

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos

**ESTUDO TECNOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS COMO ESTRATÉGIA PARA
LIBERAÇÃO DO FÁRMACO ANTI-INFLAMATÓRIO IBUPROFENO**

KARISA CRISTINA RODRIGUES BELOTTO VIRGÍNIO

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA

ARARAQUARA – SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos

**ESTUDO TECNOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS COMO ESTRATÉGIA PARA
LIBERAÇÃO DO FÁRMACO ANTI-INFLAMATÓRIO IBUPROFENO**

KARISA CRISTINA RODRIGUES BELOTTO VIRGÍNIO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e
Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP,
como parte dos requisitos para obtenção do Título de
Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA.

ARARAQUARA – SP

2014

Ficha Catalográfica

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

V817e

Virgínio, Karisa Cristina Rodrigues Belotto

Estudo tecnológico e caracterização físico-química de nanopartículas lipídicas sólidas como estratégia para liberação do fármaco anti-inflamatório ibuprofeno/ Karisa Cristina Rodrigues Belotto Virgínio. — Araraquara, 2014
129 f.

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

Orientador: Anselmo Gomes de Oliveira

1. Nanopartículas lipídicas sólidas. 2. Ibuprofeno. 3. Homogeneização de alta pressão. 4. Ultrasonicação. I. Oliveira, Anselmo Gomes de, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Dedicatória

A Diego Virgínio Silva, meu marido, amigo e companheiro que sempre esteve ao meu lado, inclusive nas horas mais difíceis, incentivando-me a seguir mesmo com tantas dificuldades.

Aos meus pais, exemplo de pessoas e de casal.

Vocês são a minha vida!

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço ao meu Deus que em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, me deu forças e não me deixou fraquejar, nem desistir.

Ao meu marido, companheiro de todas as horas, amigo fiel e dedicado Diego Virgínio Silva, o meu sincero e profundo agradecimento!

Aos meus amados pais Florentino Belotto Moreno e Celma Sueli Rodrigues Belotto. Vocês foram e sempre serão o meu porto seguro, a minha inspiração e o meu combustível para sempre querer melhorar como pessoa e como profissional.

A minha irmã Karen Cristiane Rodrigues Belotto, que, mesmo de longe sempre me ajudou.

Aos pais do meu marido Cícero Virgínio da Silva e Maria Aparecida da Silva, e à minha cunhada Fernanda Virgínio Silva agradeço pela ajuda com palavras sábias nos momentos decisivos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, pela oportunidade e por todo o conhecimento compartilhado durante esses quatro anos de estudo.

Aos colegas do Laboratório de Farmacotécnica, principalmente a Cristiane Pissinato, Vanessa Meyagusku e Lilian Barbassa por terem sido mais que simples colegas de grupo, vocês foram companheiras e cúmplices de todo o meu aprendizado.

Às amigas do Laboratório de Controle de Qualidade Natália Ferri, Ana Cláudia Depaoli e Kamila Rotolo, pelas nossas longas discussões e por toda colaboração.

Aos professores do Departamento de Fármacos e Medicamentos, por todos os ensinamentos e, em especial à Professora Virgínia pela amizade.

Ao Prof. Dr. Sidney, Dr. Hernane Barud e ao Departamento de físico-química do Instituto de Química da UNESP-Araraquara pela utilização dos equipamentos para a realização dos ensaios de análise térmica (DSC e TG). À técnica do laboratório Danúbia pelo auxílio e ajuda na interpretação dos dados das análises térmicas realizadas neste trabalho.

Agradecimentos

Ao Ricardo José Giagio, técnico responsável pelas análises de Difração de Raios X e ao GFQM-IQ pela utilização do Difrátômetro de Raios X.

À Prof. Dra Renata Fonseca Vianna (FCFRP-USP) por permitir a realização de muitas análises em seu laboratório e à técnica do laboratório Patrícia por auxiliar no manuseio do equipamento.

Ao Prof. Dr. Roberto Mendonça Faria e ao Instituto de Física da USP de São Carlos – Departamento de polímeros – por permitir a utilização do Microscópio de Força Atômica e ao Prof. Dr. Marcelo Assunção pelo auxílio para com as análises.

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

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

Aos funcionários da biblioteca que sempre prestaram seus serviços com dedicação. A Neuzinha que sempre cuidou da limpeza do nosso departamento.

À Capes pela bolsa concedida.

Epígrafe

“Não adianta ser luz se não iluminar o caminho dos demais”.

Walt Disney

RESUMO

O ibuprofeno (IBU) é um anti-inflamatório não esteroide com ação analgésica e antipirética sendo amplamente utilizado no tratamento de diversas doenças tais como: cefaleia, dismenorreia, artrite reumatoide e, inclusive no tratamento de doenças neurodegenerativas. O IBU foi selecionado devido à sua solubilidade limitada para ser incorporado às nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). As NLS foram obtidas por homogeneização de alta pressão e ultrassonicação. A triestearina foi utilizada como lipídio sólido e, o poloxamer 188 e a fosfatidilcolina hidrogenada de soja como sistema tensoativo. Os resultados obtidos demonstraram que as técnicas empregadas foram eficazes para a obtenção das NLS. Para ambas as técnicas empregadas, as análises realizadas demonstraram que as dispersões mantiveram-se estáveis, pois os valores dos diâmetros das partículas (diâmetros hidrodinâmicos) não apresentaram grande variação e mantiveram-se abaixo de 400 nm e, a distribuição das partículas demonstrou-se ser heterogênea ($PdI < 0,5$). A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada, para as amostras obtidas pela técnica de ultrassonicação, no dia posterior à obtenção das NLS e depois de 30 dias. Para ambas as análises, os valores da EE foram de aproximadamente 90%, sendo mínima a diferença entre os valores obtidos nos diferentes dias de análise, fato este que confirmou a alta estabilidade das dispersões. Os resultados de calorimetria exploratória diferencial mostraram que o IBU estava mais disperso na FHS do que na triestearina. Análises de difração de raios X (DRX) foram realizadas para avaliar o estado cristalino de cada componente da dispersão e da própria dispersão. Os resultados indicaram que a triestearina, o poloxamer 188 e o IBU apresentaram alta cristalinidade mostrando o alto grau de organização das suas estruturas. A fosfatidilcolina de soja hidrogenada mostrou uma menor cristalinidade. A análise de DRX da dispersão sem o fármaco mostrou uma discreta diminuição na cristalinidade. Os resultados do ensaio de liberação *in vitro* mostraram que as NLS promoveram a liberação sustentada do IBU por período superior a 24 horas quando comparadas com a solução controle utilizada. Os resultados demonstraram que as NLS aqui obtidas são um sistema promissor para a administração do IBU.

ABSTRACT

Ibuprofen (IBU) is a non-steroidal anti-inflammatory analgesic and antipyretic action being widely used in treatment of several diseases such as: headache, dysmenorrhoea, rheumatoid arthritis, and even in the treatment of neurodegenerative diseases. The IBU was selected due to its limited solubility to be incorporated to solid lipid nanoparticles (SLN). The SLN were obtained by high-pressure homogenization and sonication. The tristearin was used as a solid lipid and the poloxamer 188 and hydrogenated soy phosphatidylcholine as surfactant system. The obtained results demonstrated that the techniques employed were effective for obtaining the SLN. For both techniques, the analyses demonstrated that the dispersions remained stable because the values of diameters of the particles (hydrodynamic diameters) did not show great variation and remained below 400 nm and the distribution of the particles has been shown to be heterogeneous ($PdI < 0.5$). The encapsulation efficiency (EE) was determined for samples obtained by the technique of sonication, the day after the obtaining of SLN and after 30 days. For both analyses, the EE values were approximately 90%, being minimal the difference between the values obtained in different days of analysis, which confirms the high stability of dispersions. The results of differential scanning calorimetry showed that IBU was more dispersed in FHS than in tristearin. X-ray diffraction analysis (DRX) were conducted to evaluate the crystalline state of each component of the dispersion and the dispersion. The results indicated that the tristearin, the poloxamer 188 and IBU showed high crystallinity showing the high degree of organization of their structures. The phosphatidylcholine hydrogenated soy showed a lower crystallinity. The DRX analysis of the dispersion without IBU showed a slight decrease in crystallinity. The results of the *in vitro* release test showed that the SLN promoted the sustained release of IBU for more than 24 hours when compared with the control solution used. The results showed that the SLN here obtained are a promising system for the administration of IBU.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura química do ibuprofeno.....	21
Figura 2 –	Configuração estereoquímica do ibuprofeno.....	22
Figura 3 –	Obtenção de NLS por homogeneização de alta pressão.....	27
Figura 4 –	Mecanismo de formação das NLS pela técnica da ultrassonicação.	30
Figura 5 –	Formas de incorporação do fármaco às NLS.....	31
Figura 6 –	Representação da estrutura química da triestearina e da fosfatidilcolina.....	33
Figura 7 –	Representação da estrutura geral dos polímeros em bloco.....	33
Figura 8 –	Etapas do delineamento experimental para a obtenção de NLS por HAP.....	38
Figura 9 –	Varredura da solução contendo IBU solubilizado em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,4.....	42
Figura 10 –	Efeito da variação da proporção dos tensoativos no diâmetro das partículas (DHM) e no índice de polidispersidade (Pdl) quando empregada a técnica de homogeneização de alta pressão com 10 ciclos de homogeneização com pressão de 500 bar.....	49
Figura 11 –	Efeito da variação do número de ciclos de homogeneização e da proporção dos tensoativos no diâmetro das partículas quando utilizada homogeneização de alta pressão com pressão de 500 bar.....	50
Figura 12 –	Efeito do número de ciclos de homogeneização no índice de polidispersidade (Pdl) quando utilizada homogeneização de alta pressão com pressão de 500 bar.....	51
Figura 13 –	Efeito da variação da porcentagem de tensoativo no diâmetro das partículas (DHM) e no índice de polidispersidade (Pdl) para NLS obtidas com 3 ciclos de homogeneização a 500 bar e armazenadas à 4°C. A relaciona o diâmetro das partículas (DHM) e B a polidispersidade (Pdl).....	53
Figura 14 –	Efeito da variação da porcentagem de tensoativo no diâmetro das partículas (DHM) e no índice de polidispersidade (Pdl) para NLS obtidas com 3 ciclos de homogeneização a 500 bar e armazenadas à 25°C. A relaciona o diâmetro das partículas (DHM) e B a polidispersidade (Pdl).....	54

Figura 15 – Efeito da variação da porcentagem de tensoativo no diâmetro das partículas (DHM) e no índice de polidispersidade (Pdl) para NLS obtidas com 5 ciclos de homogeneização a 500 bar e armazenadas à 4°C. A relaciona o diâmetro das partículas (DHM) e B a polidispersidade (Pdl).....	56
Figura 16 – Efeito da variação da porcentagem de tensoativo no diâmetro das partículas e no índice de polidispersidade (Pdl) para NLS obtidas com 5 ciclos de homogeneização e pressão de 500 bar armazenadas à 25°C. A relaciona o diâmetro das partículas (DHM) e B a polidispersidade (Pdl).....	57
Figura 17 – Avaliação, durante 60 dias, do diâmetro (nm) e do índice de polidispersidade (Pdl) de NLS obtidas a partir do emprego de diferentes amplitudes de sonicação e diferentes tempos de duração do processo. A relaciona o diâmetro das partículas e B a polidispersidade (Pdl).....	60
Figura 18 – Avaliação, durante 60 dias, do potencial zeta (mV) de NLS obtidas a partir do emprego de diferentes amplitudes de sonicação e diferentes tempos de duração do processo.....	62
Figura 19 – Ilustração da determinação do ponto isoelétrico de um sistema coloidal.....	64
Figura 20 – Análise das frações de NLS contendo IBU encapsulado e das frações de IBU não encapsulado por espectrofotometria em 223 nm e em 410 nm após filtração em coluna. Dispersão ultrassonicada com 15% de amplitude durante 20 minutos contendo 1% de IBU; Frações de 1 mL.....	66
Figura 21 – Análise das frações de NLS contendo IBU encapsulado e das frações de IBU não encapsulado por espectrofotometria em 223 nm e em 410 nm após filtração em coluna. Dispersão ultrassonicada com 15% de amplitude durante 20 minutos contendo 3% de IBU; Frações de 1 mL.....	67
Figura 22 – Análise das frações de NLS contendo IBU encapsulado e das frações de IBU não encapsulado por espectrofotometria em 223 nm e em 410 nm após filtração em coluna. Dispersão ultrassonicada com 20% de amplitude durante 20 minutos contendo 1% de IBU; Frações de 1 mL.....	69
Figura 23 – Análise das frações de NLS contendo IBU encapsulado e das frações de IBU não encapsulado por espectrofotometria em 223 nm e em 410 nm após filtração em coluna. Dispersão ultrassonicada com 20% de amplitude durante 20 minutos contendo 2% de IBU; Frações de 1 mL.....	70

Figura 24 – Análise das frações de NLS contendo IBU encapsulado e das frações de IBU não encapsulado por espectrofotometria em 223 nm e em 410 nm após filtração em coluna. Dispersão ultrassonicada com 20% de amplitude durante 20 minutos contendo 3% de IBU; Frações de 1 mL.....	71
Figura 25 – Curva analítica do IBU em tampão fosfato de potássio dibásico 0,1M pH 7,4.....	73
Figura 26 – Imagens de microscopia de força atômica das NLS vazias e das NLS contendo 2 e 3% de IBU obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude por 20 minutos.....	78
Figura 27 – Distribuição do diâmetro das partículas de acordo com o determinado por MFA.....	80
Figura 28 – Distribuição das partículas de acordo com o diâmetro obtido por DLS.....	81
Figura 29 – Curvas de DSC dos componentes da dispersão. A e B : primeiro ciclo de aquecimento e resfriamento, respectivamente (A: 25°C a 200°C e B: 200°C a -20°C); C e D : segundo ciclo de aquecimento e resfriamento, respectivamente (C: -20°C a 200°C e D: 200°C a -20°C).....	83
Figura 30 – Curvas de DSC das NLS sem fármaco e contendo 2 e 3% de IBU obtidas 1 dia após a produção das NLS. A e B : primeiro ciclo de aquecimento e resfriamento, respectivamente (A: 25°C a 200°C e B: 200°C a -20°C); C e D : segundo ciclo de aquecimento e resfriamento, respectivamente (C: -20°C a 200°C e D: 200°C a -20°C).....	88
Figura 31 – Curvas de DSC das NLS sem fármaco e contendo 2 e 3% de IBU obtidas 30 dias após a produção das NLS. A e B : primeiro ciclo de aquecimento e resfriamento, respectivamente (A: 25°C a 200°C e B: 200°C a -20°C); C e D : segundo ciclo de aquecimento e resfriamento, respectivamente (C: -20°C a 200°C e D: 200°C a -20°C).....	93
Figura 32 – Curvas de DSC referentes ao primeiro ciclo de aquecimento (de 0 a 100°C) das NLS sem fármaco e contendo 2 e 3% de IBU obtidas no primeiro e no trigésimo dia após a obtenção das NLS.....	96
Figura 33 – Curvas de TG/DTG dos componentes das NLS analisados individualmente e da respectiva mistura física.....	96
Figura 34 – Curvas de TG/TG das NLS sem fármaco e contendo 2 e 3% de IBU obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude durante 20	

minutos. Análises realizadas 24 horas da obtenção das NLS e após 30 dias.....	100
Figura 35 – Difrátogramas dos componentes das NLS analisados individualmente e a respectiva mistura física.....	101
Figura 36 – Difrátogramas das principais formas polimórficas da triestearina.....	103
Figura 37 – Difrátogramas das NLS vazias obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude sonicadas durante 20 minutos. Análises realizadas 24 horas da obtenção das NLS e após 30 dias.....	105
Figura 38 – Difrátogramas das NLS contendo 2% de IBU obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude sonicadas durante 20 minutos. Análises realizadas 24 horas da obtenção das NLS e após 30 dias.....	106
Figura 39 – Difrátogramas das NLS contendo 3% de IBU obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude sonicadas durante 20 minutos. Análises realizadas 24 horas da obtenção das NLS e após 30 dias.....	107
Figura 40 – Perfis de liberação <i>in vitro</i> do IBU a partir das NLS contendo 3% de fármaco obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude sonicadas por 20 minutos e da solução de IBU em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 utilizada como controle. Os valores expressos representam a média de 6 determinações (n=6).....	111
Figura 41 – Perfil de liberação do IBU a partir de NLS contendo 3% de fármaco obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude sonicadas durante 20 minutos obtido de acordo com o modelo de Higuchi.....	113
Figura 42 – Perfil de liberação do IBU a partir de NLS contendo 3% de fármaco obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude sonicadas durante 20 minutos obtido de acordo com o modelo de Korsmeyer-Peppas.....	115
Figura 43 – Perfil de liberação do IBU a partir de NLS contendo 3% de fármaco obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude sonicadas durante 20 minutos obtido de acordo com o modelo de Weibull.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Comparação entre as diferentes técnicas de obtenção das NLS....	26
Tabela 2 –	Concentrações percentuais avaliadas entre os tensoativos.....	37
Tabela 3 –	Parâmetros testados para a técnica de ultrassonicação.....	39
Tabela 4 –	Amplitudes e tempos empregados no processo de obtenção das NLS.....	41
Tabela 5 –	Resultado do teste de ANOVA para se verificar a influência dos parâmetros número de ciclos e proporção entre tensoativos sobre o diâmetro das partículas.....	52
Tabela 6 –	Valores de PZ (mV) das NLS homogeneizadas pela técnica de HAP com 3 e 5 ciclos de homogeneização a 500 bar e armazenadas à 4°C e à 25°C.....	58
Tabela 7 –	Resultado do teste de ANOVA para verificar a influência dos parâmetros amplitude de ultrassonicação e tempo de ultrassonicação sobre o diâmetro das partículas.....	62
Tabela 8 –	Relação entre diâmetro, Pdl e PZ de NLS contendo 1, 3 e 5% de IBU obtidas por ultrassonicação com 15% de amplitude durante 20 minutos.....	68
Tabela 9 –	Relação entre diâmetro da partícula, Pdl e PZ de NLS contendo 1, 2 e 3% de IBU obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude durante 20 minutos.....	72
Tabela 10 –	Parâmetros da validação do método analítico para quantificação de IBU livre após separação por filtração em gel Sephadex G-50.....	73
Tabela 11 –	Relação entre eficiência de encapsulação e capacidade de carga das NLS contendo 1, 2 e 3 % de IBU obtidas com diferentes amplitudes e tempos de sonicação.....	75
Tabela 12 –	Entalpias obtidas nos diferentes ciclos de aquecimento e resfriamento a partir das curvas de DSC dos componentes da dispersão e da mistura física dos mesmos.....	85
Tabela 13 –	Entalpias obtidas nos diferentes ciclos de aquecimento e resfriamento a partir das curvas de DSC de NLS sem fármaco e contendo 2 e 3% de IBU obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude durante 20 minutos. Análises realizadas em 24 horas da obtenção das NLS.....	90
Tabela 14 –	Entalpias obtidas nos diferentes ciclos de aquecimento e resfriamento a partir das curvas de DSC de NLS sem fármaco e	

contendo 2 e 3% de IBU obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude durante 20 minutos. Análises realizadas após 30 dias da obtenção das NLS.....	95
Tabela 15 – Dados dos picos dos difratogramas analisados no dia 1 e 30 dias após a obtenção das NLS sem e com fármaco.....	108
Tabela 16 – Valores médios obtidos após a realização do ensaio de liberação <i>in vitro</i> do IBU a partir das NLS contendo 3% de fármaco obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude sonicadas por 20 minutos (n=6).....	110
Tabela 17 – Interpretação dos mecanismos de liberação de fármacos a partir de diferentes geometrias de acordo com o modelo de Korsmeyer-Peppas.....	114
Tabela 18 – Valores dos coeficientes de determinação (R^2) obtidos de acordo com cada modelo matemático para NLS contendo 3% de IBU obtidas por ultrassonicação.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES	anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CC	capacidade de carga
DHM	diâmetro hidrodinâmico médio
DLS	<i>dynamic light scattering</i>
DSC	calorimetria exploratória diferencial
DRX	difração de raios X em pó
DTG	termogravimetria derivada
EHL	equilíbrio hidrófilo-lipófilo
EE	eficiência de encapsulação
FHS	fosfatidilcolina hidrogenada de soja
HAP	homogeneização de alta pressão
IBU	ibuprofeno
LOD	limite de detecção
LOQ	limite de quantificação
MFA	microscopia de força atômica
NLS	nanopartículas lipídicas sólidas
O/A	óleo em água
PdI	índice de polidispersidade
PEO	óxido de polietileno
PPO	óxido de polipropileno
PZ	potencial zeta
SLN	solid lipid nanoparticles

SNC sistema nervoso central

TG termogravimetria

UV ultravioleta

vis visível

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
mV	milivolts
mL	mililitros
nm	nanômetros
p	valor de p
μm	micrômetros
μg	microgramas
μL	microlitros
λ	comprimento de onda
>	maior que
<	menor que
'	minuto
''	segundo

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 Ibuprofeno.....	21
2.2 Nanopartículas lipídicas sólidas.....	23
2.2.1 Técnicas de obtenção das NLS.....	24
2.2.1.1 Homogeneização de alta pressão.....	27
2.2.1.2 Ultrassonicação.....	29
2.2.2 Formas de distribuição do fármaco na matriz lipídica.....	30
2.2.3 Componentes das NLS utilizados neste estudo.....	31
3 OBJETIVO.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Reagentes, matérias-primas, solventes, equipamentos e acessórios.....	35
4.2 Métodos.....	37
4.2.1 Obtenção das NLS.....	37
4.3 Determinação do diâmetro das partículas.....	39
4.4 Avaliação da estabilidade das NLS.....	40
4.5 Determinação do potencial zeta.....	40
4.6 Determinação da eficiência de encapsulação e da capacidade de carga.....	41
4.6.1 Separação entre as frações contendo IBU encapsulado e não encapsulado.....	41
4.6.2 Eficiência de encapsulação e capacidade de carga.....	43
4.6.3 Validação do método espectrofotométrico em UV-visível para quantificação de ibuprofeno nas NLS.....	43
4.6.3.1 Precisão.....	43
4.6.3.2 Exatidão.....	44
4.6.3.3 Limites de detecção e quantificação.....	44

4.6.3.4 Linearidade.....	45
4.7 Caracterização morfológica das NLS.....	45
4.8 Caracterização físico-química das NLS.....	45
4.8.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	46
4.8.2 Análises termogravimétricas.....	46
4.8.3 Difratometria de raios X (DRX).....	46
4.9 Análise estatística dos resultados obtidos.....	47
4.10 Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do ibuprofeno incorporado às NLS.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Obtenção das NLS.....	49
5.1.1 Amostras obtidas pela técnica de HAP.....	49
5.1.2 Amostras obtidas pela técnica de ultrassonicação.....	59
5.2 Incorporação do ibuprofeno às NLS.....	65
5.2.1 Validação do método de análise quantitativa do ibuprofeno.....	73
5.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação e capacidade de carga.....	74
5.3 Caracterização morfológica das NLS.....	77
5.4 Caracterização físico-química das NLS.....	82
5.4.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	82
5.4.2 Termogravimetria e termogravimetria derivada (TG/DTG).....	96
5.4.3 Difratometria de raios X (DRX).....	101
5.5 Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do ibuprofeno incorporado às NLS....	108
6 CONCLUSÕES.....	118
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	119
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120

1 INTRODUÇÃO

Os problemas como toxicidade, instabilidade química e física, baixa hidrossolubilidade, baixa absorção, alta flutuação na concentração plasmática e extensa metabolização da maioria dos fármacos evidenciam a necessidade de estratégias no desenvolvimento de medicamentos baseados na plataforma de nanotecnologia (MEHNERT E MÄDER, 2012).

Os grupos de pesquisas das áreas de farmacotécnica, tecnologia e nanotecnologia farmacêutica desta Universidade vem, há anos, pesquisando e aprimorando sistemas para a liberação de diferentes classes de fármacos destinados a tratamentos diversos. Dentre os variados sistemas de liberação destacam-se as pesquisas com micropartículas, nano e microemulsões, lipossomas e, mais recentemente, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) (OLIVEIRA et al, 1990; CANTO et al, 1999; DALMORA et al, 1999; LOPES et al, 2004; CORREA et al, 2005; FORMARIZ et al, 2006; FORMARIZ et al, 2007; PESTANA et al, 2008; DA SILVA et al, 2009a; OLIVEIRA et al, 2010; VERISSIMO et al, 2010; FRANZINI et al, 2012; ASSUMPÇÃO et al, 2013; BOTTOS et al, 2013).

Desde a década de 90, com a introdução das NLS para liberação de fármacos, muitos pesquisadores voltaram seus estudos para o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas para a obtenção das NLS (WANG et al, 2012). Atualmente, as NLS são muito empregadas visando, principalmente, melhorar a estabilidade de fármacos e diminuir a sua toxicidade no organismo (MEHNERT E MÄDER, 2012; PARHI E SURESH, 2012).

As NLS podem ser obtidas através de diferentes técnicas como homogeneização de alta pressão, ultrassonicação, microemulsão, entre outras (PARHI E SURESH, 2012). Diferentes classes de fármacos, tais como: anticancerígenos, antipsicóticos, antiparasitários, antibióticos e anti-inflamatórios estão sendo incorporadas às NLS (ALI et al, 2010; BATHOOL et al, 2012; IBRAHIM et al, 2014; KHERADMANDNIA et al, 2010; KUMAR E RANDHAWA, 2013; PATEL E PATRAVALE, 2011; POTTA et al, 2011; RUCKMANI et al, 2006).

O ibuprofeno (IBU) é um anti-inflamatório não-esteroidal, sintetizado na década de 60 por Stewart Adams e, inicialmente foi empregado no tratamento da artrite reumatoide (PATEL et al, 2013; RAINSFORD, 2013a; RAINSFORD, 2013b). Atualmente, é empregado no tratamento de diversas enfermidades, como por exemplo: cefaléias, artrite reumatoide, inflamações em geral e em doenças

neurodegenerativas (como o Alzheimer) (BARADARAN et al, 2013; PINNEN et al, 2011; POTTHAST et al, 2005). Porém, ainda há poucos relatos na literatura de IBU incorporado às NLS e alguns às micropartículas (LONG et al, 2006; SILVA et al, 2007; XIANG et al, 2008; ZHANG et al, 2008; POTTA et al, 2011; PERGE et al, 2012) o que torna o presente estudo desafiador.

Este estudo visou à otimização do processo de obtenção de NLS e a incorporação do IBU, como um fármaco lipofílico, às NLS.

2 REVISÃO DA LITERATURA

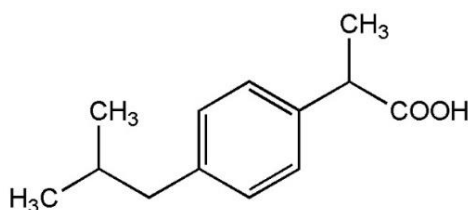
2.1 Ibuprofeno

Sintetizado na década de 60, o ibuprofeno (IBU) surgiu pela necessidade de se ter um anti-inflamatório mais seguro do que o ácido acetil salicílico (Aspirina®) porém, sem apresentar os efeitos gastrintestinais deste último e sem os efeitos adversos mais graves da fenilbutazona e dos corticosteroides (RAINSFORD, 2013a; RAINSFORD, 2013b).

O IBU é um anti-inflamatório não esteroidal, derivado do ácido propiônico e amplamente utilizado no tratamento da dor leve a moderada e nos casos de hipertermia. Também é utilizado para aliviar os sintomas da artrite reumatoide e da osteoartrite, no tratamento da dismenorreia, cefaleias e, mais recentemente, empregado no tratamento de doenças neurodegenerativas (como Alzheimer e Parkinson) e câncer devido a sua capacidade de diminuir o avanço destas doenças (NEWA et al, 2007; RAINSFORD, 2013a). Estudos demonstraram que o IBU é capaz de inibir a inflamação cerebral, reduzir os níveis de proteína A β e melhorar a cognição em modelos de Alzheimer (LIM, et al, 2000; LIM et al, 2001; JANTZEN et al, 2002; YAN et al, 2003; MCKEE et al, 2008; WILKINSON et al, 2012).

A ação do IBU dá-se pela inibição da atividade da ciclo-oxigenase (COX) e, conseqüentemente, pela diminuição da síntese de prostaglandinas tanto no sistema nervoso periférico quanto no sistema nervoso central (VILENCHIK et al, 2012). A figura 1 ilustra a estrutura química do IBU.

Figura 1 – Representação da estrutura química do ibuprofeno

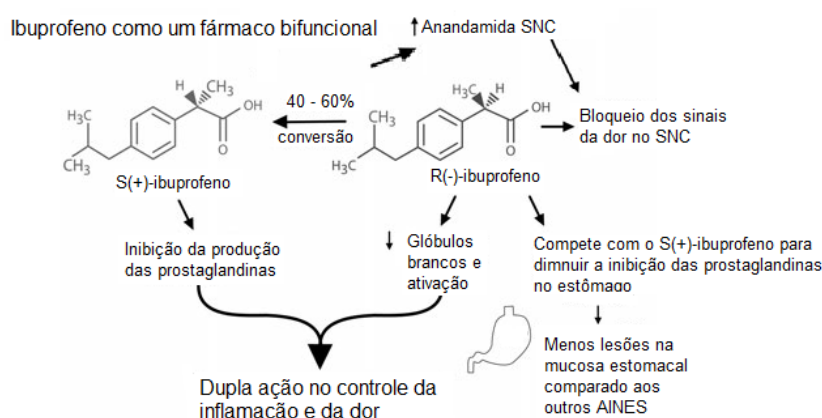


Fonte: POTTHAST et al, 2005.

O IBU não possui polimorfos, entretanto, ele apresenta-se como uma mistura racêmica: R(-)-ibuprofeno e S(+)-ibuprofeno (POTTHAST et al, 2005). O isômero R(-)-ibuprofeno é convertido, após a absorção, no organismo ao isômero S(+)-ibuprofeno (RAINSFORD, 2013b).

Ambos os isômeros contribuem para a ação analgésica do IBU, sendo que o isômero S(+)-ibuprofeno inibe tanto a COX-1 quanto a COX-2. Já o isômero R(-)-ibuprofeno tem pouco efeito sobre as COX (1 e 2), exceto quando há a conversão, já no organismo, do isômero R(-) para o S(+)-ibuprofeno. O isômero R(-)-ibuprofeno também afeta a produção de leucócitos e leucotrienos, fato este que pode contribuir para a ação anti-inflamatória do IBU (RAINSFORD, 2013a). A figura 2 ilustra os isômeros do IBU e suas respectivas contribuições nas ações analgésica e anti-inflamatória.

Figura 2 – Configuração estereoquímica do ibuprofeno



SNC: Sistema Nervoso Central;

AINES: Anti-inflamatórios não-esteroidais.

Fonte: RAINSFORD, 2013b.

O pKa do IBU compreende a faixa de 4,4 a 5,2, variando de acordo com o solvente e com o pH (AVDEEF et al, 1999; BONES et al 2006; DOMANSKA et al, 2009; PATEL et al, 2013), é pouco solúvel em água (21 mg/L; 25°C), sua faixa de fusão é de 75 a 77°C (NEWA et al, 2007; PATEL et al, 2013; POTTHAST et al, 2005) e, de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, o IBU é classificado como classe II de fármacos (baixa solubilidade e alta permeabilidade) (POTTHAST et al, 2005; RIVERA-LEYVA et al, 2012; VIDAL E ALEGRE, 2013).

Quando administrado por via oral, o IBU é rapidamente absorvido e apresenta uma biodisponibilidade de aproximadamente 100% (POTTHAST et al, 2005; NEWA et al, 2007). A sua dose oral diária varia de 200 a 800 mg, podendo

chegar a 1200 mg dependendo do caso (POTTHAST et al, 2005; RAINSFORD, 2013a).

O IBU tem sido amplamente empregado em diversos tratamentos e tem se tornado um fármaco cada vez mais visado por pesquisadores devido ao fato de apresentar, quando administrado isoladamente, poucos efeitos indesejados em órgãos vitais como rins e fígado (RAINSFORD, 2013a). Assim, devido às diversas possibilidades de uso do IBU e aos poucos trabalhos realizados com o IBU na área da nanotecnologia (LONG et al, 2006; SILVA et al, 2007; XIANG et al, 2008; ZHANG et al, 2008; POTTA et al, 2011; PERGE et al, 2012), ele foi selecionado para fazer parte deste estudo como modelo de fármaco lipofílico.

2.2 Nanopartículas lipídicas sólidas

Grande parte dos fármacos disponíveis na terapêutica são caracterizados pela baixa solubilidade em água. A encapsulação destes fármacos em sistemas coloidais é uma alternativa para minimizar o problema da baixa hidrossolubilidade e, adicionalmente, proteger o fármaco da degradação nos fluidos biológicos além da possibilidade de se obter uma liberação controlada (BUNJES E SIEKMANN, 2006; WESTESEN, 2000).

As NLS podem ser compostas por lipídios biodegradáveis e biocompatíveis, sólidos a temperatura ambiente; esta característica origina uma partícula sólida e, este fato contribui para melhorar a estabilidade física e química do fármaco encapsulado (BUNJES, 2011). Além dos lipídios, as NLS são compostas por tensoativos – os quais devem ser biocompatíveis e escolhidos de acordo com a via de administração – e água. A combinação de diferentes tensoativos tende a prevenir, com maior eficiência, a aglomeração entre as partículas (MEHNERT E MÄDER, 2012). A seleção do lipídio ou dos lipídios que irão compor a matriz lipídica é um parâmetro crítico e afeta diretamente o diâmetro final da partícula. Ácidos graxos com cadeias curtas geralmente produzem partículas com menor diâmetro e o aumento do conteúdo lipídico (5-10%) resulta em partículas maiores com maior polidispersidade (AHLIN et al, 1998; POTTA et al, 2011). As NLS tipicamente possuem diâmetros situados na faixa de 50 a 1000 nm (VITORINO et al, 2011).

Entre as principais vantagens apresentadas pelas NLS podem ser citadas (WESTESEN, 2000; BATTAGLIA E GALLARATE, 2012; MEHNERT E MÄDER, 2012; VITORINO et al, 2011):

- A modulação da biodisponibilidade do fármaco;
- A possibilidade de conduzir o fármaco a um sítio-alvo de acordo com a composição da formulação;
- O emprego em diferentes vias de administração;
- As partículas serem biocompatíveis e biodegradáveis, fato este que diminui os efeitos adversos no organismo;
- Os lipídios utilizados na obtenção das NLS são metabolizados no organismo e os produtos de degradação são atóxicos;
- A alta estabilidade física da dispersão;
- A proteção de fármacos lábeis contra a degradação;
- A habilidade de liberação controlada de fármacos;
- A possibilidade de atravessar a barreira hemato-encefálica;
- A possibilidade de produção em larga escala;
- A possibilidade de obtenção de formas secas.

A biodistribuição das partículas coloidais contendo fármaco (como as NLS) é diferente quando comparada com a biodistribuição de um fármaco administrado numa forma farmacêutica convencional. As partículas coloidais podem ser transportadores especiais de fármacos para determinados órgãos ou sítios-alvo. Esta “entrega” do fármaco num sítio específico pode aumentar significativamente a eficácia e segurança da terapia, pois a quantidade de fármaco disponível no sítio de ação seria maior enquanto que a presença dos efeitos indesejáveis seria diminuída (WESTESEN, 2000).

2.2.1 Técnicas de obtenção das NLS

Diferentes técnicas de obtenção de NLS tem sido desenvolvidas desde o início das pesquisas, na década de 90, sobre estes sistemas de liberação de fármacos (BUNJES E SIECKMANN, 2006).

As técnicas podem, basicamente, serem classificadas em dois grupos: aqueles que fornecem alta energia como a homogeneização de alta pressão (HAP) (a frio ou a quente) e a ultrassonicação e aqueles baseados na precipitação de sistemas homogêneos como as microemulsões, soluções orgânicas miscíveis com água. A escolha de determinada técnica depende: das propriedades físico-químicas e

estabilidade do fármaco a ser incorporado, do diâmetro desejado de partícula e da composição da dispersão coloidal (BUNJES E SIECKMANN, 2006).

A tabela 1 compara as diferentes técnicas de obtenção das NLS, listando suas principais vantagens e desvantagens.

Tabela 1 – Comparação entre as principais técnicas de obtenção das NLS

Técnica	Vantagens	Desvantagens	Adequado para a preparação de
HAP a quente	Dispersões estáveis Boa reprodutibilidade É possível uma alta concentração da fase lipídica Solventes orgânicos não são necessários Tecnologia bem estabelecida	Alta temperatura Necessidade de equipamento especial	Fármacos altamente lipofílicos e termoestáveis
HAP a frio	Estresse térmico limitado Particionamento limitado do fármaco durante a homogeneização Solventes orgânicos não são necessários	Necessidade de alta energia Formação de uma dispersão grosseira; Necessidade de equipamento especial	Fármacos lipofílicos (e hidrofílicos) sensíveis à alta temperatura
Precipitação de emulsões solvente-em-água	Podem gerar partículas muito pequenas Aquecimento não é necessário	Uso de solventes orgânicos Baixa concentração lipídica Dificuldade de escalonamento Necessidade de equipamento especial	Fármacos lipofílicos e sensíveis à alta temperatura
Precipitação de microemulsões a quente	Processo simples	Baixa concentração lipídica e baixa capacidade de carga Uso de aquecimento Crescimento das partículas durante armazenamento Geralmente requer processo adicional	Fármacos lipofílicos
Precipitação de solução orgânica	Processo simples e sem emprego de aquecimento	Uso de solventes orgânicos Concentração lipídica muito baixa	Fármacos lipofílicos sensíveis à alta temperatura

Fonte: BUNJES E SIEKMANN, 2006.

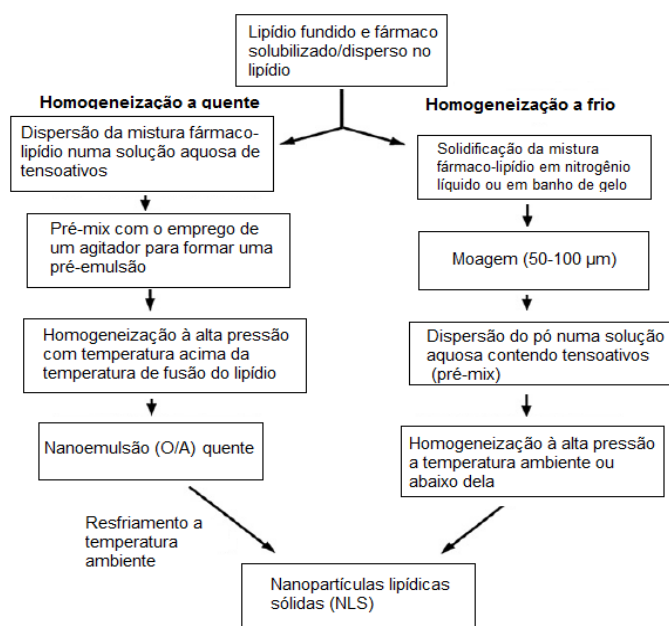
2.2.1.1 Homogeneização de alta pressão

A homogeneização de alta pressão (HAP) tem sido empregada há anos na produção de nanoemulsões para nutrição parenteral e, em contraste com as outras técnicas pode ser facilmente utilizada em escala industrial na maioria dos casos (MEHNERT E MÄDER, 2012).

Os homogeneizadores a alta pressão impulsionam o líquido (emulsão, pré-emulsão) com alta pressão (100 – 2000 bar) através de um orifício ínfimo (na faixa de poucos micrômetros). A presença de alta tensão de cisalhamento e as forças de cavitação quebram as partículas à grandeza de nanômetros (MEHNERT E MÄDER, 2012).

O processo de homogeneização à alta pressão pode ocorrer a quente ou a frio (figura 3). Em ambas as técnicas o fármaco é solubilizado no lipídio fundido e aquecido de 5 a 10°C acima do ponto de fusão do lipídio (MÜLLER et al, 2000).

Figura 3 – Obtenção de NLS por homogeneização de alta pressão



Fonte: MEHNERT E MÄDER, 2012.

A técnica mais empregada é a homogeneização a quente onde a mistura fármaco-lipídio fundido é dispersa sob agitação (vórtex, agitação sob alta velocidade como Ultra Turrax ou ultrassonicação) numa solução aquosa contendo tensoativos, estando esta última à mesma temperatura da mistura fármaco-lipídio fundido

(MÜLLER et al, 2000; BUNJES E SIEKMANN, 2006; MEHNERT E MÄDER, 2012). A qualidade da pré-emulsão afeta diretamente a qualidade do produto final, sendo indicada a obtenção de uma pré-emulsão com gotículas na faixa de poucos micrômetros (MEHNERT E MÄDER, 2012). A pré-emulsão é homogeneizada sob alta pressão e o produto quente, resfriado, a temperatura ambiente ou em banho de gelo, para que o lipídio solidifique e forme as NLS (BUNJES E SIEKMANN, 2006; MÜLLER et al, 2000).

O diâmetro médio das NLS obtidas por homogeneização de alta pressão a quente está na faixa de 50 a 400 nm, porém este valor pode variar de acordo com a composição da dispersão, dos constituintes da matriz lipídica; do tipo e da proporção dos agentes tensoativos assim como os parâmetros do processo de homogeneização (BUNJES E SIEKMANN, 2006).

Geralmente, altas temperaturas resultam em partículas com diâmetros menores devido à diminuição da viscosidade da fase interna. Entretanto, as altas temperaturas podem favorecer a degradação do fármaco. Os ciclos de homogeneização podem se repetir por várias vezes e, deve-se considerar que, a alta pressão empregada na homogeneização aumenta a temperatura da amostra (aproximadamente 10°C por 500 bar) na maioria dos equipamentos disponíveis. Na maior parte dos casos, 3 a 5 ciclos de homogeneização sob 500 – 1500 bar são suficientes para a obtenção de NLS com os diâmetros desejados. Com o aumento do número de ciclos ou da pressão, frequentemente, há o aumento do diâmetro da partícula, fato este que é devido à coalescência de partículas que ocorre como resultado da elevada energia cinética das partículas (MEHNERT E MÄDER, 2001).

Em contraste com a homogeneização a quente, a homogeneização a frio é realizada com os lipídios no estado sólido e representa, portanto, uma moagem sob alta pressão de uma suspensão.

A primeira etapa é idêntica à da homogeneização a quente e inclui a solubilização ou dispersão do fármaco no lipídio fundido. As etapas seguintes são diferentes. A mistura fármaco-lipídio fundido é rapidamente resfriada com o auxílio de banho de gelo ou de nitrogênio líquido. O resfriamento rápido favorece a distribuição homogênea do fármaco entre a matriz lipídica. O produto solidificado é moído até se obter micropartículas (50 – 100 µm). O emprego de baixas temperaturas no processo de moagem aumenta a fragilidade do lipídio e favorece a quebra das partículas. As micropartículas lipídicas sólidas obtidas são dispersas numa solução aquosa

contendo tensoativos. Esta pré-suspensão é submetida ao processo de homogeneização de alta pressão sob temperatura ambiente ou abaixo dela (BUNJES E SIEKMANN, 2006; MEHNERT E MÄDER, 2001; MÜLLER et al, 2001).

A homogeneização a frio foi desenvolvida na tentativa de superar os seguintes problemas enfrentados com a homogeneização a quente (BUNJES E SIEKMANN, 2006; MEHNERT E MÄDER, 2001):

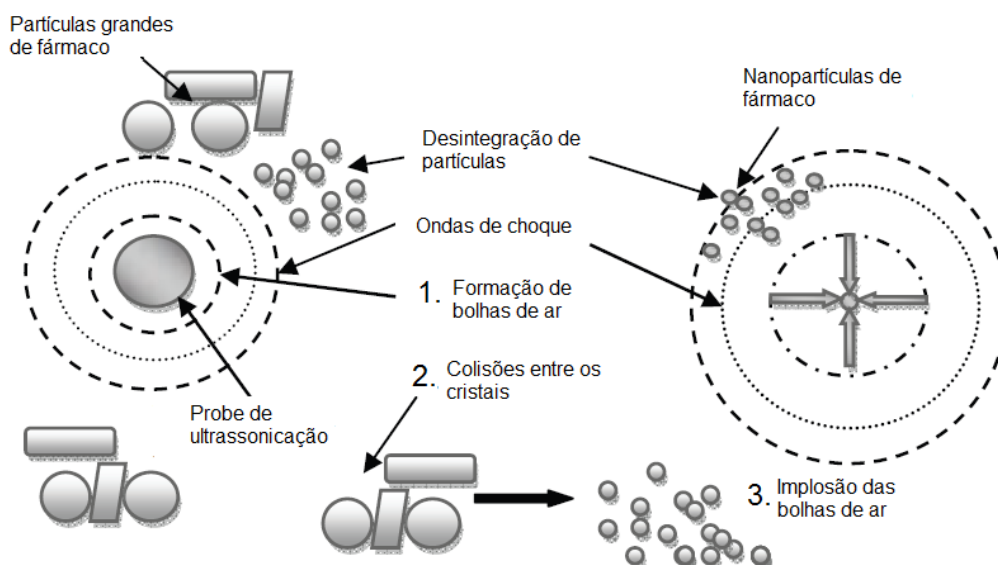
- A alta temperatura que induz a degradação do fármaco;
- Distribuição do fármaco na fase aquosa durante o processo de homogeneização;
- Complexidade na etapa de cristalização (não cristalização, polimorfismos).

Comparando-se as duas técnicas, na homogeneização a frio observa-se a presença de partículas maiores com uma distribuição mais heterogênea (MEHNERT E MÄDER, 2001). Como o próprio processo de homogeneização de alta pressão usualmente leva ao aumento da temperatura, o processo de homogeneização a frio não necessariamente garante que as partículas lipídicas estarão em seu estado sólido durante o processo, principalmente quando não há um sistema de refrigeração para manter a temperatura no nível desejado (BUNJES E SIEKMANN, 2006). Sempre que possível, é preferível optar pelo processo de homogeneização a quente ao processo de homogeneização a frio.

2.2.1.2 Ultrassonicação

A ultrassonicação é uma técnica de dispersão baseada no mecanismo de cavitação que dispersa o lipídio fundido em gotículas na fase contínua como demonstrado na figura 4 (PARHI E SURESH, 2012).

Figura 4 – Mecanismo de formação das NLS pela técnica da ultrassonicação



1. Ondas sonoras de alta frequência que se propagam no meio aquoso resultando em bolhas de cavitação que geram altas forças de cisalhamento as quais reduzem o diâmetro das gotículas. 2 e 3. Na zona de dispersão, a implosão das bolhas de ar causa intensas ondas de choque no meio circundante que resultam na formação de “jatos” com alta velocidade os quais causam a redução do diâmetro das gotículas até a faixa nanométrica.

Fonte: PARHI E SURESH, 2012.

O processo de homogeneização pela técnica de ultrassonicação começa com a adição do fármaco ao lipídio fundido seguida pela adição da fase aquosa (contendo tensoativos) à mesma temperatura da mistura fármaco-lipídio fundido. Após a adição da fase aquosa procede-se a homogeneização por ultrassonicação (PARHI E SURESH, 2012).

Para prevenir a recristalização durante o processo de ultrassonicação, a temperatura deve ser mantida a pelo menos 5°C acima da temperatura de fusão do lipídio. A nanosuspensão obtida deve sofrer algum tipo de tratamento (como centrifugação) para a retirada do resíduo de metal proveniente da probe de sonicação (PARHI E SURESH, 2012).

2.2.2 Formas de distribuição do fármaco na matriz lipídica

Conforme descrito na literatura, há pelo menos três maneiras de o fármaco se distribuir nas NLS (figura 5). A primeira está relacionada com a similaridade entre as características físico-químicas do fármaco e da matriz lipídica. Neste caso, ocorre uma dispersão molecular homogênea do fármaco na matriz lipídica das NLS (figura

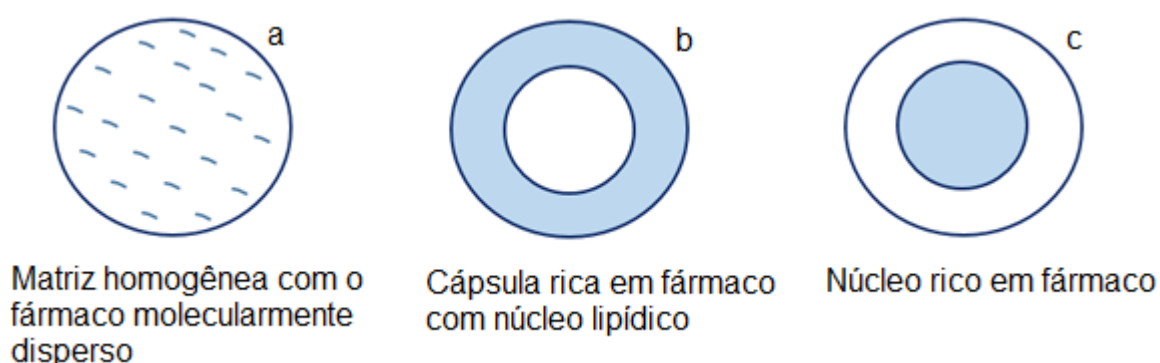
5a). Neste caso, ocorre a liberação do fármaco de forma contínua, lenta e regular a partir das NLS. Esta forma de distribuição dá-se principalmente quando é utilizada a técnica de homogeneização a frio sem o uso de tensoativos (MÜLLER et al, 2000; KUMAR E RANDHAWA, 2013).

As outras duas formas de distribuição do fármaco na matriz lipídica ocorrem devido às diferenças nas propriedades físico-químicas do fármaco e da matriz lipídica.

Quando o fármaco apresenta lipofilia menor do que a da matriz lipídica, há a formação de um gradiente de concentração do fármaco, crescente do interior para a superfície da matriz lipídica (figura 5b). Neste caso, ocorre liberação imediata do fármaco da superfície da matriz, causando o chamado efeito “burst” (MÜLLER et al, 2000).

Quando o fármaco é mais lipofílico do que a matriz lipídica, o gradiente de concentração se dá no sentido inverso, proporcionando maior concentração de fármaco na região mais interna da matriz lipídica (figura 5c). A baixa liberação inicial do fármaco seguida pelo aumento da liberação em tempos posteriores é indicativo de que a maior proporção de fármaco esteja localizada na região central do núcleo lipídico das NLS (MÜLLER et al, 2000).

Figura 5 – Formas de incorporação do fármaco às NLS



Fonte: MÜLLER et al, 2000.

2.2.3 Componentes das NLS utilizados neste estudo

As NLS são compostas, basicamente, por um lipídio sólido à temperatura ambiente, por tensoativos e fármaco. Neste estudo, adotou-se a triestearina, como lipídio sólido, e o poloxamer 188 e a fosfatidilcolina hidrogenada de soja (FHS) compuseram o sistema tensoativo.

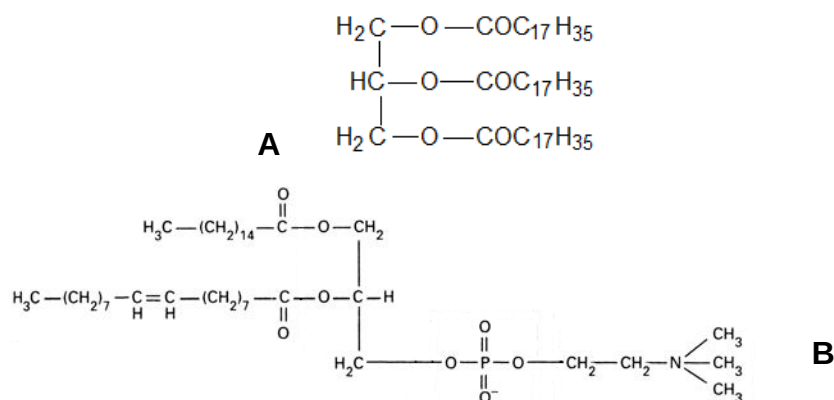
A triestearina (figura 6A) é um triglicerídeo de cadeia carbônica longa, atóxico, biodegradável, apresenta faixa de fusão de 50 a 72°C e é sólido à temperatura ambiente. Este lipídio tem sido extensivamente empregado na obtenção de NLS como sistema de liberação de diversas classes de fármacos visando diferentes vias de administração e, por esta razão e pelas características relatadas, além da disponibilidade, ele foi selecionado para compor a fase lipídica sólida da dispersão deste estudo (CHATTOPADHYAY et al, 2007; ESPOSITO et al, 2008; KIM et al, 2010; MANJUNATH E VENKATESWARLU, 2005; MEI et al, 2003; NAIR et al, 2012; NOACK et al, 2012; RAWAT et al, 2011; VENKATESWARLU E MANJUNATH, 2004).

A FHS (figura 6B) consiste de uma mistura de fosfolípidos constituídos por uma extremidade hidrofóbica formada por duas longas cadeias de ácidos graxos e outra extremidade hidrofílica formada pelos grupos fosfato, glicerol e colina. Devido ao mimetismo da FHS à fosfatidilcolina presente naturalmente no organismo humano, ela foi selecionada para compor o sistema tensoativo da dispersão a ser obtida neste estudo. A FHS apresenta características lipofílicas predominantes com EHL situado na faixa de 3-4 e caráter zwitteriônico pH-dependente. Outras características favoráveis ao uso da FHS em sistemas de liberação de fármacos são a sua baixa toxicidade, sua biocompatibilidade, ser biodegradável e poder ser administrada pela via parenteral (BRUXEL et al, 2012; DATE E NAGARSENKER, 2008; MEHNERT E MÄDER, 2001).

O poloxamer 188 é um co-polímero não iônico de bloco do tipo “ABA” constituído por um bloco central hidrofóbico composto por óxido de polipropileno (PPO). O bloco central apresenta-se circundado por blocos hidrofílicos compostos de óxido de polietileno (PEO) (figura 7). Para o poloxamer 188 as unidades de PEO representam aproximadamente 81% do peso molecular e as unidades de PPO cerca de 19%, fato este que determina sua alta hidrofília (EHL 29) (KIBBE, 2000; FRIEDRICH et al, 2008; REMINGTON, 2006). Os principais tipos destes co-polímeros de bloco são empregados em formulações farmacêuticas como tensoativos, emulsificantes, solubilizantes e dispersantes (PATEL et al, 2009). Assim, o poloxamer 188 apresenta importantes características, tais como: baixa toxicidade, capacidade de transpor barreiras biológicas, capacidade de inibir os transportadores de efluxo de fármacos, capacidade de modificar superfícies, capacidade de aumentar o “uptake” celular, promover uma estabilização estérica do sistema coloidal evitando agregação

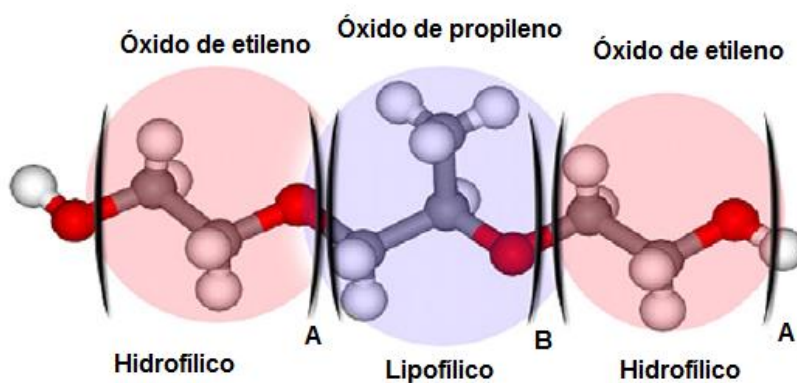
das partículas, entre outras (BATRAKOVA et al, 2008; HUANG et al, 2008; YAN et al, 2010).

Figura 6 – Representação da estrutura química da triestearina e da fosfatidilcolina



A: triestearina; **B:** fosfatidilcolina hidrogenada de soja

Figura 7 – Representação da estrutura geral dos co-polímeros de bloco



Para o poloxamer 188 considerar A=80 e B = 27.

Fonte: BATRAKOVA et al, 2008.

3 OBJETIVO

Desenvolver e caracterizar nanopartículas lipídicas sólidas contendo ibuprofeno como fármaco lipofílico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A etapa de desenvolvimento das NLS foi realizada no laboratório de Tecnologia Farmacêutica do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara, enquanto que a etapa de caracterização foi realizada nos Laboratórios de Difração de Raios X do Departamento de Físico-Química e no Laboratório de Materiais Fotônicos do Departamento de Química Geral e Inorgânica, ambos do Instituto de Química da UNESP – Araraquara e no Laboratório de Microscopia de Força Atômica do Instituto de Física da USP – São Carlos.

4.1 Reagentes, matérias-primas, solventes, equipamentos e acessórios.

As matérias-primas empregadas neste estudo foram:

- Ibuprofeno (Henrifarma);
- Fosfatidilcolina hidrogenada de soja, Epikuron 200SH[®] (Lucas Meyer);
- Membrana sintética de acetato de celulose 0,45 μm (Sigma Aldrich[®]);
- Co-polímero de bloco, poloxamer 188 (Sigma Aldrich);
- Sephadex G50 (GE Healthcare);
- Triestearina, Tristearin[®] (Sigma Aldrich).

Os acessórios utilizados foram: micropipetas automáticas com volumes ajustáveis, balões volumétricos, béqueres, calibrados segundo as normas da Rede Brasileira de Calibração (RBC).

Os equipamentos laboratoriais utilizados foram:

- Analisador de partículas Zetasizer Nano ZS e Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments);
- Analisadores térmicos DSC 2910 Modulated DSC (TA Instruments) e SDT Q600 (TA Instruments);
- Balanças analíticas AW220 (Shimadzu) e AB265-5/Fact (Mettler Toledo);
- Banho de ultrassom Ultrasonic Cleaner (Unique);
- Centrífugas Excelsa II modelo 206 BL (Fanem) e Spectrafuge 16M (Labnet);

- Difratorômetro de Raios X D5000, Diffrac Plus XRD Commander (Siemens);
- Espectrofotômetro UV-vis HP8453 (Hewlett-Packard);
- Homogeneizador de alta pressão NanoDeBEE com nozzle Z8 (BEE International);
- Liofilizador Savant, MicroModulyo-115 (Thermo Scientific);
- Microette Plus modelo 0700-1251 (HANSON);
- Microscópio de Força Atômica Dimension Icon (Bruker);
- pHmetro DM-23 (Digimed);
- Purificador de água (Milli-Q Plus - Millipore®);
- Termômetro Inconterm;
- Ultrassonicador Q700 com probe de sonicação modelo Microtip de 1/8" (3,2 mm), (Qsonica, LLC).

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção das NLS

Tanto no emprego de HAP ou de ultrassonicação, primeiramente, uma pré-emulsão foi obtida através do aquecimento das fases oleosa e aquosa separadamente até a temperatura de 75°C para garantir a fusão do lipídio, com ponto de fusão aproximado de 65°C. Em seguida, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa com leve agitação manual por aproximadamente 1 minuto. A pré-emulsão foi introduzida no homogeneizador ou ultrassonicador e então processada conforme condições pré-estabelecidas. As dispersões obtidas pela técnica de ultrassonicação foram resfriadas à temperatura ambiente para evitar o processo de gelificação (MEHNERT E MÄDER, 2012) e, após foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos para a retirada de possível resíduo de titânio proveniente da probe do ultrassonicador.

A técnica de homogeneização à alta pressão foi, inicialmente, utilizada para a obtenção das NLS.

Para os estudos iniciais, fixou-se a concentração do lipídio em 5% e a concentração da mistura dos tensoativos em 2,5%.

A triestearina (figura 6A) foi usada como lipídio e para compor o sistema tensoativo foram utilizados fosfatidilcolina hidrogenada de soja (FHS) (figura 6B) e o co-polímero de bloco, o poloxamer 188 (figura 7).

O delineamento experimental e a composição das dispersões estão resumidos na tabela 2.

Tabela 2 – Concentrações percentuais avaliadas entre os tensoativos

Dispersão de NLS	Lipídio (% m/m)	Concentração de tensoativos (% m/m)	Proporção FHS:Poloxamer 188
1	5	2,5	1:9
2	5	2,5	2:8
3	5	2,5	3:7
4	5	2,5	4:3
5	5	2,5	5:5
6	5	2,5	6:4
7	5	2,5	7:3
8	5	2,5	8:2
9	5	2,5	9:1

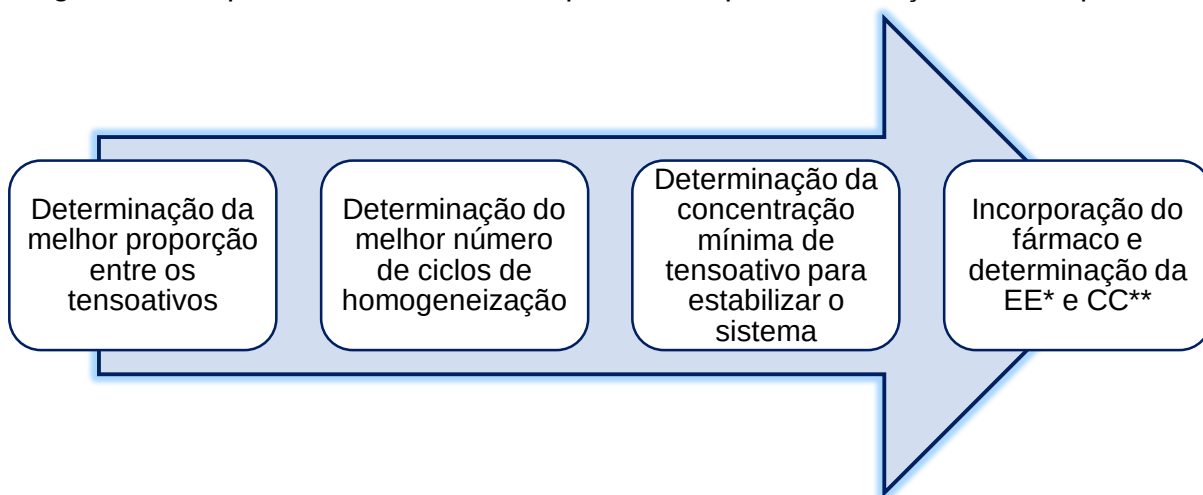
Para os testes acima relacionados, foi utilizada a técnica de HAP empregando-se 10 ciclos de homogeneização sob pressão de 500 bar no homogeneizador NanoDeBEE (BEE Instruments).

Em seguida, passou-se então à determinação das melhores condições para o processo de homogeneização utilizando o homogeneizador de alta pressão. Para tanto, o parâmetro pressão foi mantido fixo em 500 bar e o número de ciclos variado em: 3, 5, 8, 10, 12, 15, 18 e 20 ciclos.

Após, determinou-se a concentração mínima de tensoativos necessária para estabilizar o sistema, utilizando-se a melhor proporção anteriormente estabelecida. As porcentagens testadas foram 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 e 5.

A figura 8 ilustra as etapas do delineamento experimental realizadas.

Figura 8 – Etapas do delineamento experimental para a obtenção de NLS por HAP



*EE: eficiência de encapsulação

**CC: capacidade de carga

Na sequência, foi estudada a incorporação do fármaco nas NLS.

Neste estudo, selecionou-se o IBU como fármaco lipofílico. Testes iniciais com 1% de IBU foram realizados. A concentração de IBU foi sempre relacionada com a massa do lipídio na dispersão e, a quantidade de IBU não foi subtraída da massa de lipídio.

Os resultados destes testes iniciais foram satisfatórios porém, problemas técnicos ocorreram e impossibilitaram a continuidade do estudo com o emprego da técnica de HAP.

A técnica de ultrassonicação foi selecionada para a sequência do estudo.

Para avaliar as melhores condições do processo de ultrassonicação, foram mantidas a concentração inicial de 5% de triestearina, a proporção estabelecida como adequada entre o tensoativo e a porcentagem da mistura dos tensoativos, previamente estabelecidas no estudo onde empregou-se a técnica de HAP.

Entretanto, foram testadas diferentes amplitudes com diferentes tempos de duração do processo de ultrassonicação. As amplitudes testadas foram de 10%, 15%, 20% e 25%, para a probe de sonicação modelo Microtip de 1/8" (3,2 mm), e os tempos avaliados foram: 10, 15 e 20 minutos. Em todos os testes empregou-se o modo de sonicação "com pulso", sendo: 1 minuto de sonicação e 30 segundos de intervalo, conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros testados para a técnica de ultrassonicação

Amplitude (%)	Tempo (minutos)		
10	10	15	20
15	10	15	20
20	10	15	20
25	10	15	20

4.3 Determinação do diâmetro das partículas

Para a determinação do diâmetro das partículas empregou-se a técnica de espalhamento dinâmico de luz (*dynamic light scattering* - DLS) com o uso do equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) o qual determina o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas.

As amostras analisadas no Zetasizer Nano ZS ou no Zetasizer Nano ZS90 foram previamente diluídas com água ultrapura na proporção de 1:10 e colocadas em cubetas apropriadas para leitura.

As análises foram realizadas à temperatura ambiente com o feixe de luz (He-Ne laser) posicionado num ângulo de 173° para o Nano ZS e de 90° para o Nano ZS90. Os resultados foram reportados de acordo com a intensidade (%) da distribuição das partículas e o diâmetro dado como diâmetro hidrodinâmico médio das partículas (nm). A mesma preparação, nas mesmas condições, também foi utilizada para determinar o índice de polidispersidade (Pdl) das NLS, o qual relata o quão homogêneo ou heterogêneo é a dispersão das NLS. Valores de Pdl menores que 0,3 são indicativos de formulações homogêneas, denominadas também por monomodais.

Valores entre 0,3 e 0,5 são desejáveis, porém com uma estreita diferença entre os diâmetros das partículas presentes na dispersão. Porém, valores de Pdl acima de 0,5 são indicativos de possível agregação de partículas e de uma distribuição de partículas muito polidispersa (BATHOOL et al, 2012; MALVERN, 2012, MOHAMMADPOUR et al, 2012; YUSUF et al, 2012;).

Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos como média±desvio padrão.

4.4 Avaliação da estabilidade das NLS

A estabilidade física da dispersão das NLS foi avaliada através do acompanhamento da alteração da viscosidade da dispersão, do diâmetro das partículas, do Pdl e separação de fases.

Também foi realizado um estudo prévio para se estabelecer o efeito da temperatura de armazenamento sobre as NLS; para tanto, as dispersões foram mantidas à 4°C e à 25°C, sempre ao abrigo da luz. Estabelecida a melhor temperatura de armazenamento, as amostras contendo IBU, foram assim armazenadas.

As amostras foram acompanhadas por um período máximo de 60 dias. As análises foram realizadas em triplicatas nos tempos de 24 horas, 7 e 30 dias para as amostras obtidas por HAP e de 24 horas, 7, 30 e 60 dias para as amostras obtidas por ultrassonicação, após a obtenção das NLS. Os resultados foram expressos como média±desvio padrão.

4.5 Determinação do potencial zeta

Para se determinar o potencial zeta (PZ) das NLS, foram utilizadas alíquotas de 200 µL da diluição utilizada para a determinação do diâmetro das partículas e, à esta diluição foram acrescentados 800 µL de água ultrapura. O total resultante de 1 mL foi introduzido numa cubeta específica para determinação do PZ. A referida diluição fez-se necessária para atender satisfatoriamente aos requisitos de análise solicitados pelos equipamentos Zetasizer Nano ZS e Zetasizer Nano ZS90. As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos como média±desvio padrão com valores em módulo, pois PZ pode ser positivo ou negativo.

4.6 Determinação da eficiência de encapsulação e capacidade de carga

As dispersões utilizadas nos ensaios para determinação da eficiência de encapsulação (EE) e capacidade de carga (CC) foram obtidas a partir do emprego de duas diferentes amplitudes de sonicação conforme mostrado na tabela 4.

Tabela 4 – Amplitudes e tempos empregados no processo de obtenção das NLS

Amplitude (%)	Tempo (minutos)	Pulso	Fármaco (%)
15%	20	1' com pulso, 30'' de intervalo	1; 3 e 5
20%	20	1' com pulso, 30'' de intervalo	1; 2 e 3

Inicialmente, empregou-se 15% de amplitude durante 20 minutos no modo “com pulso” e, num segundo momento, empregou-se 20% de amplitude durante 20 minutos, também no modo “com pulso”. A porcentagem de fármaco a ser encapsulada variou de 1 a 5% e, como relatado no item 4.2.2, esta porcentagem sempre foi relacionada à porcentagem do lipídio na dispersão.

4.6.1 Separação entre as frações contendo IBU encapsulado e não encapsulado

Para se determinar a EE, as dispersões foram previamente separadas por filtração em coluna com o emprego de Sephadex G-50 e as frações separadas (1 mL) foram analisadas por espectrofotometria em UV-visível (HP8453, Hewlett-Packard) medindo-se o espalhamento de luz em $\lambda=410$ nm.

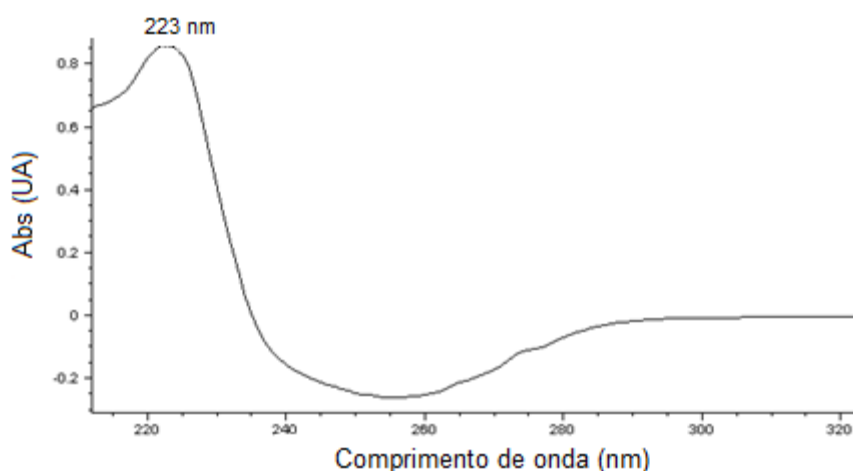
As colunas foram montadas usando-se 6 g de Sephadex G-50 hidratados com água ultrapura durante 24 horas. Após a hidratação, uma coluna com 30 cm de altura e 1,5 cm de diâmetro foi preenchida com o Sephadex G-50 hidratado e condicionada com tampão fosfato de potássio dibásico 0,1 mol/L pH 7,4.

Para o processo de separação, foram medidos 500 μ L de amostra de NLS e a eles acrescidos 2,0 mL de tampão fosfato de potássio dibásico 0,1 mol/L pH 7,4 e aplicados na coluna para separação. O tampão fosfato de potássio dibásico 0,1 mol/L pH 7,4 foi empregado como fase móvel no processo de separação. Frações seriadas de 1 mL foram coletadas e, à cada fração foi adicionado 1 mL de tampão fosfato de potássio dibásico 0,1 mol/L pH 7,4 para se proceder a leitura do espalhamento de luz

ou da absorção. Foram coletadas 50 frações. Para a detecção e quantificação, foram utilizados os comprimentos de onda em 223 nm para a se detectar e quantificar o fármaco não encapsulado e em 410 nm para se detectar as frações das NLS (com fármaco encapsulado).

Para a análise do fármaco não encapsulado, a validação do método analítico e posterior quantificação do IBU foi realizada após a execução de um espectro de varredura de uma solução contendo IBU dissolvido em tampão fosfato de potássio dibásico 0,1 mol/L pH 7,4, onde verificou-se que em 223 nm ocorria a maior absorbância (figura 9).

Figura 9 – Varredura da solução contendo IBU solubilizado em tampão fosfato de potássio dibásico 0,1 mol/L pH 7,4



Após a separação e identificação das frações de fármaco livre e fármaco encapsulado, todas frações de fármaco livre foram reunidas em um único recipiente para posterior quantificação por método espectrofotométrico devidamente validado e assim, ter determinada a EE. Este método de determinação da EE é conhecido como determinação indireta; o método de determinação direta é quando se determina a massa de fármaco encapsulado, ou seja, rompem-se as NLS e quantifica-se o fármaco que há dentro das NLS. Porém, a determinação direta do IBU não foi possível de ser realizada devido à falta de sensibilidade (limite de quantificação alto) do método previamente validado com clorofórmio:metanol.

4.6.2 Eficiência de encapsulação e capacidade de carga

A EE e a CC foram determinadas de acordo com as equações 1 e 2, respectivamente (PARHI E SURESH, 2012):

$$EE (\%) = \frac{\text{massa inicial de IBU} - \text{massa de IBU livre}}{\text{massa inicial de IBU}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

$$CC (\%) = \frac{\text{massa inicial de IBU} - \text{massa de IBU livre}}{\text{massa total de lipídio}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

A massa de IBU livre foi determinada a partir da leitura da absorção em $\lambda = 223$ nm das frações separadas pela filtração em coluna e reunidas num único recipiente.

4.6.3 Validação do método espectrofotométrico em UV-Visível para quantificação de ibuprofeno nas NLS

A validação da metodologia para quantificação de IBU livre nas NLS foi realizada de acordo com as normas da Resolução nº 899 de 2003 da ANVISA e os seguintes parâmetros foram analisados: precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade. As leituras foram realizadas em $\lambda_{\text{max}} = 223$ nm.

4.6.3.1 Precisão

Segundo normas da ANVISA “precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra” (BRASIL, 2003).

Para a determinação da precisão para a análise da fração de IBU livre foram analisadas amostras controles em três concentrações diferentes: concentração baixa (1,5 µg/mL), concentração média (10 µg/mL) e concentração alta (20 µg/mL). As análises realizadas no mesmo dia determinaram a precisão intra-dia com um n=3 para cada concentração e, as análises realizadas em três dias diferentes e consecutivos determinaram a precisão inter-dia com n=9 para cada concentração. Os

resultados foram expressos como média, desvio padrão e desvio padrão relativo (%) dos resultados das análises.

4.6.3.2 Exatidão

A exatidão de um método analítico é demonstrada a partir da proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor real.

A exatidão foi determinada a partir de 9 determinações para cada amostra controle, sendo as mesmas utilizadas no ensaio de precisão. A equação 3 corresponde à determinação da exatidão:

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

4.6.3.3 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que possa ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais determinadas, devendo ser de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base.

O limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito, presente em uma amostra, que possa ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais determinadas, devendo ser, no mínimo cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no comprimento de onda do fármaco.

Esses parâmetros podem ser determinados através da análise de soluções-padrão contendo concentrações conhecidas e decrescentes de IBU, até o menor nível detectável e quantificável com precisão e exatidão aceitáveis, bem como pelas equações:

$$\text{LOD} = \frac{\text{DPa} \times 3}{\text{IC}} \quad \text{Equação 4}$$

$$\text{LOD} = \frac{\text{DPa} \times 3}{\text{IC}} \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

D_{Pa} é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco;

IC é a inclinação da curva de calibração.

4.6.3.4 Linearidade

Linearidade pode ser definida como a capacidade de um método analítico tem e demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado, sendo que o coeficiente de correlação (r^2) deve ser igual ou superior a 0,99, segundo as normas da ANVISA (BRASIL, 2003).

A determinação da linearidade foi realizada a partir da construção de uma curva analítica de soluções-padrão de IBU em tampão fosfato de potássio dibásico 0,1 mol/L pH 7,4 em diferentes concentrações conhecidas.

A curva analítica representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito, representada neste estudo pela absorbância gerada. Assim, foi estabelecida uma correlação linear entre concentração e absorbância.

4.7 Caracterização morfológica das NLS

As NLS contendo ou não IBU foram caracterizadas morfológicamente através da microscopia de força atômica (MFA). As análises foram realizadas em microscópio de força atômica modelo Dimension Icon (Bruker). As amostras foram previamente diluídas com água ultrapura na proporção de 1:100 e, 5 µL da amostra diluída foram colocados sobre uma placa de mica deixando-se secar à temperatura ambiente. A placa de mica contendo a amostra foi colocada no microscópio e analisada no modo “tapping”. O tratamento das imagens foi realizado com o uso do software NanoScope versão 8.1SR3sr4.

4.8 Caracterização físico-química das NLS

A caracterização físico-química das NLS contendo ou não fármaco foi realizada por análises térmicas: calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria; e difratometria de raios X.

4.8.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Para as análises de DSC, 5 mg das amostras liofilizadas sem crioprotetor foram pesados e colocados em cadinhos de alumínio os quais foram então selados e colocados no calorímetro DSC Q100 (TA Instruments). Um cadinho vazio selado foi utilizado como referência. As análises foram realizadas em atmosfera de Nitrogênio (N_2) com fluxo de 70 mL min e as razões de aquecimento e resfriamento foram de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. As taxas de aquecimento foram de 0°C a 200°C seguidas de resfriamento até -20°C e, posteriormente, aquecimento até 200°C e resfriamento até -20°C , respectivamente. Neste estudo, adotou-se como evento exotérmico a disposição dos picos indicados no sentido ascendente. Os resultados foram analisados pelo software TA Universal Analysis.

4.8.2 Análises termogravimétricas

Para as análises termogravimétricas (TG) e as termogravimétricas derivadas (DTG) foram pesados 5 mg das amostras liofilizadas sem crioprotetor e colocados em cadinhos de alumina. Cadinhos vazios foram utilizados como referência. As análises foram realizadas no analisador térmico SDT Q600 (TA Instruments). As análises foram realizadas à temperatura de 25°C até 600°C , com razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ em atmosfera de N_2 com fluxo de 100 mL/min. Os resultados foram analisados pelo software TA Universal Analysis.

4.8.3 Difratometria de raios X (DRX)

A cristalinidade das NLS e dos seus componentes isolados foi investigada empregando-se a técnica de difratometria de raios X.

As amostras, previamente liofilizadas sem crioprotetor, foram colocadas em um porta amostra de vidro (aproximadamente 5 mg de amostra) o qual foi introduzido no difratômetro de raios X D5000, Diffrac Plus XRD Commander com geometria BRAGG – BRENTANO (Siemens), com radiação $\text{CuK}\alpha$ e detector de cintilação e monocromador de grafite. Os ângulos 2θ inicial e final do escaneamento foram de 4° e 70° , respectivamente, com velocidade de varredura de $0,05^\circ$ por segundo.

Os resultados de DRX foram plotados com o emprego do software Origin 8 (OriginLab Corporation).

4.9 Análise estatística dos resultados

Os resultados de diâmetro de partículas obtidos a partir dos ensaios de obtenção das NLS foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com o emprego dos *softwares* IBM SPSS Statistics 22 ou Excel 2013 (Office 365). Adotou-se o nível de significância (α) menor que 0,05.

4.10 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* do ibuprofeno incorporado às NLS

O estudo de liberação *in vitro* do IBU a partir das NLS foi realizado com o emprego do equipamento Microette Plus (HANSON Microette, 0700-1251), utilizando células de difusão vertical tipo “Franz”.

Para este teste foi utilizada membrana sintética de acetato de celulose com poro de 0,45 μm e como meio receptor tampão fosfato de potássio dibásico 0,1 mol/L; pH 7,4. A condição *sink* foi avaliada e validada a partir da solubilização de uma quantidade de IBU 10 vezes superior à quantidade de fármaco presente na dispersão com maior quantidade do fármaco.

Inicialmente, a membrana sintética foi hidratada com a própria solução receptora por aproximadamente 10 horas. Após a hidratação da membrana, o compartimento receptor da célula de difusão foi preenchido com 7 mL da solução receptora e a membrana foi posicionada entre os compartimentos doador e receptor da célula de difusão. Alíquotas de 350 μL da dispersão contendo 3% de fármaco foram colocadas no anel dosador com área de exposição de 1,77 cm^2 . A solução receptora foi agitada a 300 rpm por meio de agitador magnético e mantida à $37 \pm 2^\circ\text{C}$ com o auxílio de banho circulante. Como controle, foi utilizada solução contendo IBU solubilizado em tampão fosfato 0,1M; pH 7,4.

Para cada experimento (amostra e controle), seis células difusão foram utilizadas ($n=6$) e alíquotas de 2 mL foram coletadas nos intervalos de tempo: 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 18 e 24 horas para avaliar a cinética de liberação. O volume de 2 mL coletado em cada tempo foi repostado com solução receptora e, um volume de 0,8 mL referente à limpeza foi também descartado e posteriormente repostado com solução receptora.

A quantificação do IBU na solução receptora foi realizada por espectrofotometria UV-visível em 223 nm, utilizando o método analítico validado e descrito no item 4.6.3.

Para o estudo de liberação *in vitro* foi selecionada a amostra que apresentou resultados considerados mais adequados.

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

A massa real de fármaco liberado (M_{real}) em determinado tempo, foi determinada a partir da equação 6:

$$M_{real,t} = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

$M_{real, t}$ = massa real liberada de fármaco referente ao tempo t ;

C_t = massa de fármaco obtida referente ao tempo t ;

V_r = Volume da solução receptora (7mL);

C_c = massa de fármaco da amostragem anterior;

V_c = volume amostrado (coletado + limpeza).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção das NLS

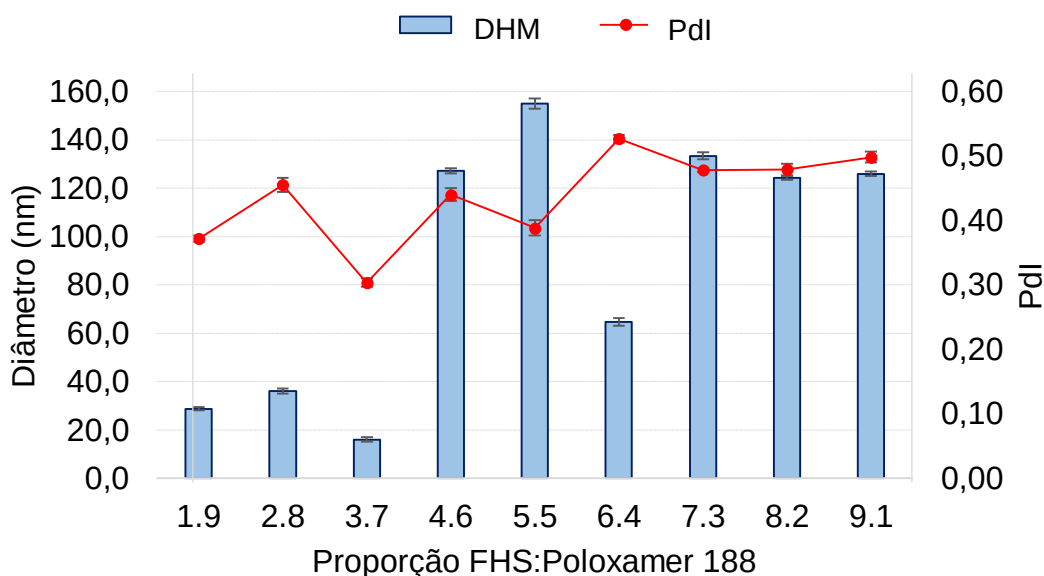
5.1.1 Amostras obtidas pela técnica de HAP

Todas as análises das amostras obtidas por HAP foram realizadas utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano ZS90.

Está descrito na literatura que, geralmente, misturas binárias de tensoativos são mais eficazes na estabilização de uma formulação do que quando apenas um tensoativo é utilizado e, os tipos de tensoativos e suas concentrações podem afetar a estabilidade da matriz lipídica (RADOMSKA-SOUKHAREV, 2007). Assim, neste estudo, uma mistura binária de tensoativos (FHS e poloxamer 188) foi empregada e suas respectivas proporções e a concentração percentual da mistura foram analisadas.

Inicialmente, as NLS foram obtidas empregando-se a técnica de HAP. A figura 10 relaciona as proporções testadas entre os tensoativos empregados aos diâmetros das partículas formadas e ao Pdl da dispersão quando aplicada a técnica de HAP com 10 ciclos de homogeneização com pressão de 500 bar.

Figura 10 – Efeito da variação da proporção dos tensoativos no diâmetro das partículas (DHM) e no índice de polidispersidade (Pdl) quando empregada a técnica de homogeneização de alta pressão com 10 ciclos de homogeneização com pressão de 500 bar



DHM: diâmetro hidrodinâmico médio

Da análise da figura 10, é possível de se verificar a existência de uma tendência à estabilização tanto no diâmetro das partículas quanto no Pdl da dispersão a partir da proporção 8:2.

Observou-se que, apesar de partículas com diâmetros muito pequenos e Pdl satisfatório, as dispersões com proporções de 1:9; 2:8 e 3:7 apresentaram, durante o período de observação de 7 dias, alta instabilidade do sistema (cremação). A amostra com proporção 9:1 apresentou aumento em sua viscosidade com passar do tempo. Assim, para dar continuidade ao estudo, foram selecionadas as proporções 4:6; 5:5; 6:4; 7:3 e 8:2.

Paralelamente a este estudo, também verificou-se qual o número de ciclos de homogeneização necessário para se obter partículas com diâmetro e Pdl adequados. Os resultados obtidos estão demonstrados nas figuras 11 e 12.

Figura 11 – Efeito da variação do número de ciclos de homogeneização e da proporção dos tensoativos no diâmetro das partículas quando utilizada homogeneização de alta pressão com pressão de 500 bar

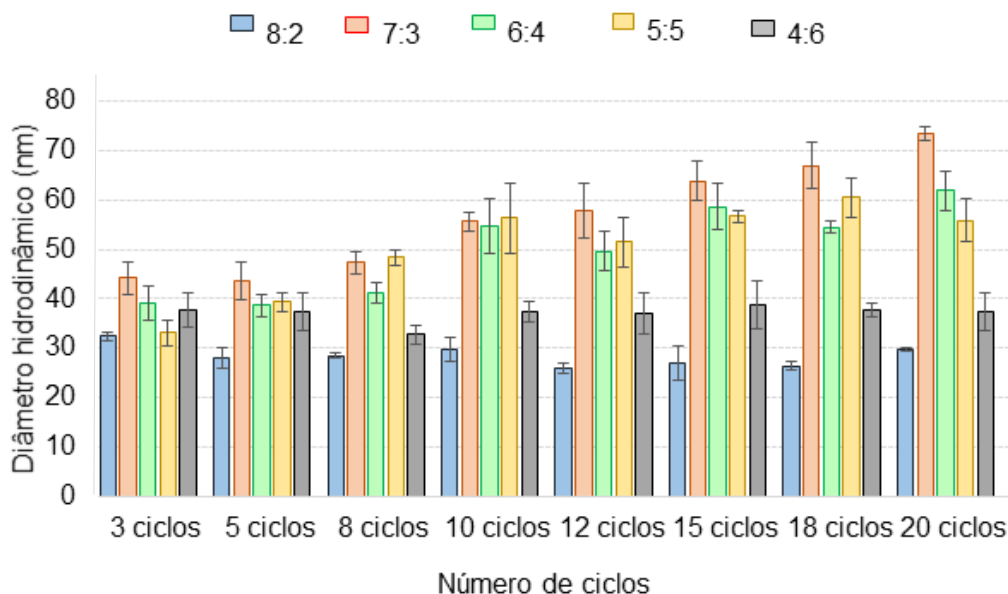
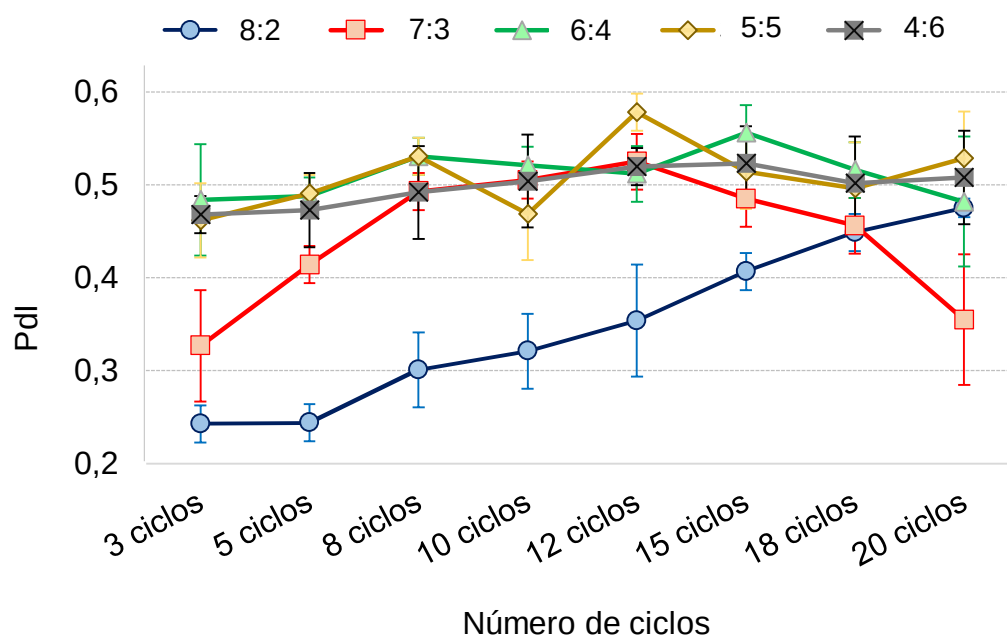


Figura 12 – Efeito do número de ciclos de homogeneização no índice de polidispersidade (Pdl) quando utilizada homogeneização de alta pressão com pressão de 500 bar



A partir da análise destes resultados pode-se inferir que a maioria das dispersões apresentou aumento no diâmetro das partículas com o aumento do número dos ciclos de homogeneização (figura 11). Tal fato foi observado, principalmente, nas dispersões com FHS e poloxamer 188 na proporção de 7:3. Em contrapartida, as dispersões com os mesmos tensoativos, porém na proporção de 8:2, formaram partículas com diâmetro praticamente constante frente à variação do número de ciclos; o desvio padrão, observado para esta proporção de tensoativos, foi muito inferior quando comparado ao desvio padrão das outras dispersões.

Com relação ao Pdl (figura 12), pode-se verificar que a dispersão contendo FHS e poloxamer 188 na proporção de 8:2 também apresentou valores mais satisfatórios quando comparados aos valores das outras dispersões, principalmente, para as dispersões com 3 e 5 ciclos de homogeneização.

Aumentando-se o número de ciclos de homogeneização houve tendência de aumento no diâmetro das partículas. Porém, ajustando-se a proporção entre os componentes da mistura binária de tensoativos ocorreu uma compensação neste aumento do diâmetro das partículas de acordo com o número de ciclos, sendo que, a menor variação pode ser observada empregando-se a proporção de 8:2 (FHS:poloxamer 188) (figura 11).

Os resultados estão de acordo com os resultados descritos por Mehnert e Mäder (2001) que relatam que com o aumento do número de ciclos ou da pressão, frequentemente, há o aumento do diâmetro da partícula, fato este que é devido à coalescência de partículas que ocorre como resultado da elevada energia cinética das partículas.

De acordo com a análise dos resultados, a proporção de 8:2 entre os tensoativos foi a que apresentou resultados melhores sendo, portanto, a selecionada para dar continuidade ao estudo juntamente com o emprego de 3 e 5 ciclos de homogeneização.

A influência do número de ciclos e da proporção entre os tensoativos sobre o diâmetro das partículas (diâmetro hidrodinâmico médio) foi significativa conforme resultados demonstrados na tabela 5, após a realização do teste de ANOVA para amostras pareadas onde é possível de se verificar que o valor de p foi menor que 0,01 quando comparadas as médias obtidas dos diâmetros das partículas para cada número de ciclos empregados. Quando se compara as médias dos diâmetros e as correlacionam com a proporção entre os tensoativos é possível verificar a influência do parâmetro “proporção entre os tensoativos” sobre o diâmetro das partículas.

Tabela 5 – Resultado do teste de ANOVA para se verificar a influência dos parâmetros número de ciclos e proporção entre tensoativos sobre o diâmetro das partículas

Fonte da variação	SQ	gl	F	valor-p	F crítico
Número de ciclos	4155,2	4	29,2	1,28E-09	2,7
Proporção entre tensoativos	1120,2	7	4,5	0,002	2,4
Erro	997,5	28			
Total	6272,8	39			

SQ: soma dos quadrados; gl: graus de liberdade.

Estabelecida a proporção entre os tensoativos e o número de ciclos de homogeneização, avaliou-se o efeito da temperatura de armazenamento sobre as NLS e, conseqüentemente a estabilidade. Também foi realizado um estudo para se verificar a concentração mínima de tensoativos necessária para estabilizar o sistema.

As figuras 13 e 14 mostram os resultados dos ensaios referentes à determinação da concentração mínima de tensoativos e da estabilidade quando

aplicados 3 ciclos de homogeneização sob pressão de 500 bar e armazenamento das dispersões à 4°C e 25°C por um período de 30 dias ao abrigo da luz.

Figura 13 – Efeito da variação da percentagem de tensoativo no diâmetro das partículas (DHM) e no índice de polidispersidade (Pdl) para NLS obtidas com 3 ciclos de homogeneização a 500 bar e armazenadas à 4°C. **A** relaciona o diâmetro das partículas (DHM) e **B** a polidispersidade (Pdl)

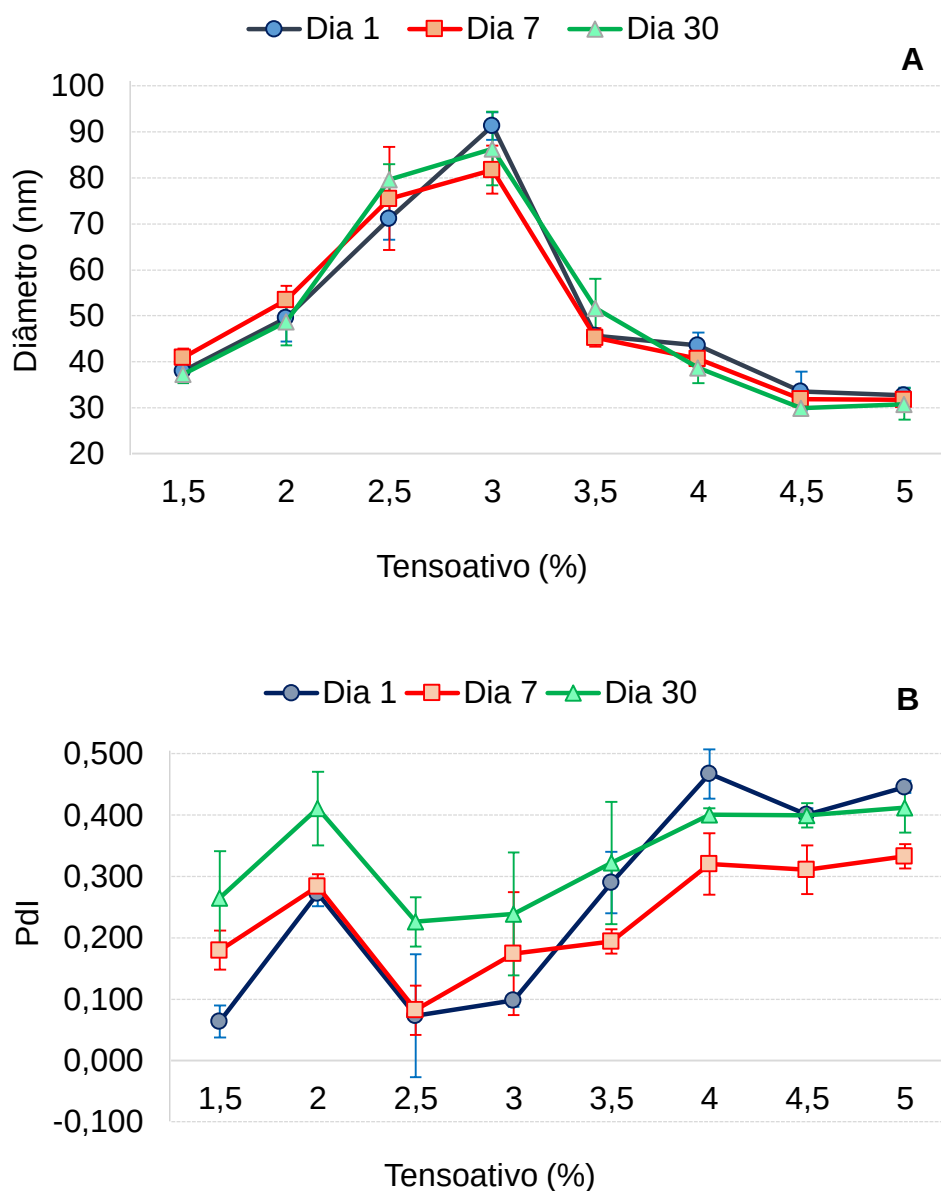
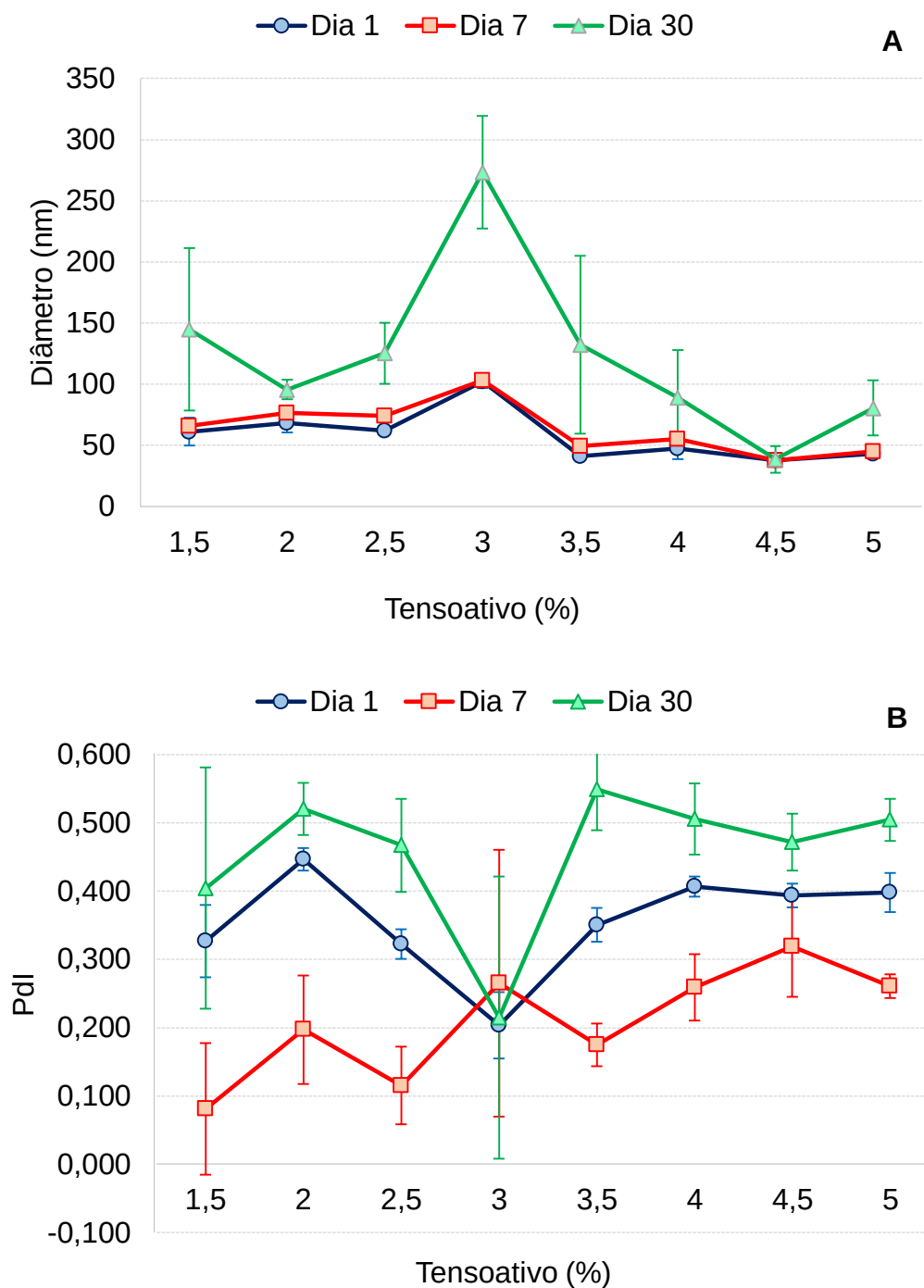


Figura 14 – Efeito da variação da porcentagem de tensoativo no diâmetro das partículas (DHM) e no índice de polidispersidade (Pdl) para NLS obtidas com 3 ciclos de homogeneização a 500 bar e armazenadas à 25°C. **A** relaciona o diâmetro das partículas (DHM) e **B** a polidispersidade (Pdl)



Com a análise dos resultados expostos nas figuras 13 e 14 pode-se verificar a presença de uma tendência à estabilização no diâmetro das partículas, tanto para as dispersões armazenadas à 4°C quanto para as armazenadas à 25°C, a partir da concentração de tensoativos de 4,5%.

Os valores de Pdl das amostras armazenadas à 4°C (figura 13) mantiveram-se abaixo de 0,5 durante todo o período de análise, fato este que não aconteceu nas amostras armazenadas à 25°C (figura 14). As amostras mantidas tanto à 4°C quanto à 25°C com 1,5% de tensoativos apresentaram sinais de desestabilização do sistema, tais como, aumento de viscosidade e separação de fases, demonstrando não ser esta porcentagem adequada para estabilizar o sistema.

As figuras 15 e 16 demonstram os resultados dos ensaios determinação da concentração mínima de tensoativos e de estabilidade quando aplicados 5 ciclos de homogeneização sob pressão de 500 bar e armazenamento das dispersões de NLS à 4°C e à 25°C por um período de 30 dias ao abrigo da luz.

Figura 15 – Efeito da variação da porcentagem de tensoativo no diâmetro das partículas (DHM) e no índice de polidispersidade (Pdl) para NLS obtidas com 5 ciclos de homogeneização a 500 bar e armazenadas à 4°C. **A** relaciona o diâmetro das partículas (DHM) e **B** a polidispersidade (Pdl)

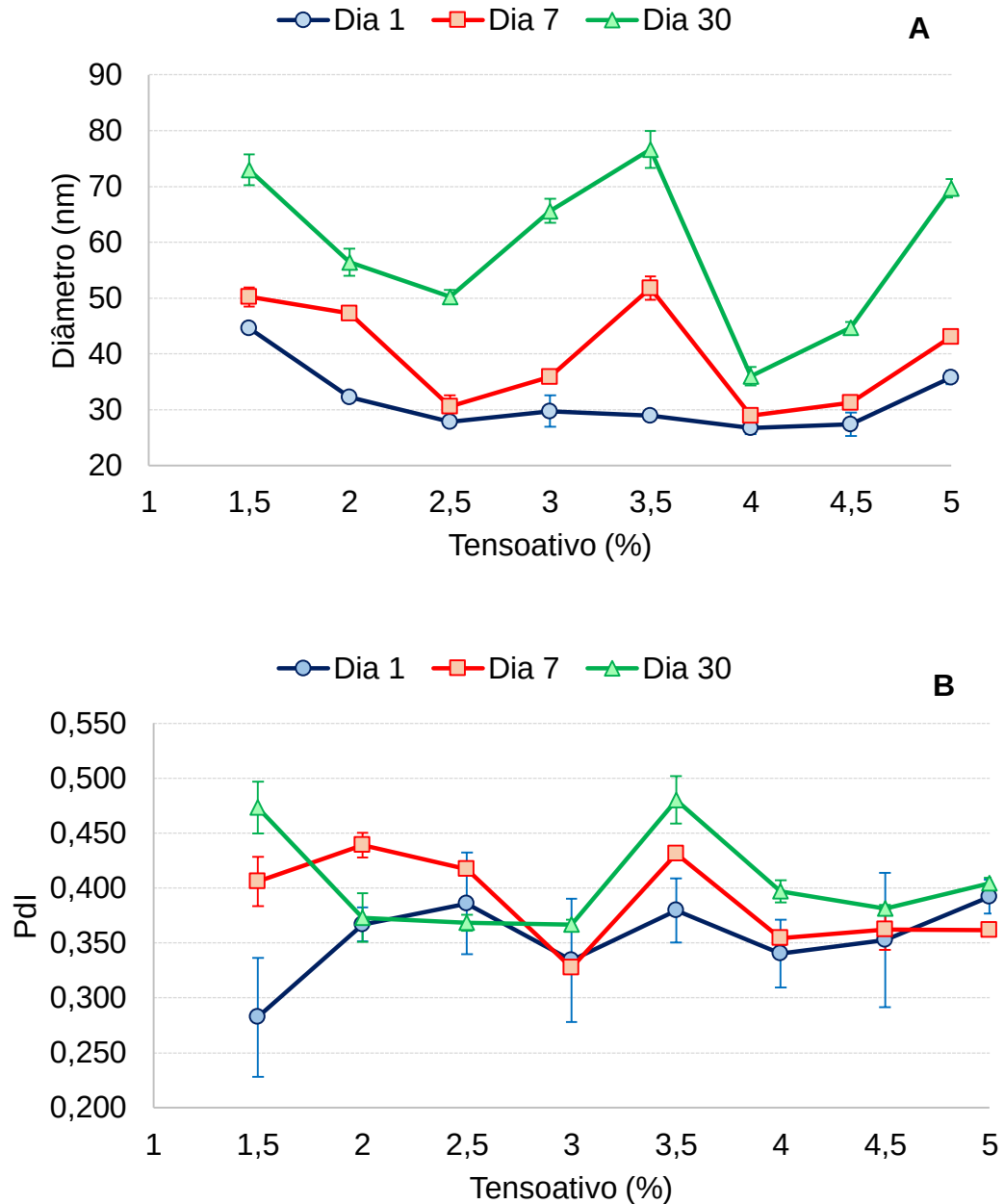
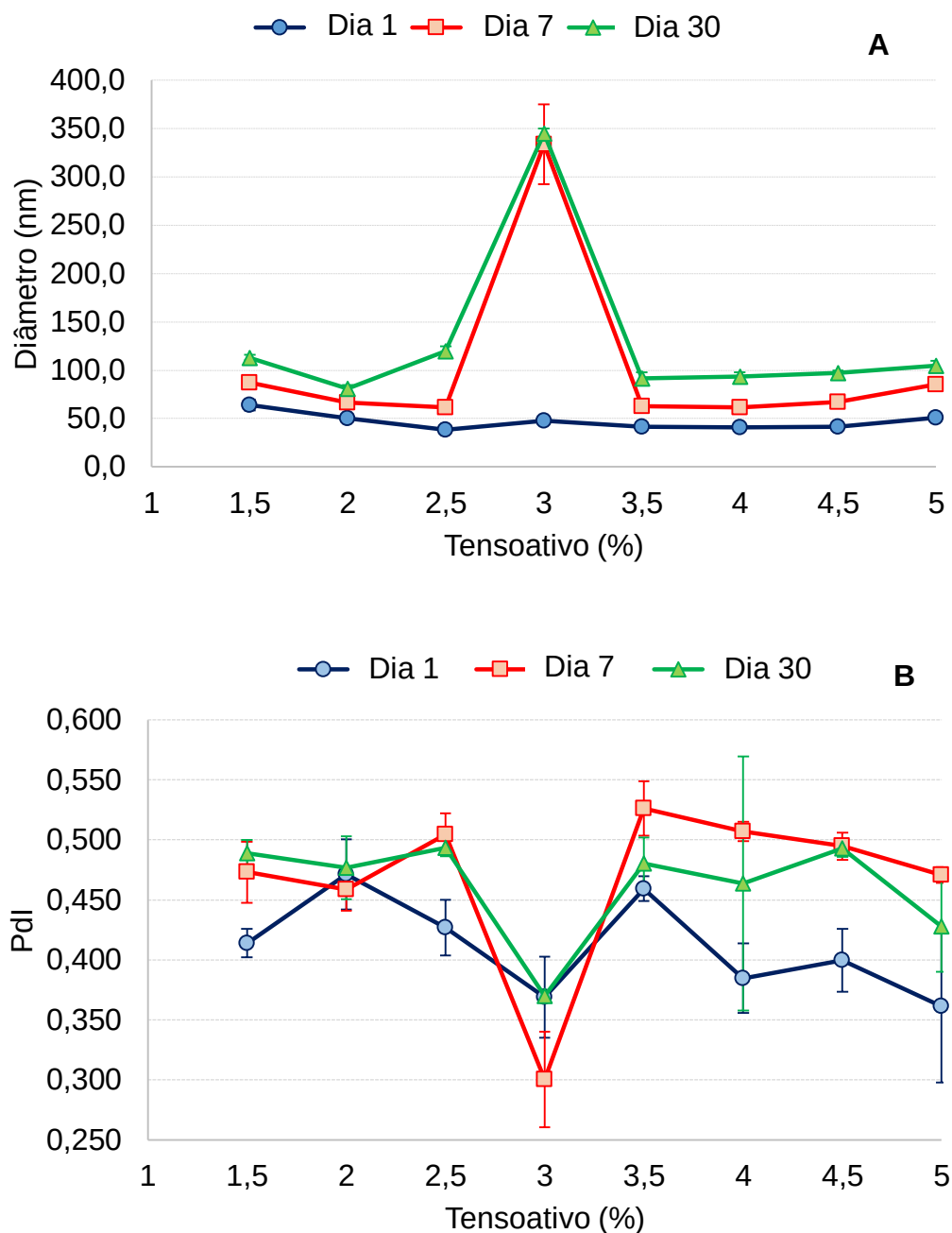


Figura 16 – Efeito da variação da porcentagem de tensoativo no diâmetro das partículas e no índice de polidispersidade (Pdl) para NLS obtidas com 5 ciclos de homogeneização e pressão de 500 bar armazenadas à 25°C. **A** relaciona o diâmetro das partículas (DHM) e **B** a polidispersidade (Pdl)



Todas as amostras armazenadas à 25°C apresentaram sinais de desestabilização.

As NLS homogeneizadas com 5 ciclos (figuras 15 e 16) apresentaram maior variação de diâmetro durante o período de armazenamento do que as NLS homogeneizadas com 3 ciclos (figuras 13 e 14).

Na tabela 6 estão os valores de PZ obtidos pelas análises das amostras homogeneizadas com o emprego de 3 e 5 ciclos a 500 bar e armazenadas à 4°C e à 25°C.

Tabela 6 – Valores de PZ (mV) das NLS homogeneizadas pela técnica de HAP com 3 e 5 ciclos de homogeneização a 500 bar e armazenadas à 4°C e à 25°C

Tensoativo (%)	3 ciclos				5 ciclos			
	4°C		25°C		4°C		25°C	
	Dia 1	Dia 30	Dia 1	Dia 30	Dia 1	Dia 30	Dia 1	Dia 30
1,5	-24±1	-23±0	-23±0	-22±1	-22±3	-21±1	-23±6	-22±3
2	-23±1	-24±0	-20±0	-21±1	-21±3	-27±1	-22±3	-20±2
2,5	-24±1	-23±0	-23±1	-21±1	-18±0	-20±0	-23±4	-22±1
3	-23±1	-22±1	-20±1	-20±1	-19±0	-16±0	-21±1	-22±1
3,5	-17±1	-23±1	-20±2	-19±1	-19±4	-20±0	-21±3	-18±0
4	-15±1	-21±1	-19±1	-18±1	-17±0	-19±1	-18±1	-19±1
4,5	-18±1	-17±0	-17±3	-16±1	-12±1	-21±1	-18±0	-21±1
5	-21±2	-22±1	-20±0	-19±0	-17±2	-15±0	-17±1	-15±0

Os valores de PZ mantiveram-se relativamente estáveis durante o período de análise de 30 dias. As NLS mantidas à 4°C, como explicado anteriormente, demonstraram maior estabilidade quando comparadas com aquelas mantidas à 25°C. Os valores de PZ permaneceram na faixa de -15 a -24, valores considerados satisfatórios visto que os componentes das dispersões não possuem carga.

O próprio manual do equipamento, empregado neste estudo para obtenção do PZ, bem como pesquisadores da área, informam que valores acima de ± 30 são indicativos de amostras estáveis, e que valores inferiores a ± 10 são indicativos de instabilidade (MALVERN, 2009; MEHNERT E MÄDER, 2012). Porém, as NLS obtidas por HAP contendo 1,5% a 3 % de tensoativo apresentaram os maiores valores de PZ e não demonstraram, necessariamente, a maior estabilidade quando comparadas com as NLS com 4,5 e 5% de tensoativo, as quais apresentaram PZ entre -15 e -22. Assim, o PZ não pode ser avaliado como único critério para determinar se uma dispersão de NLS é ou não estável (KATHE et al, 2014).

Após análise conjunta dos dados obtidos, ou seja, número de ciclos, diâmetro das partículas, Pdl, temperatura de armazenamento, concentração de tensoativos e PZ, é possível concluir que as melhores condições para obtenção de

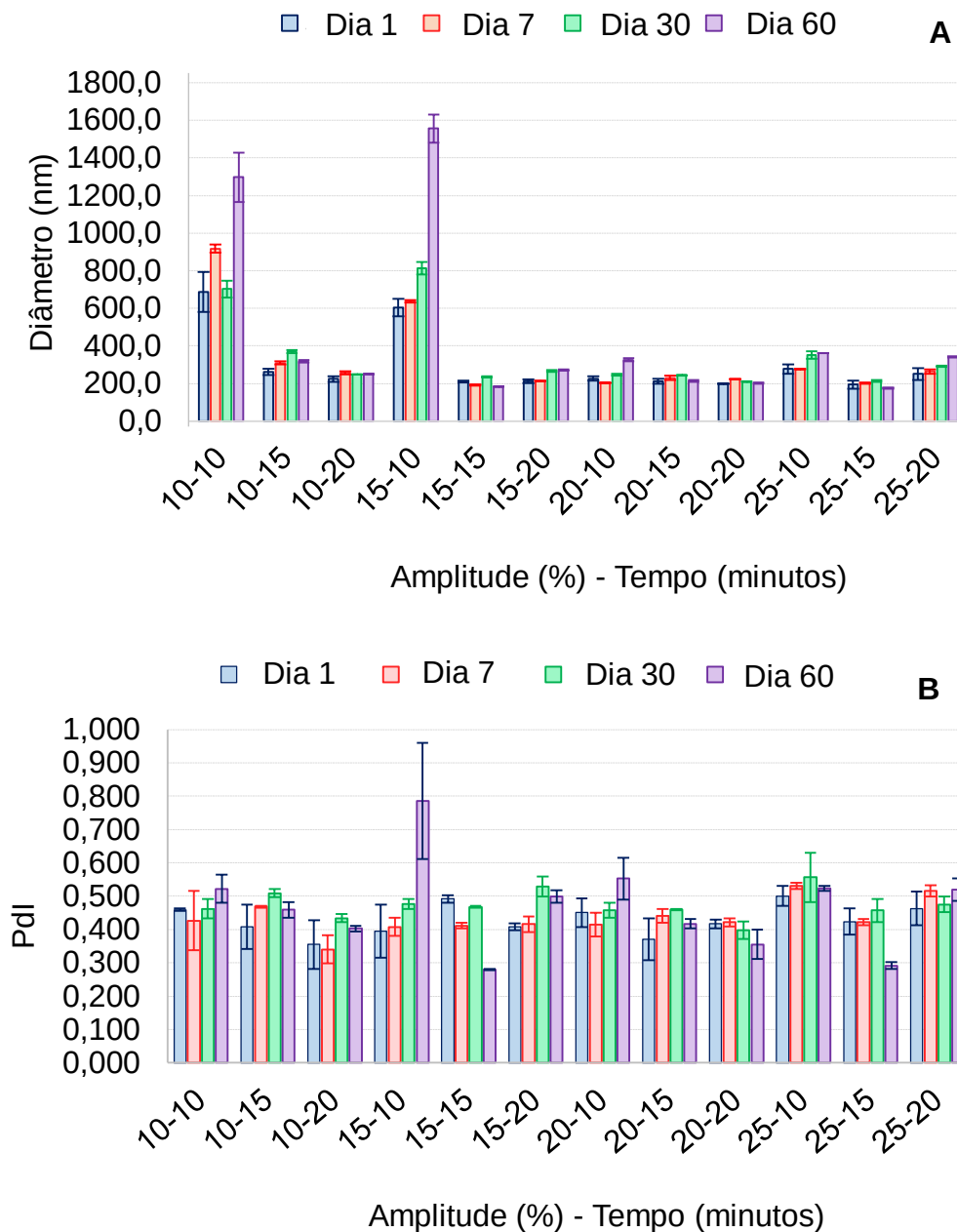
NLS estáveis com o emprego da técnica de HAP foi usar 3 ciclos de homogeneização a 500 bar, utilizar concentração de 5% de tensoativos e armazenar as amostras à 4°C, pois nestas condições obteve-se dispersão com diâmetro de partícula inferior a 40 nm e com polidispersidade satisfatória além de valor de PZ médio de -20. Para as referidas condições, tanto os valores de diâmetro da partícula quanto os de polidispersidade mantiveram-se muito próximos, quando analisados e comparados, ao longo dos 30 dias de análise. Os desvios padrões dos valores dos diâmetros das partículas e Pdl das NLS contendo 5% de tensoativos também foram muito estreitos indicando, também, uma estabilidade do sistema, já que as análises foram realizadas em triplicatas com amostragens diferentes para cada dispersão.

5.1.2 Amostras obtidas por ultrassonicação

As NLS obtidas por ultrassonicação foram analisadas pelo equipamento Zetasizer Nano ZS quanto ao diâmetro das partículas (referido como diâmetro hidrodinâmico médio), Pdl e PZ.

Como informado em sessão anterior, a proporção entre os tensoativos de 8:2 (FHS:poloxamer 188) foi mantida, assim como a porcentagem da mistura de tensoativos de 5%. Os resultados de diâmetro e Pdl das partículas das NLS obtidas por ultrassonicação de acordo com a variação dos parâmetros amplitude e duração do processo de ultrassonicação, sendo empregado o modo com pulso de ultrassonicação, estão mostrados na figura 17. As análises foram realizadas ao longo de 60 dias para também se verificar a estabilidade física das dispersões.

Figura 17 – Avaliação, durante 60 dias, do diâmetro (nm) e do índice de polidispersidade (Pdl) de NLS obtidas a partir do emprego de diferentes amplitudes de sonicação e diferentes tempos de duração do processo. **A** relaciona o diâmetro das partículas e **B** a polidispersidade (Pdl)



As NLS obtidas com o emprego de 10% de amplitude durante 10 minutos, no modo com pulso, apresentaram alta instabilidade com visualização de separação de fases e instabilidade em relação ao diâmetro das partículas quando analisadas ao longo de 60 dias (figura 17A). Também foi visualizado que, ao término do processo de ultrassonicação e consequente resfriamento à temperatura ambiente, o lipídio ao se solidificar formou partículas grosseiras e aglomeradas perceptíveis ao olho nu, fato

este, indicativo de que a amplitude empregada durante o tempo estipulado não forneceu energia suficiente para romper as partículas a dimensões nanométrica.

O fato acima referido também foi observado nas NLS ultrassonicadas com 15% de amplitude durante 10 minutos, as quais apresentaram diâmetro maior de 1 μm e Pdl de $0,785 \pm 0,2$ na análise realizada após 60 dias da obtenção das NLS. Tais valores são indicativos da alta instabilidade e heterogeneidade da dispersão de NLS pois, como mencionado anteriormente, valores de Pdl acima de 0,500 mostram que as dispersões são heterogêneas quanto ao diâmetro das partículas e são indicativos de instabilidade.

Analisando conjuntamente os dados de diâmetro e Pdl das NLS ultrassonicadas com diferentes amplitudes durante diferentes tempos, chegou-se à seguinte conclusão: as NLS ultrassonicadas com o emprego de 15% de amplitude durante 20 minutos e as ultrassonicadas com 20% de amplitude durante 20 minutos foram as que apresentaram menor variação nos valores de diâmetros obtidos dentre as quatro análises realizadas (Dia 1, Dia 7, Dia 30 e Dia 60), assim como o menor desvio padrão. Associada à menor variação do diâmetro está a menor variação dos valores do Pdl também obtidos nas quatro análises realizadas (Dia 1, Dia 7, Dia 30 e Dia 60), assim como o menor desvio padrão. Portanto, a amplitude mínima para homogeneizar o presente sistema e promover a quebra das partículas a diâmetros adequados é de 15% por um tempo mínimo de sonicação de 20 minutos.

Uma análise de variância (ANOVA) foi realizada para os valores de diâmetro das partículas para se verificar a influência dos parâmetros amplitude e duração do processo de ultrassonição sobre o diâmetro das partículas. Os resultados são mostrados na tabela 7 onde é possível verificar que não houve influência significativa dos parâmetros analisados sobre o diâmetro das partículas.

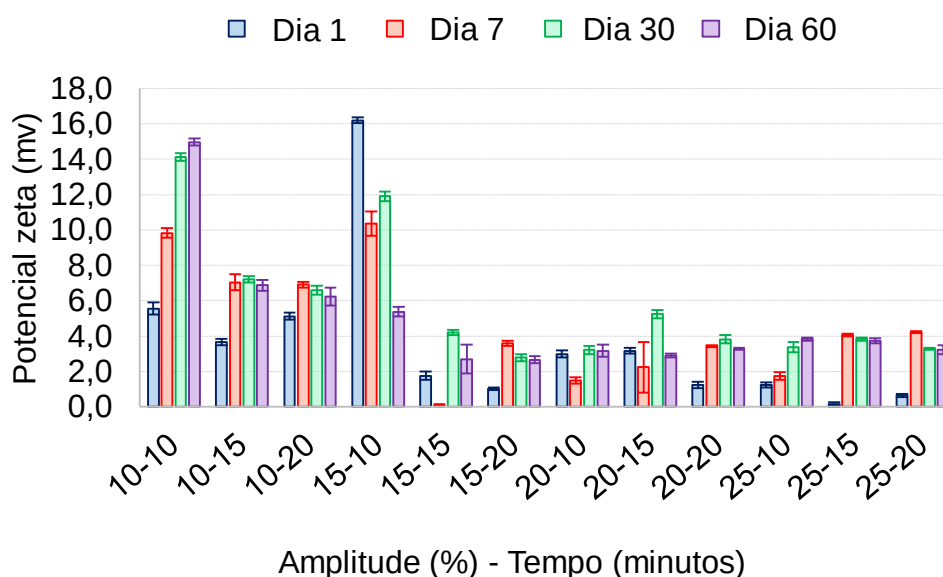
Tabela 7 – Resultado do teste de ANOVA para verificar a influência dos parâmetros amplitude de ultrassonicação e tempo de ultrassonicação sobre o diâmetro das partículas

Fonte da variação	SQ	Gl	F	valor- <i>p</i>	F crítico
Amplitude de ultrassonicação	320,4	2	0,2	0,811	19
Duração do processo de ultrassonicação	334,5	1	0,5	0,557	18,5
Erro	1372,6	2			
Total	2027,5	5			

SQ: soma dos quadrados; gl: graus de liberdade.

Os dados obtidos nas análises de PZ corroboram com os dados de diâmetro das partículas e Pdl, ou seja, para as NLS ultrassonicadas com 15% de amplitude por 20 minutos e 20% de amplitude durante 20 minutos houve uma menor variação com menor desvio padrão entre os valores obtidos a partir das quatro análises realizadas (Dia 1, Dia 7, Dia 30 e Dia 60). Os valores modulares dos PZ obtidos estão mostrados na figura 18.

Figura 18 – Avaliação, durante 60 dias, do potencial zeta (mV) de NLS obtidas a partir do emprego de diferentes amplitudes de sonicação e diferentes tempos de duração do processo



Com a análise da figura 18, é possível verificar que todos os valores de PZ não foram superiores a 16 mV. Como uma diretriz e de acordo com o manual do

equipamento utilizado neste estudo, as partículas em dispersão com valores superiores a ± 30 , tenderão a repulsão eletrostática entre si, seno que, essa força de repulsão supera a tendência natural à floculação e agregação (MALVERN, 2009; MEHNERT E MÄDER, 2012; KATHE et al, 2014).

Entretanto, este conceito é aplicável principalmente para dispersões que contenham somente estabilizadores eletrostáticos e, não pode ser aplicada para sistemas que contêm estabilizadores estéricos, pois, a adsorção destes estabilizadores na partícula irá diminuir o PZ devido à mudança na exposição dos íons na interface partícula-água (MEHNERT E MÄDER, 2012).

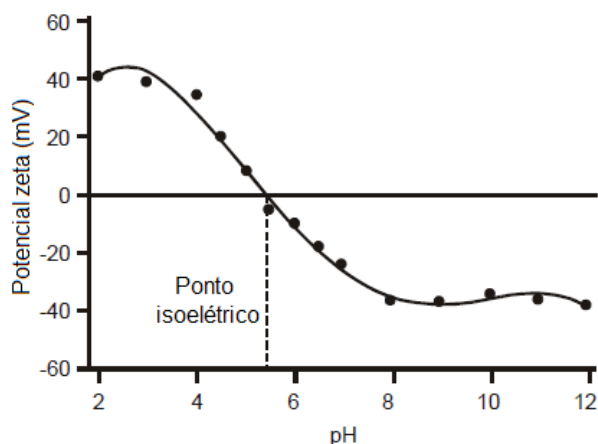
Assim, em misturas binárias de tensoativos entre os quais um seja estabilizador eletrostático e o outro seja estabilizador estérico, mesmo com o PZ baixo (menor que 20) há a estabilização da dispersão, pois, os efeitos da estabilização eletrostática são somados aos efeitos da estabilização estérica (RADOMSKA-SOUKHAREV, 2007).

Outro fator que influenciou no baixo valor de PZ obtido nas análises foi que todos os componentes da dispersão são compostos não-iônicos.

O pH é o principal fator que influencia o valor do PZ de uma formulação. Como exemplo, tendo partículas com PZ negativo, se alguma substância básica for adicionada à suspensão, as partículas tenderão a adquirir carga de superfície mais negativa. Se o contrário acontecer, ou seja, um ácido for adicionado à suspensão um ponto de equilíbrio será alcançado onde, a carga negativa será neutralizada. E, se o ácido continuar a ser adicionado à suspensão, haverá um acúmulo de carga positiva de superfície nas partículas. Assim, o PZ será positivo em pH ácido e negativo em pH alcalino. A influência do pH no PZ é principalmente visualizada quando há apenas a estabilização eletrostática (BATTAGLIA E GALLARATE, 2012; MALVERN, 2009).

Na curva de PZ em função do pH, o valor do pH no qual o PZ é zero, corresponde ao ponto isoelétrico da dispersão sendo, neste ponto, o sistema disperso menos estável (figura 19).

Figura 19 – Ilustração da determinação do ponto isoelétrico de um sistema coloidal



Fonte: MALVERN, 2009.

O valor do pH das dispersões foi determinado e os valores obtidos situaram-se numa faixa de 6,8 a 7,2, isto pode explicar o fato dos resultados terem apresentado cargas negativas, pois encontram-se mais próximos do pH alcalino do que do pH ácido.

Considerando o valor de PZ para as dispersões ultrassonicadas com 15% de amplitude durante 15 minutos, 25% de amplitude durante 15 minutos e 25% de amplitude durante 20 minutos as quais apresentaram valor de PZ próximo a zero em pelo menos uma análise (figura 18), esperar-se-ia que tais dispersões apresentassem alta instabilidade com a presença de agregação de partículas. Porém, o observado foi o contrário, tais amostras demonstraram-se estáveis com discreto aumento no diâmetro das partículas e pequena oscilação no valor do Pdl (figura 17). Tal fato, também corrobora com o descrito na literatura de que estabilizadores estéricos podem fornecer baixos valores de PZ e mesmo assim, a dispersão encontrar-se-á estável (MEHNERT E MÄDER, 2012). Neste estudo, a estabilização estérica pode ser atribuída à presença do poloxamer 188 na dispersão (SALMINEN et al, 2014).

Portanto, as dispersões ultrassonicadas com 15% de amplitude durante 20 minutos e as ultrassonicadas com 20% de amplitude durante 20 minutos foram as selecionadas para dar continuidade ao estudo.

5.2 Incorporação do ibuprofeno às NLS

Para a incorporação do IBU às NLS obtidas pela técnica de ultrassonicação, foi empregada, primeiramente, a amplitude de 15% durante 20 minutos com as seguintes concentrações de fármaco: 1, 3 e 5%.

Após os procedimentos para realizar a incorporação do IBU às NLS, uma cromatografia em coluna com o emprego do Sephadex G-50 foi feita para separar as frações de NLS contendo o fármaco encapsulado daquelas frações contendo apenas o fármaco não encapsulado. As frações separadas foram analisadas por espectrofotometria de UV-Vis em 223 nm e em 410 nm, sendo que, em 223 nm foi possível detectar a presença do IBU não-encapsulado e em 410 nm o perfil de eluição das NLS contendo o IBU encapsulado. A eluição foi realizada em dois momentos distintos: o primeiro após 24 horas da obtenção das NLS e o segundo 30 dias após a primeira determinação.

As análises das frações de NLS contendo o fármaco encapsulado e das frações contendo o fármaco não encapsulado das dispersões por ultrassonicação com 15% de amplitude durante 20 minutos estão descritas nas figuras 20 e 21.

Figura 20 – Análise das frações de NLS contendo IBU encapsulado e das frações de IBU não encapsulado por espectrofotometria em 223 nm e em 410 nm após filtração em coluna. Dispersão ultrassonicada com 15% de amplitude durante 20 minutos contendo 1% de IBU; Frações de 1 mL

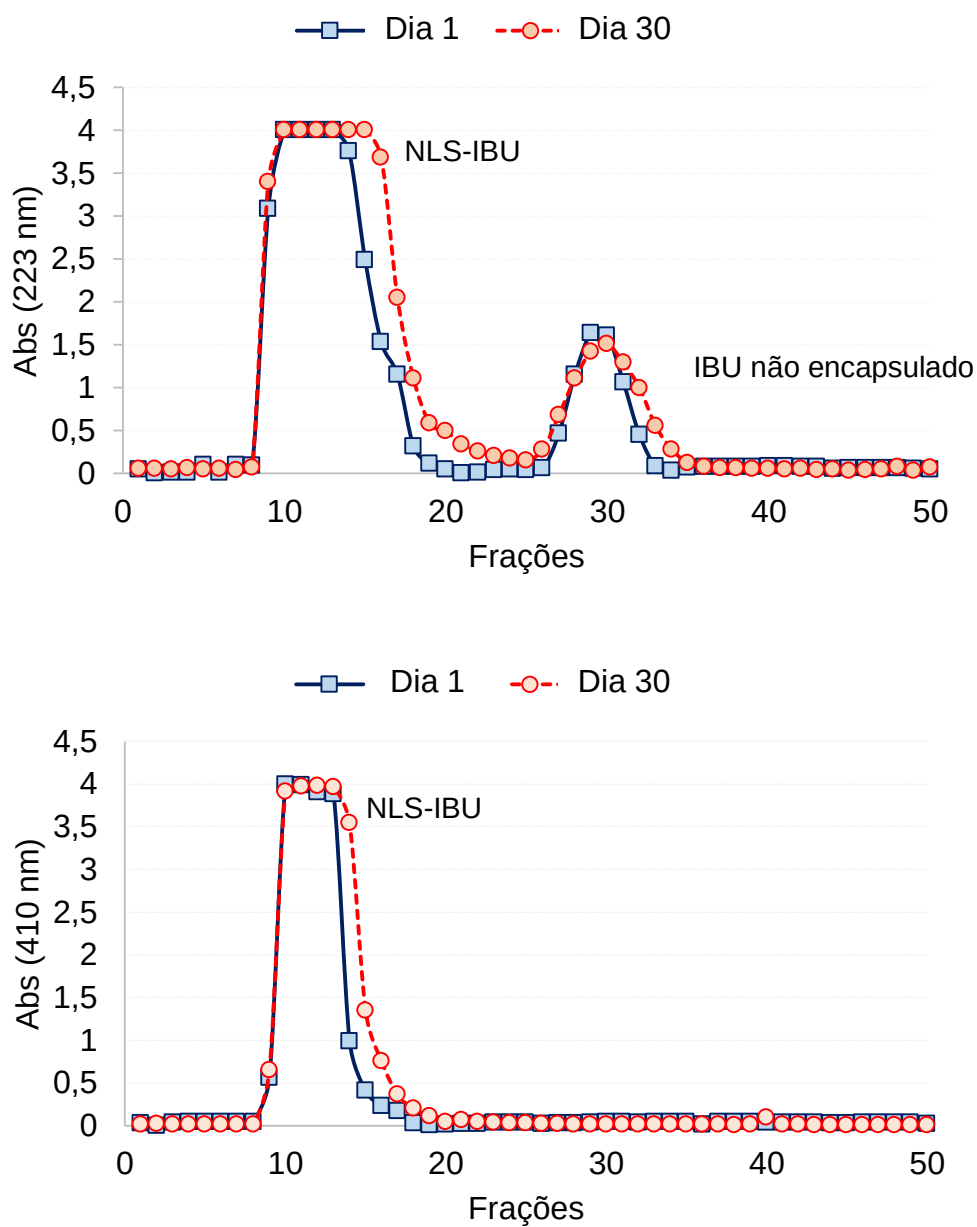
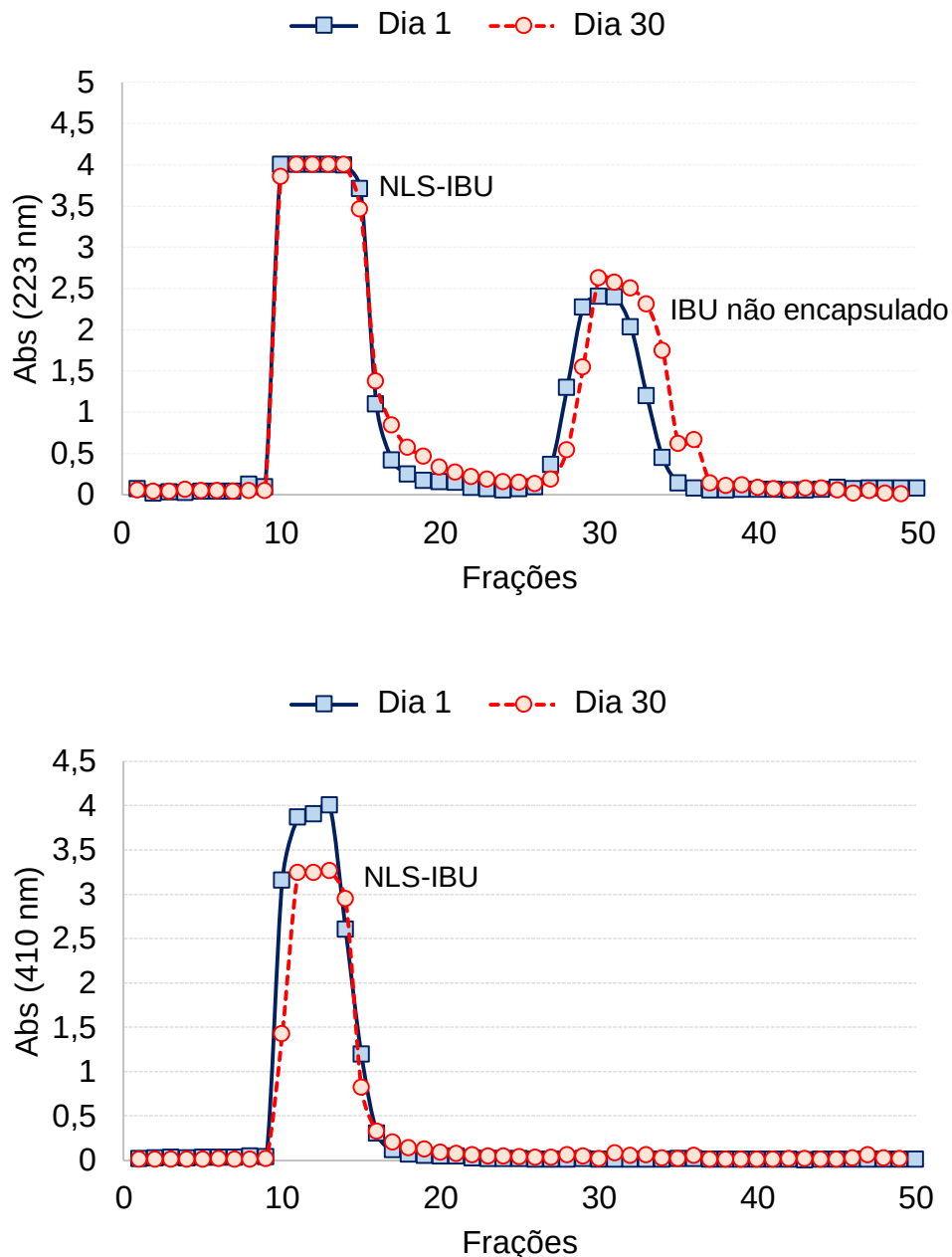


Figura 21 – Análise das frações de NLS contendo IBU encapsulado e das frações de IBU não encapsulado por espectrofotometria em 223 nm e em 410 nm após filtração em coluna. Dispersão ultrassonicada com 15% de amplitude durante 20 minutos contendo 3% de IBU; Frações de 1 mL



As frações de NLS contendo 5% de IBU não puderam ser separadas pelo Sephadex G-50 devido ao diâmetro das partículas ter sido superior a 500 nm (nos dias 1 e 30, nos quais foram realizadas as análises) e ao alto índice de polidispersidade, causando a obstrução da coluna durante a eluição e impossibilitando a realização do processo de separação.

A determinação do diâmetro, do Pdl e do PZ também foi realizada e os dados obtidos estão descritos na tabela 8.

Tabela 8 – Relação entre diâmetro, Pdl e PZ de NLS contendo 1, 3 e 5% de IBU obtidas por ultrassonicação com 15% de amplitude durante 20 minutos

Dia	Fármaco (%)	DHM (nm)	Pdl	PZ (mV)
1	1	281±10	0,40±0,07	-2,6±0,1
	3	347±9	0,84±0,04	-3,1±0,2
	5	570±29	1,00±0,00	-2,2±0,2
7	1	390±2	0,58±0,01	-2,1±0,2
	3	445±77	0,81±0,05	-2,8±0,2
	5	866±60	1,00±0,00	-1,2±0,3
30	1	356±5	0,48±0,01	-2,9±0,3
	3	280±4	0,54±0,01	-4,2±0,1
	5	470±5	0,54±0,02	-5,9±0,7
60	1	314±3	0,46±0,01	-6,5±0,2
	3	216±3	0,33±0,04	-6,3±0,1
	5	446±12	0,32±0,1	-6,3±0,2

DHM: diâmetro hidrodinâmico médio; valores expressos como média ± desvio padrão

De acordo com os resultados de diâmetro, Pdl e PZ das dispersões ultrassonicadas com 15% de amplitude durante 20 minutos (tabela 8), pode-se inferir que as partículas não apresentaram estabilidade física, pois notou-se uma maior variação do diâmetro, Pdl e PZ entre os dias de análises quando comparados com as dispersões ultrassonicadas com 20% de amplitude durante 20 minutos (tabela 9).

A dispersão contendo 3% de fármaco apresentou, nos primeiros dias de análises, diâmetro relativamente grande e uma polidispersidade alta, indicativa de uma dispersão muito heterogênea (tabela 8).

Com a análise da figura 21, pode-se notar que houve uma discreta diminuição na fração encapsulada e consequente aumento na fração não encapsulada após o período de armazenamento de 30 dias.

A dispersão contendo 5% de fármaco apresentou no decorrer do período de armazenamento de 60 dias, sinais de instabilidade como o aumento de viscosidade (tabela 8).

Portanto, para as dispersões obtidas com o emprego de 20% de amplitude durante 20 minutos, as concentrações de IBU foram alteradas para 1, 2 e 3%.

As figuras 22, 23 e 24 ilustram os perfis de eluição das dispersões contendo 1%, 2% e 3% de IBU, respectivamente; dispersões ultrassonicadas com 20% de amplitude durante 20 minutos.

Figura 22 – Análise das frações de NLS contendo IBU encapsulado e das frações de IBU não encapsulado por espectrofotometria em 223 nm e em 410 nm após filtração em coluna. Dispersão ultrassonicada com 20% de amplitude durante 20 minutos contendo 1% de IBU; Frações de 1 mL

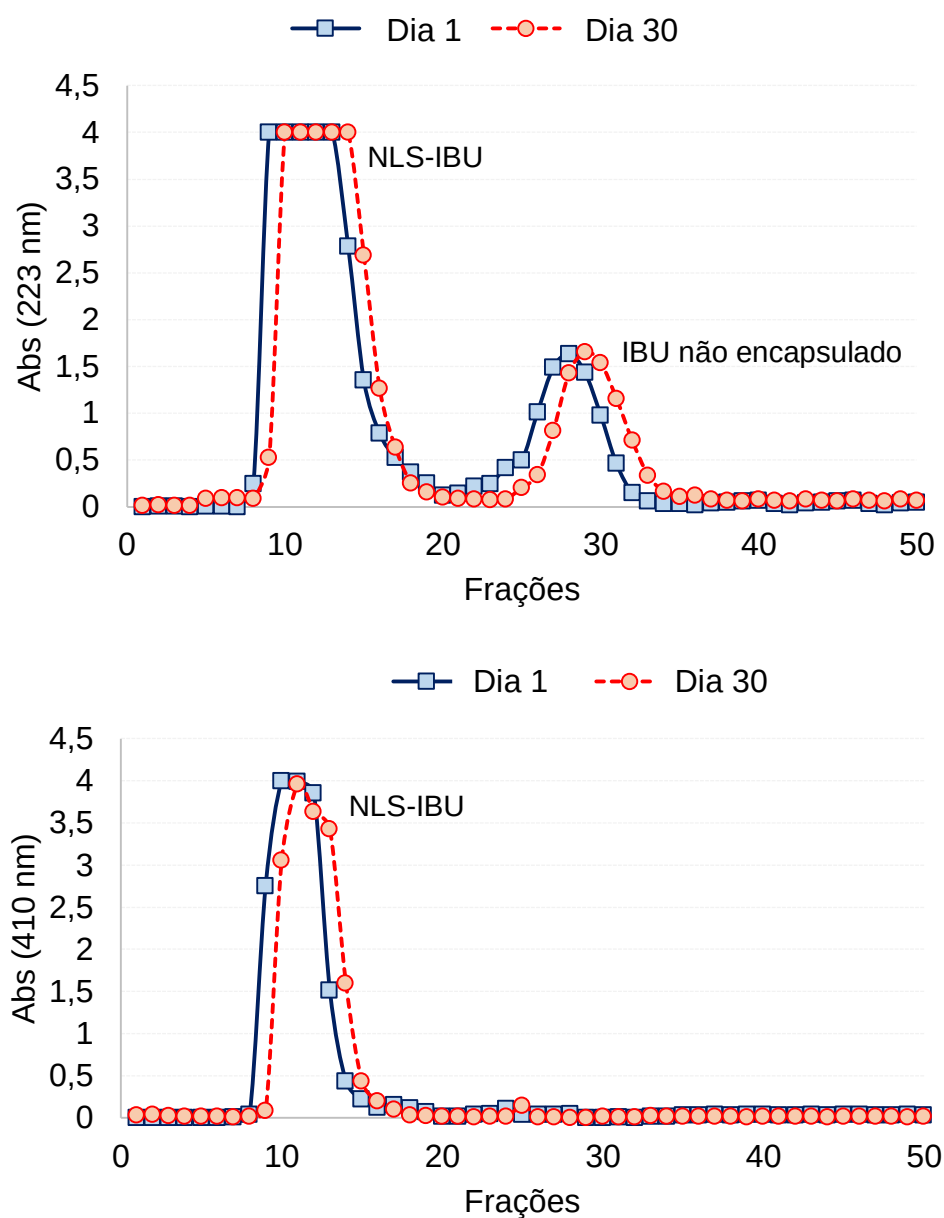


Figura 23 – Análise das frações de NLS contendo IBU encapsulado e das frações de IBU não encapsulado por espectrofotometria em 223 nm e em 410 nm após filtração em coluna. Dispersão ultrassonicada com 20% de amplitude durante 20 minutos contendo 2% de IBU; Frações de 1 mL

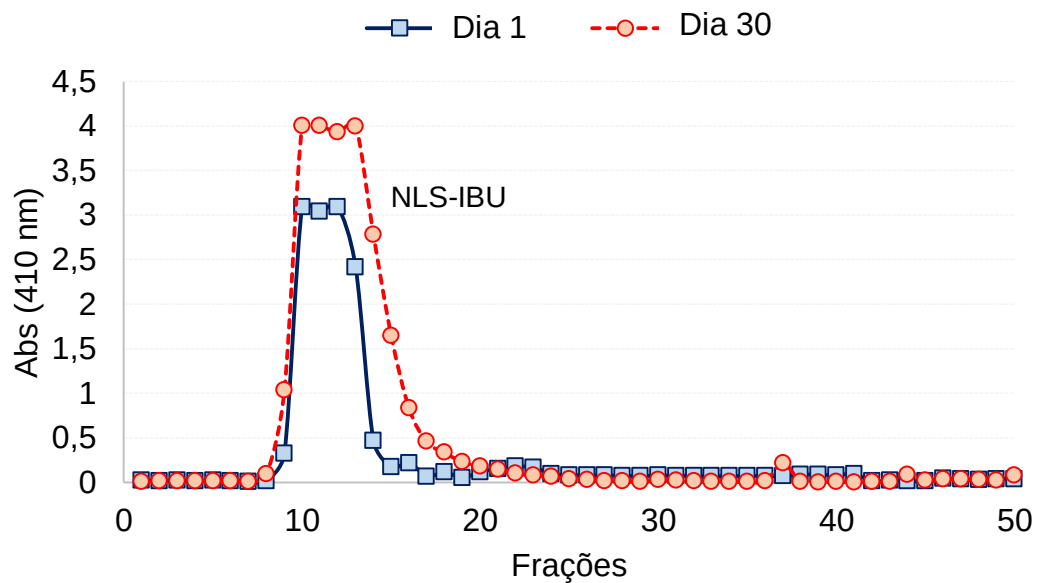
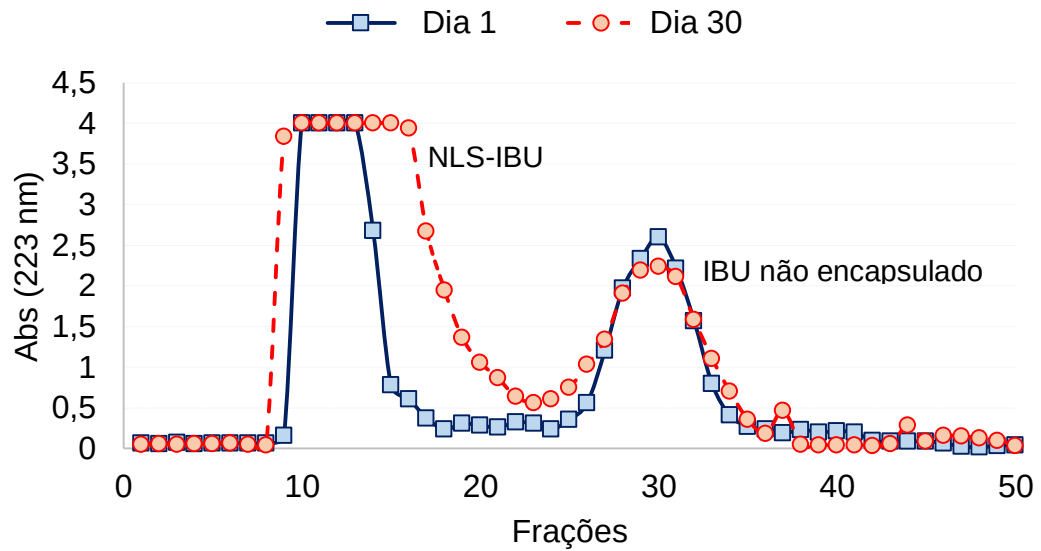
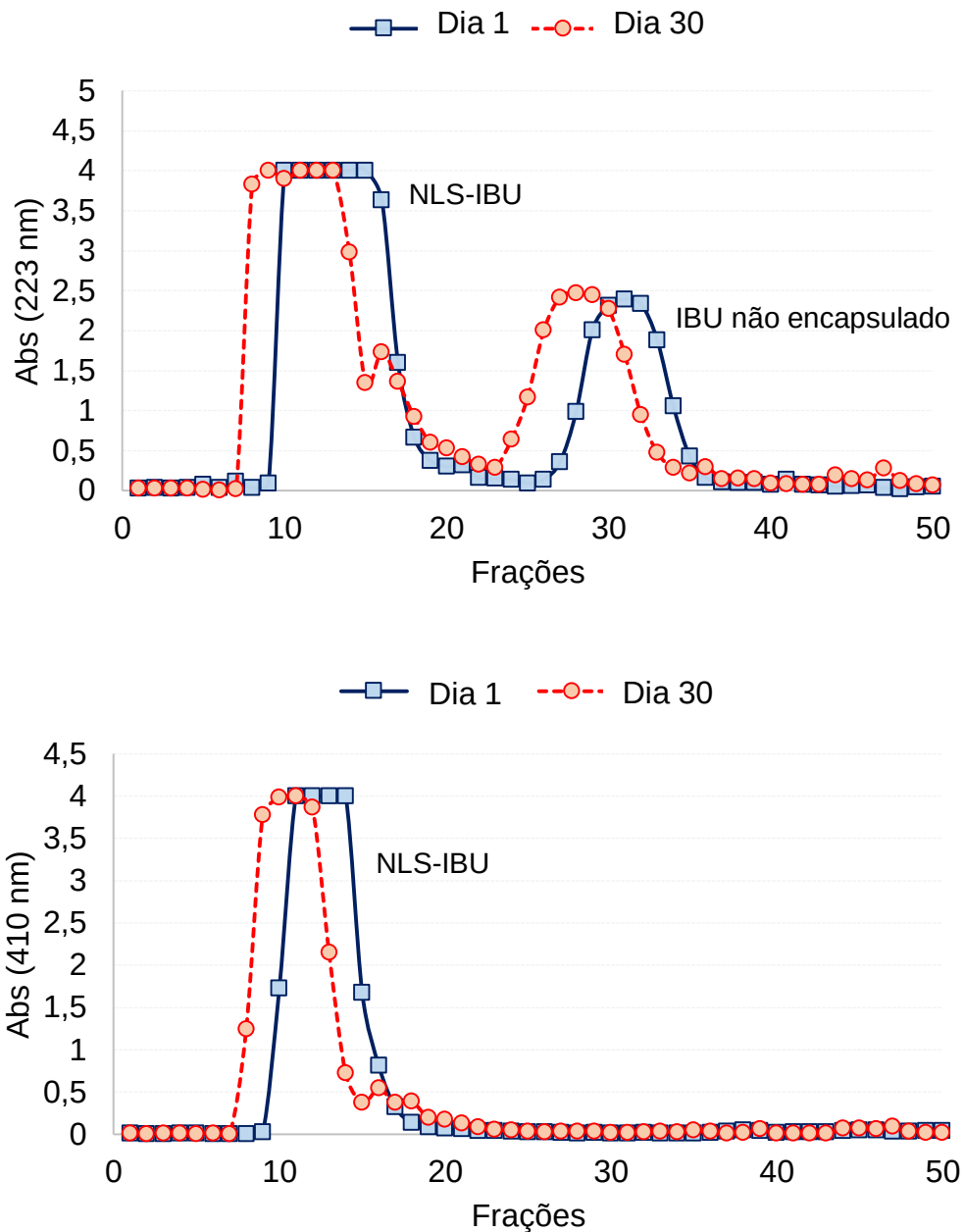


Figura 24 – Análise das frações de NLS contendo IBU encapsulado e das frações de IBU não encapsulado por espectrofotometria em 223 nm e em 410 nm após filtração em coluna. Dispersão ultrassonicada com 20% de amplitude durante 20 minutos contendo 3% de IBU; Frações de 1 mL



Com a análise da figura 22 pode-se perceber que a separação das frações das NLS com 1% de IBU foi mais homogênea quando comparados os dias analisados. Em contrapartida, a separação das frações das NLS contendo 2% de IBU (figura 23) mostrou menor homogeneidade com aumento no diâmetro das partículas (tabela 9). Com a análise da figura 24 também pode-se notar a presença de heterogeneidade entre as separações realizadas nos dias 1 e 30 e o aumento no diâmetro das

partículas, porém, as frações encapsuladas e não encapsuladas apresentaram limites semelhantes para os dias analisados.

A tabela 9 descreve os valores de diâmetro, Pdl e PZ obtidos ao longo dos 60 dias de análises das dispersões ultrassonicadas com 20% de amplitude durante 20 minutos.

Tabela 9 – Relação entre diâmetro da partícula, Pdl e PZ de NLS contendo 1, 2 e 3% de IBU obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude durante 20 minutos

Dia	% de fármaco	DHM (nm)	Pdl	PZ (mV)
1	1	202±2	0,37±0,02	-7,1±0,6
	2	334±8	0,52±0,02	-6,6±0,2
	3	263±29	0,49±0,06	-7,2±0,2
7	1	227±2	0,30±0,01	-5,9±0,5
	2	357±7	0,44±0,10	-6,1±0,6
	3	267±12	0,46±0,04	-6,8±0,2
30	1	294±5	0,44±0,04	-5,9±0,9
	2	368±30	0,47±0,10	-7,2±0,2
	3	255±2	0,45±0,01	-7,0±0,2
60	1	229±1	0,29±0,03	-6,0±0,1
	2	335±4	0,56±0,02	-5,3±0,1
	3	228±2	0,44±0,01	-10,0±0,2

DHM: diâmetro hidrodinâmico médio; valores expressos como média ± desvio padrão

De acordo com os resultados de diâmetro, Pdl e PZ das dispersões ultrassonicadas com 20% de amplitude durante 20 minutos, pode-se inferir que as partículas mantiveram-se estáveis pelo período de análise de 60 dias. Os processos de cremação, sedimentação e aglomeração de partículas não foram observados em nenhum momento durante o período de armazenamento das dispersões (60 dias) indicando que o delineamento experimental do sistema tensoativo resultou em um sistema altamente capaz de estabilizar a dispersão impedindo a aglomeração das partículas e a expulsão do fármaco das NLS, conforme mostram os resultados de EE e CC (item 5.2.1.2).

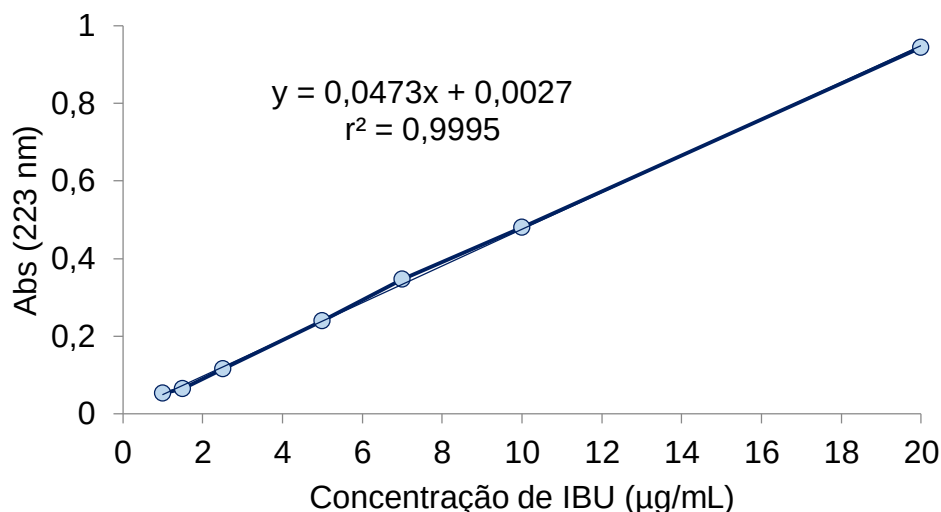
5.2.1 Validação do método de análise quantitativa do ibuprofeno

Para a quantificação do IBU não encapsulado, um método analítico de espectrometria de UV-Vis foi validado. A tabela 10 mostra os parâmetros de validação para a quantificação do IBU não encapsulado, após separação das NLS por filtração em gel de Sephadex G-50. A figura 25 mostra a curva analítica, com o coeficiente de correlação linear (r^2) e a equação da reta empregada para os cálculos de EE.

Tabela 10 – Parâmetros da validação do método analítico para quantificação de IBU livre após separação por filtração em gel Sephadex G-50

Parâmetro	Média (µg/mL)	DP (µg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
LOD (1 µg/mL)	0,33	0,01	4,2	105,2
LOQ (1 µg/mL)	1,12	0,04	4,2	105,2
Precisão				
<i>intra-dia</i> (n=3)				
1,5	1,36	0,05	3,5	90,4
10	9,88	0,08	0,8	99,7
20	20,17	0,16	0,8	100,9
<i>inter-dia</i> (n=9)				
1,5	1,30	0,08	6,1	86,4
10	10,08	0,10	0,9	100,8
20	19,87	0,34	1,2	99,3

Figura 25 – Curva analítica do IBU em tampão fosfato de potássio dibásico 0,1M pH 7,4



O método para quantificação de IBU livre (não encapsulado às NLS) foi validado dentro dos requisitos exigidos pela ANVISA (2003). Os limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ) foram ambos de 1 µg/mL. A técnica de espectrometria em UV-Vis não é sensível para concentrações ínfimas de analito, porém, para esta etapa do estudo a faixa linear detectável e quantificável demonstrou precisão e exatidão aceitáveis, ou seja, permaneceram dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA (BRASIL, 2003) que determina exatidão de 80 a 120% e precisão (DPR) menor do que 15%.

O método manteve linearidade aceitável na faixa de concentração entre 1 a 20 µg/mL de IBU com r^2 de 0,9995. Portanto, a linearidade também manteve-se dentro dos requisitos estabelecidos pela ANVISA (BRASIL, 2003), que especifica um r^2 mínimo de 0,99.

Assim, o método pode ser considerado preciso, exato e validado de acordo com os requisitos exigidos pela ANVISA (BRASIL, 2003), sendo aplicável para a quantificação de IBU não encapsulado e, conseqüentemente, aplicável para a determinação da EE.

5.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação (EE) e capacidade de carga (CC)

O IBU não encapsulado foi quantificado de acordo com o método validado e, a equação da reta, obtida, $y = 0,0473x + 0,0027$ foi empregada para a quantificação em µg/mL do IBU existente fora das NLS, tendo-se determinado indiretamente a EE e a CC.

Os resultados de EE e CC do IBU nas NLS em diferentes condições de ultrassonicação estão mostrados na tabela 11.

Tabela 11 – Relação entre eficiência de encapsulação e capacidade de carga das NLS contendo 1, 2 e 3 % de IBU obtidas com diferentes amplitudes e tempos de sonicação

Fármaco (%)	EE (%)		CC (%)	
	Dia 1	Dia 30	Dia 1	Dia 30
1*	79,06±0,04	79,07±0,05	0,7906±0,0004	0,7907±0,0005
3*	95,71±0,01	95,07±0,06	2,8714±0,0004	2,8520±0,0019
1**	78,06±0,01	78,55±0,01	0,7806±0,0001	0,7855±0,0001
2**	93,06±0,01	88,52±0,20	1,8611±0,0002	1,7705±0,0039
3**	95,80±0,01	95,10±0,02	2,8799±0,0004	2,8522±0,0006

*Dispersão ultrassonicada com 15% de amplitude durante 20 minutos.

**Dispersão ultrassonicada com 20% de amplitude durante 20 minutos.

Valores expressos como média±desvio padrão.

Exceto as NLS contendo 1% de IBU, todas as outras NLS apresentaram EE acima de 93%, valor considerado alto e muito satisfatório.

A EE aumentou com o aumento na concentração de fármaco na dispersão. O mesmo pode ser observado com a CC.

Após 30 dias da obtenção das NLS contendo IBU, foram realizados novos ensaios para determinação da EE e da CC. Os resultados mostraram que não houve perda ou degradação de IBU das NLS, exceto uma pequena diminuição na dispersão contendo 2% de IBU. Este resultado também corrobora com os resultados de diâmetro, Pdl e PZ, nos quais observou-se que, principalmente para a dispersão contendo 3% de fármaco (obtida com 20% de amplitude durante 20 minutos), não houve alteração considerável nos valores destes parâmetros.

Os fatores que contribuem para se obter uma boa EE e CC são aqueles relacionados com as propriedades físico-químicas do fármaco e sua interação com o lipídio, além dos parâmetros da técnica de obtenção das NLS. Os principais fatores são (BUNJES, 2011; HOU et al, 2003; MÜLLER et al, 2000; PARHI E SURESH, 2012):

- A solubilidade do fármaco no lipídio fundido;
- A miscibilidade entre o fármaco fundido e o lipídio fundido;
- A estrutura física e química da matriz lipídica;
- Amorficidade da matriz lipídica.

Um ensaio simples de solubilidade do fármaco no lipídio fundido foi realizado. Foram pesados 500 mg de lipídio (triestearina) e aquecidos até a completa

fusão; massas de IBU foram adicionadas paulatinamente ao lipídio fundido, mantendo-se o aquecimento. A massa de 1,5 g apresentou-se totalmente miscível com 500 mg de lipídio fundido, confirmando a solubilidade e miscibilidade do fármaco ao lipídio e corroborando para a alta EE.

Mussi e colaboradores (2013) realizaram um delineamento experimental para obter NLS contendo doxorrubicina por ultrassonicação e alcançaram EE entre 30 e 99% e CC de 14 a 38% de acordo com as dispersões testadas. No referido estudo uma amplitude de 20% foi empregada durante 10 minutos, mesma amplitude empregada por este estudo, porém a composição da matriz lipídica e do sistema tensoativo foram totalmente diferentes.

Empregando a técnica de ultrassonicação, Li e colaboradores (2006) obtiveram uma EE de aproximadamente 90% para NLS contendo ácido esteárico como matriz lipídica e tetrandrina como fármaco, porém a CC não foi determinada.

Potta e colaboradores (2011) empregaram a técnica de HAP para obter NLS contendo IBU. Os componentes da dispersão foram diferentes aos utilizados neste estudo. Potta e colaboradores (2011) obtiveram NLS com matriz lipídica composta por ácido esteárico ou por tripalmitina ou por trilaurina. Como tensoativos utilizaram Lutrol F127 e/ou taurocolato de sódio. Porém, os parâmetros de homogeneização foram idênticos aos aqui considerados como melhores: 3 ciclos a 500 bar. A EE obtida por Potta e colaboradores (2011) foi superior a 93%, semelhante a EE por este estudo atingida, porém com o emprego de uma técnica diferente. A diferença entre a CC obtida por Potta e colaboradores (2011) e a obtida neste estudo pode ser atribuída, à diferente composição das dispersões pois a matriz lipídica e o sistema tensoativo foram diferentes além da concentração do fármaco utilizada.

Em estudo realizado por Ibrahim e colaboradores (2014) para incorporação de sulpirida em NLS, a técnica de ultrassonicação foi empregada com uma amplitude de 40% durante 3 minutos. Dispersões com matriz lipídica composta por um único lipídio ou mistura binária de lipídios estabilizadas com tensoativo foram obtidas e avaliadas. Como lipídios foram avaliados o ácido esteárico, Softisan[®] 154, Dynasan[®] 118 e o Inwirtor[®] 900 K e, como tensoativo foram testados Tween[®] 80, Span[®] 80 e poloxamer 188. O lipídio triestearina (Dynasan[®] 118) foi empregado tanto isoladamente quanto em mistura binária com o ácido esteárico. Para a dispersão com matriz lipídica composta apenas por triestearina a EE não ultrapassou 21% e a CC não ultrapassou 2,3%. Porém, quando a matriz lipídica foi composta por misturas

binárias de triestearina e ácido esteárico a EE obtida variou para 15 – 93% e a CC para 2 – 24%.

A CC é, geralmente, expressa em porcentagem, ou seja, é o percentual de fármaco em relação à massa de lipídio. A maneira de se calcular a CC pode variar de estudo para estudo, porém a relação matriz lipídica com o fármaco está sempre presente nas equações (IBRAHIM et al, 2014; LIMA et al, 2013; PARHI E SURESH, 2012; POTTA et al, 2011).

Os valores de CC variam desde 1% até 30%, podendo alcançar 50%, de acordo com a aproximação das características físico-químicas do fármaco e da matriz lipídica (MÜLLER et al, 2000; JUDEFEIND E VILLIERS, 2009).

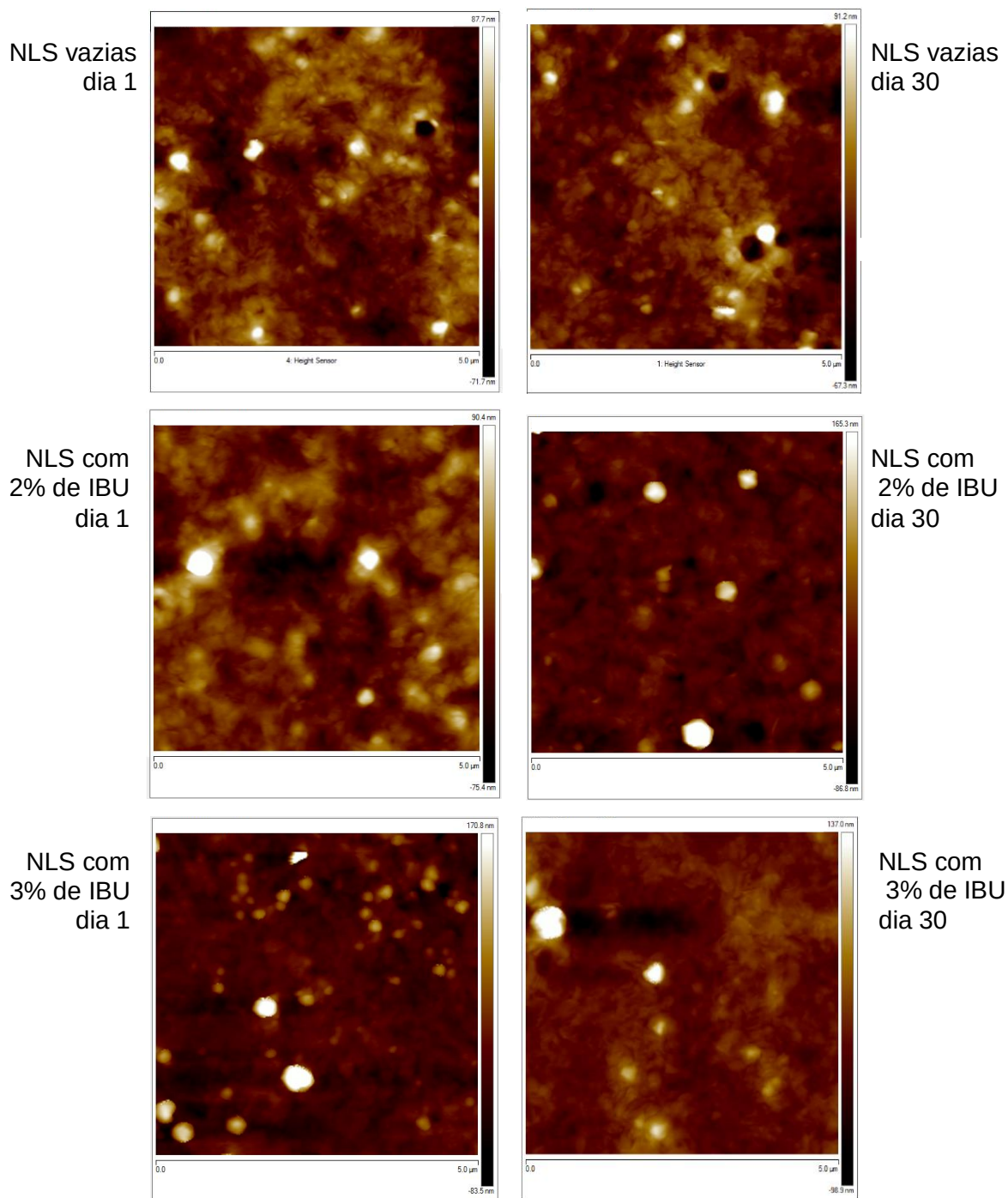
Neste estudo, a concentração de 5% de lipídio foi selecionada para compor a matriz lipídica. Sabe-se que, na maior parte dos casos, o aumento do conteúdo lipídico (5–10%) pode levar ao aumento do diâmetro das partículas e a distribuição pode tornar-se mais polidispersa (MEHNERT E MÄDER, 2012), por isso, foi mantida a concentração de 5% de lipídio. As concentrações de fármaco testadas variaram de 1 a 5%. Foi verificado que a dispersão contendo 5% de fármaco apresentou viscosidade elevada, por isso, não foram testadas concentrações superiores a 5% de IBU.

Assim, as dispersões obtidas por ultrassonicação com o emprego de 20% de amplitude durante 20 minutos contendo 2 e 3% de IBU foram as selecionadas para serem caracterizadas físico-quimicamente e morfologicamente.

5.3 Caracterização morfológica das NLS

As fotomicrografias obtidas por MFA das NLS vazias e das NLS contendo 2 e 3% de fármaco obtidas por ultrassonicação com o emprego de 20% de amplitude por 20 minutos estão registradas na figura 26. As análises foram realizadas no primeiro dia da obtenção das NLS e após 30 dias da primeira análise.

Figura 26 – Imagens de microscopia de força atômica das NLS vazias e das NLS contendo 2 e 3% de IBU obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude por 20 minutos



A forma das nanopartículas lipídicas é muito variada e pode algumas vezes fugir da esfericidade. Os lipídios tendem a se solidificar em estruturas lamelares (MEHNERT E MÄDER, 2012). As NLS, quando em estruturas lamelares, apresentam uma área de superfície maior do que as estruturas esféricas, sendo necessária uma

massa maior de tensoativo para promover a curvatura e estabilizar a estrutura esférica (MEHNERT E MÄDER, 2012).

Com a análise dos dados das fotomicrografias (figura 26), foi possível visualizar a presença das NLS. Nas fotomicrografias, as regiões mais claras (brancas) indicam que as partículas encontram-se na região superior da placa de mica tendendo para regiões mais profundas com o escurecimento. Parece evidente que houve aglomeração de partículas na superfície da placa de mica, demonstrada pelas áreas claras mais extensas em diferentes locais das fotomicrografias.

Houve tendência à morfologia esférica para a maioria das amostras de NLS, fato este desejável, pois, partículas que apresentam esta morfologia podem oferecer maior proteção para as substâncias incorporadas, além de promover uma liberação mais regular, pois, mantêm um contato máximo e homogêneo com o meio de dissolução em comparação com partículas que apresentem morfologia irregular e menor proporção de tensoativo (BUNJES E SIECKMANN, 2006; KUMAR E RANDHAWA, 2013). Entretanto, as formas anisométricas podem apresentar vantagens quando o fármaco for incorporado na camada de tensoativo ou ficar adsorvido na superfície da partícula (KUMAR E RANDHAWA, 2013).

Algumas partículas visualizadas nas micrografias apresentaram forma lamelar (BUNJES E SIECKMANN, 2006). As partículas com este tipo de forma podem levar à uma melhor disponibilidade do fármaco na corrente sanguínea e em alguns órgãos (KUMAR E RANDHAWA, 2013).

As partículas apresentaram uma camada circundante escura a qual pode ser atribuída ao tensoativo e, a presença do fármaco não alterou a forma das NLS. Grande diferença na forma e na aglomeração também não foi visualizada entre as análises do dia 1 e do dia 30.

Com relação à superfície das nanopartículas, aparentemente, demonstraram superfícies lisas.

As distribuições dos diâmetros das partículas obtidas nas análises de microscopia corroboraram com aquelas obtidas por DLS, conforme mostram as figuras 27 e 28.

Figura 27 – Distribuição do diâmetro das partículas de acordo com o determinado por MFA

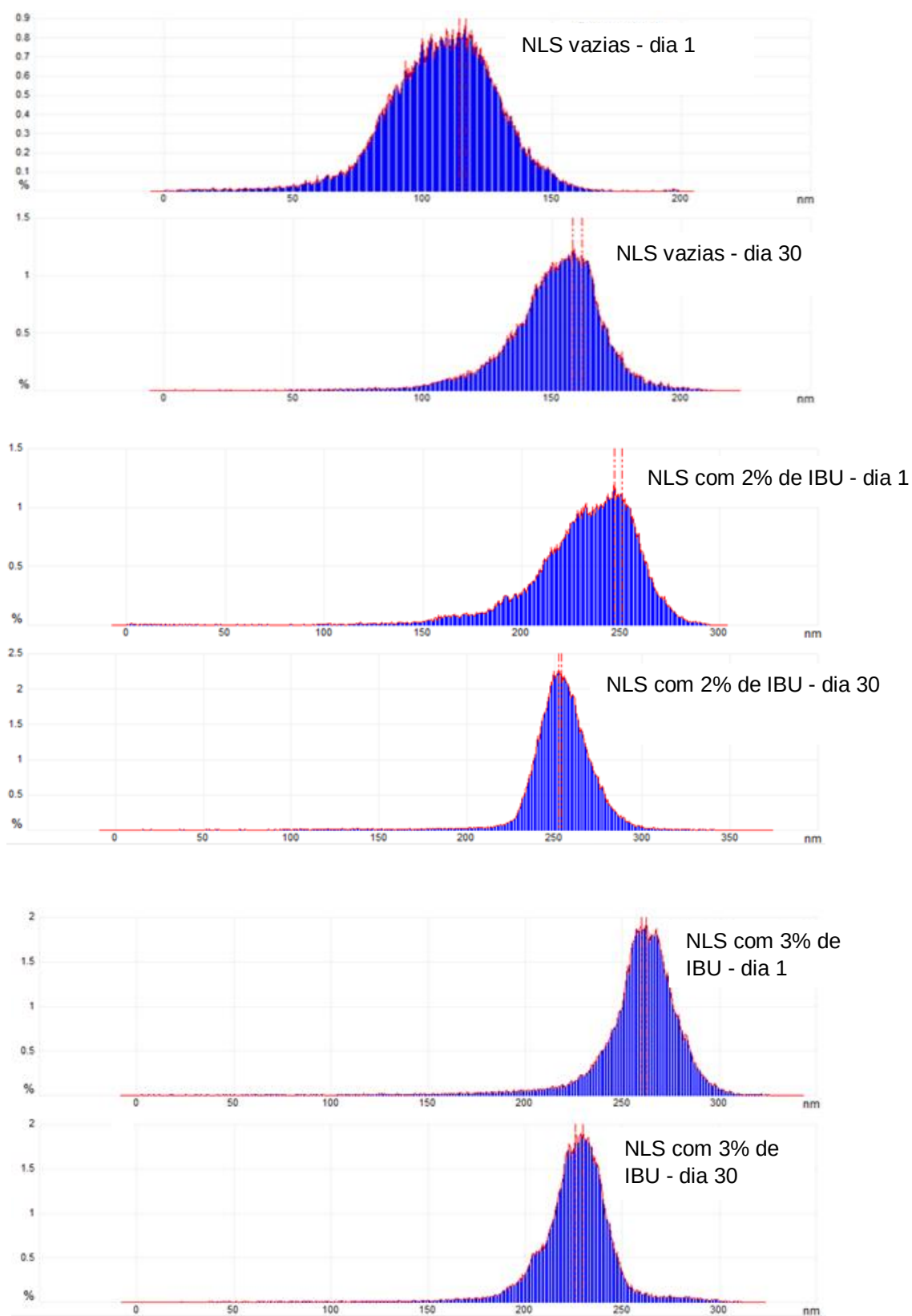
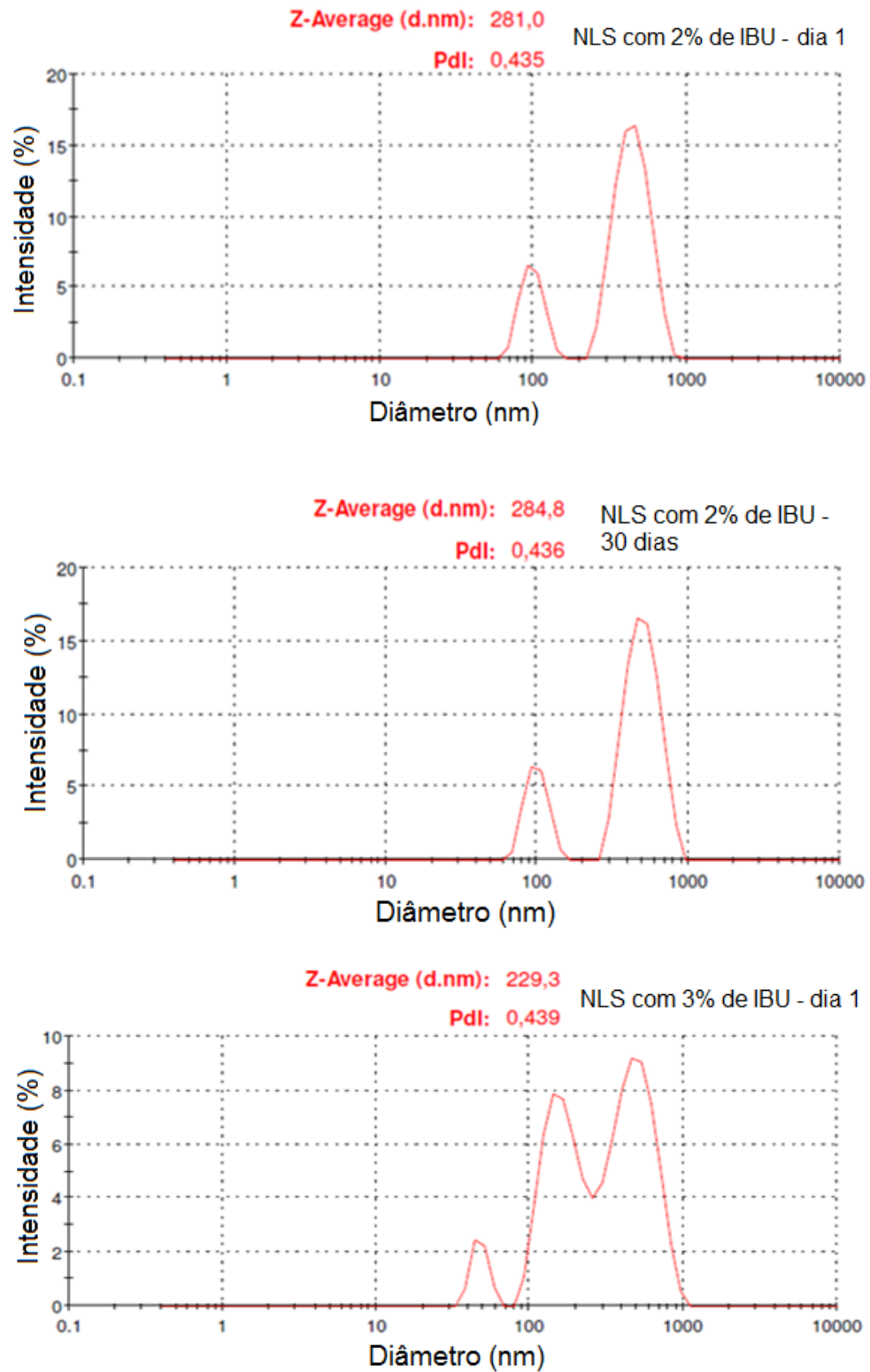
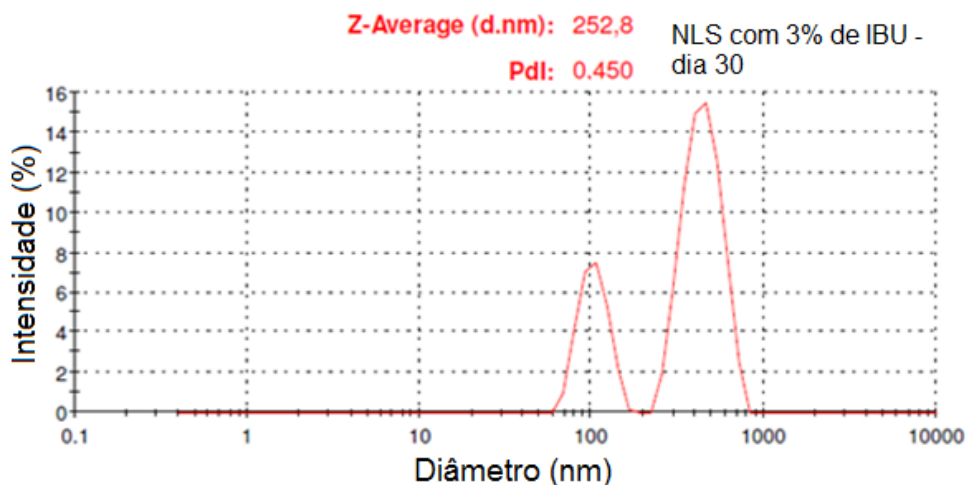


Figura 28 – Distribuição das partículas de acordo com o diâmetro obtido por DLS





Os valores médios dos diâmetros analisados por MFA são muito próximos dos valores médios obtidos por DLS, o que comprova que as NLS realmente são de dimensões nanométricas.

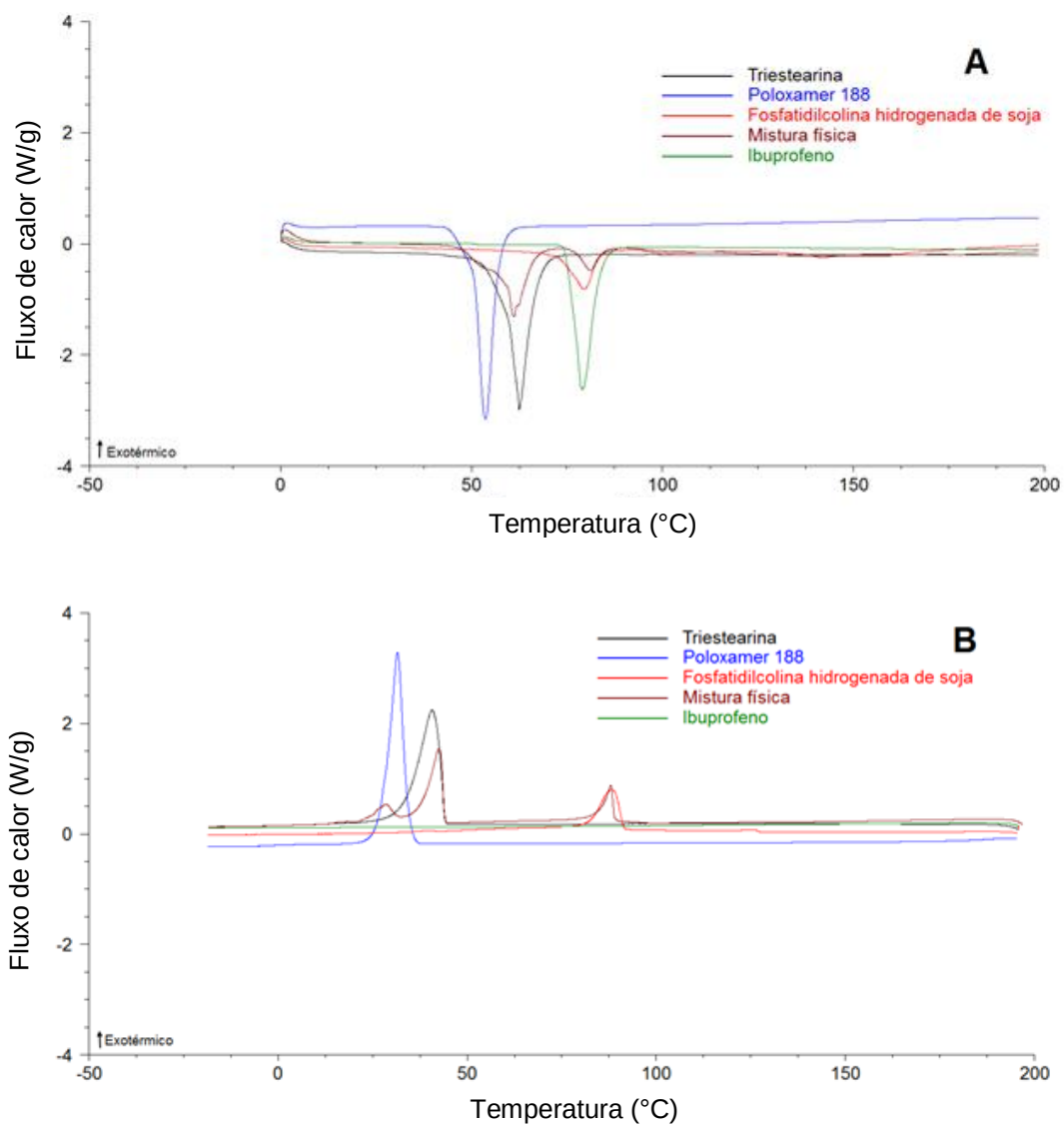
5.4 Caracterização físico-química das NLS

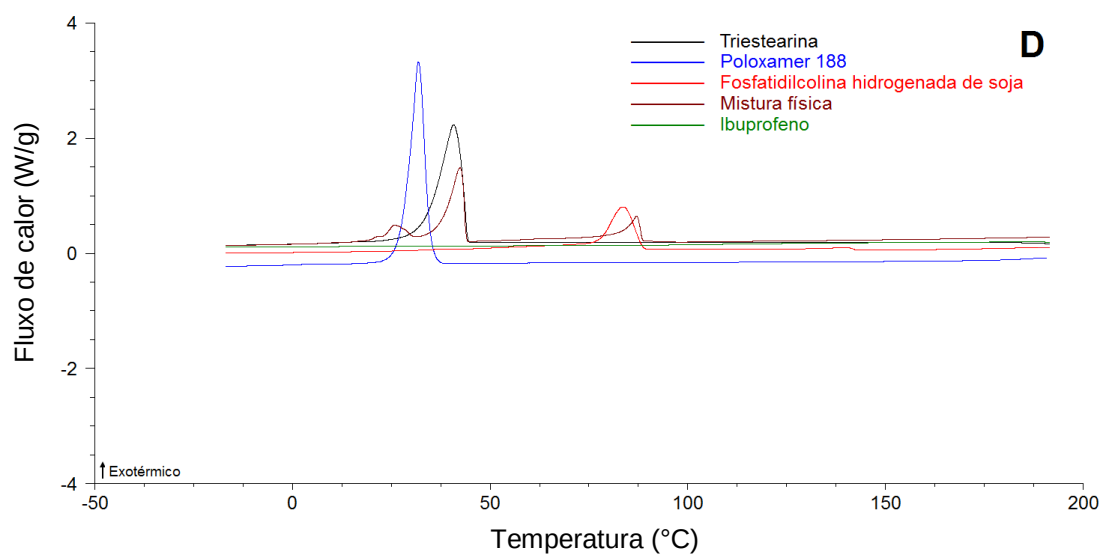
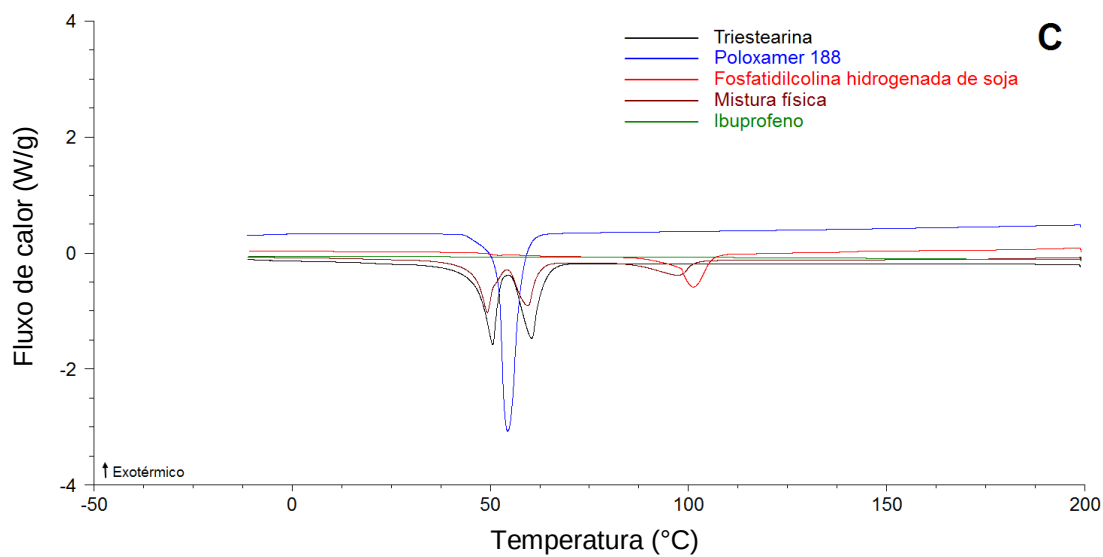
5.4.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A figura 29 mostra as curvas de DSC dos componentes da dispersão analisados separadamente e a mistura física dos mesmos. As curvas de DSC foram obtidas com os ciclos de aquecimento e resfriamento, sendo:

- Primeiro ciclo de aquecimento de 25°C a 200°C e de resfriamento de 200°C a -20°C;
- Segundo ciclo de aquecimento de -20°C a 200°C e de resfriamento de 200°C a -20°C.

Figura 29 – Curvas de DSC dos componentes da dispersão. **A e B**: primeiro ciclo de aquecimento e resfriamento, respectivamente (A: 25°C a 200°C e B: 200°C a -20°C); **C e D**: segundo ciclo de aquecimento e resfriamento, respectivamente (C: -20°C a 200°C e D: 200°C a -20°C)





A tabela 12 identifica as entalpias obtidas a partir da análise das curvas DSC dos componentes da dispersão e da mistura física dos mesmos.

Tabela 12 – Entalpias obtidas nos diferentes ciclos de aquecimento e resfriamento a partir das curvas de DSC dos componentes da dispersão e da mistura física dos mesmos

Amostra	Ciclo	Aquecimento		Resfriamento	
		Temperatura de fusão (°C)	ΔH obtida (J/g)	Temperatura de cristalização (°C)	ΔH obtida (J/g)
Ibuprofeno	1º ciclo	79	87,6	-	-
	2º ciclo	-	-	-	-
Fosfatidilcolina hidrogenada de soja	1º ciclo	79,5	28,3	88,2	26,5
	2º ciclo	101,3	26,1	83,7	30,3
Poloxamer 188	1º ciclo	53,7	109,5	54,4	101,6
	2º ciclo	31,6	98,7	31,9	98,6
Triestearina	1º ciclo	62,5	112,9	40,7	89,5
	2º ciclo	50,6	84,5	40,8	88,8
Mistura física	1º ciclo	61,1	62,9	28,4	7,7
		81,1	11,6	42,6	33,7
				88	12,7
	2º ciclo	49,3	49,4	25,8	7,3
		97,7	13,2	42,4	34,7
				87,1	13,8

O IBU apresentou um único evento endotérmico (de fusão) em 79°C (figura 29), valor este que se encontra dentro dos limites da faixa de fusão descrita pela literatura (NEWA et al, 2007; PATEL et al, 2013; POTTHAST et al, 2005). À presença do pico afilado e intenso atribuiu-se a cristalinidade e pureza do IBU.

A triestearina (figura 29), apresentou no primeiro ciclo de aquecimento, um evento endotérmico em 62,5 °C, com um ΔH de 112,9 J/g, o qual foi atribuído à sua fusão. A presença do pico foi atribuída a sua cristalinidade. No primeiro ciclo de resfriamento, a triestearina apresentou um único evento exotérmico em 40,7°C com um ΔH de 89,5 J/g, o que é indicativo de recristalização nesta temperatura. Porém, a grande diferença observada tanto entre as temperaturas de fusão e recristalização e

entre as respectivas entalpias é indicativa da presença de polimorfos (SIEKMANN E WESTESEN, 1994).

A presença de polimorfos da triestearina ficou evidenciada a partir do segundo ciclo de aquecimento (figura 29C), quando os eventos endotérmicos foram diferentes daqueles apresentados no primeiro ciclo de aquecimento. Neste segundo ciclo de aquecimento os mesmos aconteceram em aproximadamente 50,6°C e em 61,1°C, temperaturas semelhantes às apresentadas pelas formas polimórficas α e β' (BUNJES et al, 2007; DORA et al, 2012), mais um fato indicativo da presença da mistura de diferentes formas polimórficas. No segundo ciclo de resfriamento, o evento exotérmico foi praticamente idêntico ao do primeiro ciclo, com temperaturas de recristalização e entalpias muito semelhantes (tabela 12), fato este que reforça o indicativo da presença de polimorfos.

O poloxamer 188 apresentou um único evento endotérmico de fusão em 53,7°C no primeiro ciclo de aquecimento (figura 29A) com entalpia de 109,5 J/g. A sua cristalinidade e pureza foram confirmadas pelo pico intenso e afilado e, adicionalmente, são com os dados obtidos a partir do primeiro ciclo de resfriamento onde os valores da temperatura de recristalização e entalpia foram muito próximos daqueles obtidos para o primeiro ciclo de aquecimento, tais dados estão de acordo com o descrito na literatura (JANNIN et al, 2006; GHAREEB et al, 2009; GILL et al, 2010; IGE et al, 2013; SHARMA et al, 2013). Porém, quando comparados os valores obtidos no primeiro ciclo de aquecimento e resfriamento com os obtidos no segundo ciclo, houve diminuição tanto nas temperaturas de fusão e recristalização quanto nas entalpias.

Já a FHS apresentou, no primeiro ciclo de aquecimento e resfriamento, um evento endotérmico em 79,5°C com entalpia de 28,3 J/g e um evento exotérmico em 88,2°C com entalpia de 26,5 J/g (figura 29). Ambos os eventos do primeiro ciclo apresentaram pico com base alargada e com pouca intensidade, evidenciando uma menor cristalinidade do que aquelas apresentadas pelos outros componentes da dispersão. Os valores de temperatura e entalpias obtidas no segundo ciclo foram diferentes daquelas obtidas no primeiro ciclo.

A partir da análise das curvas de DSC da mistura física de todos os componentes da dispersão (figura 29), evidenciou-se uma interação entre a triestearina e o poloxamer 188 pois, no primeiro aquecimento, houve o aparecimento de um único pico situado entre as temperaturas de fusão da triestearina e do

poloxamer 188 (61,1°C) com um alargamento da base do pico e diminuição de intensidade. Adicionalmente, um segundo pico foi evidenciado entre as temperaturas de fusão da FHS e do IBU (81,1°C), porém com características predominantes da FHS, sugerindo uma possível interação entre essas substâncias. Outra possibilidade seria parte do IBU ter se dissolvido no lipídio fundido e parte ter se fundido com a FHS.

No primeiro e no segundo ciclos de resfriamento, ficaram evidentes os picos de recristalização da FHS, da triestearina e do poloxamer 188. Os valores das temperaturas de recristalização e das entalpias do primeiro e do segundo ciclos de resfriamento, foram semelhantes, indicando não ter havido eventos importantes no processo de recristalização.

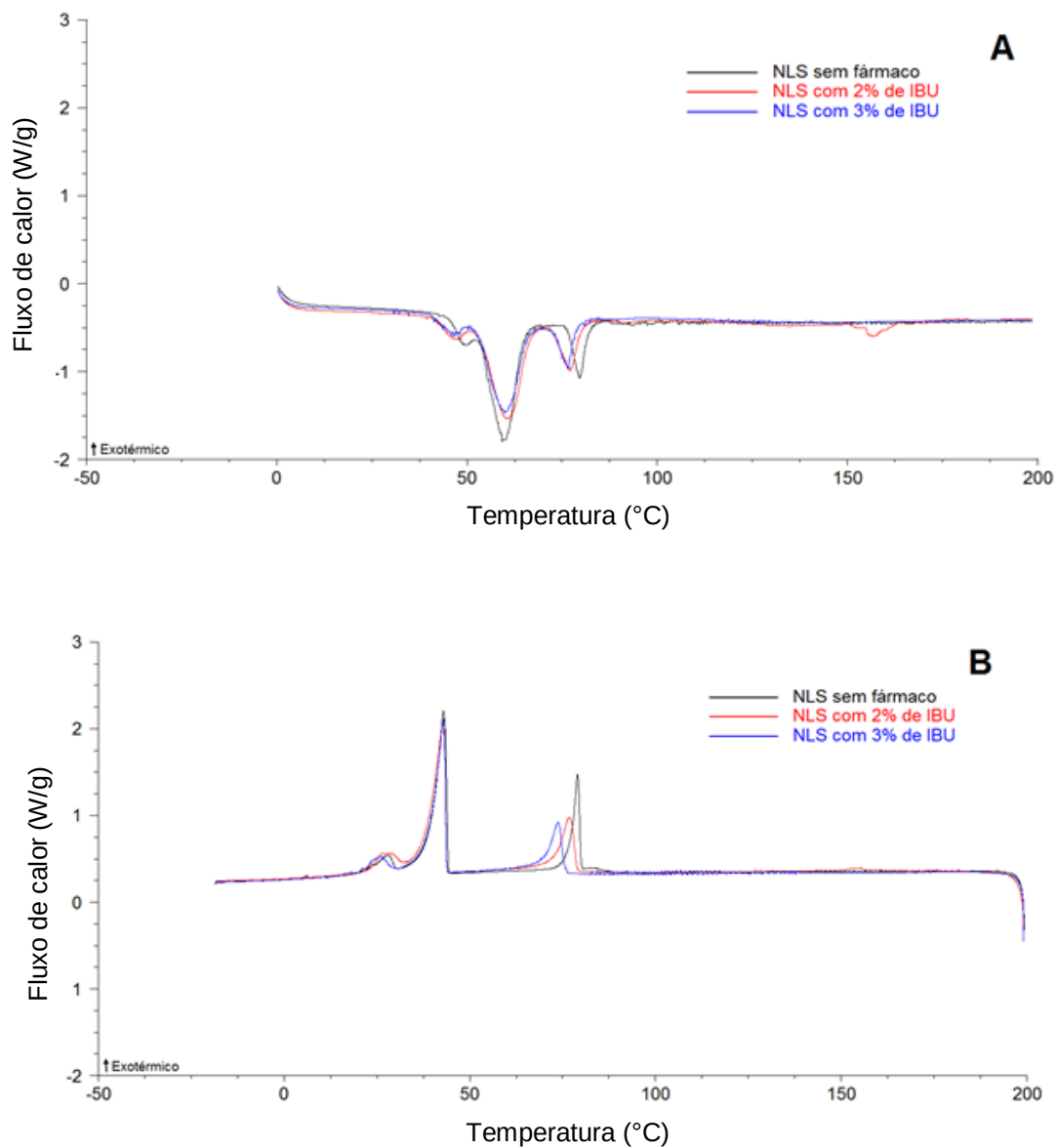
Conforme evidenciados na curva de DSC do segundo ciclo de aquecimento da triestearina (figura 29C), os dois eventos de fusão atribuídos à modificação polimórfica da triestearina também foram visualizados no segundo ciclo de aquecimento da mistura física.

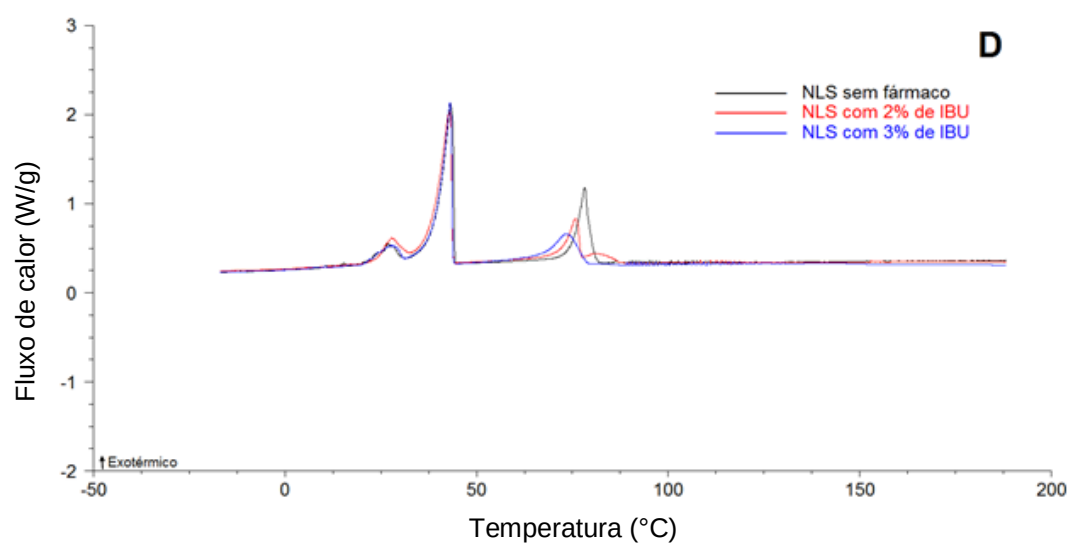
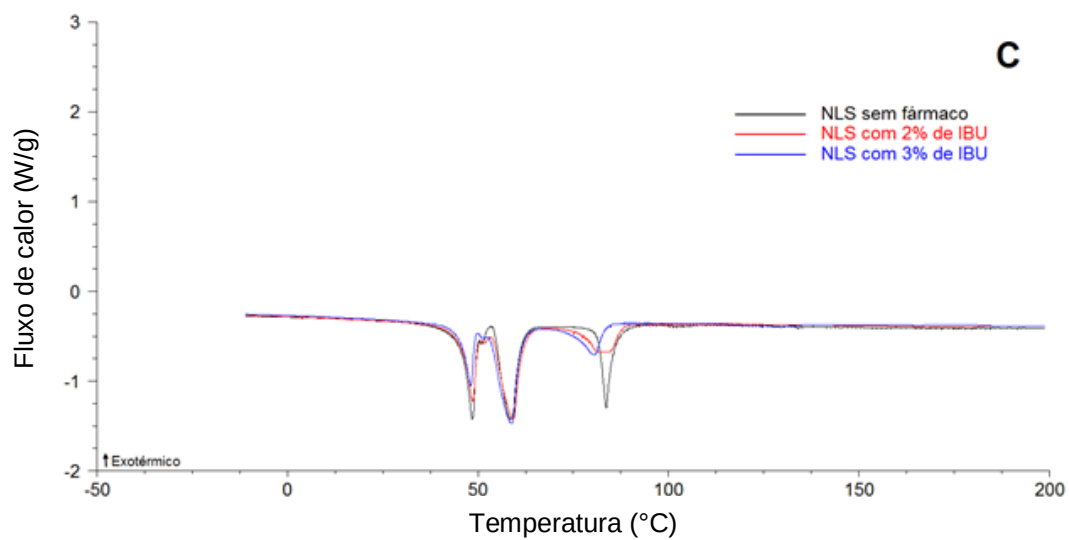
A figura 30 mostra as curvas de DSC obtidas pela análise das NLS sem fármaco e contendo 2 e 3% de IBU no primeiro dia após a obtenção das NLS. Já a figura 31 mostra as curvas de DSC obtidas pela análise das NLS sem fármaco e contendo 2 e 3% de IBU 30 dias após a obtenção das NLS. As curvas de DSC referentes às NLS também foram analisadas de acordo com os ciclos de aquecimento e resfriamento, sendo:

- Primeiro ciclo de aquecimento de 25°C a 200°C e de resfriamento de 200°C a -20°C;

Segundo ciclo de aquecimento de -20°C a 200°C e de resfriamento de 200°C a -20°C.

Figura 30 – Curvas DSC das NLS sem fármaco e contendo 2 e 3% de IBU obtidas 1 dia após a produção das NLS. **A e B**: primeiro ciclo de aquecimento e resfriamento, respectivamente (A: 25°C a 200°C e B: 200°C a -20°C); **C e D**: segundo ciclo de aquecimento e resfriamento, respectivamente (C: -20°C a 200°C e D: 200°C a -20°C)





A tabela 13 identifica as entalpias obtidas a partir da análise das curvas DSC das NLS sem fármaco e contendo 2 e 3% de IBU (dia 1).

Tabela 13 – Entalpias obtidas nos diferentes ciclos de aquecimento e resfriamento a partir das curvas de DSC de NLS sem fármaco e contendo 2 e 3% de IBU obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude durante 20 minutos. Análises realizadas em 24 horas da obtenção das NLS

Amostra	Ciclo	Aquecimento		Resfriamento	
		Temperatura de fusão (°C)	ΔH obtida (J/g)	Temperatura de cristalização (°C)	ΔH obtida (J/g)
NLS sem fármaco	1º ciclo	48,8	3,3	28,2	4,8
		59,2	46,5	42,9	42,5
		79,6	11,0	79,0	15,3
	2º ciclo	48,5	22,1	26,9	4,7
		58,5	29,1	43,2	42,5
		83,7	17,4	78,3	17,5
NLS com 2% de IBU	1º ciclo	46,6	4,5	26,2	5,0
		60,8	50,8	42,7	41,5
		77,1	14,6	76,8	16,8
	2º ciclo	48,6	14,8	27,8	5,4
		59,2	27,6	43,0	41,6
		84,4	14,4	76,0	14,7
NLS com 3% de IBU	1º ciclo	46,0	4,7	26,3	5,0
		59,9	47,5	43,0	39,6
		76,5	12,0	73,8	14,0
	2º ciclo	48,1	9,7	27,8	5,6
		58,9	32,5	43,1	39,6
		80,5	12,0	73,5	14,3

Analisando as curvas de DSC das NLS sem fármaco e contendo 2 e 3% de IBU (figura 30), é possível a percepção de uma diminuição na intensidade dos picos (principalmente no pico da FHS) com o aumento na concentração de IBU, fato indicativo de interação entre a FHS e o IBU.

A modificação polimórfica atribuída à triestearina também foi identificada nas curvas de DSC apresentadas na figura 30C.

O evento de fusão do IBU não pôde ser identificado, fato este que sugere duas hipóteses: a primeira de que ele estivesse dissolvido parte no lipídio e parte na FHS ou dissolvido em sua totalidade ou no lipídio ou na FHS. Como as entalpias referentes à fusão da triestearina assim como a da FHS apresentaram um discreto

aumento para NLS contendo fármaco (2 e 3% de IBU) quando comparada com NLS sem fármaco, a hipótese de que o IBU encontrava-se parte solubilizado no lipídio e parte na FHS tornar-se-ia a mais provável, porém, visualizando o pico endotérmico referente à FHS da figura 31 a hipótese de que o IBU tenha interagido mais com a FHS do que com a triestearina é a mais provável.

Assim, o aumento na entalpia da FHS nas NLS contendo IBU é indicativo da forte interação entre o IBU e a FHS, devido a necessidade de uma maior energia para romper a estrutura cristalina formada.

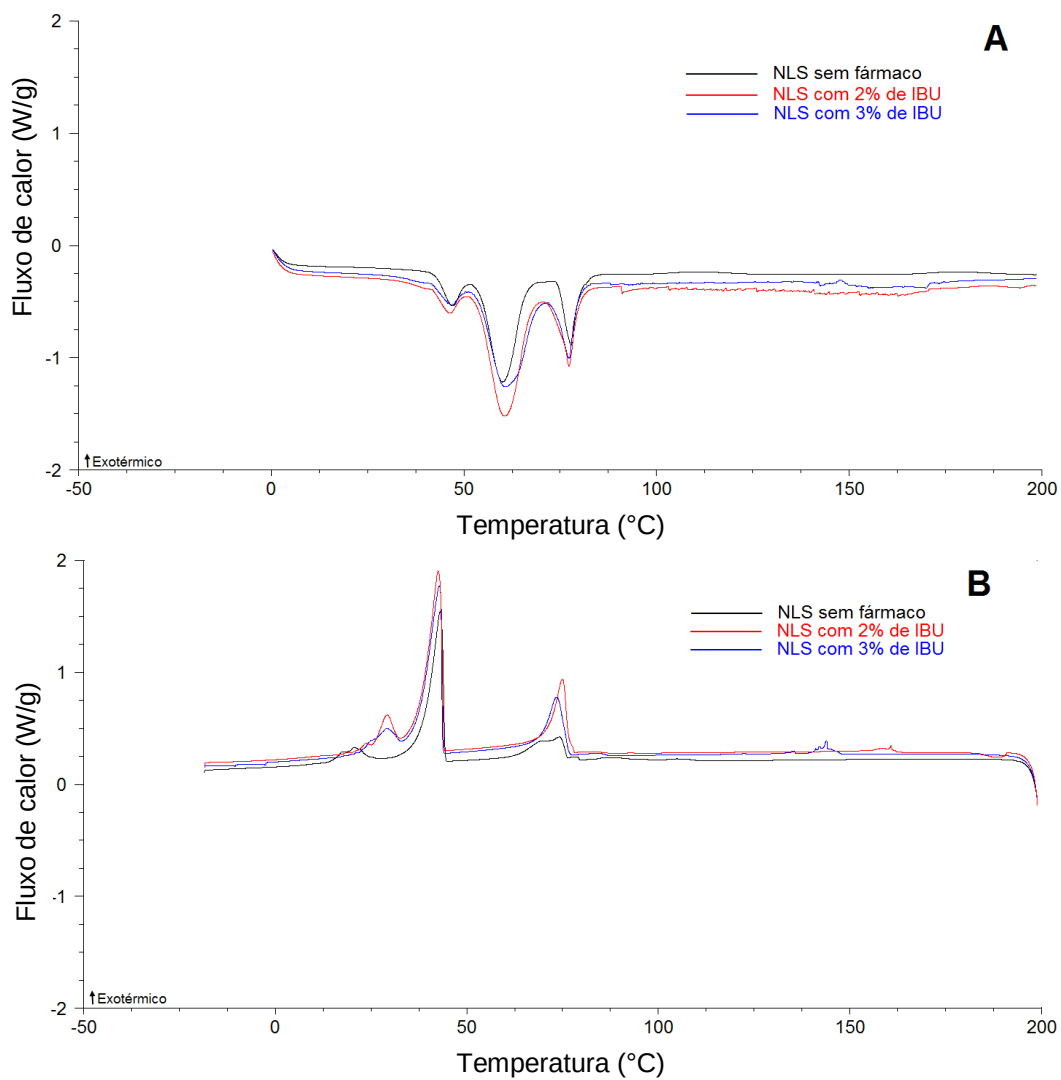
Outro fator indicativo da interação entre os componentes das NLS e a consequente formação das mesmas é a alteração nas temperaturas de fusão, principalmente quando há a diminuição destas. A alteração nas temperaturas de fusão é consequência da modificação estrutural ocorrida com a formação das NLS e, também pode estar relacionada com as dimensões nanométricas das NLS (KUMAR E RANDHAWA, 2013; VAGHASIYA et al, 2013). Outro fator que também pode explicar a diminuição da temperatura de fusão é a presença de diferentes polimorfos (KUMAR E RANDHAWA, 2013). Para os picos correspondentes ao poloxamer 188 nas NLS houve uma diminuição de 53,7°C (poloxamer isolado) para aproximadamente 47°C. O mesmo pode ser observado para os picos correspondentes à triestearina os quais apresentaram uma diminuição da temperatura de fusão de 62,5°C (triestearina isolada) para aproximadamente 60°C. Já a FHS apresentou uma maior alteração na temperatura de fusão quando o IBU foi incorporado às NLS, essa alteração foi de 79,5°C (FHS isolada) para aproximadamente 77°C; nas NLS sem IBU, a temperatura de fusão da FHS permaneceu inalterada daquela observada na curva de DSC da FHS isolada, ou seja, 79,5°C para a FHS isolada e 79,6°C para a FHS nas NLS (tabelas 12 e 13).

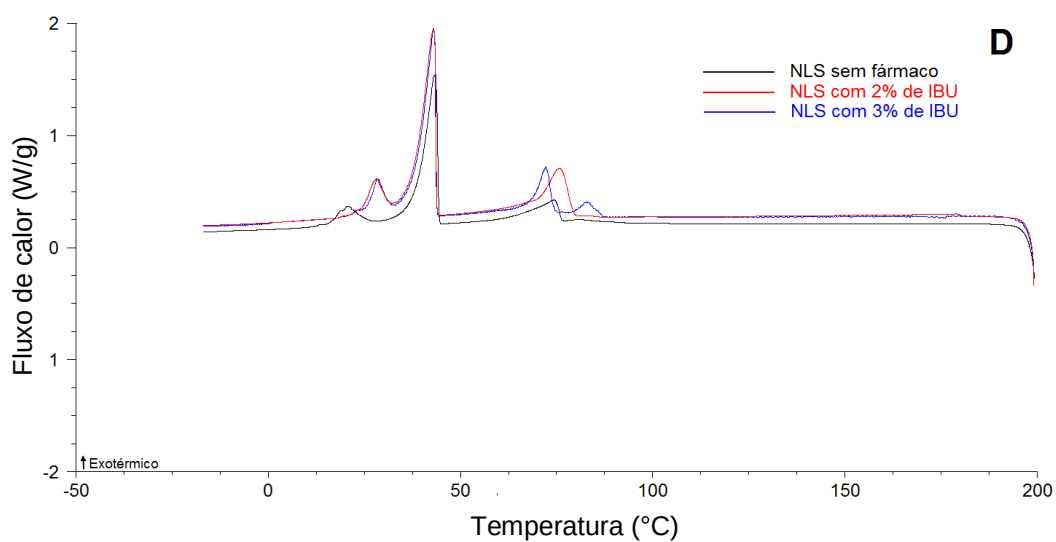
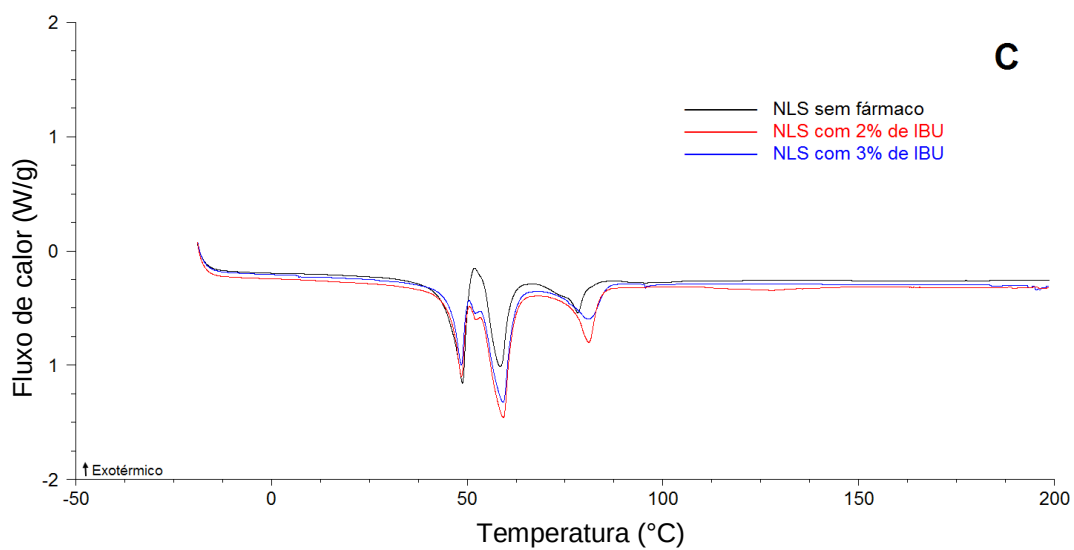
No estudo realizado por Potta e colaboradores (2011) com NLS contendo IBU, também foi verificada uma diminuição na temperatura de fusão dos lipídios nas curvas de DSC e, tal diminuição foi verificada tanto para as NLS sem IBU quanto para as NLS com IBU; a temperatura de fusão do IBU quando incorporado às NLS não foi visualizada, indicando seu estado amorfo.

Perge e colaboradores (2012) trabalharam com micropartículas contendo IBU e relataram a diminuição da temperatura de fusão do álcool cetílico e o desaparecimento do evento de fusão do IBU.

As temperaturas de fusão e recristalização e as entalpias obtidas para as NLS contendo 2% de IBU foram muito próximas daquelas obtidas para as NLS contendo 3% de IBU em ambos os ciclos, exceto para os valores das temperaturas de fusão e entalpias encontradas no segundo ciclo de aquecimento onde, para NLS contendo 2% de IBU a fusão da triestearina gerou um ΔH de 27,6 J/g, enquanto que o mesmo evento para NLS contendo 3% de IBU gerou um ΔH de 32,5 J/g.

Figura 31 - Curvas de DSC das NLS sem fármaco e contendo 2 e 3% de IBU obtidas 30 dias após a produção das NLS. **A e B**: primeiro ciclo de aquecimento e resfriamento, respectivamente (A: 25°C a 200°C e B: 200°C a -20°C); **C e D**: segundo ciclo de aquecimento e resfriamento, respectivamente (C: -20°C a 200°C e D: 200°C a -20°C)





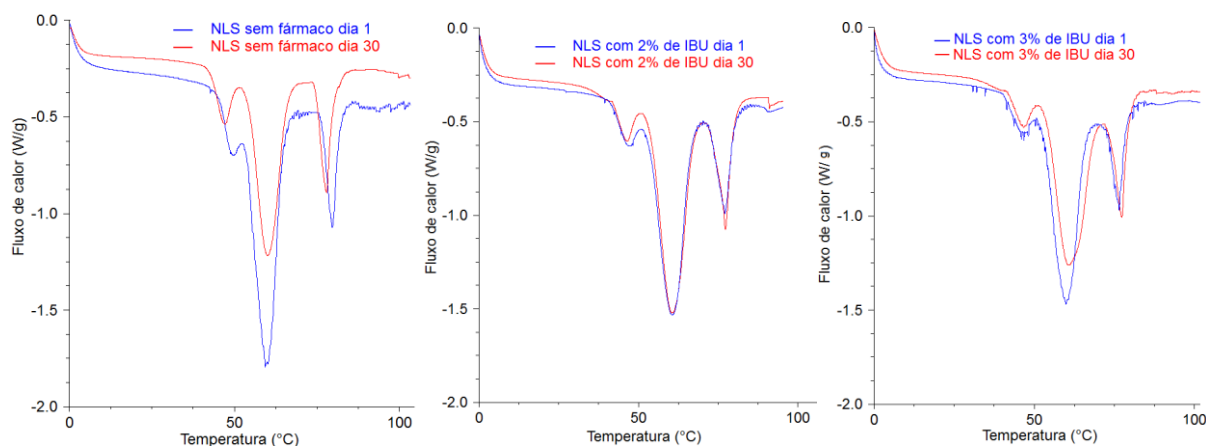
A tabela 14 identifica as entalpias obtidas a partir da análise das curvas DSC das NLS sem fármaco e contendo 2 e 3% de IBU 30 dias após a obtenção das NLS.

Tabela 14 – Entalpias obtidas nos diferentes ciclos de aquecimento e resfriamento a partir das curvas de DSC de NLS sem fármaco e contendo 2 e 3% de IBU obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude durante 20 minutos. Análises realizadas após 30 dias da obtenção das NLS

Amostra	Ciclo	Aquecimento		Resfriamento	
		Temperatura de fusão (°C)	ΔH obtida (J/g)	Temperatura de cristalização (°C)	ΔH obtida (J/g)
NLS sem fármaco	1º ciclo	46,9	6,3	20,5	4,9
		60,0	39	43,1	34,9
		77,3	12,9	74,1	8,5
	2º ciclo	48,8	31,99	20,8	5,0
		58,4	24,2	43,2	35,1
		78,3	9,1	74,4	8,0
NLS com 2% de IBU	1º ciclo	46,3	4,7	29,2	4,9
		60,5	52,8	42,6	41,9
		77,3	15,3	74,9	16,8
	2º ciclo	48,5	11,4	28,2	5,5
		59,3	32,9	43,0	42,4
		81,0	15,0	75,7	16,7
NLS com 3% de IBU	1º ciclo	46,6	4,3	28,9	4,9
		60,5	45,7	42,8	37,8
		77,3	12,7	73,5	15,1
	2º ciclo	48,5	9,8	28,3	5,8
		59,2	30,8	42,9	39,3
		80,9	12,8	72,2	12,8

Para as análises das curvas DSC obtidas após 30 dias da obtenção das NLS foram observadas temperaturas de fusão e recristalização bem como entalpias com valores muito semelhantes àqueles observados na análise realizada 1 dia após a obtenção das NLS, fato este que corrobora com os dados de EE obtidos (tabela 11). Porém, ficou evidenciado um ligeiro estreitamento do pico e maior definição de início e término dos eventos (figura 32).

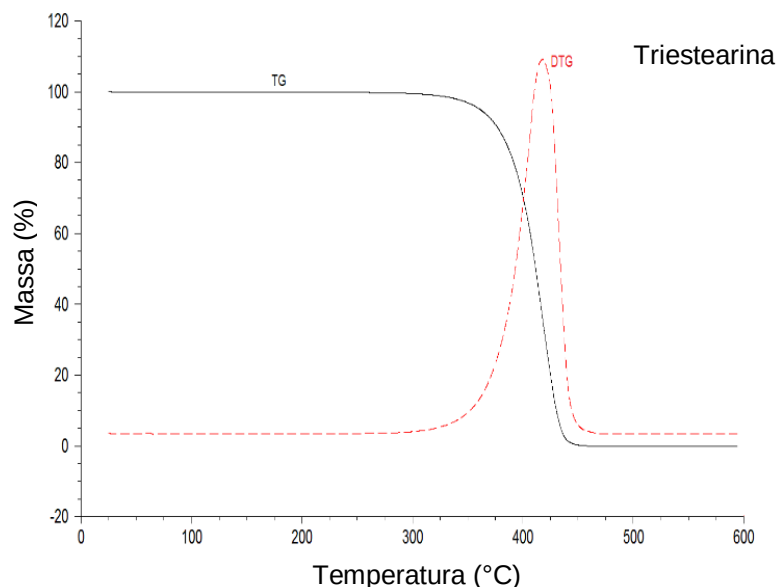
Figura 32 – Curvas de DSC referentes ao primeiro ciclo de aquecimento (de 0 a 100°C) das NLS sem fármaco e contendo 2 e 3% de IBU obtidas no primeiro e no trigésimo dia após a obtenção das NLS

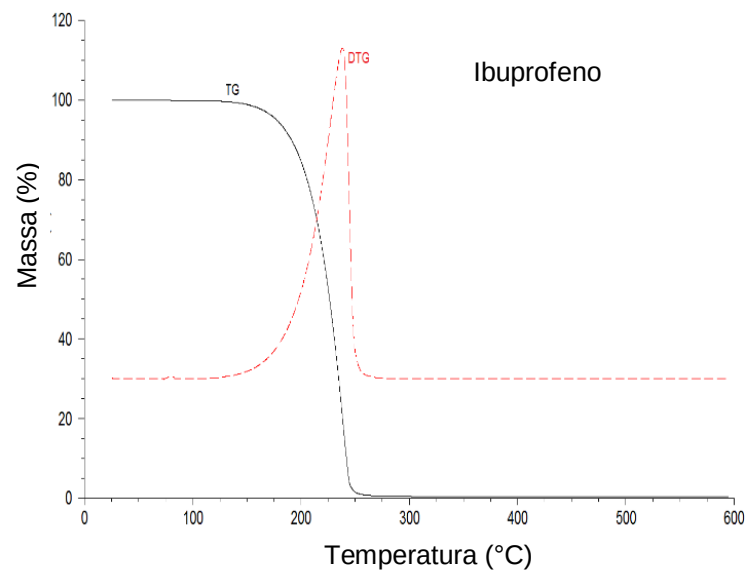
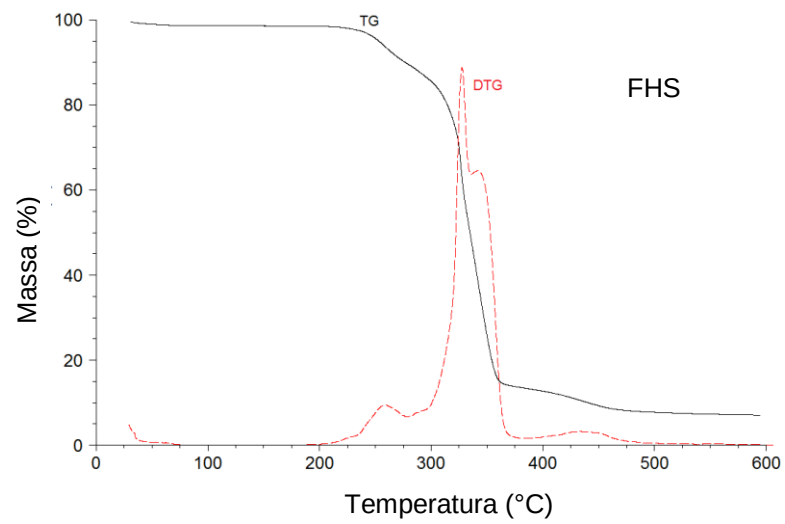
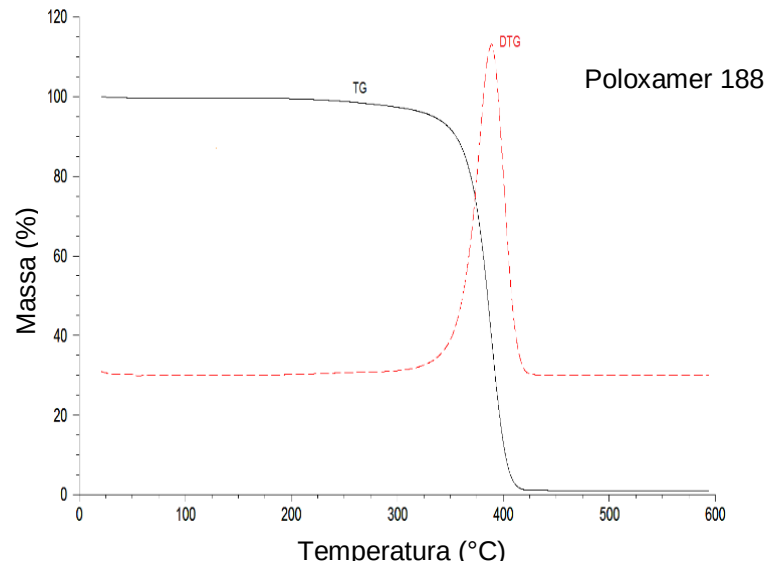


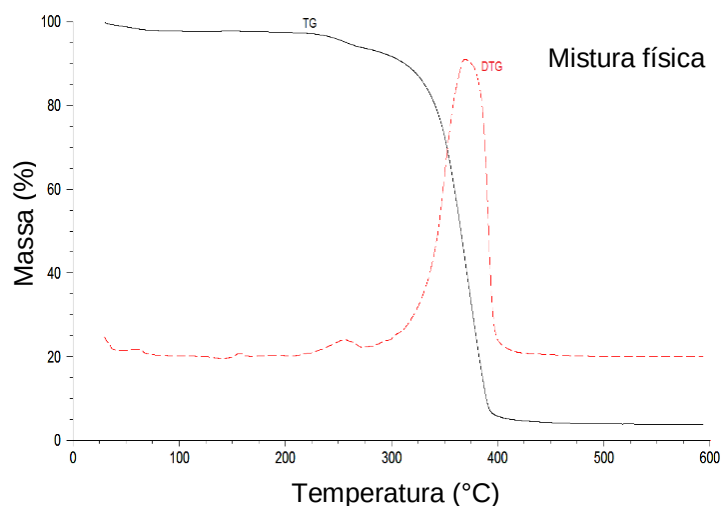
5.4.2 Termogravimetria e termogravimetria derivada (TG/DTG)

Na figura 33 estão as curvas termogravimétricas (TG) e termogravimétricas derivadas (DTG) obtidos com as análises dos componentes das NLS isoladamente e da mistura física dos mesmos.

Figura 33 – Curvas de TG/DTG dos componentes das NLS analisados individualmente e da respectiva mistura física







Os estudos sobre a variação da massa de uma amostra, a termogravimetria (TG), é o resultado de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação) em função do tempo ou da temperatura. Neste estudo, realizou-se um estudo sobre a variação da massa em função da temperatura para verificar alguma transformação química, ou seja, a degradação das amostras analisadas (SILVA, 2005).

Já a termogravimetria derivada (DTG) é a derivada da variação de massa em relação ao tempo ou temperatura da curva de TG. Esta técnica é capaz de auxiliar na visualização e esclarecimentos dos eventos que ocorrem na curva de TG. A área dos picos da curva DTG é proporcional ao total de massa perdida pela amostra, além de possibilitar a determinação das temperaturas inicial e final do processo (SILVA, 2005).

A triestearina iniciou a perda de massa a partir de 260°C (figura 33), sendo que a temperatura final da perda de massa ocorreu em 457°C, restando um resíduo de 0,01482% da sua massa, ou seja, praticamente 100% da triestearina foi degradada sob altas temperaturas.

O poloxamer 188 iniciou a perda de massa em 198°C (figura 33), a qual foi quase que completamente degradada até 442°C, restando um resíduo mínimo de 0,004202% da sua massa inicial.

A FHS iniciou a degradação com perda de massa a partir de 203°C (figura 33), tal perda continuou a acontecer até temperaturas acima de 400°C, sendo que, nesta temperatura a massa residual era de 0,04808%. A FHS é o único componente que apresentou várias perdas de massas de acordo com os dados das suas curvas

de TG/DTG, nas quais foi possível de se verificar a presença de vários picos (curva de DTG) (figura 33).

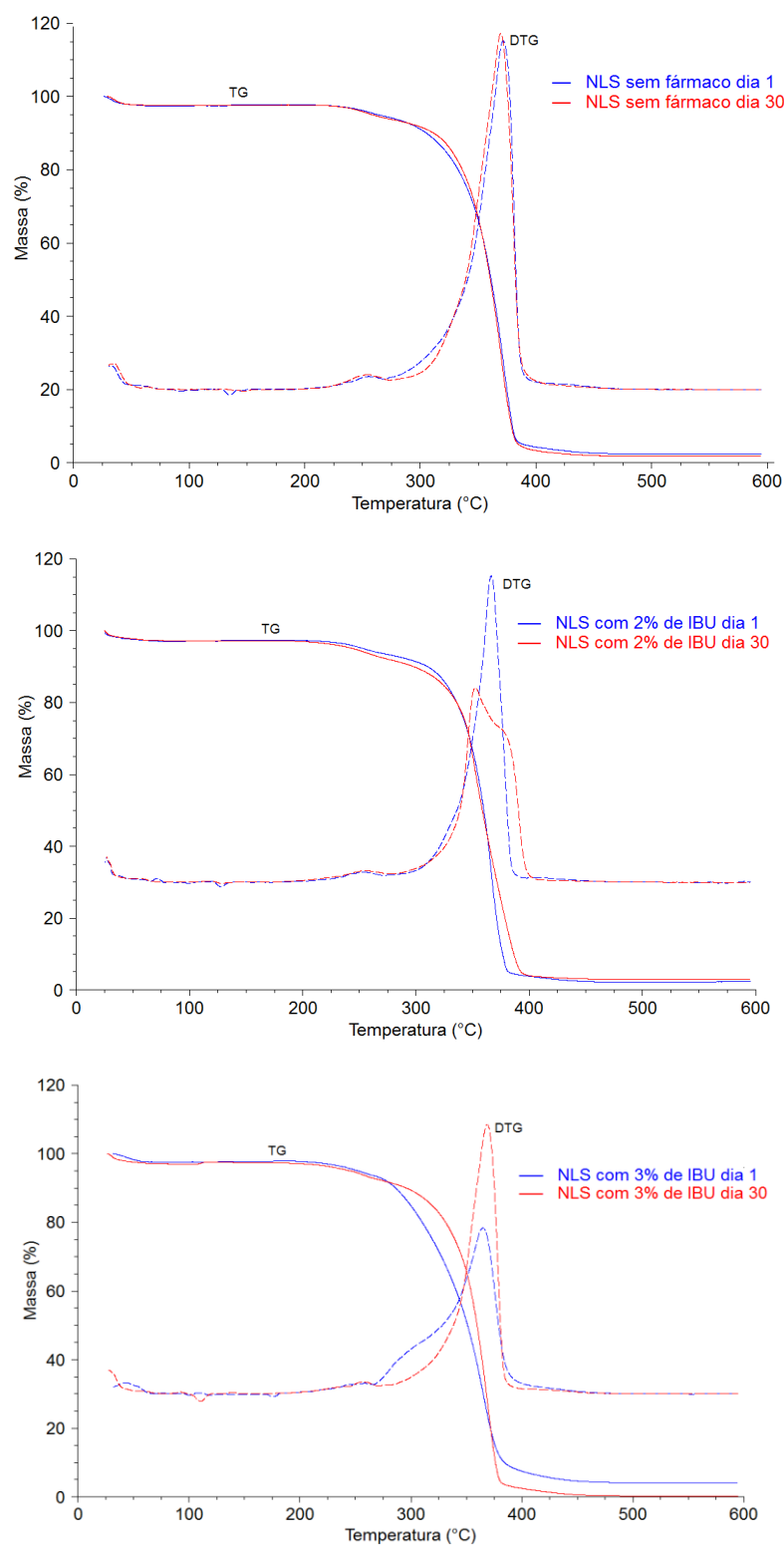
O IBU apresentou perda de massa a partir de 150°C e teve a sua massa quase que completamente vaporizada à 277°C, ou seja, aproximadamente 99,3% da sua massa total vaporizada à referida temperatura (figura 33). O IBU frequentemente sofre processo de vaporização em análises termogravimétricas (LERDKANCHANAPORN E DOLLIMORE, 2000).

As curvas de TG/DTG (figura 33) para a mistura física dos componentes das NLS mostraram início de perda de massa próximo à 200°C, e, à 430°C restavam praticamente 0,03% da massa inicial da amostra. Também foi possível de se visualizar a presença de diferentes picos na curva de DTG, porém em temperaturas um pouco diferentes das apresentadas nos outros termogramas, além de um pico mais alargado, indicando a interação entre os componentes.

A partir da análise conjunta de todas as curvas de TG/DTG concluiu-se que a temperatura de 75°C empregada durante o processo de obtenção das NLS não foi suficiente para degradar qualquer componente das NLS, inclusive o fármaco, demonstrando que o processo foi seguro e garantiu a estabilidade química dos componentes.

A figura 34 mostra as curvas de TG/DTG das NLS sem fármaco e contendo 2 e 3% de IBU obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude durante 20 minutos.

Figura 34 – Curvas de TG/DTG das NLS sem fármaco e contendo 2 e 3% de IBU obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude durante 20 minutos. Análises realizadas 24 horas da obtenção das NLS e após 30 dias

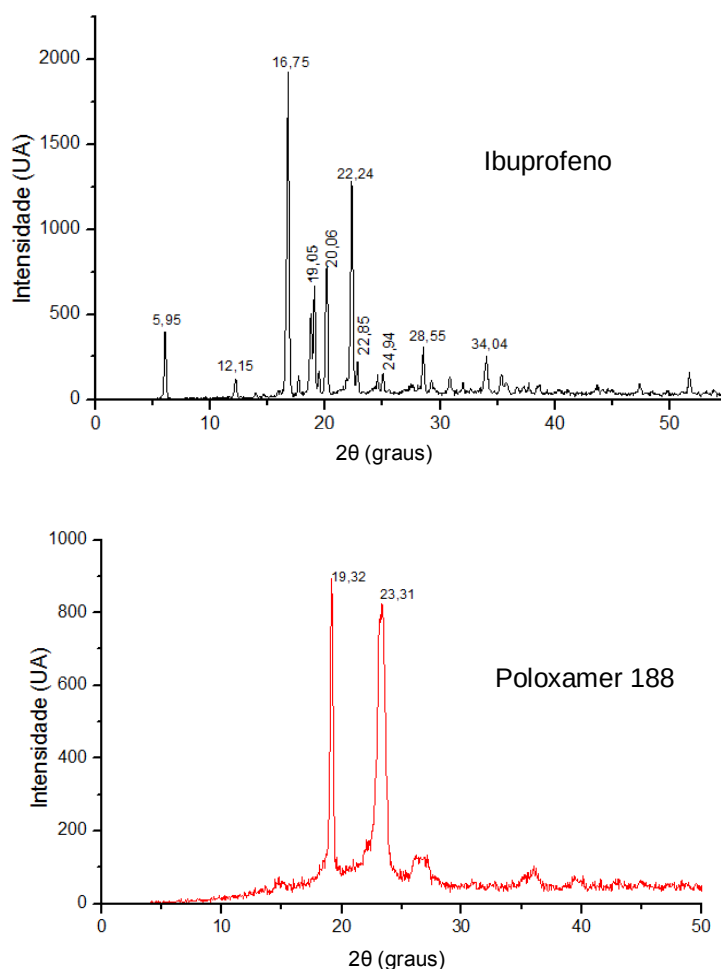


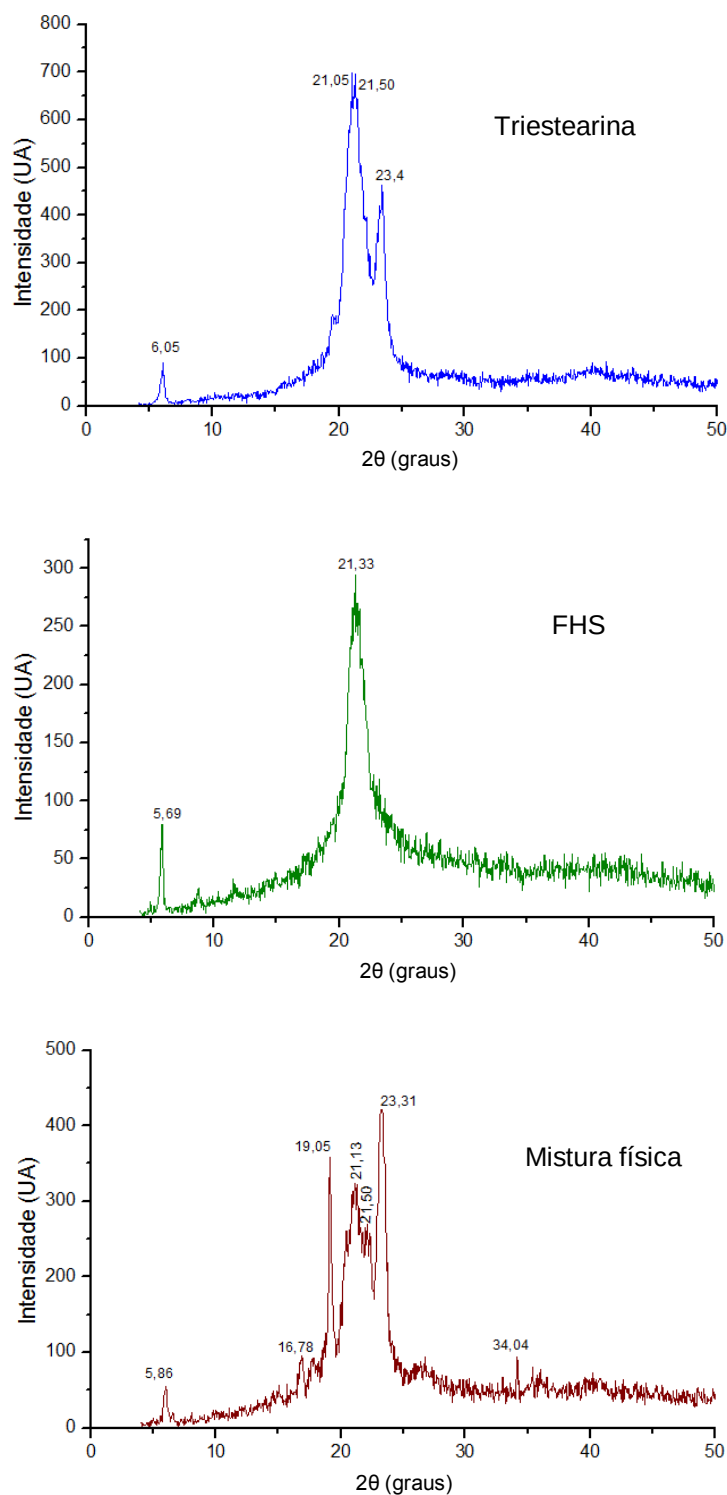
Os resultados das análises de TG/DTG das NLS com e sem fármaco também permitem afirmar que a temperatura empregada durante o processo de obtenção das nanopartículas foi segura, pois o início da perda de massa, em todos os casos, ocorreu acima de 200°C. As NLS conferiram proteção ao IBU, pois não foi possível de se notar qualquer perda de massa abaixo de 150°C, temperatura esta onde deu-se o início da perda de massa do IBU (figura 33).

5.4.3 Difratometria de raios X (DRX)

Na figura 35 estão apresentados os difratogramas dos componentes das NLS analisados isoladamente e a mistura física deles.

Figura 35 – Difratomogramas dos componentes das NLS analisados individualmente e a respectiva mistura física





O difratograma do IBU apresentado na figura 35 confirmou a sua estrutura cristalina devido a presença de inúmeros picos intensos e afilados. Este resultado também corroborou com o resultado obtido por DSC, o qual já havia identificado a cristalinidade do IBU devido a presença de um único evento endotérmico com a presença de um pico intenso e afilado (figura 29A). O resultado de DRX para o IBU está semelhante com o que há descrito na literatura (NAJIB et al, 1988; SULEIMAN

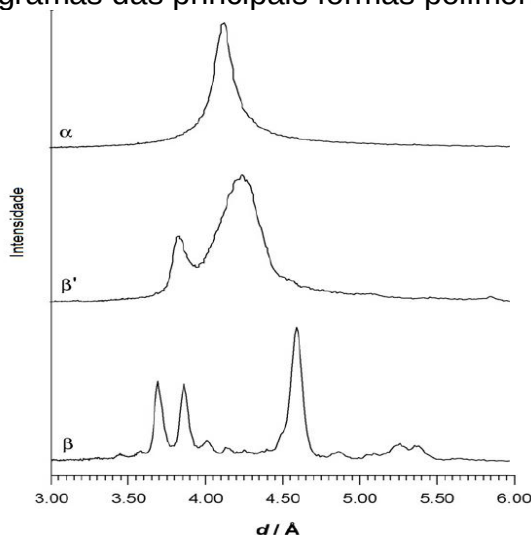
et al, 1990; PASSERINI et al, 2002; PLAKKOT et al, 2011; POTTA et al, 2011; PERGE et al, 2012).

De acordo com os resultados obtidos de DRX e de DSC por Dwivedi e colaboradores (1992) durante uma análise sobre a identificação dos enantiômeros e da mistura racêmica do IBU, pode-se dizer que o IBU utilizado por este estudo tratava-se de uma mistura racêmica.

Para o poloxamer 188 também foi confirmada a sua estrutura cristalina pelo difratograma apresentado na figura 35 no qual estão presentes picos afilados e característicos em 19,3 e em 23,3 graus, tais resultados corroboram com os descritos na literatura (GHAREEB et al, 2009; GILL et al, 2010; IGE et al, 2013; SHARMA et al, 2013).

Os picos presentes no difratograma da triestearina (figura 35) em 21,05 e em 23,4 graus são indicativos da presença de uma forma polimórfica intermediária entre as formas α e β' . A figura 36 representa os difratogramas das principais formas polimórficas da triestearina descritas na literatura (DA SILVA et al, 2009; WINDBERGS et al, 2009).

Figura 36 – Difratogramas das principais formas polimórficas da triestearina



Fonte: Da Silva et al, 2009.

Segundo Larsson (1966), há uma quarta forma cristalina para os triglicerídeos como a triestearina, a qual pode ser devida à presença de impurezas. Esta forma é denominada intermediária ou β_2 ou ainda, mais recentemente, γ por

alguns autores, pois apresenta faixa de fusão situada entre as faixas das formas β' e β (LARSSON, 1966; BUNJES et al, 2007; DORA et al, 2012).

A forma α , apresenta a maior capacidade de incorporar e transportar outras moléculas, porém é a forma mais instável e com o menor faixa de fusão (48 a 54°C). Esta forma tende a se transformar rapidamente na forma β' a qual apresenta faixa de fusão entre 62 a 64°C e sua capacidade de incorporar e transportar moléculas é intermediária entre as formas α e β . A forma β é a mais estável, apresenta faixa de fusão de 72 a 73°C e tem a menor capacidade de incorporar e transportar moléculas (LARSSON, 1966; BUNJES et al, 2007; DORA et al, 2012).

Partículas formadas pelo polimorfo α apresentam uma estrutura esferoidal enquanto que as formadas pelo polimorfo β apresentam-se em formato lamelar (BUNJES et al, 2007; DORA et al, 2012).

Assim, com a análise conjunta do difratograma da triestearina pura (figura 35), das curvas de DSC da triestearina pura (figura 29) e das fotomicrografias das NLS (figura 26), parece óbvia a presença de uma forma polimórfica intermediária entre as formas α e β' da triestearina, pois, a fusão da triestearina, neste estudo, deu-se em 62,5°C para o primeiro aquecimento (tabela 12) e no segundo aquecimento apareceram dois eventos endotérmicos, um em 50,6°C e outro em 61,1°C (tabela 12), indicativos da presença de diferentes polimorfos ou da transição de uma forma para a outra, ou seja, formas α e β' . Os mesmos eventos também puderam ser visualizados nas curvas de DSC das NLS anteriormente discutidas no item 5.4.1.

A recristalização dos lipídios ocorre de maneira diferente quando puros ou na estruturadas NLS. Na sua maioria, os triglicerídeos (como a triestearina) quando presentes nas NLS tendem a se recristalizar na forma α , transformando-se com o tempo na forma β' . Porém, a presença de tensoativos como o poloxamer 188 pode retardar essa transformação, a qual geralmente pode ser mais lenta com o aumento da cadeia carbônica do triglicerídeo (MÜLLER et al, 2000; MEHNERT E MÄDER, 2012).

A estrutura cristalina do lipídio é um fator determinante para a acomodação da molécula do fármaco nos sistemas transportadores como as NLS. Na estrutura das NLS, o lipídio altamente cristalino e estruturalmente organizado certamente permitirá a inclusão do fármaco organização. Por outro lado, com a redução dessa organização, aparecem espaços suficientes para “acomodar” a molécula do fármaco. Assim, as

NLS com estruturas menos organizadas ou amorfas podem beneficiar a CC e consequentemente a EE (MÜLLER et al, 2000; HOU et al, 2003).

Comparando-se os difratogramas das NLS vazias e contendo IBU (figuras 37, 38 e 39) com os difratogramas dos componentes das NLS apresentados na figura 36, observou-se uma diminuição na cristalinidade. Esse fenômeno também pode ser verificado no difratograma da mistura física dos componentes das NLS (figura 35).

Figura 37 – Difratogramas das NLS vazias obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude sonicadas durante 20 minutos. Análises realizadas 24 horas da obtenção das NLS e após 30 dias

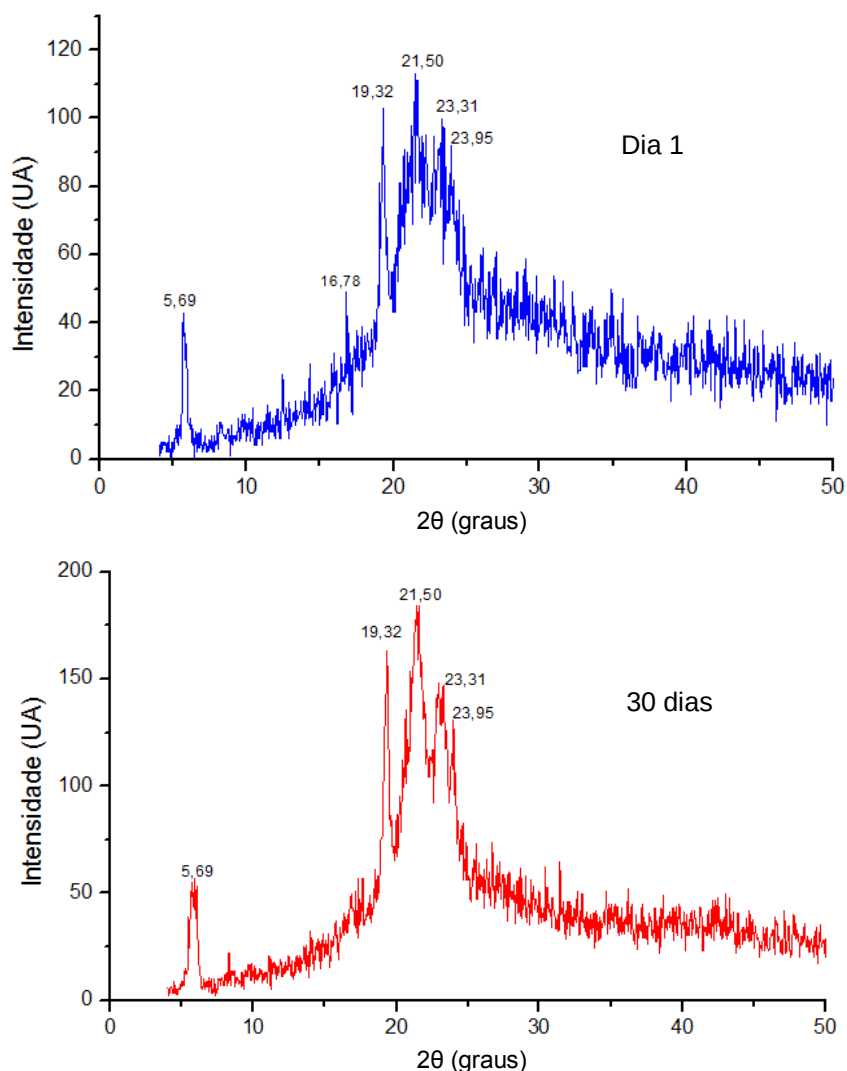


Figura 38 – Difrátogramas das NLS contendo 2% de IBU obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude sonicadas durante 20 minutos. Análises realizadas 24 horas da obtenção das NLS e após 30 dias

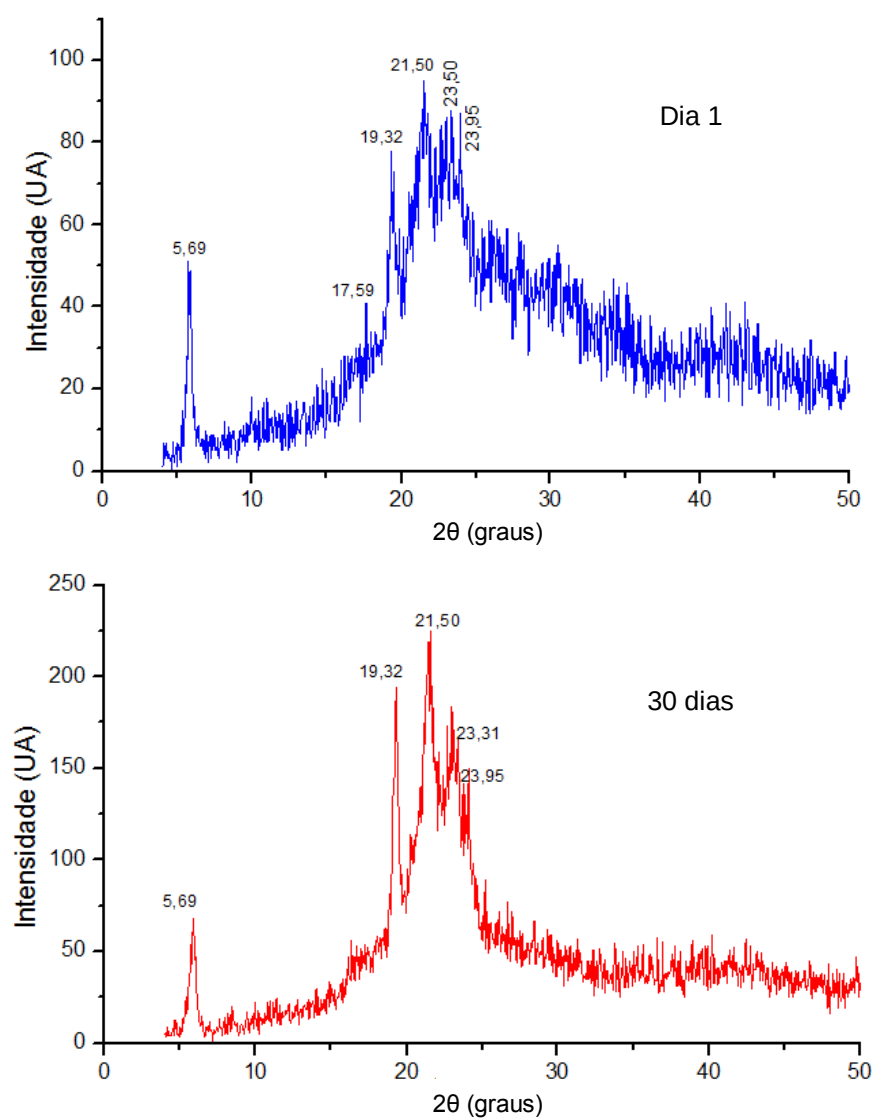
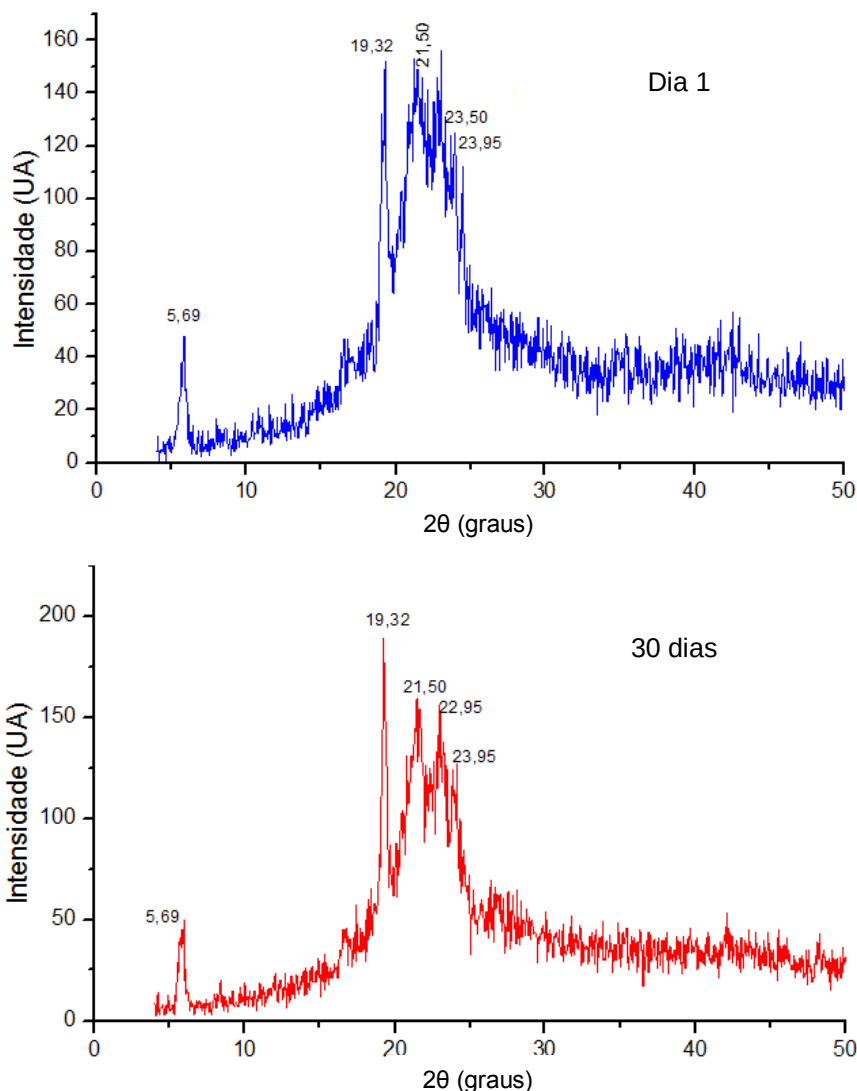


Figura 39 – Difratomogramas das NLS contendo 3% de IBU obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude sonicadas durante 20 minutos. Análises realizadas 24 horas da obtenção das NLS e após 30 dias



Em todos os difratogramas das NLS obtidas com e sem IBU (figuras 37, 38 e 39), foram visualizados os picos em 5,69 (FHS); 19,32 (poloxamer 188); 21,5 e 23,95 (triestearina) graus. Picos característicos do IBU não foram visualizados nos difratogramas apresentados nas figuras 38 e 39. A não visualização dos picos característicos do IBU foi indicativa de que ele estivesse presente na forma amorfa e incorporado à matriz lipídica das NLS.

Conforme os dados apresentados na tabela 15 e com a análise dos difratogramas da figura 37, 38 e 39 foi possível visualizar um discreto aumento da cristalinidade da dispersão após o período de 30 dias de obtenção das NLS. O

aumento da cristalinidade foi verificado de acordo com o estreitamento da base do pico; picos agudos e com baixo ruído são indicativos de alto grau de cristalinidade. O discreto aumento aqui verificado pode ser atribuído à modificação polimórfica gradual da triestearina com possível expulsão do fármaco, fato que corrobora com a discreta diminuição da EE após 30 dias de obtenção das NLS com fármaco (tabela 11).

Tabela 15 – Dados dos picos dos difratogramas analisados no dia 1 e 30 dias após a obtenção das NLS sem e com fármaco

Dispersão	Dia 1			Dia 30		
	2 θ inicial	2 θ final	Largura da base do pico	2 θ inicial	2 θ final	Largura da base do pico
NLS sem fármaco	5,10	6,50	0,33	5,25	6,50	0,68
	18,75	19,60	0,54	18,60	19,85	0,53
	19,60	25,00	4,52	19,85	25,05	2,38
	Total*		5,39	Total*		3,59
NLS com 2% de IBU	5,40	6,40	0,38	5,25	6,50	0,50
	18,90	20,15	1,00	18,50	19,95	0,53
	20,15	27,00	4,50	20,10	25,00	3,34
	Total*		5,88	Total*		4,37
NLS com 3% de IBU	5,05	6,55	0,44	5,10	6,50	0,50
	18,70	19,75	0,79	18,80	19,95	0,45
	19,75	25,05	4,20	19,95	25,05	4,24
	Total*		5,43	Total*		5,19

*Soma de todas as larguras das bases dos picos

5.5 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* do ibuprofeno incorporado às NLS

A liberação sustentada de um fármaco a partir de um sistema de liberação, como as NLS, é um fator de alta importância a ser considerado no desenvolvimento da formulação (DIAN et al, 2013).

Existem diversos modelos matemáticos capazes de descrever o perfil de dissolução de fármacos, nos quais a massa de fármaco dissolvido a partir de uma forma farmacêutica está relacionada com o tempo de liberação (COSTA E LOBO, 2001). A maioria dos modelos baseia-se nas equações de difusão (COSTA E LOBO,

2001; SIEPMANN E SIEPMANN; 2008; SIEPMANN E PEPPAS, 2011). O fenômeno de difusão está intimamente relacionado com a estrutura do material pelo qual ocorrerá tal fenômeno (SIEPMANN E PEPPAS, 2011).

Vários fatores podem influenciar o processo de difusão e a cinética de liberação, entre os quais as propriedades físico-químicas do fármaco, o seu estado polimórfico, grau de cristalinidade, o diâmetro da partícula, solubilidade e quantidade incorporada na forma farmacêutica (COSTA E LOBO, 2001; SIEPMANN E PEPPAS, 2011).

Em sistemas matriciais como as NLS, o fármaco pode ser incorporado à matriz tanto na forma dispersa quanto na solubilizada (MÜLLER et al, 2000). Entretanto, a solubilidade do fármaco na matriz lipídica torna-se um importante fator controlador da liberação do fármaco a partir da matriz. Quando a concentração inicial do fármaco estiver abaixo do limite de solubilidade, a liberação ocorrerá por simples difusão do fármaco através do lipídio. Porém, quando a concentração do fármaco estiver acima do limite de solubilidade, a solubilização do fármaco no lipídio tornar-se-á um fator limitante (MÜLLER et al, 2002; VAGHASIYA et al, 2013).

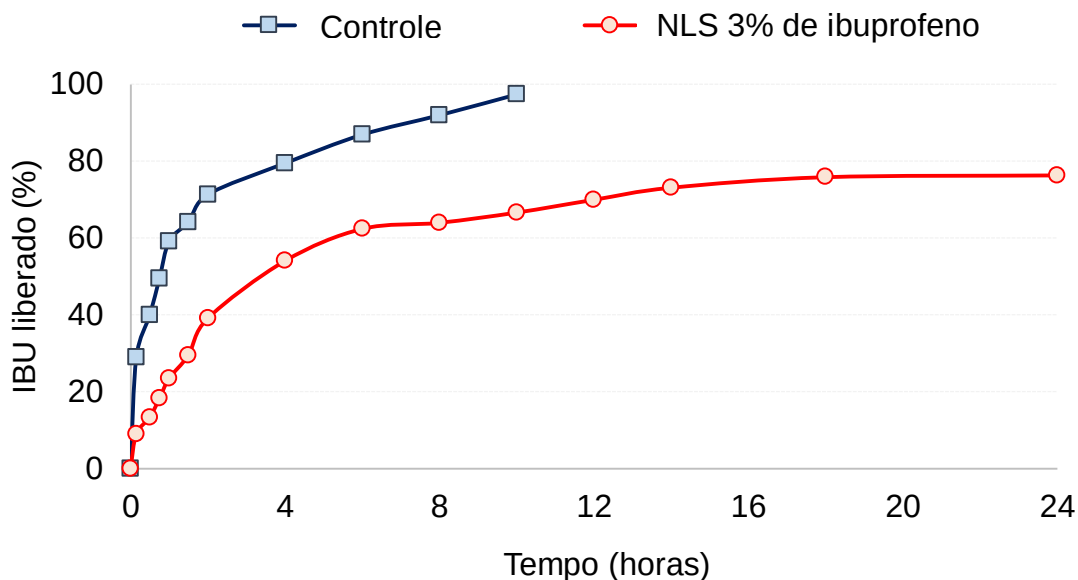
As NLS contendo 3% de IBU, ultrassonicadas com 20% de amplitude durante 20 minutos, demonstraram melhores resultados de estabilidade física, EE e CC e por estas razões foram selecionadas para o ensaio de liberação *in vitro*. Para se verificar o perfil de liberação do IBU a partir das NLS obtidas neste estudo, a massa real (M_{real}) de IBU liberado em determinado tempo, bem como a porcentagem (%) de IBU liberado e o desvio padrão relativo (DPR) referente às 6 determinações realizadas (n=6) foram calculados e estão apresentados na tabela 16. Os cálculos foram realizados de acordo com a equação 6 do item 4.10.

Tabela 16 – Valores médios obtidos após a realização do ensaio de liberação *in vitro* do IBU a partir das NLS contendo 3% de fármaco obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude sonicadas por 20 minutos (n=6)

Tempo (h)	Mreal ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Fármaco (%)	DPR (%)
0,15	47,0	9,0	5,2
0,5	70,0	13,3	9,3
0,75	95,7	18,2	5,9
1,00	123,2	23,5	6,6
1,50	153,7	29,5	6,4
2,00	204,3	38,9	9,5
4,00	283,8	54,1	2,5
6,00	322,6	62,4	6,8
8,00	336,0	64,0	4,1
10,00	349,9	66,7	4,3
12,00	367,4	70,0	4,4
14,00	383,9	73,1	5,7
18	398,3	75,9	3,6
24	400,8	76,3	5,5

A figura 40 mostra a porcentagem média liberada (*in vitro*) de IBU a partir das NLS obtidas por ultrassonicação e adicionalmente da solução controle utilizada no estudo.

Figura 40 – Perfis de liberação *in vitro* do IBU a partir das NLS contendo 3% de fármaco obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude sonicadas por 20 minutos e da solução de IBU em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 utilizada como controle. Os valores expressos representam a média de 6 determinações (n=6)



Com a análise dos resultados da figura 40, pode-se perceber que as NLS contendo 3% de IBU promoveu uma liberação sustentada do fármaco. A curva de cinética mostra uma liberação mais rápida nas primeiras duas horas de liberação, seguida de uma fase mais lenta, atingindo cerca de 67% de liberação nas dez horas equivalentes ao acompanhamento do ensaio do fármaco livre. A liberação sustentada do IBU na segunda fase do processo de liberação pode ser atribuída à estrutura das NLS. Nas 24 horas do ensaio, aproximadamente 76% do IBU presente na matriz lipídica foi liberado para o meio de dissolução, demonstrando a alta eficiência de encapsulação. O fármaco livre foi liberado em praticamente 100% nas 10 horas de duração do ensaio.

O perfil de liberação *in vitro* obtido por este estudo corrobora com o estudo realizado por Dian e colaboradores (2013), apesar dos sistemas de liberação apresentarem características distintas, tais como os componentes da matriz, o fármaco utilizado foi o mesmo. Aproximadamente 85% do IBU encapsulado no sistema obtido por Dian e colaboradores (2013) foi liberado em 24 horas, enquanto que, considerando-se o mesmo período de tempo, as NLS obtidas pelo presente estudo, liberaram cerca de 76% do IBU encapsulado.

Adicionalmente, após a obtenção do perfil de liberação *in vitro* do IBU a partir das NLS, os modelos matemáticos de Higuchi Korsmeyer-Peppas e Weibull, foram aplicados aos dados de liberação (figura 40 e tabela 16), com o objetivo de caracterizar o processo de liberação do IBU a partir das NLS.

Higuchi (1961, 1963) desenvolveu diferentes modelos para estudar a liberação de fármacos a partir de matrizes sólidas e semi-sólidas. Os modelos matemáticos de Higuchi descrevem a liberação do fármaco como um processo de difusão baseado na lei de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo. De uma forma geral, é possível resumir o modelo de Higuchi de acordo com a equação:

$$f_t = K_H t^{1/2} \quad \text{Equação 7}$$

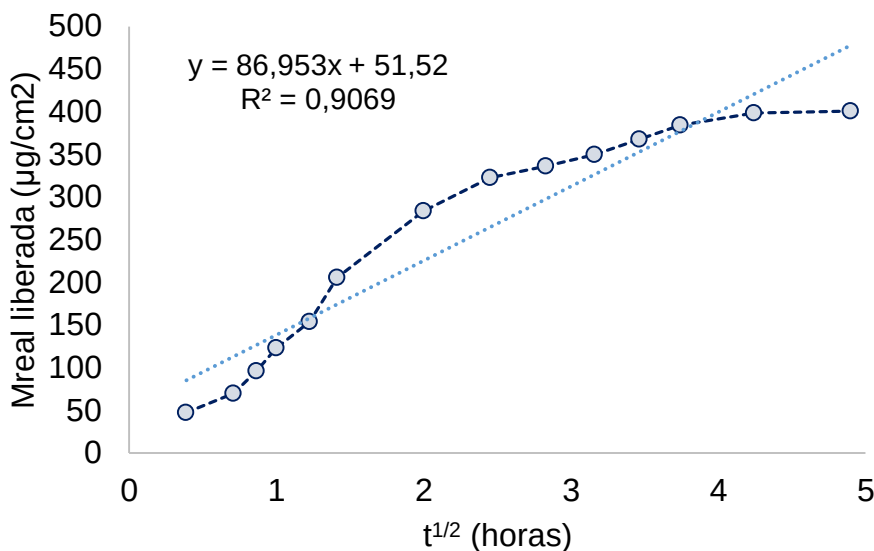
Onde:

K_H é a constante de dissolução;
 t é o tempo.

Os modelos desenvolvidos por Higuchi descrevem a liberação de um fármaco a partir de uma forma farmacêutica com geometria planar fina. Para descrever a liberação de um fármaco a partir de formas farmacêuticas com geometria cilíndrica ou esférica, modelos derivados devem ser utilizados (COSTA E LOBO, 2001; SIEPMANN E PEPPAS, 2011).

A figura 41 mostra o perfil de liberação do IBU a partir das NLS contendo 3% de fármaco obtido segundo o modelo de Higuchi.

Figura 41 – Perfil de liberação do IBU a partir de NLS contendo 3% de fármaco obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude sonicadas durante 20 minutos obtido de acordo com o modelo de Higuchi



Korsmeyer e colaboradores (1983) desenvolveram um modelo simples e semi-empírico, baseado na Lei das Potências, que relaciona exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo (equação 8).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{Equação 8}$$

Onde:

M_t representa a quantidade absoluta de fármaco liberada no tempo t ;

M_∞ é a quantidade total de fármaco liberado num tempo infinito (o que corresponde à quantidade inicial de fármaco);

k é uma constante cinética;

n é o expoente de liberação que, de acordo com o valor numérico que assume, caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco.

O modelo de Korsmeyer-Peppas é utilizado para vários tipos de sistemas de liberação modificada e o valor do expoente n é utilizado para caracterizar diferentes mecanismos de liberação, sendo empregado, principalmente, na análise de liberação de formas farmacêuticas poliméricas (PEPPAS, 1985). Os diferentes valores de n para diferentes formas geométricas e os respectivos mecanismos de liberação são apresentados na tabela 17 (SIEPMANN E PEPPAS, 2001).

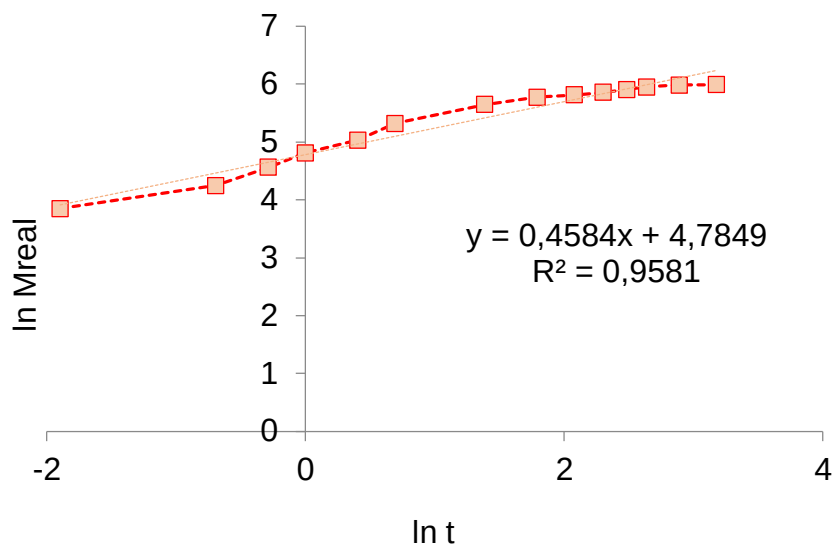
Tabela 17 – Interpretação dos mecanismos de liberação de fármacos a partir de diferentes geometrias de acordo com o modelo de Korsmeyer-Peppas

Expoente de liberação (n)			Mecanismo de liberação
Filme fino	Cilindro	Esfera	
0,5	0,45	0,43	Difusão Fickiana
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Transporte anômalo
1,0	0,89	0,85	Transporte caso II (intumescimento do polímero)

Este modelo é visto como uma generalização de dois mecanismos de transporte de fármacos a difusão Fickiana e transporte caso-II (em função do intumescimento). Quando o expoente n é 1,0, a taxa de liberação do fármaco é independente do tempo, correspondendo à cinética de ordem zero. Para estruturas de formas cilíndrica ou esférica esse mecanismo de liberação é conhecido como transporte caso-II sendo fator determinante da liberação o processo de relaxamento das macromoléculas que dá-se pela entrada da água no sistema. A água diminui a temperatura de transição vítrea do polímero, aumenta a mobilidade das macromoléculas e expande o volume (SIEPMANN E PEPPAS, 2001). Já o transporte anômalo ocorre quando a difusão e o relaxamento da cadeia polimérica são simultâneos. A equação da lei das potências relaciona dois casos: quando $n = 0,5$ indica liberação do fármaco controlada por difusão e quando $n = 1,0$ indica liberação controlada pelo intumescimento. Valores entre 0,5 e 1,0 indicam sobreposição dos dois fenômenos, chamado de transporte anômalo. Para estruturas com outras formas geométricas utilizam-se outros valores de n como padrão (tabela 17) (PEPPAS, 1985).

A figura 42 mostra o perfil de liberação do IBU a partir das NLS contendo 3% de fármaco obtido segundo o modelo de Korsmeyer-Peppas.

Figura 42 – Perfil de liberação do IBU a partir de NLS contendo 3% de fármaco obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude sonificadas durante 20 minutos obtido de acordo com o modelo de Korsmeyer-Peppas



Uma equação geral descrita por Weibull, em 1951, foi adaptada por Langenbucher para os processos de dissolução/liberação de fármacos. Esta equação pode ser aplicada com sucesso a praticamente todos os tipos de curvas de dissolução sendo normalmente usada nestes estudos (COSTA E LOBO, 2001). Quando aplicada à liberação do fármaco a partir de formas farmacêuticas a equação de Weibull exprime a fração cumulativa do fármaco (m) na solução ao tempo t .

$$m = 1 - \exp \left[\frac{-(t - T_i)^b}{a} \right] \quad \text{Equação 9}$$

Onde:

a define a escala temporal do processo;

T_i representa o intervalo de tempo antes do início do processo de dissolução ou de liberação (na maioria das vezes é zero);

b é o parâmetro de forma que caracteriza a curva como sendo exponencial ($b=1$; cinética de primeira ordem), sigmóide ($b>1$; cinética rápida) ou parabólica ($b<1$; cinética lenta).

A equação 9 pode ser transformada em:

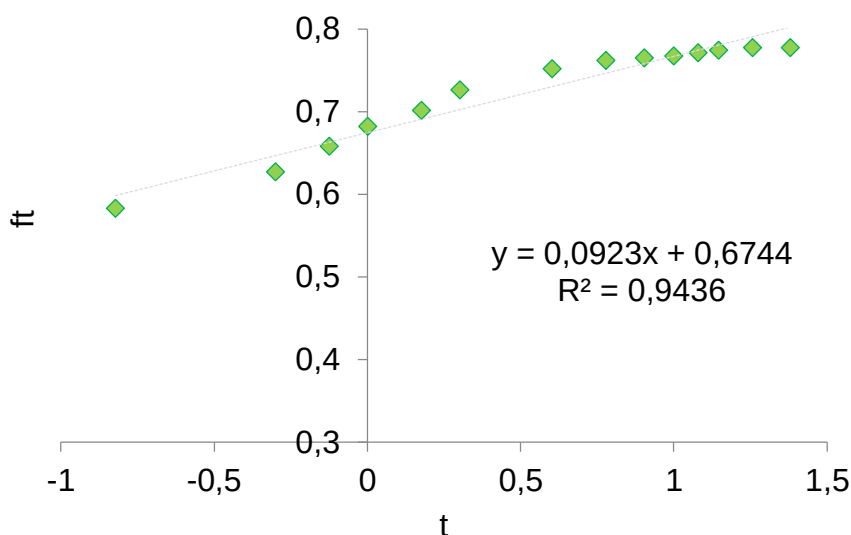
$$\log [-\ln(1 - m)] = b \log (t - T_i) - \log a \quad \text{Equação 10}$$

Para sistemas farmacêuticos que sigam este modelo, o gráfico logaritmo decimal da quantidade liberada do fármaco *versus* o logaritmo decimal do tempo será linear (COSTA E LOBO, 2001; COSTA, 2002).

Por ser um modelo não baseado em qualquer fundamento cinético, o modelo de Weibull apresenta algumas deficiências e tem sido alvo de críticas, como: não há qualquer fundamento cinético e só poderia descrever, mas não caracterizar adequadamente, as propriedades cinéticas de dissolução do fármaco, não há qualquer parâmetro relacionado com a taxa de dissolução intrínseca do fármaco e é de uso limitado para estabelecer correlações *in vivo/in vitro* (COSTA E LOBO, 2001).

A figura 43 mostra o perfil de liberação do IBU a partir das NLS contendo 3% de fármaco obtido segundo o modelo de Weibull.

Figura 43 – Perfil de liberação do IBU a partir de NLS contendo 3% de fármaco obtidas por ultrassonicação com 20% de amplitude sonicadas durante 20 minutos obtido de acordo com o modelo de Weibull



O principal critério para a escolha do modelo mais adequado de liberação é aquele realizado pela análise do coeficiente de determinação (R^2), ou seja, o modelo cujo valor de R^2 for o mais próximo de 0,99 é o modelo considerado mais adequado de liberação (COSTA e LOBO, 2001). Os valores dos R^2 obtidos de acordo com a aplicação de cada modelo matemático aos dados do ensaio de liberação do IBU a partir das NLS estão dispostos na tabela 18.

Tabela 18 – Valores dos coeficientes de determinação (R^2) obtidos de acordo com cada modelo matemático para NLS contendo 3% de IBU obtidas por ultrassonicação

Modelo Matemático	R^2
Higuchi	0,9069
Korsmeyer-Peppas	0,9581
Weibull	0,9436

O modelo de Higuchi pode ser aplicado com maior exatidão a matrizes unidimensionais pouco solúveis que não apresentam capacidade de intumescimento (LOPES et al, 2005). O uso deste modelo em sistemas que intumescem pode tornar-se insuficiente, pois sistemas deste tipo podem ser erodíveis devido ao relaxamento das cadeias poliméricas. Assim, o modelo de Higuchi apresenta limitações na interpretação de mecanismos de liberação controlada e, como as NLS obtidas neste estudo apresentaram mecanismo de liberação controlada, tal modelo não foi o mais adequado para estabelecer o perfil de liberação do IBU a partir das NLS de acordo com o R^2 de 0,9069 (figura 41 e tabela 18).

O modelo de Korsmeyer-Peppas, geralmente, é utilizado para interpretar e descrever a liberação de um fármaco quando o mecanismo de liberação que prevalece não é bem conhecido ou resulta da combinação de dois processos aparentemente independentes: um devido ao transporte Fickiano e outro em consequência do intumescimento que envolve a transição de um estado semi-rígido para outro mais flexível (LOPES et al, 2005). Este modelo foi o mais adequado para explicar a cinética de liberação do IBU a partir das NLS obtidas neste estudo, pois, o R^2 foi de 0,9581 (figura 42 e tabela 18).

De acordo com as fotomicrografias obtidas por MFA (figura 26) as NLS obtidas por este estudo, possuem, em sua maioria, forma esférica. Analisando os parâmetros obtidos com a aplicação do modelo de Korsmeyer-Peppas, observa-se que as NLS contendo 3% de IBU apresentaram n situado entre 0,43 e 0,85, indicando que o mecanismo de liberação do IBU deu-se por transporte anômalo, ou seja, ocorreu tanto pelo processo de difusão quanto pelo de intumescimento, simultaneamente (tabela 17) (COSTA E LOBO, 2001).

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados, é possível concluir que:

- Os processos de homogeneização de alta pressão e ultrassonicação empregados na obtenção das NLS, contendo ou não IBU, foram eficientes para a obtenção das NLS com diâmetros e índices de polidispersidade dentro de limites aceitáveis;
- As melhores condições para a obtenção de NLS estáveis convergiram para: o emprego de ultrassonicação com amplitude de 20% durante 20 minutos utilizando pulsos de 1 minuto com 30 segundos de intervalo, proporção de 8:2 para FHS:poloxamer 188 e 5% de tensoativo;
- A eficiência de encapsulação do IBU foi superior a 90% pelo método da ultrassonicação;
- As caracterizações morfológica e físico-química mostraram que as NLS apresentaram, em sua maioria, formato esférico e diminuição da cristalinidade, fatores que proporcionam maior eficiência da encapsulação e liberação mais uniforme do fármaco;
- As NLS mostraram uma liberação sustentada do IBU superior a 24 horas nos estudos de liberação *in vitro*;
- A realização deste trabalho proporcionou o acúmulo de informações importantes para a realização de futuras pesquisas que venham a utilizar fármacos com características físico-químicas semelhantes às do IBU em sistemas de liberação sustentada com toxicidade e dose minimizadas.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os conhecimentos acumulados neste estudo permitem que o sistema estudado possa ser utilizado com base para outros fármacos com características físico-químicas semelhantes às do IBU.

Estudos de liberação do IBU *in vivo* serão necessários para a determinação da farmacocinética a partir da via de administração necessária a partir do estímulo da doença a ser tratada, assim como da avaliação da toxicidade.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLIN, P; KRISTL, J; SMID-KOBAR, J. Optimization of procedure parameters and physical stability of solid lipid nanoparticles in dispersions. **Acta Pharmaceut**, v. 48, p. 257-267, 1998.
- ALI, H; SHIRODE, AB; SYLVESTER, PW; NAZZAL, S. Preparation and in vitro antiproliferative effect of tocotrienol loaded lipid nanoparticles. **Colloid Surface A**, v. 353, p. 43-51, 2010.
- ASSUMPÇÃO, JUCV; CAMPOS, ML; FILHO, MAFN; PESTANA, KC; BALDAN, HM; PILON, TPF; DE OLIVEIRA, AG; PECCININI, RG. Biocompatible microemulsion modifies the pharmacokinetic profile and cardiotoxicity of doxorubicin. **J Pharm Sci**, v. 102, n. 1, p. 289-296, 2013.
- AULTON, ME. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2° ed., Porto Alegre: Artmed, 2005, p. 677, p. 115.
- AVDEEF, A; BOX, KJ; COMER, JEA; GILGES, M; HADLEY, M; HIBBERT, C; PATTERSON, W; TAM, KY. PH-metric log P 11. pKa determination of water-insoluble drugs in organic solvent–water mixtures. **J Pharm Biomed**, v. 20, p. 631-641, 1999.
- BARADARAN, M; AHMADI-AHANGAR, A; TEIMOURIAN, F; MOGHADAMNIA, AA. Concomitant administration of alprazolam and ibuprofen in acute migraine headache. **J Neurol Sci**, v. 333, n. 1, p. 515-516, 2013.
- BATTAGLIA, L; GALLARATE, M. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 9, n. 5, p. 497-508, 2012.
- BATHOOL, A; VISHAKANTE, GD; KHAN, MS; SHIVAKUMAR, HG. Development and characterization of atorvastatin calcium loaded chitosan nanoparticles for sustain drug delivery. **Adv Mat Lett**, v. 3, n. 6, p. 466-470, 2012.
- BONES, J; THOMAS, K; NESTERENKO, PN; PAULL, B. On-line preconcentration of pharmaceutical residues from large volume water samples using short reversed-phase monolithic cartridges coupled to LC-UV-ESI-MS. **Talanta**, v. 70, p. 1117-1128, 2006.
- BOTTOS, KM; OLIVEIRA, AG; BERSANETTI, PA; NOBUEIRA, RF; LIMA-FILHO, AAS; CARDILLO, JA; SCHOR, P; CHAMON, W. Corneal absorption of a new riboflavina-nanostructured system for transepithelial collagen cross-linking. **PLoS One**, v. 8, n. 6, e66408, 2013.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899, de 02 de junho de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.
- BRUXEL, F; LAUX, M; WILD, LB; FRAGA, M; KOESTER, LS; TEIXEIRA, HF. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Quím Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.

BUNJES, H. Structural properties of solid lipid bases colloidal drug delivery systems. **Curr Opin Colloid In**, v. 16, p. 405-411, 2011.

BUNJES, H; SIEKMANN, B. Manufacture, Characterization and applications of solid lipid nanoparticles as drug delivery systems, **in: Microencapsulation**, 2. Auflage, Benita S. (Hrg.) Marcel Dekker, New York, 2006, p. 213-268.

BUNJES, H; STEINIGER, F; RICHTER, W. Visualizing the structure of triglyceride nanoparticles in different crystal modifications. **Langmuir**, v. 23, p. 4005-4011, 2007.

CANTO, GS; DALMORA, SL; OLIVEIRA, AG. Piroxicam encapsulated in liposomes: characterization and in vivo evaluation of topical anti-inflammatory effect. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 25, n. 12, p. 1235-1239, 1999.

CHATTOPADHYAY, P; SHEKUNOV, BY; YIMB, D; CIPOLLA, D; BOYD, B; FARR, S. Production of solid lipid nanoparticle suspensions using supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE) for pulmonary delivery using the AERx system. **Adv Drug Deliver Rev**, v. 59, p. 444-453, 2007.

CORREA, MA; SCARPA, MV; FRANZINI, MC; OLIVEIRA, AG. On the incorporation of the non-steroidal anti-inflammatory naproxen into cationic O/W microemulsions. **Colloid Surface B**, v. 43, n. 2, p. 108-114, 2005.

COSTA, PJC. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Braz J Pharm Sci**, v. 38, n. 2, p. 141-153, 2002.

COSTA, P; LOBO, JMS. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur J Pharm Sci**, v. 13, p. 123-133, 2001.

DALMORA, ME; OLIVEIRA, AG. Inclusion complex of piroxicam with beta-cyclodextrin and incorporation in hexadecyltrimethylammonium bromide based microemulsion. **Int J Pharm**, v. 184, n. 2, p. 157-164, 1999.

DA SILVA, AAJr; DE MATOS, JR; FORMARIZ, TP; ROSSANEZI, G; SCARPA, MV; DO EGITO, ES; DE OLIVEIRA, AG. Thermal behavior and stability of biodegradable spray-dried microparticles containing triamcinolone. **Int J Pharm**, v. 368, n. 1-2, p. 45-55, 2009a.

DA SILVA, E; BRESSONB, S; ROUSSEAU, D. Characterization of the three major polymorphic forms and liquid state of tristearin by raman spectroscopy. **Chem Phys Lipids**, v. 157, p. 113-119, 2009.

DATE, AA; NAGARSENKER, MS. Parenteral microemulsions: an overview. **Int J Pharm**, v. 355, n. 1-2, p. 19-30, 2008.

DIAN, L; YANG, Z; LI, G; WANG, Z; PAN, X; PENG, X; HUANG, X; GUO, Z; QUAN, G; SHI, X; CHEN, B; LI, G; WU, C. Cubic phase nanoparticles for sustained release of ibuprofen: formulation, characterization, and enhanced bioavailability study. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 845-854, 2013.

DORA, CL; PUTAUX, JL; PIGNOT-PAINTRAND, I; DUBREUIL, F; SOLDI, V; BORALI, R; LEMOS-SENNA, E. Physicochemical and morphological characterizations of glyceryl tristearate/castor oil nanocarriers prepared by the solvent diffusion method. **J Brazil Chem Soc**, v. 23, n. 11, p. 1972-1981, 2012.

DOMANSKA, U; POBUDKOWSKA, A; PELCZARSKA, A; GIERYCZ, P. pKa and Solubility of Drugs in Water, Ethanol, and 1-Octanol. **J Phys Chem B**, v. 113, p. 8941-8947, 2009.

DWIVEDI, SK; SATTARI, S; JAMALI, F; MITCHELL, AG. Ibuprofen racemate and enantiomers: phase diagram, solubility and thermodynamic studies. **Int J Pharm**, v. 87, p. 95-104, 1992.

ESPOSITO, E; FANTIN, M; MARTI, M; DRECHSLER, M; PACCAMICCIO, L; MARIANI, P; SIVIERI, E; LAIN, F; MENEGATTI, E; MORARI, M; CORTESI, R. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bromocriptine. **Pharmaceut Res**, v. 25, n. 7, p. 1521-1530, Jul, 2008.

FORMARIZ, TP; CHIAVACCI, LA; SARMENTO, VH; SANTILLI, CV; TABOSA, DO; EGITO, ES; OLIVEIRA, AG. Relationship between structural features and in vitro release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. **Colloid Surface B**, v. 60, n. 1, p. 28-35, 2007.

FORMARIZ, TP; SARMENTO, VH; SILVA-JUNIOR, AA; SCARPA, MV; SANTILLI, CV; OLIVEIRA, AG. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. **Colloid Surface B**, v. 51, n. 1, p. 54-61, 2006.

FRANZINI, CM; PESTANA, KC; MOLINA, EF; SCARPA, MV; DO EGITO, ES; DE OLIVEIRA, AG. Structural properties induced by the composition of biocompatible phospholipid-based microemulsion and amphotericin B association. **J Biomed Nanotechnol**, v. 8, n. 2, p. 350-359, 2012.

FRIEDRICH, RB; FONTANA, MC; BECK, RCR; POHLMANN, AR; GUTERRES, SS. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. **Quím Nova**, v. 31, n. 5, p. 1131-1136, 2008.

FUSSNEGGER, B. Poloxamers (1). Lutol F68 (Poloxamer 188). **BASF ExA**, n. 3, p.5, 1999.

GHAREEB, MM; ABDULRASOOL, AA; HUSSEIN, AA; NOORDIN, MI. Kneading technique for preparation of binary solid dispersion of meloxicam with poloxamer 188. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 4, p. 1206-1215, 2009.

GILL, B; KAUR, T; KUMAR, S; GUPTA, GD. Formulation and evaluation of glimepiride solid dispersion tablets. **Asian J Pharm**, v. 4, n. 3, p. 212-218, 2010.

HIGUCHI, T. Rate of release of medicamentes from ointment bases containing drugs in suspension. **J Pharm Sci**, v. 50, p. 874-875, 1961.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **J Pharm Sci**, v. 52, p. 1145-1149, 1963.

HOU, DZ; XIE, CS; HUANG, KJ; ZHU, CH. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLN). **Biomaterials**, v. 24, p. 1781-1785, 2003.

HUANG, J; SI, L; JIANG, L; FAN, Z; QIU, J; LI, G. Effect of pluronic F68 block copolymer on P-glycoprotein transport and CYP3A4 metabolism. **Int J Pharm**, v. 356, n. 1-2, p. 351-353, 2008.

IBRAHIM, WM; ALOMRANI, AH; B YASSIN, AE. Novel sulpiride-loaded solid lipid nanoparticles with enhanced intestinal permeability. **Int J Nanomedicine**, v. 9, p. 129-144, 2014.

IGE, PP; BARIA, RK; GATTANI, SG. Fabrication of fenofibrate nanocrystals by probe sonication method for enhancement of dissolution rate and oral bioavailability. **Colloid Surface B**, v. 108, p. 366-373, 2013.

JANNIN, V; POCHARD, E; CHAMBIN, O. Influence of poloxamer on the dissolution performance and stability of controlled-release formulation containing Precirol® ATO 5. **Int J Pharm**, v. 309, p. 6-15, 2006.

JANTZEN, PT; CONNOR, KE; DICARLO, G; WENK, GL; WALLACE, JL; ROJIANI, AM; COPPOLA, D; MORGAN, D; GORDON, MN. Microglial activation and beta - amyloid deposit reduction caused by a nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug in amyloid precursor protein plus presenilin-1 transgenic mice. **J Neurosci**, v. 22, p. 2246-2254, 2002.

JUDEFEIND, A; DE VILLIERS, MM. In **Biotechnology: pharmaceutical aspects. Nanotechnology in drug delivery systems; Part 1 – Fundamentals of nanotechnology in drug delivery; Cap. 5 – Drug loading into and in vitro release from nanosized drug delivery systems**, Ed. Springer, 2009, p. 129-160.

KATHE, N; HENRIKSEN, B; CHAUHAN, H. Physicochemical characterization techniques for solid lipid nanoparticles: principles and limitations. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 25, 2014, DOI: 10.3109/03639045.2014.909840.

KHERADMANDNIA, S; VASHEGHANI-FARAHANI, E; NOSRATI, M; ATYABI, F. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomed Nanotech Biol Med**, v. 6, p. 753-759, 2010.

KIBBE, AH. In: **Handbook of pharmaceutical excipients**, 3rded., London: Pharmaceuticas Press, 2000, p. 138-139, p. 292-293, p. 412-415.

KIM, J-K; PARK, J-S; KIM, C-K. Development of a binary lipid nanoparticles formulation of itraconazole for parenteral administration and controlled release. **Int J Pharm**, v. 383, p. 209-215, 2010.

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

KUMAR, S; RANDHAWA, JK. Preparation and characterization of Paliperidone loaded solid lipid nanoparticles. **Colloid Surface B**, v. 102, p. 562-568, 2013.

LARSSON, K. Classification of glyceride crystal forms. **Acta Chem Scand**, v. 20, p. 2255-2260, 1966.

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

LI, Y; DONGH, L; JIA, A; CHANG, X; XUE, H. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded traditional chinese medicine. **Int J Biol Macromol**, v. 38, p. 296-299, 2006.

LIM, GP; CHU, T; YANG, F; BEECH, W; FRAUTSCHY, SA; COLE, GM. 2001a. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. **J Neurosci**, v. 21, p. 8370-8377, 2001.

LIM, GP; YANG, F; CHU, T; CHEN, P; BEECH, W; TETER, B; TRAN, T; UBEDA, O; ASHE, KH; FRAUTSCHY, SA; COLE, GM. Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. **J Neurosci**, v. 20, p. 5709-5714, 2000.

LIMA, AM; PIZZOL, CD; MONTEIRO, FBF; CRECZYNSKI-PASA, TB; ANDRADE, GP; RIBEIRO, AO; PERUSSI, JR. Hypericin encapsulated in solid lipid nanoparticles: phototoxicity and photodynamic efficiency. **J Photoch Photobio B**, v. 125, p. 146-154, 2013.

LONG, C; ZHANG, L; QIAN, Y. Preparation and Crystal modification of ibuprofen-loaded solid lipid microparticles. **Chinese J Chem Eng**, v. 14, n. 4, p. 518-525, 2006.

LOPES, LB; SCARPA, MV; SILVA, GV; RODRIGUES, DC; SANTILLI, CV; OLIVEIRA, AG. Studies on the encapsulation of diclofenac in small unilamellar liposomes of soya phosphatidylcholine. **Colloid Surface B**, v. 39, n. 4, p. 151-158, 2004.

LOPES, CM; JMS; COSTA, P. Formas Farmacêuticas de Liberação Modificada: polímeros hidrofílicos. **Braz J Pharm Sci**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

MALVERN. **A basic guid to particle characterization**. 2012.

MALVERN. **Zetasizer Nano User Manual**. Man0317, Issue 5.0, 2009.

MANJUNATH, K; VENKATESWARLU, V. Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration. **J Control Release**, v. 107, n. 2, p. 215-228, 2005.

MCKEE, AC; CARRERAS, I; HOSSAIN, L; RYU, H; KLEIN, WL; ODDO, S; LAFERLA, FM; JENKINS, BG; KOWALL, NW; DEDEOGLU, A. Ibuprofen reduces Abeta, hyperphosphorylated tau and memory deficits in Alzheimer mice. **Brain Res**, v. 1207, p. 225-236, 2008.

MEHNERT, W; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Adv Drug Deliver Rev**, v. 47, n. 2-3, p. 165-196, 2001.

MEHNERT, W; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticle: Production, characterization and applications. **Adv Drug Deliver Rev**, v. 64, p. 83-101, 2012.

MEI, Z; CHEN, H; WENG, T; YANG, Y; YANG, X. Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 56, n. 2, p. 189-196, 2003.

MOHAMMADPOUR, DN; ESKANDARI, R; AVADI, MR; ZOLFAGHARIAN, H; MIR MOHAMMAD SADEGHI, A; REZAYAT, M. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing Mesobuthus eupeus scorpion venom as an antigen delivery system. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis**, v. 18, n. 1, p. 44-52, 2012.

MÜLLER, RH; MÄDER, K; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 50, p. 161-177, 2000.

MÜLLER, RH; RADTKE, M; WISSING, SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Adv Drug Deliver Rev**, v. 54, n. 1, p. S131–S155, 2002.

MUSSI, SV; SILVA, RC; DE OLIVEIRA, MC; LUCCI, CM; DE AZEVEDO, RB; FERREIRA, LAM. New approach to improve encapsulation and antitumor activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles. **Eur J Pharm Sci**, v. 48, p. 282-290, 2013.

NAIR, R; KUMAR, ACK; PRIYA, VK, YADAV, CM; RAJU, PY. Formulation and evaluation of chitosan solid lipid nanoparticles of carbamazepine. **Lipids Health Dis**, 11:72, 2012, doi: 10.1186/1476-511X-11-72.

NAJIB, NM; EL-HINNAWI, MA; SULEIMAN, MS. Physicochemical characterization of ibuprofen-polyvinylpyrrolidone dispersions. **Int J Pharm**, v. 45, p. 139-144, 1988.

NEWA, M; BHANDARI, KH; LI, DX; KWON, TH, KIMA, JÁ; YOO, BK; WOO, JS; LYOO, WS; YONG, CS; CHOI, HG. Preparation, characterization and in vivo evaluation of ibuprofen binary solid dispersions with poloxamer 188. **Int J Pharm**, v. 343, p. 228-237, 2007.

NOACK, A; HAUSE, G; MÄDER, K. Physicochemical characterization of curcuminoid-loaded solid lipid nanoparticles. **Int J Pharm**, v. 423, n. 2, p. 440-451, Feb, 2012.

OLIVEIRA, AG; CUCCOVIA, IM; CHAIMOVICH, H. Micellar modification of drug stability: analysis of the effect of hexadecyltrimethylammonium halides on the rate of degradation of cephaclo. **J Pharm Sci**, v. 79, n. 1, p. 37-42, 1990.

OLIVEIRA, AG; ROSSANEZZI, G; FORMARIZ, TP; EGITO, ES; SCARPA, MV. Effect of cationic micelles on the decomposition of alpha-aminophenyl cephalosporins. **Colloid Surface B**, v. 79, n. 2, p. 372-376, 2010.

PARHI, R; SURESH, P. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles – a review. **Curr Drug Discov Technol**, v. 9, n. 1, p. 2-16, 2012.

PASSERINI, N; ALBERTINI, B; GONZALEZ-RODRIGUES, ML; CAVALLARI, C; RODRIGUEZ, L. Preparation and characterization of ibuprofen-poloxamer 188 granules obtained by melt granulation. **Eur J Pharm Sci**, v. 15, p. 71-78, 2002.

PATEL, A; BELL, M; O'CONNOR, C; INCHLEY, A; WIBAWA, J; LANE, ME. Delivery of ibuprofen to the skin. **Int J Pharm**, v. 457, p. 9-13, 2013.

PATEL, HR; PATEL, RP; PATEL, MM. Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic Behaviors. **Int J Pharm Technol Res**, v. 1, n. 2, p. 299-303, 2009.

PATEL, PA; PATRAVALE, VB. AmbiOnp: solid lipid nanoparticles of amphotericin B for oral administration. **J Biomed Nanotechnol**, v. 7, n. 5, p. 632-639, 2011.

PEPPAS, N.A. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. **Pharm. Acta Helv**, v. 60, p. 110-111, 1985.

PERGE, L; ROBITZER, M; GUILLEMOT, C; DEVOISSELLE, J-M; QUIGNARD, F; LEGRAND, P. New solid lipid microparticles for controlled ibuprofen release: formulation and characterization study. **Int J Pharm**, v. 422, n. 1-2, p. 59-67, 2012.

PESTANA, KC; FORMARIZ, TP; FRANZINI, CM; SARMENTO, VH; CHIAVACCI, LA; SCARPA, MV; EGITO, ES; OLIVEIRA, AG. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. **Colloid Surface B**, v. 66, n. 2, p. 253-259, 2008.

PINNEN, F; SOZIO, P; CACCIATORE, I; CORNACCHIA, C; MOLLIKA, A; IANNITELLI, A; D'AURIZIO, E; CATALDI, A; ZARA, S; NASUTI, C; DI STEFANO, A. Ibuprofen and glutathione conjugate as a potential therapeutic agent for treating Alzheimer's disease. **Arch Pharm**, v. 344, n. 3, p. 139-148, 2011.

PLAKKOT, S; DE MATAS, M; YORK, P; SAUNDERS, M; SULAIMAN, B. Comminution of ibuprofen to produce nano-particles for rapid dissolution. **Int J Pharm**, v. 415, p. 307-314, 2011.

POTTA, SG; MINEMI, S; NUKALA, RK; PEINADO, C; LAMPROU, DA; URQUHART, A; DOUROUMIS, D. Preparation and characterization of ibuprofen solid lipid nanoparticles with enhanced solubility. **J Microencapsul**, v. 28, n. 1, p. 74-81, 2011.

POTTHAST, H; DRESSMAN, JB; JUNGINGER, HE; MIDHA, KK; OESER, H; SHAH, VP; VOGELPOEL, H; BARENDs, DM. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: ibuprofen. **J Pharm Sci**, v. 94, n. 10, p. 2121-2131, 2005.

RADOMSKA-SOUKHAREV, A. Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles. **Adv Drug Deliver Rev**, v. 59, p. 411-418, 2007.

RAINSFORD, KD. Fifty years of ibuprofen: advancing pain and fever management. **Int J Clin Pract**, v. 67, n. 178, p. 1-2, 2013a.

RAINSFORD, KD. Ibuprofen: from invention to an OTC therapeutic mainstay. **Int J Clin Pract**, v. 67, n. 178, p. 9-20, 2013b.

RAWAT, MK; JAIN, A; SINGH, S. Studies on binary lipid matrix based solid lipid nanoparticles of repaglinide: in vitro and in vivo evaluation. **J Pharm Sci**, v. 100, n. 6, p. 2366-2378, Jun, 2011.

REMINGTON – **The Science and Practice of Pharmacy, Part 5: Pharmaceutical manufacturing**, 21sted. Lippincott Williams & Wilkins, 2006, pag. 760.

RIVERA-LEYVA, JC; GARCÍA-FLORES, M; VALLADARES-MÉNDEZ, A; OROZCO-CASTELLANOS, LM; MARTÍNEZ-ALFARO, M. Comparative studies on the dissolution profiles of oral ibuprofen suspension and commercial tablets using biopharmaceutical classification system criteria. **Indian J Pharm Sci**, v. 74, n. 4, p. 312-318, 2012.

RUCKMANI, K, SIVAKUMAR M, GANESHKUMAR PA. Methotrexate loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for effective treatment of carcinoma. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 6, n. 9-10, p. 2991-2995, 2006.

SALMINEN, H; HELGASON, T; AULBACH, S; KRISTINSSON, B; KRISTBERGSSON, K; WEISS, J. Influence of co-surfactants on crystallization and stability of solid lipid nanoparticles. **J Colloid Interf Sci**, v. 426, p. 256-263, 2014.

SHARMA, A; JAIN, CP; TANWAR, YS. Preparation and characterization of solid dispersions of carvedilol with poloxamer 188. **J Chil Chem Soc**, v. 58, n. 1, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072013000100012>.

SIEKMANN, B; WESTESEN, K. Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles. **Colloid Surface B**, v. 3, p. 159-175, 1994.

SIEPMANN, J; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug delivery. **Int J Pharm**, v. 364, p. 328-343, 2008.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Adv Drug Deliver Rev**, v. 48, n. 2-3, p. 139-157, 2001.

SIEPMANN, J; PEPPAS, NA. Derivation, applications, use and misuse. **Int J Pharm**, v. 418, p. 6-12, 2011.

SILVA, MCD. **Obtenção e avaliação térmica do corante natural bixina a partir das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.)**, João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, Tese de Doutorado, 2005.

SILVA, A; SANTOS, D; FERREIRA, D; SOUTO, E. Characterization of ibuprofen loaded solid lipid nanoparticles dispersed in semi-solid carbopol gels. **J Biotechnol**, v. 131, n. 2, p. S67-S68, 2007.

SULEIMAN, MS; NAJIB, NM; HASSAN, MA; ABDEL-HAMID, ME. Physico-chemical characterization of a new salto f ibuprofen. **J Pharmaceut Biomed**, v. 8, n. 4, p. 321-327, 1990.

VAGHASIYA, H; KUMAR, A; SAWANT, K. Development of solid lipid nanoparticles based controlled release system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. **Eur J Pharm Sci**, v. 49, p. 311-322, 2013.

VENKATESWARLU, V; MANJUNATH, K. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. **J Control Release**, v. 95, n. 3, p. 627-638, 2004.

VERISSIMO, LM; LIMA, LF; EGITO, LC; DE OLIVEIRA, AG; DO EGITO, ES. Pharmaceutical emulsions: a new approach for gene therapy. **J Drug Target**, v. 18, n. 5, p. 333-342, 2010.

VIDAL, NLG; ALEGRE, MEG. UV analytical method suitability for investigation of BCS Class 2 biowaivers: ibuprofen case. **Dissolut Technol**, p. 44-47, 2013.

VILENCHIK, R; BERKOVITCH, M; JOSSIOFF, A; BEN-ZVI, Z; KOZER, E. Oral versus rectal ibuprofen in healthy volunteers. **J Popul Ther Clin Pharmacol**, v. 19, n. 2, p. 179-186, 2012.

VITORINO, C; CARVALHO, FA; ALMEIDA, AJ; SOUSA, JJ; PAIS, ACC. The size of solid lipid nanoparticles: an interpretation from experimental design. **Colloid Surface B**, v. 84, p. 117-130, 2011.

XIANG, L, X; NIE, S; KONG, J; LI, N; JU, C; PAN, W. A controlled-release ocular delivery system for ibuprofen based on nanostructured lipid carriers. **Int J Pharm**, v. 363, n. 1-2, p. 177-182, 2008.

YAN, F; ZHANG, C; ZHENG, Y; MEI, L; TANG, L; SONG, C; SUN, H; HUANG, L. The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. **Nanomed Nanotech Biol Med**, v. 6, n. 1, p. 170-178, 2010.

YAN, Q; ZHANG, J; LIU, H; BABU-KHAN, S; VASSAR, R; BIERE, AL; CITRON, M; LANDRETH, G. Anti-inflammatory drug therapy alters betaamyloid processing and deposition in an animal model of Alzheimer's disease. **J Neurosci**, v. 23, p. 7504-7509, 2003.

YUSUF, M; KHAN, RA; KHAN, M; AHMED, B. Plausible antioxidant biomechanics and anticonvulsant pharmacological activity of brain-targeted β -carotene nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 4311-4322, 2012.

WANG, J; CHEN, J; YE, N; LUO, Z; LAI, W; CAI, X; LIN Y. Absorption, pharmacokinetics and disposition properties of solid lipid nanoparticles (SLNs). **Curr Drug Metab**, v. 13, n. 4, p. 447-56, 2012.

WESTESEN, K. Novel lipid-based colloidal dispersions as potential drug administration systems – expectations and reality. **Colloid Polym Sci**, v. 278, p. 608-618, 2000.

WILKINSON, BL; CRAMER, PE; VARVEL, NH; REED-GEAGHAN, E; JIANG, Q; SZABO, A; HERRUP, K; LAMB, BT; LANDRETH, GE. Ibuprofen attenuates oxidative damage through NOX2 inhibition in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 33, n. 1, p. 197.e21-197.e32; 2012.

WINDBERGS, M; STRACHAN, CJ; KLEINEBUDDE, P. Understanding the solid-state behaviour of triglyceride solid lipid extrudates and its influence on dissolution. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 71, p. 80-87, 2009.

WISSING, SA; KAYSER, O; MÜLLER, RH. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Adv Drug Deliver Rev**, v. 56, p. 1257-1272, 2004.

ZHANG, L; LIU, L; QIAN, Y; CHEN, Y. The effects of cryoprotectants on the freeze-drying of ibuprofen-loaded solid lipid microparticles (SLM). **Eur J Pharm Biopharm**, v. 69, n. 2, p. 750-759, 2008.