



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



**DESENVOLVIMENTO DE DISPERSÕES SÓLIDAS E
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS MUCOADESIVAS DE
ZIDOVUDINA E AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO BIOLÓGICA
COM A MUCOSA INTESTINAL**

Liliane Neves Pedreiro

Araraquara

Liliane Neves Pedreiro

**DESENVOLVIMENTO DE DISPERSÕES SÓLIDAS E
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS MUCOADESIVAS DE
ZIDOVUDINA E AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO BIOLÓGICA
COM A MUCOSA INTESTINAL**

Tese 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 Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Maria Palmira Daflon Gremião

Co-orientadora: Beatriz Stringhetti Ferreira Cury

Araraquara – Julho/2015

Ficha Catalográfica

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

P371d

Pedreiro, Liliane Neves

Desenvolvimento de dispersões sólidas e nanopartículas poliméricas mucoadesivas de zidovudina e avaliação da interação biológica com a mucosa intestinal / Liliane Neves

Pedreiro— Araraquara, 2015

149 f.

Tese (Doutorado) – **Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas.** Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Maria Palmira Daflon Gremião

Coorientador: Beatriz Stringhetti Ferreira Cury

1. Zidovudina. 2. Sistema de liberação de fármacos. 3. Biodisponibilidade. 4. Mucoadesão I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II. Cury, Beatriz Stringhetti Ferreira, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

*Dedico este trabalho aos meus pais
Ivone e Edelto*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Maria Palmira Daflon Gremião e à minha coorientadora Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury por serem pessoas e profissionais exemplares. Obrigada pela dedicação e disposição em me ajudar em todo o trabalho, pela confiança, por me oferecerem oportunidades de crescimento profissional, pelo conhecimento compartilhado e por terem sempre uma palavra amiga nos momentos de desânimo.

Aos professores do laboratório de farmacotécnica Dra Ana Dóris de Castro, Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, Dr. Marlus Chorilli e Dr. Raul Cesar Evangelista (*in memoriam*) por disponibilizarem equipamentos e material para o desenvolvimento do trabalho e pelo conhecimento transmitido.

Aos professores Dr. Marcos Luciano Bruschi, Dr. Marco Vinícius Chaud, Dr. Marlus Chorilli e Dr. Sérgio Paulo Campana Filho pela grande contribuição na defesa da tese.

Ao professor Dr. Clóvis Augusto Ribeiro pelas contribuições no exame de qualificação. Ao Leonardo Miziara Barbosa Ferreira e à Mariana Fonseca pela realização das análises de DSC e pelo auxílio na interpretação dos resultados.

Ao professor Dr. Marco Vinícius Chaud pelas contribuições no exame de qualificação e pela colaboração no ensaio de permeabilidade *ex vivo*.

À professora Dra. Eliana Varanda e, em especial, ao Rone Aparecido De Grandis pela colaboração nos ensaios com cultura de células e no auxílio da interpretação dos resultados.

Às professoras Dra. Matilde Merino Sanjuán e Dra. Virgínia Merino pela supervisão do trabalho no exterior e colaboração no experimento de farmacocinética *in vivo*. Ao Departamento de Farmácia e Tecnologia Farmacêutica da Universidade de Valência pelo acolhimento.

Aos meus pais, Ivone e Edeldo, por sempre me apoiarem a conquistar meus objetivos e por todo carinho e dedicação. Ao meu irmão Leandro e ao Wesley, pela compreensão e companheirismo.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de farmacotécnica e às pessoas que de alguma forma colaboraram com este trabalho pelo incentivo e ajuda nos experimentos. À Natália Gonçalves dos Santos, Mariane Hiromi Hirata, Bruna Mota Reginato e Fernanda Cardoso Colombo.

À Universidade Estadual Paulista e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas. À secretaria de pós-graduação, aos funcionários da faculdade e aos funcionários da biblioteca.

À Fundação para o Remédio Popular (FURP) pela doação do fármaco utilizado neste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) – Processos Fapesp 2013/01670-0 e 2014/08044-0 pelas bolsas de doutorado como apoio financeiro.

“Uma coletânea de pensamentos é uma farmácia moral onde se encontram remédios para todos os males.”

Voltaire

RESUMO

A zidovudina (AZT) é o fármaco mais utilizado isoladamente ou em associação para o tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), causada pelo vírus HIV. A baixa biodisponibilidade do AZT é o grande desafio a ser vencido para otimizar seu desempenho na terapêutica por via oral, já que sua elevada taxa de metabolização e baixa permeabilidade resultam na necessidade de administração de elevadas doses do fármaco. Além disso, este fármaco ainda é substrato do mecanismo de efluxo mediado pela glicoproteína-P no intestino, o que diminui ainda mais sua biodisponibilidade. Desta forma, dispersões sólidas (DS) e nanopartículas poliméricas (NP) foram desenvolvidas por complexação polieletrólítica com diferentes proporções entre o fármaco e os polímeros quitosana (QS) e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HP). O teor de incorporação de fármaco nas DSs (em torno de 98%) foi maior que nas NPs (cerca de 65%). Os ensaios de liberação *in vitro* realizados em HCl 0,1 mol/l (pH 1,2) demonstraram que a complexação entre os polímeros e a compartimentalização do fármaco reduziu as taxas de liberação do AZT tanto para as DSs (26 a 50%) quanto nas NPs (aproximadamente 60%) e, em tampão fosfato 50 m mol/l (pH 7,4), ambos sistemas de liberação prolongaram a liberação do fármaco por até 240 minutos. A determinação da granulometria confirmou a obtenção de sistemas micro (até 100 µm) e nanoparticulados (até 400 nm) e o potencial zeta evidenciou a carga superficial negativa das DSs e positiva das NPs. Os dados de DSC e DRX mostraram que o AZT estava molecularmente disperso em ambos os sistemas e que as DSs apresentaram estrutura amorfa, enquanto as NPs apresentaram estrutura predominantemente cristalina. A espectroscopia na região do infravermelho mostrou a formação de ligações entre a QS e o HP tanto nas DSs quanto nas NPs, sem alterar a estrutura do AZT. As NPs apresentaram maior capacidade de absorção de líquidos (até 260%) em relação às DSs (até 160%), nos diferentes valores de pH, enquanto as DSs apresentaram maior capacidade de adsorção de mucina. A adsorção de mucina pelas DSs e NPs ocorre segundo o mecanismo de Freundlich e Langmuir, respectivamente. O ensaio de permeabilidade intestinal evidenciou a influência da DS em aumentar a permeabilidade do fármaco em 54%. O bloqueio da bomba de efluxo pela inibição da glicoproteína também foi avaliada e os resultados sugerem que existe uma concentração limite a partir da qual o bloqueador da bomba de efluxo não favorece a permeabilidade. A interação do AZT com células Caco-2 foi maior evidenciada pelas DSs, tanto na presença como na ausência de mucina provavelmente devido ao tipo de

interação das partículas com as células. O ensaio *in vivo* demonstrou a eliminação mais lenta do fármaco quando administrado em DS e NP, com comportamentos farmacocinéticos diferentes das amostras controle (solução intravenosa e oral), sendo as maiores alterações nos parâmetros farmacocinéticos ($T_{m\acute{a}x}$, V_d , K_{el} , $t_{1/2}$ e ASC) evidenciadas nas NPs. Além disso, a farmacocinética do AZT administrado pela via oral apresentaram parâmetros correspondentes ao modelo bicompartimental. Finalmente, o ensaio de biodisponibilidade demonstrou que as NPs foram capazes de aumentar significativamente a biodisponibilidade oral do AZT (65%) em relação ao fármaco carregado nas formulações solução oral e dispersão sólida.

Palavras-chave: AIDS/HIV, zidovudina, dispersão sólida, nanopartícula polimérica, mucoadesão, permeabilidade intestinal, biodisponibilidade.

ABSTRACT

Zidovudine (AZT) is the most widely used drug alone or in combination with other antiretroviral agents for the treatment of AIDS, caused by the HIV virus. The low AZT bioavailability is the great challenge to be overcome to optimize its performance in oral therapy, since its high rate of hepatic metabolism and low permeability results in the need for high doses of the drug. In addition, this drug is substrate of the efflux mechanism mediated by P-glycoprotein in the gut, which further decreases its bioavailability. Thus, solid dispersions (SD) and polymeric nanoparticles (NP) were developed by complexation polyelectrolyte with different ratios between the drug and the polymers chitosan (CS) and hydroxypropyl methylcellulose phthalate (HP). The drug content in the SDs (around 98%) was higher than in NPs (about 65%). The *in vitro* release assays performed in HCl 0.1 mol/l (pH 1.2) showed that polymeric complexation and drug entrapment reduced the AZT rates release in both SDs (26 to 50%) and NPs (around 60%), and in phosphate buffer 50 m mol/l (pH 7.4), both modified the drug release until 240 minutes. The particle size determination confirmed obtaining micro systems (around 100 micron) and nanoparticles (around 400 nm) and zeta potential showed the negative surface of SDs and the positive charge of NPs. DSC and XRD data showed that AZT remained molecularly dispersed in both systems and the DSs had an amorphous structure, while the NPs showed structure crystalline predominantly. The IR spectroscopy showed in both SDs and NPs the formation of bonds between CS and the HP without changing the structure of AZT. The NPs showed higher liquid absorption capacity (until 260%) relative to SDs (until 160%) in different pH values, while SDs presented higher mucin adsorption capacity. The SDs and NPs mucin adsorption occurs according to the mechanism of Freundlich and Langmuir, respectively. Intestinal permeability assay showed the influence of SD to increase the drug permeability in 54%. The efflux pump blocking by the glycoprotein P inhibition was also assessed and the results suggest that there is a threshold concentration from which the efflux pump blocking disadvantage permeability. The AZT interaction with Caco-2 cells was more evidenced in SDs, both in the presence and absence of mucin, probably due to the type of particles interaction with the cells. The *in vivo* assay demonstrated the slower drug elimination when administered on SD and NP, with pharmacokinetic behavior different of the controls (intravenous and oral solution), being the greatest changes in the pharmacokinetic parameters (T_{max} , VD , K_{el} , $t_{1/2}$ and AUC) evidenced in the NPs. In addition, the AZT administered orally

pharmacokinetics presented parameters corresponding to the two-compartment model. Finally, the bioavailability assay demonstrated that NP drug delivery system was able to significantly increase the oral bioavailability of AZT in relation to drug in oral solution and solid dispersion formulations.

Palavras-chave: AIDS/HIV, zidovudine, solid dispersion, polymeric nanoparticle, mucoadhesion, intestinal permeability, bioavailability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural do AZT	24
Figura 2 – Fórmula estrutural da quitosana	34
Figura 3 - Fórmula estrutural do HPMCP	36
Figura 4 – Representação esquemática do preparo das dispersões sólidas pelo método da evaporação do solvente.....	45
Figura 5 - Representação esquemática do preparo das nanopartículas poliméricas pelo método da complexação polieletrólítica.	47
Figura 6 - Curva de titulação potenciométrica e sua primeira derivada.....	63
Figura 7 - Relação linear entre a concentração das soluções de QS e viscosidade reduzida ($\eta_{\text{esp}/C}$), usada para a determinação da viscosidade intrínseca (η).	64
Figura 8 – Perfil de liberação <i>in vitro</i> do AZT livre e em DSs (pH 1,2).....	72
Figura 9 - Perfil de liberação <i>in vitro</i> do AZT em DSs (pH 7,4)	73
Figura 10 – Perfil de liberação <i>in vitro</i> do AZT em NPs (pH 1,2).....	74
Figura 11 – Perfil de liberação <i>in vitro</i> do AZT em NPs (pH 7,4).....	75
Figura 12 - Distribuição de tamanho de partícula em intervalo de classes para as dispersões sólidas e misturas físicas.....	77
Figura 13 – Diâmetro médio (nm) (barras) e índice de polidispersão (pontos) das nanopartículas poliméricas com fármaco (NP) e sem fármaco (NPv).	80
Figura 14 – Curvas de DSC obtidas para o fármaco, polímeros, DSs e MFs.	83
Figura 15 - Curvas de DSC obtidas para o fármaco, polímeros, NPs e NPvs.....	84
Figura 16 - Difractometria de raios X do fármaco e polímeros.	86
Figura 17 – Difractometria de raios X das DSs e MFs.	88
Figura 18 – Difractometria de raios X das NPs e NPvs.....	89
Figura 19 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho do fármaco e polímeros livres.	91
Figura 20 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho das DSs e MFs....	92
Figura 21 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho das NPs e NPvs. .	93
Figura 22 – Fotomicrografias do AZT (A), QS (B) e HP (C).	94
Figura 23 – Fotomicrografias da DS 12 e sua respectiva MF.	95
Figura 24 – Fotomicrografia da NP 5,5 e da NPv 4.	96
Figura 25 – Capacidade de absorção de líquidos (%) das DSs e NPs em água.....	97

Figura 26 - Quantidade de mucina adsorvida pelas DSs e NPs de acordo com as diferentes massas de mucina adicionadas (\pm DP).	99
Figura 27 – Isotermas de adsorção de Freundlich das DSs e NPs.....	101
Figura 28 - Isotermas de adsorção de Langmuir das DSs e NPs.....	102
Figura 29 – Porcentagem permeada de AZT.....	104
Figura 30 – Interação celular de AZT nas células Caco-2.	108
Figura 31 – Efeito da mucina no pré-tratamento das micropartículas (DS 8) e das células Caco-2 na interação celular do AZT.....	110
Figura 32 - Efeito da mucina no pré-tratamento das nanopartículas (NP 5,5) e das células Caco-2 na interação celular do AZT.....	111
Figura 33 – Cromatograma em 265 nm do (A) plasma de rato (controle) e (B) plasma de rato com AZT (3 μ g/mL).....	113
Figura 34 – Curva analítica do AZT em plasma de rato.	114
Figura 35 – Perfis da concentração plasmática de AZT (μ g/mL) <i>versus</i> tempo obtidos por administração intravenosa e oral de 32 mg/kg de AZT em ratos (n=6).	117
Figura 36 - Perfis da concentração logarítmica plasmática de AZT (μ g/mL) <i>versus</i> tempo obtidos por administração intravenosa e oral de 32 mg/kg de AZT em ratos (n=6). ...	118
Figura 37 – Fração absorvida <i>versus</i> tempo (min) de AZT a partir da formulação OR (n=6).	122
Figura 38 - Fração absorvida <i>versus</i> tempo (min) de AZT a partir da formulação DS (n=6).	122
Figura 39 - Fração absorvida <i>versus</i> tempo (min) de AZT partir da formulação NP (n=6).	122
Figura 40 - Resultados do modelo de exploração (verificação visual preditiva), em que os perfis totais de concentração plasmática <i>versus</i> tempo de AZT foram simulados 200 vezes. Experimental concentração plasmática do AZT ($^{\circ}$). As linhas representam os intervalos de confiança de 5%, 50% e 95%.....	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das dispersões sólidas de AZT obtidas com os polímeros QS e HP.....	46
Tabela 2 – Grupos, formulações, concentração de AZT (mg/mL), via de administração e dose (mg/kg) avaliados no estudo <i>in vivo</i>	59
Tabela 3 - Condições experimentais para obtenção do GD da quitosana	63
Tabela 4 – Influência da variação de massa de QS na composição e propriedades das nanopartículas poliméricas sem AZT.....	67
Tabela 5 – Influência da variação de massa de HP na composição e propriedades das nanopartículas poliméricas sem AZT.....	68
Tabela 6 – Composição da nanopartículas poliméricas.....	69
Tabela 7 – Teor de incorporação de fármaco nas NPs.....	70
Tabela 8 – Teor de incorporação de fármaco nas DSs.....	70
Tabela 9 - Diâmetro médio das dispersões sólidas, misturas físicas, fármaco e polímeros.....	78
Tabela 10 - Potencial zeta (mV) das DSs e NPs.....	81
Tabela 11 - Potencial zeta das nanopartículas poliméricas vazias.....	82
Tabela 12 - Valores de entalpia das amostras analisadas por DSC.....	85
Tabela 13 – Constantes obtidas pela linearização das equações de Freundlich e Langmuir.....	100
Tabela 14 - Viabilidade celular das formulações diluídas em DMEM.....	106
Tabela 15 – Precisão intra e inter dias e exatidão do AZT em plasma de rato.....	114
Tabela 16 – Recuperação do AZT em plasma de rato.....	115
Tabela 17 – Parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da concentração plasmática de AZT <i>versus</i> tempo obtidos por administração intravenosa e oral de 32 mg/kg de AZT em ratos (n=6).....	119
Tabela 18 - Parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da concentração plasmática de AZT <i>versus</i> tempo obtidos na análise bicompartimental (dose= 32 mg/kg; n=6)...	121
Tabela 19 – Parâmetros farmacocinéticos do AZT para o estudo de farmacocinética populacional.....	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ARV	Antirretroviral
ASC0-∞	Área sob a curva de zero ao infinito
ASC0-t	Área sob a curva de zero ao tempo
AZT	Zidovudina
Cl	Clearance plasmático
CLAE / HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
C _{max}	Concentração plasmáticamáxima
CV	Coefficiente de variação
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DRX	Difração de raios X
DS	Dispersão sólida
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
F	Fator de biodisponibilidade
GD	Grau de desacetilação
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HP / HPMCP	Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose
IV	Infravermelho
K _{el}	Constante de eliminação
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PDI	Índice de polidispersão
PEC	Complexo polieletrólítico
P-gp	Glicoproteína-P
P _{ka}	Constante de equilíbrio
QS	Quitosana
r ²	Coefficiente de determinação
t _{1/2}	Meia vida de eliminação
TGI	Trato gastrointestinal

Tmax

Tempo para atingir a concentração
plasmática máxima

Vd

Volume de distribuição

SUMÁRIO

1	<i>INTRODUÇÃO</i>	18
2	<i>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</i>	21
2.1	AIDS	21
2.2	ZIDOVUDINA	23
2.3	SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....	25
2.3.1	<i>Dispersão sólida</i>	26
2.3.2	<i>Nanopartícula polimérica</i>	28
2.4	SISTEMAS MUCOADESIVOS	30
2.5	POLÍMEROS.....	32
2.5.1	<i>Quitosana</i>	33
2.5.2	<i>Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose</i>	36
2.6	PERMEABILIDADE INTESTINAL	37
3	<i>OBJETIVOS</i>	40
4	<i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	41
4.1	MATERIAL.....	41
4.2	MÉTODOS	43
4.2.1	<i>Caracterização da quitosana</i>	43
4.2.1.1	Determinação do grau médio de desacetilação	43
4.2.1.2	Determinação da massa molar média viscosimétrica.....	43
4.2.2	<i>Obtenção dos sistemas de liberação</i>	45
4.2.2.1	Preparo das dispersões sólidas	45
4.2.2.2	Preparo das nanopartículas poliméricas	46
4.2.3	<i>Determinação do teor de fármaco incorporado</i>	47
4.2.4	<i>Dissolução “in vitro” dos sistemas de liberação</i>	48
4.2.5	<i>Caracterização dos sistemas de liberação</i>	48

4.2.5.1	Análise granulométrica das dispersões sólidas	48
4.2.5.2	Análise granulométrica e índice de polidispersão das nanopartículas poliméricas	48
4.2.5.3	Avaliação do potencial zeta das partículas.....	48
4.2.5.4	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	49
4.2.5.5	Difratometria de raios X.....	49
4.2.5.6	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	49
4.2.5.7	Microscopia eletrônica de varredura	49
4.2.6	<i>Determinação da capacidade de absorção de líquidos</i>	50
4.2.7	<i>Estudos de mucoadesão “in vitro”</i>	50
4.2.7.1	Adsorção de mucina	50
4.2.7.1.1	Isotermas de adsorção de mucina.....	51
4.2.8	<i>Avaliação “ex vivo” da permeabilidade intestinal da zidovudina pelo método do saco intestinal invertido</i>	51
4.2.9	<i>Avaliação da citotoxicidade em cultura de células Caco-2</i>	52
4.2.10	<i>Estudo de associação celular</i>	53
4.2.10.1	Efeito da mucina na associação celular	53
4.2.11	<i>Análise estatística</i>	54
4.2.12	<i>Ensaio de farmacocinética e biodisponibilidade “in vivo”</i>	54
4.2.12.1	Validação da metodologia analítica para quantificação do AZT em plasma de rato	54
4.2.12.1.1	<u>Preparo das soluções padrão de AZT</u>	54
4.2.12.1.2	<u>Processamento do plasma de rato</u>	54
4.2.12.1.3	<u>Instrumentação e condições cromatográficas</u>	54
4.2.12.1.4	<u>Determinação dos parâmetros de validação</u>	55
4.2.12.2	Procedimento cirúrgico para canulação da veia jugular dos animais	56
4.2.12.3	Protocolo de administração e amostragem.....	57
4.2.12.3.1	<u>Administração intravenosa</u>	58

4.2.12.3.2	<u>Administração oral</u>	58
4.2.12.3.3	<u>Protocolo de amostragem</u>	58
4.2.12.4	Análise farmacocinética	59
4.2.12.4.1	<u>Modelo não-compartimental</u>	59
4.2.12.4.2	<u>Modelo compartimental</u>	59
4.2.12.5	Biodisponibilidade	61
4.2.12.6	Análise estatística	61
5	<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	62
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA	62
5.1.1	<i>Determinação do grau médio de desacetilação</i>	62
5.1.2	<i>Determinação da massa molar média viscosimétrica</i>	64
5.2	OBTENÇÃO DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO	65
5.2.1	<i>Preparo das dispersões sólidas</i>	66
5.2.2	<i>Preparo das nanopartículas poliméricas</i>	66
5.3	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FÁRMACO INCORPORADO	69
5.4	DISSOLUÇÃO “ <i>IN VITRO</i> ” DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO	71
5.4.1	<i>Dissolução “in vitro” do fármaco a partir das dispersões sólidas</i>	71
5.4.2	<i>Dissolução “in vitro” do fármaco a partir das nanopartículas poliméricas</i>	74
5.5	CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO	75
5.5.1	<i>Análise granulométrica das dispersões sólidas</i>	75
5.5.2	<i>Análise granulométrica e índice de polidispersão das nanopartículas poliméricas</i>	78
5.5.3	<i>Avaliação do potencial zeta das partículas</i>	80
5.5.4	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	82
5.5.5	<i>Difratometria de raios X</i>	86
5.5.6	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho</i>	89
5.5.7	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	93

5.5.8	<i>Determinação da capacidade de absorção de líquidos</i>	96
5.6	ESTUDOS DE MUCOADESÃO <i>IN VITRO</i>	97
5.6.1	<i>Adsorção de mucina</i>	98
5.6.1.1	Isotermas de adsorção de mucina.....	100
5.6.2	<i>Avaliação “ex vivo” da permeabilidade intestinal da zidovudina pelo método do saco intestinal invertido</i>	103
5.6.3	<i>Avaliação da citotoxicidade em cultura de células Caco-2</i>	105
5.6.4	<i>Estudo de interação celular</i>	107
5.6.4.1	Efeito do muco na interação celular.....	109
5.6.5	<i>Ensaio de farmacocinética e biodisponibilidade “in vivo”</i>	111
5.6.5.1	Validação da metodologia analítica do AZT em plasma de rato	111
5.6.5.1.1	<u>Seletividade</u>	111
5.6.5.1.2	<u>Linearidade</u>	113
5.6.5.1.3	<u>Precisão e exatidão</u>	114
5.6.5.1.4	<u>Limite de detecção e limite de quantificação</u>	115
5.6.5.1.5	<u>Recuperação</u>	115
5.6.6	<i>Análise farmacocinética</i>	115
5.6.6.1	Seleção da dose	115
5.6.6.2	Perfis farmacocinéticos	116
5.6.6.3	Modelo não-compartimental	119
5.6.6.4	Modelo compartimental	120
5.6.7	<i>Biodisponibilidade</i>	125
6	CONCLUSÃO.....	127
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	129
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130

1 INTRODUÇÃO

O tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) tem evoluído constantemente e mudado o histórico da AIDS mundialmente. Com o avanço da terapia antirretroviral, as manifestações clínicas decorrentes da infecção tornaram-se menos frequentes e houve melhora do prognóstico dos pacientes portadores da síndrome. Por outro lado, o surgimento de métodos laboratoriais eficientes em identificar e quantificar o vírus circulante no plasma e o conhecimento da dinâmica viral tem tornado o tratamento dos indivíduos com AIDS mais eficiente. Além disso, a disponibilidade de diferentes fármacos antirretrovirais ampliou as possibilidades de tratamentos (PEÇANHA *et al.*, 2002).

Sintetizada por HORWITZ *et al.* (1964), a zidovudina, análogo da timidina, é um dos fármacos mais utilizados para o tratamento da AIDS / HIV. Este fármaco atua como inibidor da transcriptase reversa que impede a replicação da fita de DNA a partir do RNA, através da inibição competitiva do desoxinucleotídeo trifosfato, impedindo a extensão da fita (DE SOUZA, DE ALMEIDA, 2003).

A baixa biodisponibilidade do AZT, quando administrado por via oral, é resultado de alguns fatores, como a metabolização pré-sistêmica de, aproximadamente, 50% da dose administrada e o mecanismo de efluxo na membrana intestinal (DALLAS *et al.*, 2000). Além disso, sua baixa permeabilidade, que o classifica como fármaco classe III (AMIDON *et al.*, 1995), contribui para a baixa biodisponibilidade.

Um dos mecanismos envolvidos na baixa e errática biodisponibilidade é o mecanismo de efluxo mediado principalmente pela glicoproteína-P (P-gp), que atua no retorno do fármaco absorvido pela membrana intestinal para o lúmen (QUEVEDO *et al.*, 2011). Assim, entender como estes mecanismos influenciam a absorção e a biodisponibilidade dos fármacos possibilitará o desenvolvimento de sistemas de liberação com habilidades de melhorar as propriedades biofarmacêuticas do fármaco e, por consequente, melhorar sua eficácia terapêutica.

Há um interesse considerável na tentativa de aumentar a absorção e biodisponibilidade oral de fármacos pela inibição do efluxo do fármaco mediado pela P-gp e estudos têm demonstrado a capacidade de vários polímeros atuarem como inibidores da P-gp (LING *et al.*, 2010; TAKIZAWA *et al.*, 2013; WERLE, 2008).

Por outro lado, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação que possam melhorar as propriedades biofarmacêuticas do AZT é um grande desafio. Assim, o desenvolvimento de

sistemas de liberação que prolonguem o tempo de residência intestinal e ainda permitam o íntimo contato com a mucosa intestinal representa uma importante estratégia para aumentar o gradiente de concentração local de absorção e a permeabilidade do fármaco pela membrana biológica, conseqüentemente, melhorando sua absorção. As propriedades mucoadesivas de polímeros no trato gastrointestinal têm sido exploradas como forma de aumentar o tempo de residência local, proporcionando aumento da absorção sistêmica (VARUM *et al.*, 2008). Além disso, a escolha de polímeros adequados com propriedades mucoadesivas podem influenciar no mecanismo de efluxo.

A incorporação do AZT em sistemas como dispersões sólidas e nanopartículas poliméricas com propriedades mucoadesivas que o protejam do meio gástrico deve assegurar que o fármaco chegue intacto ao intestino delgado, uma vez que as maiores taxas de absorção do AZT ocorrem nas regiões do íleo e jejuno proximal (QUEVEDO *et al.*, 2011).

As dispersões sólidas (DS) são sistemas de liberação em que o fármaco está molecularmente disperso na matriz inerte, geralmente para melhorar a biodisponibilidade oral do fármaco. Nestes sistemas, o fármaco pode estar, predominantemente, em estado amorfo e não na forma cristalina, o que influencia em propriedades como dissolução, biodisponibilidade e outras propriedades do fármaco (BIKIARIS *et al.*, 2009; GIRI *et al.*, 2012).

As nanopartículas poliméricas (NP) são pequenas partículas sólidas que podem ser tanto um sistema reservatório de fármacos (nanocápsulas) como ou um sistema matricial, no qual o fármaco encontra-se disperso (nanoesferas). A metodologia e os polímeros empregados no preparo determinarão o tamanho e as propriedades das partículas. A veiculação de fármacos em NPs visa à liberação precisa de baixas doses de fármacos potentes, redução da concentração do fármaco em outros locais que não os órgãos ou tecidos alvo e proteção dos compostos lábeis, antes e depois da administração, até exercerem a sua ação farmacológica. Na administração oral, o tamanho reduzido das nanopartículas favorece a absorção gastrointestinal do fármaco, melhorando sua biodisponibilidade (TRAN *et al.*, 2011).

Os polímeros têm grande aplicação em sistemas de liberação de fármacos uma vez que são amplamente disponíveis e podem ser modificados por processos químico ou físicos (CURY *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2013). Geralmente, um único polímero não é tão eficaz como a sua forma modificada ou a combinação com outro polímero, por isso a associação polimérica é bastante usual quando se pretende modificar a liberação do fármaco (SHUKLA, TIWARI, 2012).

A quitosana, polissacarídeo catiônico, vem sendo alvo de estudos na área de desenvolvimento de novos sistemas de liberação modificada de fármacos devido às suas propriedades de biocompatibilidade, mucoadesividade e efeito promotor de absorção por favorecer a abertura das junções intracelulares. Entretanto, sua limitação é a elevada solubilidade em meio ácido devido à protonação dos grupos amino, que pode resultar na liberação prematura do fármaco no meio gástrico (AMIDI *et al.*, 2010).

O ftalato de hidroxipropilmetilcelulose ou ftalato de hipromelose (HPMCP), além de conferir propriedades de gastroresistência e bioadesivas às formulações farmacêuticas, é um polímero capaz de formar complexos polieletrólíticos com outros polímeros devido à protonação dos grupamentos carboxílicos (MAKHLOF *et al.*, 2011).

Neste trabalho, foram estudados sistemas poliméricos micro/nanoestruturados que associem propriedades como a mucoadesão, o aumento da absorção intestinal de fármacos, gastroresistência e inibição da P-gp através do bloqueio da bomba de efluxo como estratégia promissora para aumentar a biodisponibilidade da zidovudina.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 AIDS

Durante as últimas três décadas, a AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida) tem sido um dos problemas de saúde que necessitam de mais atenção e urgência do mundo. A epidemia vem afetando a vida de até 36 milhões de pessoas, sendo que 35 milhões vivem atualmente com o HIV (vírus da imunodeficiência humana). Só em 2012, 1,6 milhões de pessoas morreram de causas relacionadas com a AIDS e 2,3 milhões foram infectadas com o vírus. As Nações Unidas reconhece a importância da epidemia, incluindo o combate à AIDS/HIV, a malária e outras doenças entre os oito objetivos de desenvolvimento do milênio (FARIA *et al.*, 2014; GRAY *et al.*, 2009).

O HIV, vírus que causa a AIDS, surgiu na África Central, na primeira metade do século 20. Atualmente, há duas espécies conhecidas de HIV, o HIV-1 e o HIV-2, com as suas respectivas subespécies. HIV-1 é o principal vírus causador da AIDS, sendo mundialmente o tipo mais comum, enquanto que a HIV-2 é o vírus mais prevalente na África do Sul. As duas espécies do vírus HIV evoluem para a AIDS, mas a espécie HIV-2 tem sua evolução mais lenta. Ambas representam riscos para a saúde e têm sido bastante pesquisadas visando à descoberta de novos medicamentos e vacinas (FIORENTINI *et al.*, 2010)

Desde que o primeiro caso de HIV foi diagnosticado, a doença parece afetar não apenas os indivíduos infectados com o vírus, mas também a sociedade em geral. Apesar de que, até certo ponto, as epidemias tenham mostrado uma tendência decrescente no mundo desenvolvido, muitos países em desenvolvimento ainda enfrentam grandes desafios para superar a epidemia da AIDS / HIV. O número de pessoas infectadas mundialmente continua a diminuir, mas as epidemias nacionais continuam a se expandir em muitas partes do mundo (UNAIDS, 2012).

O HIV pertence ao grupo dos retrovírus, o qual necessita da enzima transcriptase reversa para se multiplicar. Esta enzima é responsável pela transcrição do RNA viral em uma cópia de DNA, que, assim, pode integrar-se ao genoma do hospedeiro, pela enzima integrase. Possui também uma enzima, a HIV protease, fundamental para a quebra de unidades proteicas em pequenas moléculas, permitindo uma montagem viral perfeita (MURI, 2014).

A infecção de uma célula ocorre quando o vírus HIV se liga a um receptor celular, geralmente o T CD4+, por meio de sua proteína gp120, que se funde à membrana celular

liberando seu conteúdo no citoplasma. A enzima do vírus, transcriptase reversa, catalisa a produção de uma cópia de DNA a partir do RNA viral. A cópia de DNA de dupla hélice é então transportada ao núcleo celular onde uma segunda enzima, a integrase, catalisa a incorporação do DNA viral ao material genético do hospedeiro. A expressão subsequente dos genes virais resulta na transcrição do RNA a partir do DNA do HIV e na tradução das proteínas virais. As proteínas virais recém-formadas são, no entanto, produzidas na forma de precursores de poliproteínas, longas unidades compostas de enzimas virais e proteínas estruturais anexadas. As poliproteínas e o RNA viral migram para a superfície da célula onde ficam incorporados aos novos vírus que surgem na membrana celular, levando parte da mesma com eles para formar a camada externa viral. Os vírus recém-formados seriam, no entanto, não infectantes sem a ação de uma terceira e essencial enzima do HIV, a protease, que processa as poliproteínas virais em proteínas e enzimas estruturais funcionais (DE SOUZA, DE ALMEIDA, 2003).

Após a infecção pelo HIV, há um período de replicação viral contínua e forte resposta imunológica, o que resulta em um estado constante e relativamente baixo de carga viral. Em seguida, o vírus entra em uma fase crônica, em que há replicação viral limitada sem, no entanto, sinais aparentes da doença. Esta fase, que pode persistir por anos, leva a um dano irreversível do sistema imunológico caracterizado pela perda de células T CD4+. Isso resulta no aparecimento do primeiro estágio da AIDS, com infecções oportunistas que podem levar a morte da grande maioria dos pacientes não tratados. Uma proporção muito pequena de pacientes infectados, os chamados "de longo prazo não-progressores", permanece livre da doença com uma contagem de células CD4+ alta, porém estável. Eles são capazes de manter a replicação viral em níveis baixos na ausência de tratamento e representam um dos grandes paradigmas do HIV (ZHAO *et al.*, 2011).

O HIV induz, na maioria dos indivíduos portadores do vírus, uma ativação generalizada do sistema imunológico, que envolve não apenas o principal alvo da infecção (por exemplo, linfócitos, monócitos T CD4+ e macrófagos), mas também linfócitos B, células "natural killer" e células apresentadoras de antígenos. Apesar da hiperatividade imunológica crônica e consequente exaustão imune serem comprovadas, os mecanismos envolvidos nesta ativação ainda não são completamente compreendidos (CÁRCAMO *et al.*, 2005).

As células do sistema imunológico desempenham um papel de destaque na patogenia da AIDS. Tecidos linfóides agem como reservatório do vírus e são considerados um local importante para a replicação viral, sendo assim a infecção pelo HIV é ativa e progressiva neste local. Durante os estágios iniciais da infecção, a quantidade de vírus é relativamente baixa e o

número de células infectadas no sangue é pequeno, porém nos tecidos linfóides do trato gastrointestinal (TGI) existe uma alta concentração de várias células imunocompetentes, como células mononucleares (linfócitos e macrófagos) e células M, que são um alvo da replicação do HIV. Além de ser ativo nos tecidos do TGI, mesmo no seu período de latência, o HIV também está associado a efeitos patológicos da doença, como a diarreia crônica. Portanto, o tecido intestinal constitui um reservatório de HIV, sendo um importante alvo de estudo (CÁRCAMO *et al.*, 2005).

Entretanto, atingir as células M infectadas pelo vírus HIV é difícil devido ao tempo de meia vida destas células (1 a 2 dias) e devido à ausência de marcadores virais nas células T CD4+ latentes, o que leva à elevada replicação viral nestas células. A estratégia racional aplicada aos sistemas de liberação de fármacos antiretrovirais se baseia na liberação sistêmica e/ou celular de acordo com as propriedades do sistema de liberação. Desta forma, sistemas de liberação que promovam o aumento da interação do fármaco com a interface da membrana intestinal podem reduzir a carga viral nas células, o que pode ser conseguido com o aumento no tempo de residência de altas concentrações de fármacos nas células alvo proporcionado por sistemas de liberação com propriedades mucoadesivas (GUNASEELAN *et al.*, 2010).

O tratamento da AIDS requer uma atuação multidisciplinar envolvendo não só os profissionais de saúde, mas também assistência social e psicológica. Os objetivos clínicos e biológicos do tratamento são definidos como a supressão da replicação viral, a restauração da resposta imune, a inibição da progressão da doença, o aumento das taxas de sobrevivência, redução da morbidade e uma melhor qualidade de vida dos pacientes. Nos países em que o acesso ao tratamento está disponível, a mortalidade e morbidade relacionada com a AIDS têm diminuído significativamente. Portanto, até o dia em que for comprovada a cura da AIDS, a diminuição da mortalidade e complicações relacionadas à doença será em decorrência da melhoria do acesso a medicamentos mais eficazes que melhorem a qualidade de vida do paciente, sendo considerados como os principais resultados do tratamento (SYED *et al.*, 2013).

2.2 ZIDOVUDINA

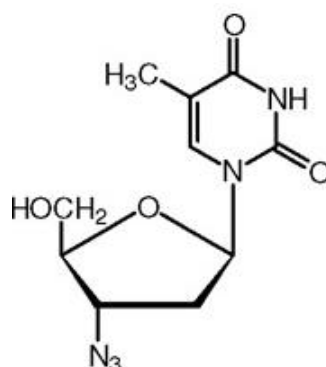
A zidovudina (AZT), conhecida inicialmente como azidotimidina, é, provavelmente, o fármaco mais utilizado no tratamento da AIDS devido à sua potente ação em inibir o HIV. É um nucleosídeo análogo da timidina, classificado como inibidor da transcriptase reversa. Após sua administração e penetração nas células, a zidovudina necessita ser fosforilada pela enzima

timidina quinase intracelular e transformada em difosfato pela timidilato quinase, para finalmente se converter na forma trifosfatada. O metabólito trifosfato interrompe, competitivamente, a replicação viral. Este metabólito inibe a DNA-polimerase das células e dos vírus, sendo particularmente ativo contra a transcriptase reversa do HIV (DE SOUZA, DE ALMEIDA, 2003).

Sintetizada por HORWITZ *et al.* (1964), a zidovudina logo foi reconhecida como potencial agente contra o retrovírus murino tipo C e, cerca de 20 anos depois, iniciou-se a aplicação clínica com relatos de efeito inibitório sobre o HIV tipo 1 (MITSUYA *et al.*, 1985).

O AZT apresenta características físico-químicas como pó cristalino, de cor branca amarelada, solúvel em água e etanol. É um fármaco ácido com pKa 9,96, ponto isoelétrico de 3,51 e massa molar de 267,2 g/mol (USP, 2011). A estrutura do AZT está representada na Figura 1.

Figura 1 - Fórmula estrutural do AZT



Após administração oral, o AZT é absorvido pelo trato gastrointestinal com pico de concentração plasmática de 1,2 µg/ mL em 30 minutos. A biodisponibilidade após administração oral é de somente 60% devido ao metabolismo pré-sistêmico, eliminado como metabólito 5'-O-glicuronídeo inativo, com tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de aproximadamente 1 hora (DALLAS *et al.*, 2000). Além de ser rapidamente metabolizado, o AZT é um fármaco classe III, segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (AMIDON *et al.*, 1995), o que o classifica como fármaco de baixa permeabilidade e contribui para sua baixa biodisponibilidade.

Para manter níveis terapêuticos efetivos, o fármaco deve ser frequentemente administrado em altas doses (600mg/dia), o que, geralmente, alcança níveis plasmáticos tóxicos, causando uma série de efeitos adversos, sendo a maioria como anemia, leucopenia, plaquetopenia e miopatia, relacionada com maiores toxicidades hematológicas diagnosticadas

nos pacientes tratados com AZT. Esses efeitos são dose-dependentes e uma redução da dose total administrada reduziria a severidade desta toxicidade (DALLAS *et al.*, 2000).

Estudos avaliaram os efeitos do elevado teor de gordura e proteína na absorção do AZT e os resultados indicaram uma redução das concentrações máximas (C_{max}), o que geralmente ocorre dentro de 1 hora após a administração oral (DOS REIS SERRA *et al.*, 2008). O volume de distribuição do AZT pelo organismo é de 1,5 l/kg e a ligação à proteínas plasmáticas é 38%. Cerca de um quinto do total absorvido tem eliminação renal, por filtração glomerular e excreção tubular, sendo sua meia-vida de, aproximadamente, uma hora, para adultos com função renal normal (SANTOS *et al.*, 2008).

Considerando a importância do AZT no tratamento da AIDS e, principalmente, a baixa biodisponibilidade associada à toxicidade plasmática, o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos mucaodesivos micro e nanoparticulados é uma alternativa tecnológica que pode melhorar as propriedades biofarmacêuticas do fármaco.

2.3 SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Na administração de fármacos por via oral, apenas uma fração da dose administrada atinge o tecido alvo, sendo que a maior parte é eliminada antes de atingir o local de ação, devido à distribuição para outros tecidos e à metabolização pré-sistêmica ou excreção (HAAG, KRATZ, 2006).

O principal objetivo da liberação modificada de fármacos é o controle temporal e espacial da concentração do fármaco para maximizar a eficácia clínica e minimizar os efeitos adversos, podendo direcionar o fármaco a sítios específicos, por meio da aplicação de princípios biológicos, físicos e químicos (VILLANOVA *et al.*, 2010).

Inicialmente, os avanços em sistemas de liberação de fármacos foram, principalmente, baseados na síntese de polímeros funcionais. Entretanto, atualmente, o desenvolvimento destes sistemas é fortemente influenciado pela compreensão detalhada dos princípios biológicos e moleculares que determinarão as estratégias para o seu desenvolvimento. Assim, sistemas de liberação de fármacos mais sofisticados são delineados para que propiciem uma melhor farmacocinética, diminuição da toxicidade, direcionamento do fármaco para um determinado sítio alvo e a liberação controlada do fármaco (GRUND *et al.*, 2011).

Alguns sistemas de liberação tem sido propostos para melhorar as propriedades biofarmacêuticas da zidovudina, como lipossomas (KAUR *et al.*, 2008), microemulsão

(TYAGI, MADHAV, 2012), nanopartícula polimérica (MAINARDES *et al.*, 2010), nanopartícula lipídica sólida (HEIATI *et al.*, 1997), micelas (SHAIK *et al.*, 2008), cristal líquido (CARVALHO *et al.*, 2013), implante cerâmico (SLOGROVE *et al.*, 2011), microesferas (JAIN *et al.*, 2011) e dispersão sólida (PEDREIRO, 2012).

2.3.1 Dispersão sólida

As dispersões sólidas (DS) são sistemas de liberação em que o fármaco está, predominantemente, disperso na de solução sólida numa matriz polimérica inerte, geralmente para melhorar a biodisponibilidade oral do fármaco. Esses sistemas de liberação podem ser obtidos por diversas técnicas, dentre elas o método de fusão, co-precipitação e extrusão a quente. Dentro da técnica de co-precipitação, encontram-se as metodologias por *spray drayer*, fluido super crítico, baixa pressão e leito de jorro (DHIRENDRA *et al.*, 2009).

O método de co-precipitação seguida de evaporação de solvente é um dos mais simples e de baixo custo para o preparo destes sistemas de liberação. Consiste em dissolver o carreador e o fármaco em solvente adequado e evaporá-lo à temperatura constante. A remoção do solvente resulta na supersaturação do meio seguida de co-precipitação dos seus constituintes (DHIRENDRA *et al.*, 2009).

Na maioria destes sistemas, o fármaco está no estado amorfo, o que influencia o seu perfil de liberação, a biodisponibilidade, estabilidade e outras propriedades. O tamanho de partícula pode também ser modificado por técnicas de DS, o que leva a um aumento na área superficial, melhorando a taxa de dissolução do fármaco (LEUNER, DRESSMAN, 2000).

As DSs podem ser classificadas em, basicamente, quatro categorias: *misturas eutéticas simples*, em que dois ou mais componentes do sistema podem, termodinamicamente, interagir em uma mistura física; *solução sólida*, na qual soluto e solvente são sólidos e podem formar um cristal misto, em que o transportador é cristalino; *precipitação amorfa de substâncias cristalinas*, com um transportador, no qual ocorre a precipitação total ou parcial do fármaco em forma amorfa no transportador cristalino; *combinação de grupos*, em que duas ou mais categorias são combinados (CRAIG, 2002).

As DSs foram, inicialmente, utilizadas para melhorar as propriedades de solubilidade e a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água, dispersando-os em carreadores hidrofílicos. Entretanto, o prolongamento da liberação por meio da técnica de dispersão sólida, utilizando polímeros intumescíveis como carreadores, tornou-se uma área de grande interesse

nos últimos anos (GIRI *et al.*, 2012). Dependendo das propriedades dos polímeros constituintes e da capacidade de retenção do fármaco na matriz, as DSs podem ser promissoras como sistemas de liberação modificada de fármacos.

As misturas poliméricas representam uma aplicação racional destes materiais para obter novos materiais, com propriedades específicas, que podem permitir um controle adequado da liberação do fármaco, modulando a biodisponibilidade (CARBINATTO *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2013).

Considerando que tanto a solubilidade como a permeabilidade do fármaco são propriedades determinantes para a biodisponibilidade oral de fármacos, a DS pode ser aplicada para melhorar essas propriedades, uma vez que nesses sistemas o fármaco está, predominantemente, no estado amorfo, que favorece a taxa de dissolução do fármaco e, conseqüentemente, a biodisponibilidade (GIRI *et al.*, 2012).

BIKIARIS *et al.* (2009) utilizaram a técnica da DS para a associação de fluvastatina ao polímero succinato de polipropileno (PPSU), para prolongar a liberação do fármaco e diminuir a toxicidade hepática. Ensaios *in vitro* confirmaram o controle da liberação do sistema composto por PPSU, polímero de elevada massa molecular, uma vez que o aumento da cadeia polimérica diminuiu os grupamentos polares, diminuindo a afinidade do fármaco com o meio aquoso.

As DSs de acetaminofeno (ACT), utilizando quitosana (QS) e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCP) como polímeros carreadores, foram desenvolvidas por CHEN *et al.* (2006), por *spray-dryer*. Ensaios de microscopia eletrônica de varredura, difração de raios-X e calorimetria exploratória diferencial foram empregados para avaliar a amorfização do ACT e os ensaios de liberação indicaram que a DS formada, com proporções específicas de polímeros, foi eficaz para garantir o controle de liberação deste fármaco.

Em trabalho anterior (Processo Fapesp 2010/02540-4), foram desenvolvidas DSs mucoadesivas, utilizando misturas poliméricas de glicolato sódico de amido e ftalato de HPMC, com a finalidade de melhorar a permeabilidade intestinal da zidovudina, avaliando a influência da glicoproteína-P neste processo. O aumento da permeabilidade intestinal do AZT, avaliado pelo método do saco intestinal invertido, sugeriu que os polímeros carreadores atuaram bloqueando da P-gp e favorecendo a biodisponibilidade do fármaco (PEDREIRO, 2012)

2.3.2 Nanopartícula polimérica

As nanopartículas poliméricas (NP) são sistemas utilizados para o encapsulamento de fármacos e podem ser classificadas em nanoesferas e nanocápsulas, dependendo da composição e organização estrutural. As nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica na qual o fármaco pode estar dissolvido ou disperso no interior da matriz ou adsorvido à superfície da estrutura. Já as nanocápsulas são sistemas reservatórios, em que o fármaco é envolto por um invólucro polimérico de espessura variável, formando o núcleo interior. O fármaco pode formar um ou mais núcleos, sendo a nanocápsula classificada como mono ou polinuclear, respectivamente (WU *et al.*, 2008).

Vários métodos são empregados para a obtenção de nanopartículas, dentre eles polimerização interfacial de monômeros, emulsificação seguida da evaporação do solvente, nanoprecipitação, *salting-out*, *spray-drying*, microemulsificação, coacervação simples ou complexa, entre outros (KUMARI *et al.*, 2010). Geralmente, estes métodos podem ser utilizados para obter tanto nanoesferas quanto nanocápsulas, variando o tipo de material precursor e/ou as condições experimentais. As NPs podem ser produzidas a partir de polímeros pré-formados ou, no caso de serem constituídas por associação de polímeros, podem ser ainda produzidas simultaneamente quando da formação das cadeias poliméricas, através técnicas de polimerização em emulsão ou em suspensão (KIM, KIM, 2003).

O método de obtenção de nanopartículas influencia diretamente em suas características físico-químicas como distribuição de tamanho e forma, grau de biocompatibilidade e toxicidade (MANMODE *et al.*, 2009).

A complexação polieletrólítica é um dos métodos mais utilizados porque não requer condições agressivas, durante a preparação, minimizando possíveis danos ao fármaco durante a formação do sistema (MAKHLOF *et al.*, 2011).

Os complexos polieletrólíticos (PEC) são preparados a partir da complexação de polieletrólitos que apresentam grupos ionizáveis de um único tipo de carga, um ânion ou um cátion. As interações eletrostáticas entre os íons carregados com cargas opostas são difusas e ocorrem aleatoriamente entre os sítios de ligação dos grupamentos. Essas interações também podem ocorrer entre os resíduos de suas cadeias laterais ou pelas interações entre outro grupamento presente na macromolécula. Entretanto, ligações hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals também podem participar da formação das partículas (MAKHLOF *et al.*, 2011).

Uma variedade de PECs pode ser obtida, tanto pela mudança da estrutura química dos componentes poliméricos (massa molar, flexibilidade de cadeia, estrutura química do grupo funcional, densidade de carga, balanço hidrofílico/hidrofóbico e compatibilidade), como pelas condições de reação, como pH, força iônica, concentração, razão de mistura polimérica e temperatura. Para que a maior parte dos sítios ativos esteja ligada, é determinante que exista um equilíbrio entre as cargas positivas e negativas (LANKALAPALLI, KOLAPALLI, 2009).

Esta técnica é particularmente interessante, pois os polieletrólitos poliméricos são biodegradáveis e se degradam lentamente e utilizando água como solvente, o que é uma grande vantagem para produtos farmacêuticos. Além disso, o processo de obtenção dos PECs é fácil, rápido, realizado em temperatura ambiente e com agitação moderada, além de evitar o uso de precursores orgânicos (LANKALAPALLI, KOLAPALLI, 2009).

A incorporação de fármacos em NPs permite administrar doses menores de ativos altamente potentes, reduzindo sua concentração em outros locais que não sejam o órgão ou tecido alvo. Além disso, as NPs podem proteger compostos lábeis, até que eles exercem a sua atividade farmacológica. Na administração oral, o tamanho pequeno das partículas favorece a difusão pelo muco e absorção gastrointestinal do fármaco, melhorando a biodisponibilidade (KUMARI *et al.*, 2010).

A formação de nanopartículas por complexação polieletrólítica entre quitosana e ftalato de HPMC foi estudada por MAKHLOF *et al.* (2011) como potencial sistema para liberação de peptídeos terapêuticos orais, no caso a insulina, devido a capacidade de melhorar propriedades de bioadesão, permeação e biocompatibilidade destes polímeros. Resultados *in vitro* demonstraram a estabilidade das NPs em meio ácido, com controle significativo da liberação da insulina. Adicionalmente, NPs apresentaram propriedades mucoadesivas e capacidade de penetração na mucosa intestinal, evidenciadas por análise de fluorescência quantitativa e microscopia confocal.

MAINARDES *et al.* (2010) avaliaram o efeito da modificação de superfície com PEG de NP biodegradáveis de PLA (ácido polilático) e PEG-PLGA (polietilenoglicol-ácido polilático) contendo zidovudina. Tanto as nanopartículas com PLA quanto as com PEG-PLGA tinham a mesma forma, no entanto, o tamanho das partículas, potencial zeta e eficiência de encapsulação do fármaco foram modificados na presença do PEG. Estudos farmacocinéticos demonstraram que as NPs foram capazes de prolongar a liberação da zidovudina, mas uma maior eficiência foi obtida para aquelas com PLA-PEG, demonstrando que a potencial liberação do AZT por via intranasal.

2.4 SISTEMAS MUCOADESIVOS

Em contato com as mucosas, os sistemas de liberação podem aderir ao muco por interações estéricas ou adesivas até serem rapidamente eliminados pelo *clearance*. Além disso, o tempo de trânsito pode ser inadequado para a liberação de uma fração significativa de fármacos, impedindo, assim, que o fármaco permaneça em um determinado sítio de ação ou absorção por períodos prolongados, levando à baixa biodisponibilidade e baixa eficácia (HARDING, 2003). Assim, é importante conhecer as características desta biointerface para delinear sistemas de liberação mais adequados com propriedades mucoadesivas.

O muco é uma camada gel viscoelástica, que protege a mucosa da exposição ao ambiente externo. É composto, principalmente, por unidades de mucina reticulada e enoveladas, secretadas pelas células caliciformes e glândulas submucosas. A mucina é uma molécula grande, tipicamente 0,5 - 40 MDa, formada pela ligação de vários monômeros de mucina, cada um com cerca de 0,3-0,5 MDa, e revestidas por uma matriz complexa e altamente diversificada de proteoglicanos (LAI *et al.*, 2009)

O muco é composto por células, bactérias, lipídeos, sais, proteínas, macromoléculas e detritos celulares, os quais atuam juntos para formar um ambiente heterogêneo que atua como uma barreira de proteção para o transporte de partículas. A viscosidade do muco é controlada, em indivíduos saudáveis, por meio do controle da secreção de água, variação de concentração de lipídeos, proteínas e íons (ENSIGN *et al.*, 2012).

O pH do muco pode variar muito, dependendo da mucosa, com ambientes ácidos capazes de agregar fibras de mucina e, assim, aumentar sua viscoelasticidade. Entretanto, a mucosa gástrica é exposta a um grande intervalo de pH, inclusive dentro de uma mesma camada, com o pH luminal entre 1 e 2, aumentando para aproximadamente 7 na superfície epitelial (LAI *et al.*, 2009).

Além disso, outra variável do muco é a espessura da camada, diferente para as diversas mucosas. Algumas doenças podem afetar esta característica, podendo aumentar significativamente, o que resulta no acúmulo do muco e no comprometimento do transporte mucociliar. No TGI, a camada de muco é mais espessa no estômago e no cólon, mas apresenta variações significativas. Dietas deficientes em fibras podem influenciar na espessura do muco, tornando-o mais fino. O *clearance* do muco é variável, podendo ocorrer dentro de minutos ou horas, sendo que os maiores volumes são observados em superfícies com a camada de muco mais fino (ENSIGN *et al.*, 2012).

Dessa forma, o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos com propriedades mucoadesivas representa uma alternativa racional para melhorar a biodisponibilidade de fármacos, uma vez que pode prolongar o tempo de residência intestinal do sistema de liberação e ainda permitir o íntimo contato com a mucosa intestinal, maximizando o gradiente de concentração local e a permeabilidade do fármaco pela membrana biológica e, conseqüentemente, melhorando sua absorção (VARUM *et al.*, 2008).

A mucoadesão pode ser definida como a formação de interações entre moléculas, como por exemplo, polímeros, com a camada de muco. Os mecanismos responsáveis pela formação dessas ligações ainda não são totalmente elucidados, mas acredita-se que este processo ocorra em 3 etapas: molhabilidade e intumescimento polimérico, interpenetração entre as cadeias de polímero e da membrana mucosa e/ou muco e formação de ligações químicas entre os enovelados da cadeia estrutural da mucina (SURESH *et al.*, 2013).

Muitas teorias explicam os mecanismos pelos quais os sistemas mucoadesivos aderem-se à camada de muco (CARVALHO *et al.*, 2010). Pela teoria eletrônica, uma camada dupla de cargas elétricas é formada entre o muco e partícula mucoadesiva, devido à transferência de elétrons associadas com diferenças em suas estruturas eletrônicas. De acordo com a teoria da adsorção, a atração entre o muco e a partícula mucoadesiva acontece via ligação hidrogênio e / ou de Van der Waals. A atração resulta em forças, consideravelmente, maiores do que as forças descritas pela teoria eletrônica (DA SILVA *et al.*, 2007). Pela teoria do intumescimento, a tensão superficial entre o muco e partícula mucoadesiva pode ser relacionada com a capacidade de intumescimento do polímero mucoadesivo e sua interpenetração na cadeia da mucina. A energia interfacial desempenha um papel importante na mucoadesão, sendo que o processo de intumescimento é um precursor de outros mecanismos. Finalmente, pela teoria da difusão, a interpenetração de cadeias do polímero e da mucina deve ocorrer em uma profundidade suficiente para garantir o contato íntimo (SURESH *et al.*, 2013).

Nos sistemas mucoadesivos, o tipo de polímero utilizado bem como sua massa molecular, tamanho da cadeia e o grau de reticulação influenciarão na sua capacidade de adesão. A estrutura química do polímero também determina algumas propriedades importantes na mucoadesão. A presença de grupos hidroxila, carboxila ou amina podem contribuir para o estabelecimento de ligações hidrogênio ou pontes dissulfeto, no caso de presença de grupos sulfidrilo. Polímeros com grupos ionizáveis podem interagir de forma eletrostática com o muco carregado negativamente, dependendo do pH do meio (VARUM *et al.*, 2008).

2.5 POLÍMEROS

Os polímeros possuem um papel fundamental no avanço da tecnologia dos sistemas de liberação por proporcionarem a liberação modificada / controlada de fármacos, em doses ajustáveis, por períodos prolongados, de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos. As inovações na área de sistemas de liberação de fármacos estão, atualmente, baseadas na aplicação racional de polímeros adaptados e específicos para cada finalidade e para exercer funções biológicas distintas (GRUND *et al.*, 2011).

As principais características que os polímeros precisam apresentar para serem aplicados em sistemas de liberação de fármacos são a solubilidade em água, ausência de imunogenicidade, inércia biológica, controle temporal da farmacocinética, além da presença de grupos funcionais que permitam a conjugação com o fármaco ou sítios alvo (ELBERT, HUBBELL, 1996).

A massa molecular e a capacidade de dispersar pelo organismo são propriedades consideradas importantes de um polímero, pois são determinantes na distribuição do sistema e, portanto, nos efeitos terapêuticos. O tamanho da cadeia polimérica é descrito como “massa médio molecular” ou “número médio de massa molecular” e a razão entre eles é referida como índice de polidispersão. Polímeros naturais são tipicamente polidispersos, com massas moleculares mais elevadas, podendo alcançar 200 kDa. Em contraste, os massas moleculares dos polímeros sintéticos podem ser controlados e, dependendo dos mecanismos de polimerização, podem-se conseguir massas moleculares bastante reduzidos (DUNCAN, 2003).

A distribuição de grupos funcionais na estrutura polimérica é outro fator que determina as interações com o meio, por exemplo, adsorção não específica de plasma com os componentes da superfície do polímero e a interação com as células. Conseqüentemente, a carga superficial é um parâmetro importante para a citotoxicidade, hemocompatibilidade, distribuição pelo organismo e internalização nas células (DUNCAN, 2003).

Polímeros biodegradáveis e bioerodíveis representam uma classe de materiais importantes para a liberação de fármacos, pois influenciam diretamente o processo de dissolução do fármaco. No processo de dissolução de um fármaco presente em uma matriz polimérica, pode ocorrer degradação ou erosão. Na degradação, a clivagem das ligações covalentes ocorre por reações químicas e na erosão essa clivagem ocorre pela dissolução de fragmentos da cadeia não reticulados sem ocasionar alterações químicas na estrutura molecular (GRUND *et al.*, 2011).

Tanto a degradação quanto a erosão podem ocorrer na superfície ou em toda a massa polimérica. Na degradação de toda a massa polimérica, ocorrem alterações no tamanho do polímero até que ele seja totalmente degradado ou erodido. O processo dominante é determinado pelas velocidades relativas de penetração do solvente no polímero, difusão do produto de degradação e da degradação ou dissolução da estrutura macromolecular (TAMADA, LANGER, 1993).

Para serem considerados biodegradáveis, os polímeros precisam de ligações instáveis em sua cadeia principal ou nas reticulações, pois, muitas vezes, são polimerizados na presença de um solvente aquoso. Além disso, uma grande vantagem destes polímeros é que não precisam ser removidos do corpo após a liberação do fármaco. Entretanto, uma questão bem conhecida, principalmente relacionada aos de origem sintética, é a incerteza em relação à segurança de produtos de degradação (LIECHTY *et al.*, 2010).

Os polímeros que vem despertando interesse ultimamente são os denominados “polímeros inteligentes” ou “estímulo responsivos”. Sua especial característica é a capacidade de sofrer mudanças, reversíveis, sincronizando a liberação do fármaco com mudanças nas condições fisiológicas (LIECHTY *et al.*, 2010).

A incorporação de monômeros ionizáveis em polímeros permite alterações de transições de fase, capacidade de absorção de água e solubilidade, dependentes do pH. A liberação modificada de fármacos pode ser realizada pela variação do tipo e grau de ionização destes polímeros, que regem o grau de protonação ou desprotonação e, como consequência, a mudança conformacional da cadeia polimérica, favorecendo a entrada de água e a liberação do fármaco. Os principais grupamentos carregados incluem os ácidos (carboxílico, sulfônico, ácido fosfórico) ou grupamentos básicos (aminas, sulfonamidas), que são capazes de aceitar ou liberar prótons em resposta às mudanças ambientais de pH (GRUND *et al.*, 2011)

2.5.1 Quitosana

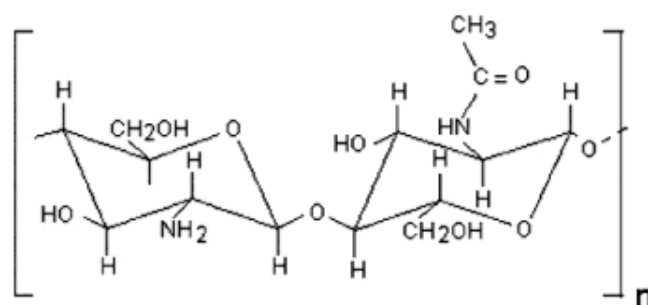
A quitosana (QS) é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação parcial da quitina, um polímero derivado da casca de crustáceos e insetos. Durante a reação de desacetilação, os grupamentos acetamida (-NHCOCH₃) da quitina são transformados, em graus variados, em grupamentos amina (-NH₂), originando a QS. O grau de desacetilação da quitosana determina a densidade (m/v) de grupos amino carregados positivamente, podendo variar de 56 a 99 % dependendo da espécie de crustáceo e do método de extração. Suas propriedades físico-

químicas como massa molecular, grau de desacetilação e o pH do meio podem influenciar o desempenho em muitas aplicações (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Seu pKa de, aproximadamente, 6,5 faz com que ela seja um polímero pH-responsivo, já que a insolubilidade em meio neutro e básico é devido à desprotonação dos grupamentos amino (CHEN *et al.*, 2011). Sua estrutura está representada na Figura 2.

A estrutura da quitosana é uma mistura de macromoléculas de diferentes massas molares. Portanto, a massa molar pode ser designada como uma distribuição de massa molar das macromoléculas que a constitui. As dimensões das cadeias dos polímeros podem ser expressas de diversas formas, tais como: massa molar, grau de polimerização e volume hidrodinâmico. Além disso, numa mesma amostra, existem cadeias poliméricas de tamanhos diferentes que resultam em uma distribuição de tamanho molecular diferente. Esta distribuição de massa molar depende basicamente do processo de síntese polimérica utilizada (CANEVAROLO JR, 2002).

Figura 2 – Fórmula estrutural da quitosana



Em alguns trabalhos vem sendo realizadas as modificações da quitosana para melhorar suas propriedades físico-químicas, tais como a solubilidade e mucoadesão, e as propriedades biológicas, tais como a interação celular. Vários derivados como quitosana trimetilada (TMC), tiolada e conjugada com β-ciclodextrina foram sintetizados e avaliados para liberação de insulina administrada por via oral (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2012). PAPADIMITRIOU *et al.* (2012) sintetizaram quitosana conjugada com copolímeros do polietilenoglicol, formando complexos com tripolifosfato e ácido poliglutâmico para serem aplicados como sistema de liberação de proteínas.

Sabe-se que a QS possui propriedades mucoadesivas, o que pode prolongar o tempo de contato do sistema de liberação com a membrana biológica e aumentar a absorção do fármaco. Sua mucoadesão é devido à interação entre os grupamentos amino, positivamente carregados,

e os grupamentos do ácido siálico, negativamente carregados, da mucina. Desta forma, o mecanismo de mucoadesão segue os fundamentos preconizados pela interação eletrostática (DA SILVA *et al.*, 2007).

Os mecanismos das interações entre a quitosana e biomembranas, geralmente, são avaliados utilizando modelos de membranas celulares, como os filmes de Langmuir. PAVINATTO *et al.* (2013) avaliaram a influência da massa molecular da quitosana nas interações com biomembranas e concluíram que as interações dependem da distribuição da massa molar do polímero sobre a membrana e que para a quitosana de baixo peso molecular prevalecem interações eletrostáticas e hidrofóbicas com a membrana, sendo que menores cadeias da quitosana interagem melhor devido ao menor impedimento estérico.

A propriedade da quitosana de agir como promotor de absorção tem sido relatada. Uma estratégia para aumentar a absorção e a biodisponibilidade de fármacos é a associação com os polímeros promotores de absorção. Esses polímeros atuam nas junções paracelulares, reversivelmente, facilitando a passagem através dos epitélios, macromoléculas hidrofílicas e fármacos com baixa permeabilidade via transporte transcelular e/ou paracelular (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2012). Entretanto, alguns estudos demonstraram que o efeito da quitosana nas junções paracelulares, como promotores de absorção, é dependente da carga positiva. Logo, essa propriedade pode ser afetada nas condições intestinais em que o pH é 7,4 (KOTZE *et al.*, 1999; ROSENTHAL *et al.*, 2012).

A biocompatibilidade e mucoadesividade, bem como o efeito promotor de absorção por favorecer a abertura das junções intracelulares, vêm a tornando como alvo de importantes estudos na área de desenvolvimento de novos sistemas de liberação controlada de fármacos. A principal limitação da quitosana é sua elevada solubilidade em meio ácido devido à protonação dos grupos amino, que pode resultar na liberação prematura do fármaco no meio gástrico. Assim, a complexação com outros polímeros pode minimizar este problema (VLLASALIU *et al.*, 2010).

A complexação de quitosana com vários poliânions como pectina, colágeno, alginato de sódio, tripolifosfato, ácido poliglutamínico e ftalato de HPMC tem se mostrado eficiente para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. Em tais aplicações é essencial que a quitosana esteja solúvel e carregada positivamente. Estas propriedades permitem a interação com os polímeros carregados negativamente, macromoléculas e poliânions em meio aquoso, formando complexos polieletrólíticos, que são utilizados como sistemas de liberação para diversos fármacos (CALVO *et al.*, 1997; PLAPIED *et al.*, 2011).

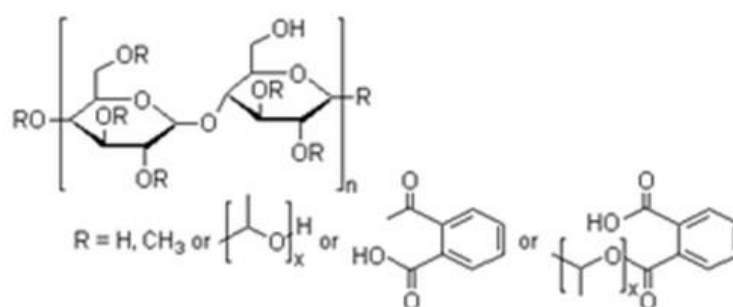
2.5.2 Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose

O polímero ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCP), designado neste trabalho como HP, é frequentemente usado como revestimento entérico devido à sua solubilidade pH dependente e capacidade de prevenir a liberação do fármaco antes de atingir a porção superior do intestino. Os polímeros com essa característica permanecem não ionizados em baixos valores de pH, e portanto, permanecem insolúveis. Entretanto, à medida que o pH no trato gastrointestinal aumenta, os grupos funcionais ácidos são capazes de ionizar, aumentando o intumescimento ou solubilizando o polímero, o que permite a liberação do fármaco (HUSSAN *et al.*, 2012).

Este polímero de elevada massa molecular (entre 80 e 130 kDa) se apresenta na forma de grânulos ou flocos livres brancos, geralmente sem odor ou levemente ácido, com sabor dificilmente detectável. É solúvel em misturas de acetona e álcool metílico ou etílico (1:1), em misturas de diclorometano e álcool metílico (1:1) e soluções com pH > 5; ele é insolúvel em água e álcool hidratado (ROWE *et al.*, 2006).

O HPMCP é sintetizado do polímero hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) pela esterificação com anidrido ftálico, resultando em uma estrutura em que as hidroxilas da glicose são substituídas por grupamentos metoxila, hidroxipropil e grupos carboxibenzoílas. O grau de substituição dos grupos alcóxi e carboxibenzoíla determina as propriedades poliméricas, principalmente o pH em que ocorre a solubilização em meio aquoso (MEEHAN, 2006). Sua estrutura está representada na Figura 3.

Figura 3 - Fórmula estrutural do HPMCP



O HPMCP, além de conferir propriedades de gastroresistência às formulações farmacêuticas devido à sua estrutura e grupamentos funcionais, possui outras propriedades como carreador em sistemas de liberação, por exemplo, dispersões sólidas e complexos

polieletrólitos, bio/mucoadesivo (CHEN *et al.*, 2006; MAKHLOF *et al.*, 2011), e bloqueador do sistema de efluxo de fármacos na membrana intestinal (CARRENO-GOMEZ, DUNCAN, 2002; PEDREIRO, 2012)

As propriedades e os mecanismos de bio/mucoadesão do HPMCP são bem conhecidos, embora não seja esta sua principal função. Em trabalho publicado por SAM *et al.* (1992), o HPMCP se destaca como polímero bio/mucoadesivo, sendo superior a polímeros como policarbofil, HPMC K4M, amilopectina e Eudragit RS 100, que são polímeros reconhecidamente adesivos.

Na mucoadesão, os grupamentos hidroxila presentes na sua estrutura interagem com o muco por ligações secundárias não covalentes, formando ligações hidrogênio, proporcionando a adesão (MAKHLOF *et al.*, 2011). A atração entre o muco e o polímero por ligação hidrogênio e / ou de Van der Waals resulta em forças consideravelmente superiores às forças descritas pela teoria eletrônica (DA SILVA *et al.*, 2007).

Os sistemas mucoadesivos não apresentam seletividade e podem aderir em qualquer segmento do TGI. Então, a incorporação desse polímero gastrorresistente pode contribuir para a seletividade do sistema (ANDREWS *et al.*, 2009).

2.6 PERMEABILIDADE INTESTINAL

Na administração de fármacos por via oral, para que os fármacos sejam absorvidos e atinjam a corrente sanguínea, precisam superar barreiras fisiológicas. Uma delas é a camada de muco, que funciona como uma barreira difusional e enzimática. O muco é secretado continuamente e se renova a cada 4 – 5 horas. Assim, o fármaco deve atravessar a camada de muco antes que ocorra a renovação, aproximando-se da superfície do epitélio intestinal. Ainda, a repulsão eletrostática entre alguns fármacos e a camada de muco pode dificultar o contato necessário para que a absorção ocorra. A segunda barreira é o epitélio intestinal, já que a permeação do fármaco pode ocorrer através do epitélio, pelas vias transcelular ou paracelular (SVENSSON, ARNEBRANT, 2010).

A maioria dos fármacos de alta permeabilidade é absorvida por difusão passiva transcelular, entretanto, esse tipo de transporte é limitado a fármacos lipofílicos com massa molecular inferior a 700 Da, uma vez que a membrana é constituída de bicamadas de fosfolípidios. Pela via paracelular, o transporte de fármacos é bastante reduzido, pois, devido

às junções paracelulares, somente fármacos com massa molecular inferior a 200 Da podem ser transportados por essa via (CHEN *et al.*, 2011).

Por serem hidrofílicos, os nucleosídeos são transportados muito lentamente por difusão passiva através da membrana celular. Os transportadores de nucleosídeos, sistema complexo de transporte constituído de múltiplas proteínas carreadoras presente nas células, auxiliam o transporte de fármacos como a zidovudina (CANO-SOLDADO *et al.*, 2004). As células transportadoras de nucleosídeos (CNT), como hCNT1, hCNT2 e hCNT3, são seletivas, sendo que somente a hCNT1 transporta o AZT. Desta forma, o transporte deste antirretroviral fica limitado a somente 1 tipo de transportador para ser absorvido (STEFFANSEN *et al.*, 2004).

Adicionalmente, outra barreira à absorção de alguns fármacos é a glicoproteína P (P-gp). A P-gp está localizada na membrana apical das células epiteliais e representa um importante transportador de membrana no bombeamento de fármacos e xenobióticos para fora das células. O AZT é substrato de diversos mecanismos de efluxo presentes em diferentes tecidos, como no sistema nervoso central, sistema imunológico e no epitélio intestinal, sendo este último diretamente relacionado às questões de biodisponibilidade do fármaco, substrato da P-gp (QUEVEDO *et al.*, 2011). Apesar de possuir um transportador específico para facilitar a absorção, o mecanismo de efluxo que a P-gp exerce sobre o AZT parece predominar, influenciando na baixa biodisponibilidade do fármaco (BANSAL *et al.*, 2009).

Há um grande interesse na tentativa de aumentar a absorção e biodisponibilidade oral pela inibição do efluxo do fármaco mediado pela P-gp e vários estudos têm demonstrado que o uso de inibidores de P-gp, como por exemplo, verapamil e ciclosporina, pode melhorar a biodisponibilidade de um grande número de moléculas. No entanto, estes inibidores possuem atividades farmacológicas e, conseqüentemente, podem causar efeitos secundários tóxicos (LI *et al.*, 2011). Assim, o desafio para a absorção oral de fármacos é encontrar inibidores da P-gp que não possuam tais inconvenientes. Embora não sejam seletivos, vários excipientes são frequentemente adicionados a formulações farmacêuticas e podem interromper a função da P-gp intestinal e, assim, aumentar a permeabilidade intestinal de um fármaco (CORNAIRE *et al.*, 2004).

CARRENO-GOMEZ, DUNCAN (2002) patentearam o uso de polissacarídeos, dendrímeros e tensoativos como inibidores da bomba de efluxo para a administração oral de várias fármacos com baixa biodisponibilidade. Dados experimentais evidenciaram que polissacarídeos aniônicos como a dextrana e o alginato de sódio possuem a capacidade de inibir a bomba de efluxo, favorecendo a permeabilidade dos fármacos. Nesse sentido, por ser um

polímero aniônico, o HPMCP poderia ser incluído no mesmo grupo e apresentar a mesma propriedade.

3 OBJETIVOS

Desenvolver e comparar as propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas de dispersões sólidas e nanopartículas poliméricas de AZT com propriedades mucoadesivas, avaliar a interação destes sistemas com as interfaces da membrana intestinal e a farmacocinética.

Desta forma, para alcançar os objetivos propostos, foram realizadas as seguintes etapas:

- Caracterização da quitosana;
- Desenvolvimento dos sistemas de liberação;
- Determinação do teor de fármaco incorporado;
- Dissolução *in vitro* dos sistemas de liberação;
- Caracterização dos sistemas de liberação;
- Determinação da capacidade de absorção de líquidos;
- Estudos de mucoadesão *in vitro*;
- Avaliação *ex vivo* da permeabilidade intestinal da zidovudina pelo método do saco intestinal invertido;
- Avaliação da citotoxicidade celular
- Ensaio de interação celular / efeito da mucina;
- Determinação da farmacocinética e biodisponibilidade do AZT veiculado nos sistemas de liberação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

MATÉRIAS – PRIMAS:

- Acetonitrila – grau HPLC (JT Baker[®])
- Ácido clorídrico (Quimis[®]);
- Água destilada;
- Células de adenocarcinoma humano intestinal/Caco-2 (Laboratório de cultura de células e mutagênese do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas /Unesp, Araraquara);
- Etanol 99,3% (v/v) (Quimis[®]);
- Etanol absoluto 100% (v/v) (VWR Chemicals Prolabo[®]);
- Fosfato de potássio monobásico (Quimis[®]);
- Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose HP-55 (Shin-Etsu[®]);
- Heparina sódica 1% (m/v) solução injetável 5000 UI (Hospira[®]);
- Hidróxido de sódio (Grupo Química[®]);
- Isoflurano 100% (m/m) (Abbott[®]);
- Kit Total Protein, Micro Lowry, Peterson's Modification (Sigma-Aldrich[®]);
- Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco – DMEM (Vitrocell[®]);
- Metanol – grau HPLC (JT Baker[®]);
- Microplacas para cultura de células (Biotek[®]);
- Mucina tipo II (Sigma Aldrich[®]);
- Pentobarbital sódico 2 mg/mL (Fatro[®]);
- Quitosana de baixa massa molecular (Sigma Aldrich[®]);
- Solução de tripsina/EDTA (Vitrocell[®]);
- Solução fisiológica estéril - 0.9% (m/v) (Braun[®]);
- Tartrato de butorfanol 10 mg/mL solução injetável (Pfizer[®]);
- Triton-X (Sigma Aldrich[®]);
- Zidovudina (doada pela Fundação para o Remédio Popular, FURP).

- Zidovudina 10 mg/mL solução injetável (doada pela Fundação para o Remédio Popular, FURP);

EQUIPAMENTOS:

- Agitador magnético (Fanem[®] 258, Ovan[®]);
- Analisador de espalhamento de luz dinâmica (DLS, Zetasizer Nano NS, Malvern Instruments, Malvern, UK);
- Balança analítica (Mettler Toledo[®] AB 265 - S/Fact, XR205 SM-DR / Precisa[®]);
- Balança semi-analítica (Ohaus[®]);
- Banho termostático para viscosidade cinemática (Qumis[®] Q303SR);
- Calorímetro exploratório diferencial (Mettler Toledo[®], DSC 1 Star System);
- Centrífuga (Heraeus Fresco 17[®]);
- Coluna de fase reversa para HPLC - Zorbax Eclipse XDB C18; 4.6 x 250 mm, 5µm (Agilent[®]);
- Dissolutor (Hanson Research; modelo New Hanson SR-8 Plus);
- Espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier (Shimadzu[®] 8300);
- Espectrofotômetro de UV-VIS, com HP UV-Visible ChemStation Software (Hewlett Packard[®] 8453);
- Estufa de secagem e esterilização (Fanem[®] 3515 SE);
- HPLC Perkin Elmer[®], conectado ao software Total Chrom Navigator[®];
- HPLC Varian, com detector espectrofotométrico ProStar[®] 330 UV-VIS PDA e Rheodine VS 125, auto-amostrador Varian ProSar[®] modelo 410
- Microscópio eletrônico de varredura (Jeol[®] JSM-7500F);
- Microscópio-estereoscópio (*Leica TM[®]*, acoplado a um programa analisador de imagem *Motic Images Advances 3.2*);
- Peagmetro (Crison micro pH 2001[®], Gehaka[®] PG 1800);
- Sistema de purificação de água Millipore (Milli-Q Plus[®]);

ANIMAIS

- Ratos albinos, linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), machos adultos, 250-270g, idade aproximada de 7 semanas, provenientes do Biotério Central – Campus de

Botucatu. Protocolo comitê de ética nº 35/2013 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP.

- Ratos albinos, linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), machos adultos, 250-300g, idade aproximada de 7 semanas, provenientes do Biotério Central – Universidade de Valência. Protocolo comitê de ética nº A1405773228053 da Faculdade de Farmácia da Universidade de Valência.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Caracterização da quitosana

4.2.1.1 Determinação do grau médio de desacetilação

A determinação do grau de desacetilação (GD) da quitosana foi realizada por titulação potenciométrica, conforme preconizado por ASSAAD *et al.* (2011). Uma massa previamente desidratada de quitosana (0,15 g) foi solubilizada em 20 mL de HCl 0,1 mol/L, sendo o volume completado para 200 mL com água destilada, após a solubilização do polímero. Em seguida, a solução foi titulada com NaOH 0,1 mol/L. Com os volumes de NaOH 0,1 mol/L consumidos nos pontos de equivalência *versus* pH foi possível obter a porcentagem de grupos amino no polímero, de acordo com a Eq. 1:

$$\% GA = \frac{203 \times (V_2 - V_1) \times C \times 100}{m + 42 \times (V_2 - V_1) \times C} \quad \text{Eq. 1}$$

Em que: V_1 e V_2 são, respectivamente, os volumes de NaOH correspondentes aos 2 volumes nos pontos de equivalência da curva obtida na titulação; C é a concentração de NaOH (mol/L); m é a massa da quitosana (g); 203 (g/mol) é a massa molar da unidade acetilada; 42 (g/mol) é a diferença entre a massa molar da unidade acetilada e da unidade desacetilada.

4.2.1.2 Determinação da massa molar média viscosimétrica

A massa molar da quitosana foi determinada por viscosimetria capilar (ASSAAD *et al.*, 2011). As amostras de quitosana foram dissolvidas em uma solução contendo ácido acético 0,1 mol/L e acetato de sódio 0,2 mol/L e a temperatura ajustada em 25 °C. A viscosidade das

soluções de quitosana em diferentes concentrações (0,2 – 1 mg/mL) foi utilizada para calcular a massa molar.

Primeiramente, a viscosidade relativa (η_{rel}) (Eq. 2) é obtida em função das densidades e tempos de escoamentos das soluções e do solvente:

$$[\eta_{rel}] = \frac{\rho \cdot t}{\rho_1 \cdot t_1} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde ρ e t são, respectivamente, densidade e tempo de escoamento da solução e ρ_1 e t_1 são densidade e tempo de escoamento do solvente, respectivamente. Para soluções diluídas, a densidade da solução é igual à densidade do solvente.

A partir da viscosidade relativa, pode-se obter a viscosidade específica (η_{esp}) (Eq. 3):

$$[\eta_{esp}] = \eta_{rel} - 1 \quad \text{Eq. 3}$$

A viscosidade reduzida (η_{red}) é obtida dividindo-se a viscosidade específica pela concentração da solução (C):

$$[\eta_{red}] = \frac{\eta_{esp}}{C} \quad \text{Eq. 4}$$

A viscosidade intrínseca (η) foi obtida a partir das curvas de viscosidade reduzida *versus* a concentração, por extrapolação da regressão linear obtida. A massa molar média viscosimétrica (M_v) foi calculada a partir da viscosidade intrínseca, segundo a equação de Mark-Houwink-Sakurada:

$$[\eta] = kM^\alpha \quad \text{Eq. 5}$$

Em que: $k = 0,074$ (dL/g) e $\alpha = 0,76$ (adimensional) são constantes para o sistema solvente utilizado.

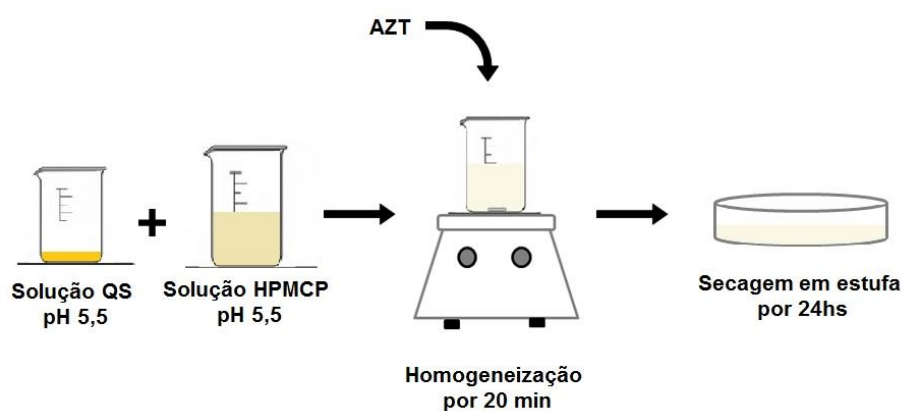
4.2.2 Obtenção dos sistemas de liberação

4.2.2.1 Preparo das dispersões sólidas

As dispersões sólidas foram preparadas pelo método da co-precipitação com evaporação do solvente. Os pHs das soluções de QS em ácido acético 0,1 mol/L (25 mg/mL) e HP em hidróxido de sódio 0,1 mol/L (37,5 mg/mL) foram ajustados separadamente para 5,5 e, em seguida, as respectivas soluções foram misturadas em diferentes proporções. Posteriormente, o fármaco foi adicionado à dispersão polimérica e homogeneizado em agitador magnético por 40 minutos. O solvente residual foi eliminado em estufa (60°C) com circulação de ar por 24 horas. As amostras secas foram pulverizadas em moinho de bolas durante 1 minuto, calibradas em tamis com abertura de malha 40 mesh (425µm) e armazenadas em dessecador (Figura 4).

As misturas físicas (MFs) foram preparadas em gral de porcelana nas mesmas proporções das dispersões sólidas, como controle, e mantidas em dessecador.

Figura 4 – Representação esquemática do preparo das dispersões sólidas pelo método da evaporação do solvente.



As composições das dispersões sólidas empregadas neste trabalho estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição das dispersões sólidas de AZT obtidas com os polímeros QS e HP.

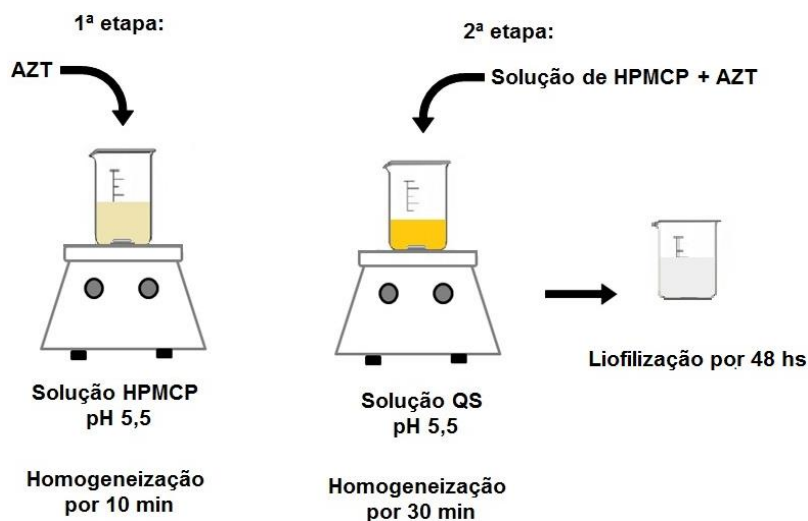
Amostra	Razão de massa (AZT: QS: HP)
DS 2	1: 0,5: 2
DS 2,5	1: 0,5: 2,5
DS 3	1: 0,5: 3
DS 3,5	1: 0,5: 3,5
DS 4	1: 0,5: 4
DS 7	1: 0,5: 7
DS 8	1: 0,5: 8
DS 10	1: 0,5: 10
DS 12	1: 0,5: 12
DS 24	1: 0,5: 24
DS 36	1: 0,5: 36

4.2.2.2 Preparo das nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas foram preparadas pelo método da complexação polieletrólítica do polímero catiônico, QS, com o polímero aniônico entérico, HP, por gotejamento. Para isso, foram preparadas soluções de QS em ácido acético 0,1 mol/L (4 mg/mL) (pH 5,5) e de HP em hidróxido de sódio 0,1 mol/L (2 mg/mL) (pH 5,5). Em seguida, o fármaco foi adicionado à solução polimérica aniônica e homogeneizado em agitador magnético por 10 minutos. Foram avaliados dois modos de preparo: a) adição lenta da solução de HP contendo AZT à solução de QS e b) adição lenta da solução de QS à solução de HP contendo AZT. Em ambos, após a adição dos polímeros, a mistura seguiu sob agitação magnética por 30 minutos (Figura 5) (MAKHLOF *et al.*, 2011). As amostras obtidas variaram

em quantidade de massa dos polímeros QS e HP. Nanopartículas poliméricas sem fármaco foram obtidas nas mesmas proporções.

Figura 5 - Representação esquemática do preparo das nanopartículas poliméricas pelo método da complexação polieletrólítica.



4.2.3 Determinação do teor de fármaco incorporado

A avaliação do teor de fármaco incorporado às NPs foi realizada a partir de uma massa de amostra liofilizada e precisamente pesada (equivalente a 10 mg de AZT). Inicialmente, as NPs foram dispersas em água ultrapura e mantidas sob agitação constante por 1 hora. Em seguida, a dispersão foi centrifugada a 15000 rpm por 45 minutos e o fármaco presente no sobrenadante foi quantificado por espectrofotometria UV em 267 nm.

Após a retirada do sobrenadante, a massa de nanopartículas foi redispersa em água (pH 5,5), homogeneizadas em ultra-turrax a 14.000 rpm por 10 minutos e mantidas sob agitação mecânica constante por 48 horas. Após este período, os procedimentos de centrifugação e quantificação do fármaco foram realizados conforme descritos anteriormente.

O teor de fármaco incorporado nas NPs foi calculado através da equação:

$$TI \% = \frac{F_q}{F_t} \times 100 \quad \text{Eq. 6}$$

Em que TI % é o teor de incorporação de fármaco (%); F_q é o fármaco quantificado no sobrenadante e F_t é a fármaco total adicionado.

4.2.4 Dissolução “in vitro” dos sistemas de liberação

O perfil de liberação foi avaliado de acordo com a porcentagem de dissolução do fármaco *in vitro* a partir dos sistemas de liberação. O ensaio foi realizado com aparato 2 (pás) de dimensão reduzida, sob velocidade de agitação de 50 rpm, em 150 mL de meio a 37°C. Foram utilizados como meios HCl 0,1 mol/L (pH 1,2) e tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,4). As coletas foram realizadas em tempos pré-determinados e com reposição imediata do meio, a fim de manter as condições *sink* (n=3). Para o ensaio, as DSs (equivalente a 15 mg de AZT) foram acondicionadas em cápsulas nº 0 e as NPs (equivalente a 7,5 mg de AZT) foram colocadas em um saco de diálise (membrana de acetato de celulose) com tamanho de poro de 14 kDa e posicionadas no fundo da cuba. A quantificação do fármaco liberado foi realizada por espectrofotometria na região UV (267 nm), de acordo com metodologia previamente validada por PEDREIRO (2012).

4.2.5 Caracterização dos sistemas de liberação

4.2.5.1 Análise granulométrica das dispersões sólidas

A determinação do diâmetro médio das partículas das dispersões sólidas foi realizada para cerca de 250 partículas, com base na medida do diâmetro de Feret a 0°, em estereoscópio Leica MZ APO™.

4.2.5.2 Análise granulométrica e índice de polidispersão das nanopartículas poliméricas

Para as nanopartículas poliméricas foi utilizada a técnica de espalhamento de luz (Dynamic Light Scattering) sob ângulo de 173°. A polidispersidade das partículas foi obtida pelo índice de polidispersão (PDI).

4.2.5.3 Avaliação do potencial zeta das partículas

A carga de superfície tanto das dispersões sólidas quanto das nanopartículas poliméricas, em pH 5,5, foi avaliada pela técnica de espalhamento de luz (Dynamic Light Scattering) sob ângulo de 173°. Os resultados foram expressos em milivolts (mV), a partir de

uma média de três determinações. Além disso, também foi avaliada a carga de superfície das nanopartículas poliméricas sem o fármaco.

4.2.5.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os ensaios de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram executados em calorímetro exploratório diferencial (Mettler®, DSC 1 Star System) acoplado a um módulo de resfriamento por fluxo de N₂ e fluxo de aquecimento de 10°C/min, calibrado com padrões de índio e zinco conforme recomendações do fabricante do equipamento.

Cerca de 5 mg das amostras (DS, NP, seus respectivos controles, polímeros livres e fármaco) foram dispostas em um cadinho de alumínio sem tampa para a realização do ensaio e um cadinho vazio foi utilizado como referência. A razão de aquecimento foi de 10°C/min, de 25 a 200°C.

4.2.5.5 Difractometria de raios X

A análise por difração de raios X foi realizada em temperatura ambiente em difratômetro de raios X, sob radiação monocromática Cu-K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$).

Para este ensaio, foram analisadas as DS, NP, seus respectivos controles, os polímeros livres e o fármaco. As amostras foram analisadas com varredura de raios X de ângulo aberto 2θ entre 4° e 60° e velocidade do goniômetro de 0,05/min.

4.2.5.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

As possíveis interações entre os polímeros e o fármaco presente nas amostras foram avaliadas por espectroscopia de absorção na região do infravermelho. O ensaio foi realizado em um espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu® 8300, abrangendo uma região de 4000 a 400 cm⁻¹. A obtenção das pastilhas das amostras foi realizada em uma prensa hidráulica sob força de 8 toneladas por 10 minutos, pela mistura com KBr. Neste ensaio foram avaliadas as DS, NP, seus respectivos controles, polímeros livres e fármaco.

4.2.5.7 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia de superfície foi examinada por um sistema de microscopia eletrônica de varredura (MEV) Jeol® JSM-7500F. As amostras foram distribuídas e fixadas sobre uma fita

de carbono para análise do material. Nesta análise, não foi realizado o revestimento das amostras com carbono.

4.2.6 Determinação da capacidade de absorção de líquidos

A capacidade de absorção de líquidos foi determinada tanto para as DSs quanto para as NPs, em meio saturado de umidade. Cerca de 50 mg de amostra foram colocados em dessecador, saturado de umidade (UR 100%), e a massa das amostras foram avaliadas em 12 e 24 horas. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados calculados em função da diferença entre a massa final e a inicial, de acordo com a Equação 7:

$$\text{Capacidade de absorção de líquidos (\%)} = \frac{m_{\text{final}}}{m_{\text{inicial}}} \times 100 \quad \text{Eq. 7}$$

Em que m_{final} (mg) é a massa de amostra obtida no intervalo estabelecido e m_{inicial} (mg) é a massa de amostra utilizada.

4.2.7 Estudos de mucoadesão “in vitro”

4.2.7.1 Adsorção de mucina

Uma massa de 20 mg de amostra (DSs e NPs) foi adicionada à 10 mL de soluções de mucina em diferentes concentrações (50, 100, 150 e 200 µg/mL). A dispersão foi homogeneizada em vortex e incubada em banho termostatizado a 37°C por 60 minutos. Posteriormente, as dispersões foram centrifugadas por 5 minutos a 8000 rpm e o sobrenadante foi utilizado para quantificar, por colorimetria, a mucina livre no meio pelo método de Lowry modificado por Peterson (DHAWAN *et al.*, 2004; PETERSON, 1977).

Para a determinação da mucina livre no sobrenadante, 1 mL do reagente de Lowry foi adicionado à alíquotas de 1 mL do sobrenadante, permanecendo em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu's e a reação foi mantida por 30 minutos adicionais nas mesmas condições. A absorbância foi medida por espectrofotometria visível em 749 nm, em duplicata. Para o branco, o mesmo procedimento foi empregado utilizando água destilada. Todo o procedimento foi realizado sem a presença de luz.

Para o cálculo da quantidade de mucina livre, foi utilizada uma curva analítica padrão de equação $y = 0,0085x + 0,0741$ e o coeficiente de determinação obtido foi $r^2 = 0,997$.

A quantidade de mucina adsorvida foi determinada a partir da quantificação da mucina livre no sobrenadante, conforme a Equação 8:

$$Q_{mucina\ adsorvida} = Q_{mucina\ adicionada} - Q_{mucina\ livre} \quad \text{Eq. 8}$$

4.2.7.1.1 Isotermas de adsorção de mucina

Os resultados obtidos através da interação da mucina com os sistemas de liberação foram ajustados e linearizados de acordo com as equações de Freundlich (Eq. 9) e Langmuir (Eq. 10):

$$C_{ads} = KC_e^{1/n} \quad \text{Eq. 9}$$

$$C_{ads} = \frac{aC_e}{b+C_e} \quad \text{Eq. 10}$$

Em que: C_{ads} é a concentração de mucina adsorvida no equilíbrio (mg/L) por unidade de massa e C_e é a concentração de mucina livre no equilíbrio (mg/L). Para a equação de Langmuir, $1/C_{abs}$ foi plotado contra $1/C_e$ e para a equação de Freundlich, o log de C_{abs} foi plotado contra C_e para a obtenção das diferentes constantes (k, n, a, b).

4.2.8 Avaliação “ex vivo” da permeabilidade intestinal da zidovudina pelo método do saco intestinal invertido

Para a avaliação da absorção intestinal do fármaco e avaliação da influência da glicoproteína-P no transporte foi utilizado o modelo do saco intestinal invertido (CHAUD *et al.*, 2010; PEDREIRO, 2012). Ratos machos adultos (250-270 g), mantidos em jejum por 12hs, foram anestesiados (tiopental sódico 50mg/kg, com prévia indução de sedação por halotano) e o intestino delgado dissecado, lavado com solução TC 199 a 10°C e colocado em meio de cultura para tecido (TC 199) na mesma temperatura e oxigenado (O₂:CO₂ – 95:5). O intestino

foi invertido com auxílio de uma haste flexível (~ 2,5 mm de diâmetro) sendo sua extremidade protegida com um fino tecido de seda; uma das extremidades foi fechada, utilizando fio de sutura e o segmento intestinal preenchido com TC 199. A outra extremidade do segmento intestinal foi fechada também com auxílio de fios de sutura, de forma que o comprimento final do segmento intestinal fosse 6 cm. A amostra a ser avaliada foi adicionada ao meio de incubação, contendo 600 µg/mL de fármaco, sendo que para cada amostra foram utilizados 6 segmentos intestinais. O meio de incubação foi mantido oxigenado (O₂:CO₂ – 95:5) e sob agitação suave na temperatura de 37°C. Após período pré-determinado de incubação, as amostras presentes no interior do saco intestinal foram filtradas e a quantidade de fármaco permeada através da membrana determinada por CLAE. Para a avaliação da influência da glicoproteína-P no transporte do fármaco, verapamil (50 µg/mL) foi adicionado à amostra avaliada no meio de incubação. Foi avaliada a absorção intestinal de cada amostra sem verapamil como controle.

A quantificação do fármaco permeado através da membrana foi realizada por CLAE, conforme metodologia validada por CARVALHO *et al.* (2009).

4.2.9 Avaliação da citotoxicidade em cultura de células Caco-2

A citotoxicidade das formulações foi avaliada em cultura de células de adenocarcinoma de cólon humano (células Caco-2), obtidas a partir do banco de células no Rio de Janeiro, de acordo com PAVAN *et al.* (2010). As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ em placas com área de superfície de 12,5 cm² em 10 mL de meio de crescimento (Meio Eagle Modificado por Dulbecco - DMEM) suplementado com 20% de soro fetal bovino, sulfato de gentamicina (50 mg/L) e Anfotericina B (2 mg/L). As células Caco-2 foram sub cultivadas por 7 dias por tripsinização com solução de tripsina-EDTA 0,25% (p/v), com substituição do meio de cultura a cada 2 dias.

A técnica de tripsinização consiste em recolher as células utilizando uma solução de tripsina-EDTA 0,25% (p/v), centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm, proceder a contagem do número de células em câmara de Neubauer e ajustar a concentração para 3,4×10⁵ células/mL em DMEM. Posteriormente, 200 µl de suspensão celular foi depositado em cada poço da microplaca de 96 poços (concentração de 6,8 x 10⁴ células/poço) e incubados a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 horas para permitir que as células se fixassem à placa. As diluições das amostras de teste foram preparadas na faixa de concentrações de 1000 - 3,9

µg/mL. Após a remoção do meio de crescimento e das células não aderidas à placa, as diluições foram adicionadas às células e incubadas novamente por 24 horas. A citotoxicidade dos compostos foi determinada após adição de 40 µL de revelador de resazurina e incubação por 2 horas. A leitura foi realizada em microplaca empregando Spectrafluor Plus (TECAN®) nos comprimentos de onda de 530 e 590 nm, respectivamente. A citotoxicidade (IC50) foi definida como a concentração mais elevada da amostra que manteve a viabilidade de pelo menos 50% das células.

4.2.10 Estudo de associação celular

Células Caco-2, originárias de adenocarcinoma de cólon humano, também foram utilizadas para comparar a associação celular do AZT livre e incorporado às dispersões sólidas e nanopartículas poliméricas. As células foram semeadas em placas de 6 poços a 250.000 células/poço e incubadas por 4 dias para crescimento. Após este período, as células foram tratadas com as amostras, tanto o AZT em solução quanto incorporado nos sistemas de liberação e incubadas a 37°C durante 90 min. Em seguida, o meio de cultura foi descartado, as células lavadas com tampão PBS gelado para remoção das partículas não aderidas, raspadas e lizadas com solução de Triton-X 5%. (CHAKRAVARTHI *et al.*, 2010). A concentração de proteínas totais foi determinada por colorimetria de acordo com o método de Lowry modificado por Peterson (DHAWAN *et al.*, 2004; PETERSON, 1977). A concentração de fármaco associado às células foi analisada por CLAE, como descrito por (CARVALHO *et al.*, 2009).

4.2.10.1 Efeito da mucina na associação celular

O efeito do muco na associação celular foi avaliado pelo pré-tratamento das células ou das partículas com solução de mucina, como descrito nos itens a e b (CHAKRAVARTHI *et al.*, 2010).

a) as células foram previamente incubadas com 200 µl de solução de mucina (1mg/mL) por 15 min., a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂.

b) 1 mL de suspensão das diferentes amostras foi incubado com 200 µL de mucina em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C por 15 min.

Após o tratamento com mucina, de acordo com o item *a* ou *b*, as células foram incubadas por 90 min, a 37°C. Em seguida, procedeu-se conforme descrito no item 4.2.9.

4.2.11 Análise estatística

Os resultados foram analisados segundo análise de variância ANOVA, com comparação de médias de acordo com o teste de Tukey. As análises foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

4.2.12 Ensaios de farmacocinética e biodisponibilidade “in vivo”

4.2.12.1 Validação da metodologia analítica para quantificação do AZT em plasma de rato

4.2.12.1.1 Preparo das soluções padrão de AZT

Soluções estoque de zidovudina foram preparadas nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Diluições seriadas a partir das soluções estoque foram preparadas em volumes apropriados para que cada 10 μl da solução estoque adicionado à 90 μl de plasma de rato resultassem nas concentrações finais de 0,05; 0,1; 0,5; 1, 2, 3, 4, 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ da curva analítica.

4.2.12.1.2 Processamento do plasma de rato

O método da desproteinização foi utilizado para separar o AZT dos componentes do plasma. Uma alíquota de 100 μl de acetonitrila foi adicionada às amostras contendo plasma de rato (razão 1:1), homogeneizadas em vortex por 30 segundos e centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um insert vial de 150 μl para as análises em HPLC.

4.2.12.1.3 Instrumentação e condições cromatográficas

As análises do AZT em plasma de rato foram realizadas em um Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) acoplado ao software Total Chrom Navigator. O sistema HPLC é composto por bombas binárias, injetor automático com loop de 100 μL e detector UV-Visível a 265 nm. Os parâmetros de análises foram compostos de uma coluna de fase reversa C18 Zorbax Eclipse XDB (250 x 4mm i.d., tamanho de poro de 5 μm), fase móvel constituída de água:acetonitrila (75: 25 v/v), fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 90 μL . Todas as análises cromatográficas foram realizadas em modo isocrático e nenhum padrão interno foi utilizado devido à simplicidade do procedimento analítico.

4.2.12.1.4 Determinação dos parâmetros de validação

Para validar a análise do AZT em plasma de rato, os seguintes parâmetros foram investigados: seletividade, linearidade, precisão e exatidão, limite de detecção e quantificação e recuperação (BRASIL, 2003).

4.2.12.1.4.1 *Seletividade*

A seletividade é definida como a ausência de picos interferentes no tempo de retenção de análise do fármaco. A especificidade do método foi determinada por comparação dos cromatogramas obtidos a partir do plasma de rato contendo o fármaco ou não (branco).

4.2.12.1.4.2 *Linearidade*

A linearidade do método foi determinada pela média de três curvas analíticas do AZT, com uma faixa de concentrações variando de 0,05 a 10 µg/mL em plasma de rato.

Soluções estoque foram preparadas em diferentes volumes para que cada 10 µl da solução estoque adicionado à 90 µl de plasma de rato resultassem nas concentrações finais da linearidade.

4.2.12.1.4.3 *Precisão e exatidão*

A precisão foi determinada como o desvio padrão relativo (DPR) e a exatidão como o erro percentual relativo. A precisão intra e inter dia e a exatidão foram obtidas pela média da análise de 3 amostras de plasma com AZT em 3 concentrações distintas (0,5; 3 e 10µg/mL) (n=3).

4.2.12.1.4.4 *Limite de detecção e limite de quantificação*

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados de acordo com as Eq. 11 e Eq. 12.

$$LD = 3,3 \times \frac{DP}{IC} \quad \text{Eq. 11}$$

$$LQ = 10 \times \frac{DP}{IC} \quad \text{Eq. 12}$$

Onde: DP é o desvio padrão do coeficiente linear e IC é referente ao coeficiente angular das concentrações da regressão linear.

4.2.12.1.4.5 Recuperação

A recuperação do AZT foi determinada em 3 diferentes concentrações (0,5; 3 e 10 ug/mL) a partir da curva analítica. O percentual de recuperação corresponde à comparação entre o AZT extraído do plasma de rato e o AZT obtido a partir dos padrões em solução aquosa.

$$\% R = \frac{C}{C_o} \times 100 \quad \text{Eq. 13}$$

Onde: %R é o percentual de recuperação; C é a média das concentrações experimentais e Co é a concentração inicial teórica.

4.2.12.2 Procedimento cirúrgico para canulação da veia jugular dos animais

Os estudos de farmacocinética foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Cuidados com Animais e aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Farmácia da Universidade de Valência/Espanha (Protocolo A1405773228053). Todos os ensaios de farmacocinético e biodisponibilidade foram realizados de acordo com LLEDÓ-GARCÍA *et al.* (2007).

Ratos machos adultos (250 a 300 g) foram submetidos à cirurgia de canulação da veia jugular antes dos experimentos conforme procedimento proposto por GINER *et al.* (1989). Antes da cirurgia, a anestesia foi induzida pela administração intraperitoneal de solução extemporânea de pentobarbital sódico a 10 mg/mL na dose de 50 mg/kg. Para facilitar a recuperação do animal após a cirurgia, foi realizada uma administração intramuscular de tartarato de butorfanol a 10 mg/mL na dose de 0,056 mg/kg, logo após a indução à anestesia.

Após o animal atingir a anestesia profunda, o procedimento para inserir a cânula iniciou-se com a localização da veia jugular na região do pescoço do rato. Uma pequena incisão foi realizada na parede da veia jugular para inserir a cânula, que foi exteriorizada através da pele na parte posterior do pescoço. A parte final da cânula exteriorizada foi preenchida com uma solução salina heparinizada (20 UI/mL) para evitar a entrada de ar na corrente sanguínea.

Após a cirurgia, a recuperação total do animal é atingida após 24 horas. O animal foi mantido em gaiola com fundo duplo com comida e água livremente disponível durante a noite e até o início da administração do fármaco. A fim de facilitar a coleta de amostras de sangue dos ratos, uma cânula de silicone de 15 cm de comprimento foi ligada à extremidade livre da cânula, que também permaneceu preenchida com solução salina heparinizada (20 UI/mL).

4.2.12.3 Protocolo de administração e amostragem

Os animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos para administração intravenosa e oral. A dose de AZT administrado aos animais foi determinada de acordo com os cálculos de extrapolação alométrica (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2002).

Para o cálculo de extrapolação alométrica, foram consideradas a Taxa Metabólica Basal (TMB) e a Taxa Metabólica Específica (TME). A TMB é o valor medido quando um animal endotérmico se encontra inativo, sem sofrer qualquer condição de estresse e mantido sob temperatura ambiente ótima. Já a TME é a menor taxa metabólica por unidade de massa, em animais endotérmicos, cujo valor é obtido pela divisão da TMB pela massa do animal (Eq. 18 e Eq. 19).

$$TMB = KxM^{0,75} \quad \text{Eq. 14}$$

$$TME = KxM^{-0,25} \quad \text{Eq. 15}$$

Onde: K= 70, constante determinada para mamíferos placentários a 37°C e M= massa do animal.

O cálculo da dose de AZT administrada aos animais foi realizado de acordo com as Eq. 16 e Eq. 17. Considerando a dose de 600 mg de AZT, o fator dose (FD) de um indivíduo de 75 kg (TME=25,92) é igual a 0,34. Para um rato de 0,3 kg cuja TME é 94,58, o cálculo da dose administrada de AZT resultou em 32 mg/kg.

$$FD (humano) = \frac{Dose(humano)}{TME (humano)} \quad \text{Eq. 16}$$

$$DA (rato) = TME(rato)x FD (humano) \quad \text{Eq. 17}$$

Onde: FD= fator dose e DA = dose administrada.

A duração do experimento foi de, pelo menos, 5 meias-vidas do fármaco e os tempos de coleta para determinação da concentração plasmática foram determinados experimentalmente (CHOW, LIU, 2008).

4.2.12.3.1 Administração intravenosa

Zidovudina 10 mg/mL de solução injetável foi administrada diretamente através da parte exteriorada da cânula inserida na veia jugular. Imediatamente após a administração, foram injetados 0,4 mL de solução salina heparinizada (20 UI/mL) para garantir que todo o fármaco atingisse a circulação sistêmica.

4.2.12.3.2 Administração oral

Para administração por via oral, três grupos de animais foram submetidos a intubação gástrica sob ligeira anestesia com isoflurano e receberam quantidades de amostras (solução, dispersão sólida e nanopartículas poliméricas) equivalentes a 10 mg/mL de AZT.

4.2.12.3.3 Protocolo de amostragem

Amostras de sangue (0,2 mL) foram coletadas através de seringas heparinizadas a partir da cânula inserida na veia jugular em intervalos de tempo pré-estabelecidos após as administrações intravenosa e oral de AZT (10 mg/mL).

Grupo 1 – Administração intravenosa solução injetável de AZT.

Grupo 2A – Administração oral de solução de AZT.

Grupo 2B – Administração oral de dispersão de dispersão sólida contendo AZT.

Grupo 2C – Administração oral de dispersão de nanopartículas poliméricas contendo AZT.

As amostras de sangue coletadas a partir da veia jugular dos ratos foram colocadas em tubos Eppendorf heparinizados. Para separar os elementos do plasma dos eritrócitos, os tubos Eppendorf foram centrifugados a 8000g durante 10 min. O sobrenadante de plasma foi transferido para outro tubo Eppendorf e armazenado a -20°C para posterior análise.

O tratamento do plasma para a quantificação do AZT foi realizado de acordo com a descrição no item 4.2.12.1.2.

A Tabela 2 mostra a dose e a concentração de AZT administrada aos diferentes grupos.

Tabela 2 – Grupos, formulações, concentração de AZT (mg/mL), via de administração e dose (mg/kg) avaliados no estudo *in vivo*.

Grupo	Formulação	Concentração de AZT (mg/mL)	Via de administração	Dose (mg/kg)
1	Solução intravenosa - IV	10	Intravenosa	32
2A	Solução oral - OR	10	Oral	32
2B	Dispersão sólida em dispersão - DS	10	Oral	32
2C	Nanopartícula polimérica em dispersão - NP	10	Oral	32

4.2.12.4 Análise farmacocinética

4.2.12.4.1 Modelo não-compartimental

Inicialmente, a análise não-compartimental foi realizada para obter informações da possível existência de uma não linearidade nos processos de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação e para determinar a biodisponibilidade do AZT.

A análise não-compartimental utilizando a média das concentrações plasmáticas obtidas a partir da administração intravenosa e oral foi realizada pelo software WinNonlin V.5.1. Para cada grupo foram determinados: pico de concentração máxima (C_{max}), tempo para atingir o pico de concentração máxima (T_{max}), volume de distribuição aparente (V_d), constante de eliminação (K_{el}), meia-vida (t_{1/2}), ASC^{0-t} e ASC^{0-∞} e o *clearance* total aparente (Cl).

4.2.12.4.2 Modelo compartimental

Equações integradas dos modelos cinéticos monocompartimental (Eq. 18) e bicompartimental (Eq. 19) foram ajustadas individualmente aos resultados obtidos pela administração intravenosa.

$$C = C_0 \cdot e^{-k_{el} \cdot t} \quad \text{Eq. 18}$$

$$C = A_0 \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B_0 \cdot e^{-\beta \cdot t} \quad \text{Eq. 19}$$

O modelo bicompartimental foi o que melhor se ajustou aos resultados obtidos a partir da administração intravenosa; então, este modelo foi escolhido para as análises compartimentais dos resultados obtidos a partir da administração oral. Além disso, para estes resultados foi aplicado o modelo descrito por LOO, RIEGELMAN (1968).

Uma abordagem gradativa da farmacocinética populacional foi realizada pela aplicação de um modelo não-linear de efeitos mistos e do método de estimativa condicional de primeira ordem (FOCE), utilizando o software NONMEM V.7.2 (BEAL, SHEINER, 1989) em associação com o compilador de dados G77 FORTRAN. Os resultados experimentais utilizados para construir o modelo foram da concentração plasmática total de AZT.

O modelo foi desenvolvido sequencialmente, de modo que sempre que modificações fossem realizadas na estrutura de base do modelo, um procedimento retrógrado seria realizado. Os resultados também foram incorporados de forma sequencial. A análise consistiu nas seguintes etapas:

Etapa 1: Resultados administração intravenosa de AZT do grupo 1.

Etapa 2: Resultados administração intravenosa de AZT do grupo 1 e da administração oral dos grupos 2A, 2B and 2C.

Como uma primeira avaliação dos resultados, foi realizada uma análise empírica em cada etapa utilizando o modelo farmacocinético linear, o que permitiu diferentes valores dos parâmetros a serem estimados para cada um dos grupos avaliados.

Para verificação preditiva visual, simulações dos perfis de concentração plasmática de AZT *versus* tempo para 200 populações foram realizadas utilizando o modelo final e cada parâmetro modelo foi estimado incluindo variabilidade entre sujeitos. Para cada grupo, os perfis de concentração plasmática de AZT *versus* tempo correspondente ao 5º, 50º e 95º quartis foram representados em conjunto com as observações correspondentes (KARLSSON, HOLFORD, 2008).

A técnica de reamostragem “bootstrap” foi utilizada como um método interno para validar o modelo final. A partir do conjunto de resultados originais, 1.000 repetições foram geradas aleatoriamente, por amostragem com reposição, e o modelo de farmacocinética da população final foi ajustado repetidamente para cada replicata usando a opção “bootstrap” PsN do software NONMEM V.7.2 (N Holford, version 222, May 2001, Auckland, New Zealand). As estimativas dos parâmetros médios, a mediana e o intervalo de confiança de 95 % foram obtidos a partir das repetições de “bootstrap” e comparados com os parâmetros farmacocinéticos populacionais obtidos a partir do conjunto original dos resultados.

4.2.12.5 Biodisponibilidade

O fator de biodisponibilidade (F) considerado para o resultado de ASC do modelo não-compartmental foi calculada de acordo com a Eq. 20. Para o resultado de ASC do modelo bicompartimental, a biodisponibilidade foi calculada como um parâmetro modelo. Diferentes modelos foram avaliados com igual ou diferente constante de absorção e biodisponibilidades para as 3 formulações avaliadas. Os ajustes foram realizados pelo software NONMEM V.7.2 subrotina ADVAN 6.

$$F = \frac{ASC_{n\grave{a}ocomp(O)}}{ASC_{n\grave{a}ocomp(IV)}} \times 100 \quad \text{Eq. 20}$$

4.2.12.6 Análise estatística

Os parâmetros não-compartmentais foram calculadas individualmente. Os resultados foram apresentados como médias e desvio padrão e a análise estatística da variância foi realizada pela ANOVA. Além disso, o teste de Further Scheffe foi aplicado uma vez que diferenças estatísticas foram observadas.

Para a análise compartimental, o valor mínimo da função objetivo (MOFV), variáveis estimadas aleatórias (BSV) e variabilidade residual (RV) obtidos pelo software NONMEM foram adotados para a seleção do melhor modelo.

Um gráfico de análise do ajuste foi realizado pelo software R Studio for Windows, version 7.0 .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

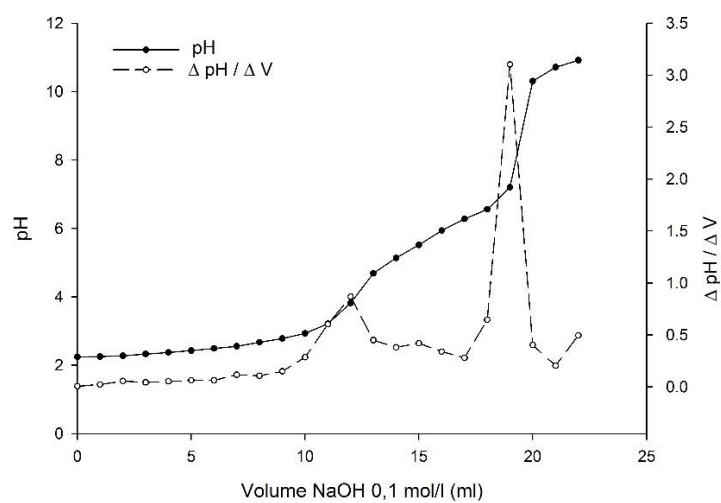
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

5.1.1 Determinação do grau médio de desacetilação

A quitosana possui propriedades que podem variar amplamente, tais como: pureza, viscosidade, grau de desacetilação e massa molecular devido às diversas variáveis do processo de obtenção, a partir da quitina. As preparações comerciais de quitosana têm valores com massa molecular entre 10^4 e 10^5 Dalton. O grau médio de desacetilação pode variar entre 70 e 95%, dependendo da metodologia utilizada. O grau de desacetilação (GD) é uma das características mais importantes da quitosana, pois determina o conteúdo de grupos amínicos livres no polissacarídeo, o que influencia principalmente na sua solubilidade (DAMIAN *et al.*, 2005).

A solubilidade da quitosana está relacionada à quantidade de grupos amino protonados (amônio/ $-\text{NH}_3^+$) na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade destes grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e também a solubilização em água (SANTOS *et al.*, 2003).

O grau de desacetilação da quitosana foi determinado por titulação potenciométrica. A curva obtida e sua primeira derivada estão representadas na Figura 6. Foram obtidos os volumes nos pontos de equivalência, cujos valores foram substituídos na Eq. 1 para o cálculo do GD da quitosana. Os resultados calculados estão apresentados na Tabela 3. O GD obtido foi de 92,8%, o que está em acordo com o intervalo preconizado por DAMIAN *et al.* (2005) e CHEN *et al.* (2011).

Figura 6 - Curva de titulação potenciométrica e sua primeira derivada.**Tabela 3 - Condições experimentais para obtenção do GD da quitosana**

Massa de quitosana (mg)	$\Delta (V_2 - V_1)$ (mL)	GD(%)
0,1518	7	92,8
0,1519	7	92,7
0,1504	7	92,8
Média (\pmDP)		92,8 (\pm0,4)

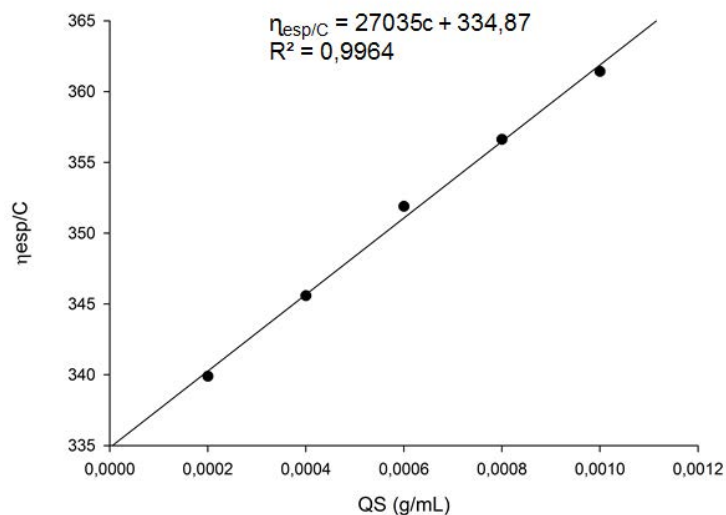
5.1.2 Determinação da massa molar média viscosimétrica

Uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização de macromoléculas, como os polímeros. A medida da viscosidade é uma técnica simples, rápida e fornece informações principalmente sobre a massa molecular média de moléculas lineares e ramificadas (DE SOUZA COSTA-JÚNIOR *et al.*, 2009).

A Figura 7 apresenta a relação linear obtida entre a viscosidade reduzida ($\eta_{\text{esp}/C}$) em função da concentração (c) das soluções das amostras. O coeficiente de correlação obtido ($r^2=0,9964$) demonstrou boa linearidade dos resultados experimentais.

A massa molecular média da quitosana foi calculada pela equação de Mark-Houwink-Sakurada, cujo valor de $[\eta]$ (viscosidade intrínseca) encontrado foi 334,87 mL/g. Os valores de k e α utilizados foram 0,074 dl/g e 0,76, respectivamente, para um sistema solvente constituído de ácido acético 0,1 mol/L e acetato de sódio 0,2 mol/L (SANTOS *et al.*, 2003). O valor da massa média da quitosana encontrado foi $6,4 \times 10^4$ g/mol.

Figura 7 - Relação linear entre a concentração das soluções de QS e viscosidade reduzida ($\eta_{\text{esp}/C}$), usada para a determinação da viscosidade intrínseca (η).



A viscosidade intrínseca da quitosana é relativamente alta e considerada maior do que para outros polímeros com massa molar semelhante. Isto é consequência da sua cadeia polimérica, que por ser derivada de quitina, possui uma conformação molecular mais rígida, resultando em maiores valores de viscosidade intrínseca (MOURYA *et al.*, 2010).

5.2 OBTENÇÃO DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO

Os sistemas de liberação para a administração pela via oral são amplamente utilizados devido à sua natureza não invasiva e maior adesão do paciente ao tratamento. Entretanto, com os avanços da terapêutica, tem-se buscado cada vez mais o aumento da biodisponibilidade de fármacos administrados pela via oral, já que a absorção pode ser influenciada pelas barreiras fisiológicas. O delineamento farmacotécnico de sistemas de liberação requer um entendimento dos parâmetros biofarmacotécnicos, que englobam a fisiologia intestinal e a mucosa, bem como as características físico-químicas de fármaco e polímeros, além das etapas de pré-formulação.

A seleção dos polímeros empregados na obtenção dos sistemas explorados neste estudo foi fundamentada nas propriedades físico-químicas de cada um. Também foram consideradas a capacidade mucoadesiva e a possibilidade de influenciar a permeabilidade do fármaco através da membrana intestinal.

A quitosana foi selecionada como polímero carreador, pois tem despertado atenção nas áreas farmacêuticas e biomédicas devido à sua excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedade mucoadesiva e grupos funcionais de fácil modificação. Além disso, a quitosana possui duas importantes vantagens para sistemas de liberação de fármacos por via oral, que incluem a capacidade mucoadesiva e sua ação promotora de absorção para vários fármacos (WANG *et al.*, 2013).

O ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, que foi inicialmente desenvolvido como material de revestimento entérico de formas farmacêuticas sólidas, foi selecionado a fim de conferir proteção frente ao meio ácido do estômago. É um polímero que possuiu grupamentos disponíveis para interação eletrostática com a quitosana, possibilitando a formação de complexos polieletrólíticos, além de propriedades mucoadesivas (MAKHLOF *et al.*, 2011). Adicionalmente, sua atividade inibidora da P-gp tem sido demonstrada (CARRENO-GOMEZ, DUNCAN, 2002).

5.2.1 Preparo das dispersões sólidas

A mistura de polímeros, com propriedades distintas, é uma abordagem racional para a obtenção de novos materiais com propriedades específicas, que podem permitir um controle adequado da liberação do fármaco, favorecendo a biodisponibilidade (CARBINATTO *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2013).

Além do emprego para o aumento da solubilidade de fármacos, as dispersões sólidas podem ser utilizadas como um sistema de liberação modificada de fármacos, apresentando a vantagem de evitar a liberação imediata do fármaco, uma vez que a estrutura matricial da dispersão sólida é monolítica, onde o fármaco está homogeneamente disperso. A técnica de preparação da dispersão sólida representa uma abordagem simples e de baixo custo para a preparação de sistemas matriciais poliméricos contendo fármaco em estado amorfo e os estudos sobre a influência dessas mudanças estruturais na resposta biológica como mucoadesão e permeabilidade de fármacos de alta solubilidade ainda não foram avaliados (GIRI *et al.*, 2012).

Na obtenção das dispersões sólidas foi necessário o ajuste do pH para evitar a precipitação dos polímeros no momento da mistura das soluções poliméricas. Em meio alcalino observou-se a precipitação da QS e, em meio ácido houve a precipitação do HP. Assim, o pH foi ajustado em 5,5, pois é o pH adequado para os polímeros e o fármaco.

Após a obtenção das amostras (Tabela 1), foi realizado o ensaio de liberação *in vitro* (Figura 8), a partir do qual foram selecionadas as 3 formulações das dispersões sólidas para os demais experimentos. As amostras selecionadas foram DS 8, DS 12 e DS 24, nomeadas de acordo com a proporção de HP nas amostras.

5.2.2 Preparo das nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas biodegradáveis vêm ganhando espaço na terapêutica, pois podem melhorar a biodisponibilidade de fármacos solúveis e de baixa solubilidade nos fluidos biológicos e também melhorar o direcionamento do fármaco para um determinado sítio biológico, devido ao seu tamanho nanométrico. Na administração oral, o tamanho reduzido das nanopartículas favorece a absorção gastrointestinal do fármaco, melhorando sua biodisponibilidade (TRAN *et al.*, 2011).

A formação espontânea de nanopartículas poliméricas por complexação polieletrólítica QS/HP depende de capacidade da QS se reestruturar em contato com soluções aniônicas, como

resultado da reticulação intermolecular entre os grupos amino da QS, carregados positivamente, e os grupos carboxílicos do HP, carregados negativamente (ZHANG *et al.*, 2012).

Os pHs das soluções de QS e HP foram ajustados para 5,5, pois em valores de pH acima do pKa 6,3 da QS, ocorre a diminuição do grau de protonação do polímero e, conseqüentemente, a agregação de partículas. No caso do HP, o pKa do polímero relacionado aos grupos de ácido carboxílico livres é de aproximadamente 5,2 e estes grupamentos tornam-se negativamente carregados em valores de pH acima deste valor, possibilitando a interação eletrostática com a QS (GAN *et al.*, 2005).

Inicialmente, foi avaliado o efeito da variação de massa da QS na formação da nanopartículas, quando o polímero catiônico era adicionado ao aniônico e a massa de HP mantida constante (10 mg). Para tanto, foram avaliados tamanho de partícula, potencial zeta, índice de polidispersão (PDI) e aparência macroscópica da dispersão de acordo com a seguinte classificação visual: solução límpida (L), dispersão opalescente (O) ou agregado (A). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Influência da variação de massa de QS na composição e propriedades das nanopartículas poliméricas sem AZT.

Amostra	Massa (mg)		Tamanho de partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)	PDI	Classificação visual
	HP	QS				
QS 1	10	1	461,3	-27,4	0,83	L
QS 2	10	2	348,7	-26,4	0,77	L
QS 3	10	3	436,5	-26,9	0,54	O
QS 4	10	4	390,1	-22,1	0,53	O
QS 5	10	5	686,7	-23,6	0,67	O
QS 7,5	10	7,5	-	-	-	A
QS 10	10	10	648,7	-23,9	0,78	O
QS 12,5	10	12,5	-	-	-	A
QS 15	10	15	-	-	-	A
QS 20	10	20	-	-	-	A
QS 30	10	30	-	-	-	A

A influência da variação de massa da QS foi observada, principalmente, no tamanho das partículas, pois, o aumento da massa deste polímero resultou na formação de partículas maiores, o que pode ser atribuído à maior concentração polimérica em solução, o que representa um maior número de cadeias poliméricas disponíveis para complexação e, conseqüentemente, formação de partículas maiores. Além disso, os elevados valores de PDI das amostras demonstraram a elevada heterogeneidade de tamanho das partículas (BAO *et al.*, 2008).

A partir de 7,5 mg de QS foi observada a formação de um agregado de partículas, exceto na amostra que continha 10 mg de QS. O aumento do tamanho das partículas devido ao aumento da massa de QS também foi relatado por TSAI *et al.* (2011) ao estudar a complexação de quitosana com tripolifosfato e por MAKHLOF *et al.* (2011) em trabalho de complexação de quitosana com tripolifosfato e com ftalato de hidroxipropilmetilcelulose.

Em um segundo momento, foi avaliada a influência da variação da massa do HP, quando o polímero aniônico foi adicionado ao catiônico e a massa de QS mantida constante (10mg). Os resultados do tamanho de partícula, potencial zeta, índice de polidispersão (PDI) e classificação visual estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Influência da variação de massa de HP na composição e propriedades das nanopartículas poliméricas sem AZT.

Amostra	Massa (mg)		Tamanho de partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)	PDI	Classificação visual
	QS	HP				
HP 1	10	1	248,4	+20,60	0,37	L
HP 2	10	2	270,6	+29,9	0,23	L
HP 3	10	3	684	+23,2	0,64	O
HP 4	10	4	952	+24,9	0,26	O
HP 5	10	5	844	+22,3	0,19	O
HP 5,5	10	5,5	862	+21,5	0,23	O
HP 7,5	10	7,5	-	-	-	A
HP 10	10	10	-	-	-	A
HP 12,5	10	12,5	-	-	-	A
HP 15	10	15	-	-	-	A

Por meio da adição lenta do poliânion sobre o polication, a solução de QS mudou de solução límpida para dispersão opalescente e, em seguida, ocorreu a turvação total do meio (solução leitosa) indicando a formação de agregados. Além disso, a mudança de solução límpida para dispersão opalescente está relacionada ao elevado rendimento do processo das NPs, por aumento da massa do HP. No entanto, acima de 5,5 mg de HP ocorreu a agregação das partículas, provavelmente por alterações no potencial zeta das NPs para valores mais baixos (PAHWA *et al.*, 2012).

Para incorporação do fármaco, foram selecionadas as amostras HP 4, HP 5 e HP 5,5, as quais foram designadas como NP 4, NP 5 e NP 5,5. A seleção destas amostras foi baseada em suas características físico-químicas como tamanho de partícula, PDI e potencial zeta. Além disso, as maiores proporções de HP nestas NPs devem contribuir para a proteção gástrica do sistema de liberação. A Tabela 6 mostra a composição das NPs que foram avaliadas neste trabalho.

Tabela 6 – Composição da nanopartículas poliméricas.

Amostra	Razão de massa (AZT: QS: HP)
NP 4	1: 1: 0,4
NP 5	1: 1: 0,5
NP 5,5	1: 1: 0,55

5.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FÁRMACO INCORPORADO

O teor de incorporação (TI) de fármaco é um parâmetro importante na caracterização físico-química de nanopartículas poliméricas e está diretamente relacionado à efetividade do sistema de liberação (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003a). Além disso, pode influenciar a biodisponibilidade do fármaco, quando administrado por via oral, devido à capacidade que as nanopartículas têm de protegê-lo das condições fisiológicas do TGI e de aumentarem sua absorção, pela promoção do transporte através da membrana intestinal e difusão pelo muco (DES RIEUX *et al.*, 2006).

O TI das nanopartículas poliméricas variou de 62 a 67%, sendo que as NPs 5 e 5,5 apresentaram teores de incorporação de fármaco significativamente maiores que a NP 4 ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Teor de incorporação de fármaco nas NPs.

Amostra	TI % (\pm DP)
NP 4	62 (\pm 1)
NP 5	65 (\pm 3)
NP 5,5	67 (\pm 4)

Assim, foi observado que o aumento da proporção do HP em relação à QS contribuiu para a maior incorporação de fármaco. Segundo MAKHLOF *et al.* (2011), a massa molecular do HP, em torno de 130 kDa, contribui para um entrelaçamento mais eficiente com a cadeia polimérica da QS, pelas interações iônicas e ligações hidrogênio, o que pode resultar na maior incorporação de fármaco na estrutura tridimensional das cadeias poliméricas.

A quantificação do fármaco no sobrenadante após a dispersão das nanopartículas em pH 5,5 por 48 h revelou que o fármaco não foi liberado para o meio aquoso, demonstrando que, neste pH, as nanopartículas apresentaram adequada estabilidade e o efetivo aprisionamento do fármaco.

Para as dispersões sólidas, o teor de incorporação de fármaco variaram de 97 a 98% (Tabela 8).

Tabela 8 – Teor de incorporação de fármaco nas DSs.

Amostra	TI % (\pm DP)
DS 8	99 (\pm 0,8)
DS 12	98 (\pm 2)
DS 24	98 (\pm 1)

5.4 DISSOLUÇÃO “*IN VITRO*” DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO

A biodisponibilidade do fármaco envolve duas etapas, a dissolução e a absorção. Como definição da taxa de dissolução, tem-se o percentual de dissolução de uma substância pura sob a condição de constante agitação do meio em contato com a sua área de superfície ou velocidade de agitação, pH e força iônica do meio de dissolução, em função do tempo (ZAKERI-MILANI *et al.*, 2009).

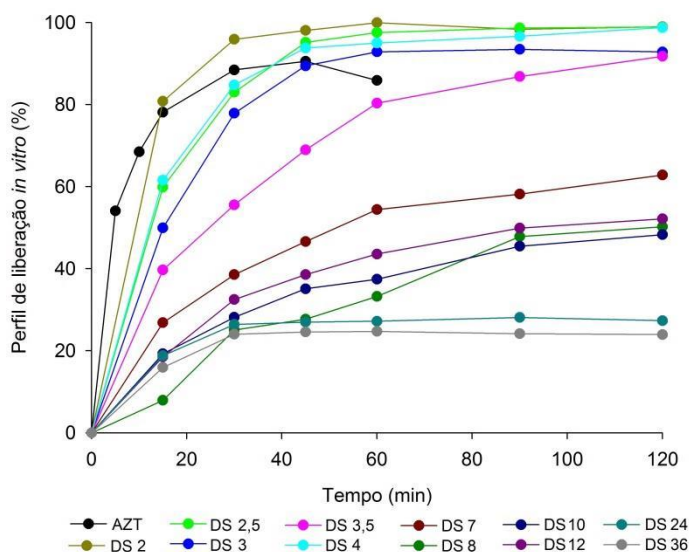
Em sistemas de liberação de fármacos, a presença de polímeros com propriedades específicas pode influenciar no comportamento de liberação do fármaco. Se estiver disperso na matriz de um polímero intumescível, o intumescimento polimérico proporcionará uma maior mobilidade das moléculas do fármaco aprisionadas nesta matriz e o fármaco terá capacidade de se difundir, de um modo controlado, para o meio eluente (OMIDIAN, PARK, 2008).

O ensaio de dissolução é um método *in vitro* que caracteriza como o fármaco é liberado da matriz polimérica. Ele pode indicar a eficiência de dissolução *in vivo*, mas não fornece maiores informações sobre a absorção do fármaco (AZARMI *et al.*, 2007). Esta relação permite a seleção das melhores condições *in vitro* que simulam as condições *in vivo* para se atingir a efetividade do fármaco (WILLMANN *et al.*, 2010).

Para fármacos administrados pela via oral, o ensaio de dissolução é realizado em meios de acordo com o pH do TGI, que varia de 1 a 7,8. Assim, a escolha do pH do meio deve considerar, principalmente, o tipo de liberação do fármaco a partir do sistema de liberação (imediate ou prolongada) e o sítio de absorção. Neste trabalho, foram avaliados os perfis de liberação do AZT em meios com pH 1,2 e pH 7,4 para simular as condições fisiológicas do estômago e do intestino, respectivamente.

5.4.1 Dissolução “*in vitro*” do fármaco a partir das dispersões sólidas

Os perfis de liberação *in vitro* do AZT livre e em DSs, em pH 1,2, estão apresentados na Figura 8.

Figura 8 – Perfil de liberação *in vitro* do AZT livre e em DSs (pH 1,2)

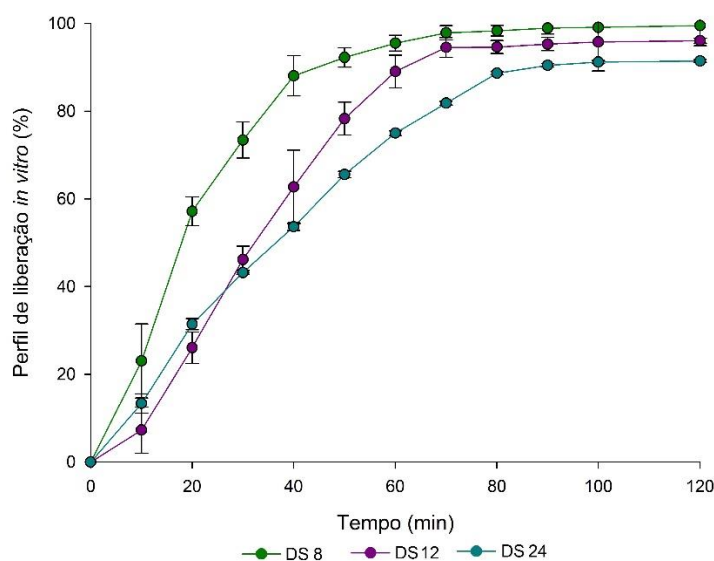
O AZT é um fármaco solúvel em meio ácido e apresentou um percentual de dissolução de aproximadamente 80% em 30 minutos. Para as amostras contendo 2 a 4 partes de HP, aproximadamente 50% do fármaco foi liberado em 30 minutos de experimento. Quando a proporção deste polímero foi aumentada, a liberação foi significativamente reduzida ($p < 0,05$), de modo que para 7 a 12 partes de HP a liberação foi de 30% a 40 %, enquanto para 24 e 36 partes deste polímero, 26% do fármaco foi liberado, no mesmo intervalo de tempo.

Após 120 minutos, a liberação atingiu 100% do fármaco contido nas DS 2 a DS 4, 50% a 60% do fármaco presente nas DS 7 a 12 e manteve-se em 26% para as DS 24 e 36 ($p > 0,05$).

Os dados apresentados demonstram a influência da proporção de HP no perfil de liberação do fármaco, de forma que o aumento da proporção deste polímero promoveu a redução das taxas de liberação em meio ácido. Neste pH, os grupos carboxílicos do HP permanecem na forma de sais de ácido não dissolvido, o que desfavorece o intumescimento do polímero e a liberação do fármaco (BELE, DERLE, 2012).

A elevada solubilidade da QS em meio ácido pode ter permitido a liberação prematura do fármaco nas DSs 2 a 4, com maiores proporções de QS. Para as outras DSs avaliadas, o aumento na proporção de HP permitiu um controle mais efetivo das taxas de liberação do fármaco.

Com base no perfil de liberação do fármaco em meio ácido, as amostras DS 8, DS 12 e DS 24 foram selecionadas para o ensaio de liberação *in vitro* em meio tampão fosfato pH 7,4. Os perfis obtidos são demonstrados na Figura 9.

Figura 9 - Perfil de liberação *in vitro* do AZT em DSs (pH 7,4)

O maior percentual de liberação foi observado para a DS 8 que, logo aos 40 minutos atingiu 89% de liberação do AZT, sendo significativamente maior que para as DS 12 e 24, que liberaram, respectivamente, 62 e 54% neste mesmo intervalo de tempo ($p < 0,05$). A DS 24 apresentou as menores taxas de liberação do fármaco a partir de 30 minutos de ensaio. Após 70 minutos, a DS 12 atingiu 94% de liberação do AZT, mantendo este percentual até ao final do ensaio. Neste mesmo intervalo, a DS 24 liberou 81% do fármaco, alcançando 91% ao final dos 120 minutos.

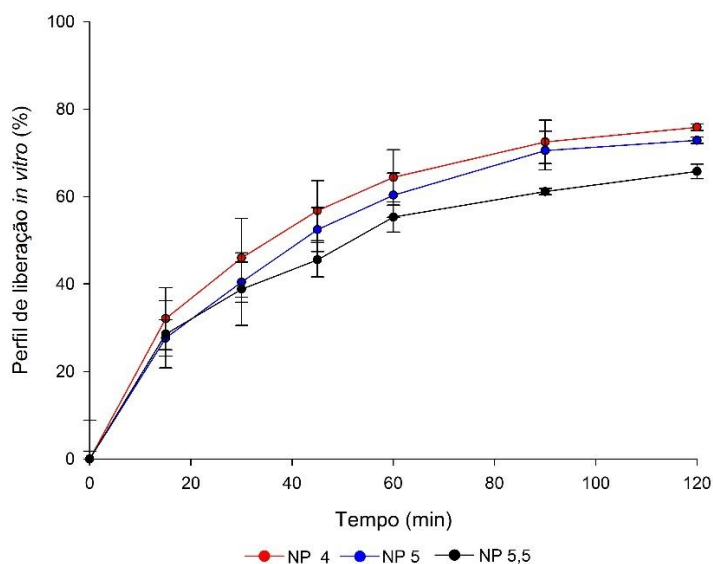
O percentual de liberação (57,2%) observado para a DS 8 aos 20 minutos pode estar relacionado à maior solubilidade do HP neste meio de liberação. Além disso, em meio básico, ocorre uma forte repulsão dos grupos carboxilados do HP, devido às cargas negativas, levando ao afastamento das cadeias e a abertura da malha polimérica, o que favorece a liberação do fármaco (OLIVEIRA et al., 2010).

Para as amostras contendo maiores proporções de HP, um elevado grau de complexação entre os polímeros pode ter sido alcançado, o que permitiu um maior aprisionamento do fármaco na matriz. Além disso, uma matriz mais elástica pode ter sido formada após o intumescimento, a qual contribuiu para o controle das taxas de liberação do fármaco. Desta forma, maiores concentrações deste polímero nas DSs proporcionaram menores taxas de liberação do fármaco no período de 120 minutos.

5.4.2 Dissolução “in vitro” do fármaco a partir das nanopartículas poliméricas

O perfil de liberação *in vitro* do AZTem NPs, em pH 1,2, está apresentado na Figura 10.

Figura 10 – Perfil de liberação *in vitro* do AZT em NPs (pH 1,2)



As maiores taxas de liberação foram observadas para as NPs 4 e 5, que atingiram 75% e 72%, respectivamente, ao final dos 120 minutos de ensaio. A NP 5,5 apresentou o maior controle das taxas de liberação do fármaco em meio ácido, quando comparada à NPs 4, liberando 65% do AZT em 120 minutos. Desta forma, a incorporação de um polímero com propriedade pH responsivo, o HP, ao sistema de liberação diminuiu as taxas de liberação do AZT em meio ácido.

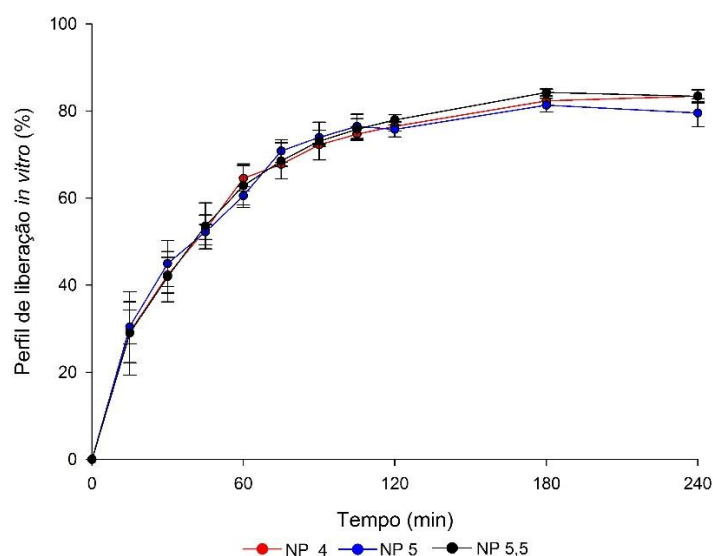
Considerando a solubilidade do AZT e da QS em meio ácido, a total liberação do fármaco para o meio pode ser prevenida pela complexação com o HP, que é insolúvel em pH abaixo de 5,5, na estrutura polimérica (MAKHLOF *et al.*, 2011). Uma vez que cerca de 40% do fármaco já estava em solução (Tabela 7), o HP foi capaz de controlar a liberação.

A Figura 11 apresenta o perfil de liberação *in vitro* do AZT em NPs, em pH 7,4. A porcentagem de AZT liberada das NPs com diferentes proporções de HP não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), o que demonstra que o aumento da proporção de HP nas formulações não influenciou na liberação do fármaco neste pH.

As taxas de liberação foram crescentes até 120 minutos, atingindo cerca de 75% de AZT no meio. Entretanto, após 120 minutos de ensaio, observou-se uma pequena variação da

porcentagem de AZT liberada até ao final do ensaio, alcançando em torno de 85% ao final dos 720 minutos de ensaio.

Figura 11 – Perfil de liberação *in vitro* do AZT em NPs (pH 7,4).



A variação da proporção do HP nas NPs não influenciou no perfil de liberação do fármaco em pH 7,4 ($p > 0,05$). A complexação da QS com o HP prolongou a liberação do AZT das NPs por até 4 horas.

A característica hidrofílica dos polímeros associada à estrutura de gel formada no sistema de liberação após a entrada de água permitiu saída gradual de fármaco do sistema de liberação, sendo a velocidade de liberação do fármaco nesta estrutura geleificada menor, levando a uma liberação mais lenta (PREZOTTI, 2013).

5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO

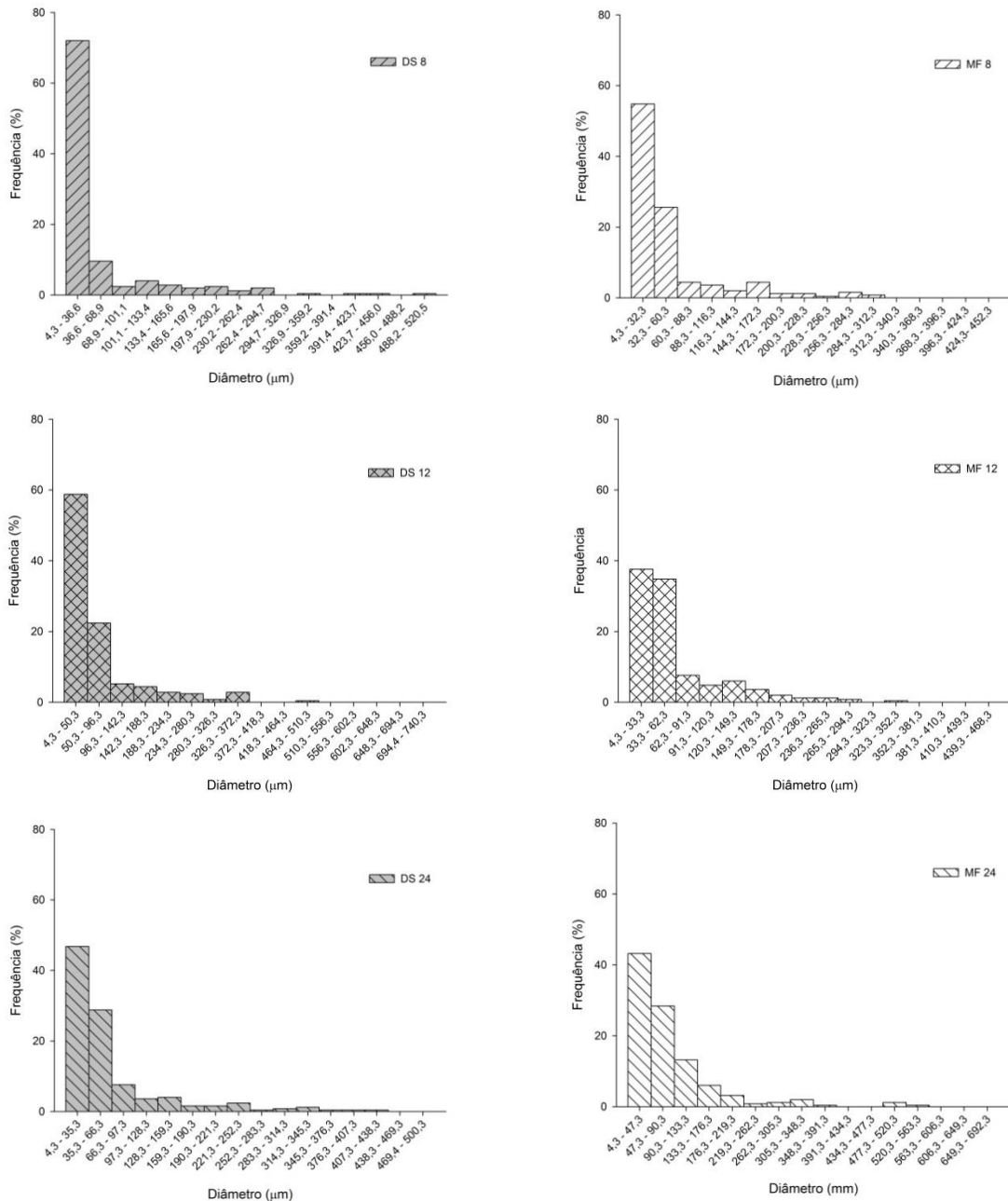
5.5.1 Análise granulométrica das dispersões sólidas

As dispersões sólidas tendem a formar um material com propriedades e características diferentes, inclusive em relação ao tamanho das partículas, quando comparado aos seus precursores (fármaco e polímero). A análise do tamanho e sua distribuição são importantes uma vez que esses parâmetros afetam a liberação, a absorção e, conseqüentemente, a biodisponibilidade do fármaco (KHAFAGY *et al.*, 2007; PREZOTTI, 2013).

Neste estudo, o tamanho de partículas foi avaliado com base no diâmetro de Feret a 0°, que é determinado a partir da distância média estabelecida entre duas linhas paralelas tangenciais ao perímetro projetado da partícula (PUND *et al.*, 2011).

Os perfis de distribuição de tamanho de partícula para as dispersões sólidas e misturas físicas, para uma população de 250 partículas estão representados na Figura 12.

Figura 12 - Distribuição de tamanho de partícula em intervalo de classes para as dispersões sólidas e misturas físicas.



A distribuição de tamanhos de partículas mostrou que cerca de 80% das partículas possuem um tamanho de até 100 μm , em todas as DSs, e as partículas maiores que atingem tamanhos superiores a 400 μm , em torno de 8%, enquanto as partículas com tamanhos entre 100 e 400 μm representam 12%. Para as DSs, a distribuição estreita de tamanho demonstra a homogeneidade das partículas.

Para as MFs, cerca de 90% das partículas possuem tamanho de até 200 μm , atingindo tamanhos de até 500 μm na MF 24 (em torno de 5%).

A partir dos dados de distribuição granulométrica, os resultados de diâmetro médio das dispersões sólidas, misturas físicas, fármaco e polímeros estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Diâmetro médio das dispersões sólidas, misturas físicas, fármaco e polímeros.

Amostras	Diâmetro médio das partículas (μm) ($\pm\text{DP}$)
DS 8	56 (± 78)
MF 8	51 (± 53)
DS 12	64 (± 71)
MF 12	62 (± 58)
DS 24	72 (± 73)
MF 24	83 (± 86)
AZT	32 (± 35)
QS	56 (± 77)
HP	116 (± 68)

As partículas do fármaco possuem o menor diâmetro médio (31,95 μm), enquanto o HP tem as partículas de maior diâmetro médio (116,00 μm) em relação às outras amostras avaliadas. As dispersões sólidas apresentaram diâmetro médio de partículas variando de 56 a 72 μm , sendo as maiores partículas correspondentes à DS 24, que é constituída por maiores proporções de HP. Assim, a presença e o tamanho da cadeia polimérica do HP podem ter influenciado na formação de uma estrutura mais rígida, não sendo possível obter partículas de menor tamanho durante o processo de moagem.

5.5.2 *Análise granulométrica e índice de polidispersão das nanopartículas poliméricas*

O tamanho de partícula e o índice de polidispersão são características físico-químicas importantes para predizer a estabilidade dos sistemas nanoparticulados. O conjunto de informações fornecidas pela caracterização desses sistemas pode conduzir a modelos descritivos da organização das nanopartículas em nível molecular, que será dependente da composição quali-quantitativa das formulações e do método de preparação empregado (GUTERRES *et al.*, 2007).

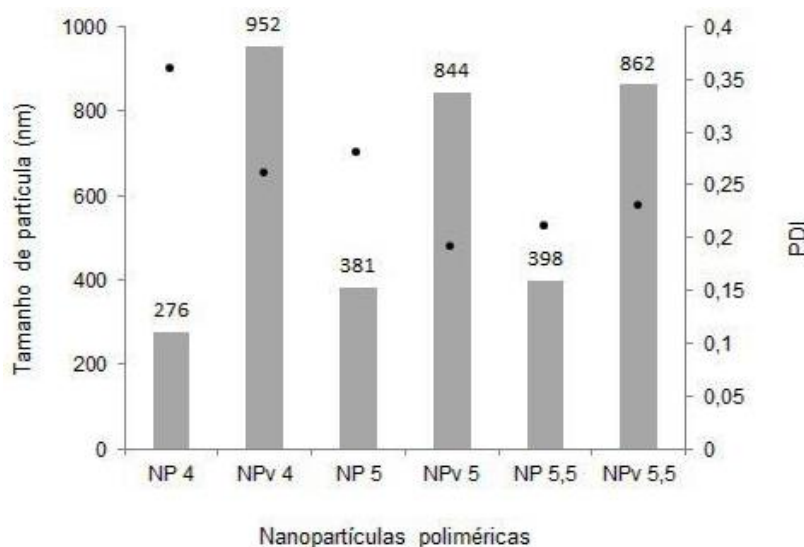
O espalhamento de luz dinâmico realiza a medida do movimento browniano das partículas em suspensão, obtendo uma correlação com o seu tamanho. Uma distribuição

monomodal em uma faixa de tamanho estreita é ideal para garantir a estabilidade (WU *et al.*, 2011).

Geralmente, os fatores que determinam o tamanho são a concentração de polieletrólitos e o grau de complexação, sendo este dependente do pH do meio e do grau de ionização dos polieletrólitos. Partículas menores e mais compactas são resultado de um maior entrelaçamento das cadeias dos polieletrólitos, causado por uma maior interação eletrostática (AVADI *et al.*, 2010).

O tamanho médio das nanopartículas poliméricas e o índice de polidispersão estão apresentados na Figura 13. Os menores tamanhos de partículas foram observados para a NP 4 (276 nm) enquanto que os tamanhos da NP 5 e 5,5 (381 e 398 nm, respectivamente) não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre si. As partículas obtidas estão na escala nanométrica e, comparando-se com as dispersões sólidas, as reduzidas concentrações poliméricas favoreceram a formação de complexos de tamanho reduzido. Na ausência do fármaco, as nanopartículas poliméricas apresentaram um tamanho significativamente maior do que as mesmas amostras com o AZT ($p < 0,05$). A presença do fármaco favoreceu a diminuição do tamanho das partículas. Possivelmente, o fármaco promoveu a interação eletrostática entre os grupamentos ionizáveis dos polímeros, promovendo um rearranjo das cadeias poliméricas, que resultou na redução do tamanho de partícula.

Figura 13 – Diâmetro médio (nm) (barras) e índice de polidispersão (pontos) das nanopartículas poliméricas com fármaco (NP) e sem fármaco (NPv).



A polidispersão é um parâmetro calculado a partir da correlação entre as medidas do tamanho da partícula, e é expressa como índice de polidispersão (PDI), que representa a variância relativa entre as medidas (AVADI *et al.*, 2010).

O índice de polidispersão (PDI) indica a quantidade de partículas que estão fora do intervalo de valor definido no equipamento, sendo por isso considerado uma medida da homogeneidade do tamanho das partículas analisadas. Amostras com PDI de até 0,5 apresentam homogeneidade no tamanho de suas partículas (AVADI *et al.*, 2010). Quando o PDI é menor que 0,1 os sistemas podem ser considerados como monodispersos (GAUMET *et al.*, 2008).

Os valores de PDI (0,2 a 0,35) indicam que as nanopartículas poliméricas são polidispersas, no entanto, apresentam homogeneidade de tamanho, o que contribui para a estabilidade física.

5.5.3 Avaliação do potencial zeta das partículas

O potencial zeta é influenciado por mudanças na interface com a fase contínua da partícula, pela dissociação de grupos funcionais na superfície ou pelo encapsulamento de substâncias passíveis de ionização. Partículas com alto potencial zeta e mesmo sinal, seja positivo ou negativo, irão se repelir. Partículas pequenas, com baixa densidade de carga e alto potencial zeta indicam uma estabilidade potencial do sistema coloidal, isto é, uma menor tendência à agregação (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003b).

O potencial zeta de sistemas coloidais é influenciado principalmente pela natureza química do polímero, do tensoativo, do pH do meio e da concentração dos componentes da formulação, inclusive do princípio ativo (TEIXEIRA *et al.*, 2005).

Os grupamentos amina e carboxila, da QS e do HP, respectivamente, controlam a carga das partículas por ionização, resultando em NH_3^+ e COO^- , o que depende do pH do sistema em que as micro/nanopartículas se encontram.

Os resultados obtidos em relação ao potencial zeta das amostras estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Potencial zeta (mV) das DSs e NPs.

Amostra	Potencial zeta (mV) (\pm DP)
DS 8	-27 (\pm 1)
DS 12	-30 (\pm 2)
DS 24	-32 (\pm 1) \pm
NP 4	+23 (\pm 0,9)
NP 5	+22 (\pm 2)
NP 5,5	+20 (\pm 0,6)

Os polieletrólitos tendem a aumentar o valor de potencial zeta, enquanto polímeros não iônicos reduzem. Valores elevados, em módulo, de potencial zeta indicam formulações mais estáveis fisicamente, pois a repulsão entre as partículas previne a agregação (PARVEEN *et al.*, 2010). Desta forma, tanto as DSs quanto as NPs devem apresentar estabilidade física adequada, sem agregação das partículas.

Para o desenvolvimento das DSs e NPs, HP e QS, respectivamente, foram utilizados em maiores quantidades. Consequentemente, as DSs apresentam potencial zeta negativo e as NPs apresentaram potencial zeta positivo, provenientes dos grupos carboxilas e amino residuais, respectivamente, não neutralizados (PARVEEN *et al.*, 2010).

A elevada massa molecular do HP resulta em maiores número de sítios carregados negativamente, o que é determinante para a incorporação do fármaco (YU *et al.*, 2009).

Também foi avaliado o potencial zeta das nanopartículas poliméricas sem fármaco e os resultados são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Potencial zeta das nanopartículas poliméricas vazias.

Amostra	Potencial zeta (mV) (\pm DP)
NPv 4	+25 (\pm 0,6)
NPv 5	+22 (\pm 2)
NPv 5,5	+22 (\pm 2)

As nanopartículas poliméricas vazias não apresentaram potencial zeta significativamente diferente ($p > 0,05$) daquelas contendo o fármaco. Entretanto, se considerarmos o ponto isoelétrico de 3,51 do AZT, então, em pH 5,5 a molécula do fármaco estaria carregada negativamente, possibilitando também a interação de seus grupamentos com os da QS. Porém, mesmo que esteja em maior proporção que o HP, a massa molar do AZT é bem menor do que a massa molar dos polímeros e, por isso, pode não ter influenciado no potencial zeta das partículas.

5.5.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial é uma das principais técnicas utilizadas para a avaliação de um fluxo de calor resultante de alteração química ou física de uma substância em função da temperatura ou tempo e energia associada com uma série de eventos térmicos incluindo fusão, cristalização, transição vítrea e reações de decomposição (CRAIG, 2002).

Ao longo dos anos, as melhorias na técnica resultaram em instrumentos de alta sensibilidade, que também fazem da técnica DSC uma ferramenta muito relevante na investigação de propriedades termodinâmicas de biopolímeros, proteínas, peptídeos e sistemas de liberação de fármacos (CHIU, PRENNER, 2011). Além disto, é utilizada para definir o estado físico de fármacos e polímeros, bem como avaliar a possibilidade de interações entre o fármaco e a matriz polimérica (SARMENTO *et al.*, 2006).

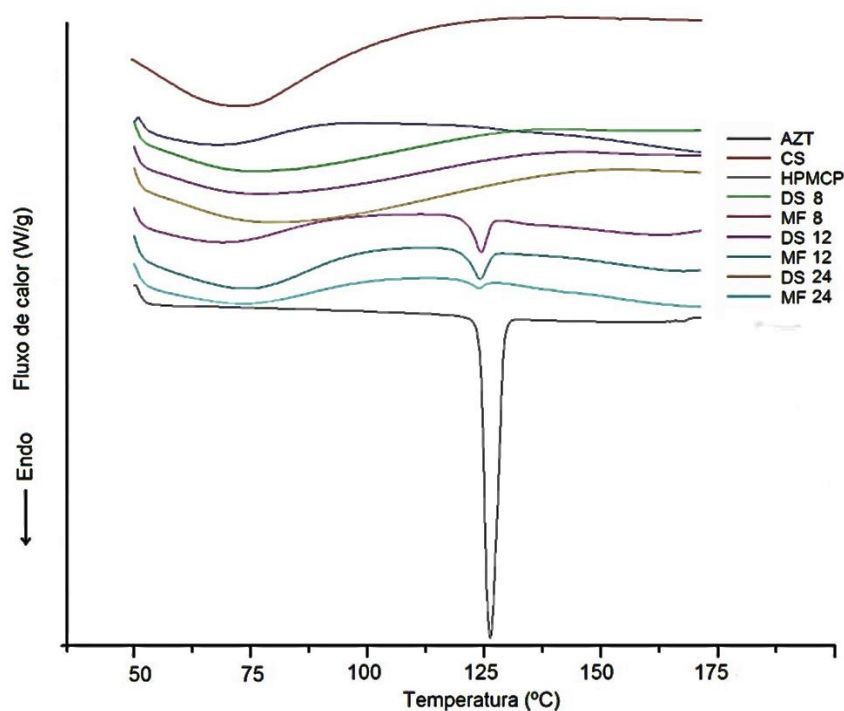
As curvas de DSC obtidas para o AZT, polímeros, DSs e MFs estão demonstradas na Figura 14. Na curva do AZT está presente um pico endotérmico em 126,7°C relacionado ao ponto de fusão do fármaco (MARU *et al.*, 2011), enquanto que a curva do HP exibiu um amplo

pico endotérmico devido à perda de água na região de 50° a 75° (WANG *et al.*, 2005). A QS apresentou um pico endotérmico largo próximo a 60°C, atribuído a evaporação de água ligada por ligações hidrogênio com grupos hidroxila da quitosana característico da cristalinidade do polímero (LI *et al.*, 2009).

Em todas as curvas de DSC apresentadas na Figura 14, o evento endotérmico na região próxima a 60°C pode ser atribuído à perda de água, devido à característica hidrofílica do material (GUINESI, CAVALHEIRO, 2006), sendo que este foi mais pronunciado na QS correspondendo à desidratação do cristal (SARMENTO *et al.*, 2006).

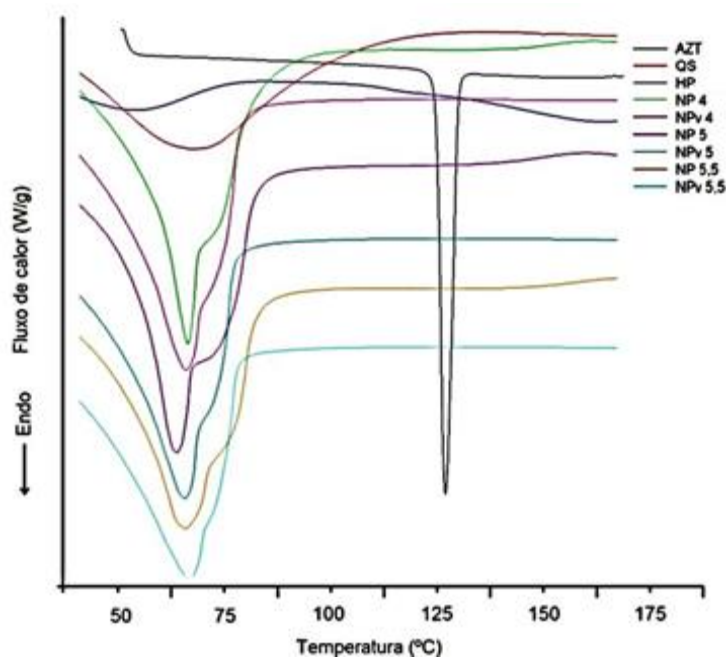
A ausência de picos endotérmicos característicos do fármaco nas curvas de DSC das DSs evidencia a predominância da forma amorfa do AZT, uma vez que a ocorrência destes picos está relacionada a uma quantidade significativa do fármaco no seu estado cristalino. Além disso, esta ausência tem sido atribuída à formação de uma solução sólida do fármaco dentro da matriz polimérica (SIPOS *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2013). As curvas de DSC das MFs revelam o pico do fármaco de acordo com sua proporção presente nas amostras, em relação aos polímeros, indicando a presença do fármaco no estado cristalino.

Figura 14 – Curvas de DSC obtidas para o fármaco, polímeros, DSs e MFs.



A Figura 15 apresenta as curvas de DSC obtidas para as NPs e NPvs. Observou-se a predominância do estado amorfo do AZT nas NPs, uma vez que o pico de fusão do fármaco não foi evidenciado nestas amostras. Tanto nas DSs quanto nas NPs, possivelmente, o AZT encontra-se molecularmente disperso na matriz polimérica.

Figura 15 - Curvas de DSC obtidas para o fármaco, polímeros, NPs e NPvs.



As NPs e NPvs apresentam dois eventos endotérmicos na região entre 60 e 75°C, sendo que o pico mais próximo de 75°C fica menos evidente à medida que a proporção de HP aumenta nas NPs. Pode-se então sugerir que o aumento da concentração de HP nas amostras promoveu uma fusão entre os picos.

A interação entre os polímeros QS e HP possivelmente favoreceu a formação de um novo material. Os picos endotérmicos dos novos materiais formados aparecem na mesma região dos polímeros isolados e parecem ser uma combinação de ambos, mas são diferentes provavelmente devido à complexação promover a formação de uma estrutura com diferentes ligações químicas (SARMENTO *et al.*, 2006).

Tabela 12 - Valores de entalpia das amostras analisadas por DSC.

Amostra (mg)	T _{peak} (°C)	T _{onset} (°C)	ΔH (J/g) esperado	ΔH (J/g) verificado
AZT	126,7	123,9	-	115
QS	67,07	25,66	-	265
DS 8	-	-	-	-
DS 12	-	-	-	-
DS 24	-	-	-	-
MF 8	123,83	119,79	12,19	11,41
MF 12	123,47	118,82	9,55	8,51
MF 24	123,08	118,26	4,6	2,64
NP 4	65,08	50,77	788,5	932,44
NP 5	61,78	49,26	760	792,18
NP 5,5	64,51	46,94	741	851,91
NPv 4	64,61	44,50	278,25	877,82
NPv 5	64,32	43,07	265	769,30
NPv 5,5	65,65	38,51	258,38	806,90

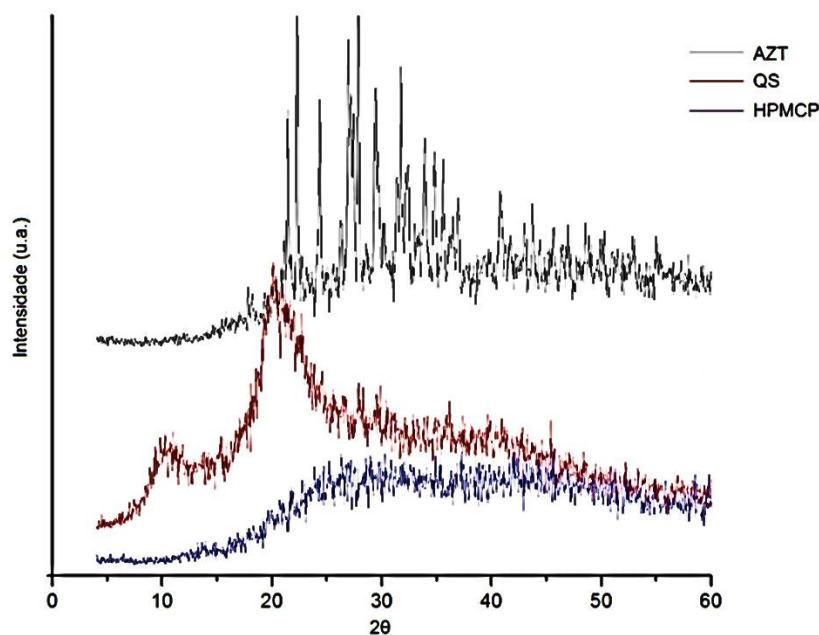
Os valores de entalpia apresentados na Tabela 12 demonstram a formação de distintos materiais nas DSs e NPs. As DSs não apresentaram valores para o ΔH (J/g) verificado, indicando a estrutura amorfa dos sistemas. Já as NPs apresentaram valores elevados para o ΔH (J/g) verificado, indicando uma forte interação na estrutura do sistema, característico de material cristalino.

5.5.5 Difractometria de raios X

A difratometria de raios X é uma técnica não destrutiva que revela informações detalhadas sobre a estrutura cristalográfica de materiais. A técnica consiste na projeção de um feixe de raios X monocromático sobre um material cristalino em um ângulo teta. Para que a difração ocorra é necessária uma diferença entre o caminho percorrido pelo raio X e o comprimento de onda da radiação incidente. Pela variação do ângulo teta, as posições angulares e intensidades dos picos difratados resultantes da radiação produzem um padrão, que é característico da amostra (JENKINS, SNYDER, 2012).

As análises de difração de raios X foram realizadas com o objetivo de avaliar o estado físico do fármaco nas dispersões sólidas e nanopartículas poliméricas bem como a cristalinidade dos materiais. A Figura 16 mostra a difratometria de raios X para o AZT e os polímeros livres.

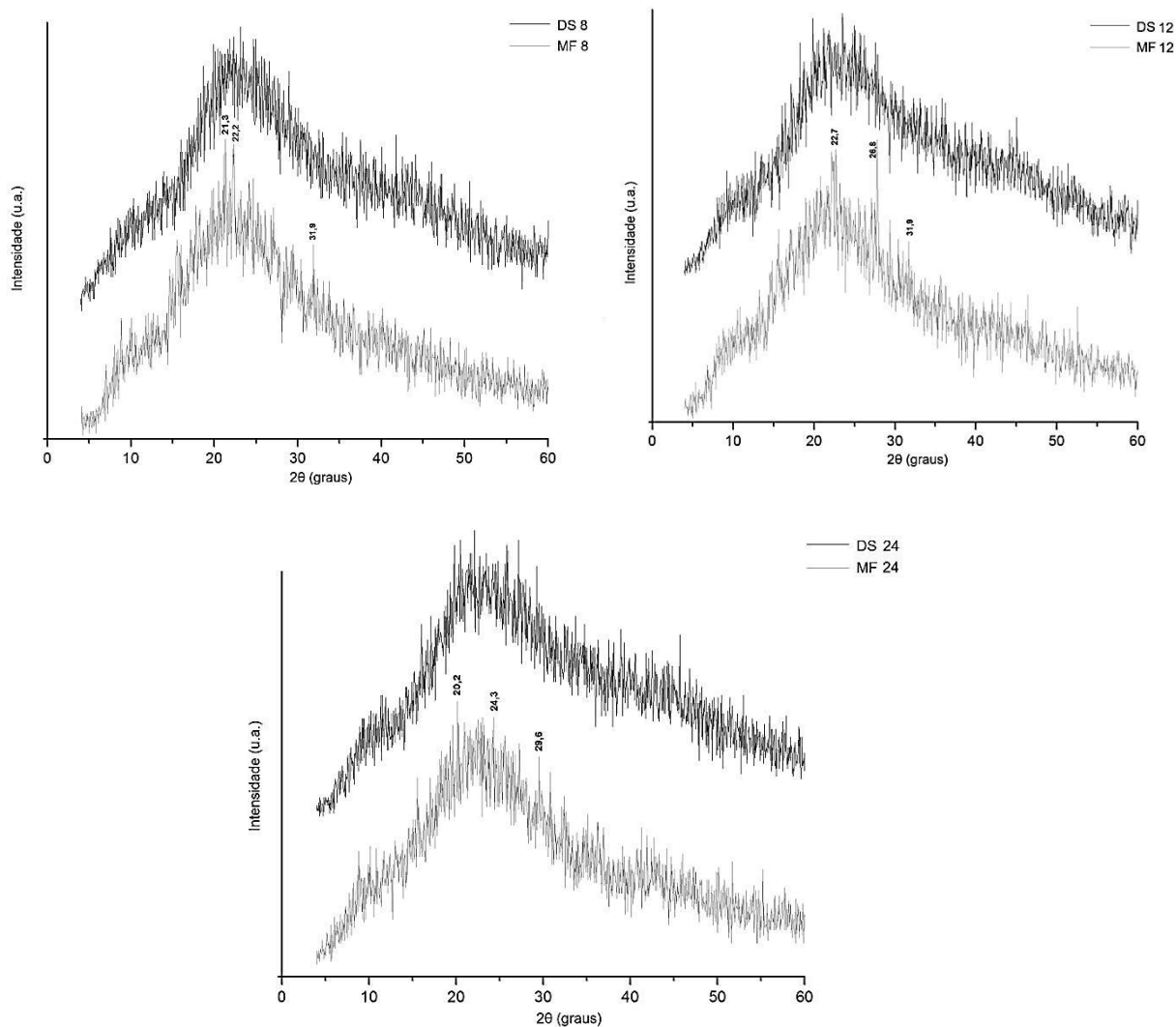
Figura 16 - Difractometria de raios X do fármaco e polímeros.



O fármaco apresentou em seu difratograma uma série de picos característicos de cristalinidade em aproximadamente 21°, 22°, 24°, 26°, 30° e 32° (2θ) (MUNDARGI *et al.*, 2011). Para a QS foram observados dois picos, em torno de 10° e 20° (2θ), relacionados aos cristais anidros (LI *et al.*, 2009). O HP não exibiu picos de cristalinidade em seu difratograma, já que é um polímero predominantemente amorfo (WANG *et al.*, 2005).

Nos difratogramas correspondentes às DSs e MFs (Figura 17) foi notada a similaridade com o difratograma da QS, com os picos característicos em 10° e 20° (2θ), mas com reduzida intensidade devido à associação com o HP. O mesmo comportamento foi verificado por BHUMKAR, POKHARKAR (2006), em reticulação da QS com TPP. No entanto, não foram observados picos de cristalinidade correspondentes ao fármaco, o que sugere sua dispersão na forma molecular na matriz polimérica. Estes resultados estão de acordo com as curvas de DSC destas amostras, (Figura 14), indicando a ausência de cristalinidade do AZT nas dispersões sólidas (CHEN *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2006). Os difratogramas das MFs apresentaram alguns picos de cristalinidade relacionados ao fármaco, porém de baixa intensidade, o que pode estar relacionado ao efeito de diluição.

Figura 17 – Difratometria de raios X das DSs e MFs.

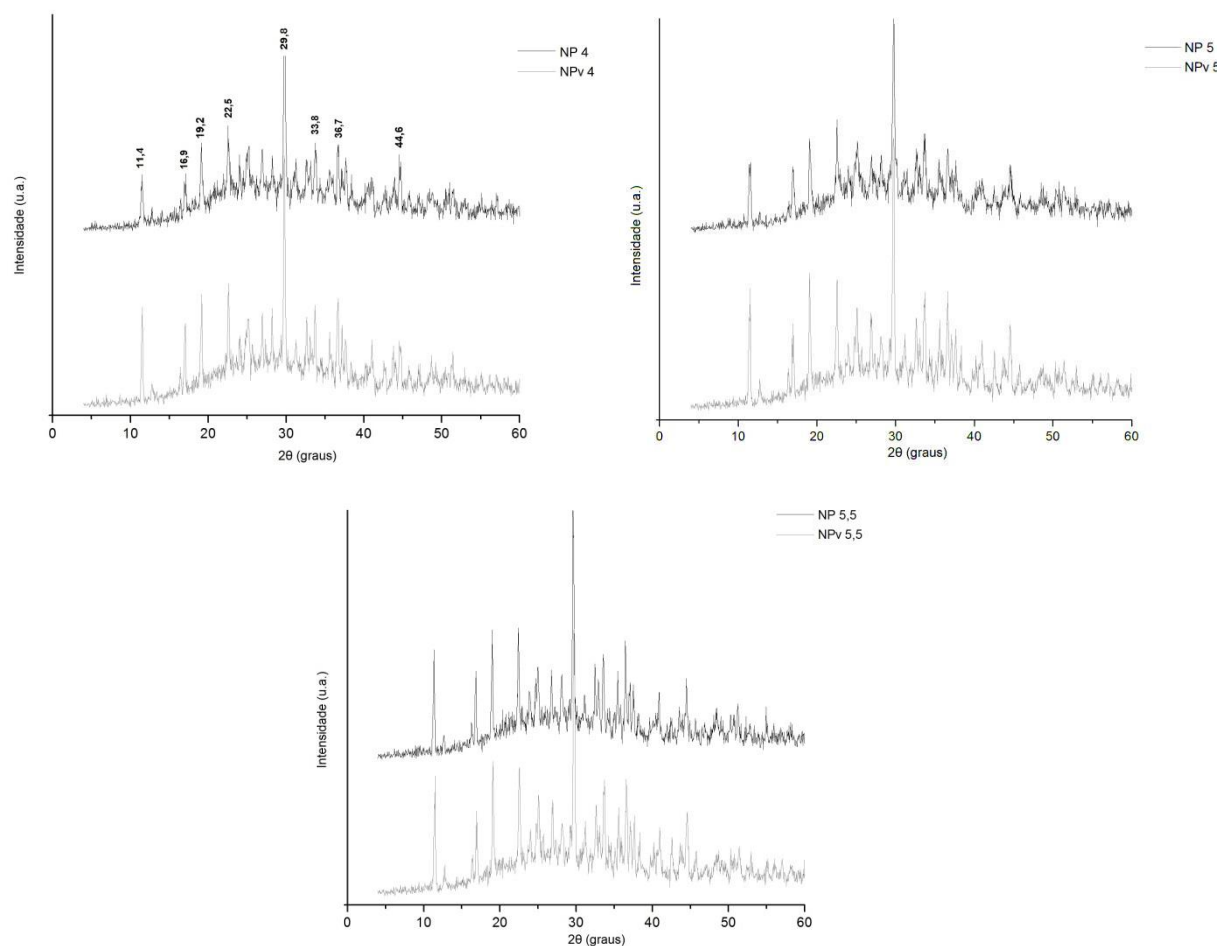


A difratometria de raios X das NPs e NPvs estão demonstradas na Figura 18. Tanto nas NPs quanto nas NPvs, houve o aparecimento de novos picos de cristalinidade nas mesmas regiões de 2θ (Figura 18), indicando que para as NPs, a complexação levou a formação de estruturas mais cristalinas em relação às DSs.

Além disto, foram notados aumentos da intensidade dos picos das NPvs em relação às respectivas NPs. O aumento da proporção de HP nas amostras sem fármaco resultou em um aumento gradual da intensidade dos picos das NPs e isto pode ser devido ao aumento, concomitante, dos grupamentos hidroxilas deste polímero, disponíveis para a interação com os grupamentos amins da QS. Esta reação de complexação possivelmente causou um rearranjo estrutural que favoreceu a cristalinidade (PU *et al.*, 2011).

Em trabalho em que foi avaliada a formação de complexos entre quitosana/alginato e quitosana- alginato/hidroxiapatita, HAN *et al.* (2010), verificaram um comportamento oposto, já que o aumento da concentração de alginato favoreceu a diminuição da intensidade dos picos de cristalinidade.

Figura 18 – Difratomia de raios X das NPs e NPvs.



5.5.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) fornece informações sobre os grupos funcionais característicos de um composto químico, tanto da estrutura quanto do ambiente molecular. Nesta técnica, a amostra é irradiada com radiação infravermelha e a absorção desta radiação estimula os movimentos vibracionais da molécula. Assim, a molécula absorve apenas em frequências correspondentes aos modos de vibração molecular na região do

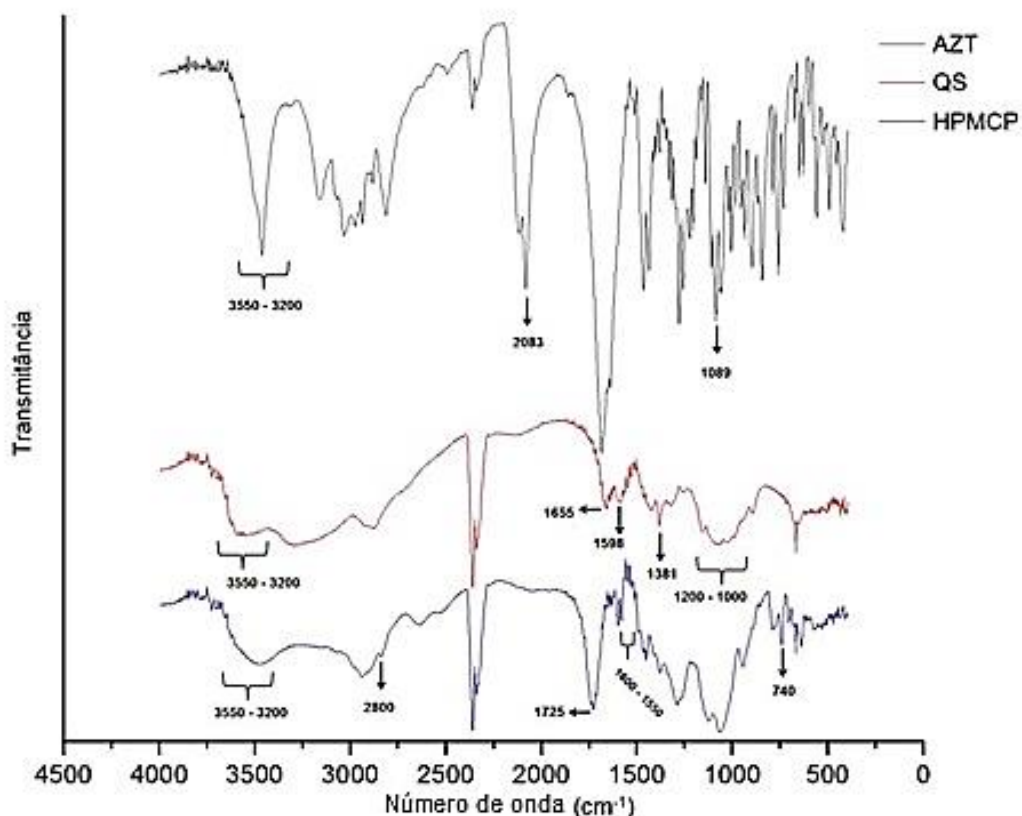
espectro eletromagnético. Estas alterações nos movimentos vibracionais dão origem às bandas no espectro vibracional, caracterizadas por sua frequência e amplitude (DUYGU *et al.*, 2009).

Os espectros correspondentes ao AZT, QS e HP estão representados na Figura 19. O espectro de absorção na região do IV do AZT exibiu bandas características, como os relacionados ao estiramento OH ($3550\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$), à ligação C-O de grupos OH (banda em 1089 cm^{-1}) e ao C=N=N=N (grupo azido) (banda em 2083 cm^{-1}) (ARAÚJO *et al.*, 2003).

No espectro da QS, foram observados picos característicos na região de $3550\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ relacionados ao estiramento OH, em 1655 cm^{-1} atribuído à bandas (-CO)NH₂ (amida primária), 1598 cm^{-1} relacionado ao grupamento NH₂ e em 1381 cm^{-1} , bandas de absorção do grupamento (-CO)₂NH (amida secundária) (LI *et al.*, 2013).

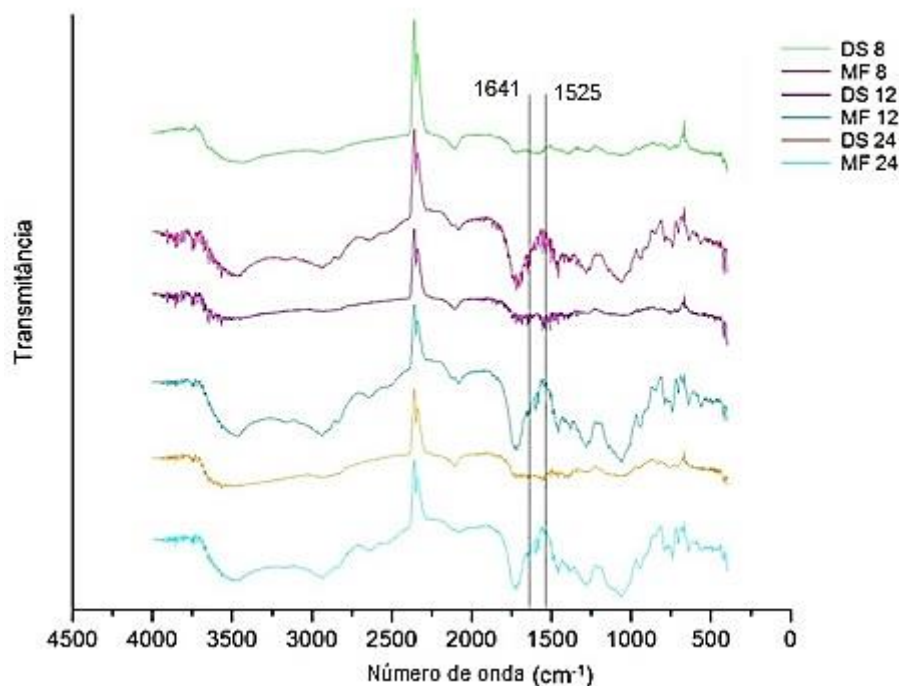
No espectro de absorção na região do IV do HP, as bandas na região entre 3500 e 3200 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento do grupo O-H, em 2800 cm^{-1} à ligação CH (sp³), em 1725 cm^{-1} à ligação C=O do grupo éster, na região de 1600 a 1550 cm^{-1} ao anel aromático, bandas próximas a 1200 cm^{-1} foram atribuídas à ligação C-O de éster, na região de 1200 a 1000 cm^{-1} à ligação C-O de éter e na região de aproximadamente 740 cm^{-1} ao anel aromático monossustituído (WANG *et al.*, 2005).

Figura 19 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho do fármaco e polímeros livres.

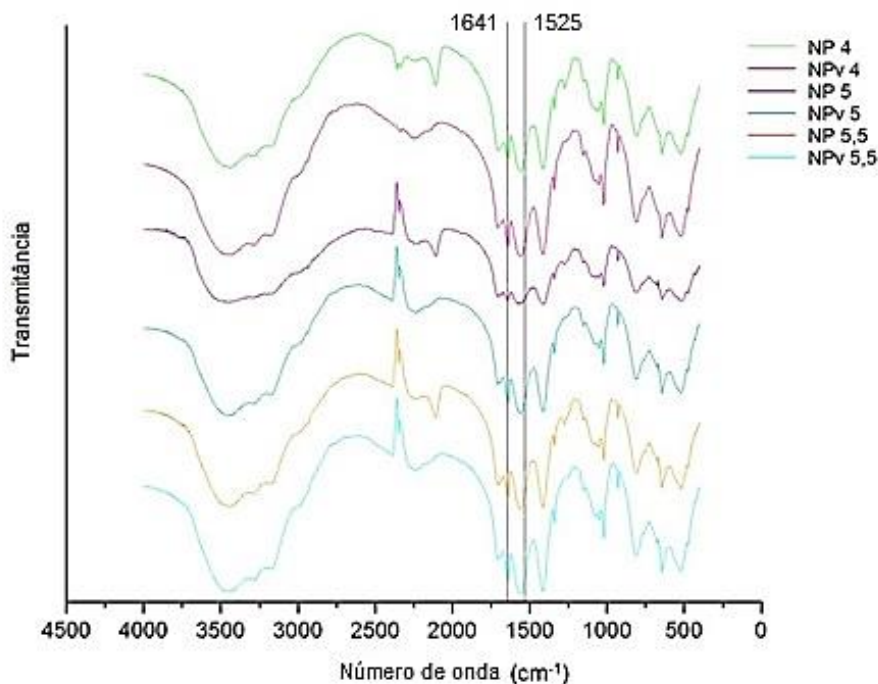


A Figura 20 apresenta os espectros de absorção na região do IV para as DSs e MFs. Foram observadas bandas características do fármaco e dos polímeros nas MFs, indicando que não houve uma interação química entre estas estruturas, comprovada pela presença da banda em 1725 cm^{-1} nas MFs, correspondente ao grupamento carbonila do HP. Já nas DSs, esta banda aparece menos evidente do que nas MFs, sugerindo que houve alguma interação deste grupamento. Nas regiões de 1641 e 1525 cm^{-1} , foram observadas alterações nas bandas de absorção em relação aos polímeros livres, sugerindo que houve interação química entre os grupamentos da QS e do HP (CHEN *et al.*, 2006).

Figura 20 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho das DSs e MFs.



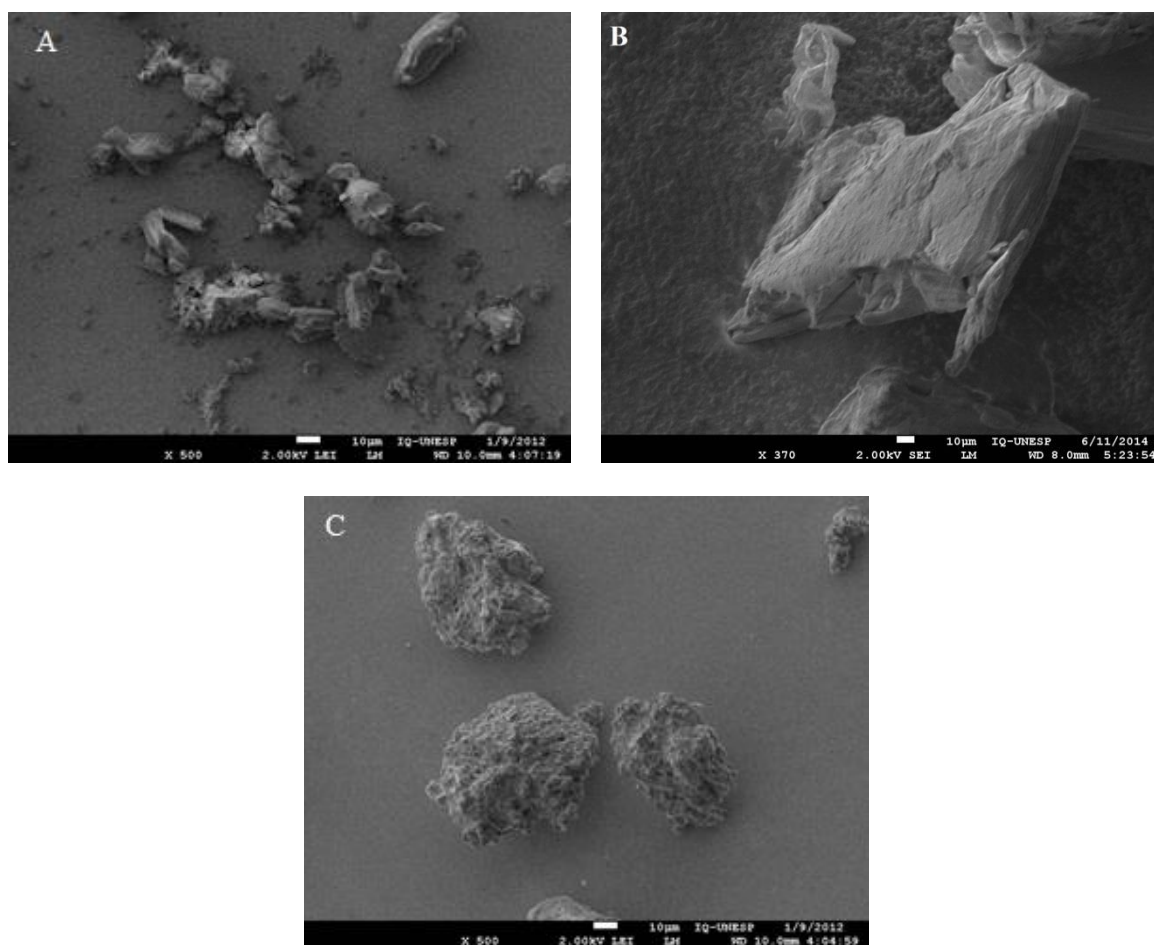
Da mesma forma, alterações nas bandas de absorção nestes números de onda (1641 e 1525 cm⁻¹) foram evidenciadas nos espectros de absorção na região do IV relacionados às NPs e NPvs (Figura 21). Em formação de complexos polieletrólíticos entre QS e HP, ocorrem interações entre os grupamentos da QS ((-CO)NH₂ e NH₂) com os grupamentos carbonila do HP, ocasionando no deslocamento das bandas da QS (1655 e 1598 cm⁻¹). O aparecimento de uma banda de absorção na região de 1525 cm⁻¹ é um indicativo de que houve a formação de complexo polieletrólítico devido à formação de NH₃ (ROSCA *et al.*, 2011). Na região de 1725 cm⁻¹ não se observou variação com o aumento da proporção de HP, o que sugere que todo o HP foi ligado à QS, possivelmente, em função da relação de grupos aminas disponíveis na QS quitosana e de grupos hidroxila do HP (COSTA JR., MANSUR, 2008).

Figura 21 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho das NPs e NPvs.

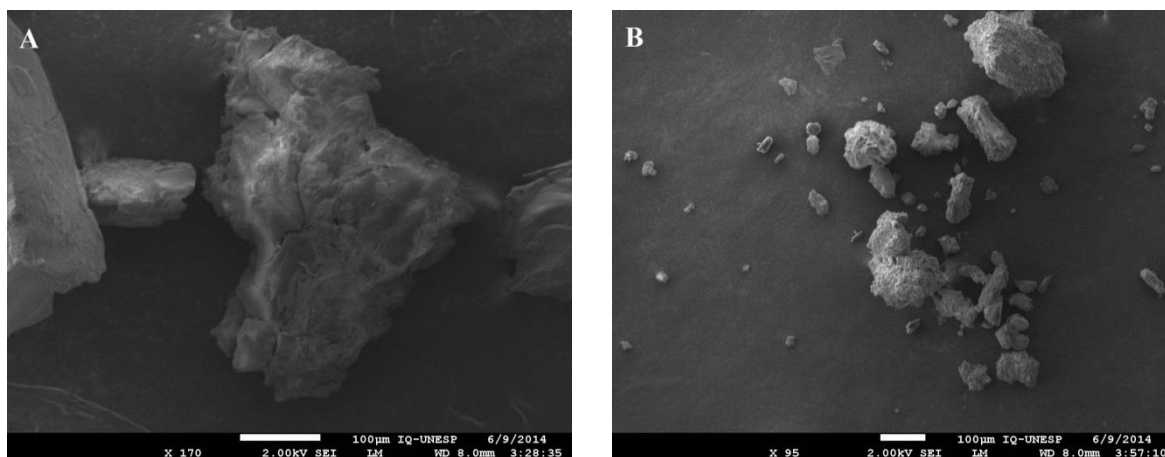
5.5.7 Microscopia eletrônica de varredura

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma das mais versáteis para a análise de características de materiais sólidos. A principal razão de seu uso é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas. Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem, resultado direto da grande profundidade de campo (DEDAVID *et al.*, 2007).

Para avaliar as características de superfície e forma do fármaco e polímeros livres, a técnica de microscopia eletrônica de varredura foi aplicada, sendo as fotomicrografias das amostras apresentadas na Figura 22.

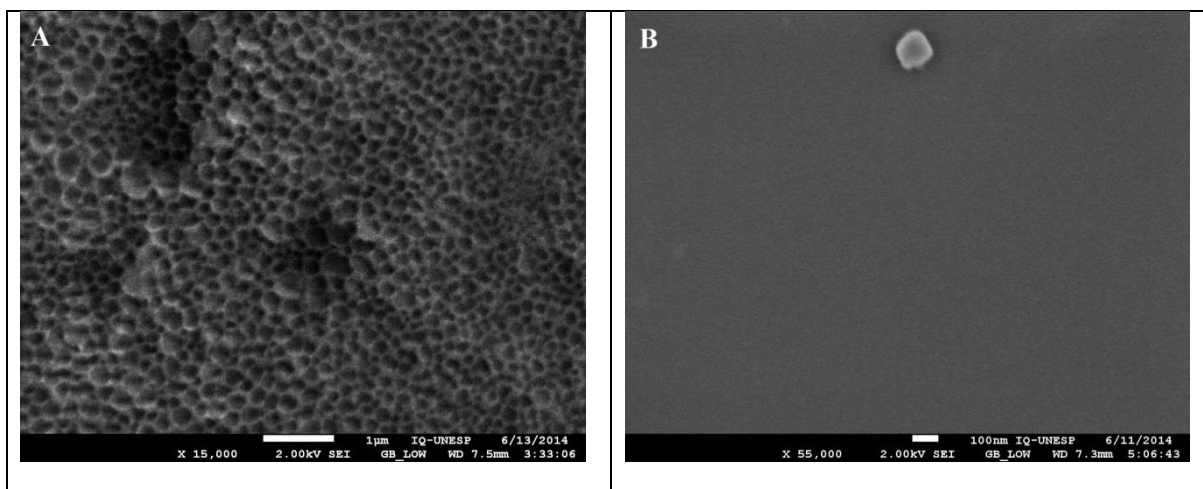
Figura 22 – Fotomicrografias do AZT (A), QS (B) e HP (C).

As partículas de AZT (A) apresentaram forma e tamanho mais irregulares e superfície lisa, com tamanhos bastante distintos, entretanto, menor do que os polímeros livres. As partículas de QS (B) apresentaram forma de flocos irregulares, porém de superfície lisa e com pequenas fissuras. Diferentemente das demais, as partículas de HP (C) possuem forma mais esférica com superfície irregular e presença de poros.

Figura 23 – Fotomicrografias da DS 12 e sua respectiva MF.

Na Figura 23, a fotomicrografia da DS 12 (A) apresenta uma partícula com estrutura compacta e densa, com superfície irregular, não sendo possível diferenciar as partículas dos dois polímeros e do fármaco. Nesta amostra, é possível sugerir que o fármaco está totalmente disperso na matriz polimérica, uma vez que não foi evidenciado seu pico de fusão na curva de DSC. Na fotomicrografia B (MF 12), observaram-se partículas de composição heterogênea, com tamanhos e formas distintas, sendo possivelmente a QS, partículas maiores e arredondadas provavelmente o polímero HP e pequenas partículas dispostas junto às demais, indicando a presença do fármaco em pequena proporção. A capacidade de diferenciação entre as partículas pode sugerir que não houve interação entre as substâncias após o procedimento de preparo das MFs, conforme demonstrado pela presença do pico de fusão do fármaco apresentado no DSC desta amostra.

A morfologia das nanopartículas poliméricas, carregadas e vazias, está demonstrada na Figura 24. Tanto nas fotomicrografias apresentadas em A quanto em B, observaram-se partículas de tamanho na escala nanométrica, regulares, arredondadas e de superfície lisa. Nesta magnificação (x 55.000), não foi possível observar se a presença do fármaco influenciou na morfologia da NP, quando comparado com a partícula vazia.

Figura 24 – Fotomicrografia da NP 5,5 e da NPv 4.

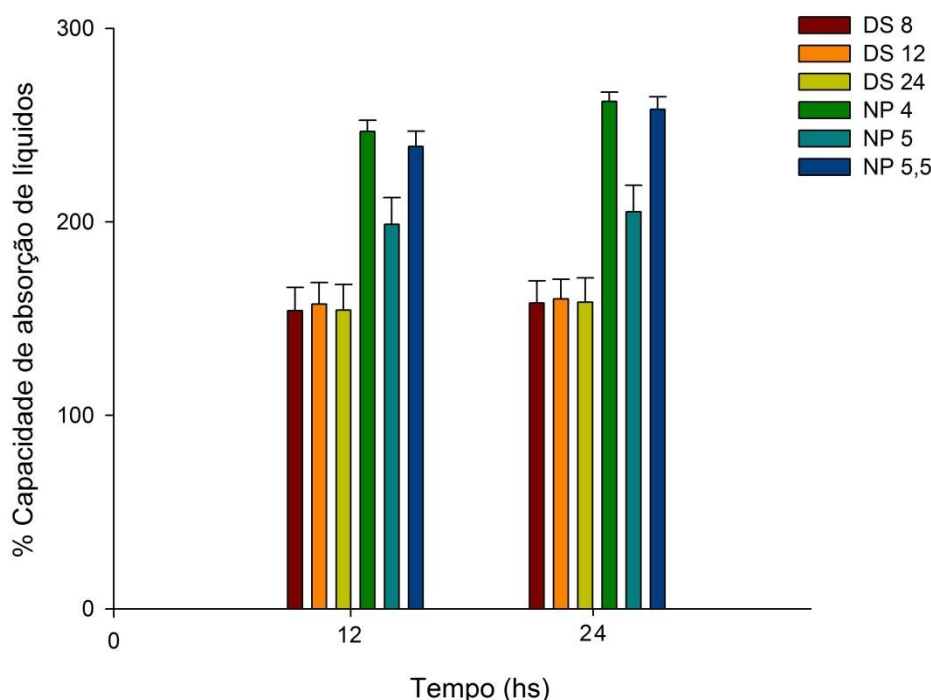
De acordo com as fotomicrografias apresentadas, é possível inferir que as dispersões sólidas e as nanopartículas poliméricas possuem características e morfologia diferentes do fármaco e dos polímeros isolados, além de possuírem características distintas entre si. Assim, os procedimentos de co-precipitação e complexação polieletrólítica foram eficientes para obtenção dos sistemas de liberação micro e nanoparticulados, comprovando ser possível obter materiais completamente diferentes a partir das mesmas matérias primas, mas alterando a concentração das substâncias e utilizando diferentes métodos de preparo.

5.5.8 Determinação da capacidade de absorção de líquidos

O desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos é dependente da escolha adequada de carreadores, capazes de controlar a liberação do fármaco da matriz para o meio. Polímeros com propriedades intumescíveis são carreadores promissores, pois respondem à presença de água ou fluídos biológicos, que mudam a estrutura do polímero modificando o perfil de liberação do fármaco (COLOMBO *et al.*, 2000).

Para um polímero com propriedades mucoadesivas, a hidratação é necessária para o relaxamento das cadeias e expansão das malha polimérica, de modo a facilitar o processo de interpenetração de cadeias entre o polímero e a mucina. No entanto, para que a mucoadesão ocorra, é necessário que exista o intumescimento (MILLER-CHOU, KOENIG, 2003).

Os dados da capacidade de absorção de líquidos das DSs e NPs está apresentada na Figura 25.

Figura 25 – Capacidade de absorção de líquidos (%) das DSs e NPs em água.

De acordo com os resultados, as DSs absorveram uma porcentagem de líquido significativamente menor que as NPs ($p < 0,05$). Entre as DSs não houve diferença significativa ($p > 0,05$), enquanto a NP4 e a NP 5,5 apresentaram valores de absorção significativamente maiores que a NP 5 ($p < 0,05$).

O tamanho de partícula pode ter influenciado na maior capacidade de absorção de líquido, uma vez que essas características aumentam a superfície de contato do material, aumentando a captação de água. Além disso, o processo de liofilização, ao qual as NPs foram submetidas, deve ter permitido a formação de poros na matriz polimérica, favorecendo a absorção de água. Nas DSs, a variação na proporção de HP não favoreceu o aumento da absorção de líquido.

5.6 ESTUDOS DE MUCOADESÃO *IN VITRO*

A biodisponibilidade de um fármaco, quando administrado por via oral, pode ser limitada pelo tempo de trânsito gastrointestinal ou pela metabolização pré-sistêmica do fármaco. O desenvolvimento de sistemas de liberação com propriedades mucoadesivas é uma estratégia utilizada para aumentar a biodisponibilidade de fármacos incorporados em uma matriz

polimérica com propriedades mucoadesivas por prolongar o tempo de residência da forma farmacêutica em um sítio específico para absorção (SURESH *et al.*, 2013).

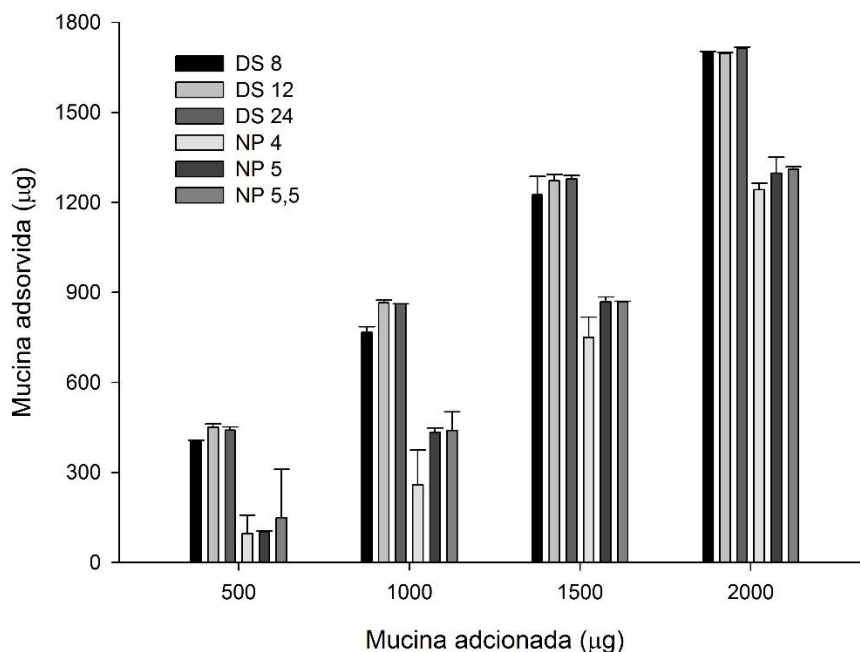
5.6.1 Adsorção de mucina

O muco é uma camada que protege a maioria das superfícies do corpo, especialmente os epitélios, e é constituído, principalmente, por mucina e sais inorgânicos suspensos em água. A mucina é um conjunto de proteínas fortemente glicosiladas, compostas por cadeias de oligossacáridos ligados a um núcleo proteico. O muco é continuamente secretado e renovado; logo, patógenos e fármacos liberados nas superfícies das mucosas devem atravessar as camadas do muco para atingir os epitélios antes de serem eliminados pelo *clearance* (CONE, 2009).

Muitas teorias explicam a interação existente entre mucina e materiais com propriedades adesivas, dentre elas a teoria eletrônica e a teoria de adsorção. De acordo com a teoria eletrônica, a mucoadesão ocorre através da interação entre cargas opostas entre o material e o muco (ANDREWS *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2010). Segundo a teoria de adsorção, o material polimérico mucoadesivo adere ao muco por interações químicas secundárias, como ligações do tipo Van der Waals ou hidrogênio, interações hidrofóbicas ou atração eletrostática. Em polímeros contendo grupamentos carboxilas, as ligações de hidrogênio prevalecem como forças interfaciais. Estas forças têm sido consideradas como as mais importantes no fenômeno de interação, pois, apesar de serem individualmente fracas, um grande número de interações pode ter um efeito sinérgico e resultar em uma intensa adesão (VINOD *et al.*, 2012).

Os resultados da adsorção de mucina pelos sistemas são apresentados na Figura 26. A quantidade de mucina adsorvida pelos sistemas aumentou conforme o aumento da concentração de mucina adicionada. Os valores de adsorção apresentados pelas DSs (405 a 1712 μg) foram significativamente maiores quando comparado com as NPs (61 a 1310 μg) ($p < 0,05$). Para DSs, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) ao avaliar a concentração de polímero de cada amostra e a quantidade de mucina adicionada, demonstrando que o aumento da concentração de HP nas DSs não influenciou a mucoadesão.

Figura 26 - Quantidade de mucina adsorvida pelas DSs e NPs de acordo com as diferentes massas de mucina adicionadas (\pm DP).



Em relação às NPs, o aumento na concentração de HP contribuiu significativamente para o aumento da mucoadesão, já que as NPs 5 e 5,5 apresentaram maiores valores de mucina adsorvida em relação à NP 4 ($p < 0,05$), para as concentrações de mucina acima de 100 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, não houve diferença entre as NPs 5 e 5,5.

Os valores de adsorção de mucina obtidos pelas DSs mostraram-se superiores (cerca de 4x) aos relatados por DHAWAN *et al.* (2004) em um estudo com microesferas de quitosana, material que apresenta reconhecidas propriedades mucoadesivas.

MAKHLOF *et al.* (2011) relataram maior mucoadesividade em nanopartículas de QS-HP em relação à nanopartículas de QS-TPP (tripolifosfato), demonstrando que o HP contribuiu para a propriedade mucoadesiva do sistema.

A mais elevada capacidade de adsorção de mucina pelas DSs pode ser atribuída ao aumento da quantidade de grupos de ácido carboxílico ionizados nesses sistemas, devido à elevada proporção de HP em relação às NPs. Desta forma, a carga negativa deve prevalecer e as ligações de hidrogênio e / ou interações hidrofóbicas, provavelmente, deverão ser responsáveis por essa interação com a mucina. A atração entre o muco e o polímero mucoadesivo via ligações hidrogênio e / ou do tipo van der Waals resulta em forças atrativas

consideravelmente maiores do que as forças descritas pela teoria eletrônica (DA SILVA *et al.*, 2007). As ligações de hidrogênio têm sido consideradas como as mais importantes no fenômeno de interação e prevalecem como forças interfaciais em polímeros contendo grupamentos carboxilas. Apesar de serem individualmente fracas, estas forças interfaciais podem ter um efeito sinérgico e resultarem em uma intensa adesão devido ao grande número de interações (VINOD *et al.*, 2012).

5.6.1.1 Isotermas de adsorção de mucina

Os dados obtidos através da interação da mucina com os sistemas de liberação foram ajustados de acordo com as equações de Freundlich e Langmuir (Tabela 13) e a linearização dos resultados é apresentada nas Figura 27 e Figura 28.

Tabela 13 – Constantes obtidas pela linearização das equações de Freundlich e Langmuir.

Amostra	Isoterma de Freundlich ^a			Isoterma de Langmuir ^b		
	K	1/n	r ²	a	b	r ²
DS 8	1,5783	1,0359	0,8135	-0,0002	0,4769	0,9378
DS 12	6,7266	1,3629	0,9736	0,0076	0,1796	0,9976
DS 24	4,8899	1,1907	0,9643	0,0045	0,2403	0,9950
NP 4	2,8184x10 ⁻⁵	0,3102	0,5635	-0,2996	18,8051	0,9407
NP 5	2,6303x10 ⁻⁷	0,2195	0,9452	-0,2446	17,2382	0,9794
NP 5,5	2,466x10 ⁻⁵	0,2888	0,9709	-0,2642	18,2324	0,9916

$$\log Q_e = \log k + \frac{1}{n} \times \log C_e \quad \mathbf{a}$$

$$\frac{1}{C_e} = a + b \times \frac{1}{C_e} \quad \mathbf{b}$$

De acordo com a Tabela 13, exceto para as amostras DS 8 e NP 4, os valores de r² foram semelhantes para os modelos de Langmuir e de Freundlich.

Considerando que as cargas de superfície das partículas, avaliadas pelo potencial zeta, influenciam no mecanismo de mucoadesão, para as NPs que apresentaram um potencial zeta

positivo (Tabela 10) é provável que o modelo que descreva a interação entre a mucina e as NPs seja o modelo de Langmuir, indicando que ocorra um tipo de interação eletrostática entre adsorbato (mucina) e adsorvente (partículas), em um processo de adsorção mais específico (DA SILVA *et al.*, 2007). Desta forma, a atração eletrostática pode ocorrer entre a carga positiva, relacionada com a QS e a mucina, carregada negativamente devido à ionização de ácido siálico (HE *et al.*, 1998).

O modelo de Langmuir sugere que ocorra uma forte interação entre a superfície (mucina) e o adsorbato (partículas), levando a formação de uma monocamada homogênea de adsorbato sobre o adsorvente (DHAWAN *et al.*, 2004; NG *et al.*, 2002). Já o modelo proposto por Freundlich assume uma distribuição heterogênea do adsorbato sobre a superfície o adsorbente, sendo esta distribuição em multicamadas (NG *et al.*, 2002; PREZOTTI *et al.*, 2014).

Figura 27 – Isotermas de adsorção de Freundlich das DSs e NPs.

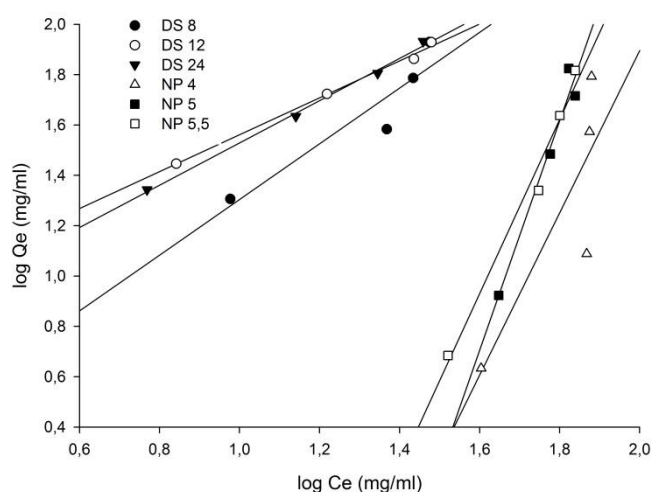
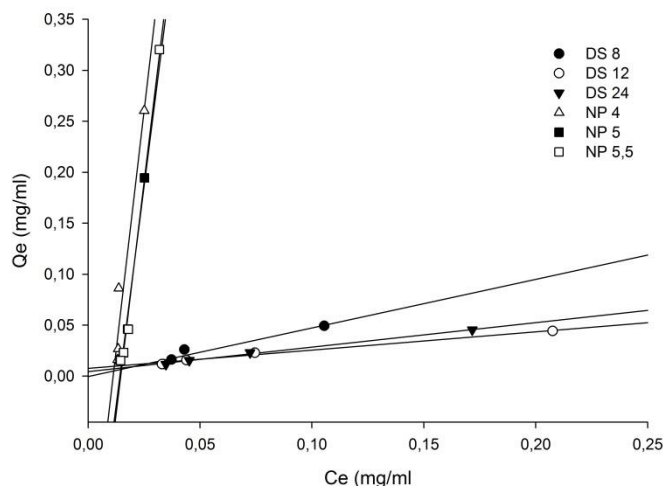


Figura 28 - Isotermas de adsorção de Langmuir das DSs e NPs.



Entretanto, ao considerar a carga negativa da superfície das DSs, é pouco provável que ocorra uma forte interação eletrostática com a mucina, que também apresenta carga negativa. Desta forma, o modelo de Freundlich deve ser o que melhor se correlaciona com o mecanismo de mucoadesão destes sistemas.

Quando a variável $1/n$ assume valores maiores que 1, indica que a interação de cargas é fraca, mas as interações com a mucina via ligações de hidrogênio e /ou interações de Van der Waals são mais fortes. Quando a variável $1/n$ assume valores mais baixos, indica forte interação na adsorção (NG *et al.*, 2002).

Conforme a Tabela 13, valores maiores que 1 para $1/n$ foram observados para as DSs, sendo que para as NPs os valores desta variável foram de até 0,3102. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos no item 4.2.7.1, em que a maior capacidade de adsorção de mucina pelas DSs pode ser atribuída ao aumento da quantidade de grupos de ácido carboxílico ionizados, que interagem com a mucina por interações do tipo ligações de hidrogênio e /ou Van der Waals.

O conjunto de dados demonstra que a mucoadesão das NPs segue o modelo proposto por Langmuir e a mucoadesão das DSs é regida pelo modelo proposto por Freundlich (DA SILVA *et al.*, 2007).

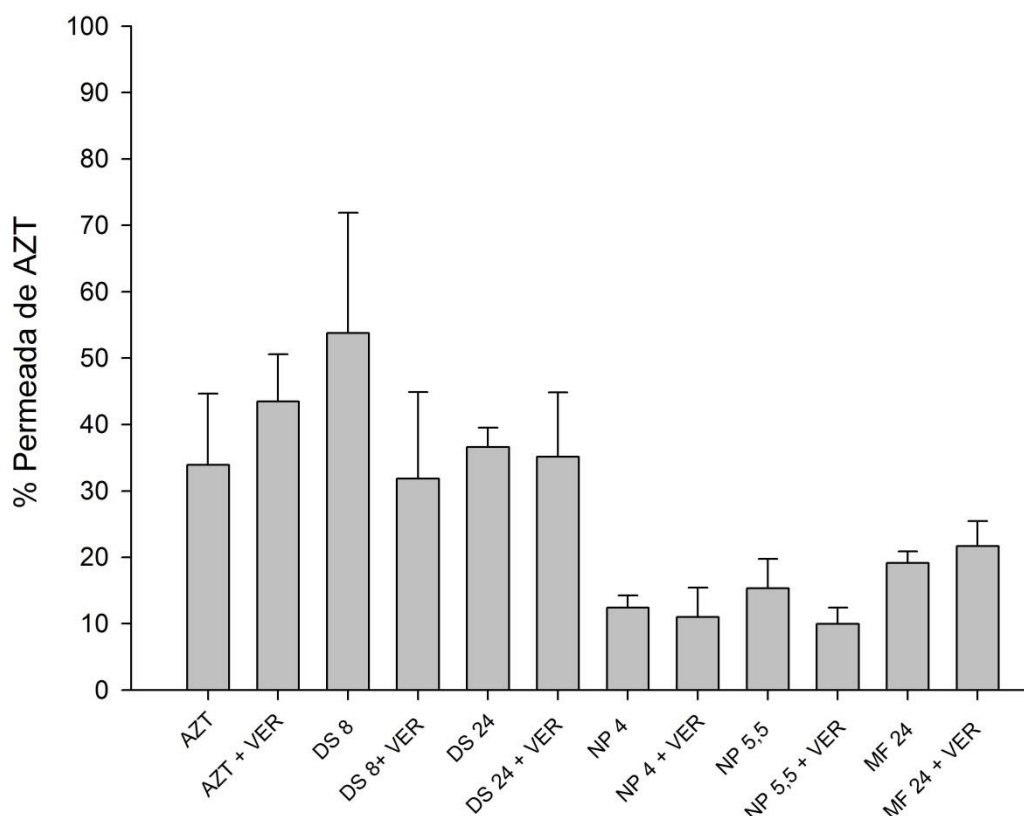
5.6.2 Avaliação “ex vivo” da permeabilidade intestinal da zidovudina pelo método do saco intestinal invertido

A permeabilidade intestinal desempenha um papel importante na absorção de fármacos administrados pela via oral. Uma vez que o fármaco tenha sido liberado da matriz polimérica ou forma farmacêutica e seja solúvel nos fluidos gastrointestinais, ele está disponível para o transporte através da mucosa intestinal. A permeabilidade é dependente da concentração do fármaco no lúmen intestinal e é diretamente influenciada por fatores como presença de transportadores de membrana, efeitos causados por excipientes, fatores fisiológicos, bioquímicos e o muco (VUPPUGALLA *et al.*, 2010).

Embora já seja comprovada a eficácia clínica do AZT contra o vírus do HIV, suas propriedades de absorção e toxicidade celular ainda não estão totalmente elucidadas. A alta variabilidade intra e inter indivíduos e a não linearidade na biodisponibilidade do AZT após administração oral podem estar envolvidas com o transporte do fármaco através da membrana intestinal durante a absorção a partir do lúmen (QUEVEDO *et al.*, 2011).

A Figura 29 mostra a porcentagem de AZT que permeou pela membrana intestinal, a partir das diferentes amostras (AZT, DSs, NPs e MFs).

A permeabilidade do AZT não incorporado nos sistemas de liberação foi de 33,9%, qual foi significativamente aumentada na presença do verapamil (45,5%) ($p < 0,05$). Nas DSs 8 e 24, as porcentagens de AZT permeadas foram de 53,77 e 35,12 %, respectivamente, sendo a permeação da DS 8 significativamente maior que para todas as outras amostras analisadas ($p < 0,05$). Para a DS 8, a presença do verapamil reduziu significativamente a permeação do fármaco enquanto que para a DS 24, a presença do verapamil não influenciou este parâmetro ($p > 0,05$).

Figura 29 – Porcentagem permeada de AZT.

O efeito de inibição da bomba de efluxo mediado pela P-gp na absorção e biodisponibilidade oral de vários fármacos têm sido relatado. Além disso, estudos tem demonstrado a capacidade de vários polímeros atuarem como inibidores da P-gp (CORNAIRE *et al.*, 2004; LING *et al.*, 2010; MUDRA, BORCHARDT, 2010; SHEN *et al.*, 2006; TAKIZAWA *et al.*, 2013; WERLE, 2008).

O mecanismo pelo qual alguns polímeros, como os polissacarídeos, bloqueiam a P-gp ainda não está bem elucidado. Uma das hipóteses é que este bloqueio ocorra por interações com os locais de ligação do substrato na P-gp por massa molecular e requerimento estérico. Polímeros de alta massa molecular e grande cadeia polimérica possuem um adequado volume molecular e são capazes de interagir estericamente com os locais de ligação do substrato na P-gp, permitindo a permeabilidade do substrato pela membrana (UEDA *et al.*, 1997).

CARRENO-GOMEZ, DUNCAN (2002) avaliaram o uso de polissacarídeos, dendrímeros e surfactantes como inibidores da bomba de efluxo para a administração oral de vários fármacos com baixa biodisponibilidade. Dados experimentais evidenciaram que

polissacarídeos aniônicos como a dextrana e o alginato de sódio possuem a capacidade de inibir a bomba de efluxo, favorecendo a permeabilidade dos fármacos.

Nesse sentido, o expressivo aumento da permeabilidade do AZT a partir da DS 8 pode ser atribuído à presença do HP que por ser um polímero aniônico, pode ter atuado como um inibidor da bomba de efluxo, aumentando a permeabilidade do fármaco. No entanto, a redução da permeabilidade do AZT a partir da DS 24 demonstra que o aumento da proporção de HP não favoreceu a permeabilidade.

A redução da permeabilidade do AZT a partir da DS 8 na presença do verapamil a valores próximos aos apresentados pela DS 24, sugere que existe uma concentração limite, a partir da qual o bloqueador da bomba de efluxo não favorece a permeabilidade. Para polissacarídeos aniônicos como a dextrana e o alginato de sódio, a concentração polimérica efetiva para inibição da P-gp em enterócitos de rato é de 0,05% (CARRENO-GOMEZ, DUNCAN, 2002). Entretanto, a QS combinada com o HPMCP no sistema de liberação pode ter contribuído para que a concentração efetiva de inibição tenha sido alterada.

Provavelmente existe um tamanho ideal de partículas para interação com a mucosa. Uma vez que a camada de muco e o clereance mucociliar diferem ao longo do tecido, diferentes taxas de difusão das partículas através do muco podem ser necessárias para que se alcance a absorção do fármaco (LAI *et al.*, 2009). De acordo com ENSIGN *et al.* (2012) as nanopartículas tem a capacidade de penetrar no tecido intestinal e interagir com as células, permanecendo retidas neste local, reduzindo a permeação do fármaco através da mucosa.

5.6.3 Avaliação da citotoxicidade em cultura de células Caco-2

A viabilidade celular e ensaios de citotoxicidade são fundamentais para avaliar as várias funções e respostas celulares quando as células são expostas a um agente tóxico, tais como atividade enzimática, permeabilidade da membrana celular, adesão celular, produção de ATP e produção de co-enzima (SONG *et al.*, 2014).

O método de avaliação baseado no corante resazurina tem sido amplamente utilizado em ensaios de viabilidade celular como indicador para avaliar a biocompatibilidade entre a célula e o composto investigado. A proliferação celular é expressa pela quantidade de NADPH produzido pelas células funcionais no meio de cultura (PAVAN *et al.*, 2010). A redução da resazurina pelo sistema de transporte de elétrons celulares só acontece por intermédio da enzima desidrogenase, que pode ser usada para medir as atividades metabólicas de respiração e

crescimento celular. Se a enzima desidrogenase é inibida pelo composto investigado, a redução química da resazurina não ocorre, permanecendo a amostra com a coloração azul. Se o composto investigado não tem efeito sobre as células, então a resazurina é reduzida para resorufina, assumindo a coloração rosa (LIU, 1981).

Os resultados de viabilidade celular das formulações diluídas em DMEM (meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco) estão apresentados na Tabela 14. Como controle, foi considerada uma cultura de células Caco-2 sem tratamento. As células também foram tratadas com mucina para avaliar alguma possível toxicidade.

Tabela 14 - Viabilidade celular das formulações diluídas em DMEM.

Tratamento nas células Caco-2	IC50/MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidade celular (%)
AZT	829	82,9
DS 8	1.000	100
NP 5,5	1.000	100
Mucina	1.000	100

Inicialmente, a avaliação da viabilidade de células Caco-2 tratadas com AZT, micro (DS 8) e nanopartículas (NP 5,5) baseou-se em numa observação microscópica, para compreender a morfologia e organização típica destas células, tanto na ausência quanto na presença do fármaco. Na cultura celular ausente de fármaco ou mucina, foi observado que as células, inicialmente isoladas, iniciaram um processo de migração para formar pequenas colônias que, progressivamente, aumentavam de tamanho. Na cultura celular tratada com AZT, foram observadas alterações na morfologia, que levam à ruptura da camada celular e lise. No entanto, este comportamento observado microscopicamente não foi notado nas culturas celulares tratadas com os sistemas de liberação micro ou nanoparticulados e nem com a mucina.

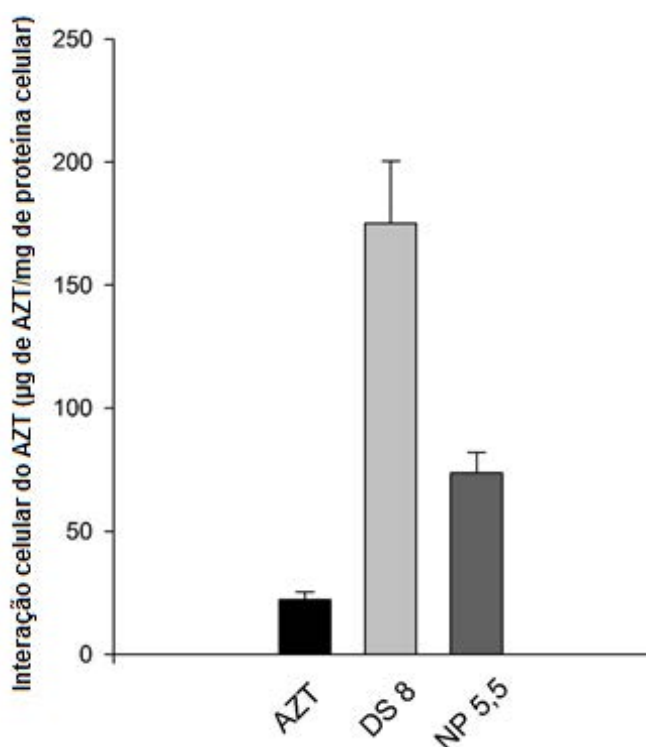
Foi observado no tratamento das células Caco-2 com AZT uma diminuição da viabilidade celular (82,9%) em relação às amostras DS 8, NP 5,5 e mucina, as quais não causaram diminuição da porcentagem de viabilidade celular no período de 24 horas. Os resultados observados para as células Caco-2 tratadas com os sistemas de liberação demonstraram que, além dos polímeros quitosana e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose não

serem citotóxicos nas concentrações propostas neste trabalho, os sistemas de liberação diminuíram a citotoxicidade do AZT em cerca de 17%.

5.6.4 Estudo de interação celular

As células Caco-2 tem sido amplamente utilizadas como modelos “in vitro” para avaliar o transporte de fármacos através da barreira epitelial intestinal. Estas células diferenciam-se espontaneamente formando uma monocamada que se assemelha tanto estrutural quando funcionalmente às células do intestino delgado.

Estas células foram selecionadas para este estudo porque, além de serem um bom modelo para avaliar o transporte e a interação de fármacos, elas expressam mecanismos apicais de efluxo, que desempenham um papel importante na restrição da absorção de alguns fármacos, como o AZT, pela via oral (LAKSHMANA RAO, 2009). A concentração de zidovudina associada às células Caco-2 é apresentada na Figura 30.

Figura 30 – Interação celular de AZT nas células Caco-2.

Os resultados demonstraram que a interação celular do AZT com células Caco-2 foi de 22 µg de AZT/mg de proteína celular, o que foi significativamente menor do que o resultado obtido pela micropartícula DS 8, com 175 µg de AZT/mg de proteína celular e do resultado obtido pela nanopartícula NP 5,5, com 73 µg de AZT/mg de proteína celular ($p < 0,05$).

A associação celular de paclitaxel em células de adenocarcinoma mamário 4T1 foi avaliada por CHAKRAVARTHI *et al.* (2010) e o mesmo comportamento foi observado para micro e nanopartículas contendo o fármaco. As micropartículas de 1 e 10 µm demonstraram uma associação celular 5 vezes maior que a obtida para as nanopartículas com tamanho de 315 nm. Este comportamento foi atribuído à maior retenção das micropartículas na superfície celular, o que favoreceu a associação celular.

As permeabilidades intestinais do AZT a partir da DS 8 e da NP 5,5 estão em acordo com os resultados observados para a interação celular dos mesmos sistemas de liberação. A permeabilidade intestinal do AZT a partir da DS 8 foi significativamente maior que a permeabilidade a partir da NP 5,5 e que o fármaco livre ($p < 0,05$).

A menor interação celular do AZT nas células Caco-2 pode estar relacionada ao fármaco ser substrato da P-gp presente nas células e ter sofrido mecanismo de efluxo. Os resultados sugerem, mais uma vez, que os polímeros constituintes dos sistemas de liberação podem ter

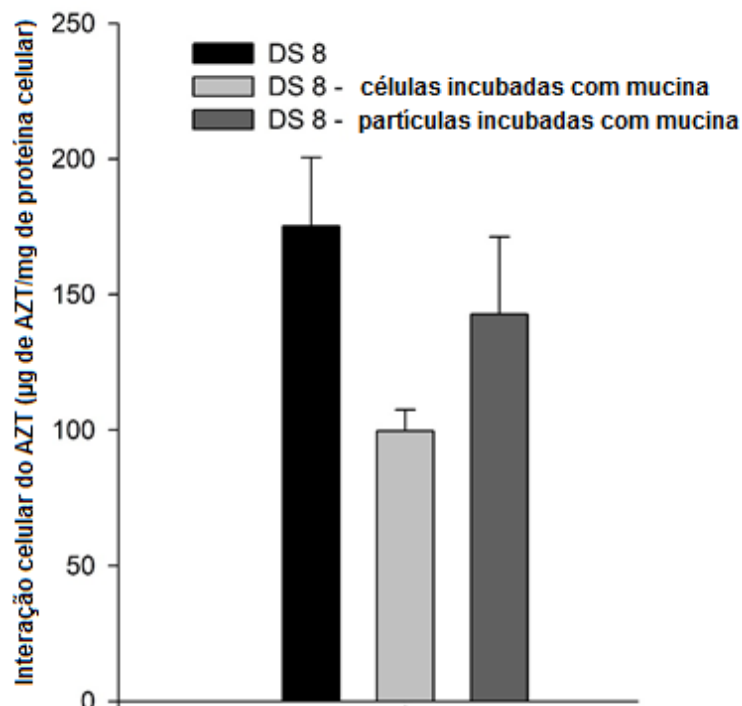
atuado também como inibidores da P-gp nas células Caco-2, aumentando a interação do AZT com as células (CARRENO-GOMEZ, DUNCAN, 2002; TAKIZAWA *et al.*, 2013). De acordo com ENSIGN *et al.* (2012), as nanopartículas tem a capacidade de penetrar no tecido intestinal e interagir com as células, permanecendo retidas neste local, reduzindo a permeação do fármaco através da mucosa, o que deve justificar a menor interação celular das NPs em relação às DSs.

CHAKRAVARTHI *et al.* (2010) avaliaram a associação de micro e nanopartículas de PLGA contendo paclitaxel em células Caco-2 e concluíram que as nanopartículas poderiam ter sido internalizadas pelas células tumorais enquanto as micropartículas permaneceram na superfície celular devido ao tamanho e propriedade mucoadesiva, sendo internalizadas posteriormente por outros mecanismos de transporte. Assim, a internalização celular do AZT incorporado nas micro (DS 8) e nanopartículas (NP 5,5) de quitosana/ftalato de HPMC pode ter ocorrido pelos mesmos mecanismos descritos acima. Entretanto, posteriores estudos devem confirmar esta hipótese.

5.6.4.1 Efeito do muco na interação celular

Com o objetivo de avaliar o efeito do muco na interação celular do AZT, foi utilizada uma solução de mucina para mimetizar as condições do muco fisiológico. As Figura 31 e Figura 32 apresentam os resultados do efeito da mucina no pré-tratamento de micropartículas e nanopartículas, respectivamente, e das células Caco-2 na associação celular do AZT.

Figura 31 – Efeito da mucina no pré-tratamento das micropartículas (DS 8) e das células Caco-2 na interação celular do AZT.



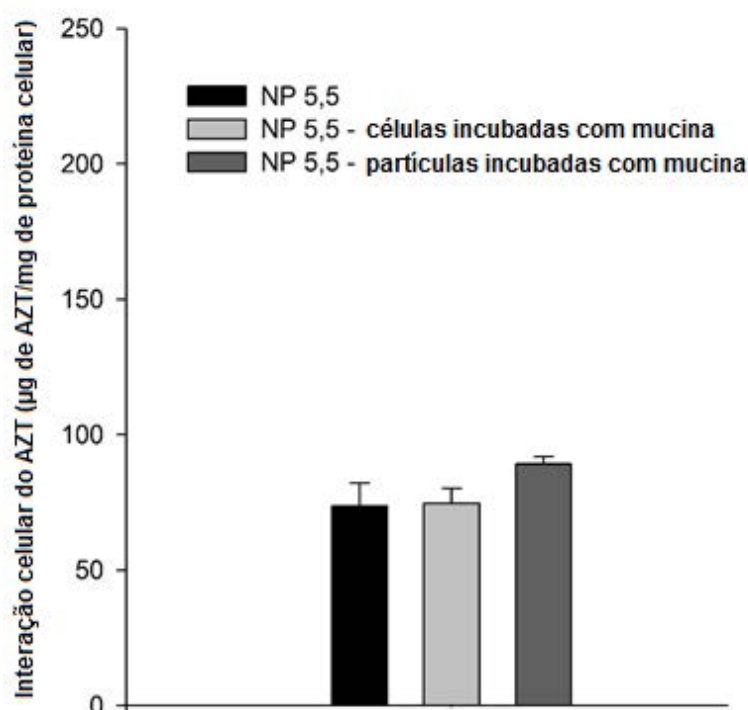
Os dados apresentados na Figura 31 demonstram que a presença de mucina diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a interação das DSs com as células Caco-2. No entanto, o pré-tratamento das micropartículas com mucina não influenciou na interação celular. Por outro lado, a incubação prévia das células com mucina afetou negativamente essa interação ($p < 0,05$), demonstrando que a camada de mucina depositada sobre as células representou uma barreira física e/ou química para a interação com a célula.

Nesse sentido, as micropartículas podem ter sido fisicamente retidas nas malhas de mucina. Além disso, de acordo com os dados de adsorção de mucina, as DSs negativamente carregadas, interagiram mais fortemente com esta proteína devido às ligações hidrogênio, o que deve contribuir para esta menor interação celular, ficando imobilizadas nesta rede polimérica. No caso do pré-tratamento das DSs com mucina, as partículas já se encontram previamente dispersas na rede de mucina, de modo que o caminho difusional a ser percorrido pode ser significativamente reduzido, facilitando a interação celular.

Para as NPs (Figura 32) não houve diferença na interação celular quando as células foram previamente incubadas com mucina. No entanto, foi observado que o pré-tratamento das partículas com mucina aumentou a interação celular do AZT ($p < 0,05$).

Devido ao menor tamanho de partícula, as NPs devem se difundir mais facilmente pela camada de mucina, alcançando as células. Além disso, segundo os dados de adsorção de mucina, as NPs interagem com a mucina por forças eletrônicas, as quais são consideradas mais fracas do que as interações por ligações hidrogênio e, dessa forma, se apresentam mais disponíveis para a interação celular.

Figura 32 - Efeito da mucina no pré-tratamento das nanopartículas (NP 5,5) e das células Caco-2 na interação celular do AZT.



A incubação das NPs com mucina deve ter permitido a adsorção prévia de mucina, modificando a carga de superfície da partícula, o que diminuiu a interação eletrostática com a rede de mucina, de forma que as partículas ficaram mais disponíveis para interação celular.

5.6.5 *Ensaio de farmacocinética e biodisponibilidade “in vivo”*

5.6.5.1 **Validação da metodologia analítica do AZT em plasma de rato**

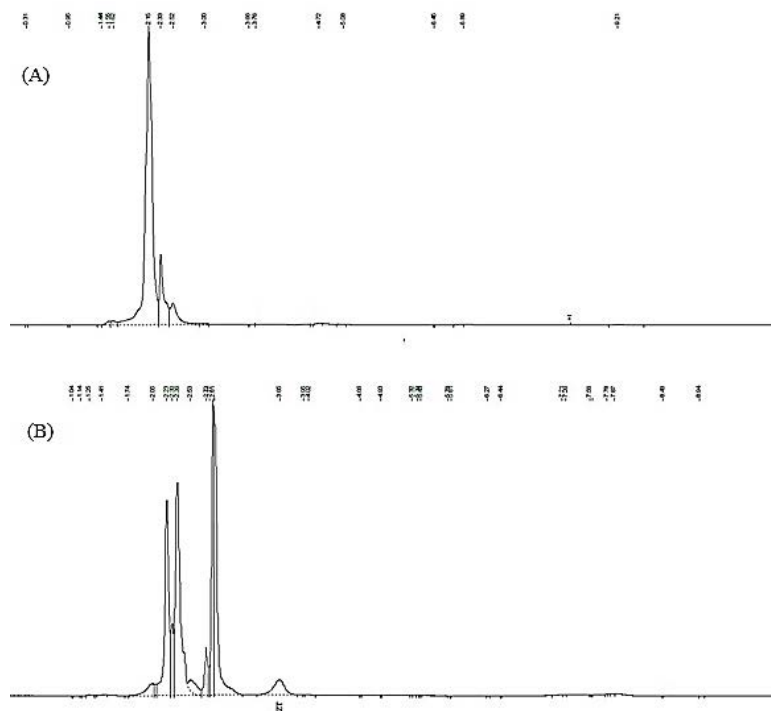
5.6.5.1.1 Seletividade

A seletividade avalia o grau de interferência de outras substâncias diferentes da substância ou princípio ativo, tais como excipientes, impurezas e produtos de degradação ou

outros compostos com propriedades semelhantes que possam estar presentes na amostra. A seletividade garante a exclusividade do pico de resposta para o composto analisado (BRASIL, 2003).

A Figura 33 mostra os cromatogramas em 265 nm de (A) plasma de rato (branco) e (B) plasma de rato com AZT (3 ug/mL). O cromatograma obtido com a solução do controle negativo mostrou ausência de quaisquer picos no tempo de retenção do AZT (3,66 min), o que confirma que o método analítico aplicado foi seletivo. Além disso, os componentes biológicos da matriz não interferiram na análise.

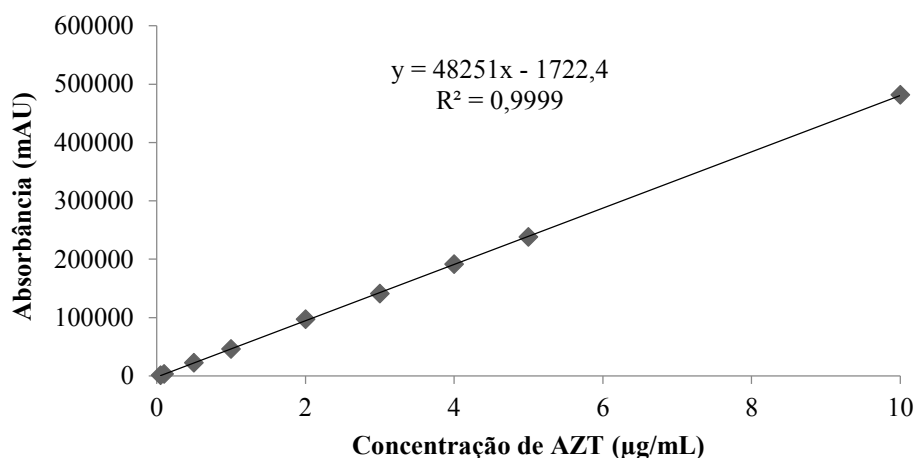
Figura 33 – Cromatograma em 265 nm do (A) plasma de rato (controle) e (B) plasma de rato com AZT (3µg/mL).



5.6.5.1.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma faixa de concentrações avaliadas.

O método analítico foi linear em 265 nm para as concentrações de AZT em plasma de rato avaliadas na faixa de 0,5 a 10 µg/mL. A equação de regressão linear obtida a partir da média de três curvas analíticas em plasma de rato foi $y = 48251x - 1722,4$; onde y é a absorbância (mAU) e x é a concentração de AZT (µg/mL). O coeficiente de determinação ($r^2 = 0,9999$) comprovou a excelente linearidade do método (Figura 34) (BRASIL, 2003).

Figura 34 – Curva analítica do AZT em plasma de rato.

5.6.5.1.3 Precisão e exatidão

A precisão é a dispersão entre os resultados independentes, repetição de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em condições especificadas e a exatidão representa a acórdância entre os resultados individuais em um experimento particular e um valor de referência aceito como verdadeiro, o que pode estar no intervalo de 80 a 120 % (BRASIL, 2003).

Os resultados de precisão intra e inter dias e exatidão do AZT em plasma de rato estão apresentados na Tabela 15, o que demonstrou que a metodologia aplicada foi exata e precisa, uma vez que o desvio padrão relativo foi inferior a 5 % .

Tabela 15 – Precisão intra e inter dias e exatidão do AZT em plasma de rato.

	AZT teórico (µg/mL)	AZT mensurado (µg/mL)	DPR (%)	Precisão (%)
Precisão intra dia	0,5	0,50	2,56	100,10
	3	2,96	0,96	98,62
	10	9,89	0,89	98,86
Precisão inter dias	0,5	0,51	2,04	102,20
	3	3,02	1,32	100,57
	10	9,86	1,55	98,61

5.6.5.1.4 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) é a mais baixa concentração da substância avaliada que pode ser detectada, mas não necessariamente, quantificada e o limite de quantificação (LQ) é a mais baixa concentração do analito avaliada que pode ser mensurado, aplicando o procedimento experimental (BRASIL, 2003).

Os valores do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados a partir de 0,04 e 0,13 µg/mL, respectivamente. Estes resultados indicam que a metodologia aplicada apresenta uma alta sensibilidade para detectar e quantificar o AZT, sem sofrer interferências de fatores intrínsecos.

5.6.5.1.5 Recuperação

Os valores de recuperação do AZT apresentados na Tabela 16, correspondentes às concentrações de 0,5; 3 e 10 µg/mL foram, respectivamente, 105,1; 97,66 e 100,19%.

A quantificação do AZT por HPLC-UV proposta neste trabalho está em conformidade com a legislação vigente uma vez que os valores de recuperação não são inferiores a 95 %, o que indica confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

Tabela 16 – Recuperação do AZT em plasma de rato.

AZT teórico (µg/mL)	AZT mensurado (µg/mL)	DPR (%)	Recuperação (%)
0,5	0,53	3,21	105,1
3	2,93	1,94	97,66
10	10,02	2,09	100,19

5.6.6 *Análise farmacocinética*

5.6.6.1 **Seleção da dose**

A seleção da dose foi realizada de acordo com o cálculo de extrapolação alométrica, o qual consiste em comparar os parâmetros fisiológicos resultantes da administração de fármacos em determinado animal, que podem ser extrapolados para uso em outros animais por meio de cálculos aritméticos. A absorção, distribuição e eliminação de muitos fármacos administrados

a uma espécie animal envolve processos fisiológicos compatíveis com a escala alométrica. O processo alométrico permite extrapolações matemáticas de doses específicas de medicamentos para um determinado animal, para o qual já foram realizados estudos de farmacocinética e farmacodinâmica, para outros animais (MAHMOOD, 2007).

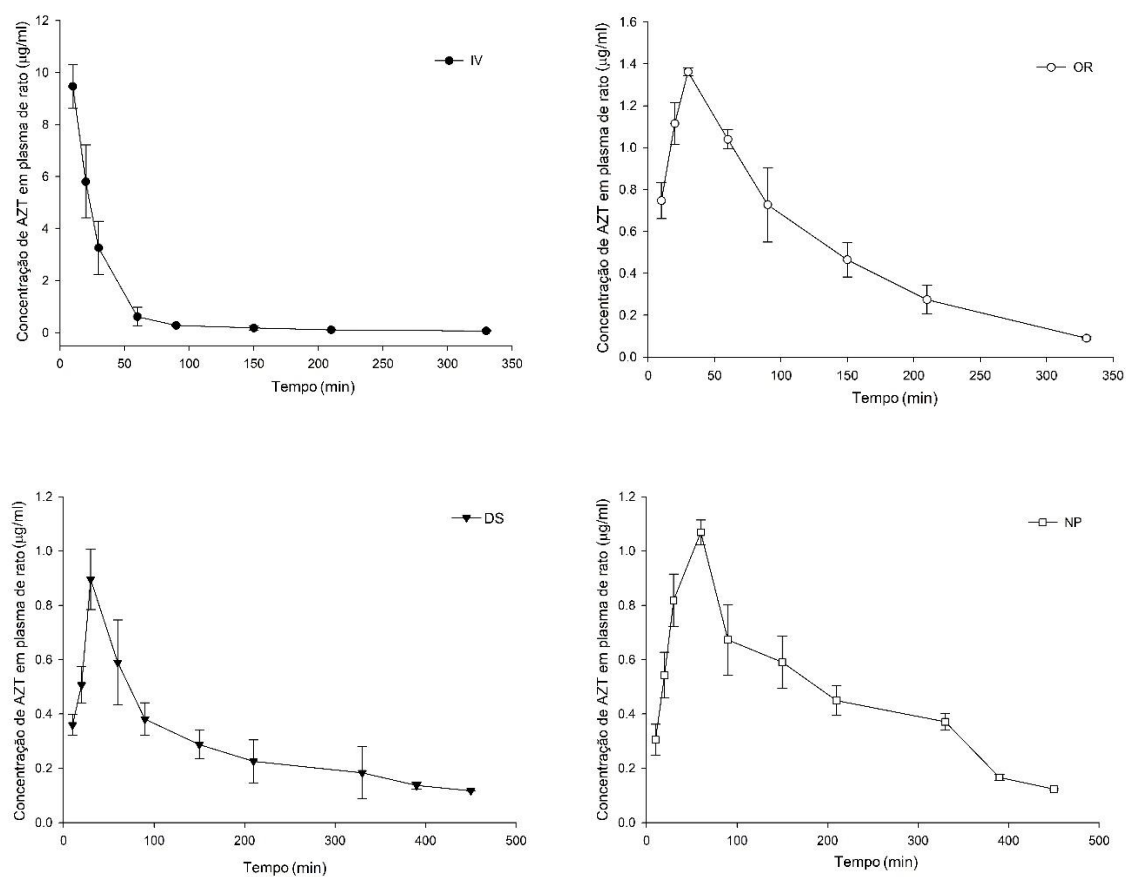
Por meio da escala alométrica, a dose selecionada de AZT para ambas as administrações pela via intravenosa e pela via oral foi de 32 mg/kg de rato. Esta dose corresponde a dose de 600 mg/dia de AZT em humanos, quando o fármaco é administrado sem combinação com outros anti-retrovirais, a fim de aproximar o estudo para a dose de AZT utilizada na terapêutica.

Além disso, um estudo preliminar demonstrou que a dose de 32 mg/kg de rato quando administrada pela via oral resultou em níveis plasmáticos possíveis de serem quantificados; assim, foi possível manter a mesma dose para ambas as vias de administração.

5.6.6.2 Perfis farmacocinéticos

A administração intravenosa permitiu a determinação do *clearance* e do volume de distribuição do AZT no rato. Estes parâmetros foram fixados para a avaliação do fármaco quando administrado por via oral tanto em solução, como uma dispersão sólida e nanopartículas poliméricas. Os perfis farmacocinéticos do AZT quantificado no plasma de rato após a administração intravenosa e oral estão demonstrados nas Figura 35 e Figura 36.

Figura 35 – Perfis da concentração plasmática de AZT ($\mu\text{g/mL}$) versus tempo obtidos por administração intravenosa e oral de 32 mg/kg de AZT em ratos (n=6).

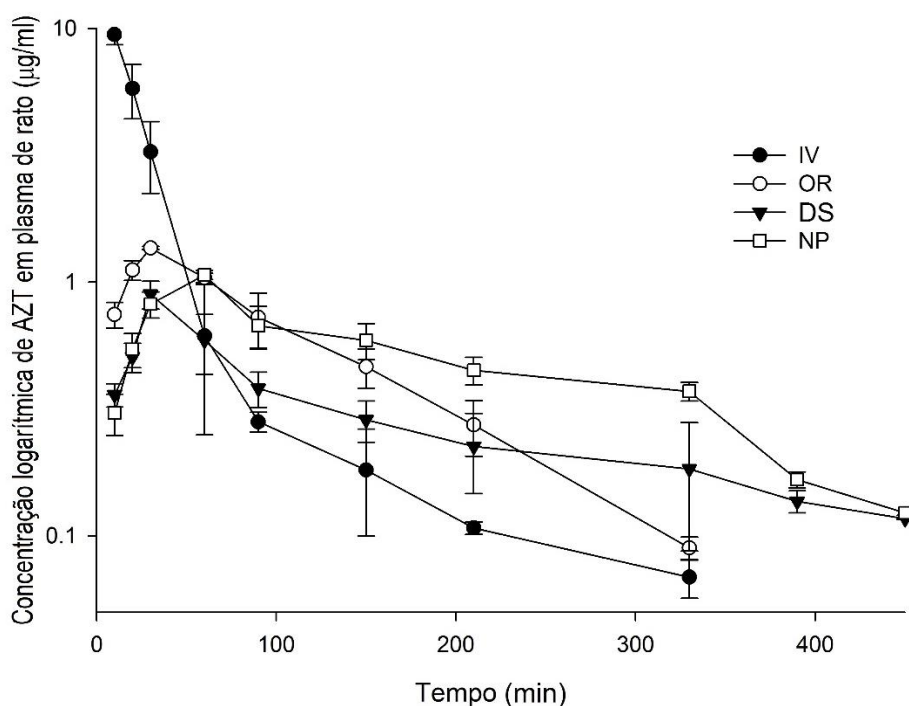


Os perfis das concentrações plasmáticas de AZT ($\mu\text{g/mL}$) *versus* tempo das formulações OR e DS foram semelhantes, com o mesmo T_{max} (30 min) e a mesma tendência de eliminação do organismo do rato, após o T_{max} .

A administração oral de AZT, a partir das NPs resultou em um perfil das concentrações plasmáticas de AZT ($\mu\text{g/mL}$) *versus* tempo com T_{max} em 60 min, diferente das outras formulações, e concentrações mais elevadas na curva de eliminação em relação à aquelas observadas para a administração de AZT a partir das DSs e OR. No entanto, o AZT em plasma de rato foi quantificado até 450 minutos após a administração a partir das NPs e DSs, demonstrando o maior tempo de permanência do AZT no sangue do rato quando o fármaco foi administrado a partir destes sistemas de liberação, diferente da administração do fármaco a partir de formulações convencionais (OR e IV), nas quais o AZT foi quantificado no plasma de rato até 330 minutos da administração.

O gráfico na escala logarítmica apresentado na Figura 36 evidencia que a formulação NP sofreu eliminação mais lenta, apresentando maiores concentrações plasmáticas que as formulações DS e a OR nos mesmos intervalos de tempo. Por outro lado, a formulação DS apresentou um perfil de eliminação mais lento quando comparado à OR.

Figura 36 - Perfis da concentração logarítmica plasmática de AZT ($\mu\text{g/mL}$) *versus* tempo obtidos por administração intravenosa e oral de 32 mg/kg de AZT em ratos (n=6).



5.6.6.3 Modelo não-compartimental

O modelo não-compartimental fornece uma base para estimar os parâmetros farmacocinéticos, os quais são os definidos para o grupo e sistemas em estudo. No entanto, modelos não-compartimentais dependem do protocolo experimental, especialmente da via através da qual o fármaco é administrado (GABRIELSSON, WEINER, 2012).

Os parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da concentração plasmática de AZT *versus* tempo obtidos pela análise não-compartimental no software WinNonlin V.5.1 estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 – Parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da concentração plasmática de AZT *versus* tempo obtidos por administração intravenosa e oral de 32 mg/kg de AZT em ratos (n=6).

Parâmetros farmacocinéticos	Formulações			
	IV	OR	DS	NP
C _{max} (µg/mL)	9,95 (± 1,32)	1,35 (± 0,02)	0,87 (±0,11)	1,08 (±0,11)
T _{max} (min)	10	30	30	60
Vd (mL)	3319,17 (±2055,33)	5218,48 (±769,2)	1709,03 (±2541,09)	6162,15 (±1124,65)
Kel (l/min)	0,0052	0,019	0,022	0,01
t _{1/2} (min)	13,33	36	31	67,95
ASC ^{0-t} (µg.min/mL)	359,19 (±39,7)	162,59 (±11,79)	116,35 (±14,51)	216,47 (±16,34)
ASC ^{0-∞} (µg.min/mL)	366,72 (±37,76)	172,82 (±10,35)	159,23 (±53,56)	240,76 (±18,42)
Cl (mL/h)	21,81 (±2,44)	46,29 (±2,51)	53,03 (±12,92)	33,27 (±2,69)

Para as formulações OR e DS, os valores de C_{max} alcançados foram de 1,35 e 0,87 µg/mL, respectivamente, em 30 min, enquanto que para a NP, o valor de C_{max} foi de 1,08 µg/mL em 60 min. Para os valores de C_{max}, não houve diferença estatisticamente significativa entre os sistemas de liberação (p > 0,05).

A fase de distribuição do AZT foi semelhante para as formulações IV, OR e NP, uma vez que os valores de Vd não foram estatisticamente diferentes ($p > 0,05$). Para o AZT administrado a partir da DS, o Vd foi estatisticamente menor do que o AZT administrado a partir da NP ($p < 0,05$). Em relação à fase de eliminação, não foram observadas diferenças entre os grupos em relação aos valores de Cl e Kel ($p > 0,05$).

Os parâmetros do perfil farmacocinético de AZT obtidos neste estudo sugerem que a exposição do fármaco no organismo do rato é maior quando administrado a partir da formulação NP, uma vez que um aumento significativo na $ASC^{0-\infty}$ (240,76 $\mu\text{g}\cdot\text{min} / \text{mL}$) foi observado em comparação com as formulações OR e DS ($p < 0,05$). Além disso, o $t_{1/2}$ para o AZT a partir das NPs foi duas vezes mais elevado do que os obtidos para as formulações OR e DS, indicando uma maior permanência do fármaco no organismo, sugerindo possível prolongamento da ação terapêutica.

5.6.6.4 Modelo compartimental

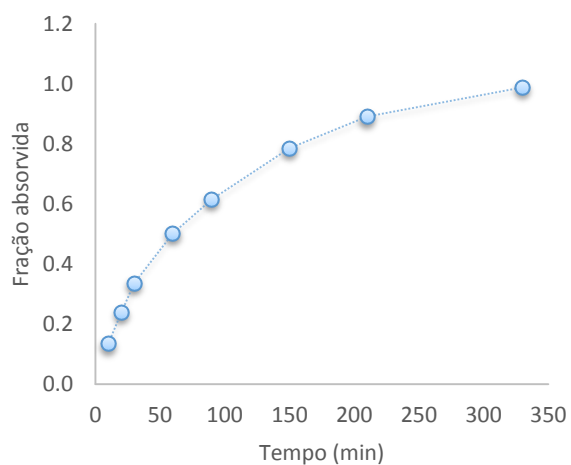
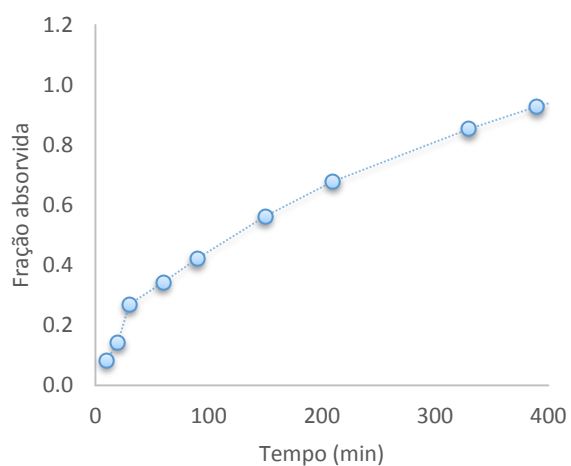
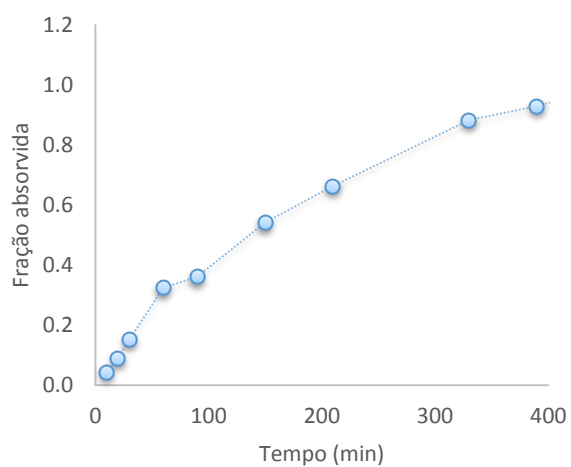
Uma análise compartimental envolve o desenvolvimento de um modelo farmacocinético (PK). Um modelo PK é uma representação matemática da passagem do fármaco pelo organismo relacionando variáveis como dose, horários de doses e horários em que as amostras de sangue são coletadas e constantes chamadas de parâmetros (*clearance* e volume de distribuição) que quantificam a disposição do fármaco. Nesta abordagem, o corpo é dividido numa série de compartimentos conectados homogeneamente que representam a disposição do fármaco.

Os parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da concentração plasmática de AZT *versus* tempo obtidos da análise bicompartimental pelo software NONMEM V.7.2 estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da concentração plasmática de AZT versus tempo obtidos na análise bicompartimental (dose= 32 mg/kg; n=6).

Parâmetros	AZT (32 mg/kg)
α (h ⁻¹)	0,086
β (h ⁻¹)	0,036
K12 (h ⁻¹)	0,010
K21 (h ⁻¹)	0,061
Kel (h ⁻¹)	0,051
Vd (mL)	445,0

A fração absorvida *versus* tempo de AZT a partir das formulações OR, DS e NP são apresentados nas Figura 37, Figura 38 e Figura 39, respectivamente, calculadas de acordo com LOO, RIEGELMAN (1968). Este método é geralmente utilizado para calcular a fração absorvida relativa em função do tempo a partir dos resultados de concentração plasmática de um fármaco que segue um modelo bicompartimental. Para a aplicação deste método, foram utilizados os parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir da administração pela via intravenosa.

Figura 37 – Fração absorvida versus tempo (min) de AZT a partir da formulação OR (n=6).**Figura 38 - Fração absorvida versus tempo (min) de AZT a partir da formulação DS (n=6).****Figura 39 - Fração absorvida versus tempo (min) de AZT a partir da formulação NP (n=6).**

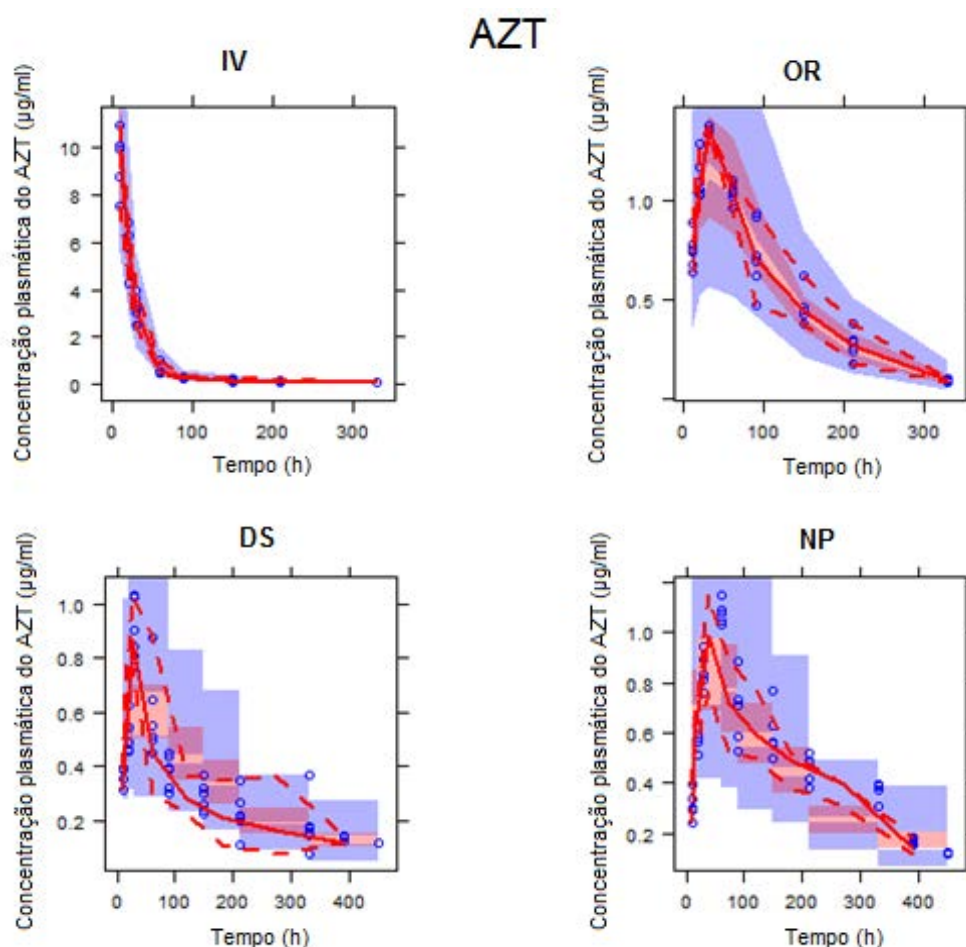
Sendo a fração absorvida de um fármaco a somatória da concentração de fármaco no organismo e da concentração de fármaco eliminado, os resultados de fração absorvida *versus* tempo do AZT a partir das formulações OR, DS e NP estão de acordo com os respectivos perfis farmacocinéticos (Figura 35), considerando a curva de tendência de eliminação do AZT de cada formulação nos perfis plasmáticos.

A Tabela 19 apresenta os resultados da técnica de reamostragem por “bootstrap”. Os valores médios do procedimento de bootstrap com minimização de sucesso foram semelhantes para as estimativas dos parâmetros da população do conjunto original de dados. Além disso, estimativas fixas e aleatórias dos dados originais se encontram dentro do intervalo de confiança de 95% obtido para as réplicas de “bootstrap” (BONATE, 2006). Os resultados obtidos pela verificação de previsão visual (Figura 40) comprovam que o modelo selecionado, bicompartimental, foi o mais adequado aos dados.

Tabela 19 – Parâmetros farmacocinéticos do AZT para o estudo de farmacocinética populacional.

Modelo Farmacocinético	Conjunto de dados originais		Replicatas “Bootstrap”			
	Estimado	CV (%)	Média	CV (%)	Intervalo de confiança (95%)	
Modelo estrutural						
CL (mL/h)	22,4	6,9	-	-	-	
Vc (mL)	443	15,7	-	-	-	
k ₁₂ (h ⁻¹)	0,01	14,5	-	-	-	
k ₂₁ (h ⁻¹)	1,62	10,6	-	-	-	
K _a (h ⁻¹)	OR	0,012	3,0	0,012	3,521	(0,0113-0,0129)
	DS_NP	0,006	3,2	0,006	3,423	(0,0052-0,006)
F	OR_DS	0,483	3,4	0,482	3,582	(0,451-0,519)
	NP	0,646	2,5	0,648	2,529	(0,615-0,679)
Variabilidade entre sujeitos (BSV)						
BSV _{CL} (%) FIX	6,32	-	-	-	-	
BSV _{Vc} (%) FIX	6,32	-	-	-	-	
BSV _{k₁₂} (%)	12,8	174	-	-	-	
BSV _{k₂₁} (%) FIX	6,32	-	-	-	-	
BSC _{ka} (%) FIX	6,32	-	-	-	-	
BSC _F (%) FIX	6,32	-	-	-	-	
Variabilidade residual						
σ (%)	0,058	15,1	0,057	13,4	(0,0436-0,074)	

Figura 40 - Resultados do modelo de exploração (verificação visual preditiva), em que os perfis totais de concentração plasmática *versus* tempo de AZT foram simulados 200 vezes. Experimental concentração plasmática do AZT (°). As linhas representam os intervalos de confiança de 5%, 50% e 95%.



5.6.7 Biodisponibilidade

A etapa biofarmacêutica é de fundamental importância para avaliar o desempenho destes novos sistemas de liberação quanto à biodisponibilidade do fármaco. Diante disto, se faz necessário o desenvolvimento e o estudo biofarmacotécnico de novas formulações visando à melhora da biodisponibilidade dos fármacos.

No cálculo da biodisponibilidade não-compartmental, é considerada uma razão entre a $ASC^{0-\infty}$ da administração oral e a intravenosa. Uma vez que a $ASC^{0-\infty}$ das formulações OR e DS não diferiram estatisticamente (172,82 e 159,23 µg.min/mL, respectivamente), os valores de biodisponibilidade obtidos para estas formulações são considerados estatisticamente iguais (48,89 e 46,6%, respectivamente) ($p > 0,05$). A biodisponibilidade do AZT aumentou significativamente quando administrado a partir da formulação NP, atingindo 65,47% em

comparação com a administração intravenosa do fármaco e cerca de 15% maior do que a biodisponibilidade das formulações OR e DS ($p < 0,05$).

Na análise compartimental, a constante de velocidade de absorção e biodisponibilidade foram calculados como parâmetros do modelo. Entre as várias aproximações consideradas, o modelo escolhido forneceu duas constantes de velocidade de absorção: uma para o grupo OR ($0,012 \text{ h}^{-1}$), diferente da constante de velocidade de absorção para os grupos NP e DS ($0,006 \text{ h}^{-1}$); e duas biodisponibilidades diferentes, 48,3% para o grupo OR e DS e 64,6% para o grupo NP. Embora a velocidade de absorção da DS tenha sido a mesma para a NP e a metade da velocidade de absorção da OR, a biodisponibilidade da formulação NP foi significativamente maior que a obtida para as formulações OR e DS ($p < 0,05$). Este parâmetro pode estar relacionado com a permanência ou não do sistema de liberação em contato com a mucosa intestinal.

Na administração oral, considerando que o tempo de renovação do muco intestinal é entre 50-270 minutos, não é esperado que as partículas mucoadesivas permaneçam aderidas ao muco por um período maior que 4-5 horas. Além disso, como os sistemas mucoadesivos aderem ao muco por mecanismos de forma eficiente, devido ao tamanho de partícula muitos deles não são capazes de penetrar através da camada de muco e inserir aos epitélios subjacentes (LEHR *et al.*, 1991).

Alguns pesquisadores sugerem que as nanopartículas são capazes de penetrar no epitélio intestinal por meio das células-M na superfície das placas de Peyer em pequenos animais, que são as superfícies intestinais menos protegidas pelo muco e mais expostas ao quimo (ELSABAHY, WOOLEY, 2012; ENSIGN *et al.*, 2012). Uma vez que o muco não é secretado na região que circunda estas células, as nanopartículas podem penetrar e permanecer nos epitélios intestinais liberando o fármaco, sem sofrer a depuração mucociliar e/ou o peristaltismo intestinal, aumentando a biodisponibilidade do fármaco (LAI *et al.*, 2009).

6 CONCLUSÃO

As metodologias de preparo das dispersões sólidas por co-precipitação e das nanopartículas poliméricas empregadas nesse trabalho permitiram a obtenção de sistemas de liberação micro e nanoparticulados, como demonstrado pelos ensaios de granulometria e microscopia eletrônica de varredura.

Os ensaios de liberação *in vitro* demonstraram que o HPMCP foi capaz de reduzir as taxas de liberação do fármaco em meio gástrico e promover o controle das taxas de liberação em meio intestinal simulado, tanto para as DSs quanto para as NPs.

Os ensaios de caracterização por DSC e difração de raios X demonstraram que o fármaco permaneceu molecularmente disperso tanto nas DSs quanto nas NPs. Entretanto, estes mesmos ensaios evidenciaram a formação de uma estrutura matricial com maior grau de cristalinidade nas NPs.

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho demonstrou a formação de um material com propriedades distintas, através da interação entre os grupamentos NH_3^+ da quitosana e os grupamentos COOH^- do ftalato de HPMC, no entanto sem alterar a estrutura do fármaco.

Os ensaios de mucoadesão demonstraram as propriedades mucoadesivas das DSs e NPs estudadas, sendo que a maior capacidade mucoadesiva das DSs foi atribuída à maior concentração de polímero nestas amostras.

A maior capacidade de absorção de líquidos demonstrada pelas NPs foi atribuída à porosidade da estrutura polimérica e ao reduzido tamanho da partícula, em relação às DSs.

A absorção intestinal do AZT avaliada pelo método do saco intestinal invertido foi maior na DS 8, o que pode ser atribuído à maior taxa de AZT liberado para o meio e a presença dos polímeros quitosana e ftalato de HPMC, que podem promover a abertura das junções paracelulares e inibir a P-gp, bloqueando a bomba de efluxo do fármaco, respectivamente.

Os sistemas de liberação micro e nanoparticulados demonstraram capacidade de associação com células Caco-2, sendo este comportamento mais evidente nas dispersões sólidas, tanto na presença como na ausência de mucina.

A metodologia e os parâmetros analíticos aplicados para quantificar o AZT em plasma de rato permitiram a obtenção dos parâmetros de validação seletividade, linearidade, precisão

Conclusão

e exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e recuperação) dentro dos limites permitidos pela ANVISA.

Os resultados obtidos nas análises não-compartimental e compartimental demonstraram que os perfis farmacocinéticos do AZT administrado pela via oral apresentaram parâmetros correspondentes ao modelo bicompartimental. O ensaio de biodisponibilidade demonstrou que o sistema de liberação de fármacos NP foi capaz de aumentar significativamente a biodisponibilidade oral do AZT em relação ao fármaco carregado nas formulações OR e DS.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos é fortemente influenciado pela compreensão detalhada dos princípios biológicos e moleculares que determinarão as estratégias para o seu desenvolvimento, sendo delineados para que propicie o direcionamento do fármaco para um determinado sítio alvo, a liberação modificada do fármaco, diminuição da toxicidade e uma melhor farmacocinética com aumento de biodisponibilidade.

As dispersões sólidas e as nanopartículas poliméricas de quitosana/ftalato de HPMC desenvolvidas neste trabalho se mostraram excelentes sistemas de liberação para a zidovudina para a administração pela via oral. O tamanho de partícula em escala micro e nanométrico associado à proteção ao meio gástrico proporcionado pelos sistemas permitiram perfis de liberação em meio simulado intestinal por um período mais prolongado que o fármaco livre. As cargas na superfície das partículas e as propriedades mucoadesivas dos sistemas proporcionaram o contato íntimo da formulação com uma superfície contendo mucina/muco, aumentando o gradiente local do fármaco para melhorar a absorção. Além disso, a provável inibição da P-gp pelo bloqueio da bomba de efluxo e a capacidade de interação com as células intestinais demonstraram a diferenciada interação dos sistemas de liberação com a membrana biológica, sendo possível que o sistema se mantenha na superfície celular intestinal, no caso das micropartículas, ou que consiga penetrar nas células intestinais, no caso das nanopartículas. Finalmente, o conjunto das propriedades apresentadas pelos sistemas de liberação promoveram alterações na farmacocinética do fármaco e o aumento da biodisponibilidade. Neste sentido, os sistemas de liberação desenvolvidos podem ser considerados inéditos ao abordarem estas estratégias para aumentar a biodisponibilidade da zidovudina.

Portanto, os resultados obtidos nestes trabalho demonstraram a viabilidade de sistemas de liberação de mesma composição polimérica em possuírem propriedades e interações biológicas totalmente distintas e inerentes de cada sistema, mantendo as características dos polímeros constituintes. Desta forma, a estratégia de modular as propriedades do fármaco considerando a forma de como ele é disponibilizado para absorção sistêmica possibilita que outros fármacos e materiais poliméricos possam ser estudados com a mesma finalidade em novos projetos de pesquisa.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIDI, M.; MASTROBATTISTA, E.; JISKOOT, W.; HENNINK, W. E. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 1, p. 59-82, 2010.

AMIDON, G.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.; CRISON, J. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 505-518, 2009.

ARAÚJO, A. A. S.; STORPIRTIS, S.; MERCURI, L. P.; CARVALHO, F. M. S.; FILHO, M. D. S.; MATOS, J. R. Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, n. 2, p. 303-314, 2003.

ASSAAD, E.; WANG, Y. J.; ZHU, X. X.; MATEESCU, M. A. Polyelectrolyte complex of carboxymethyl starch and chitosan as drug carrier for oral administration. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 4, p. 1399-1407, 2011.

AVADI, M. R.; SADEGHI, A. M. M.; MOHAMMADPOUR, N.; ABEDIN, S.; ATYABI, F.; DINARVAND, R.; RAFIEE-TEHRANI, M. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 58-63, 2010.

AZARMI, S.; ROA, W.; LÖBENBERG, R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, n. 1, p. 12-21, 2007.

BANSAL, T.; MISHRA, G.; JAGGI, M.; KHAR, R. K.; TALEGAONKAR, S. Effect of P-glycoprotein inhibitor, verapamil, on oral bioavailability and pharmacokinetics of irinotecan in rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 4, p. 580-590, 2009.

BAO, H.; LI, L.; ZHANG, H. Influence of cetyltrimethylammonium bromide on physicochemical properties and microstructures of chitosan-TPP nanoparticles in aqueous solutions. **Journal of colloid and interface science**, v. 328, n. 2, p. 270-277, 2008.

BEAL, S. L.; SHEINER, L. B. **NONMEM User's Guides, NONMEM**. Project Group, University of California, San Francisco. 1989

BELE, M. H.; DERLE, D. V. Mechanism of disintegrant action of polacrillin potassium: Swelling or wicking? **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 1, p. 70-76, 2012.

BHUMKAR, D.; POKHARKAR, V. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 2, p. E138-E143, 2006.

BIKIARIS, D.; PAPAGEORGIOU, G.; PAPADIMITRIOU, S.; KARAVAS, E.; AVGOUSTAKIS, K. Novel Biodegradable Polyester Poly(Propylene Succinate): Synthesis and Application in the Preparation of Solid Dispersions and Nanoparticles of a Water-Soluble Drug. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 1, p. 138-146, 2009.

BONATE, P. L. **Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and simulation**. New York, NY: Springer, 2006. ISBN 9780387271972 (alk. paper)

038727197X (alk. paper). Disponível em: <
<http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0663/2005928491-d.html>
<http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0814/2005928491-t.html>>.

Resolução RE nº 899: Guia para valiação de métodos analíticos e bioanalíticos, ed., SANITÁRIA, M. D. S.-A. N. D. V.: Brasília, 2003.

CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J.; ALONSO, M. Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. **Colloid and Polymer Science**, v. 275, n. 1, p. 46-53, 1997.

CANEVAROLO JR, S. V. **Ciência dos polímeros**. São Carlos: Arliber Editora, 2002.

CANO-SOLDADO, P.; LARRÁYOZ, I. M.; MOLINA-ARCAS, M.; CASADO, F. J.; MARTINEZ-PICADO, J.; LOSTAO, M. P.; PASTOR-ANGLADA, M. Interaction of nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase with the concentrative nucleoside transporter-1 (SLC28A1). 2004.

CARBINATTO, F. M.; DE CASTRO, A. D.; CURY, B. S. F.; MAGALHÃES, A.; EVANGELISTA, R. C. Physical properties of pectin–high amylose starch mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 281-288, 2012.

CÁRCAMO, C.; HOOTON, T.; WENER, M. H.; WEISS, N. S.; GILMAN, R.; AREVALO, J.; CARRASCO, J.; SEAS, C.; CABALLERO, M.; HOLMES, K. K. Etiologies and manifestations of persistent diarrhea in adults with HIV-1 infection: a case-control study in Lima, Peru. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 1, p. 11-19, 2005.

CARRENO-GOMEZ, B.; DUNCAN, R. **Compositions with enhanced oral bioavailability**2002.

CARVALHO, F. C.; BARBI, M. D. S.; GREMIÃO, M. P. D. LC Evaluation of In Vitro Release of AZT from Microemulsions. **Chromatographia**, v. 69, n. 2, p. 207-211, 2009.

CARVALHO, F. C.; BRUSCHI, M. L.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, p. 1-17, 2010.

CARVALHO, F. C.; CAMPOS, M. L.; PECCININI, R. G.; GREMIÃO, M. P. D. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 1, p. 219-227, 2013.

CHAKRAVARTHI, S. S.; DE, S.; MILLER, D. W.; ROBINSON, D. H. Comparison of anti-tumor efficacy of paclitaxel delivered in nano- and microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, n. 1-2, p. 37-44, 2010.

CHAUD, M. V.; TAMASCIA, P.; LIMA, A. C. D.; PAGANELLI, M. O.; GREMIÃO, M. P. D.; FREITAS, O. D. Solid dispersions with hydrogenated castor oil increase solubility, dissolution rate and intestinal absorption of praziquantel. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, p. 473-481, 2010.

CHEN, M.-C.; SONAJE, K.; CHEN, K.-J.; SUNG, H.-W. A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery. **Biomaterials**, v. 32, n. 36, p. 9826-9838, 2011.

CHEN, R.; TAKAHASHI, H.; OKAMOTO, H.; DANJO, K. Particle Design of Three-Component System for Sustained Release Using a 4-Fluid Nozzle Spray-Drying Technique. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 11, p. 1486-1490, 2006.

CHIU, M. H.; PRENNER, E. J. Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions. **Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 39-59, 2011.

CHOW, S. C.; LIU, J. P. Design of Bioavailability Studies. In: (Ed.). **Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies, Third Edition**: Chapman and Hall/CRC, 2008. (Chapman & Hall/CRC Biostatistics Series). ISBN 978-1-58488-668-6.

COLOMBO, P.; BETTINI, R.; SANTI, P.; PEPPAS, N. A. Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 6, p. 198-204, 2000.

CONE, R. A. Barrier properties of mucus. **Advanced drug delivery reviews**, v. 61, n. 2, p. 75-85, 2009.

CONNER, S. D.; SCHMID, S. L. Regulated portals of entry into the cell. **Nature**, v. 422, n. 6927, p. 37-44, 2003.

CORNAIRE, G.; WOODLEY, J.; HERMANN, P.; CLOAREC, A.; ARELLANO, C.; HOUIN, G. Impact of excipients on the absorption of P-glycoprotein substrates in vitro and in vivo. **International journal of pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 119-131, 2004.

COSTA JR., E. D. S.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, p. 1460-1466, 2008.

CRAIG, D. Q. M. The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 231, n. 2, p. 131-144, 2002.

CURY, B. S. F.; DE CASTRO, A. D.; KLEIN, S. I.; EVANGELISTA, R. C. Influence of phosphated cross-linked high amylose on in vitro release of different drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 789-793, 2009.

DA SILVA, C.; MARTINS, F.; SANTANA, M. H. Adsorption Isotherms of Mucin on Granules Containing Chitosan Microspheres. **Adsorption Science & Technology**, v. 25, n. 10, p. 781-789, 2007.

DALLAS, S.; READ, S. E.; KING, S.; KOREN, G.; BENDAYAN, R. Pharmacokinetic interaction between zidovudine and trimethoprim/sulphamethoxazole in HIV-1 infected children. **The Canadian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 254, 2000.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; FRANCISCO, A. D.; ESPÍRITO SANTO, M. L. P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alim. Nutr.**, v. 6, n. 2, p. 195-205, 2005.

DE SOUZA COSTA-JÚNIOR, E.; PEREIRA, M.; MANSUR, H. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 2, p. 553-561, 2009.

DE SOUZA, M. V. N.; DE ALMEIDA, M. V. Drogas anti-VIH: passado, presente e perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 366-372, 2003.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscópio eletrônico de varredura (MEV). In: IDEIAPUCRS, C. D. M. E. M. D. (Ed.). **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores** Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. p.60.

DES RIEUX, A.; FIEVEZ, V.; GARINOT, M.; SCHNEIDER, Y.-J.; PRÉAT, V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. **Journal of Controlled Release**, v. 116, n. 1, p. 1-27, 2006.

DHAWAN, S.; SINGLA, A.; SINHA, V. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. **AAPS PharmSciTech**, v. 5, n. 4, p. 122-128, 2004.

DHIRENDRA, K.; LEWIS, S.; UDUPA, N.; ATIN, K. Solid dispersions: a review. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 22, n. 2, p. 234-246, 2009.

DOS REIS SERRA, C. H.; MORI KOONO, E. E.; KANO, E. K.; SCHRAMM, S. G.; ARMANDO, Y. P.; PORTA, V. Bioequivalence and pharmacokinetics of two zidovudine formulations in healthy brazilian volunteers: An open-label, randomized, single-dose, two-way crossover study. **Clinical Therapeutics**, v. 30, n. 5, p. 902-908, 2008.

DUNCAN, R. The dawning era of polymer therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 5, p. 347-360, 2003.

DUYGU, D. Y.; BAYKAL, T.; AÇIKGÖZ, I.; YILDIZ, K. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy for Biological Studies. **G.U. Journal of Science**, v. 22, n. 3, p. 117-121, 2009.

ELBERT, D. L.; HUBBELL, J. A. Surface treatments of polymers for biocompatibility. **Annual Review of Materials Science**, v. 26, n. 1, p. 365-394, 1996.

ELSABAHY, M.; WOOLEY, K. L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2545-2561, 2012.

ENSIGN, L. M.; CONE, R.; HANES, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 6, p. 557-570, 2012.

FARIA, N. R.; RAMBAUT, A.; SUCHARD, M. A.; BAELE, G.; BEDFORD, T.; WARD, M. J.; TATEM, A. J.; SOUSA, J. D.; ARINAMINPATHY, N.; PÉPIN, J. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. **science**, v. 346, n. 6205, p. 56-61, 2014.

FIORENTINI, S.; GIAGULLI, C.; CACCURI, F.; MAGIERA, A. K.; CARUSO, A. HIV-1 matrix protein p17: a candidate antigen for therapeutic vaccines against AIDS. **Pharmacology & therapeutics**, v. 128, n. 3, p. 433-444, 2010.

GABRIELSSON, J.; WEINER, D. Non-compartmental analysis. In: (Ed.). **Computational Toxicology**: Springer, 2012. p.377-389. ISBN 1627030492.

GAN, Q.; WANG, T.; COCHRANE, C.; MCCARRON, P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 44, n. 2, p. 65-73, 2005.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.

GINER, M.; FIGUERA, J.; GA-BOROBIA, F. Técnica de infusión intravenosa contínua en ratas en libertad. **Res. Surg.**, v. 1, p. 3-9, 1989.

GIRI, T. K.; KUMAR, K.; ALEXANDER, A.; AJAZUDDIN; BADWAIK, H.; TRIPATHI, D. K. A novel and alternative approach to controlled release drug delivery system based on solid dispersion technique. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 50, n. 2, p. 147-159, 2012.

GRAY, R. R.; TATEM, A. J.; LAMERS, S.; HOU, W.; LAEYENDECKER, O.; SERWADDA, D.; SEWANKAMBO, N.; GRAY, R. H.; WAWER, M.; QUINN, T. C. Spatial phylodynamics of HIV-1 epidemic emergence in east Africa. **AIDS (London, England)**, v. 23, n. 14, p. F9, 2009.

GRUND, S.; BAUER, M.; FISCHER, D. Polymers in drug delivery—state of the art and future trends. **Advanced Engineering Materials**, v. 13, n. 3, p. B61-B87, 2011.

GUINESI, L. S.; CAVALHEIRO, É. T. G. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. **Thermochimica Acta**, v. 444, n. 2, p. 128-133, 2006.

GUNASEELAN, S.; GUNASEELAN, K.; DESHMUKH, M.; ZHANG, X.; SINKO, P. J. Surface modifications of nanocarriers for effective intracellular delivery of anti-HIV drugs. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 4, p. 518-531, 2010.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147, 2007.

HAAG, R.; KRATZ, F. Polymer therapeutics: concepts and applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 8, p. 1198-1215, 2006.

HAN, J.; ZHOU, Z.; YIN, R.; YANG, D.; NIE, J. Alginate–chitosan/hydroxyapatite polyelectrolyte complex porous scaffolds: Preparation and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 2, p. 199-205, 2010.

HARDING, S. Mucoadhesive interactions. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. 5, p. 1036-1041, 2003.

HE, P.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 166, n. 1, p. 75-88, 1998.

HEIATI, H.; TAWASHI, R.; SHIVERS, R. R.; PHILLIPS, N. C. Solid lipid nanoparticles as drug carriers. I. Incorporation and retention of the lipophilic prodrug 3'-azido-3'-deoxythymidine palmitate. **International journal of pharmaceutics**, v. 146, n. 1, p. 123-131, 1997.

HORWITZ, J. P.; CHUA, J.; NOEL, M. Nucleosides. V. The Monomesylates of 1-(2'-Deoxy- β -D-lyxofuranosyl)thymine 1,2. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 2076-2078, 1964.

HUSSAN, D.; SANTANU, R.; VERMA, P.; BHANDARI, V. A review on recent advances of enteric coating. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 6, p. 05-11, 2012.

JAIN, S.; BISWAL, I.; DINDA, A.; MOITRA, S.; KOHLI, S. Modified sustained release chitosan-coated zidovudine microspheres. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. Suppl 4, p. 95-97, 2011.

JENKINS, R.; SNYDER, R. L. **Introduction to X-ray powder diffractometry**. New York: John Wiley & Sons, 2012. 389.

KARLSSON, M.; HOLFORD, N. A tutorial on visual predictive checks. **Abstracts of the annual meeting of the population approach group in Europe**, p. 17. Abstr 1434, 2008.

KAUR, C. D.; NAHAR, M.; JAIN, N. K. Lymphatic targeting of zidovudine using surface-engineered liposomes. **Journal of drug targeting**, v. 16, n. 10, p. 798-805, 2008.

KHAFAGY, E.-S.; MORISHITA, M.; ONUKI, Y.; TAKAYAMA, K. Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: a comparative review. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 15, p. 1521-1546, 2007.

KIM, E.-J.; CHUN, M.-K.; JANG, J.-S.; LEE, I.-H.; LEE, K.-R.; CHOI, H.-K. Preparation of a solid dispersion of felodipine using a solvent wetting method. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, n. 2, p. 200-205, 2006.

KIM, I.-S.; KIM, S.-H. Development of polymeric nanoparticulate drug delivery systems: evaluation of nanoparticles based on biotinylated poly(ethylene glycol) with sugar moiety. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 257, n. 1-2, p. 195-203, 2003.

KOTZE, A.; LUESSEN, H.; DE BOER, A.; VERHOEF, J.; JUNGINGER, H. Chitosan for enhanced intestinal permeability: prospects for derivatives soluble in neutral and basic environments. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 7, n. 2, p. 145-151, 1999.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

LAI, S. K.; WANG, Y.-Y.; HANES, J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 2, p. 158-171, 2009.

LAKSHMANA RAO, S. Caco-2 cells: an overview. **ASIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL RESEARCH AND HEALTH CARE**, v. 1, n. 2, 2009.

LANKALAPALLI, S.; KOLAPALLI, V. Polyelectrolyte complexes: A review of their applicability in drug delivery technology. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 71, n. 5, p. 481, 2009.

LEHR, C.-M.; POELMA, F. G.; JUNGINGER, H. E.; TUKKER, J. J. An estimate of turnover time of intestinal mucus gel layer in the rat in situ loop. **International journal of pharmaceutics**, v. 70, n. 3, p. 235-240, 1991.

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 47-60, 2000.

LI, C.; HEIN, S.; WANG, K. Chitosan-Carrageenan Polyelectrolyte Complex for the Delivery of Protein Drugs. **ISRN Biomaterials**, v. 2013, p. 6, 2013.

LI, M.; SI, L.; PAN, H.; RABBA, A. K.; YAN, F.; QIU, J.; LI, G. Excipients enhance intestinal absorption of ganciclovir by P-gp inhibition: Assessed *in vitro* by everted gut sac and *in situ* by improved intestinal perfusion. **International journal of pharmaceutics**, v. 403, n. 1, p. 37-45, 2011.

LI, X.; XIE, H.; LIN, J.; XIE, W.; MA, X. Characterization and biodegradation of chitosan-alginate polyelectrolyte complexes. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, n. 1, p. 1-6, 2009.

LIECHTY, W. B.; KRYSCIO, D. R.; SLAUGHTER, B. V.; PEPPAS, N. A. Polymers for drug delivery systems. **Annual review of chemical and biomolecular engineering**, v. 1, p. 149, 2010.

LING, G.; ZHANG, P.; ZHANG, W.; SUN, J.; MENG, X.; QIN, Y.; DENG, Y.; HE, Z. Development of novel self-assembled DS-PLGA hybrid nanoparticles for improving oral bioavailability of vincristine sulfate by P-gp inhibition. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 2, p. 241-248, 2010.

LIU, D. A rapid biochemical test for measuring chemical toxicity. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 26, n. 1, p. 145-149, 1981.

LIU, J.; SHAPIRO, J. I. Endocytosis and signal transduction: basic science update. **Biological research for nursing**, v. 5, n. 2, p. 117-128, 2003.

LLEDÓ-GARCÍA, R.; NÁCHER, A.; PRATS-GARCÍA, L.; CASABÓ, V. G.; MERINO-SANJUÁN, M. Bioavailability and pharmacokinetic model for ritonavir in the rat. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 3, p. 633-643, 2007.

LOO, J. C. K.; RIEGELMAN, S. New method for calculating the intrinsic absorption rate of drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, n. 6, p. 918-928, 1968.

MAHMOOD, I. Application of allometric principles for the prediction of pharmacokinetics in human and veterinary drug development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 11, p. 1177-1192, 2007.

MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M.; GREMIÃO, M. P. D. Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA-PEG blend nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1-2, p. 266-271, 2010.

MAKHLOF, A.; TOZUKA, Y.; TAKEUCHI, H. Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 5, p. 445-451, 2011.

MANMODE, A. S.; SAKARKAR, D. M.; MAHAJAN, N. M. Nanoparticles -Tremendous Therapeutic Potential: A Review. **International Journal of PharmTech Research**, v. 1 n. 4, p. 1020-1027, 2009.

MARU, S. M.; DE MATAS, M.; KELLY, A.; PARADKAR, A. Characterization of thermal and rheological properties of zidovudine, lamivudine and plasticizer blends with ethyl cellulose to assess their suitability for hot melt extrusion. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 471-478, 2011.

MEEHAN, E. Characterisation of hydroxypropylmethylcellulose phthalate (HPMCP) by GPC using a modified organic solvent. **Analytica chimica acta**, v. 557, n. 1, p. 2-6, 2006.

MILLER-CHOU, B. A.; KOENIG, J. L. A review of polymer dissolution. **Progress in Polymer Science**, v. 28, n. 8, p. 1223-1270, 2003.

MITSUYA, H.; WEINHOLD, K. J.; FURMAN, P. A.; STCLAIR, M. H.; LEHRMAN, S. N.; GALLO, R. C.; BOLOGNESI, D.; BARRY, D. W.; BRODER, S. 3'-azido-3'-deoxythymidine 9BWA09U0 – an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human lymphotropic-T virus type III lymphadenopathy associated virus *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 20, p. 868-871, 1985.

MOURYA, V.; INAMDAR, N. N.; TIWARI, A. Carboxymethyl chitosan and its applications. **Advanced Materials Letters**, v. 1, n. 1, p. 11-33, 2010.

MUDRA, D. R.; BORCHARDT, R. T. Absorption barriers in the rat intestinal mucosa. 3: Effects of polyethoxylated solubilizing agents on drug permeation and metabolism. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 2, p. 1016-1027, 2010.

MUKHOPADHYAY, P.; MISHRA, R.; RANA, D.; KUNDU, P. P. Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A review. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 11, p. 1457-1475, 2012.

MUNDARGI, R. C.; BABU, V. R.; RANGASWAMY, V.; AMINABHAVI, T. M. Formulation and in vitro evaluation of transdermal delivery of zidovudine—An anti-HIV drug. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 119, n. 3, p. 1268-1274, 2011.

MURI, E. M. F. PROTEASES VIRAIS: IMPORTANTES ALVOS TERAPÊUTICOS DE COMPOSTOS PEPTIDOMIMÉTICOS. **Quim. Nova**, v. 37, n. 2, p. 308-316, 2014.

NG, C.; LOSSO, J. N.; MARSHALL, W. E.; RAO, R. M. Freundlich adsorption isotherms of agricultural by-product-based powdered activated carbons in a geosmin–water system. **Bioresource Technology**, v. 85, n. 2, p. 131-135, 2002.

OLIVEIRA, G. F.; FERRARI, P. C.; CARVALHO, L. Q.; EVANGELISTA, R. C. Chitosan–pectin multiparticulate systems associated with enteric polymers for colonic drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 1004-1009, 2010.

OMIDIAN, H.; PARK, K. Swelling agents and devices in oral drug delivery. **Journal Drug Delivery Science and Technology**, v. 18, n. 2, p. 83-93, 2008.

PAHWA, R.; SAINI, N.; KUMAR, V.; KOHLI, K. Chitosan-based gastroretentive floating drug delivery technology: an updated review. **Expert opinion on drug delivery**, v. 9, n. 5, p. 525-539, 2012.

PAPADIMITRIOU, S. A.; ACHILIAS, D. S.; BIKIARIS, D. N. Chitosan-g-PEG nanoparticles ionically crosslinked with poly(glutamic acid) and tripolyphosphate as protein delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, n. 1–2, p. 318-327, 2012.

PARVEEN, S.; MITRA, M.; KRISHNAKUMAR, S.; SAHOO, S. K. Retraction notice to ‘‘Enhanced Antiproliferative Activity of Carboplatin loaded Chitosan-Alginate Nanoparticles in Retinoblastoma Cell Line’’ [Acta Biomaterialia 6 (2010) 3120–3131]. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 8, p. 3120-3131, 2010.

PAVAN, F. R.; MAIA, P. I. D. S.; LEITE, S. R. A.; DEFLON, V. M.; BATISTA, A. A.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S. G.; LEITE, C. Q. F. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti – Mycobacterium tuberculosis activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1898-1905, 2010.

PAVINATTO, A.; PAVINATTO, F. J.; DELEZUK, J. A. D. M.; NOBRE, T. M.; SOUZA, A. L.; CAMPANA-FILHO, S. P.; OLIVEIRA JR, O. N. Low molecular-weight chitosans are stronger biomembrane model perturbants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 104, n. 0, p. 48-53, 2013.

PEÇANHA, E. P.; ANTUNES, O. A.; TANURI, A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. **Química Nova**, v. 25, n. 6/B, p. 1108-1116, 2002.

PEDREIRO, L. N. **Desenvolvimento e caracterização de dispersão sólida com propriedade mucoadesiva para liberação de zidovudina**. 2012. 100 f Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal. Biochem.**, v. 83, n. 2, p. 346-356, 1977.

PLAPIED, L.; DUHEM, N.; DES RIEUX, A.; PRÉAT, V. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 3, p. 228-237, 2011.

PREZOTTI, F. G. **Microesferas de goma gelana e pectina como potencial estratégia para liberação controlada de fármacos**

2013. 111 f (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.

PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, n. 0, p. 286-295, 2014.

PU, H.; CHEN, L.; LI, X.; XIE, F.; YU, L.; LI, L. An Oral Colon-Targeting Controlled Release System Based on Resistant Starch Acetate: Synthetization, Characterization, and Preparation of Film-Coating Pellets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5738-5745, 2011.

PUND, S.; JOSHI, A.; VASU, K.; NIVSARKAR, M.; SHISHOO, C. Gastroretentive delivery of rifampicin: In vitro mucoadhesion and in vivo gamma scintigraphy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, n. 1-2, p. 106-112, 2011.

QUEVEDO, M. A.; NIETO, L. E.; BRIÑÓN, M. C. P-glycoprotein limits the absorption of the anti-HIV drug zidovudine through rat intestinal segments. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 3, p. 151-159, 2011.

ROSCA, C.; NOVA, O.; LISA, G.; POPA, M. I. Polyelectrolyte complexes of chitosan with dextran sulphate. Synthesis and characterization. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 45, n. 3-4, p. 185 -189, 2011.

ROSENTHAL, R.; GÜNZEL, D.; FINGER, C.; KRUG, S. M.; RICHTER, J. F.; SCHULZKE, J.-D.; FROMM, M.; AMASHEH, S. The effect of chitosan on transcellular and paracellular mechanisms in the intestinal epithelial barrier. **Biomaterials**, v. 33, n. 9, p. 2791-2800, 2012.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C.; ASSOCIATION, A. P. **Handbook of pharmaceutical excipients**. Pharmaceutical press London, 2006.

SAM, A. P.; VAN DEN HEUIJ, J. T. M.; TUKKER, J. J. Mucoadhesion of both film-forming and non-film-forming polymeric materials as evaluated with the Wilhelmy plate method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 79, n. 1-3, p. 97-105, 1992.

SANTOS, J. E. D.; SOARES, J. D. P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, É. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros**, v. 13, p. 242-249, 2003.

SANTOS, J. V.; BATISTA DE CARVALHO, L.; PINA, M. O papel da Zidovudina na Erradicação da Transmissão Vertical da SIDA. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 2, p. 303, 2008.

SARMENTO, B.; FERREIRA, D.; VEIGA, F.; RIBEIRO, A. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 1, p. 1-7, 2006.

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

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

SCHEDL, H. P.; CHRISTENSEN, K. K.; CLARK, E. D.; BUETTNER, G. R. Surface charge, fluidity, and calcium uptake by rat intestinal brush-border vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1234, n. 1, p. 81-89, 1995.

SHAIK, N.; PAN, G.; ELMQUIST, W. F. Interactions of pluronic block copolymers on P-gp efflux activity: Experience with HIV-1 protease inhibitors. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 12, p. 5421-5433, 2008.

SHEN, Q.; LIN, Y.; HANDA, T.; DOI, M.; SUGIE, M.; WAKAYAMA, K.; OKADA, N.; FUJITA, T.; YAMAMOTO, A. Modulation of intestinal P-glycoprotein function by

polyethylene glycols and their derivatives by in vitro transport and in situ absorption studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, n. 1–2, p. 49-56, 2006.

SHUKLA, R. K.; TIWARI, A. Carbohydrate polymers: Applications and recent advances in delivering drugs to the colon. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 399-416, 2012.

SIPOS, P.; SZÚCS, M.; SZABÓ, A.; ERŐS, I.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P. An assessment of the interactions between diclofenac sodium and ammonio methacrylate copolymer using thermal analysis and Raman spectroscopy. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 46, n. 2, p. 288-294, 2008.

SLOGROVE, A.; RABIE, H.; COTTON, M. Paediatric antiretroviral drug targets. **Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)**, v. 11, n. 2, p. 115-123, 2011.

SOARES, G. A.; CASTRO, A. D. D.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Blends of cross-linked high amylose starch/pectin loaded with diclofenac. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 135-142, 2013.

SONG, Y.; GUAN, R.; LYU, F.; KANG, T.; WU, Y.; CHEN, X. In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles and zinc oxide nanoparticles to human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 769, n. 0, p. 113-118, 2014.

STEFFANSEN, B.; NIELSEN, C. U.; BRODIN, B.; ERIKSSON, A. H.; ANDERSEN, R.; FROKJAER, S. Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 1, p. 3-16, 2004.

SURESH, P.; MANASA, K.; BABU, S. S.; BRAHMAIAH, B.; KHALILULLAH, S.; NAMA, S. Bioadhesive drug delivery system - a review. **Asian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 1, p. 30-37, 2013.

SVENSSON, O.; ARNEBRANT, T. Mucin layers and multilayers — Physicochemical properties and applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, n. 6, p. 395-405, 2010.

SYED, I. A.; SULAIMAN, S. A. S.; HASSALI, M. A.; LEE, C. K. C. HIV/AIDS treatment and health related quality of life: Importance of knowing patients' perspective. **HIV & AIDS Review**, v. 12, n. 1, p. 26-27, 2013.

TAKIZAWA, Y.; KISHIMOTO, H.; NAKAGAWA, M.; SAKAMOTO, N.; TOBE, Y.; FURUYA, T.; TOMITA, M.; HAYASHI, M. Effects of pharmaceutical excipients on membrane permeability in rat small intestine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 2, p. 363-370, 2013.

TAMADA, J.; LANGER, R. Erosion kinetics of hydrolytically degradable polymers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 2, p. 552-556, 1993.

TEIXEIRA, M.; ALONSO, M. J.; PINTO, M. M. M.; BARBOSA, C. M. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, n. 3, p. 491-500, 2005.

TRAN, V.-T.; BENOÎT, J.-P.; VENIER-JULIENNE, M.-C. Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 407, n. 1-2, p. 1-11, 2011.

TSAI, M.-L.; CHEN, R.-H.; BAI, S.-W.; CHEN, W.-Y. The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 2, p. 756-761, 2011.

TYAGI, N.; MADHAV, N. S. FORMULATION AND EVALUATION OF ZIDOVUDINE MICRO EMULSION USING A NOVEL BIO POLYMER FROM THE SEEDS OF BUCHANANIA LANZAN. **Int J Biopharmaceutics**, v. 3, n. 1, p. 40-43, 2012.

Guidance for Industry and Reviewers: Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers, ed., Rockville, 2002.

UEDA, K.; TAGUCHI, Y.; MORISHIMA, M. How does P-glycoprotein recognize its substrates? **Seminars in Cancer Biology**, v. 8, n. 3, p. 151-159, 1997.

UNAIDS. UNAIDS report on global AIDS epidemics. http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_en.pdf, 2012.

The United States Pharmacopeia, 34th ed., Rockville, 2011.

VARUM, F. O.; BASIT, A. W.; SOUSA, J.; VEIGA, F. Estudos de mucoadesão no trato gastrointestinal para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 535-548, 2008.

VILLANOVA, J. C.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Pharmaceutical applications of polymers. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

VINOD, K. R.; ROHIT, R. T.; SANDHYA, S.; BANJI, D.; VENKATRAM, R. B. Critical Review on Mucoadhesive Drug Delivery **Journal for drugs and medicines**, v. 4, n. 1, p. 7-28, 2012.

VLLASALIU, D.; EXPOSITO-HARRIS, R.; HERAS, A.; CASETTARI, L.; GARNETT, M.; ILLUM, L.; STOLNIK, S. Tight junction modulation by chitosan nanoparticles: Comparison with chitosan solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 400, n. 1–2, p. 183-193, 2010.

VUPPUGALLA, R.; KIM, S.; ZVYAGA, T.; HAN, Y.-H.; BALIMANE, P.; MARATHE, P.; RODRIGUES, A. D. Anticipating and minimizing drug interactions in a drug discovery and development setting: an industrial perspective. In: (Ed.). **Enzyme-and Transporter-Based Drug-Drug Interactions**: Springer, 2010. p.585-624. ISBN 1441908390.

WANG, L.; CUI, F. D.; HAYASE, T.; SUNADA, H. Preparation and Evaluation of Solid Dispersion for Nitrendipine–Carbopol and Nitrendipine–HPMCP Systems Using a Twin Screw Extruder. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 10, p. 1240-1245, 2005.

WANG, L.; LI, L.; SUN, Y.; TIAN, Y.; LI, Y.; LI, C.; JUNYAPRASERT, V. B.; MAO, S. Exploration of hydrophobic modification degree of chitosan-based nanocomplexes on the oral delivery of enoxaparin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 3–4, p. 263-271, 2013.

WERLE, M. Natural and Synthetic Polymers as Inhibitors of Drug Efflux Pumps. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 3, p. 500-511, 2008.

WILLMANN, S.; THELEN, K.; BECKER, C.; DRESSMAN, J. B.; LIPPERT, J. Mechanism-based prediction of particle size-dependent dissolution and absorption: Cilostazol pharmacokinetics in dogs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 1, p. 83-94, 2010.

WU, D. Y.; MEURE, S.; SOLOMON, D. Self-healing polymeric materials: A review of recent developments. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 5, p. 479-522, 2008.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, n. 6, p. 456-469, 2011.

YU, C.-Y.; YIN, B.-C.; ZHANG, W.; CHENG, S.-X.; ZHANG, X.-Z.; ZHUO, R.-X. Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with

improved pH-sensitive drug release property. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 68, n. 2, p. 245-249, 2009.

ZAKERI-MILANI, P.; BARZEGAR-JALALI, M.; AZIMI, M.; VALIZADEH, H. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 1, p. 102-106, 2009.

ZHANG, X.; SUN, M.; ZHENG, A.; CAO, D.; BI, Y.; SUN, J. Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 5, p. 632-638, 2012.

ZHAO, R. Y.; LI, G.; BUKRINSKY, M. I. Vpr-host interactions during HIV-1 viral life cycle. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 6, n. 2, p. 216-229, 2011.