas as concentrações o que evidencia a solubilização do IBU com a FSH.

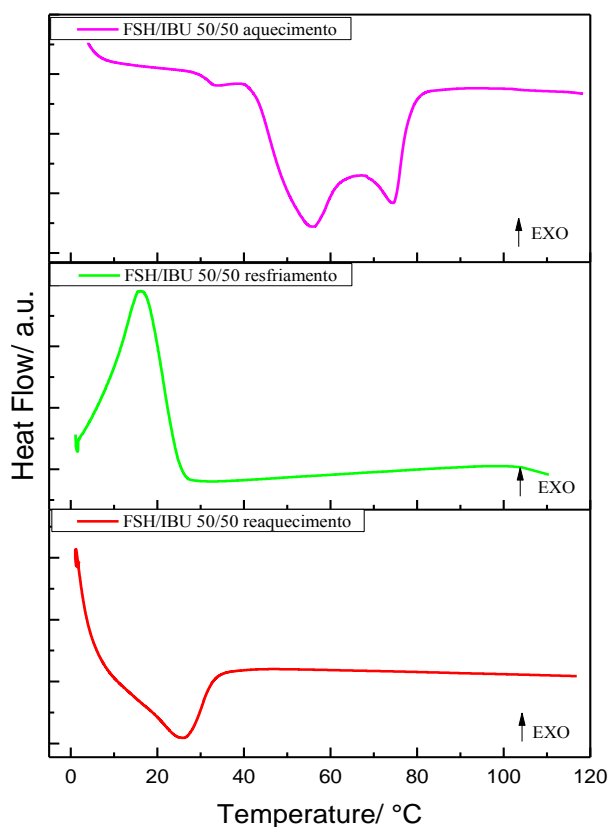
**Tabela 20.** Dados de DSC da mistura física de FSH/IBU com 2, 3, 5, 10 e 15% do fármaco, contendo a cristalização, temperatura onset e os valores de entalpias

	FSH	FSH/IBU2	FSH/IBU3	FSH/IBU5	FSH/IBU10	FSH/IBU15
<b>Cristalização (°C)</b>	80,81	28,57/56,75/74,89	26,01/53,63/76,61	25,65/37,16/49,37/60,62/80,76	36,14	24,99
<b>Onset (°C)</b>	82,68	32,12/58,61/77,50	32,72/59,52/78,65	29,45/42,01/53,72/61,67/85,22	40,48	35,08
<b><math>\Delta H</math>[obtido] (J/g)</b>	26,30	-49,07	-50,16	-49,69	-36,40	-32,78
<b><math>\Delta H</math>[esperado] Total (J/g)</b>	-	- 24,28	-23,91	-22,54	-19,72	-17,53

Para melhor investigar o primeiro pico presente na curva da mistura física da FSH/IBU, analisou-se a curva de DSC da FSH/BU na proporção 50/50. A figura 28 representa a curva de DSC da mistura física FSH:IBU 50:50, na qual a primeira curva é o aquecimento (A), a segunda representa o resfriamento (B), e a terceira o reaquecimento (C).



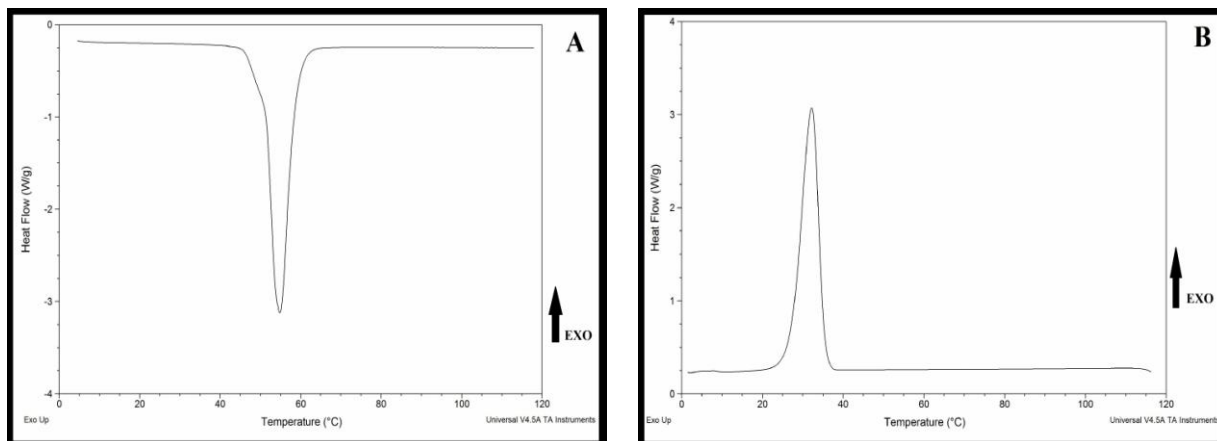
**Figura 28.** Curva de DSC da mistura física FSH/IBU 50/50, Aquecimento (A) Resfriamento (B) Reaquecimento(C). Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C



Conforme ilustrado na figura 28 pode-se observar dois eventos endotérmico na curva de aquecimento em 54,70 °C e 74,68 °C com  $\Delta H$  73,03 J/g. O evento de resfriamento apresentou um pico exotérmico em 16,53 °C com  $\Delta H$  -22,06 J/g, apresentando similaridade com a curva da FSH+IBU 15%. E no reaquecimento apresentou um único pico em 25,12 °C com  $\Delta H$  44,84 J/g. Assim, a curva da mistura física FSH/IBU na proporção de 50/50 demonstrou que o pico endotérmico em 54,70°C na curva de aquecimento não representa o ponto de fusão da FSH ou do IBU, sendo a formação de um novo pico com a interação dos componentes. A curva de reaquecimento evidencia a formação de um novo pico. Contudo além do IBU solubilizar na FSH, ele possui forte interação com a FSH e quando aumenta a concentração de IBU fica mais evidenciada esta interação.

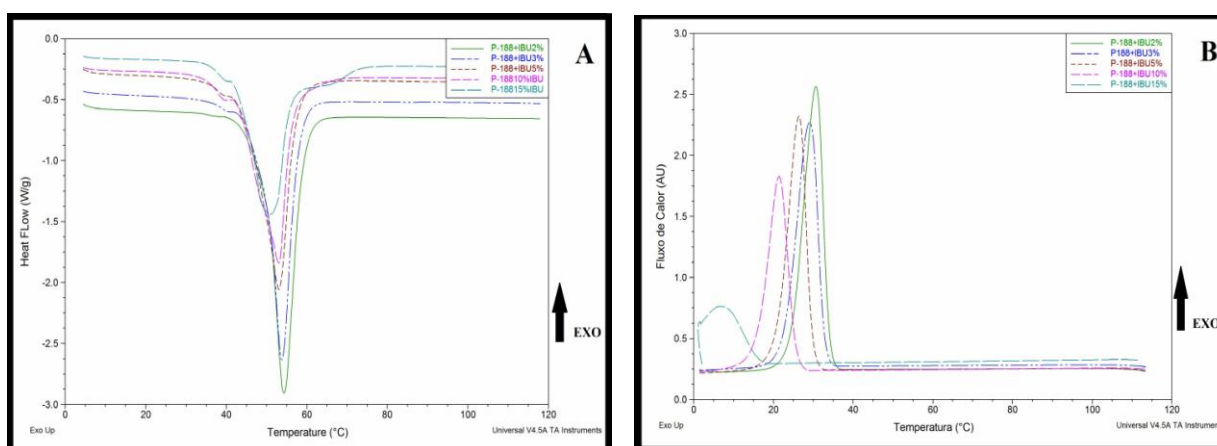
A Figura 29 mostra a curva de DSC do P-188 que é o último excipiente presente na formulação.

**Figura 29.** Curva de DSC do P-188, (A) Aquecimento (B) Resfriamento. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C



Conforme ilustrado na figura 29 pode-se observar um único pico endotérmico em 54,77°C (T-onset 50,86 °C com  $\Delta H$ 101,5 J/g). O evento de resfriamento apresentou um pico exotérmico em 32,25 °C, referente à cristalização do P-188 e  $\Delta H$  -91,59 J/g. Estas temperaturas coincidem com o ponto de fusão do tensoativo (ROWE; SHESKEY; QUINN 2009).

**Figura 30.** Curva de DSC da mistura física P-188/IBU contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU, (A) Aquecimento (B) Resfriamento. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C



Na tabela 21 pode-se observar que a mistura física contendo 2% de IBU tem o ponto de fusão bem próximo do P-188 puro e a entalpia de fusão obtida é maior que a esperada. Para as outras mistura física conforme aumentou a concentração de fármaco a temperatura de fusão

diminuiu de 3,91 °C para 6,4 °C referente ao P-188 puro e a mistura física contendo 15% de IBU.

Na figura 30 (A) observa-se também que ocorreu alargamento do pico de fusão, na mistura física contendo 10 e 15% de IBU. Estes resultados demonstram que o IBU solubilizou-se no P-188, sendo mais evidente com maior quantidade de fármaco.

Resultados diferentes foram encontrados por PASSERINI e colaboradores (2002), na qual verificaram na curva física de DSC do ibuprofeno com poloxamer - 188 que tanto o pico de fusão do IBU e do P-188 não aparecia e um novo pico endotérmico surgia com ponto de fusão de 37,6 °C (T.onset 33,8 °C). Este resultado sugere que ocorre a formação de um sistema eutético na mistura física do IBU com o P-188. Para confirmar esta hipótese os autores analisaram a curva de DSC com razão diferente da mistura física na proporção de 100:0 a 0:100 de IBU:P-188. A proporção de 90:10 e 60:40 foram similares demonstrando a formação do sistema eutético, pois apresentou dois picos endotérmicos, sendo o primeiro em 35,3 °C característico do ponto de fusão da mistura eutética e o segundo corresponde a fusão do fármaco. Portanto os autores concluíram que quando diminuía a proporção de fármaco a formação do sistema era mais evidente, sendo que as proporções de 30:70 e 15:85 apresentaram um único pico representando a formação da mistura eutética.

**Tabela 21.** Dados de DSC da mistura física P-188/IBU contendo o ponto de fusão, temperatura onset e os valores de entalpias

Componente	Ponto de Fusão(°C)	Onset (°C)	$\Delta H$ [obtido] (J/g)	$\Delta H$ [esperado] (J/g)
<b>P-188</b>	54,77	50,86	101,5	-
<b>P-188/2%IBU</b>	54,31	49,47	95,51	93,70
<b>P-188/3%IBU</b>	53,76	49,63	87,49	92,27
<b>P-188/5%IBU</b>	53,07	45,27	86,10	87,00
<b>P-188/10%IBU</b>	53,03	42,40	88,11	76,13
<b>P-188/15%IBU</b>	50,47	44,07	84,43	67,66

Na Figura 30 (B) observa-se que ocorreu deslocamento e alargamento do pico de cristalização com o aumento de concentração de IBU na mistura física em relação ao P-188 puro, porém com a concentração de 15% ocorreu uma mudança dos eventos mais acentuada.

Observa-se na tabela 22 que ocorreu uma diminuição na temperatura inicial em relação ao evento de cristalização do P-188 puro para a mistura contendo 15% de IBU de 2,99 °C para

8,57 °C respectivamente. Ocorreu assim uma desorganização dos eventos da curva de DSC do P-188 devido à alta concentração de fármaco.

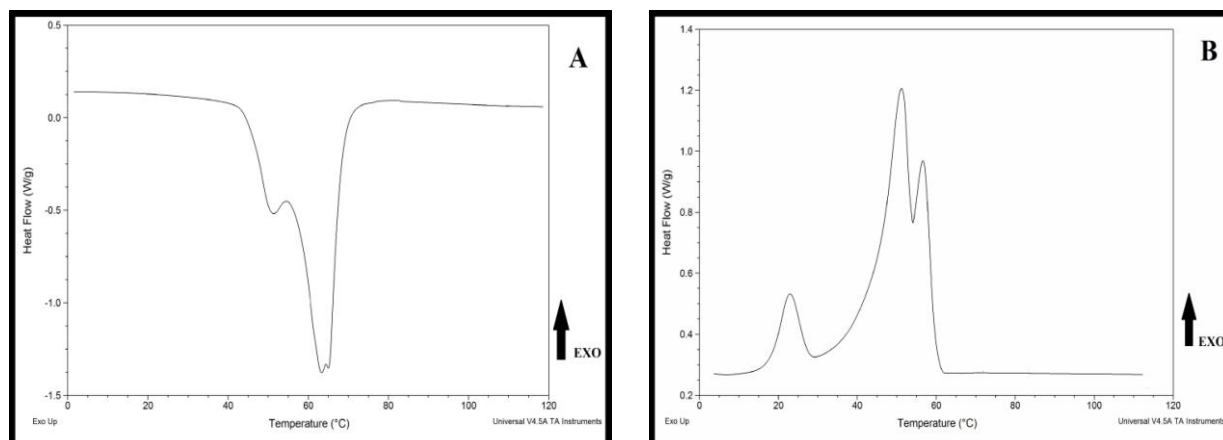
Também foi possível observar que a mistura física com 2 e 15% de IBU tem entalpia de cristalização obtida maior que a esperada, porém não é um aumento significativo. Para as outras mistura física a entalpia de fusão obtida foi menor que a esperada.

**Tabela 22.** Dados de DSC da mistura física P-188/IBU contendo a cristalização, temperatura onset e os valores de entalpias

Componente	Cristalização(°C)	Onset (°C)	$\Delta H$ [obtido] (J/g)	$\Delta H$ [esperado] (J/g)
<b>P-188</b>	32,25	35,24	- 91,59	-
<b>P-188/2%IBU</b>	30,65	33,95	- 85,61	- 84,55
<b>P-188/3%IBU</b>	29,07	32,70	- 79,33	- 83,26
<b>P-188/5%IBU</b>	26,45	29,73	- 73,64	- 78,50
<b>P-188/10%IBU</b>	21,44	25,58	- 59,69	- 68,70
<b>P-188/15%IBU</b>	7,52	16,09	- 31,23	- 61,05

A figura 31 ilustra a curva de DSC da mistura física (P-188/FSH/GMS) utilizadas para o desenvolvimento da NLS. A análise separada de cada componente utilizado na obtenção das NLS é importante para posterior análise destes componentes em conjunto na mistura física e nas NLS que passaram por um processo de aquecimento e sonicação. É possível, a partir da análise separada, inferir os picos que, se alterados, demonstram a interação entre componentes.

**Figura 31.** Dados do DSC da mistura física (P-188, FSH e GMS), (A) Aquecimento (B) Resfriamento. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10° C/min no intervalo de 0 a 120°C

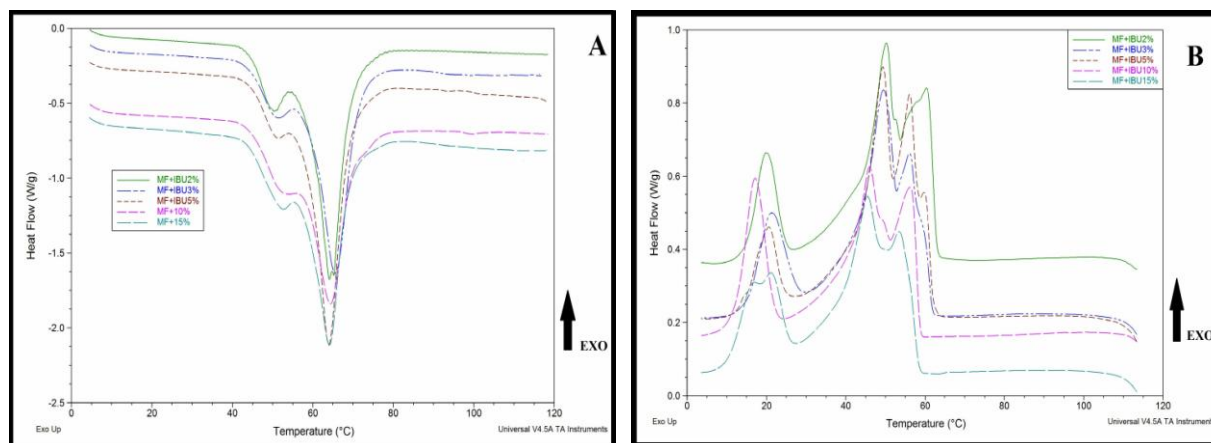


No evento de aquecimento da figura 31 (A), a mistura física (P-188, FSH e GMS) apresenta três picos de fusão. O primeiro em 51,03 °C com  $\Delta H$  igual a 2,018 J/g, representa o pico de fusão do P-188. O segundo e terceiro pico apresenta fusão em 63,00 °C e 65,67 °C respectivamente, com  $\Delta H$  77,15 J/g, representando o ponto de fusão do GMS e FSH. Sugere-se que houve uma interação entre o GMS e a FSH e que o P-188 tem uma leve interação com o GMS, pois, a entalpia de fusão total de todos os eventos que ocorre na mistura física (P-188/GMS/FSH) aumenta se comparada as entalpias de fusão das matérias primas pura, como pode ser observados nos valores da tabela 23.

Na curva de resfriamento observam-se três picos exotérmicos (Figura 31 (B)). O primeiro e o segundo pico em 50,79 °C e 57,27 °C com  $\Delta H$  -62,81 J/g referente GMS e FSH respectivamente. O terceiro pico é em 22,80 °C com  $\Delta H$  -8,027 J/g referente a matéria prima P-188. Ocorreu diminuição da temperatura onset do GMS e FSH na mistura física em relação à matéria prima pura, mostrando a forte interação destes lipídios de diferentes estruturas.

A figura 32 representa o evento endotérmico e exotérmico das MF (P-188/FSH/GMS) contendo concentrações crescentes de fármaco.

**Figura 32.** Curva DSC da mistura física P-188/FSH/GMS contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU, (A) Aquecimento (B) Resfriamento. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C



Conforme ilustrado na figura 32 (A) a MF contendo 2% de IBU possui três eventos endotérmicos característicos da mistura física pura. As concentrações de 3, 5, 10 e 15% de IBU apresentam dois picos endotérmicos, sendo que os picos da FSH e GMS se fundiram de forma simultânea.

**Tabela 23.** Dados de DSC da mistura física (P-188/FSH/GMS) e da mistura física contendo fármaco com o ponto de fusão, temperatura onset e os valores de entalpias

Componente	Ponto de Fusão (°C)			Onset (°C)		$\Delta H$ [obtido] Total (J/g)	$\Delta H$ [esperado] Total (J/g)
MF	51,03	63,00	65,67	47,95	57,82	117,00	102,77
MF/2%IBU	49,20	64,15	65,28	45,00	59,87	98,29	100,82
MF/3%IBU	49,59		65,83	44,55	59,78	95,38	100,44
MF/5%IBU	49,28		64,06	45,03	59,38	104,05	98,88
MF/10%IBU	49,91		64,74	47,02	58,96	90,23	95,00
MF/15%IBU	49,41		64,33	44,24	58,73	94,07	91,12

No processo de cristalização da mistura física contendo IBU foi possível observar que a mistura física contendo 10 e 15% de fármaco apresentaram desorganização dos eventos da curva conforme mostra na figura 32 (B).

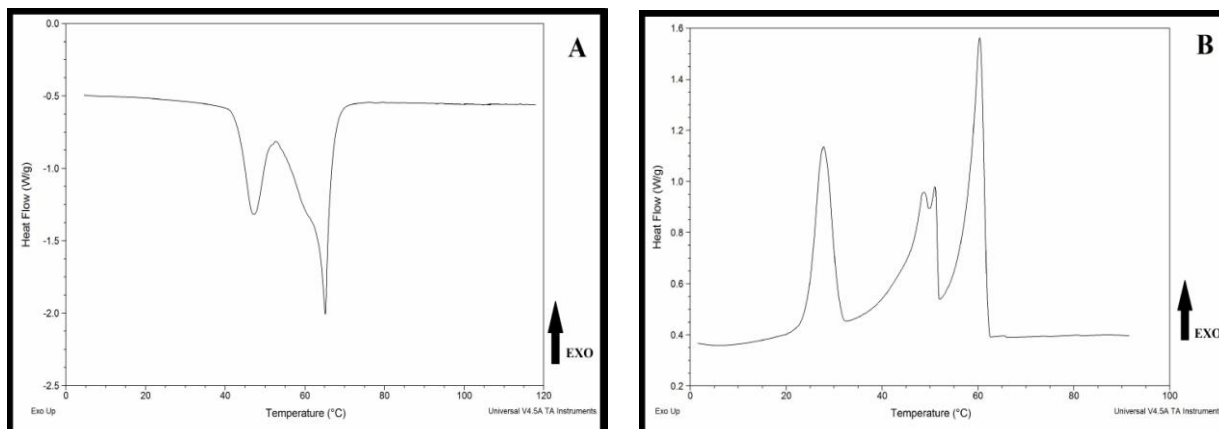
**Tabela 24.** Dados de DSC da mistura física (P-188/FSH/GMS) e da mistura física contendo fármaco com a cristalização, temperatura onset e os valores de entalpias

Componente	Cristalização (°C)			Onset (°C)			$\Delta H$ [obtido] Total (J/g)	$\Delta H$ [esperado] Total (J/g)
MF	22,80	50,79	57,27	27,40	50,79	57,27	-80,09	-79,41
MF/2%IBU	19,76	49,64	60,66	24,53	52,59	63,14	- 68,02	-69,52
MF/3%IBU	21,01	49,05	56,45	27,53	52,45	61,85	- 68,57	-69,28
MF/5%IBU	20,06	48,49	56,67	24,66	51,81	62,85	- 72,51	-68,31
MF/10%IBU	17,04	45,90	57,01	21,62	48,73	58,27	- 63,30	-65,87
MF/15%IBU	20,85	45,23	56,46	25,46	47,94	58,08	- 66,40	-63,45

A curva de DSC da NLS sem fármaco foi feita com o intuito de avaliar as condições aplicadas no processo de desenvolvimento das NLS e a interação dos excipientes quando a amostra é aquecida e sonicada. Logo a curva de DSC da mistura física antes do processamento foi comparada com a curva de DSC das NLS após processamento para observar as possíveis interações ocorridas entre os excipientes.

A figura 33 mostra a curva de DSC da NLS sem fármaco.

**Figura 33.** Curva DSC da NLS sem fármaco, (A) Aquecimento (B) Resfriamento. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C



No evento de aquecimento a NLS sem fármaco apresenta dois eventos endotérmicos em 46,83 °C (T-onset 43,01 °C) com  $\Delta H$  igual a 18,31 J/g e 65,19 °C (T-onset 61,88 °C) com  $\Delta H$  igual a 45,19 J/g.

Foi possível comparar a curva de DSC da mistura física com a NLS sem fármaco e observar que as condições aplicadas no processo de desenvolvimento da NLS, aquecimento e sonicação, diminuíram a interação do GMS com o P-188 devido ao aumento da entalpia do pico de fusão do P-188 de 16,29 vezes em relação à entalpia do P-188 presente na mistura física (P-188/FSH/GMS). O aumento da entalpia de fusão do P-188 nas NLS em relação à mistura física após o processamento indica que este componente está revestindo a matriz lipídica, pelo fato que o P-188 não está interagindo fortemente com a matriz. (SOUZA *et al.*, 2012).

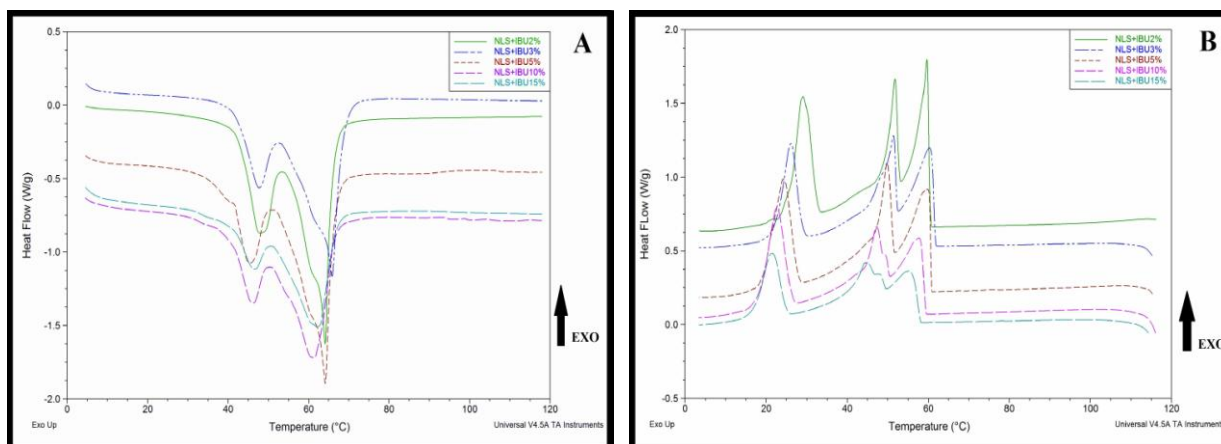
O segundo pico endotérmico apresentou diminuição de entalpia da mistura física para a NLS de 31,96 J/g conforme ilustrado nas figuras 31 e 33. Nota-se que ocorreu mudança na curva de DSC da NLS em relação à mistura física (P-188/FSH/GMS), na qual, ocorreu a fusão simultânea do segundo pico endotérmico mostrando forte interação da FSH com o GMS. Este fato é devido à mistura de lipídios de diferentes comprimentos de cadeia carbônica e diferentes estruturas possuírem solubilidade mútua (BUNJES; WESTESEN; KOCH, 1996; JENNING; THÜNEMANN; GOHLA, 2000).

Na curva de resfriamento é possível observar três picos exotérmicos, o primeiro evento ocorre em 60,39 °C com  $\Delta H$  igual a -23,70 J/g, o segundo com ponto de cristalização em 48,56 °C com  $\Delta H$  -19,59 J/g e o terceiro em 27,77 °C com  $\Delta H$  igual a -18,24 J/g.

Observa-se que a curva exotérmica da NLS apresenta estrutura diferenciada em relação à curva da mistura física, mostrando a interação entre os excipientes presentes na NLS após o processamento (ANGELIERI, 2013).

A figura 34 representa o evento endotérmico e exotérmico das NLS sem e contendo concentrações crescentes de fármaco.

**Figura 34.** Curva DSC da NLS/IBU contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU, (A) Aquecimento (B) Resfriamento. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo de 0 a 120°C



No evento de aquecimento observado na figura 34 (A) ocorre deslocamento e alargamento do pico das NLS contendo 5, 10 e 15% de IBU. A entalpia de fusão contendo todas as concentrações de fármaco é menor que a entalpia esperada. Com isto, é possível observar que, com o aumento da quantidade de fármaco, maior é a interação do IBU com os componentes da NLS.

Pudemos observar que não aparece o pico de fusão do IBU na curva de DSC, mostrando que os cristais do fármaco solubilizaram no GMS e na FSH, sendo que o IBU possui maior interação com a FSH, logo podemos inferir que o fármaco está molecularmente disperso na matriz lipídica. Resultados semelhantes foram observados por SILVA e colaboradores (2011) na qual primeiramente realizaram o estudo de solubilidade do lipídio para o desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas contendo risperidonas (RISP), o Imwitor<sup>®</sup> 900 foi escolhido. Para confirmar o teste de solubilidade, foi realizada análise de DSC da mistura física do lipídio



contendo 1, 2, e 3% de RISP. Observaram que ocorreu a diminuição da temperatura onset e do ponto de fusão da mistura física e houve alargamento do pico, sendo mais acentuado com o aumento da concentração de fármaco no lipídio, além disso, não houve evento de fusão da RISP na mistura física. Estes resultados confirmaram que o fármaco estava solubilizado no lipídio. Além disto, analisaram a curva DSC da NLS com e sem fármaco para investigar a incorporação do fármaco. Foi possível confirmar que a RISP estava dispersa na fase lipídica porque o pico típico de fusão do fármaco não foi detectado.

ZIMMERMANN e colaboradores (2005) investigaram a interação do fármaco RMEZ98 na matriz lipídica, na qual foi realizada análise de DSC da mistura física (RMEZ98 + Imwitor<sup>®</sup> 900) contendo 5, 10, 15, 20, 25 e 30% do fármaco. Observaram que ocorreu uma diminuição da temperatura onset e ocorreu mudança dos eventos, sendo mais evidenciada com o aumento da concentração de fármaco. Sendo assim, puderam afirmar que o fármaco possui interação com o lipídio e esta interação aumenta com o aumento da concentração de RMEZ98.

**Tabela 25.** Dados de DSC da NLS sem e com fármaco (2, 3, 5, 10 e 15% de IBU), com o ponto de fusão, temperatura onset e os valores de entalpias

Componente	Ponto de Fusão(°C)		Onset (°C)		$\Delta H$ [obtido] Total (J/g)	$\Delta H$ [esperado] Total (J/g)
NLS	46,83	65,19	43,01	61,88	88,21	102,77
NLS/2%IBU	47,30	64,13	42,84	60,88	96,99	100,82
NLS/3%IBU	47,31	65,92	42,08	61,00	90,30	100,44
NLS/5%IBU	44,85	64,15	40,68	59,67	87,01	98,88
NLS/10%IBU	45,33	61,66	40,74	54,01	76,59	95,00
NLS/15%IBU	45,82	62,64	40,99	53,28	69,83	91,12

Na figura 34 (B) observa-se que as NLS com concentrações de 10 e 15% de IBU possuem desorganização dos eventos na curva de cristalização comparado com a NLS sem fármaco, evidenciando assim, que conforme aumenta a concentração do fármaco maior é a interação com os componentes da formulação.

**Tabela 26.** Dados de DSC da NLS sem e com fármaco com a cristalização, temperatura onset e os valores de entalpias

Componente	Cristalização (°C)			Onset (°C)			$\Delta H$ [obtido]	$\Delta H$ [esperado]
							Total (J/g)	Total (J/g)
NLS	27,77	48,56	60,39	30,99	51,74	61,99	- 78,71	- 70,74
NLS/2%IBU	28,99	51,68	59,63	32,46	52,77	60,39	- 90,36	- 69,52
NLS/3%IBU	26,12	51,34	60,51	28,86	52,23	61,75	- 78,08	- 69,28
NLS/5%IBU	24,12	49,84	60,00	27,61	51,35	60,76	- 93,51	- 68,31
NLS/10%IBU	22,54	47,11	57,95	26,22	50,36	59,30	- 78,21	- 65,87
NLS/15%IBU	21,35	44,15	56,01	24,76	49,43	58,00	- 59,66	- 63,45

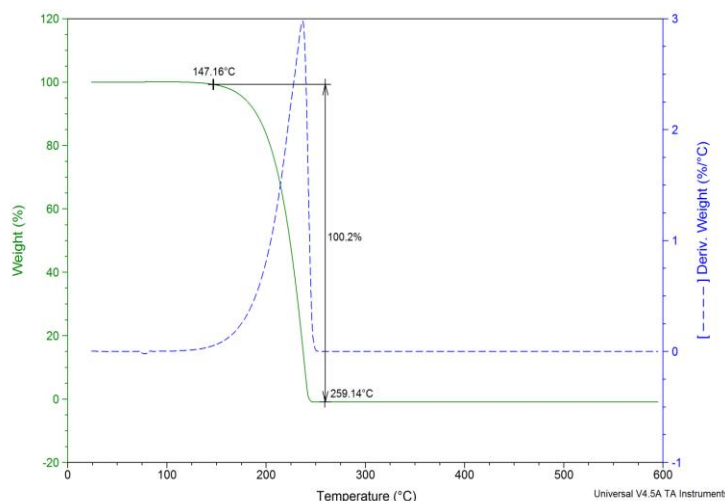
#### 4.5 TERMOGRAVIMETRIA

A termogravimetria (TG) é uma técnica na qual a variação de massa de uma substância é medida em função da temperatura, enquanto é submetida a uma programação controlada de temperatura (TOMASSETI; CAMPANELLA; AURELI, 1989).

Neste estudo a TG foi realizada com os objetivos de avaliar a estabilidade térmica do fármaco encapsulado nas NLS e das NLS contendo fármaco comparado a NLS sem fármaco, assim como avaliar a temperatura de degradação dos excipientes e das NLS e complementar as informações obtidas da curva de DSC.

A Figura 35 mostra a curva TG/DTG do ibuprofeno.

**Figura 35.** Curva de TG/DTG do ibuprofeno. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo temperatura ambiente a 600°C

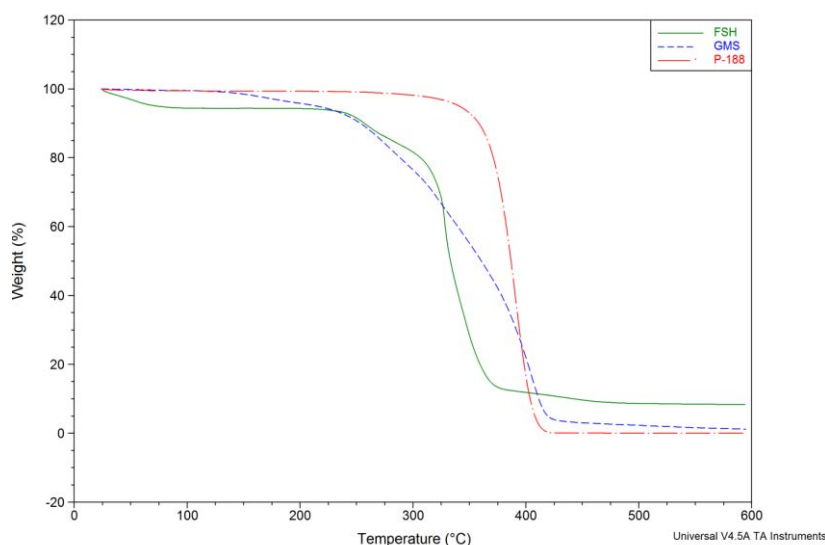


Na figura 35 é possível observar que ocorre perda total de massa de 100,2% em um único evento térmico entre as temperaturas de 147,16 e 259,14 °C. Segundo XU e colaboradores (2004) este fato acontece devido à vaporização do ibuprofeno. Outros pesquisadores tais como, LERDKANCHANAPORN e DOLLIMORE (2000), têm estudado o processo de vaporização do ibuprofeno com mais detalhes. Foi descoberto que o processo de vaporização é um processo característico de ordem zero, pois em qualquer temperatura especificada a taxa de vaporização de uma superfície uniforme será um valor constante.

Desta forma, pode-se verificar que o IBU é estável termicamente até a temperatura de 147,16 °C, pois até esta temperatura não ocorre perda de massa.

A figura 36 mostra as curvas de TG dos excipientes, FSH, GMS, P-188.

**Figura 36.** Curvas de TG dos excipientes: FSH, GMS e P-188. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo temperatura ambiente a 600 °C



**Tabela 27.** Porcentagem de perda de massa das curvas de TG da FSH, GMS e P-188

Componente	T°Cinicial/T°C final	Perda de Massa (%)	T°Cinicial/T°C final	Perda de Massa (%)	T°Cinicial/T°C final	Perda de Massa (%)
<b>FSH</b>	36,39 / 72,71	3,35	107,7 / 283,4	9,63	285,8 / 392,9	72,07
<b>GMS</b>	109,0 / 300,9	23,01	302,7 / 446,2	73,31	-	-
<b>P-188</b>	330,6 / 419,2	96,34	-	-	-	-

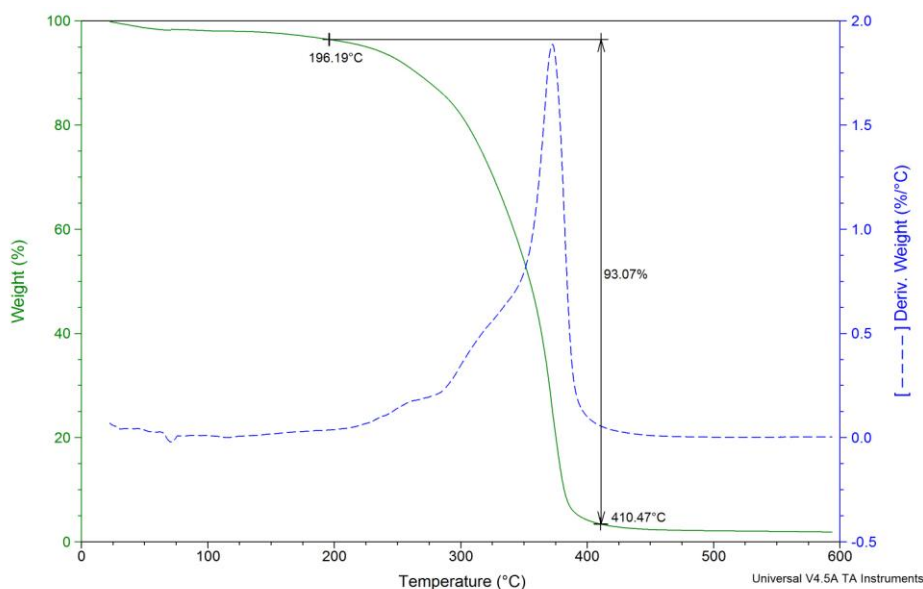
Na tabela 27 observa-se que a FSH possui três eventos, na qual a perda de massa inicial é de 3,35% sendo irrisória e ocorre na temperatura entre 36,39 - 72,71 °C. Esta pequena perda de massa pode ser sugerida devido à perda da água presente na FSH absorvida pela umidade do ar, ou, de algum resíduo de solvente orgânico presente na amostra referente ao processo de obtenção da FSH. A última etapa apresenta uma perda da massa de maior intensidade e acontece em temperatura elevada, provavelmente ocorre devido à degradação da FSH, como pode ser observado na figura 36.

Os eventos que acontecem para os excipientes GMS e P-188 podem estar relacionados com a degradação das respectivas matérias primas (Tabela 27).

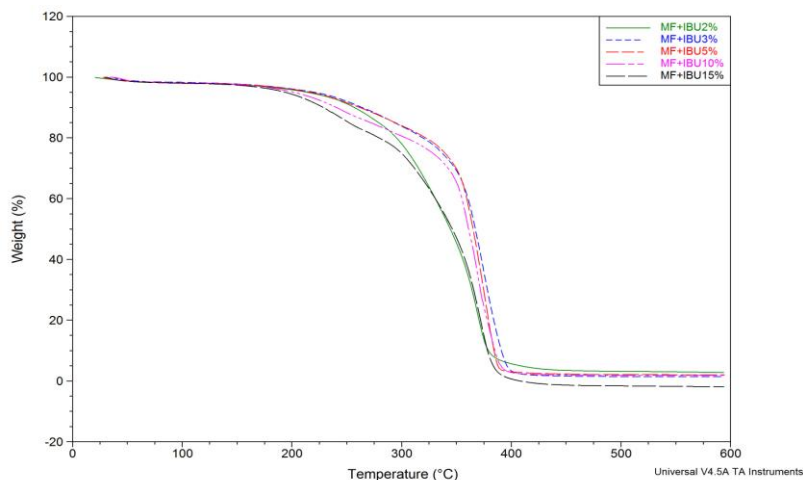
Diante disto, é possível observar que a faixa de temperatura utilizada para o desenvolvimento da NLS (75°C) é inferior aos eventos térmicos apresentados pelos excipientes, sendo estes adequados para a produção da formulação.

As figuras 37 e 38 representam as curvas de TG/DTG da mistura física (P-188/FSH/GMS) sem fármaco e a curva TG da MF (P-188/FSH/GMS) contendo fármaco respectivamente.

**Figura 37.** Curva TG/DTG da mistura física (P-188/FSH/GMS) sem fármaco. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10°C/min no intervalo temperatura ambiente a 600 °C



**Figura 38.** Curva TG da mistura física (P-188/FSH/GMS) com 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo temperatura ambiente a 600 °C



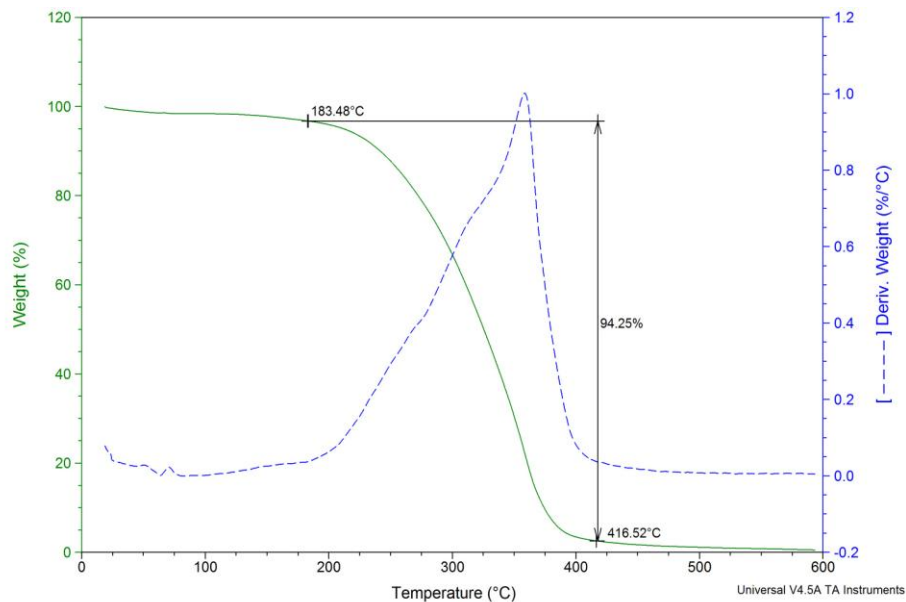
**Tabela 28.** Porcentagem de perda de massa das curvas de TG para IBU, MF (P-188/FSH/GMS) e MF (P-188/FSH/GMS) contendo 2, 3, 5, 10 e 15 de IBU%

Componente	T°C inicial/T°C final	Perda de Massa (%)
<b>IBU</b>	147,2 / 259,1	100,20
<b>MF sem fármaco</b>	196,2 / 410,5	93,07
<b>MF+IBU2%</b>	193,2 / 406,8	90,99
<b>MF+IBU3%</b>	195,0 / 410,1	94,34
<b>MF+IBU5%</b>	201,0 / 403,8	93,19
<b>MF+IBU10%</b>	175,6 / 412,3	94,451
<b>MF+IBU15%</b>	157,5 / 417,1	97,78

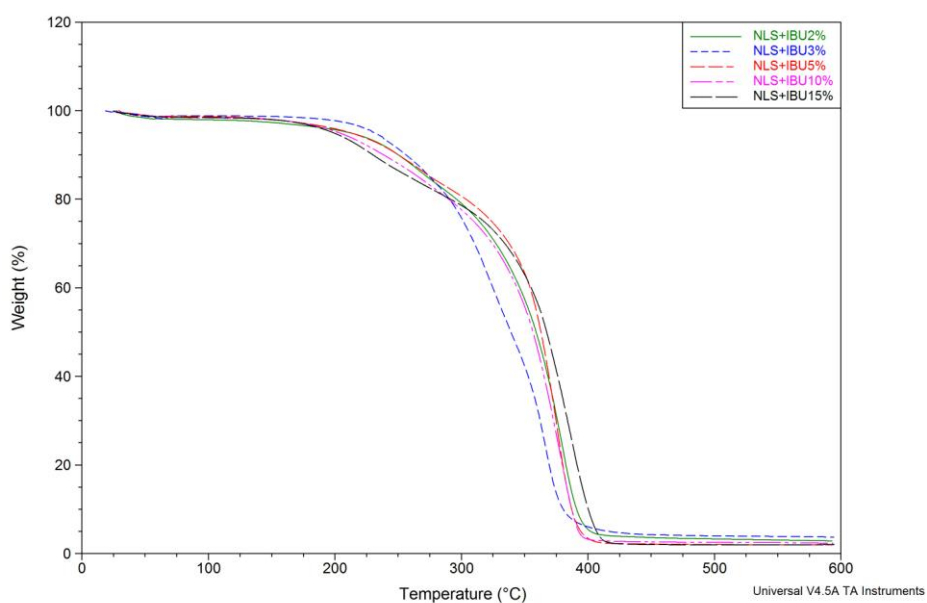
Observou-se nos resultados apresentados na tabela 28 que a perda de massa da MF (P-188/FSH/GMS) sem e com fármaco ocorreu em um único evento, em temperatura acima da temperatura na qual foi realizada o desenvolvimento da formulação. Observou-se também que na curva TG da MF (P-188/FSH/GMS) contendo fármaco, conforme aumentou a quantidade de fármaco, maior foi a perda de massa (%) com uma diferença de 6,79 % em relação a MF contendo 2% para a de 15%. Portanto foi possível observar a presença do IBU na MF.

As figuras 39 e 40 representam a curva de TG da NLS sem fármaco e NLS contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU.

**Figura 39.** Curva TG da nanopartícula lipídica sólida sem fármaco. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10°C/min no intervalo temperatura ambiente a 600°C



**Figura 40.** Curvas de TG da NLS+IBU2%, NLS+IBU3%, NLS+IBU5%, NLS+IBU10% e NLS+IBU15%. Condições experimentais: atmosfera de nitrogênio 50 mL/min, razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min no intervalo temperatura ambiente a 600°C



**Tabela 29.** Porcentagem de perda de massa das curvas de TG para IBU, NLS e NLS+IBU 2, 3, 5, 10 e 15%

Componente	T°Cinicial/T°C final	Perda de Massa (%)	T°Cinicial/T°C final	Perda de Massa (%)
<b>IBU</b>	147,2 / 259,1	100,20	-	-
<b>NLS sem fármaco</b>	183,5 / 416,5	94,25	-	-
<b>NLS+IBU2%</b>	201,6 / 281,5	13,36	288,8 / 415,0	77,75
<b>NLS+IBU3%</b>	205,3 / 280,3	14,23	286,4 / 406,8	76,20
<b>NLS+IBU5%</b>	210,1 / 288,2	12,80	297,9/ 421,8	78,82
<b>NLS+IBU10%</b>	150,8 / 279,7	15,60	285,8 / 412,9	77,67
<b>NLS+IBU15%</b>	150,2 / 257,9	13,10	261,6 / 428,0	82,56

Conforme ilustrado na figura 39 a perda de massa da NLS sem fármaco ocorreu em um único evento em temperatura acima do desenvolvimento da formulação. Porém, quando o fármaco foi adicionado à formulação ocorreu aumento na estabilidade térmica das nanopartículas, comparado com as NLS sem fármaco, devido ao aumento da temperatura de degradação da NLS contendo IBU (Figura 39).

Foi possível observar nas curvas TG do IBU e das NLS contendo fármaco, como representado na tabela 29, o aumento da estabilidade térmica do fármaco quando incorporado ao sistema, devido à perda de massa iniciar-se em temperaturas superiores à do IBU o que comprova que a incorporação do IBU nas NLS evita a vaporização do fármaco.

Foi possível comparar a curva TG da mistura física (P-188/FSH/GMS) e NLS contendo 2, 3, 5 10 e 15% de IBU, como ilustrado nas figuras 38 e 40, em que a MF com IBU apresentou um único evento e a NLS com fármaco apresentou dois eventos térmicos. OLIVEIRA e colaboradores (2013) analisaram a interação do fármaco e polímero através da análise termogravimétrica das misturas físicas e das micropartículas de (PLGA) contendo diferentes concentrações de metotrexato. Foi observado que o aumento da interação do fármaco com a matriz lipídica era devido à menor similaridade entre as curvas TG da mistura física e das micropartículas. Portanto a diferença da curva TG da MF e NLS com fármaco neste estudo, certifica que o IBU encontra-se incorporado à matriz lipídica e conforme aumentou a concentração do IBU, maior foi esta interação.

A degradação da NLS sem e com fármaco ocorreu somente em altas temperaturas como mostram as curvas TG na tabela 29, sendo esta temperatura superior a utilizada para o desenvolvimento da formulação.

#### **4.6 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO IBU EM TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO 0,1M; PH 7,4**

A solubilidade do IBU em tampão fosfato 0,1 M; pH 7,4 foi de 4,89 mg/mL, o fármaco apresentou concentração dez vezes maior, caso passasse pela membrana sintética 100% do IBU liberado da nanopartícula, para manter as condições de não saturação (condições “sink”) a concentração do fármaco não deve exceder 10% da solubilidade de saturação da solução receptora (OECD, 2004).

#### **4.7 ESTUDO *IN VITRO* DE LIBERAÇÃO DO IBUPROFENO INCORPORADO NAS NLS**

O teste de liberação *in vitro* foi realizado com as formulações contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU e solução de ibuprofeno que foi utilizada como controle neste experimento. O teste permitiu verificar a quantidade liberada do IBU em um intervalo específico de tempo, de modo a caracterizar o perfil de liberação do fármaco.

As tabelas 30 a 34 apresentam a quantidade real de fármaco liberado (Q real) em determinado tempo que foi determinado pela equação 7 descrita no item 3.2.7. Em seguida calculou-se a média (n=6) da quantidade liberada em função da área de exposição  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Calculou-se também a porcentagem liberada por  $\text{cm}^2$  e o desvio padrão relativo (DPR), sendo que os valores de DPR para todas as formulações foram inferiores 10% (USP, 2009). Todos estes dados foram obtidos em relação à quantidade de amostra e concentração do fármaco que estavam presente no copo dosador no ensaio de liberação.



**Tabela 30.** Liberação do IBU a partir da NLS 2% com Q real ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), porcentagem de IBU liberada e DPR (média de n=6)

Tempo (h)	Média Q real ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Liberação (%)	DPR (%)
0,5	42,79	20,93	6,49
1	62,90	30,77	5,50
2	98,53	48,19	3,00
4	123,11	60,22	2,20
8	178,60	87,36	4,14
12	201,13	98,37	2,11
18	203,73	99,65	1,27
24	204,19	99,87	1,65

**Tabela 31.** Liberação do IBU a partir da NLS 3% com Q real ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), porcentagem de IBU liberada e DPR (média de n=6)

Tempo (h)	Média Q real ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Liberação (%)	DPR (%)
0,5	54,63	22,45	6,20
1	70,52	28,97	4,87
2	109,85	45,14	5,50
4	135,79	55,79	3,49
8	207,62	85,31	3,26
12	233,49	95,94	2,82
18	245,59	100,91	2,87
24	248,22	101,99	2,84

**Tabela 32.** Liberação do IBU a partir da NLS 5% Q real ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), porcentagem de IBU liberada e DPR (média de n=6)

<b>Tempo (h)</b>	<b>Média Q real (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>)</b>	<b>Liberação (%)</b>	<b>DPR (%)</b>
0,5	56,57	13,87	6,64
1	94,64	23,20	5,38
2	161,39	39,56	3,08
4	236,67	58,02	3,40
8	329,95	80,89	2,63
12	365,12	89,51	2,77
18	389,98	95,60	3,08
24	401,73	98,48	1,76

**Tabela 33.** Liberação do IBU a partir da NLS 10% Q real ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), porcentagem de IBU liberada e DPR (média de n=6)

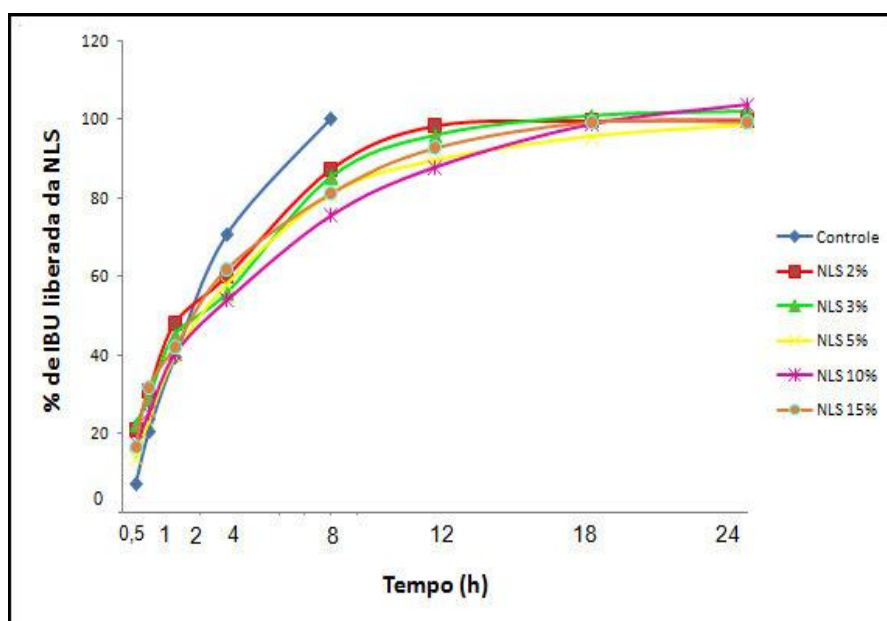
<b>Tempo (h)</b>	<b>Média Q real (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>)</b>	<b>Liberação (%)</b>	<b>DPR (%)</b>
0,5	144,86	17,55	6,37
1	207,68	25,16	5,40
2	333,06	40,35	3,06
4	445,89	54,02	2,64
8	623,71	75,56	3,12
12	724,95	87,83	3,85
18	815,07	98,75	2,54
24	856,19	103,73	1,92

**Tabela 34.** Liberação do IBU a partir da NLS 15% Q real ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), porcentagem de IBU liberada e DPR (média de n=6)

Tempo (h)	Média Q real ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Liberação (%)	DPR (%)
0,5	204,27	16,92	4,59
1	385,59	31,94	3,60
2	508,19	42,10	5,05
4	748,69	62,02	2,62
8	980,63	81,23	3,73
12	1120,51	92,82	3,18
18	1199,90	99,40	3,32
24	1200,29	99,43	1,68

A figura 41 representa a % de IBU liberada das nanopartículas contendo 2, 3, 5, 10 e 15% do fármaco e solução de ibuprofeno controle em relação ao tempo. A porcentagem liberada por  $\text{cm}^2$  foi calculada pela quantidade liberada em função da área de exposição  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  multiplicado por 100 e dividido pela quantidade total de ativo no anel dosador.

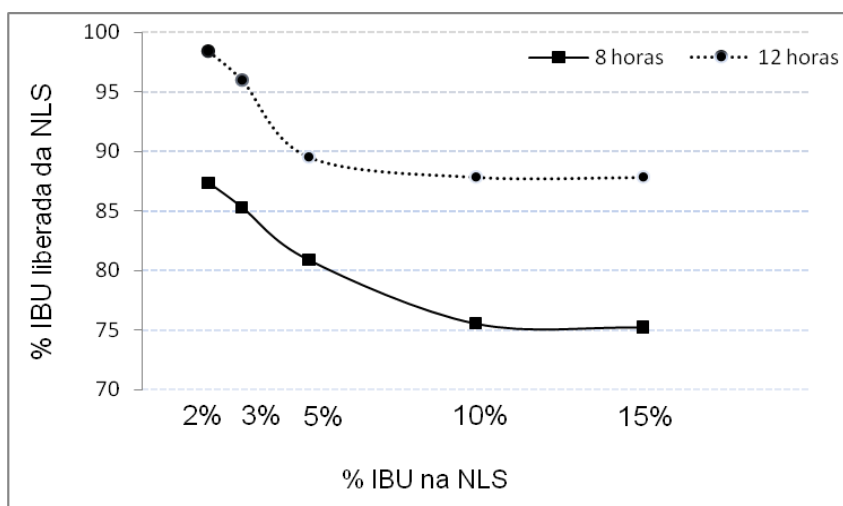
**Figura 41.** Perfil de liberação (% liberada) do IBU nas NLS contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de fármaco e solução de ibuprofeno controle (média n=6)



Pode-se observar na figura 41 que as formulações contendo fármaco e a solução de IBU, apresentaram liberação controlada do fármaco. Porém, a solução de IBU controle libera 100% do fármaco em 8 horas de experimento. As NLS contendo 2 e 3% de IBU liberam a quantidade total de IBU em 12 horas e as outras concentrações em aproximadamente 24 horas. O perfil de liberação observado é característico de um sistema do tipo matricial, na qual o fármaco está molecularmente disperso na matriz lipídica. O item 1.2.2 descreve este tipo de modelo.

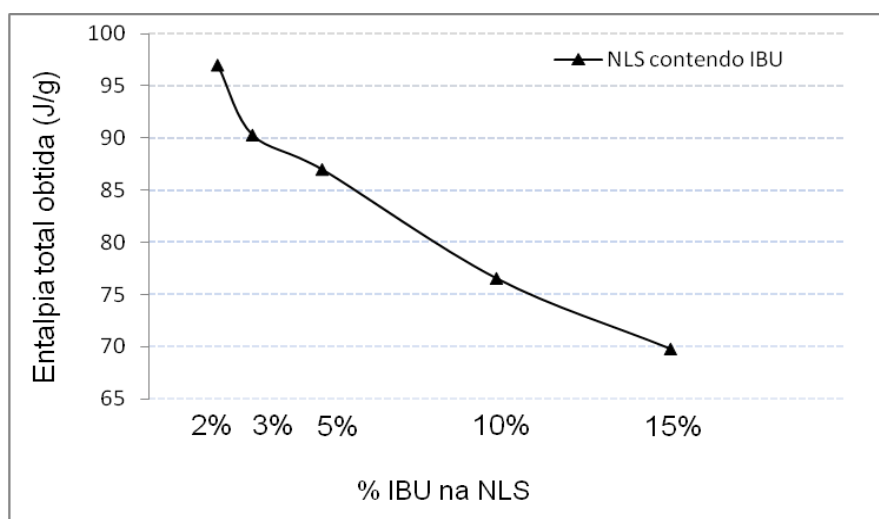
Para observar o efeito da porcentagem do IBU na liberação das NLS contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de fármaco no mesmo tempo, foi construído um gráfico de porcentagem liberada do IBU nos tempos de 8 e 12 horas. A figura 42 ilustra estes resultados.

**Figura 42.** Porcentagem liberada do IBU das NLS contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU nos tempos de 8 e 12 horas



Observou-se nos resultados apresentados na figura 42 que no tempo de 8 horas as concentrações de 10 e 15% liberaram uma porcentagem menor de fármaco comparada as outras concentrações (2, 3 e 5% de IBU). O mesmo perfil de liberação foi observado no tempo de 12 horas. Com isto foi possível observar que com o aumento da quantidade de fármaco, maior é a interação do IBU com os componentes da NLS. Os resultados da curva de DSC das NLS contendo fármaco corroboram com estes resultados. Logo foi construído um gráfico, representado na figura 43, com os valores de entalpia total obtida (J/g) com os dados da tabela 25 do item 4.4, em relação à porcentagem de IBU presente na NLS.

**Figura 43.** Entalpia obtida total (J/g) da curva de DSC da NLS contendo 2, 3, 5, 10 e 15% de IBU



De acordo com a figura 43 nota-se que conforme aumenta a concentração de fármaco na NLS menor é a entalpia obtida. Segundo MARCATO (2009), a fusão de um cristal altamente organizado requer maior energia de entalpia de fusão para superar as forças de coesão do retículo cristalino do que um cristal pouco ordenado ou amorfo, ou seja, valores altos de entalpia de fusão sugerem uma alta organização no retículo cristalino. Diante disso, os resultados observados na figura 43 demonstram que as formulações contendo concentrações maiores de fármaco (10 e 15%) apresentam estrutura menos ordenada do que as demais concentrações, por terem valores menores de entalpia, possuindo assim maior interação com a matriz lipídica e conseqüentemente a liberação do fármaco ocorre de forma mais lenta e por mais tempo.

Desta forma, devido a análise da curva de TG e DSC levou à proposição de que o IBU está molecularmente disperso na matriz lipídica, além de que, com o aumento da concentração do fármaco, menor é a entalpia obtida, pois ocorre uma maior interação do fármaco com a matriz lipídica. O estudo da liberação complementa estes dados, devido às concentrações de 10 e 15% de fármaco apresentarem liberação de forma mais lenta. Assim também, esta maior interação contribui com a organização dos materiais estruturais das NLS, favorecendo a esferoinização do sistema, a qual é confirmada pelas imagens de AFM (Figura 19) descrita no item 4.2.3.

AJI ALEX e colaboradores (2011) realizaram os teste de DSC e liberação e concluíram, pelos resultados obtidos, que as NLS apresentaram liberação controlada do lopinavir atribuído

a boa solubilidade do fármaco no lipídio e devido ao fato que o fármaco possui uma distribuição homogênea na matriz lipídica, demonstrada na curva de DSC. Com o mesmo objetivo PANG e colaboradores (2011) estudaram a liberação do ibuprofeno em filmes de PLGA. Os autores relataram que ocorreu liberação controlada do fármaco, sendo que o efeito *burst* não foi observado na liberação pelo fato do IBU estar distribuído homogeneamente no polímero.

Foi avaliado o perfil de liberação do IBU nas NLS através da utilização de modelos matemáticos, seguindo modelos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Weibull e Hixson-Crowell, com o principal objetivo de caracterizar o processo de liberação do IBU através do sistema.

O modelo matemático de ordem zero descreve a liberação da mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo. O modelo de primeira ordem descreve que a quantidade de fármaco liberada diminui ao longo do tempo, uma vez que a liberação do fármaco ocorre de forma proporcional à quantidade de fármaco que permanece no interior da forma farmacêutica. O modelo de Higuchi descreve que a liberação do fármaco ocorre de forma dependente do tempo, por um processo de difusão baseado na lei de Fick. O modelo de Korsmeyer-Peppas descrever mecanismos de liberação do fármaco que não são previsíveis ou que envolvem mais do que um tipo de fenômeno de liberação e que podem apresentar um comportamento anômalo. O modelo de Weibull descreve a fração cumulativa de fármaco na solução ao tempo, sendo que o logaritmo da quantidade de fármaco dissolvido versus o logaritmo do tempo será linear. O modelo de Hixson-Crowell descreve que a área de uma partícula é proporcional à raiz cúbica do seu volume (RITGER e PEPPAS, 1987; COSTA e LOBO, 2001).

A tabela 35 representa os valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) relativos a cada modelo matemático.

**Tabela 35.** Valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) calculado pela fórmula de cada modelo matemático.

Ordem de Liberação	Fórmula	NLS 2%	NLS 3%	NLS 5%	NLS 10%	NLS 15%
Ordem zero	$Q_{real} \times tempo$	0,756	0,805	0,789	0,868	0,788
Primeira ordem	$\log Q_{real} \times tempo$	0,644	0,700	0,631	0,717	0,637
Higuchi	$Q_{real} \times \sqrt{tempo}$	0,901	0,931	0,925	0,971	0,924
Korsmeyer-Peppas	$\ln Q_{real} \times \ln tempo$	0,959	0,975	0,955	0,985	0,953
Weibull	$\log\{\ln [(1 - q_{real}) - 1]\} \times \log tempo$	0,944	0,968	0,934	0,975	0,936
Hixson-Crowell	$\sqrt[3]{\%remanecente} \times tempo$	0,922	0,974	0,952	0,960	0,949

O principal critério para escolher o melhor modelo de liberação foi pela análise do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), mais próximo de 0,99 (COSTA e LOBO, 2001). Logo, foi possível observar na tabela 35 que as NLS contendo 2, 10 e 15% de IBU apresentaram o melhor coeficiente de determinação para o perfil de Korsmeyer-Peppas. As formulações contendo 3 e 5% de IBU apresentaram melhor  $R^2$  para dois perfil matemático, o perfil de Korsmeyer-Peppas e o de Hixson-Crowell.

O modelo matemático de Korsmeyer-Peppas (equação 8), é um modelo simples e semi-empírico desenvolvido por KORSMEYER e colaboradores (1983), na qual relaciona exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo decorrido. O modelo também pode ser expresso através da análise do valor de  $n$  contido na equação. PEPPAS (1985) utilizou este valor  $n$  para caracterizar diferentes mecanismos de liberação, em que considerou o valor de  $n$  como o expoente de liberação. Os valores de  $n = 0,5$  expressam modelo de difusão fickiana, os valores de  $n$  entre 0,5 a 1 expressam um modelo não fickiano, na qual ocorre transporte anômalo,  $n = 1$  transporte de caso II e por fim,  $n > 1$  expressa modelo de super transporte de caso II.

$$\frac{Mt}{M\infty} = at^n$$

**Equação 8**

Na qual:

$a$  é a constante cinética de liberação controlada;  $n$  é o expoente de liberação e  $Mt/M$  é a fração do fármaco liberado ao longo do tempo.

O valor de  $n$  encontrado para a NLS 2% foi de 0,42; NLS 3% foi de 0,42; NLS 5% foi de 0,50; NLS10% foi de 0,47 e NLS 15% foi de 0,45. Dessa forma, os ensaios de liberação para todas as formulações apresentaram  $n \leq 0,5$ ; que resulta no mecanismo de liberação do tipo difusão fickiana. Neste mecanismo o fármaco se difunde pelos poros do esqueleto lipídico que é formado após penetração do líquido de dissolução na matriz, o qual dissolve o fármaco e os compostos hidrossolúveis.

Na difusão fickiana a velocidade de liberação do fármaco diminui em função do tempo, devido ao fato, principalmente de aumentar a distância percorrida pelas moléculas do fármaco até à superfície de liberação, na medida que o solvente avança dentro da forma farmacêutica (PEPPAS, 1985).



**\_\_\_\_\_ CONSIDERAÇÕES  
FINAIS**

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ O estudo de solubilidade do IBU nos diferentes lipídios demonstrou ser o monoestearato de glicerila o lipídio adequado para a obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas contendo IBU;
- ✓ As NLS produzidas pela técnica de sonicação apresentaram diâmetro médio de partículas em escala nanométrica, sendo esta técnica efetiva para produção de nanopartículas. As NLS contendo menores concentrações de fármaco apresentaram menor diâmetro de partícula e Pdi. O Pz indicou a presença de estabilidade termodinâmica no sistema no tempo de 1 dia;
- ✓ A metodologia analítica por espectrofotometria na região ultravioleta desenvolvida para o IBU em tampão fosfato de potássio 0,1 M; pH 7,4 mostrou-se adequada para a quantificação do IBU, na qual foi utilizada no estudo de EE (%) e liberação *in vitro* do IBU incorporado nas NLS;
- ✓ Estudo de eficiência de encapsulação mostrou uma taxa de encapsulação do IBU na NLS superiores a 58%;
- ✓ A análise da AFM permitiu analisar a morfologia e o tamanho das partículas. As micrografias indicaram formação de partículas nanométricas com formato irregular, porém conforme aumentou a quantidade de fármaco no sistema o formato apresentou-se aproximadamente esférico;
- ✓ Estudo de estabilidade demonstrou que todas as formulações apresentaram estabilidade termodinâmica do sistema por 60 dias;
- ✓ As análises de DSC sugeriram que o IBU está molecularmente disperso na matriz lipídica. A matriz das NLS permanecem no estado sólido;

- ✓ As análises de TG mostraram que ocorre uma maior estabilidade térmica do IBU quando este é incorporado na NLS, como também das nanopartículas contendo fármaco e não ocorre degradação dos excipientes e da formulação na temperatura de desenvolvimento da NLS;
- ✓ O estudo *in vitro* de liberação demonstrou que todas as formulações apresentaram liberação controlada do fármaco. O perfil de liberação *in vitro* seguiu o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas, sendo que para todas as formulações o transporte de IBU ocorreu pela difusão do fármaco;
- ✓ As análises de DSC, TG e estudo *in vitro* de liberação demonstraram que o IBU se encontra disperso na matriz lipídica e com concentrações maiores do fármaco maior é a interação com a matriz. A análise de AFM complementa estes dados.

Pode-se concluir que o sistema desenvolvido neste projeto apresentou resultados promissores para obtenção de sistema de liberação modificada do IBU incorporado nas NLS a ser futuramente avaliado no tratamento de doenças crônico-degenerativas.

*REFERÊNCIAS*  
*BIBLIOGRÁFICAS*

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJI ALEX, M.R.; CHACKO, A.J.; JOSE, S.; SOUTO, E.B. Lopinavir loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for intestinal lymphatic targeting. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 42, p.11-18, 2011.

ANGELIERI, N. F. **Obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas contendo (-)-terpinen-4-ol**. Araraquara: UNESP, tese de Mestrado-Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

LOPES, C. M.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2º ed., Porto Alegre: Artmed, p.677, p.115, 2005.

BEJARANO, P.F. **Ibuprofeno y analgesia**. *EMB*, v. 5, p.39-42, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União. Brasília, 02 de junho de 2003, seção 1. Disponível em: <[http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs\\_leis/vm/vm1.pdf](http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf)> Acesso em: 09 nov 2013.

BUNJES, H.; SIEKMANN, B.; WESTESEN, K. Emulsions of super-cooled melts - anovel drug delivery system. In: Benita S, editor. **Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery**., Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 175-204, 1998.

BUNJES, H.; WESTESEN, K.; KOCH, M. H. J. Crystallization tendency and polymorphic transitions triglyceride nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 129, p. 159-173, 1996.

BUNJES, H; STEINIGER, F; RICHTER, W. Visualizing the Structure of triglyceride Nanoparticles in Different Crystal Modifications. **Langmuir**., v. 23, p. 4005-4011, 2007.

CARVALHO, P. O.; CASS, Q. B.; CALAFATTI, S. A.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R. Review- Alternatives for the separation of drug enantiomers: ibuprofen as a model compound. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 23, n. 3, p. 291-300, 2006.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia: Cromatografia por exclusão**. Campinas: Editora UNICAMP, p. 139-166, 2006.

CORTESI, R.; ESPOSITO, E.; LUCA, G.; NASTRUZZI, C. Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds. **Biomaterials**, v.23, p.2283-2294, 2002.

COSTA, D.; MOUTINHO, L; LIMA, J. L. F. C.; FERNANDES, E. Antioxidant activity and inhibition of human neutrophil oxidative burst mediated by arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 8, p. 1659-1670. 2006.

- COSTA, P.; SOUSA LOBO, J.M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.13, p123-133, 2001.
- DINGLER, A.; BLUM, R. P.; MÜLLER, R. H.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLNTM/Lipopearls<sup>TM</sup>) a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products. **J. Microencapsul.**, v.16, n. 6, p. 751-767, 1999.
- DUBES, A.; LOPEZ, H. P.; ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H.; SHAHGALDIAN, P.; COLENAN, A.W. Scanning electron microscopy and atomic force microscopy imaging of solid lipid nanoparticles derived from amphiphilic cyclodextrins. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.55, p. 279-282, 2003.
- Farmacopéia Brasileira. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.
- FENG, S. S.; HUANG, G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>) from nanospheres of biodegradable polymers. **J. Controlled Release**, v.71, p. 53-69, 2001.
- FRICKER, G.; KROMP, T.; WENDEL, A.; BLUME, A.; ZIRKEL, J.; REBMANN, H.; SETZER, C.; QUINKERT, R.-O.; MARTIN, F.; MÜLLER-GOYMANN, C. Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. **Pharm. Res.**, v. 27, p. 1469–1486, 2010.
- GASCO, M. R. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow distribution. **US Patent N° 5250236**, 1993.
- HOU, D.; XIE, C.; HUANG, K.; ZHU, C. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). **Biomaterials**, v.24, p.1781-1785, 2003.
- HU, F.-Q.; JIANG, S.-P.; DU, Y.-Z.; YUAN, H.; YE, Y.-Q.; ZENG, S. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. **Int. J. Pharm.**, v. 314, n. 1, p. 83–89, 2006.
- HU, F-Q.; JIANG, S-P.; DU, Y-Z. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. **Colloid. Surface. B**, v. 45, n. 3-4, p. 167–173, 2005.
- ICH Q2 (R1), INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Validation of analytical procedures**: text and methodology, 2005.
- JENNING, V.; THÜNEMANN, A. F.; GOHLA, S. H. Characterization of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. **Int. J. Harm.**, v. 199, p. 167-177, 2000.
- JONES, R.; RUBIN, G.; BERENBAUM, F.; SCHEIMAN, J. Gastrointestinal and cardiovascular risks of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Am. J. Med.**, v. 121, p.464-474, 2008.

KOCBEK, P.; BAUMGARTNER, S.; KRISTL, J. Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. **Int. J. Pharm.**, v.312, p.179-186, 2006.

KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **Int. J. Pharm.**, v. 15, p. 25-35, 1983.

KÜCHLER, S.; HERRMANN, W.; PANEK-MINKIN, G.; BLASCHKE, T.; ZOSCHKE, C.; KRAMER, K. D.; BITTL, R.; SCHÄFER-KORTING, M. SLN for topical application in skin diseases - Characterization of drug-carrier and carrier-target interactions. **Int. J. Pharm.**, v. 390, n. 2, p. 225-233, 2010.

KUNTSCHKE, J.; MÄDER, K. Handbook of Materials for Nanomedicine: Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Drug Delivery. USA: Pan Stanford Publishing, cap.9, 2010.

LANDER, R.; MANGER, W.; SCOULOUDIS, M.; KU, A.; DAVIS, C.; LEE, A. Gaulin Homogenization: A Mechanistic Study. **Biotechnol. Prog.**, v.16, p. 80–85, 2000.

LERDKANCHANAPORN, S.; DOLLIMORE, D. The evaporation of Ibuprofen from Ibuprofen-starch mixtures using simultaneous TG-DTA. **Thermochim Acta.** v. 357–358, p. 71-78, 2000.

LIPPACHER, A.; MÜLLER, R. H.; MÄDER, K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v.214, p. 9-12, 2001.

MAIA, S. C.; SCHAFER-KORTING, M.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles as drug carries for topical glucocorticoids. **Int. J. Pharm.**, v.196, p.165-167, 2000.

MANJUNATH, K.; REDDY, J. S.; VENKATESWARLU, V. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system. **Methods in Exp Clin Pharmacol.**, v. 27, n.2, p. 1-20, 2005.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 2, p. 1-37, 2009.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 47, p. 165 -196, 2001.

MENDOZA, A. E.-H.; CAMPANERO, M. A.; MOLLINEDO, F.; BLANCO-PRIETO, M. J. Lipid nanomedicines for anticancer drug therapy. **J. Biomed. Nanotechnol.**, v. 5, p. 323-343, 2009.

MÜHLEN, A.Z.; SCHAWRZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery– Drug release and release mechanism. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 45, n. 2, p. 149-155, 1998.

MÜLLER, R. H., MAASSEN, S., WEYHERS, H., MEHNERT, W. Phagocytic uptake and cytotoxicity of solid lipid nanoparticles (SLN) sterically stabilized with poloxamine 908 and poloxamer 407. **J. Drug Target.**, v.4, n.3, p.161-170, 1996.

MÜLLER, R.H.; MÄDER, 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, p. 161-177, 2000.

MÜLLER, R.H.; RUNGE, S.; RAVELLI, V.; MEHNERT, W.; THUNEMANN, A.F.; SOUTO, E.B. Oral bioavailability of cyclosporine: solid lipid nanoparticles (SLN) versus drug nanocrystals. **Int. J. Pharm.**, v. 317, p. 82-89, 2006.

NEWA, M.; BHANDARI, K. H.; KIM, J. O.; IM, J. S.; KIM, J. A. YOO, B. K.; WOO, J. S.; CHOI, H. G.; YONG, C. S. Enhancement of Solubility, Dissolution and Bioavailability of Ibuprofen in Solid Dispersion Systems, Pharmaceutical Society of Japan, **Chem. Pharm. Bull.**, v.56, n.4, p. 569-574, 2008.

NICOLI, S.; SANTI, P.; COUVREUR, P.; COUARRAZE, G.; COLOMBO, P.; FATTAL, E. Design of triptorelin loaded nanospheres for transdermal iontophoretic administration. **Int. J. Pharm.**, v. 214, n. 1-2, p. 31-35, 2001.

OECD. Environment Directorate, Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. **Guidance for the conduct of skin absorption studies**, n.28, 2004. Series on testing and assessment.

OLBRICH, C.; BAKOWSKY, U.; LEHR, C. M.; MULLER, R. H.; KNEUER, C. Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. **J. Control Release**, v.77, n.3, p.345-355, 2001.

OLIVEIRA, A. R.; MOLINA, E. F.; MESQUITA, P. C.; FONSECA, J. L. C.; ROSSANEZZI, G.; PEDROSA, M. F. F.; OLIVEIRA, A. G.; SILVA-JUNIOR, A. A. Structural and thermal properties of spray-dried methotrexate-loaded biodegradable microparticles. **J. Therm. Anal. Calorim.**, n. 12, p. 555-565., 2013.

OSSWALD, W.; GUIMARÃES, S. **Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas**, Manual de Farmacologia e Farmacoterapia, 4ª edição, Porto Editora, Porto, 2001.

PANG, J.; LUAN, Y.; LI, F.; CAI, X.; DU, J.; LI, Z. Ibuprofen-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) films for controlled drug release. **Int. J. Nanomedicine**, v.6, p.659-665, 2011.

PARK, M.K.; LEE, K.M.; HWANG, J.K.; KIM, K.C. Phospholipid-based microemulsions of flubiprofen by the spontaneous emulsification process. **Int. J. Pharm.**, v.183, p.145-154, 1999.

PASSERINI, N.; ALBERTINI, B.; GONZALE-RODRIZES, M. L.; CAVALLARI, C. Preparation and characterisation of ibuprofen-poloxamer 188 granules obtained by melt granulation. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.15, p. 71-78, 2002.

PEPPAS, N. A. Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. **Pharm. Acta Helv.**, v. 60, n. 110-1, p. 1985.



RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **J. Controlled Release**, v.5, p. 37-42, 1987.

ROGER, E.; LAGARCE, F.; GARCION, E.; BENOIT, J.-P. Biopharmaceutical parameters to consider in order to alter the fate of nanocarriers after oral delivery. **Nanomedicine**, v. 5, n. 2, p. 287-306, 2010.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipient**. 6th ed. London: The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain and The American Pharmaceutical Association, p. 290-292, 506-509, 385,499,682, 2009.

SANTOS-MAGALHAES, N.S.; PONTES, A.; PEREIRA, V.M.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzathine penicilin G: nanoemulsions and nanocapsules. **Int. J. Pharma.**, v.208, p.71-80, 2000.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SIEKMANN, B.; WESTESEN, K. Submicron-sized parenteral carrier systems based on solid lipids. **Pharm. Pharmacol.**, n.1, p. 123-126, 1992.

SILVA, A.C.; GONZÁLEZ-MIRA, E.; GARCÍA, M.L.; EGEA, M.A.; FONSECA, J.; SILVA, R.; SANTOS, D.; SOUTO, E.B.; FERREIRA, D. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. **Colloids Surf., B: Biointerfaces**, v. 86, p. 158-165, 2011.

SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN, NLC). **Int. J. Cosmet. Sci.**, v.30, n.3, p.157-165, 2008.

SOUZA, A. L. R.; ANDREANI, T.; NUNES, F. M.; CASSIMIRO, D. L.; ALMEIDA, A. E.; RIBEIRO, C. A.; SARMENTO, V. H. V.; GREMIÃO, M, P, D.; SILVA, A. M.; SOUTO, E. B. Loading of praziquantel in the crystal lattice of solid lipid nanoparticles. **J. Therm. Anal Calorim.**, v.108, p. 353-360, 2012.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; JUNYAPRASERT, V. B.; SOUTO, E. B.; MULLER, R. H. Development of ascorbyl palmitate nanocrystals applying the nanosuspension technology. **Int. J. Pharm.**, v.354, n.1-2, p.227-234, 2008.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; MULLER, R. H.; JUNYAPRASERT, V. B. Encapsulation of ascorbyl palmitate in nanostructured lipid carriers (NLC)--effects of formulation parameters on physicochemical stability. **Int. J. Pharm.**, v.340, n.1-2, p.198-206, 2007.

TOMASSETTI, M.; CAMPANELLA, T.; AURELI, T. Thermogravimetric analysis of some spices and commercial food products. Comparison with other analytical methods for moisture content determination. **Thermochim. Acta.**, v.143, p. 15-26, 1989.

UNER, M. Preparation, characterization and physic-chemical properties of SLN and NLC: their benefits as colloidal drug carrier system. **Pharmazie**, v. 61, n.5, p. 375-386, 2006.

USP 32 NF 27. Rockville: USP; 2009.

VIGHI, E.; RUOZI, B.; MONTANARI, M.; BATTINI, R.; LEO, E. pDNA condensation capacity and in vitro gene delivery properties of cationic solid lipid nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 389, p. 254-261, 2010.

WESTESEN, K.; SIEKMANN, B. Investigation of the gel formation of phospholipid stabilized solid lipid nanoparticles, **Int. J. Pharm.**, v. 151, p. 35-45, 1997.

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

WONG, L. H.; LI, Y.; BENDAYAN, R.; RAUTH, M. K.; WU, X. Y. **Nanotechnology for cancer therapy**. Taylor & Francis Group: New York, cap. 36, p. 741-769, 2007.

XU, F.; SUN, L. X.; TAN, Z. C.; LIANG, J. G.; LI, R. L. Thermodynamic study of ibuprofen by adiabatic calorimetry and thermal analysis. **Thermochim. Acta.**, v. 412, p.33-37, 2004.

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

YANG, Y.; FENG, J. F.; ZHANG, H.; LUO, J. Y. Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. **J Control. Release.**, v.3, p. 299-307, 1999.

ZIMMERMANN, E.; SOUTO, E. B.; MULLER, R. H. Physicochemical investigations on the structure of drug-free and drug loaded solid lipid nanoparticles (SLN TM) by means of DSC and <sup>1</sup>H NMR. **Pharmazie**, v.60, n.7, p. 508-513, 2005.