



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de Araraquara



DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA PARA ADMINISTRAÇÃO NASAL DE ZIDOVUDINA

MARIANA DA SILVA BARBI

ARARAQUARA

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS ARARAQUARA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE
QUITOSANA PARA ADMINISTRAÇÃO NASAL DE
ZIDOVUDINA**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO

CO-ORIENTADORA: MSc FLÁVIA CHIVA CARVALHO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista para obtenção do
grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Araraquara

2011

Dedico este trabalho à minha mãe, Regina,
pelo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Regina e Carlos, e meus irmãos, Rafael e Lucas, que me acompanharam durante toda essa jornada, pelo carinho, apoio, conselhos e momentos de desabafo. Aos meus familiares, que sempre se preocuparam e me ajudaram nos momentos difíceis em mais essa etapa da vida.

À minha querida orientadora Dra. Maria Palmira Daflon Gremião, por ter me acolhido durante todos esses anos, se tornando minha amiga e ser um exemplo pessoal e profissional a seguir. Muito obrigada por toda experiência e conhecimento transmitidos, paciência e dedicação.

À minha querida co-orientadora Flávia Chiva Carvalho, por ter se tornado minha grande amiga, pelos momentos de alegria e descontração, por todos os ensinamentos transmitidos, dedicação, paciência e por participar ativamente de todo esse trabalho.

À minhas queridas amigas, Caroline, Gabriela e Natália, que me acompanharam, apoiaram e me deram conselhos, além de sempre estarem ao meu lado durante toda faculdade.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacotécnica, alunos da graduação e pós-graduação, com os quais convivi diariamente, e que contribuíram e ajudaram no desenvolvimento deste projeto. Além de tornarem meus dias mais alegres e divertidos.

Aos professores do departamento de Fármacos e Medicamentos por toda ajuda e amizade.

Ao Professor Dr. Miguel Jafelicci Júnior, do departamento de Físico-química do Instituto de Química, UNESP, por permitir a utilização do espectrômetro de espalhamento de luz.

Ao Laboratório de Uso Comum, da Faculdade de Engenharia Química, da UNICAMP, por permitir a utilização do viscosímetro.

À FAPESP por acreditar na relevância deste trabalho e pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Sobe mais alto
aquele que ajuda o outro a subir”*

George Adams

*“Sonhos são como deuses,
quando não se acredita neles deixam de existir.”*

Paulinho Moska

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1. AIDS	19
2.1.1. Zidovudina	20
2.2. VIA NASAL	21
2.3. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	23
2.3.1. Sistemas mucoadesivos	24
2.3.1.1. Quitosana	25
2.3.1.2. Nanopartículas de quitosana	25
2.3.1.3. Metodologia para avaliação da mucoadesão.....	27
3. OBJETIVOS	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. MATERIAIS	29
4.2. EQUIPAMENTOS	30
4.3. MÉTODOS	31
4.3.1. Caracterização da quitosana	31
4.3.1.1. Determinação do grau de desacetilação da quitosana	31
4.3.1.2. Determinação da massa molar da quitosana	31
4.3.2. Desenvolvimento das nanopartículas	34
4.3.2.1. Obtenção de NPs em suspensão e liofilizadas	35
4.3.3. Caracterização das nanopartículas	35
4.3.3.1. Determinação da distribuição granulométrica	36
4.3.3.2. Determinação do potencial zeta	36
4.3.3.3. Determinação do pH das amostras	37

4.3.3.4. <i>Análise morfológica das nanopartículas</i>	37
4.3.4. Avaliação da eficiência de encapsulação da zidovudina	38
4.3.4.1. <i>Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de AZT por espectroscopia UV</i>	38
4.3.4.2. <i>Determinação do AZT incorporado nas NPs</i>	39
4.3.5. Avaliação da capacidade de mucoadesão das nanopartículas	39
4.3.5.1. <i>Preparação da mucosa</i>	39
4.3.5.2. <i>Preparação do disco de mucina</i>	40
4.3.5.3. <i>Preparação das NPs secas para o ensaio de mucoadesão</i>	41
4.3.5.4. <i>Preparação dos padrões mucoadesivos</i>	41
4.3.5.5. <i>Preparação das NPs liofilizadas</i>	42
4.3.5.6. <i>Análise de mucoadesão</i>	42
4.3.6. Estudos de permeação <i>ex vivo</i>	43
4.3.6.1. <i>Validação da metodologia analítica para determinação do AZT por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i>	43
4.3.6.2. <i>Preparação da mucosa</i>	44
4.3.6.3. <i>Preparação das amostras</i>	44
4.3.6.4. <i>Ensaio de permeação ex vivo</i>	44
4.3.7. Forma de análise dos resultados	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA	46
5.1.1. Determinação do grau de desacetilação da quitosana	46
5.1.2. Determinação da massa molar da quitosana	47
5.2. DESENVOLVIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS	48
5.2.1. Obtenção das NPs	48
5.3. CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NPs	49
5.3.1. Determinação da distribuição granulométrica	51
5.3.2. Determinação do potencial zeta	55
5.3.3. Seleção das amostras para incorporação do AZT.....	57
5.3.4. pH das suspensões de NPs	60
5.3.5. Análise morfológica das NPs	62
5.4. CARACTERIZAÇÃO DAS NPs LIOFILIZADAS	63
5.4.1. Determinação da distribuição granulométrica	63

5.4.2. Determinação do potencial zeta	66
5.4.3. Análise morfológica das nanopartícula	66
5.5. Avaliação da eficiencia de encapsulacao da zidovudina	68
5.5.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do AZT por espectroscopia UV	68
5.5.2. Determinação do AZT incorporado nas NPs	72
5.6. Avaliação da Propriedade de mucoadesão das nanopartículas ...	74
5.6.1. Mucoadesão das NPs secas	75
5.6.2. Mucoadesão dos padrões mucoadesivos	76
5.6.3. Mucoadesão das NPs liofilizadas	83
5.7. ESTUDOS DE PERMEACÃO EX VIVO	86
5.7.1. Validação da metodologia analítica para determinação do AZT por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	87
5.7.2. Ensaio de permeação	90
6. CONCLUSÃO	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
8. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES	105
8.1. BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA	105
8.2. PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS	105
8.3. TRABALHO PREMIADO	106
8.4. PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA	106
8.5. Trabalhos Publicados em Anais de Congressos	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química do AZT.....	20
Figura 2.	Estrutura química da quitosana (Adaptado de Kumar, 2000).....	25
Figura 3.	(a) Viscosímetro capilar. (b) Viscosímetro capilar dentro do banho termostatizado recirculante. Os números 1 e 2 indicam os meniscos do viscosímetro.....	33
Figura 4.	(a) Analisador de Textura utilizado para avaliar a força adesiva das NPs. Os números indicam: 1 – prova, 2 – anel de mucoadesão, 3 – banho aquecido e 4 – aquecedor. (b) anel de mucoadesão, utilizado para fixar a mucosa.	40
Figura 5.	(a) Disco de mucina aderido na mesa do Texturômetro. (b) Comprimido de Policarbofil (PC) aderido na prova, representativo para os outros polímeros. (c) PC na forma de pó aderido na prova, representativo para os outros polímeros. (d) Ensaio realizado no texturômetro.....	41
Figura 6.	(a) Curva de titulação potenciométrica e (b) sua primeira derivada, o valor numérico no pico corresponde ao V1 e V2.	47
Figura 7.	Relação linear entre a concentração das soluções de QS (c) e viscosidade reduzida (η_{sp}/c), usada para a determinação da viscosidade intrínseca ($[\eta]$)	48
Figura 8.	Imagens representativas dos sistemas classificados como dispersão transparente - DT (a), dispersão opalescente - DO (b) e agregados – A(c)	49
Figura 9.	Estudo de formação das NPs em função da concentração final dos componentes. Os números representam as amostras de NPs. (●) Dispersão transparente; (∇) Dispersão opalescente; (■) Agregados....	50
Figura 10.	Reticulação da quitosana com TPP (Adaptado de Lam et al., 2006)	51
Figura 11.	Distribuição de tamanho das amostras de NP1 a NP16.	52
Figura 12.	Concentração de QS (mg/mL) versus diâmetro (nm) das partículas NP1 a NP16 versus concentração de TPP (mg/mL). (●) Diâmetro; (×) Concentração de TPP. As cores representam as mesmas amostras.	57
Figura 13.	Distribuição de tamanho das NPs com fármaco.....	60

Figura 14.	Fotomicrografias das amostras NP3 e NP4, com e sem fármaco, obtidas por MEV. (a) NP3 e (b) NP3_A15 no aumento de 80.000x. (c) NP4 e (d) NP4_A10 no aumento de 50.000x.....	62
Figura 15.	Fotomicrografias obtidas por MEV, (a) AZT utilizando um aumento de 3.000x e (b) quitosana no aumento de 6.000x.....	63
Figura 16.	Fotomicrografias das amostras NP3_A12,5 (a) e NP4_A12,5 (b), obtidas por MEV.....	67
Figura 17.	Curva analítica do AZT, obtida por espectroscopia UV em 266 nm (n=3). Regressão linear representada por $y = 0,04041x - 0,0074414$, e $r^2 = 0,9985$	69
Figura 18.	Espectro de absorção do UV da solução padrão de AZT (10 µg/mL) em água.....	69
Figura 19.	Espectro de absorção do UV do sobrenadante da formulação NP3_A7,5.....	70
Figura 20.	Espectro de absorção do UV da dispersão de QS 0,5% (m/v).....	70
Figura 21.	Espectro de absorção do UV da solução de TPP 0,1% (m/v).....	70
Figura 22.	Relação entre a quantidade de AZT encapsulado nas NPs (µg/mL) e a concentração de AZT solubilizado na solução de TPP (mg/mL).....	73
Figura 23.	Relação entre EE do AZT nas NPs (em relação ao TPP) com a concentração de AZT solubilizado na solução de TPP (mg/mL).....	73
Figura 24.	Curva força (g) versus tempo (s) representativa das amostras de NPs e dos padrões mucoadesivos.....	75
Figura 25.	Valores de Pico de Força (g) e de Trabalho de Adesão (g.s) do Policarbofil (PC). (a) pico de força do PC compacto e (b) o trabalho de adesão correspondente. (c) pico de força do PC em pó e (d) o trabalho de adesão correspondente.....	79
Figura 26.	Valores de Pico de Força (g) e de Trabalho de Adesão (g.s) do Carbopol 971 (C971). (a) pico de força do C971 compacto e (b) o trabalho de adesão correspondente. (c) pico de força do C971 em pó e (d) o trabalho de adesão correspondente.....	80
Figura 27.	Valores de Pico de Força (g) e de Trabalho de Adesão (g.s) do Carbopol 974 (C974). (a) pico de força do C974 compacto e (b) o trabalho de adesão correspondente. (c) pico de força do C974 em pó e (d) o trabalho de adesão correspondente.....	81
Figura 28.	Valores de Pico de força (g) e de Trabalho de Adesão (g.s) da NP3 e NP4, na forma liofilizada (tempo de contato de 60 segundos).....	83

Figura 29.	Valores de Pico de força (g) e de Trabalho de Adesão (g.s) do carbopol 971 (C971), carbopol 974 (C974) e policarbofil (PC), NP3 e NP4 liofilizadas, obtidos em disco de mucina, no tempo de contato de 60 segundos.....	85
Figura 30.	Valores de Pico de força (g) e de Trabalho de Adesão (g.s) do carbopol 971 (C971), carbopol 974 (C974) e policarbofil (PC), NP3 e NP4 liofilizadas, obtidos em mucosa nasal suína, no tempo de contato de 60 segundos.....	85
Figura 31.	Curva analítica do AZT, obtida por CLAE em 265 nm (n=3). Regressão linear representada por $y = 0,00174x - 0,00013$, e coeficiente de determinação $r^2 = 0,9998$	88
Figura 32.	Cromatograma da solução padrão de AZT em tampão fosfato monobásico 20mM pH6,8.....	88
Figura 33.	Cromatograma de uma amostra do meio de dissolução após 1h de ensaio de permeação da NP4 sem fármaco.....	89
Figura 34.	Cromatograma de uma amostra do meio de dissolução após 1h de ensaio de permeação da amostra NP4 carregada.....	89
Figura 35.	Perfil de permeação do AZT das amostras SA (●) e NP4_A12,5 (○) no intervalo de tempo de 12 horas em relação ao Q (μg/cm ²)...	91
Figura 36.	Perfil de permeação das amostras SA (●) e NP4_A12,5 (○) no intervalo de tempo de 12 horas em relação a % de AZT liberada...	91
Figura 37.	Quantidade de AZT Permeado <i>versus</i> Tempo, utilizado para cálculo do fluxo da SA. Linearização das duas porções da reta, com suas respectivas equações da reta e o coeficiente de determinação (r^2)	92
Figura 38.	Quantidade de AZT Permeado <i>versus</i> Tempo, utilizado para cálculo do fluxo da NP4_A12,5. Linearização das duas porções da reta, com suas respectivas equações da reta e o coeficiente de determinação (r^2).....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Parâmetros utilizados no ensaio de mucoadesão para as amostras de NPs, secas e liofilizadas, e para os padrões mucoadesivos (PC, C971 e C974).....	43
Tabela 2.	Condições cromatográficas utilizadas para validação da metodologia analítica para determinação do AZT por CLAE	44
Tabela 3.	Condições experimentais para se obter o grau de desacetilação da QS (GD).....	47
Tabela 4.	Concentração e razão de QS e de TPP nas amostras finais e suas classificações. (DT) Dispersão Transparente; (DO) Dispersão Opalescente; (A) Agregado.....	49
Tabela 5.	Diâmetro médio, índice de polidispersidade e distribuição granulométrica com as respectivas frequências das amostras NP1 a NP16.....	53
Tabela 6.	Potencial zeta (ζ) das suspensões de NPs sem fármaco.	56
Tabela 7.	Nomenclatura e concentração de AZT de todas as formulações de NPs. C: concentração	57
Tabela 8.	Potencial zeta (ζ) das suspensões de NPs com fármaco	58
Tabela 9.	Diâmetro médio e índice de polidispersidade, distribuição granulométrica e frequências das NPs com fármaco.....	59
Tabela 10.	Valores de pH das suspensões de NPs com e sem fármaco.....	61
Tabela 11.	Diâmetro médio, índice de polidispersidade, distribuição granulométrica com as respectivas frequências das amostras liofilizadas NP3 e NP4 com fármaco.....	65
Tabela 12.	Potencial zeta das amostras NP3 e NP4 com e sem fármaco, após o processo de liofilização.....	66
Tabela 13.	Concentrações das soluções padrão e os respectivos valores de absorbância (A) obtidos por espectrofotometria no comprimento de onda de 266 nm (n=3).....	68
Tabela 14.	Cálculo dos parâmetros estatísticos da precisão e exatidão, intra-dia e inter-dia, para validação do método de quantificação do AZT por espectroscopia UV	71

Tabela 15.	Quantidade de AZT encapsulado nas NPs e eficiência de encapsulação (EE %) em relação à solução de TPP (volume de 15mL). CV: coeficiente de variação	72
Tabela 16.	Valores do trabalho de adesão (N.s) das amostras de NPs secas, utilizando mucosa nasal suína, no tempo de contato de 60 segundos. O número de replicatas foi igual a 5.....	75
Tabela 17.	Valores do trabalho de adesão (g.s) obtido nas medidas de mucoadesão dos polímeros: policarbofil (PC), carbopol 971 (C971) e carbopol 974 (C974).....	77
Tabela 18.	Valores do pico de força (g) obtido nas medidas de mucoadesão dos polímeros: policarbofil (PC), carbopol 971 (C971) e carbopol 974 (C974)..	77
Tabela 19.	Valores do trabalho de adesão (g.s) obtido nas medidas de mucoadesão da NP3 e NP4, na forma liofilizada (pó), e dos padrões mucoadesivos (tempo de contato de 60 segundos).....	84
Tabela 20.	Valores do pico de força (g) obtido nas medidas de mucoadesão da NP3 e NP4, na forma liofilizada (pó), e dos padrões mucoadesivos (tempo de contato de 60 segundos).....	84
Tabela 21.	Concentrações das soluções padrão utilizadas para construção da curva analítica e os respectivos valores de áreas sob a curva (ASC) obtidos por CLAE no comprimento de onda de 266 nm (n=3).....	87
Tabela 22.	Cálculo dos parâmetros estatísticos da precisão e exatidão para validação do método de quantificação do AZT por CLAE.....	90
Tabela 23.	Valores calculados pra cada fluxo da SA e NP4_A12,5, correspondentes à cada reta obtida.....	93

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

A.....	Agregados
	Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida, sigla originada do
AIDS.....	Inglês: <i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i>
AZT.....	Zidovudina
C.....	Concentração
CLAE.....	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV.....	Coefficiente de variação
C971.....	Carbopol 971
C974.....	Carbopol 974
DO.....	Dispersão opalescente
DP.....	Desvio Padrão
DT.....	Dispersão transparente
EE.....	Eficiência de encapsulação
FNS.....	Fluído nasal simulado
GD.....	Grau de desacetilação da quitosana
	Vírus da imunodeficiência, sigla originada do Inglês: <i>Human</i>
HIV.....	<i>Immunodeficiency Virus</i>
IP.....	Índice de Polidispersidade
LD.....	Limite de detecção
LQ.....	Limite de quantificação
M.....	Massa molar da quitosana
MEV.....	Microscopia eletrônica de varredura
[η]	Viscosidades intrínsecas
η_{rel}	Viscosidade relativa

η_{esp}	Viscosidade específica
$\eta_{\text{esp}/c}$	Viscosidade reduzida
NPs.....	Nanopartículas
NPn.....	Formulações sem fármaco estudadas. n = 1 a 16
NPn_Ac.....	Formulações contendo AZT. n = 2, 3, 4, 5, 10 e 13. c corresponde à concentração do fármaco
PC.....	Policarbofil
PF.....	Pico de força
Q.....	Quantidade fármaco permeada
QS.....	Quitosana
r^2	Coefficiente de determinação
SA.....	Solução aquosa do AZT
t.....	Tempo
t_0	Tempo do solvente padrão
TPP.....	Tripolifosfato de sódio
τ_A	Trabalho de adesão
UV.....	Ultravioleta
ζ	Potencial zeta

RESUMO

A zidovudina (AZT) é o fármaco mais utilizado no tratamento da AIDS, sozinho ou em combinação com outros anti-retrovirais, porém possui certa limitação terapêutica devido a sua toxicidade hematológica dose-dependente. Além disso, apresenta baixa biodisponibilidade oral, pois sofre metabolismo pré-sistêmico. A via nasal tem sido muito utilizada como rota alternativa para administração de fármacos, pois pode promover sua absorção direta para circulação sanguínea, evitando o metabolismo hepático. Entretanto, esta via apresenta como fator limitante os mecanismos de depuração mucociliar que removem rapidamente a formulação da cavidade nasal. Para prolongar o tempo de permanência das formulações nesta via, tem sido proposto o desenvolvimento de sistemas mucoadesivos. Dentre os vários sistemas existentes, a utilização da quitosana (QS), como polímero mucoadesivo, tem sido muito explorado na preparação de nanopartículas (NPs). O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar NPs de QS para administração intranasal do AZT. Para tanto foram desenvolvidas NPs de QS através do método de gelificação ionotrópica com tripolifosfato de sódio. Estas NPs foram caracterizadas por determinação da distribuição granulométrica, potencial zeta, morfologia, ensaios de mucoadesão, avaliação da capacidade de encapsulação do fármaco e do perfil de permeação do AZT. A avaliação da incorporação do AZT nas NPs foi determinada por espectroscopia UV-Vis. As medidas de mucoadesão foram realizadas através de um analisador de textura, utilizando disco de mucina e uma mucosa suína; e os ensaios de permeação foram realizados utilizando mucosa nasal suína adaptada à célula de Franz. Estes resultados sugerem que estes sistemas possuem grande potencial para administração nasal do AZT.

Palavras-chave: Sistema de liberação de fármacos; Nanopartículas; Quitosana; Via Nasal; Mucoadesão; AIDS e Zidovudina.

ABSTRACT

Zidovudine (AZT) is the drug most commonly used in AIDS treatment, isolated or in combination with other antiretroviral agents, but it has certain limitations due to its therapeutic dose-dependent haematological toxicity. In addition, it has low oral bioavailability, since it undergoes pre-systemic metabolism. The nasal route has been used as an alternative route for drug administration, because it can promote its direct absorption to blood circulation, avoiding hepatic metabolism. However, this route presents as a factor limiting the mucociliary clearance mechanisms that remove quickly the formulation of the nasal cavity. To prolong the residence time of formulations, in this direction, has been proposed the development of mucoadhesive systems. Among the various existing systems, the use of chitosan (QS), as mucoadhesive polymer, has been widely exploited in the preparation of nanoparticles (NPs). The objective of this study was to develop and characterize QS's NPs for intranasal administration of AZT. For both NPs have been developed by ionic crosslinking of QS with sodium tripolyphosphate (TPP). These NPs were characterized by studies of particle size distribution, zeta potential, morphology, mucoadhesion tests, assessing the ability of encapsulation of the drug and permeation profile of AZT. The evaluation of AZT in the NPs was determined by UV-Vis spectroscopy. Mucoadhesion measures were made using a texture analyzer, using a mucin disk and porcine mucous membrane , and permeation assay were conducted using porcine nasal mucous membrane adapted to the Franz cell. These results suggest that the systems in hand have great potential for nasal AZT administration.

Keywords: System for drug delivery, Nanoparticles, Chitosan, Nasal; Mucoadhesion; AIDS and Zidovudine.

1. INTRODUÇÃO

A AIDS é uma doença crônica causada pelo vírus HIV e caracterizada pela perda ou diminuição acentuada da capacidade do sistema imunológico de defender o organismo. O constante desenvolvimento de novos medicamentos vem prolongando significativamente a vida dos portadores do HIV por dificultar a multiplicação do vírus, porém ainda não conseguem eliminá-lo do organismo (Brasil, 2011). Além disso, as atuais terapias antiretrovirais têm um esquema de administração de doses bastante complexo, dificultando a adesão do paciente ao tratamento em longo prazo.

A zidovudina (AZT) é o fármaco mais utilizado no tratamento da AIDS, sozinho ou em combinação com outros antiretrovirais, porém possui certa limitação terapêutica devido a sua toxicidade hematológica dose-dependente. Além disso, possui baixa biodisponibilidade oral, pois sofre metabolismo pré-sistêmico (Silva, 2006a).

A via nasal tem sido muito utilizada como rota alternativa para administração de fármacos que apresentam metabolismo pré-sistêmico, pois pode promover a absorção direta para circulação sanguínea (Gavini et al., 2008). Entretanto, esta via apresenta como fator limitante os mecanismos de depuração mucociliar que removem rapidamente a formulação da cavidade nasal (Illum, 2003; Mainardes et al., 2006). Para prolongar o tempo de permanência das formulações no local de ação, tem sido proposto o desenvolvimento de sistemas mucoadesivos (Andrews, Laverty, Jones, 2008; Carvalho et al., 2010a).

Dentre os vários materiais existentes, a utilização de quitosana (QS) como polímero mucoadesivo tem sido muito explorado na preparação de micro e nanopartículas como sistemas de liberação nasal (Amidi et al., 2006; Amidi et al., 2007; Dyer et al., 2002; Gavini et al., 2006; Gavini et al., 2008). A propriedade de mucoadesão da QS está relacionada com as interações eletrostáticas deste polímero com

os grupos siálicos da mucina que compõe a camada de muco (Bravo-Osuna et al., 2007) e com sua capacidade de intumescimento (Krauland, Guggi, Bernkop-Schnurch, 2006).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. AIDS

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida ou AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) é uma doença crônica causada pelo vírus HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) e caracterizada pela perda ou diminuição acentuada da capacidade do sistema imunológico de defender o organismo. De acordo com o Relatório *Aids Epidemic Update* (2009) da Organização Mundial da Saúde (OMS), existem cerca de 33,4 milhões de pessoas vivendo com o HIV no mundo, sendo que 2,7 milhões foram infectadas no ano de 2008 e 2 milhões de pessoas morreram em decorrência da AIDS neste mesmo ano. Na América Latina existem aproximadamente 2 milhões de pessoas infectadas pelo HIV, sendo que aproximadamente um terço dessas pessoas reside no Brasil (OMS, 2009).

O constante desenvolvimento de novos medicamentos vem prolongando significativamente a vida dos portadores do HIV ao dificultar a multiplicação do vírus, porém ainda persistem numerosas incertezas a respeito da melhor maneira de se controlar a doença. Os medicamentos adiam o início dos sintomas da doença, diminuindo o ritmo da redução das células de proteção do sistema imunológico, entretanto, não conseguem eliminar o HIV do organismo, além de estar associado com vários efeitos adversos (Brasil, 2011).

Além disso, as atuais terapias antiretrovirais têm um esquema de administração de doses bastante complexo, dividindo-se em duas a três doses ao dia, podendo ainda interferir no regime alimentar. O grande número de formas de dosagem, utilizados por

tempo indeterminado, dificulta sobremaneira a adesão do paciente ao tratamento em longo prazo. Alguns comprimidos precisam ser ingeridos em jejum, outros após a alimentação, e em caso de infecções associadas, nas quais são necessárias terapias combinadas, o aumento no número de comprimidos pode trazer dificuldade na compreensão das doses e severos efeitos colaterais (Brasil, 2011).

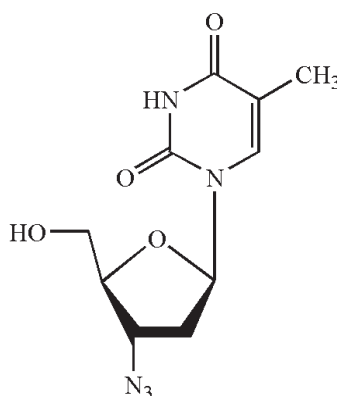
Estas limitações podem ser superadas com a identificação de novas moléculas, modificação química das já existentes e desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, os quais podem melhorar a eficácia de fármacos já existentes e explorar novas vias de administração (Ojewole et al., 2008).

A introdução de um novo fármaco no mercado, além de levar vários anos de pesquisa, envolve custos altíssimos. Assim, a procura por novos sistemas de liberação é importante no sentido de se estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilitem administrar os fármacos com mais segurança e com efeitos colaterais minimizados (Evangelista, 2006; Mainardes et al., 2004; Mainardes et al., 2005).

2.1.1. ZIDOVUDINA

A zidovudina (AZT) é um análogo da timidina que possui um grupamento 3'-azido em lugar de 3'-hidroxila. (Silva, 2006a). Sua estrutura química está representada na Figura 1.

Figura 1. Estrutura química do AZT.



O AZT foi o primeiro composto aprovado para uso clínico no tratamento antiretroviral e é o fármaco mais amplamente usado, sozinho ou em combinação com outros agentes antivirais. Entretanto, o fator que limita a sua efetividade terapêutica é sua toxicidade hematológica dose-dependente (Thomas e Panchagnula, 2003).

Após administração oral, a zidovudina é rapidamente absorvida e sua biodisponibilidade varia de 60 a 70%. Nos pacientes infectados com HIV, a absorção varia amplamente e é retardada após a ingestão de alimentos. As concentrações plasmáticas máximas e mínimas são, respectivamente, de 0,4 a 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com a posologia de 400 mg de quatro em quatro horas. A meia vida plasmática de eliminação é de aproximadamente 0,9 a 1,5 horas. Sofre metabolismo hepático, pré-sistêmico e é rapidamente transformada no metabólito inativo 5'-O-glicuronídeo (Silva, 2006a).

Para manter níveis terapêuticos efetivos, altas doses devem ser administradas (400 mg/ cada 4 h), porém estas doses geralmente alcançam níveis plasmáticos tóxicos, causando uma série de efeitos adversos graves tais como granulocitopenia e anemia (Blum et al., 1988). Esses efeitos são doses-dependentes e uma redução da dose total administrada reduziria a severidade desta toxicidade (Mandal e Tenjarla, 1996). Para manter efetivas concentrações de AZT e evitar concentrações sub-terapêuticas ou tóxicas, o controle da liberação do fármaco é requerido.

2.2. VIA NASAL

A via nasal apresenta uma série de vantagens para liberação sistêmica de fármacos. Seu epitélio, com numerosas microvilosidades e grande área de superfície, facilita a absorção de fármacos. A camada subepitelial altamente vascularizada e a membrana basal com endotélio poroso podem facilitar a permeação do fármaco. Essas características podem fazer com que a formulação absorvida pela via nasal chegue

diretamente à circulação sistêmica, evitando o efeito de metabolismo pré-sistêmico no fígado, atingindo rapidamente níveis plasmáticos terapêuticos. Todos esses fatores podem favorecer a redução da dose, a diminuição de efeitos adversos e a maior adesão ao tratamento (Mainardes, 2007).

Comparando-se com outras vias de administração, a via nasal tem representado um grande avanço na administração de fármacos peptídicos, como hormônio do crescimento (Cheng et. al., 2005; Pontiroli, 1998; Leitner et. al., 2004), insulina (Krauland, Guggi, Bernkop-Schnurch, 2006) e fármacos que sofrem metabolismo pré-sistêmico (Gavini et al., 2008; Mainardes, 2007).

Apesar do potencial desta via, há alguns fatores que limitam a absorção intranasal de fármacos. Essas barreiras incluem os mecanismos de depuração mucociliar, o qual remove rapidamente a formulação da cavidade nasal (Illum, 2003; Mainardes et al., 2006); degradação enzimática que pode acontecer tanto no lúmen da cavidade nasal como na passagem através da barreira epitelial; a baixa permeabilidade do epitélio nasal que dificulta a absorção de fármacos polares ou de alto peso molecular e o pH do sistema que deve ser compatível com o da cavidade nasal (Mainardes et al., 2006). Uma estratégia utilizada para retardar a remoção da formulação pela depuração mucocilar é o uso de sistemas mucoadesivos, que promovem um contato prolongado entre a formulação e os locais de absorção na cavidade nasal (Andrews, Lavery, Jones, 2008; Carvalho et al., 2010b).

2.3. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

A busca por novos sistemas de liberação é importante no sentido de se estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilitem administrar os fármacos com mais segurança e com efeitos colaterais minimizados (Cera, 2001).

A nanotecnologia tem representado um importante avanço no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, pois apresenta inúmeras vantagens, tais como estabilidade, proteção do fármaco, melhores propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, assim como a liberação prolongada e sítio específica (Santos-Magalhães et al., 2000). Os sistemas nanoestruturados se caracterizam pelo tamanho reduzido das partículas e a compartimentalização de fármacos em ambientes restritos, favorecendo a interação com sistemas biológicos.

Atualmente há vários estudos envolvendo sistemas de liberação de fármaco antiretrovirais (Dembri et al., 2000; Han et al., 2007; Kawaguchi et al., 1991; Kohli et al., 2007, Mainardes et. al. 2009; Phillips, Skamene, Tsoukas, 1991; Phillips, Tsoukas, 1992; Subheet; Tiwary, Jain, 2006; Wintergerst et al., 1997). Dembri e colaboradores (2000) desenvolveram nanopartículas de poli-isohexilcianoacrilato para administração gastrointestinal do AZT. Estudos de encapsulação de AZT em lipossomas mostraram que a administração parenteral em ratos não desenvolveu toxicidade na medula, exibindo perfis normais de leucócitos e eritrócitos, além de atingir órgãos onde o vírus se aloja, como pulmões e baço (Phillips, Skamene, Tsoukas, 1991; Phillips, Tsoukas, 1992).

Muitos estudos envolvem a encapsulação de antiretrovirais para direcionar a liberação para macrófagos. Nanopartículas de ácido polilático foram desenvolvidas para liberação intranasal do AZT, sendo que a afinidade por leucócitos polimorfonucleares mostrou ser dependente das quantidades destes polímeros (Mainardes et al., 2009).

Nanocápsulas de AZT trifosfatado de poliisobutilcianoacrilato também promoveu a liberação celular *in vitro* em macrófagos (Hillaireau, et al., 2006).

2.3.1.SISTEMAS MUCOADESIVOS

A bioadesão pode ser definida como o estado em que dois materiais, dentre os quais pelo menos um é de natureza biológica, sejam mantidos em contato por um período prolongado de tempo através de forças interfaciais (Smart, 2005). Sistemas bioadesivos aplicados em mucosas que apresentam uma camada estacionária de muco, geralmente são definidos como mucoadesivos, porém os termos podem ser intercambiáveis (Leung, Robinson, 1990).

A ação dos sistemas mucoadesivos consiste em prolongar o tempo de residência da amostra no local de absorção e promover o contato intensificado com a barreira epitelial (Hägerström, 2003).

As mucosas são as principais vias de administração para os sistemas bioadesivos, seguido da aplicação na pele. A mucosa mais utilizada para administração e absorção de fármacos é a gastrintestinal (Junginger; Thanou; Verhoef, 2007), entretanto outras vias também são exploradas, como a nasal, ocular, bucal, vaginal, retal, oral e periodontal (Bruschi et al., 2007; Hägerström, 2003; Woodley, 2001).

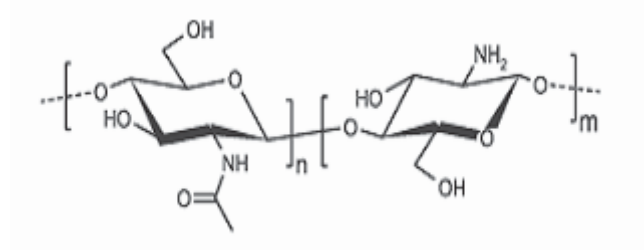
Um sistema mucoadesivo pode ser delineado nas mais variadas formas farmacêuticas, uma vez que a propriedade da adesão depende das características do material utilizado para sua preparação (Evangelista, 2006). Diferentes sistemas de liberação baseados em polímeros mucoadesivos têm sido extensivamente desenvolvidos (Gavini et al., 2008). Dentre os vários materiais existentes, a utilização de quitosana como polímero mucoadesivo tem sido muito explorado na preparação de micro e

nanopartículas (Amidi et al., 2006; Amidi et al., 2007; Dyer et al., 2002; Gavini et al., 2006; Gavini et al., 2008).

2.3.1.1. QUITOSANA

A quitosana (QS) (Figura 2) é um polímero semi-sintético obtido da desacetilação da quitina. Apresenta propriedades biológicas favoráveis, como baixa toxicidade, biocompatibilidade e elevada susceptibilidade a biodegradação (Lucinda, 1999).

Figura 2. Estrutura química da quitosana (Adaptado de Kumar, 2000).



Além disso, a sua capacidade de mucoadesão (Prabaharan, Gong, 2008; Venter et al., 2006) e de intumescimento na presença de água (Krauland, Guggi, Bernkop-Schnurch, 2006; Oliveira, Santana, Ré, 2005) somada a sua natureza catiônica, são características que podem ser utilizadas na tecnologia de liberação de fármacos (Guimarães, 2005). A propriedade de mucoadesão da QS está relacionada com as interações eletrostáticas deste polímero com os grupos siálicos da mucina na camada de muco (Bravo-Osuna et al., 2007) e sua capacidade de intumescimento (Krauland, Guggi, Bernkop-Schnurch, 2006).

2.3.1.2. NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

Dentre os sistemas de liberação de fármacos, as nanopartículas têm se destacado por apresentar alta versatilidade para formulação, capacidade de modificar a liberação

de fármacos, possuir grande estabilidade e biocompatibilidade com tecidos e células, (Guimarães, 2005). Estes sistemas têm sido desenvolvidos visando inúmeras aplicações terapêuticas, sendo planejados para administração parenteral, oral, oftálmica e nasal (Amidi et al, 2007; Kang et al., 2007; Sadeghi, et. al., 2008; Schaffazick et al., 2003; Quan et al., 2008).

A QS tem sido muito utilizada na preparação de micro e nanopartículas como sistemas de liberação intranasal (Amidi et al., 2006; Amidi et al., 2007; Dyer et al., 2002; Gavini et al., 2006; Gavini et al., 2008; Janes; Calvo; Alonso, 2001; Kang et al., 2007; Krauland, Guggi, Bernkop-Schnurch, 2006; Soane et al., 2001). Fernandez-Urrusuno e colaboradores (1999) observaram que nanopartículas de QS melhoram a absorção nasal da insulina em coelhos. Estas nanopartículas foram capazes de aumentar significativamente a resposta hipoglicêmica da insulina absorvida pela via intranasal. Soane e colaboradores (2001) avaliaram a taxa de depuração mucociliar de microesferas de quitosana em humanos. Eles demonstraram que a meia vida de depuração das microesferas quaduplicou quando comparada com o controle.

Além disso, as nanopartículas de QS podem se aderir à mucosa nasal e abrir transitoriamente as junções intercelulares das células epiteliais e deste modo aumentar a biodisponibilidade dos fármacos incorporados (Gavini et al., 2008; Janes, Calvo, Alonso, 2001; Kang et al., 2007; Krauland, Guggi, Bernkop-Schnurch, 2006).

Inúmeras técnicas são descritas na literatura para o preparo de micro e nanopartículas (NPs) de QS e seus derivados, e dentre elas a gelificação ionotrópica com tripolifosfato é muito utilizada devido às características que a QS apresenta em complexar com poliânions específicos, através de ligações cruzadas inter e intramoleculares (Amidi et al., 2006; Chen, Zhang, Huang, 2007; Dyer et al., 2002;

Guimarães, 2005; Janes, Calvo, Alonso, 2001; Laus et al., 2006; Lucinda, 1999; Sadeghi et al., 2008).

O tripolifosfato de sódio (TPP) é um ânion multivalente e atóxico. É utilizado como agente reticulante alternativo ao glutaraldeído, que é um agente potencialmente antigênico e pode causar irritações nas superfícies de mucosas devido a sua toxicidade. O tratamento da QS com TPP resulta numa diminuição da susceptibilidade de degradação pela quitinase, além de alterar o comportamento de solubilidade do polímero (Guimarães, 2005).

2.3.1.3. METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA MUCOADESÃO

Para avaliar a mucoadesão de sistemas de liberação de fármacos, inúmeras metodologias *in vitro* são relatadas, embora o emprego dos diferentes métodos às vezes cause incoerência entre os resultados, os quais ficam difíceis de comparar, devido às diferenças entre os parâmetros e condições experimentais (Sigurdsson; Loftsson; Lehr, 2006).

Para sistemas sólidos, como nanopartículas, a técnica mais empregada é a avaliação da força de adesão (Chowdary, Rao, 2004); para sistemas semi-sólidos, como hidrogéis e matrizes líquido cristalinas, além da medida de força de adesão, a mucoadesão pode ser avaliada por medidas reológicas (Bruschi et al., 2007; Carvalho et al., 2010b; Nielsen, Schubert, Hansen, 1998).

O equipamento mais usado para avaliação da força de adesão é o analisador de textura, o qual mede a força necessária para remover a formulação a partir de uma membrana modelo, que pode ser um disco de mucina (Bruschi et al., 2007; Carvalho, 2009) ou uma mucosa animal, como mucosa nasal suína (Hägerström, Bergström, Edsman, 2004).

3. OBJETIVOS

Tendo em vista a necessidade de se obter novos sistemas de liberação de antiretrovirais e o potencial que a via nasal oferece para absorção dos mesmos, este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar sistemas nanoestruturados compostos de quitosana para administração nasal do AZT.

Etapas do trabalho

- Desenvolvimento das nanopartículas de quitosana;
- Caracterização físico-química das amostras por estudos de distribuição granulométrica, potencial zeta e morfologia;
- Avaliação da capacidade de encapsulação do AZT nos sistemas, por espectroscopia UV-Vis.
- Análises de mucoadesão, através de analisador de textura;
- Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação do AZT nos ensaios de permeação;
- Determinação do perfil de permeação do AZT *ex vivo*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

- Ácido acético glacial, Chemis;
- Ácido clorídrico, Chemis;
- Adesivo instantâneo universal (éster de cianocrilato), SuperBonder®, Loctite.
- Agulha de tuberculina, 0,38x13 - 27,5G1/2;
- Água deionizada Milli-Q.
- Anel de mucoadesão;
- Cloreto de Sódio, Synth;
- D-Glicose anidra, Synth
- Fita adesiva dupla face, Adelbras;
- Fosfato de potássio monobásico, Merck;
- Hidróxido de sódio, Merck;
- Membrana de acetato celulose, com poro de 0,45µm, Sartorius AG;
- Metanol grau CLAE, J. T. Backer
- Mucosa nasal suína;
- Mucina tipo II crua de estômago suíno, Sigma-Aldrich;
- NOVEON® AA-1 Policarbofil, Lubrizol
- Polímero Carbopol® 971P NF, Lubrizol;
- Polímero Carbopol® 974P NF, Lubrizol;
- Seringas BD, 1 e 5 mL;
- Seringa de insulina U -100, 1 mL;
- Seringa para HPLC 25 µL, Hamilton;
- Tripolifosfato de sódio, Synth;
- Quitosana de baixo peso molecular, 75-85% desacetilada, Sigma-Aldrich.

- Zidovudina, Fundação para o Remédio Popular (FURP), Guarulhos, Brasil.

4.2. EQUIPAMENTOS

- Analisador de textura TAXT plus (Stable Micro Systems[®]), probe cilíndrico (P/P25);
- Agitador Magnético, Multimatic, modelo 9S;
- Agitador Mecânico, Marconi;
- Balança analítica, Ohaus, AS200;
- Balança analítica, Mettler, H51;
- Balança semi-analítica, Sartorius, BP210S;
- Banho de ultrassom, Unique ,Ultra Sonic Cleaner;
- Banho termostatizado recirculante, Nova Ética;
- Bomba a vácuo, Tecnal – TE – 058;
- Bomba peristáltica, Pharmacia Biotech, Pump P1;
- Centrífuga, Beckman Coulter, modelo Avanti Centrifuge J-25, rotor JA – 25.50;
- CLAE Varian, módulo de distribuição de solvente ProStar/Dynamax[®] 210/215, detector espectrofotométrico ProStar[®] 330 UV-VIS PDA e Rheodine[®] VS 7125, válvula de injeção com um *loop* de 100µL, coluna RP-18 (Phenomenex[®] - Luna[®]) 250 mm x 4.6mm I.D. 5µm tamanho de partícula.
- Espectrofotômetro de UV-VIS, Hewlett Packard 8453, com HP UV-Visible ChemStation Software;
- Espectrômetro de espalhamento de luz por incidência de raio laser, Malvern, Zetasizer Nanoseries – Nano ZS ($\lambda = 633 \text{ nm}$);
- Filtro com membrana de acetato celulose, com poro de 0,45µm, Sartorius AG
- Homogeneizador de tubos, modelo AP22, Phoenix;

- Liofilizador Edwards, mod. Modulyo;
- Máquina de comprimir, excêntrico, Fabbe
- Membrana de acetato celulose, com poro de 0,45 μ m, Sartorius AG;
- Micro pipeta de 100 e 1000 mL Pipetman, Gilson;
- Microscópio eletrônico de varredura, Jeol, modelo JSM 7500 F;
- Microscópio óptico, modelo CX41, Olympus;
- Permeador cutâneo Microette Plus, Hanson Research.
- Porta filtro holder aço inox 25 MM, Sartorius AG;
- Purificador de água Milli-Q Plus, Millipore;
- pHmetro Digital, Gehaka, PG 1800;
- Revestimento de carbono, Bal-Tec SCD 050, Sputter Coater.
- Sonicador, Sonics (vibra cell).
- Viscosímetro Cannon-Fenke (nº 150), Laborglas.

4.3. MÉTODOS

4.3.1. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

4.3.1.1. Determinação do grau de desacetilação da quitosana

O grau de desacetilação da QS foi determinado por titulação potenciométrica. Foi adicionado 25 mL de solução de HCl (0,05M), a uma determinada massa seca de QS (~0,20g) deixando-a sob agitação mecânica por 24 horas, tempo suficiente para protonar os grupos amino disponíveis. Em seguida, titulou-se a solução resultante com NaOH (0,1M) para obter uma curva típica de titulação potenciométrica. Através das inflexões das curvas obtidas, foi possível determinar a porcentagem de grupos amino na QS, utilizando a equação 1 (Jiang; Chen; Zhong, 2003).

$$\%NH_{2-} = \frac{M_{NaOH} \times (V_2 - V_1) \times 161 \times 100}{m_2} \quad (\text{eq.1})$$

Em que M_{NaOH} é a molaridade da solução de NaOH (mols/L); V_1 e V_2 são respectivamente os volumes de NaOH empregados para neutralizar o excesso de HCl e a amostra de QS protonada; 161 é a massa molecular da unidade monomérica da QS; e m_2 a massa da amostra no estado seco tomado para titulação (g).

4.3.1.2. Determinação da massa molar da quitosana

A massa molar da QS foi determinada pela técnica de viscosimetria capilar. O viscosímetro utilizado foi o Cannon-Fenke, com diâmetro nº 150 (Laboratório Multiusuário da Faculdade de Engenharia Química, da UNICAMP). Durante o experimento o viscosímetro permaneceu a 25° C em um recipiente transparente contendo água na mesma temperatura, a qual foi mantida por um banho termostatizado recirculante.

Para a obtenção da massa molar, foram preparadas soluções de QS nas concentrações de 0,001; 0,003; 0,006; 0,009; 0,012 (g/mL) em um sistema solvente contendo ácido acético 0,1 M, cloreto de sódio 0,2 M e água (Severino, 2008). Com ajuda de uma bomba a vácuo, o viscosímetro foi preenchido com 10 mL de cada solução. Através da determinação do tempo em que estas soluções passam pelos dois meniscos do viscosímetro (Figura 3), foi calculada a viscosidade relativa (eq. 2), específica (eq. 3) e reduzida (eq. 4). Estes valores foram utilizados na equação 5 para o cálculo da massa molar da quitosana.

$$\eta_{rel} = \frac{t}{t_0} \quad (\text{eq.2})$$

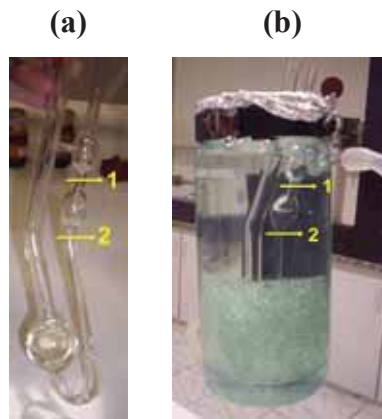
$$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 = (t - t_0) / t_0 \quad (\text{eq.3})$$

$$\eta_{esp/c} = \frac{\eta_{esp}}{c} = \frac{t - t_0}{t_0 \cdot c} \quad (\text{eq.4})$$

$$[\eta] = K \cdot M^\alpha \quad (\text{eq.5})$$

Nestas equações, η_{rel} , η_{esp} e $\eta_{esp/c}$ são a viscosidade relativa, viscosidade específica e reduzida, respectivamente; t é o tempo que a solução de QS levou para escoar entre os dois meniscos e t_0 é o tempo do solvente padrão; c é a concentração das soluções; α e K são constantes para um sistema polímero-solvente específico. As viscosidades intrínsecas $[\eta]$ das soluções utilizadas na eq. 5 foram determinadas através da construção do gráfico da viscosidade reduzida ($\eta_{esp/c}$) em função da concentração (c) das soluções. A viscosidade intrínseca $[\eta]$ é dada pelo valor de $\eta_{esp/c}$ quando $c=0$. O gráfico foi plotado com auxílio do software Origin® 7.0. Os valores obtidos foram utilizados para calcular a massa molar média (M) da QS, através da equação de Mark-Houwink (eq. 5) (Aulton, 2005).

Figura 3. (a) Viscosímetro capilar. (b) Viscosímetro capilar dentro do banho termostaticado recirculante. Os números 1 e 2 indicam os meniscos do viscosímetro.



4.3.2. DESENVOLVIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS

As partículas de QS foram preparadas pelo o método da gelificação ionotrópica utilizando TPP como agente reticulante. Por essa técnica, suspensões de partículas foram formadas através da titulação, por gotejamento, da solução de TPP em dispersões de QS, com auxílio de uma bomba peristáltica e lenta agitação mecânica.

Para isto, foram preparadas dispersões de QS nas concentrações de 0,1 e 0,5 % (m/v). A QS foi suspensa em metade do seu volume final em solução de ácido acético glacial 0,75 % (v/v) e a mistura foi realizada com agitação mecânica por 24 horas a temperatura ambiente (25° C). Adicionou-se água (2/3 do volume restante) e agitou-se por mais 24 horas nas mesmas condições. Em seguida ajustou-se o pH para 4,8 com solução aquosa de hidróxido de sódio 0,1 M e completou-se o volume com água (Severino, 2008). A solução de TPP foi preparada em água, nas concentrações de 0,1 e 0,5% (m/v). Para a reticulação das NPs com o fármaco, o AZT foi solubilizado na solução de TPP.

A gelificação ionotrópica foi realizada com a preparação de diferentes volumes (3, 6, 15 e 30 mL) de TPP, nas concentrações de 0,1 e 0,5 %, os quais foram gotejados em 30 mL da solução de QS 0,1 e 0,5 %, sob agitação mecânica. A agitação persistiu por mais 90 minutos após todo volume de TPP ser adicionado. As partículas contendo o fármaco foram obtidas com o mesmo procedimento. A bomba peristáltica utilizada foi a Pharmacia Biotech (Pump P1), com a qual foi padronizado o gotejamento de $12,33 \pm 1,97$ gotas por minuto, através de uma cânula acoplada a uma seringa de 1 mL, com uma agulha $0,38 \times 13 - 27,5$ G1/2 (Severino, 2008). A agitação foi realizada utilizando o agitador mecânico Marconi.

A mistura resultante foi classificada visualmente como dispersão transparente (DT), dispersão opalescente (DO) e agregados (A). Os valores das concentrações de QS e TPP na dispersão final de cada amostra foram calculados (Guimarães, 2005).

4.3.2.1. Obtenção de NPs em suspensão e liofilizadas

Alguns ensaios utilizaram as NPs ressuspensas em água ou liofilizadas. Para isto, as suspensões de NPs foram centrifugadas a 22.000 g por 20 min a 25 °C (Mainardes et al., 2009). O sobrenadante das amostras sem AZT foi descartado e das formulações com fármaco, foi coletado para a determinação da concentração de AZT não encapsulada nas NPs. As partículas sedimentadas, tanto das amostras com e sem fármaco, foram pesadas e ressuspensas em água purificada.

Para os ensaios que utilizaram as NPs na forma liofilizada, foi adicionado 3 mL de glicose 40%, como crioprotetor, antes da etapa de centrifugação. As NPs ressuspensas em água, foram congeladas e posteriormente liofilizadas (Wang et al., 2009).

4.3.3. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As suspensões de partículas sem fármaco formadas após a gelificação ionotrópica, ou seja, após o gotejamento da solução de TPP na dispersão de QS, foram caracterizadas por estudos de distribuição granulométrica, potencial zeta, pH e morfologia. As amostras classificadas como DO, região de maior probabilidade de formação de NPs, foram escolhidas para incorporação do fármaco, e submetidas aos mesmos ensaios.

Para verificar se o processo de liofilização influencia nas características das NPs (tamanho de partícula, carga de superfície e morfologia), novas análises de distribuição

granulométrica, potencial zeta e morfologia foram realizadas após a reconstituição das NPs liofilizadas com fármaco.

4.3.3.1. Determinação da distribuição granulométrica

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Materiais Magnéticos e Colóides, Departamento de Físico-Química, do Instituto de Química (IQ), da Unesp. O equipamento utilizado foi o Malvern Zetasizer, empregando uma fonte de laser vermelho ($\lambda = 633 \text{ nm}$), na temperatura de 25° C .

As suspensões de partículas, com e sem fármaco, foram filtradas em membrana acetato de celulose com poro de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$, diluídas em água purificada (1:10) e analisadas por espalhamento de luz. O índice de refração da água e da QS utilizados foram, respectivamente, 1,33 e 1,55. As amostras foram analisadas em triplicata e foram feitas 10 determinações para cada uma delas. Foram calculados os valores médios e os respectivos desvios-padrão.

As NPs liofilizadas contendo AZT, foram dispersas em água, na concentração de $2,5 \text{ mg/mL}$, com auxílio de um homogeneizador de tubos, durante 24 horas. Estas amostras foram sonicadas por 1 segundo com pulso de 5 segundos, durante um minuto e meio, na amplitude de 21%, foram filtradas em membrana acetato de celulose com poro de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$, e analisadas por espalhamento de luz. Foram realizadas 5 medidas para cada amostra, com 1 varredura de 180 segundos. Foram calculados os valores médios e os respectivos desvios-padrão.

4.3.3.2. Determinação do potencial zeta

Para determinação do potencial zeta (ζ), as suspensões de partículas, com e sem o fármaco, foram filtradas em membrana $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ e diluídas em água purificada. As

NPs liofilizadas contendo AZT foram dispersas em água. As amostras foram submetidas a um campo elétrico produzido pelo equipamento Malvern Zetasizer. O experimento foi realizado em triplicata e foram feitas 30 determinações para cada uma delas, calculando-se os valores médios e os respectivos desvios-padrão.

4.3.3.3. Determinação do pH das amostras

O pH das amostras foi medido diretamente nas suspensões das partículas, com e sem o fármaco.

4.3.3.4. Análise morfológica das nanopartículas

A análise morfológica das suspensões de NPs, da QS e do AZT foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Jeol, JSM 7500 F). Uma gota da suspensão de NPs foi depositada sobre um suporte de silício aderido na parte superior de um *stub* de latão próprio para utilização deste microscópico, os suportes contendo a suspensão foram secos em dessecador (Guimarães, 2005). As NPs liofilizadas foram depositadas diretamente sobre um suporte de silício. O AZT foi disperso em querosene, depositado no suporte e seco a 50 °C; a QS, na forma de pó, foi depositada diretamente sobre este suporte. As amostras foram revestidas com carbono sob vácuo (Bal-Tec SCD 050, Sputter Coater), com exceção das NPs liofilizadas que foram revestidas com ouro, e analisadas. As fotomicrografias foram obtidas utilizando-se um feixe de elétron de 2 kV.

4.3.4. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DA ZIDOVUDINA

4.3.4.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de AZT por espectroscopia UV.

Para quantificação do AZT nas NPs foi desenvolvida e validada uma metodologia analítica por espectroscopia UV segundo as normas estabelecidas pela Anvisa (Resolução - RE nº899 de 2003), cujos parâmetros determinados foram precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e quantificação, especificidade, seletividade e recuperação.

Para o desenvolvimento da curva analítica foi utilizado o espectrofotômetro de UV-VIS. A solução estoque de AZT foi preparada de acordo com as condições preconizadas na Farmacopéia Americana (USP 30), sendo o solvente utilizado o metanol, a concentração de AZT de 1 mg/mL, e o comprimento de onda de 266 nm. A partir da solução estoque prepararam-se soluções padrões, em água purificada, na faixa de concentração de 2 a 10 µg/mL.

4.3.4.2. Determinação do AZT incorporado nas NPs

A quantificação do AZT nas NPs foi determinada indiretamente (Mainardes et. al., 2009). As NPs foram isoladas através de centrifugação, como descrito no item 4.3.2.1., e o sobrenadante foi devidamente diluído em água e quantificado por espectroscopia UV. A concentração de AZT foi calculada aplicando-se os valores de absorbância na equação da reta obtida pelo método analítico desenvolvido e validado. Com estes valores determinou-se a eficiência de encapsulação (EE%) de acordo com a equação 6.

$$EE \% = \frac{\text{Quantidade total de AZT adicionada} - \text{AZT livre}}{\text{Quantidade total de AZT adicionada}} \times 100 \quad (\text{eq. 6})$$

4.3.5. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE MUCOADESÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A avaliação da mucoadesão foi realizada através da medida da força necessária para remover a formulação a partir de uma membrana modelo utilizando um analisador de textura TAXTplus (Stable Micro Systems®) (Figura 4 - a), o qual tem sido muito utilizado em estudos de mucoadesão para sistema sólidos, como as NPs (Fransén, Björk, Edsman, 2008; Hägerström, Bergström, Edsman, 2004; Hägerström, Edsman, 2001; Hagesaether, Hiorth, Sande, 2009). Foi utilizado como membrana modelo mucosa nasal suína e o disco de mucina (Hagesaether, Hiorth, Sande, 2009).

Foram analisadas amostras de NPs secas e liofilizadas na forma de pó, e polímeros conhecidos na literatura por sua mucoadesão como padrões mucoadesivos, entre eles o Policarbofil e o Carbopol, na forma compacta e em pó. As medidas de mucoadesão das NPs liofilizadas foram comparadas com a destes polímeros.

4.3.5.1. Preparação da mucosa

O tecido foi preparado segundo a metodologia adaptada de Hägerström e Edsman (2001). A mucosa nasal foi obtida de porcos domésticos provenientes de abatedouro local. As cavidades nasais foram separadas através de uma incisão ao longo do septo nasal. A mucosa foi removida com auxílio de uma pinça e tesoura cirúrgica curva e mantida em salina (solução de cloreto de sódio 0,9% (m/v)). Cerca de 3 pedaços foram cortados das partes centrais das mucosas de cada cavidade, evitando regiões que entraram em contato com a pinça, e congelados em salina.

No dia do experimento, os pedaços de mucosa foram descongelados e mantidos refrigerados em gelo, mergulhados em salina.

A mucosa foi fixada no anel de mucoadesão (Figura 4 - b) com adesivo instantâneo universal (éster de cianocrilato) e este conjunto permaneceu a 32 °C.

Imediatamente antes do experimento a mucosa foi hidratada com 100 μL de fluido nasal simulado (FNS) a 32° C, solução (pH 5,7) composta de 8% (p/v) de mucina, 7,45 mg.mL^{-1} NaCl; 1,29 mg.mL^{-1} KCl e 0,32 mg.mL^{-1} $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ (Melon, 1968 *apud* Callens et al., 2003).

Figura 4. (a) Analisador de Textura utilizado para avaliar a força adesiva das NPs. Os números indicam: 1 – prova, 2 – anel de mucoadesão, 3 – banho aquecido e 4 – aquecedor. (b) anel de mucoadesão, utilizado para fixar a mucosa.

(a)



(b)



4.3.5.2. Preparação do disco de mucina

Os discos de mucina foram preparados pela compressão de mucina suína crua (200 mg), utilizando uma máquina de comprimir (excêntrico, Fabbe) e uma punção plana de diâmetro de 11 mm. Os discos foram aderidos na mesa do equipamento com fita adesiva dupla face (Figura 2 – a) e o conjunto permaneceu sobre um banho a 32° C. A mucina foi hidratada com 100 μL de FNS a 32 °C imediatamente antes do experimento.

4.3.5.3. Preparação das NPs secas para o ensaio de mucoadesão

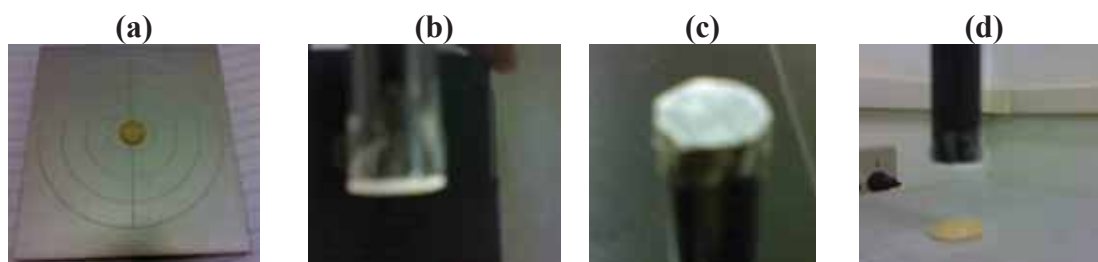
As suspensões de NPs, com e sem fármaco, foram centrifugadas e ressuspensas em água como descrito no item 4.3.2.1. Uma gota (70 μ L) das NPs em suspensão, na concentração de 140 mg/mL, foi adicionada em um círculo de fita adesiva do mesmo tamanho da prova cilíndrica (diâmetro = 1 cm) e seca em dessecador, a massa formada de NPs secas foi anotada. A fita adesiva contendo as NPs secas foi aderida na prova. Para estimar a aderência inespecífica da prova (sem a amostra) com a membrana modelo, foi realizado o mesmo ensaio sem aderir as NPs na prova.

4.3.5.4. Preparação dos padrões mucoadesivos

Os polímeros utilizados como padrões mucoadesivos foram o Policarbofil (PC), o Carbopol 971 (C971) e o Carbopol 974 (C974). Estes foram avaliados na forma de pó e comprimido.

Os comprimidos foram preparados pela compressão dos polímeros (60 mg), utilizando uma máquina de comprimir e punção de diâmetro de 10 mm, igual ao diâmetro da prova. Eles foram aderidos na prova com fita dupla face e adesivo instantâneo universal (Figura 5 – b). Os polímeros na forma de pó foram aderidos na prova com fita adesiva dupla face (Figura 5 – c) e analisados em microscópio óptico para verificar a formação de uma camada homogênea.

Figura 5. (a) Disco de mucina aderido na mesa do Texturômetro. (b) Comprimido de Policarbofil (PC) aderido na prova, representativo para os outros polímeros. (c) PC na forma de pó aderido na prova, representativo para os outros polímeros. (d) Ensaio realizado no texturômetro.



4.3.5.5. Preparação das NPs liofilizadas

As suspensões de NPs formadas foram centrifugadas e liofilizadas como descrito no item 4.3.2.1. As NPs liofilizadas foram aderidas na prova com fita adesiva dupla face segundo as metodologias já apresentadas na literatura (Fransén, Björk, Edsman, 2007; Grabovac, Gugli, Bernkop-Schunürch, 2005) e analisadas em microscópio óptico para verificar a formação de uma camada homogênea.

4.3.5.6. Análise de mucoadesão

Para avaliação das propriedades mucoadesivas, o teste utilizado foi o “*Hold until time*” no modo “*compression*” e os parâmetros envolvidos no ensaio são apresentados na Tabela 1.

A prova, contendo a amostra, desceu até encontrar a membrana modelo, detectada por uma força de gatilho, a uma velocidade constante e permaneceu em contato com a membrana modelo por um tempo determinado, para assegurar o contato íntimo entre a membrana modelo e a amostra. Nenhuma força foi aplicada durante a fase de contato. A prova foi lentamente removida a uma velocidade constante e a força necessária para destacar a amostra da superfície da membrana modelo foi determinada através da curva força *versus* tempo. O trabalho de adesão, ou seja, área sob a curva determinada durante a fase de retirada da prova foi calculado utilizando o software Texture Exponent Lite do equipamento. Esse parâmetro foi usado como medida de mucoadesão (Hagerstrom, Bergstrom, Edsman 2004; Hagerstrom, Edsman 2001). O número de replicatas realizado para cada amostra está presente na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros utilizados no ensaio de mucoadesão para as amostras de NPs, secas e liofilizadas, e para os padrões mucoadesivos (PC, C971 e C974).

Parâmetros utilizados no ensaio de mucoadesão	Amostras		
	NPs secas	Padrões mucoadesivos	NPs liofilizadas
Força de gatilho	2 mN	2 mN	2 mN
Velocidade de descida da prova	0,5 mm/s	1 mm/s	1 mm/s
Tempo de contato (segundos)	60	30, 60 e 120	60
Velocidade de remoção da prova	0,1 mm/s	0,5 mm/s	0,5 mm/s
Membrana modelo	mucosa	mucina e mucosa	mucina e mucosa
Número mínimo de replicatas	5	7	4

4.3.6. ESTUDOS DE PERMEACÃO *EX VIVO*

4.3.7.1. Validação da metodologia analítica para determinação do AZT por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para quantificação do AZT nas NPs foi desenvolvida e validada uma metodologia analítica por CLAE segundo as normas estabelecidas pela Anvisa (Resolução - RE nº899 de 2003), cujos parâmetros determinados foram precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e quantificação, especificidade, seletividade e recuperação.

As condições cromatográficas empregadas estão descritas na Tabela 2. A solução estoque de AZT foi preparada de acordo com as condições preconizadas na Farmacopéia Americana (USP 30), sendo o solvente utilizado o metanol, na concentração de AZT de 1 mg/mL. A partir desta solução estoque prepararam-se soluções padrões, em tampão fosfato monobásico 20 mM pH 6,8 (USP 35), na faixa de concentração de 0,1 a 20 µg/mL.

Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas para validação da metodologia analítica para determinação do AZT por CLAE.

	Condições cromatográficas utilizadas
Coluna	RP-18 (Phenomenex [®] - Luna [®])
Fase móvel	Metanol:água 60:40 (v/v)
Fluxo	0,7 mL/min.
Volume de injeção	30µL
Comprimento de onda	266 nm

4.3.6.2. Preparação da mucosa

A mucosa nasal suína foi preparada com a mesma técnica descrita no item 4.3.6.1. A mucosa foi colocada na parte superior da célula de difusão previamente aquecida a 32 °C. Esta mucosa foi utilizada, pois segundo Wadell, Björk e Camber (2003) é a mais apropriada para os estudos de permeação.

4.3.6.3. Preparação das amostras

A suspensão de NPs foi centrifugada como descrito no item 4.3.2.1., e a massa de NPs precipitada (0,2613 g) foi ressuspensa em 1,5 mL de água, sendo a concentração de AZT nas NPs de 0,934 mg/mL. Também foi avaliada a permeação da solução aquosa (SA) do AZT, na mesma concentração da NP, ou seja, 0,934 mg/mL de AZT. As amostras foram colocadas sobre a mucosa no volume de 200 µL, o que corresponde a 186,78 µg de AZT para ambas as amostras.

4.3.6.4. Ensaio de permeação *ex vivo*

O sistema de célula de difusão vertical utilizado foi o equipamento de permeação cutânea Microette Plus (Hanson Research), composto de seis células individuais, com volume de 7 mL e área de exposição de 1,77 cm², conectado a um

banho termostatzado a $32 \pm 0,5$ °C, sob agitação magnética constante de 300 rpm, por um período de 12 horas para perfil de permeação. O meio receptor usado foi tampão fosfato monobásico 20 mM pH 6,8, garantindo as condições *sink*, ou seja, quando a concentração do fármaco dissolvida no meio de liberação é menor que 10% da sua concentração de saturação.

Alíquotas de 2 mL do meio receptor foram retiradas nos tempos de 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480, 600 e 720 minutos e quantificadas por CLAE. O volume retirado foi imediatamente repostado com volume igual do meio de dissolução. O estudo foi realizado em 6 replicatas.

4.3.7. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise estatística foi realizada pelo teste estatístico de análise de variância (ANOVA) fator único, com nível de significância menor que 0,05. Para comparações individuais, foi realizado o teste *post-hoc* de Tukey.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

5.1.1. Determinação do grau de desacetilação da quitosana

Diversas técnicas são propostas, incluindo espectroscopia de infravermelho, de massas, de ultravioleta, ressonância magnética nuclear, cromatografia e potenciometria. Esta última em especial é o método mais simples, cujos equipamentos e reagentes requeridos estão disponíveis nos laboratórios mais comuns de química (Jiang; Chen; Zhong, 2003). A titulação potenciométrica é uma técnica analítica bem conhecida para quantificar o percentual de grupos amino presentes na quitosana. Esse método é recomendável quando se trabalha com grau de desacetilação maiores que 5% (Raymond et al., 1993). O grau de desacetilação (GD) da quitosana é essencial para a sua caracterização, sendo utilizada para determinar a quantidade de agente gelificante (TPP) adequado à produção das NPs (Severino, 2008), além de prever a interação com a mucosa nasal, uma vez que a mucina, glicoproteína do muco, possui grupos siálicos de carga negativa, que interagem com os grupos amino da QS.

O GD da quitosana foi determinado pela titulação potenciométrica. A curva de titulação obtida está representada na Figura 6a, e sua primeira derivada na Figura 6b. Com ela foi possível obter os pontos de inflexão cujos valores foram utilizados na eq. 1 para calcular o grau de desacetilação da QS. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 3.

Figura 6. (a) Curva de titulação potenciométrica e (b) sua primeira derivada, o valor numérico no pico corresponde ao V_1 e V_2 .

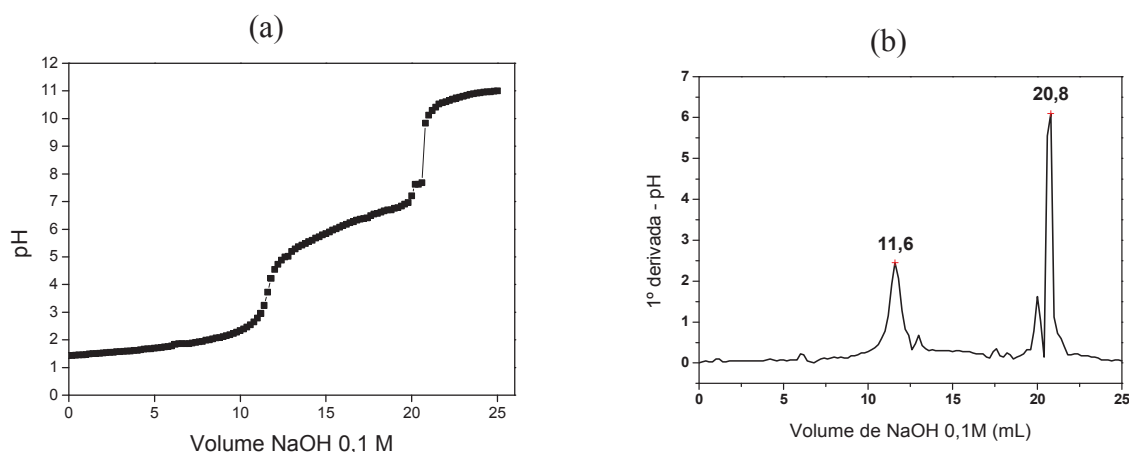


Tabela 3. Condições experimentais para se obter o grau de desacetilação da QS (GD).

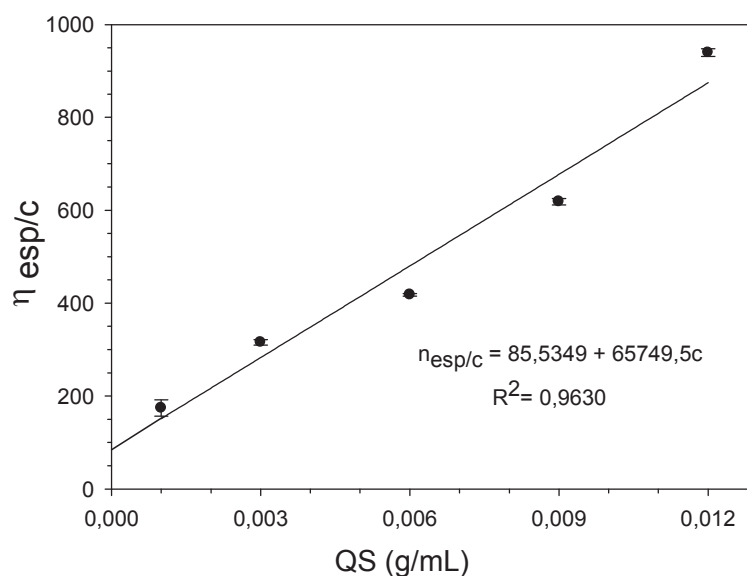
Massa de quitosana (g)	$\Delta (V_2 - V_1)$ (mL)	% GD
0,2000	9,2	74,06
0,2046	8,2	62,95
0,2007	7,8	62,57
Média		66,53
Desvio Padrão		$\pm 6,53$

O grau de desacetilação obtido foi menor que o valor informado pelo fabricante (75-85 %).

5.1.2. Determinação da massa molar da quitosana

A Figura 7 apresenta a relação linear obtida entre a viscosidade reduzida (η_{sp}/c) em função da concentração (c) das soluções das amostras. Obteve-se um coeficiente de ajuste (r^2) igual a 0,9630 (com sistema solvente), demonstrando uma boa linearidade dos dados experimentais obtidos.

Figura 7. Relação linear entre a concentração das soluções de QS (c) e viscosidade reduzida (η_{esp}/c), usada para a determinação da viscosidade intrínseca ($[\eta]$).



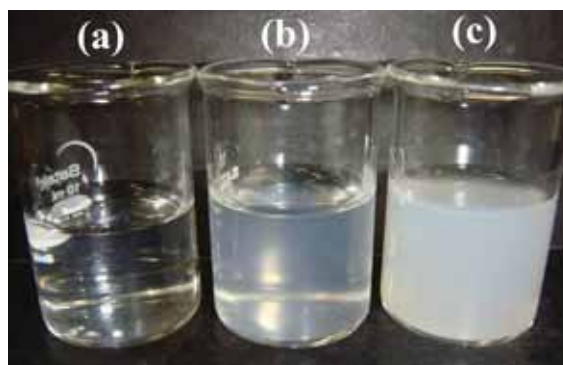
A massa molecular média da QS (M) foi calculada pela equação de Mark-Houwink (eq.5), cujo valor da $[\eta]$ encontrado foi $85,5349 \text{ mL.g}^{-1}$. Os valores de K e α utilizados foram de $1,81 \cdot 10^{-3} \text{ mL.g}^{-1}$ e 0,93, respectivamente, para um sistema solvente constituído de ácido acético 0,1M e cloreto de sódio 0,2M (Roberts; Domszy, 1982). O valor da massa média da QS (M) encontrado foi 106,24 kDa.

5.2. DESENVOLVIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS

5.2.1. Obtenção das NPs

As suspensões de NPs foram formadas através da titulação, por gotejamento, da solução de TPP em dispersões de QS, com auxílio de uma bomba peristáltica e sob lenta agitação mecânica. Foram preparadas 16 amostras com concentrações diferentes de cada componente, as quais foram classificadas visualmente como dispersão transparente - DT (não é possível observar a formação de nenhum precipitado), dispersão opalescente - DO (região de interesse e com maior probabilidade de NP) e agregados - A (região onde se observa uma grande massa precipitada), como pode ser observado na Figura 8.

Figura 8. Imagens representativas dos sistemas classificados como dispersão transparente DT (a), dispersão opalescente DO (b) e agregados A (c).

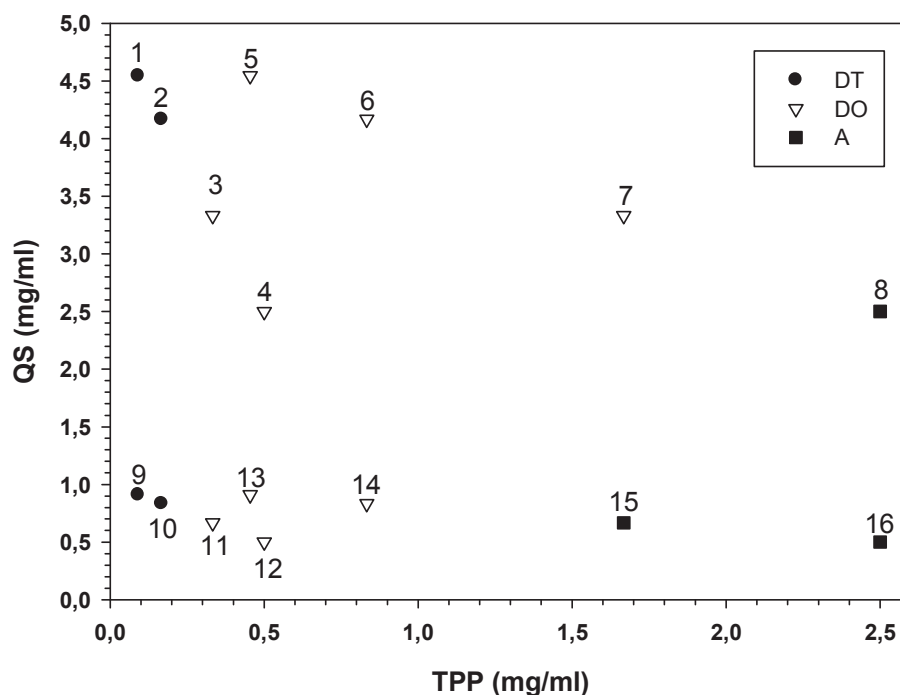


As concentrações e razões de TPP e QS resultantes em cada amostra estão dispostas na Tabela 4. A partir destes dados, foi construído um gráfico de formação das NPs em função da concentração final dos componentes (Figura 9).

Tabela 4. Concentração e razão de QS e de TPP nas amostras finais e suas classificações. (DT) Dispersão Transparente; (DO) Dispersão Opalescente; (A) Agregado.

Amostra	Concentração de QS (mg/mL)	Concentração de TPP (mg/mL)	Razão QS/TPP	Classificação
NP1	4,55	0,091	50:1	DT
NP2	4,17	0,167	25:1	DT
NP3	3,33	0,333	10:1	DO
NP4	2,50	0,500	5:1	DO
NP5	4,55	0,455	10:1	DO
NP6	4,17	0,833	5:1	DO
NP7	3,33	1,667	2:1	DO
NP8	2,50	2,500	1:1	A
NP9	0,91	0,091	10:1	DT
NP10	0,83	0,167	5:1	DO
NP11	0,67	0,333	2:1	DO
NP12	0,50	0,500	1:1	DO
NP13	0,91	0,455	2:1	DO
NP14	0,83	0,833	1:1	DO
NP15	0,67	1,667	0,4:1	A
NP16	0,50	2,500	0,2:1	A

Figura 9. Estudo de formação das NPs em função da concentração final dos componentes. Os números representam as amostras de NPs. (●) Dispersão transparente; (▽) Dispersão opalescente; (■) Agregados.

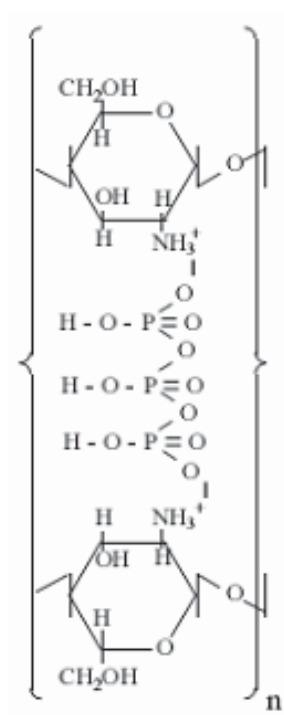


Através dos resultados é possível observar que quando a concentração de TPP é inferior à concentração de QS, há formação de dispersões transparentes, pois não há TPP suficiente para reticular com a QS. À medida que a concentração de TPP aumenta, regiões com maior probabilidade de formação das NPs (DO). Já quando a concentração de TPP é mais elevada, acima de 1,6 mg/mL, ocorre formação de sistemas opacos, devido as agregações das partículas. A zona de DO está associada com as formulações contendo concentração final de QS entre 0,8 e 4,17 mg/ml e concentração final de TPP entre 0,17 e 0,83 mg/ml.

As regiões de formação de partículas podem estar relacionadas às estruturas predominantes encontradas no meio reacional. Quando a concentração do TPP é muito baixa, ocorrem principalmente cadeias distendidas de quitosana. Quando a quantidade de TPP é suficiente para promover o enovelamento das cadeias de QS (Figura 10) ocorre a formação de NPs. E quando a quantidade de TPP é maior do que a quantidade

estequiométrica para neutralização das cargas positivas da cadeia de QS, o excesso de cargas negativas do TPP promove a agregação das nanopartículas, formando-se micropartículas (Silva, 2006b).

Figura 10. Reticulação da quitosana com TPP (Adaptado de Lam et al., 2006).



5.3. CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NPs

5.3.1. Determinação da distribuição granulométrica

A Figura 11 mostra a distribuição granulométrica obtida por espalhamento de luz das suspensões de partículas. Os diâmetros médios obtidos, o grau de polidispersidade, a distribuição granulométrica e as frequências estão apresentadas na Tabela 5.

Figura 11. Distribuição de tamanho das amostras de NP1 a NP16.

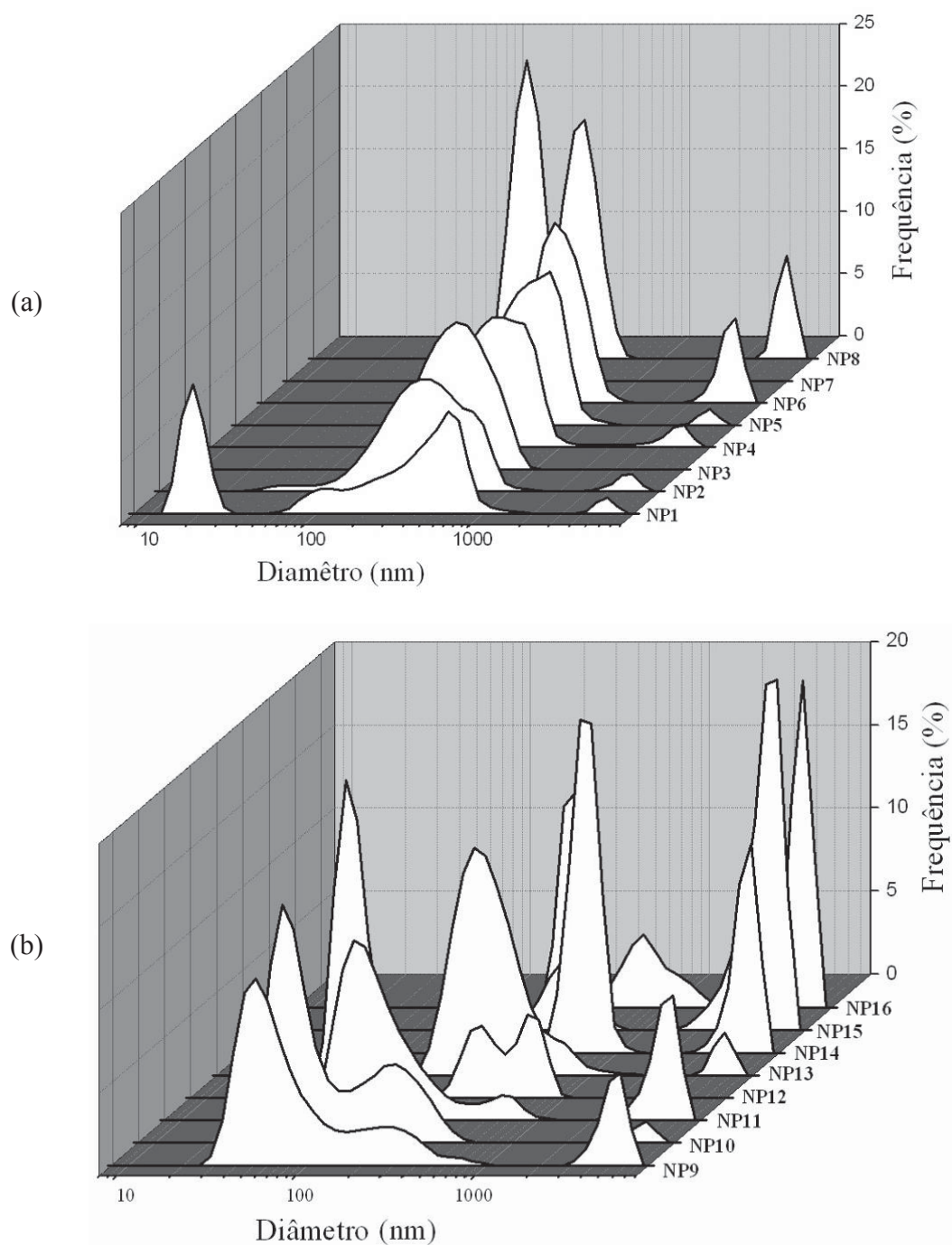


Tabela 5. Diâmetro médio, índice de polidispersidade e distribuição granulométrica com as respectivas frequências das amostras NP1 a NP16.

	Diâmetro médio (nm)	Polidispersidade	Diâmetro médio do 1° pico (nm)	Frequência do 1° pico (%)	Diâmetro médio do 2° pico (nm)	Frequência do 2° pico (%)	Diâmetro médio do 3° pico (nm)	Frequência do 3° pico (%)
NP1	353 ± 91,0	0,529 ± 0,085	398	96,2	3490	3,8	-	-
NP2	270 ± 20,3	0,423 ± 0,040	362	97,5	3150	2,5	-	-
NP3	260 ± 1,70	0,247 ± 0,005	334	100	-	-	-	-
NP4	330 ± 12,9	0,329 ± 0,023	473	97,5	3310	2,5	-	-
NP5	365 ± 3,22	0,332 ± 0,041	458	98,7	3560	1,3	-	-
NP6	896 ± 160	0,583 ± 0,136	518	87,8	3360	12,2	-	-
NP7	751 ± 145	0,761 ± 0,114	220	100	-	-	-	-
NP8	815 ± 162	0,655 ± 0,024	322	90,9	3640	9,1	-	-
NP9	304 ± 62,6	0,702 ± 0,190	168	67,6	3310	32,4	-	-
NP10	179 ± 19,4	0,372 ± 0,083	212	77,7	66,7	20	3530	2,2
NP11	202 ± 3,71	0,537 ± 0,035	153	76,4	3300	16,7	1870	6,9
NP12	1120 ± 220	0,886 ± 0,092	432	63,5	70,5	36,5	-	-
NP13	318 ± 14,7	0,391 ± 0,039	262	93,3	666	4,6	3610	2,1
NP14	2390 ± 509	0,695 ± 0,093	2030	77,5	2050	22,5	-	-
NP15	1740 ± 801	0,760 ± 0,361	2760	70,5	1900	29,5	-	-
NP16	4030 ± 860	0,730 ± 0,239	2230	76	2010	24	-	-

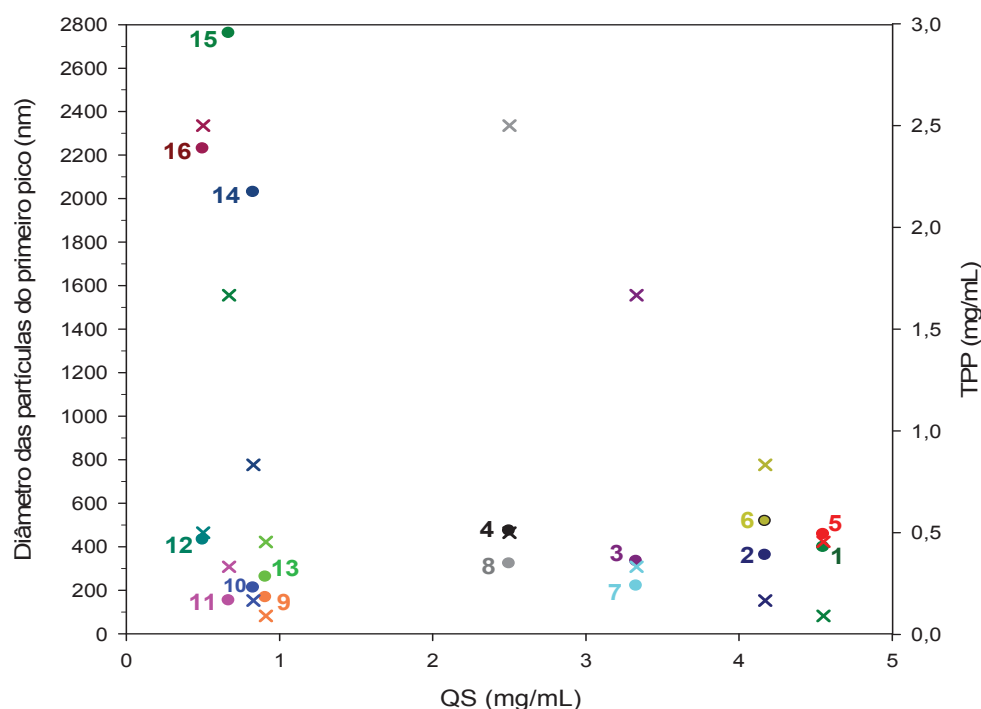
É possível observar nas Figuras 10a e 10b que as únicas amostras monodispersas são as NP3 e NP7. A amostra NP3 foi caracterizada como DO, e seu diâmetro médio foi $260 \pm 1,70$ nm. O diâmetro médio da NP7 possui um desvio padrão muito alto (Tabela 5) e houve formação de aglomerados, por isto, foi descartada para incorporação do AZT. O mesmo ocorreu para as amostras NP8, NP15 e NP16. Para as amostras restantes pode ser observada uma distribuição polimodal, porém há o predomínio de uma população de partículas, como pode ser observado na frequência do primeiro pico (Tabela 5).

Nas amostras NP1 e NP9 foi verificada uma alta frequência (96,2 %) na formação de NPs com diâmetro médio de 398 nm, já para a amostra NP9 a polidispersidade foi muito alta (0,702), provavelmente devido a utilização de baixas concentrações de QS em relação ao TPP, observando-se a presença de 32,4 % de partículas com diâmetro médio de 3310 nm. As amostras NP2, NP3, NP4, NP5, NP10 e NP13 obtiveram menor índice de polidispersidade e menor diâmetro médio.

Já as amostras classificadas como agregados apresentaram diâmetro médio entre 751 a 4030 nm (Tabela 5). Analisando o diâmetro do primeiro pico das amostras NP7 e NP8 (Tabela 5), observa-se que mais de 90% das partículas formadas apresentaram um diâmetro de 220 e 322 nm, respectivamente; enquanto que a NP15 e NP16 possuem diâmetros acima de 2 μ m. Isso pode ter ocorrido devido a NP7 e NP8 apresentarem uma maior quantidade de QS em relação ao TPP, do que NP15 e NP16, restando no meio menor quantidade de cargas negativas de TPP, responsáveis pela agregação das nanopartículas.

A Figura 12 mostra o gráfico relacionando as concentrações de QS e TPP com o diâmetro das partículas situadas na região do primeiro pico da distribuição granulométrica, em que a frequência de formação de NPs é mais intensa. Observa-se que quanto menor a concentração de QS e maior a de TPP (NP14, NP15 e NP16) maior é o diâmetro das NPs.

Figura 12. Concentração de QS (mg/mL) *versus* diâmetro (nm) das partículas NP1 a NP16 *versus* concentração de TPP (mg/mL). (●) Diâmetro; (×) Concentração de TPP. As cores representam as mesmas amostras.



5.3.2. Determinação do potencial zeta

A maioria das partículas adquire uma carga elétrica de superfície quando posta em contato com um meio aquoso (Aulton, 2005). O potencial zeta (ζ) reflete esse potencial de superfície, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (Schaffazick et al., 2003).

A determinação do potencial zeta pode também prever a interação das partículas com as membranas biológicas (Schaffazick et al., 2003). Para interação com a mucosa nasal, o interessante é ter partículas com carga de superfície positiva, uma vez que a mucina, glicoproteína do muco, possui grupos siálicos de carga negativa.

A Tabela 6 apresenta o potencial zeta (ζ) das amostras de NP1 a NP16.

Tabela 6. Potencial zeta (ζ) das suspensões de NPs sem fármaco.

Amostras sem AZT	ζ (mV)
NP1	45,4 $\pm$ 1,3
NP2	44,4 $\pm$ 1,4
NP3	44,6 $\pm$ 0,3
NP4	39,5 $\pm$ 0,5
NP5	47,9 $\pm$ 1,7
NP6	39,6 $\pm$ 0,4
NP7	16,7 $\pm$ 5,7
NP8	3,09 $\pm$ 0,5
NP9	34,8 $\pm$ 2,1
NP10	35,0 $\pm$ 0,6
NP11	19,9 $\pm$ 1,0
NP12	18,1 $\pm$ 0,3
NP13	21,5 $\pm$ 1,5
NP14	17,8 $\pm$ 1,3
NP15	1,64 $\pm$ 0,74
NP16	-5,15 $\pm$ 1,3

O potencial zeta das formulações sem o fármaco variou de + 47,9 a -5,15 mV. Quanto maior a concentração de QS nas amostras, mais positiva é a superfície das partículas e quanto maior a quantidade TPP, menor é o potencial zeta, conseqüentemente mais negativa é a superfície da partícula. As amostras escolhidas para incorporação do AZT apresentaram um alto e positivo valor de potencial zeta, devido à necessidade de interação das NPs com o muco da cavidade nasal.

5.3.3. Seleção das amostras para incorporação do AZT

As amostras NP2, NP3, NP4, NP5, NP10 e NP13 apresentaram os melhores resultados de distribuição granulométrica e potencial zeta, portanto foram escolhidas para incorporação do AZT. A nomenclatura de todas as amostras selecionadas para incorporação do fármaco, juntamente com suas respectivas concentrações de AZT estão presentes na Tabela 7.

Tabela 7. Nomenclatura e concentração de AZT de todas as formulações de NPs. C: concentração

Nomenclatura das amostras sem AZT	C de AZT (mg/mL) no TPP	C de AZT (mg/mL) na suspensão de NPs	Nomenclatura das amostras com AZT
NP2	7,5	1,25	NP2_A7,5
NP3	3,75	1,25	NP3_A3,75
NP3	5	2,5	NP3_A5
NP3	7,5	3,75	NP3_A7,5
NP3	10	5	NP3_A10
NP3	12,5	6,25	NP3_A12,5
NP3	15	3,33	NP3_A15
NP4	2,5	1,25	NP4_A2,5
NP4	5	2,5	NP4_A5
NP4	7,5	3,75	NP4_A7,5
NP4	10	5	NP4_A10
NP4	12,5	6,25	NP4_A12,5
NP5	13,75	1,25	NP5_A13,75
NP10	7,5	1,25	NP10_A7,5
NP13	13,75	1,25	NP13_A13,75

A Tabela 8 contém os valores de potencial zeta das amostras com AZT. Na Tabela 9 são apresentados os valores de diâmetro médio, índice de polidispersidade, distribuição

granulométrica e frequências das amostras com fármaco e a Figura 13 representa o gráfico de distribuição granulométrica destas amostras.

Tabela 8. Potencial zeta (ζ) das suspensões de NPs com fármaco.

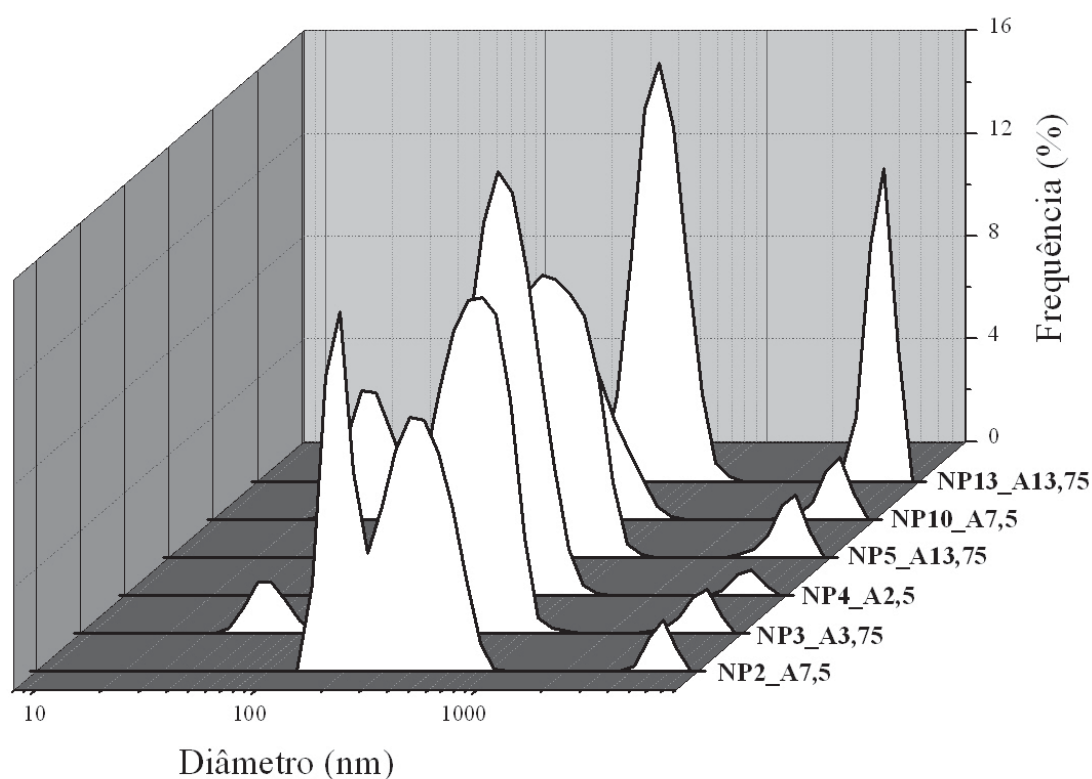
Amostras com AZT	ζ (mV)
NP2_A7,5	$47,2 \pm 1,9$
NP3_A3,75	$44,4 \pm 1,1$
NP4_A2,5	$48,7 \pm 11,7$
NP5_A13,75	$42,0 \pm 1,7$
NP10_A7,5	$31,7 \pm 1,2$
NP13_A13,75	$17,0 \pm 1,1$

A comparação entre o potencial zeta das NPs com e sem fármaco (Tabela 6 e 8) foi realizada pela análise de variância (ANOVA) fator único, através da comparação do valor p , o qual deve ser menor que 0,05 para a diferença entre as amostras serem consideradas estatisticamente significativas. Esta análise mostrou que a incorporação do AZT não alterou significativamente o potencial zeta das partículas ($p = 0,96$).

Tabela 9. Diâmetro médio e índice de polidispersidade, distribuição granulométrica e frequências das NPs com fármaco.

	Diâmetro médio (nm)	Polidispersidade	Diâmetro médio do 1° pico (nm)	Frequência do 1° pico (%)	Diâmetro médio do 2° pico (nm)	Frequência do 2° pico (%)	Diâmetro médio do 3° pico (nm)	Frequência do 3° pico (%)
NP2_A7,5	676 ± 323	0,627 ± 0,160	328	97,9	1800	2,1	-	-
NP3_A3,75	406 ± 14,0	0,390 ± 0,039	456	95,5	1630	4,0	1830	0,5
NP4_A2,5	425 ± 14,5	0,381 ± 0,014	414	98,7	1730	1,3	-	-
NP5_A13,75	329 ± 11,3	0,299 ± 0,056	385	96,5	4920	3,5	-	-
NP10_A7,5	254 ± 9,74	0,337 ± 0,006	291	93,6	3360	4,6	1750	1,8
NP13_A13,75	1820 ± 496	0,834 ± 0,099	553	79,2	3470	20,8	-	-

Figura 13. Distribuição de tamanho das NPs com fármaco.



Comparando-se os resultados das Tabelas 5 e 9, observa-se que as amostras incorporadas com AZT apresentaram um aumento no tamanho de partícula. Analisando o diâmetro do primeiro pico para todas as amostras em que há formação de mais de 79% das partículas, é possível observar através da análise estatística (ANOVA), que os diâmetros não possuem uma diferença significativa ($p = 0,47$).

5.3.4. pH das suspensões de NPs

Os valores de pH foram obtidos para as suspensões de NPs, com e sem fármaco, e estão dispostos na Tabela 10.

Tabela 10. Valores de pH das suspensões de NPs com e sem fármaco.

Amostras sem AZT	pH	Amostras com AZT	pH
NP1	4,83	-	-
NP2	4,81	NP2_A7,5	4,91
NP3	4,85	NP3_A3,75	4,85
NP4	4,92	NP4_A2,5	4,95
NP5	4,84	NP5_A13,75	4,87
NP6	4,93	-	-
NP7	5,23	-	-
NP8	5,89	-	-
NP9	4,80	-	-
NP10	4,81	NP10_A7,5	4,97
NP11	4,90	-	-
NP12	4,97	-	-
NP13	4,87	NP13_A13,75	4,93
NP14	4,95	-	-
NP15	5,27	-	-
NP16	5,94	-	-

Através desses resultados foi observado que o valor de pH das amostras aumenta em relação a quantidade de TPP. Isso ocorre devido a solução de TPP 0,1 e 0,5% apresentarem valores de pH iguais a 8,17 e 8,98, respectivamente, enquanto que o valor de pH das dispersões de QS 0,1 e 0,5 % é 4,8.

A análise estatística mostra que valores de pH das suspensões de NPs com e sem o fármaco possuem diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Logo, a incorporação do AZT provocou um leve aumento do pH das suspensões de NPs.

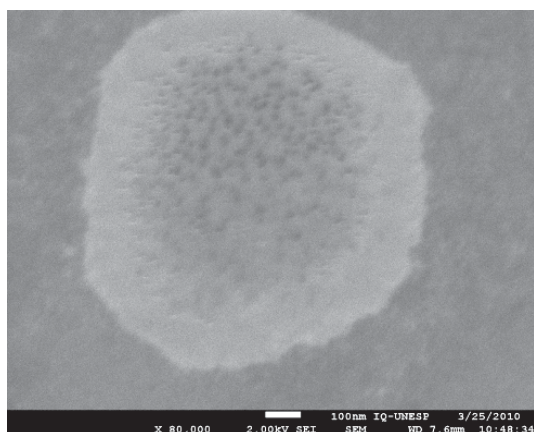
5.3.5. Análise morfológica das NPs

Dentre as amostras selecionadas para incorporação do fármaco, a NP3 e a NP4 foram as formulações que apresentaram os melhores resultados de tamanho de partícula, índice de polidispersidade e potencial zeta, com e sem AZT, portanto foram escolhidas para este estudo.

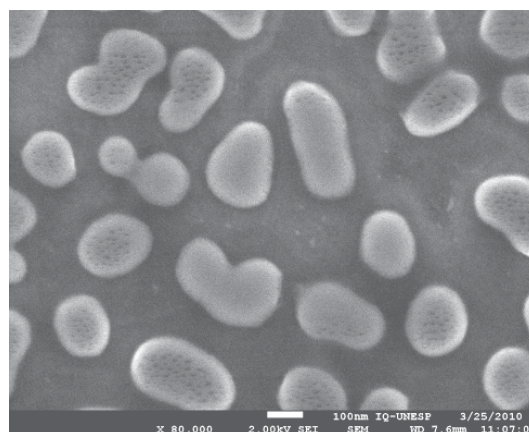
A figura 14 apresenta as fotomicrografias obtidas por MEV das amostras NP3 e NP4, com e sem fármaco. As NPs apresentam-se como estruturas sólidas, esféricas ou ligeiramente ovaladas, com superfície aparentemente porosa e rugosa.

Figura 14. Fotomicrografias das amostras NP3 e NP4, com e sem fármaco, obtidas por MEV. (a) NP3 e (b) NP3_A15 no aumento de 80.000x. (c) NP4 e (d) NP4_A10 no aumento de 50.000x.

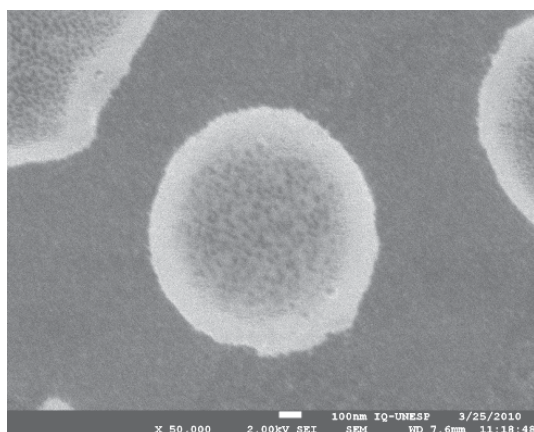
(a) NP3



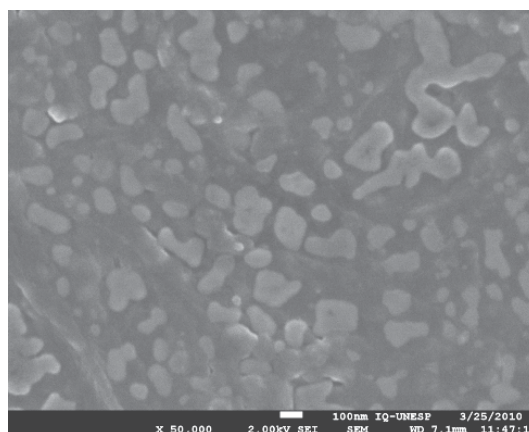
(b) NP3_A15



(c) NP4

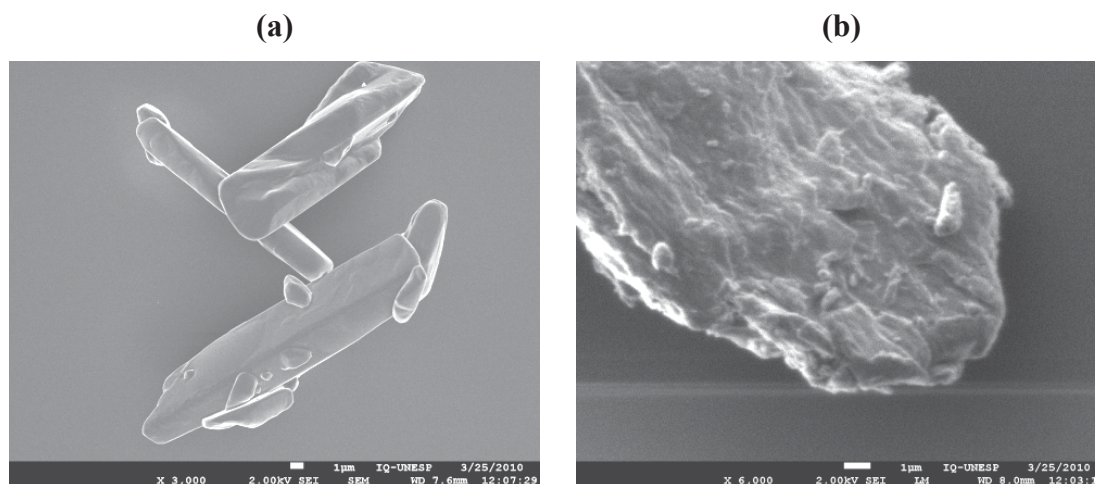


(d) NP4_A10



Também foi analisada a morfologia do fármaco e do constituinte principal das NPs. As imagens revelam que o AZT possui forma cristalina (Figura 15 - a) e a QS apresenta-se amorfa (Figura 15 - b).

Figura 15. Fotomicrografias obtidas por MEV, (a) AZT utilizando um aumento de 3.000x e (b) quitosana no aumento de 6.000x.



5.4. CARACTERIZAÇÃO DAS NPs LIOFILIZADAS

Para verificar se o processo de liofilização influencia nas características das NPs, ou seja, no tamanho de partícula, na carga de superfície e morfologia, novas análises de distribuição granulométrica, potencial zeta e morfologia foram realizadas após a reconstituição das NPs liofilizadas.

As amostras NP3 e NP4 foram selecionadas para realização destes estudos, pois apresentaram os melhores resultados de tamanho de partícula, índice de polidispersidade e potencial zeta, com e sem AZT. As concentrações de AZT incorporadas em cada amostra estão presentes na Tabela 7.

5.4.1. Determinação da distribuição granulométrica

A distribuição granulométrica e o índice de polidispersidade das amostras de NPs liofilizadas estão presentes na Tabela 11. Comparando-se as Tabelas 9 e 11 é possível verificar que o processo de liofilização não alterou significativamente o

tamanho das partículas. Porém, as amostras liofilizadas tiveram que passar por um processo intenso (sonicação e filtração) para poderem ser analisadas e obtida a qualidade de análise necessária determinada pelo equipamento (dados não mostrados). Possivelmente as amostras liofilizadas se agregaram. Para confirmar esta hipótese foi realizada análises de MEV (Figura 16).

Tabela 11. Diâmetro médio, índice de polidispersidade, distribuição granulométrica com as respectivas frequências das amostras liofilizadas NP3 e NP4 com fármaco.

	Diâmetro médio (nm)	Polidispersidade	Diâmetro médio do 1° pico (nm)	Frequência do 1° pico (%)	Diâmetro médio do 2° pico (nm)	Frequência do 2° pico (%)	Diâmetro médio do 3° pico (nm)	Frequência do 3° pico (%)
NP3_A5	268,8 ± 2,68	0,249 ± 0,015	339 ± 16,49	99,68	986 ± 2205	0,32	-	-
NP3_A7,5	225,2 ± 1,79	0,214 ± 0,009	282,2 ± 9,01	99,78	1018 ± 2276	0,22	-	-
NP3_A10	271,8 ± 5,0	0,250 ± 0,019	325 ± 12,11	98,32	3980 ± 2243	1,68	-	-
NP3_A12,5	393,6 ± 12,9	0,325 ± 0,039	587 ± 40,48	97,18	1013 ± 2161	2,22	970 ± 2169	0,3
NP4_A5	274,4 ± 2,88	0,176 ± 0,005	339,2 ± 4,15	100	-	-	-	-
NP4_A7,5	282,8 ± 19,8	0,210 ± 0,083	312,4 ± 49,56	99,32	16,26 ± 36,36	0,68	-	-
NP4_A10	266,4 ± 17,6	0,223 ± 0,030	337,4 ± 27,43	98,6	1830 ± 2479	1,4	-	-
NP4_A12,5	274,8 ± 49,3	0,286 ± 0,130	266,2 ± 49,27	98,64	26,08 ± 35,74	0,88	1002 ± 2241	0,48

5.4.2. Determinação do potencial zeta

O potencial zeta obtido das amostras de NPs após o processo de liofilização está presente na Tabela 12.

Tabela 12. Potencial zeta das amostras NP3 e NP4 com e sem fármaco, após o processo de liofilização.

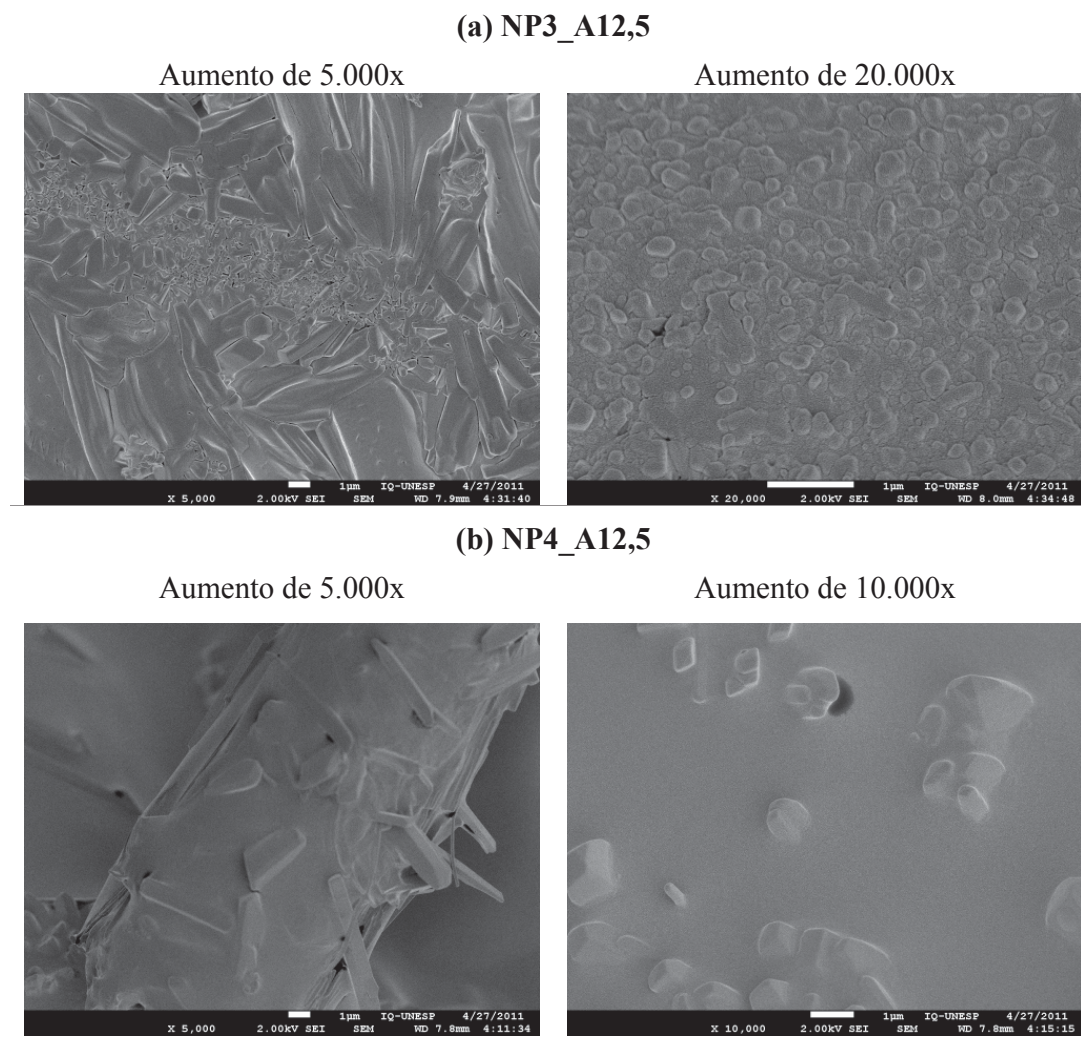
Amostras	Potencial zeta (mV)	Desvio Padrão	Coefficiente de variação
NP3_A5	1,96	$\pm 0,26$	13,29
NP3_A7,5	-1,44	$\pm 0,32$	21,88
NP3_A10	4,37	$\pm 0,52$	11,94
NP3_A12,5	2,64	0,29	11,04
NP4_A5	3,40	$\pm 1,97$	58,13
NP4_A7,5	3,98	$\pm 2,87$	72,20
NP4_A10	1,06	$\pm 0,43$	40,83
NP4_A12,5	1,61	$\pm 0,66$	41,05

Comparando-se as Tabela 8 e 12 foi possível verificar que o processo de liofilização alterou significativamente a carga elétrica de superfície das formulações, sendo que as amostras liofilizadas apresentaram uma redução no valor do potencial zeta.

5.4.3. Análise morfológica das nanopartículas

A Figura 16 contém as fotomicrografias obtidas por MEV das amostras NP3_A12,5 e NP4_A12,5 após o processo de liofilização. Comparando-se as amostras antes (Figura 14) e após a liofilização, verifica-se que as NPs se aglomeram formando uma massa sólida com AZT não encapsulado, constatando que este processo alterou a morfologia das NPs.

Figura 16. Fotomicrografias das amostras NP3_A12,5 (a) e NP4_A12,5 (b), obtidas por MEV.



Através dos resultados de potencial zeta e MEV, constatam-se que a liofilização altera significativamente a estrutura das NPs, sendo utilizada neste trabalho apenas para realizar os testes de mucoadesão, no qual foi necessário obter-se as NPs na forma de pó, para comparação com os padrões mucoadesivos.

5.5. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DA ZIDOVUDINA

5.5.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do AZT por espectroscopia UV.

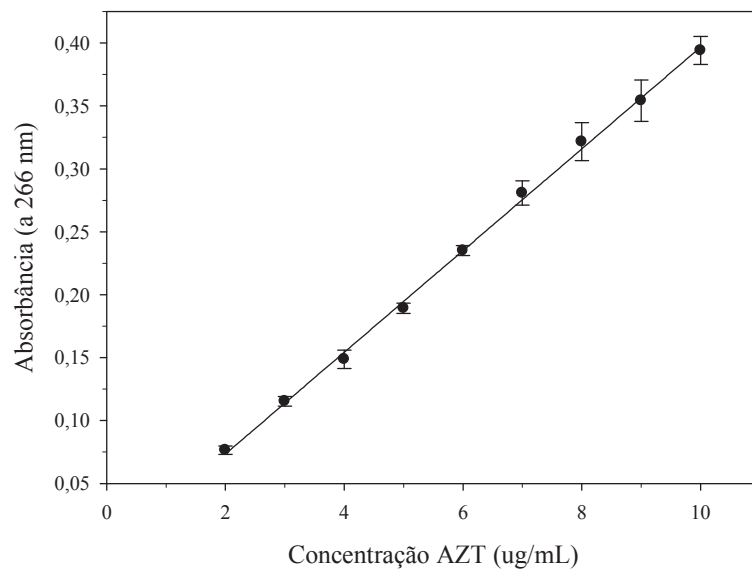
A validação do método para quantificação de AZT nos ensaios de incorporação foi realizada segundo os parâmetros estipulados pela Anvisa (2003), para verificar se este método apresenta linearidade na faixa de concentração utilizada, especificidade, precisão e exatidão.

A partir das leituras das soluções padrão de AZT obtiveram-se os valores absorvância (A) dispostos na Tabela 12. Elaborou-se o gráfico (Figura 17) de concentração de AZT *versus* A e calculou-se a regressão linear e a equação da reta, a qual foi $y = 0,04041x - 0,0074414$. A linearidade do método pode ser evidenciada pelo coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,9985, calculado através da regressão linear.

Tabela 13. Concentrações das soluções padrão e os respectivos valores de absorvância (A) obtidos por espectrofotometria no comprimento de onda de 266 nm (n=3).

Concentração de AZT ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	A	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)
2	0,0764	0,0034	4,44
3	0,1152	0,0038	3,33
4	0,1486	0,0073	4,93
5	0,1892	0,0040	2,12
6	0,2351	0,0040	1,69
7	0,2808	0,0096	3,41
8	0,3215	0,0150	4,67
9	0,3541	0,0165	4,67
10	0,3941	0,0112	2,85

Figura 17. Curva analítica do AZT, obtida por espectroscopia UV em 266 nm (n=3). Regressão linear representada por $y = 0,04041x - 0,0074414$, e coeficiente de determinação $r^2 = 0,9985$.



A especificidade do método foi demonstrada através dos espectros de absorção do UV representados nas Figuras 18, 19, 20 e 21, que mostram que apenas o fármaco absorve no comprimento de onda de 266 nm.

Figura 18. Espectro de absorção do UV da solução padrão de AZT (10 µg/mL) em água.

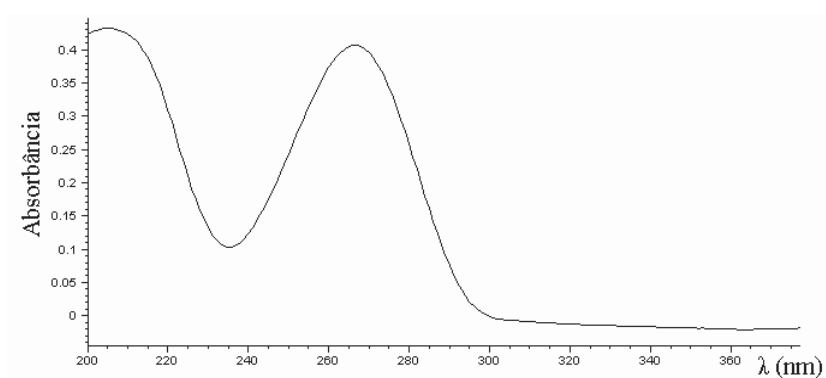


Figura 19. Espectro de absorção do UV do sobrenadante da formulação NP3_A7,5.

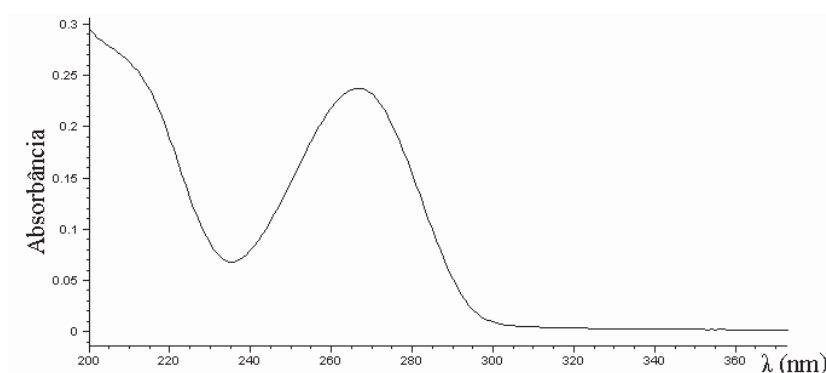


Figura 20. Espectro de absorção do UV da dispersão de QS 0,5% (m/v).

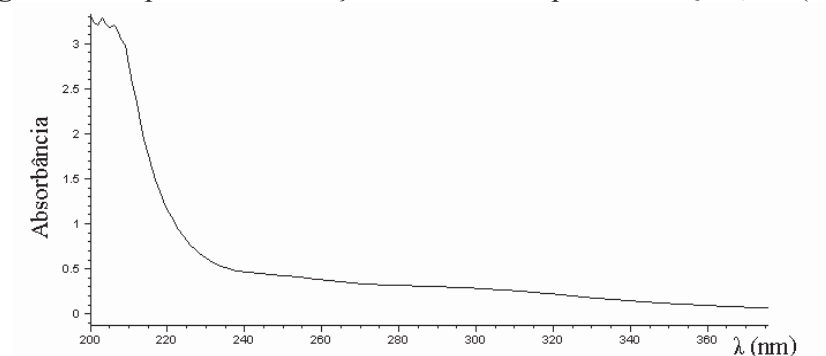
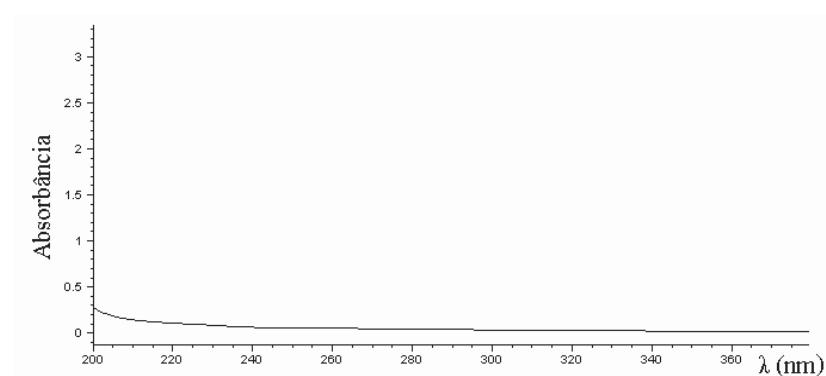


Figura 21. Espectro de absorção do UV da solução de TPP 0,1% (m/v).



A precisão representa a variabilidade dos resultados em séries repetidas de análises, sob as mesmas condições experimentais e é expressa pelo coeficiente de variação (CV) e testada através da análise de soluções padrões de AZT em triplicata, em concentrações

baixa, media e alta, dentro da faixa de concentração da curva analítica. A exatidão é a proximidade dos resultados da quantificação do fármaco na metodologia testada comparada com a concentração conhecida, é expressa como a porcentagem de recuperação, determinada pela equação 7. Os resultados dos cálculos de CV e de porcentagem de recuperação estão presentes na Tabela 14. Eles indicam que o método é preciso, pois os valores de CV são inferiores a 5 %, e também exatos, pois a recuperação está dentro da faixa limite (80 – 120 %) preconizada pela Anvisa (2003).

$$Exatidão = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{eq. 7})$$

Tabela 14. Cálculo dos parâmetros estatísticos da precisão e exatidão, intra-dia e inter-dia, para validação do método de quantificação do AZT por espectroscopia UV.

	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração determinada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Desvio Padrão	CV%	Recuperação (%)
Intra-dia	2	2,04	0,0409	2,00	102,21
	5	4,84	0,0157	0,33	96,71
	10	9,84	0,2066	2,00	98,41
Inter-dia	2	2,01	0,0263	1,31	100,74
	5	4,79	0,0347	0,72	95,85
	10	9,90	0,1840	1,86	99,02

O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), calculados a partir das equações 8 e 9, respectivamente, apresentaram valores iguais a $0,024 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para LD, e $0,080 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para LQ. Acima destes valores o método é preciso e exato.

$$LD = (DP_a/IC) \times 3 \quad (\text{eq. 8})$$

$$LQ = (DP_a/IC) \times 10 \quad (\text{eq. 9})$$

Em que DP_a é o desvio padrão do intercepto-y das equações das regressões lineares obtidas a partir de três curvas analíticas, e IC é a média da inclinação das mesmas (Anvisa, 2003).

5.5.2. Determinação do AZT incorporado nas NPs

A partir da equação da reta, calculou-se a concentração de AZT nas NPs, e através da equação 6, calculou-se a quantidade de AZT encapsulada e sua eficiência de encapsulação (EE %), relacionadas na Tabela 15. As Figuras 22 e 23 relacionam a massa encapsulada de AZT nas NPs com a concentração solubilizada de AZT na solução de TPP e EE % com concentração de AZT adicionada, respectivamente.

Tabela 15. Quantidade de AZT encapsulado nas NPs e eficiência de encapsulação (EE %) em relação à solução de TPP (volume de 15mL). CV: coeficiente de variação.

	Encapsulação do AZT nas NPs		
	Quantidade de AZT encapsulada ($\mu\text{g/mL}$)	EE % (em relação ao volume de TPP)	CV%
NP3_A5	550,78 $\pm$ 102,77	11,02 $\pm$ 2,05	18,65
NP3_A7,5	561,61 $\pm$ 91,51	7,49 $\pm$ 1,22	16,30
NP3_A10	589,67 $\pm$ 74,47	5,90 $\pm$ 0,74	12,63
NP3_A12,5	556,59 $\pm$ 116,63	4,45 $\pm$ 0,93	20,95
NP4_A5	878,76 $\pm$ 74,20	17,58 $\pm$ 1,48	8,44
NP4_A7,5	893,02 $\pm$ 15,86	11,91 $\pm$ 0,21	1,78
NP4_A10	1000,48 $\pm$ 34,43	10,01 $\pm$ 0,34	3,44
NP4_A12,5	1068,52 $\pm$ 50,73	8,55 $\pm$ 0,41	4,75

Figura 22. Relação entre a quantidade de AZT encapsulado nas NPs ($\mu\text{g/mL}$) e a concentração de AZT solubilizado na solução de TPP (mg/mL).

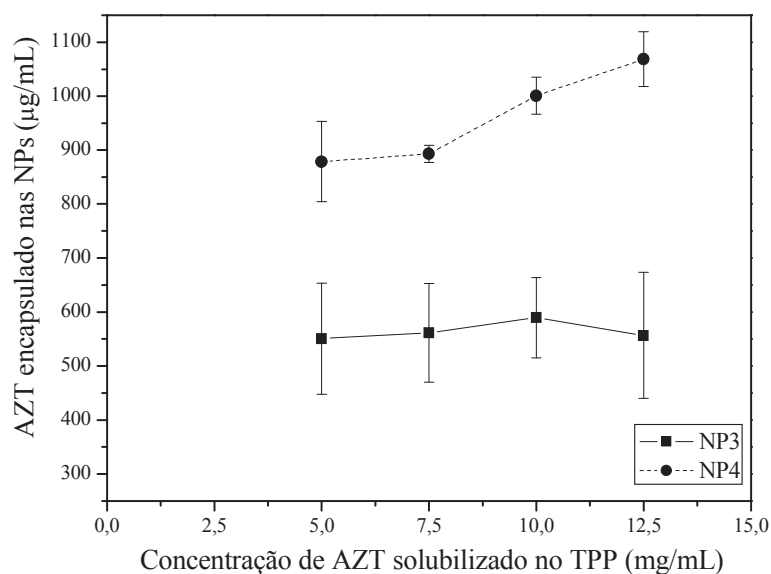
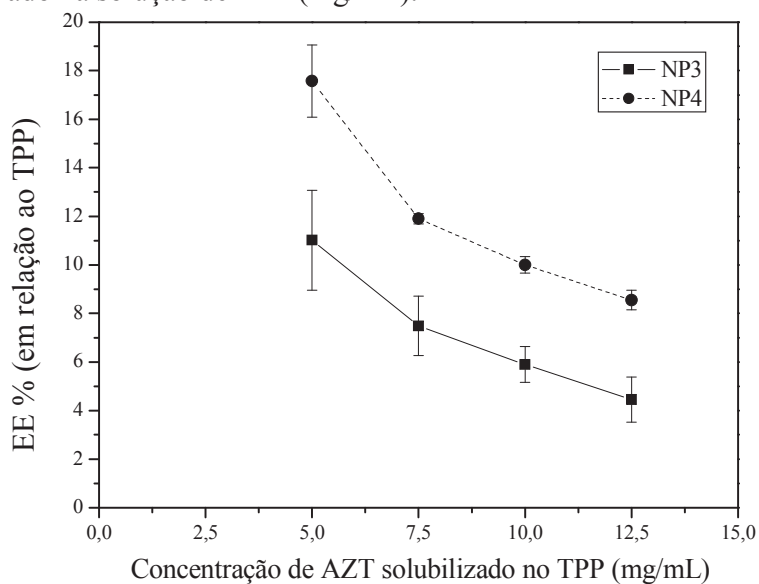


Figura 23. Relação entre EE do AZT nas NPs (em relação ao TPP) com a concentração de AZT solubilizado na solução de TPP (mg/mL).



A análise estatística mostra que os valores de quantidade encapsulada de AZT entre todas as formulações NP3 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas,

mostrando que o aumento da quantidade de AZT adicionada, não influenciou a massa de fármaco encapsulado. Analisando as amostras NP4, observa-se que com aumento da concentração de AZT solubilizado no TPP, ocorre um aumento na massa encapsulada nas NPs, sendo que a amostra NP4_A12,5, estatisticamente, é maior que a NP4_A7,5 e NP4_A5 e igual a NP4_A10. As amostras NP4_A10, NP4_A7,5 e NP4_A5 não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Comparando-se as amostras NP3 e NP4, verifica-se que a NP4 encapsulou mais que a NP3 e obteve maior EE %, em todas as concentrações de fármaco avaliadas.

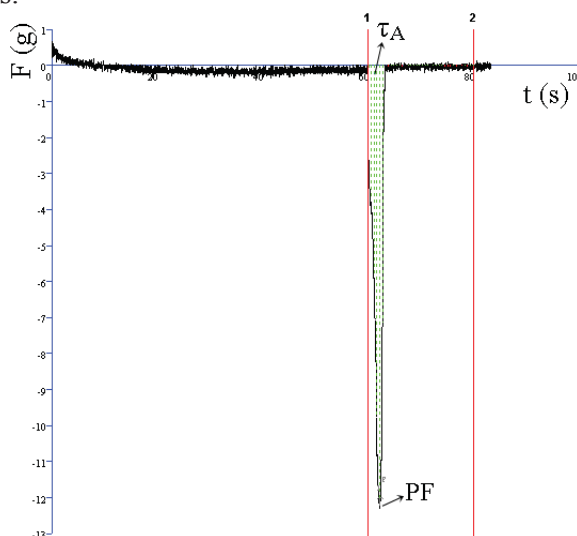
Analisando a EE % é possível observar que quanto maior foi a quantidade de fármaco adicionada, menor foi sua EE % nas duas amostras (NP3 e NP4). Este fato pode ser explicado devido ao AZT ficar protonado em meio ácido ($pK_a = 9$) e competir com a quitosana pela reticulação com TPP.

Como o fármaco foi solubilizado na solução de TPP, a quantidade de fármaco incorporada foi limitada pela sua solubilidade nesta solução, e deste modo, não foi possível verificar a saturação do fármaco no sistema, ou seja, a quantidade máxima de fármaco que pode ser encapsulada nas NPs.

5.6. AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE DE MUCOADESÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Os parâmetros utilizados na medida da mucoadesão foram o pico de força (PF) e o trabalho de adesão (τ_A), calculados a partir da área sob a curva determinada durante a fase de retirada da prova. A Figura 24 mostra a curva obtida nos ensaios, as âncoras 1 e 2 delimitam a área sob a curva calculada, indicando o de trabalho de adesão (τ_A) e o pico de força (PF).

Figura 24. Curva força (g) *versus* tempo (s) representativa das amostras de NPs e dos padrões mucoadesivos.



5.6.1. Mucoadesão das NPs secas

Os valores de trabalho de adesão (τ_A) obtidos para as NPs secas estão presentes nas Tabelas 16.

Tabela 16. Valores do trabalho de adesão (N.s) das amostras de NPs secas, utilizando mucosa nasal suína, no tempo de contato de 60 segundos. O número de replicatas foi igual a 5.

Amostras	Trabalho de adesão	
	Média (N.s)	CV (%)
NP3	0,111 ± 0,010	9,26
NP3_A7,5	0,115 ± 0,010	8,61
NP3_A15	0,104 ± 0,011	10,89
NP4	0,099 ± 0,007	7,32
NP4_A5	0,095 ± 0,013	13,25
NP4_A10	0,109 ± 0,007	6,83
Prova	0,059 ± 0,007	11,64

O coeficiente de variação pode ser explicado pela diferença na superfície da mucosa nasal, que pelo fato de ser um material biológico, nem sempre se apresenta homogênea, modificando o valor de trabalho de adesão. Além disso, a amostra utilizada continha uma quantidade muito pequena de NPs, em torno de 0,2 mg, o que pode ter desfavorecido o seu intumescimento quando em contato com a mucosa.

Os resultados mostraram que os valores de τ_A calculados entre as amostras e a prova apresentam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$). Para verificar quais formulações apresentaram diferenças, foi utilizado o teste de Tukey. Todas as amostras de NPs apresentaram diferenças estatisticamente significativas comparadas com a prova sem a amostra (aderência inespecífica), ou seja, apresentaram maior força adesiva, concluindo que as NPs são sistemas potenciais mucoadesivos.

Como a amostra utilizada apresentava uma quantidade de NPs muito pequena, estas análises foram repetidas com as amostras liofilizadas, a fim de favorecer o intumescimento das NPs com a mucosa.

5.6.2. Mucoadesão dos padrões mucoadesivos

Foram analisados polímeros, conhecidos na literatura por sua mucoadesão, como padrões mucoadesivos, entre eles o policarbofil (PC), carbopol 971 (C971) e carbopol 974 (C974), na forma compacta e em pó. Os valores de trabalho de adesão (τ_A) e de PF estão presentes nas Tabelas 17 e 18 e representados nas Figuras 25, 26 e 27. Estes padrões mucoadesivos foram construídos para comparação com as amostras de NPs liofilizadas.

Tabela 17. Valores do trabalho de adesão (g.s) obtido nas medidas de mucoadesão dos polímeros: policarbofil (PC), carbopol 971 (C971) e carbopol 974 (C974).

Amostras		Trabalho de adesão (g.s)					
		Mucina			Mucosa		
		30 s	60 s	120 s	30 s	60 s	120 s
PC compacto	Média (g.s)	1,64	2,11	1,94	4,65	5,97	21,61
	DP	±0,13	±0,21	±0,23	±0,77	±2,79	±5,36
	CV %	8,04	9,88	11,20	16,62	46,71	24,80
PC Pó	Média (g.s)	1,75	1,96	2,40	3,56	2,92	3,07
	DP	±0,22	±0,26	±0,33	±0,49	±0,19	±0,43
	CV %	12,48	13,31	13,73	13,76	6,36	14,01
C971 compacto	Média (g.s)	1,94	1,90	2,10	19,30	29,14	67,25
	DP	±0,28	±0,27	±0,23	±11,40	±9,24	±9,11
	CV %	14,52	14,32	11,16	59,09	31,72	28,42
C971 Pó	Média (g.s)	2,30	2,15	2,05	3,02	2,75	3,35
	DP	±0,24	±0,28	±0,40	±0,35	±0,18	±0,64
	CV %	10,33	12,87	19,59	11,47	5,57	19,16
C974 compacto	Média (g.s)	2,05	1,83	2,19	17,57	19,51	66,90
	DP	±0,21	±0,18	±0,36	±3,61	±5,10	±13,22
	CV %	-0,21	10,03	16,62	20,57	26,16	19,76
C974 Pó	Média (g.s)	1,78	1,92	2,13	3,16	2,91	3,71
	DP	±0,17	±0,22	±0,24	±0,38	±0,35	±0,70
	CV %	9,35	11,50	11,05	11,88	11,98	18,89

Tabela 18. Valores do pico de força (g) obtido nas medidas de mucoadesão dos polímeros: policarbofil (PC), carbopol 971 (C971) e carbopol 974 (C974).

Amostras		Pico de Força (g)					
		Mucina			Mucosa		
		30 s	60 s	120 s	30 s	60 s	120 s
PC compacto	Média (g.s)	0,87	1,09	1,40	3,02	4,47	6,97
	DP	±0,09	±0,11	±0,12	±0,42	±1,55	±1,47
	CV %	10,72	10,17	8,27	14,04	34,54	21,15
PC Pó	Média (g.s)	1,09	1,23	1,17	0,97	0,99	1,17
	DP	±0,16	±0,16	±0,26	±0,09	±0,09	±0,22
	CV %	14,43	12,73	22,13	9,45	9,35	18,45
C971 compacto	Média (g.s)	0,86	1,01	1,25	6,50	11,30	19,65
	DP	±0,08	±0,15	±0,20	±7,32	±2,58	±6,08
	CV %	8,79	14,98	15,99	112,71	22,84	30,93
C971 Pó	Média (g.s)	1,44	1,81	1,30	1,12	0,98	2,78
	DP	±0,35	±0,62	±0,19	±0,39	±0,09	±1,18
	CV %	24,31	34,37	14,29	34,80	8,74	42,61
C974 compacto	Média (g.s)	0,81	1,07	1,37	8,24	9,72	20,57
	DP	±0,08	±0,13	±0,21	±1,26	±2,72	±7,94
	CV %	9,28	11,87	15,45	15,35	27,97	38,57
C974 Pó	Média (g.s)	0,80	0,81	0,90	1,00	1,02	2,45
	DP	±0,07	±0,07	±0,07	±0,10	±0,11	±0,74
	CV %	9,00	8,54	7,74	10,37	10,62	30,40

Figura 25. Valores de Pico de Força (g) e de Trabalho de Adesão (g.s) do **Polycarbofil** (PC). (a) pico de força do PC compacto e (b) o trabalho de adesão correspondente. (c) pico de força do PC em pó e (d) o trabalho de adesão correspondente.

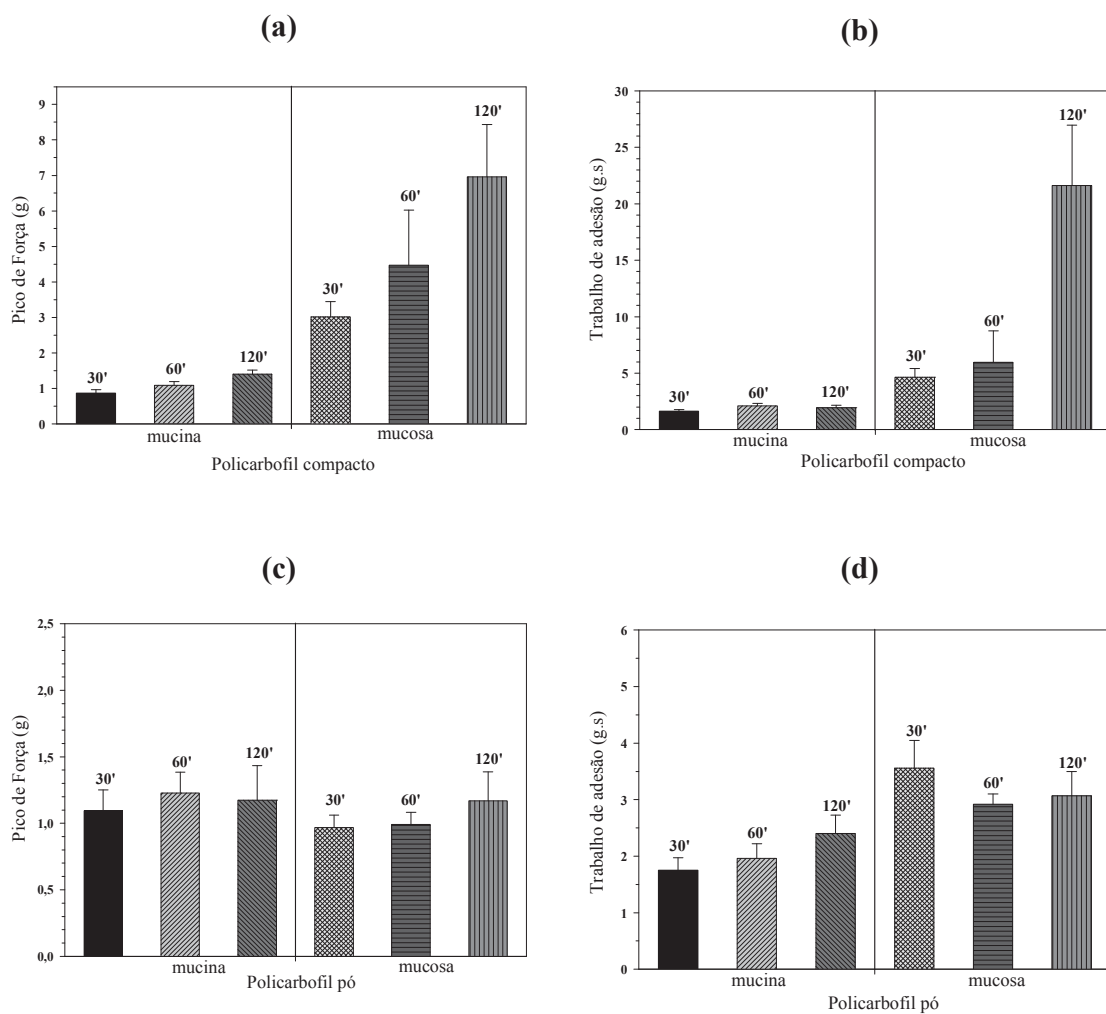


Figura 26. Valores de Pico de Força (g) e de Trabalho de Adesão (g.s) do **Carbopol 971** (C971). (a) pico de força do C971 compacto e (b) o trabalho de adesão correspondente. (c) pico de força do C971 em pó e (d) o trabalho de adesão correspondente.

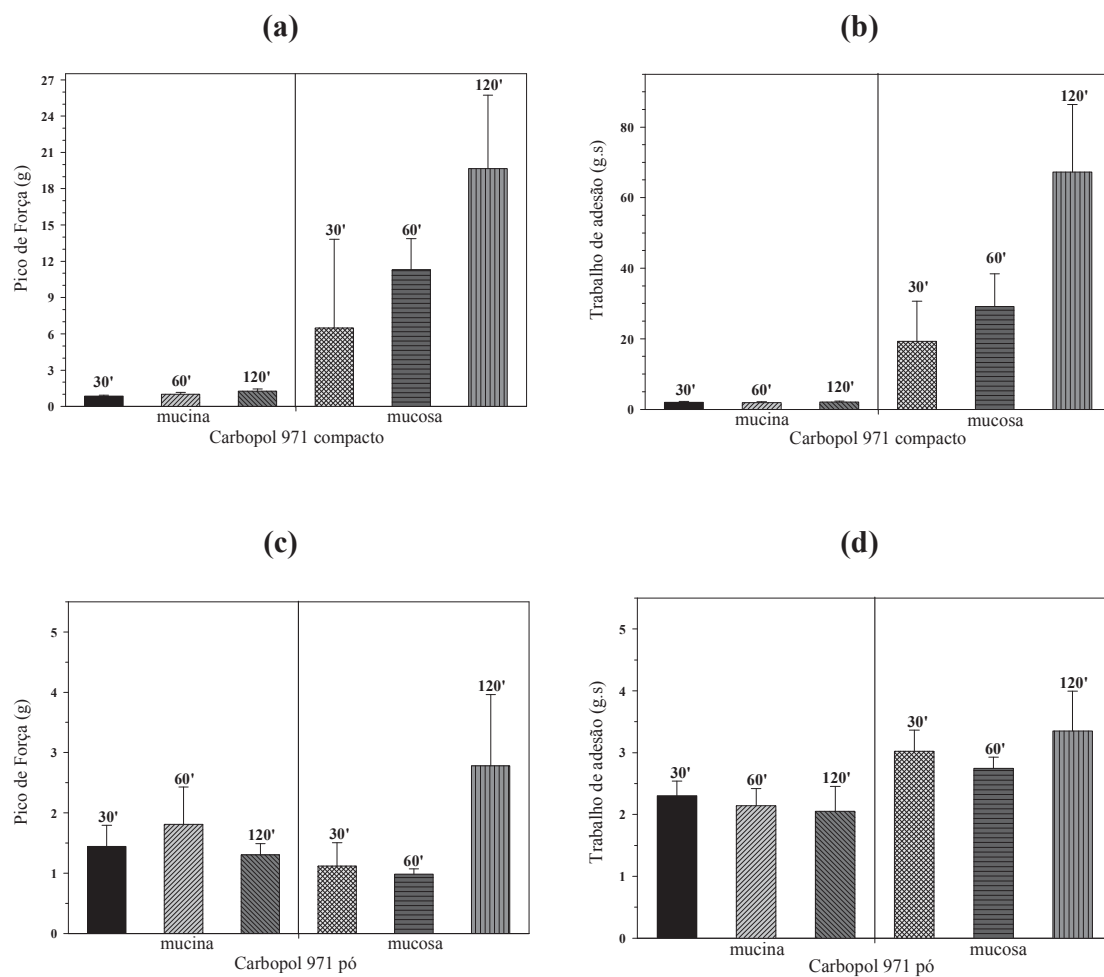
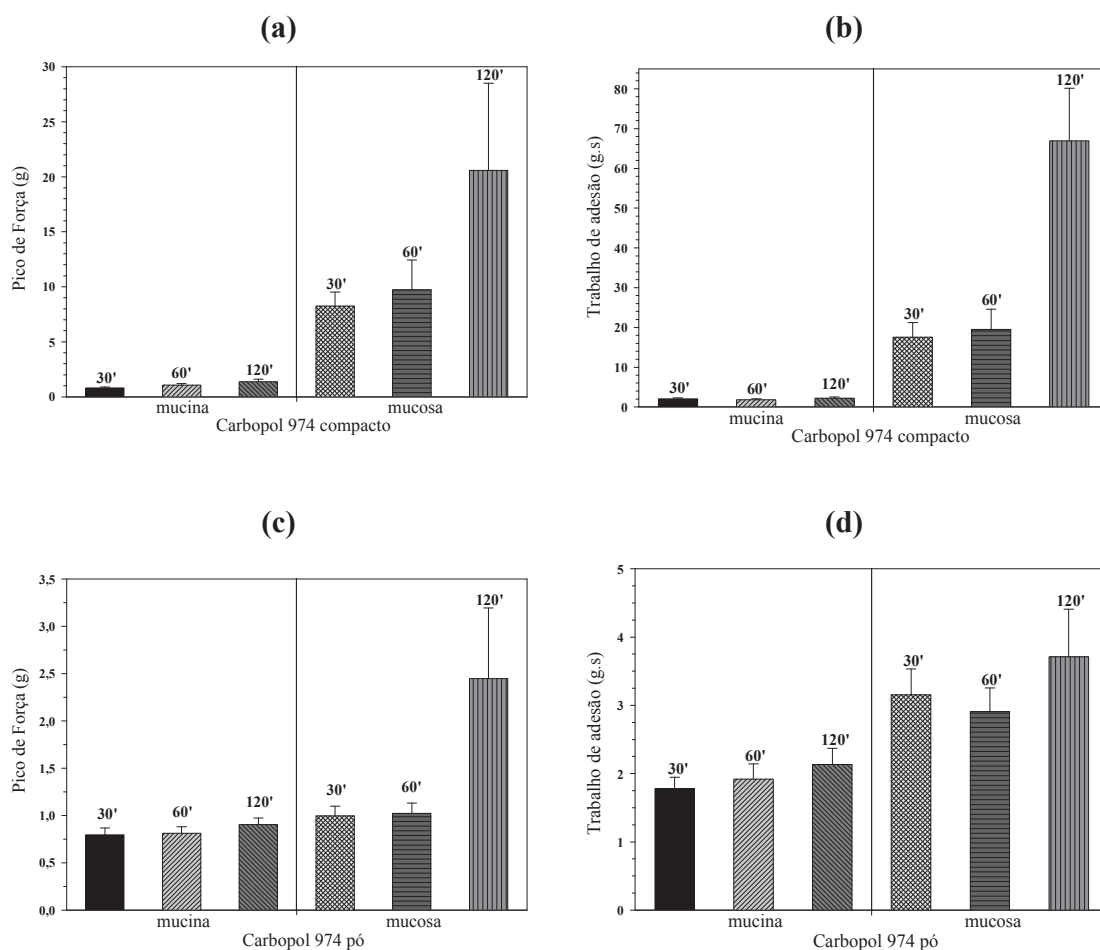


Figura 27. Valores de Pico de Força (g) e de Trabalho de Adesão (g.s) do **Carbopol 974** (C974). (a) pico de força do C974 compacto e (b) o trabalho de adesão correspondente. (c) pico de força do C974 em pó e (d) o trabalho de adesão correspondente.



Em relação à membrana modelo, verifica-se que os maiores valores obtidos, tanto para pico de força quanto para trabalho de adesão, são conseguidos com a utilização da mucosa. Entretanto, o disco de mucina foi utilizado para se obter um modelo *in vitro*, pois é um modelo mais fácil e rápido para ser utilizado, além de possuir menos variações e interferências nos resultados por não ser um material biológico.

Analisando-se os polímeros utilizados como padrão, não se observa uma diferença estatisticamente significativa nas medidas realizadas com o disco de mucina entre os três

polímeros testados. Porém, com o uso da mucosa e, principalmente, com os polímeros na forma compacta, observam-se valores de pico de força e trabalho de adesão diferenciados entre os polímeros, sendo que os carbopóis (971 e 974) apresentam-se mais mucoadesivos do que o policarbofil.

Com esses dados verifica-se que a mucoadesão dos polímeros analisados é influenciada por vários fatores, como o tempo de contato testado, a forma da amostra analisada e a membrana modelo utilizada. Quanto maior foi o tempo de contato testado, maior foi a força mucoadesiva, pois garante que mais interações ocorram entre membrana modelo e amostra. Os padrões utilizados na forma compacta obtiveram maior força mucoadesiva, possivelmente por apresentar maior quantidade de polímero aderido na prova. Quando se utiliza a mucosa, como membrana modelo, uma maior força mucoadesiva é obtida, possivelmente por apresentar outros componentes, além da mucina, co-responsáveis pela mucoadesão; além disso, a mucosa pode apresentar maior interação interfacial, ao contrario do disco de mucina, o qual é um pó compactado e oferece menor resistência.

O ensaio de mucoadesão realizado com estes polímeros foi muito importante para se obter os padrões mucoadesivos para comparação com as amostras de NPs desenvolvidas neste trabalho, uma vez que esses polímeros são descritos na literatura como mucoadesivos (Grabovac, Guggi, Bernkop-Schnürch, 2005). Além disso, os parâmetros e condições experimentais utilizados para análise dos polímeros foram os empregados para analisar as NPs liofilizadas, deste modo, a comparação entre os padrões mucoadesivos e as NPs liofilizadas foram mais fidedignas.

5.6.3. Mucoadesão das NPs liofilizadas

A mucoadesão das NPs foi analisada e comparada com os valores de mucoadesão dos padrões mucoadesivos. A Figura 28 apresenta a mucoadesão das NPs liofilizadas. A comparação dos valores de trabalho de adesão (τ_A) e de PF das NPs liofilizadas com os padrões mucoadesivos estão apresentados nas Tabelas 19 e 20 e Figuras 29 e 30.

Figura 28. Valores de Pico de força (g) e de Trabalho de Adesão (g.s) da NP3 e NP4, na forma liofilizada (tempo de contato de 60 segundos).

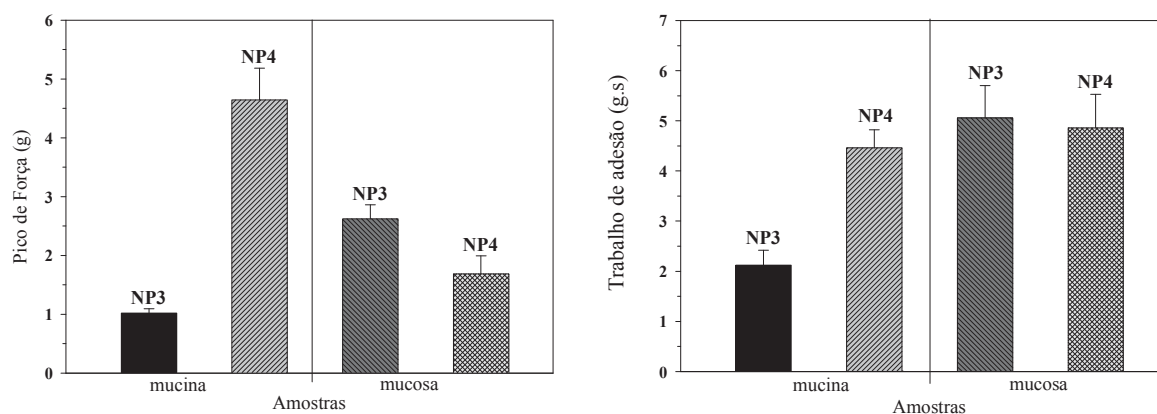


Tabela 19. Valores do trabalho de adesão (g.s) obtido nas medidas de mucoadesão da NP3 e NP4, na forma liofilizada (pó), e dos padrões mucoadesivos (tempo de contato de 60 segundos).

Trabalho de adesão (g.s) – Tempo de contato de 60 segundos									
	NP3	NP4	C971 pó	C971 compacto	C974 pó	C974 compacto	PC pó	PC compacto	
Mucina	Média (g.s)	2,12	4,46	2,15	1,90	1,92	1,83	1,96	2,11
	DP	± 0,30	± 0,36	± 0,28	± 0,27	± 0,22	± 0,18	± 0,26	± 0,21
	CV %	13,99	8,09	12,87	14,32	11,50	10,03	13,31	9,88
Mucosa	Média (g.s)	5,06	4,86	2,75	29,14	2,91	19,51	2,92	5,97
	DP	± 0,64	± 0,66	± 0,18	± 9,24	± 0,35	± 5,10	± 0,19	± 2,79
	CV %	12,72	13,67	5,57	31,72	11,98	26,16	6,36	46,71

Tabela 20. Valores do pico de força (g) obtido nas medidas de mucoadesão da NP3 e NP4, na forma liofilizada (pó), e dos padrões mucoadesivos (tempo de contato de 60 segundos).

Pico de Força (g) – Tempo de contato de 60 segundos									
	NP3	NP4	C971 pó	C971 compacto	C974 pó	C974 compacto	PC pó	PC compacto	
Mucina	Média (g.s)	1,02	4,64	1,81	1,01	0,81	1,07	1,23	1,09
	DP	± 0,07	± 0,54	± 0,62	± 0,15	± 0,07	± 0,13	± 0,16	± 0,11
	CV %	7,25	11,67	34,37	14,98	8,54	11,87	12,73	10,17
Mucosa	Média (g.s)	2,62	1,69	0,98	11,30	1,02	9,72	0,99	4,47
	DP	± 0,24	± 0,30	± 0,09	± 2,58	± 0,11	± 2,72	± 0,09	± 1,55
	CV %	9,09	18,04	8,74	22,84	10,62	27,97	9,35	34,54

Figura 29. Valores de Pico de força (g) e de Trabalho de Adesão (g.s) do carbopol 971 (C971), carbopol 974 (C974) e policarbofil (PC), NP3 e NP4 liofilizadas, obtidos em **disco de mucina**, no tempo de contato de 60 segundos.

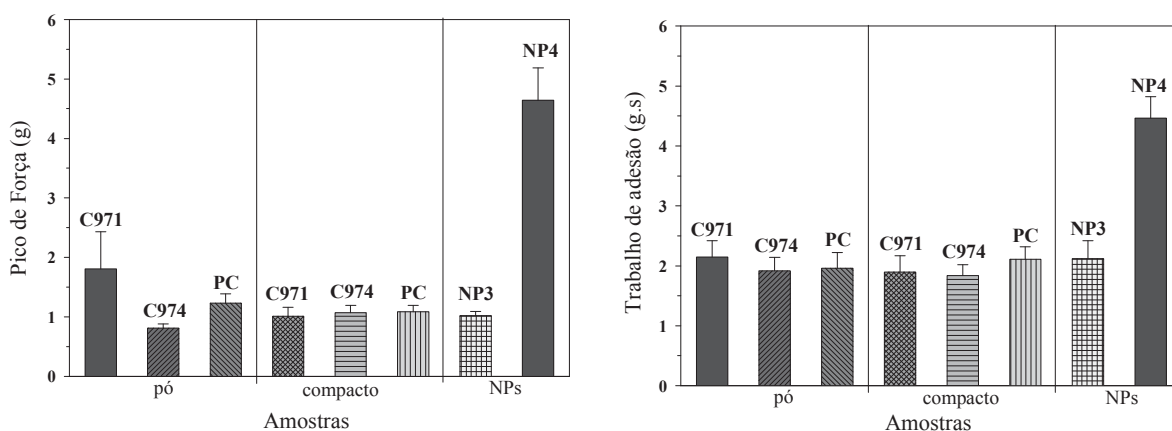
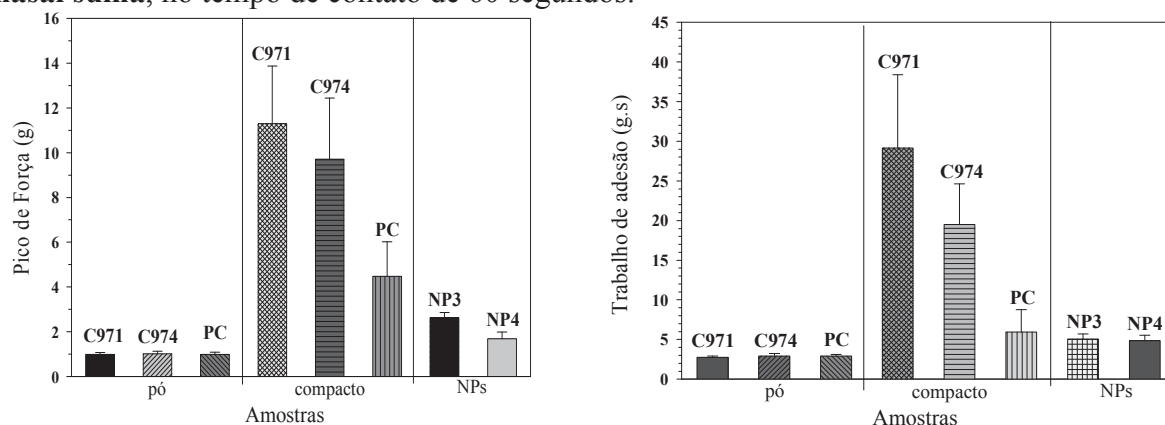


Figura 30. Valores de Pico de força (g) e de Trabalho de Adesão (g.s) do carbopol 971 (C971), carbopol 974 (C974) e policarbofil (PC), NP3 e NP4 liofilizadas, obtidos em **mucosa nasal suína**, no tempo de contato de 60 segundos.



De acordo com a Figura 28 e comparando a força mucoadesiva (pico de força e trabalho de adesão) entre todas as NPs estudadas observa-se que as amostras NP4, analisadas com disco de mucina e mucosa, e a NP3 analisada com mucosa, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para trabalho de adesão, enquanto que no gráfico de pico de força elas apresentaram valores diferentes entre si. Apenas a NP3 analisada em disco de mucina apresentou o mesmo comportamento para as duas situações analisadas (pico de força e trabalho de adesão), sendo menos mucoadesivo que as outras amostras. Porém comparando as análises realizadas com as diferentes mucosas modelo, observa-se que para os testes realizados com disco de mucina, a NP4 apresentou maior força mucoadesiva que a NP3, pois

os valores de pico de força e trabalho de adesão foram maiores. Para os ensaios feitos em mucosa observa-se que as amostras NP3 e NP4 não apresentaram diferenças significativas para os dois parâmetros estudados.

Comparando-se as análises realizadas em disco de mucina dos padrões mucoadesivos com as NPs (Figura 29), observa-se que apenas a NP4 apresentou um valor mucoadesivo alto, sendo que as outras amostras não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Para comparação dos ensaios feitos em mucosa nasal suína (Figura 30), observa-se que os polímeros compactados apresentaram maior força mucoadesiva, tanto para pico de força quanto para trabalho de adesão. Esses valores foram seguidos pelas NPs e por último pelos padrões em pó. Era esperado que os polímeros analisados na forma compactada obtivessem maiores valores de mucoadesão, pois apresentam maior quantidade de polímero aderido na prova. Porém, quando as NPs são comparadas com os polímeros mucoadesivos nas mesmas condições experimentais (pó aderido na prova), sua mucoadesão mostrou-se superior. Portanto, estes resultados demonstram que as NPs analisadas apresentam propriedades mucoadesivas.

5.7. ESTUDOS DE PERMEACÃO *EX VIVO*

A permeação do fármaco pelo epitélio nasal é um fator muito importante para se avaliar, uma vez que a eficácia clínica de um fármaco não depende apenas das suas propriedades farmacológicas, mas também da sua biodisponibilidade. Os estudos de permeação *in vitro*, utilizando uma mucosa nasal suína, oferecem vantagens sobre os estudos *in vivo*, uma vez que podem ser executados mais rapidamente, envolvendo menos animais, e seguindo procedimentos analíticos mais simplificados.

5.7.1. Validação da metodologia analítica para determinação do AZT por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

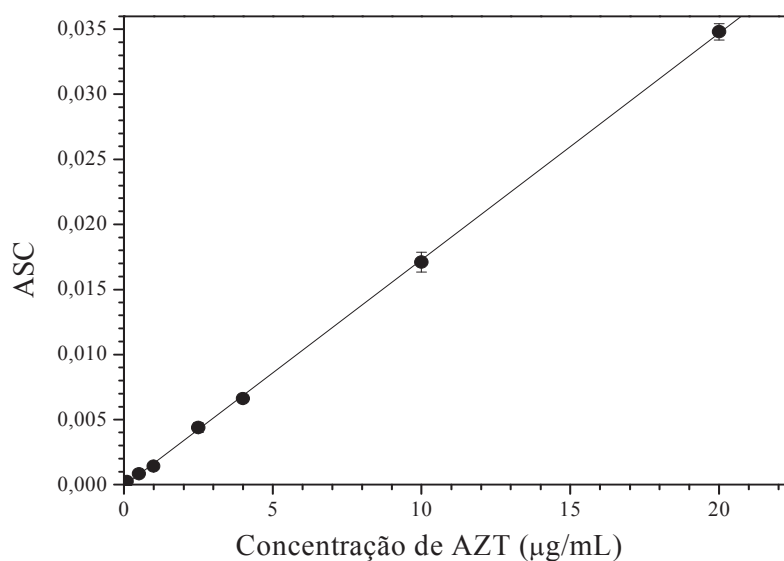
A validação do método para quantificação de AZT nos ensaios de permeação foi realizada segundo os parâmetros estipulados pela Anvisa (2003), para verificar se este método apresenta linearidade na faixa de concentração utilizada, especificidade, precisão e exatidão.

A partir das leituras das soluções padrão de AZT obteve-se os valores das áreas sob a curva (ASC) dispostos na Tabela 21. Elaborou-se o gráfico (Figura 31) de concentração de AZT *versus* ASC e calculou-se a regressão linear, a qual foi $y = 0,00174x - 0,00013$. A linearidade do método pode ser evidenciada pelo coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,9998, calculado através da regressão linear.

Tabela 21. Concentrações das soluções padrão utilizadas para construção da curva analítica e os respectivos valores de áreas sob a curva (ASC) obtidos por CLAE no comprimento de onda de 266 nm (n=3).

Concentração de AZT ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	ASC	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)
0,1	0,00026	$\pm 0,00005$	20,67
0,5	0,00084	$\pm 0,00011$	12,54
1	0,00142	$\pm 0,00021$	14,59
2,5	0,00439	$\pm 0,00038$	8,69
4	0,00661	$\pm 0,00006$	0,89
10	0,01708	$\pm 0,00078$	4,54
20	0,03478	$\pm 0,00064$	1,85

Figura 31. Curva analítica do AZT, obtida por CLAE em 265 nm (n=3). Regressão linear representada por $y = 0,00174x - 0,00013$, e coeficiente de determinação $r^2 = 0,9998$.



A especificidade do método foi demonstrada através dos cromatogramas representados nas Figuras 32, 33 e 34 que mostram que tempo de retenção do fármaco foi em torno de 6,5 min e os outros componentes não interferiram no pico do AZT.

Figura 32. Cromatograma da solução padrão de AZT em tampão fosfato monobásico 20mM pH6,8.

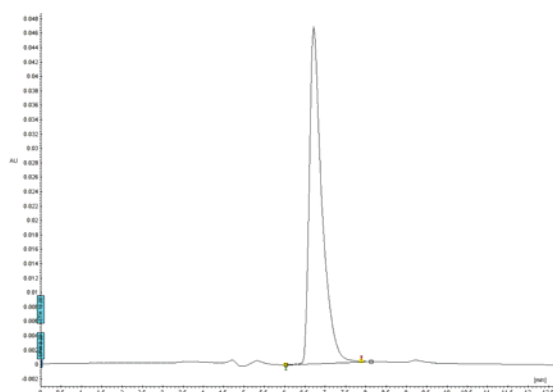


Figura 33. Cromatograma de uma amostra do meio de dissolução após 1h de ensaio de permeação da NP4 sem fármaco.

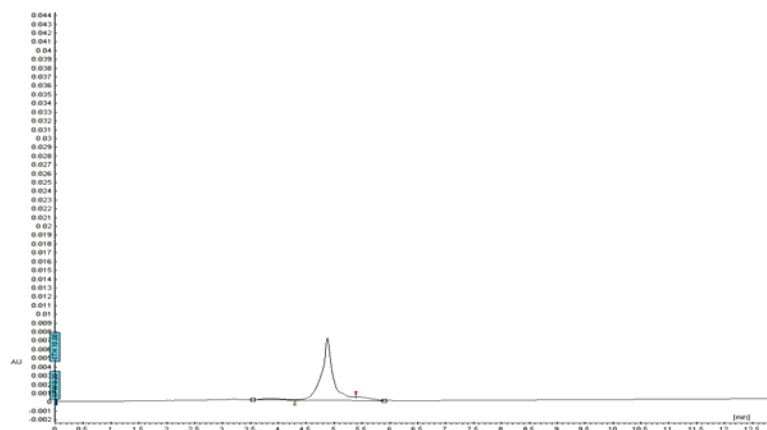
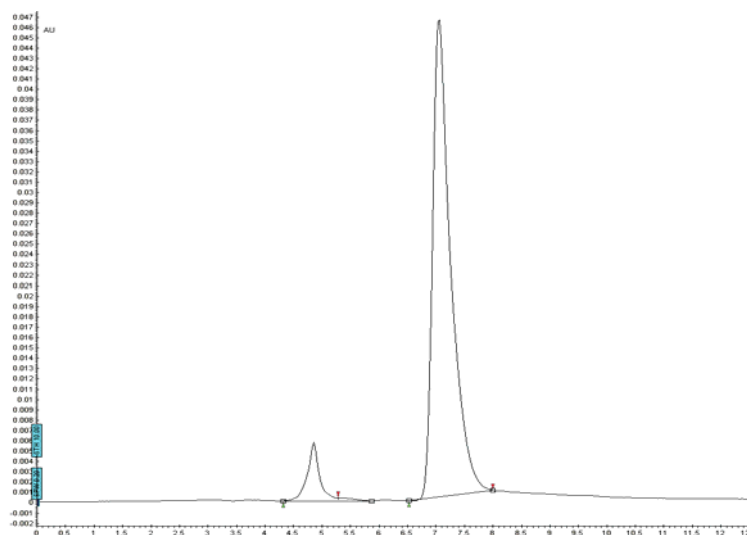


Figura 34. Cromatograma de uma amostra do meio de dissolução após 1h de ensaio de permeação da amostra NP4 carregada.



A precisão é expressa pelo coeficiente de variação (CV) e a exatidão é expressa como a porcentagem de recuperação, determinada pela equação 7, como descrito no item 5.5.1. Os resultados dos cálculos de CV e de porcentagem de recuperação estão presentes na Tabela 22. Eles indicam que o método é preciso, pois os valores de CV são inferiores a 5 %, e também exatos, pois a recuperação está dentro da faixa limite (80 – 120 %) preconizada pela Anvisa (2003).

Tabela 22. Cálculo dos parâmetros estatísticos da precisão e exatidão para validação do método de quantificação do AZT por CLAE.

	Concentrações de AZT determinadas ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
	0,5	4,0	10
Média	0,4904	3,9789	10,3851
Desvio Padrão	$\pm 0,0239$	$\pm 0,0872$	$\pm 0,4136$
Coefficiente de variação (%)	4,88	2,19	3,98
Recuperação (%)	98,08	99,47	103,85

O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), calculados a partir das equações 8 e 9, respectivamente, apresentaram valores iguais a $0,01724 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para LD, e $0,05747 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para LQ. Acima destes valores o método é preciso e exato.

5.7.2. Ensaio de permeação

O perfil de permeação para amostras estudadas foi calculado de acordo com a equação 10 (USP 35), sendo que a quantidade permeada ($Q_{\text{real}, t}$) em determinado t é igual a quantidade medida (Q_t), somadas as quantidades removidas da célula nas amostragens e descartes anteriores.

$$Q_{\text{real}, t} = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c \quad (\text{eq.10})$$

Em que: $Q_{\text{real}, t}$ ($\mu\text{g/cm}^2$) é a quantidade real permeada referente ao tempo t; C_t ($\mu\text{g/mL.cm}^2$) é a concentração obtida referente ao tempo t; V_r (mL) é o volume da solução receptora (7 mL); C_c ($\mu\text{g/mL.cm}^2$) é a concentração da amostragem anterior e V_c (mL) é o volume amostrado.

As figuras 35 e 36 mostram o perfil de permeação das amostras NP4_A12,5 e SA, em relação ao Q ($\mu\text{g/cm}^2$) e em % de liberação, respectivamente.

Figura 35. Perfil de permeação do AZT das amostras SA (●) e NP4_A12,5 (○) no intervalo de tempo de 12 horas em relação ao Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

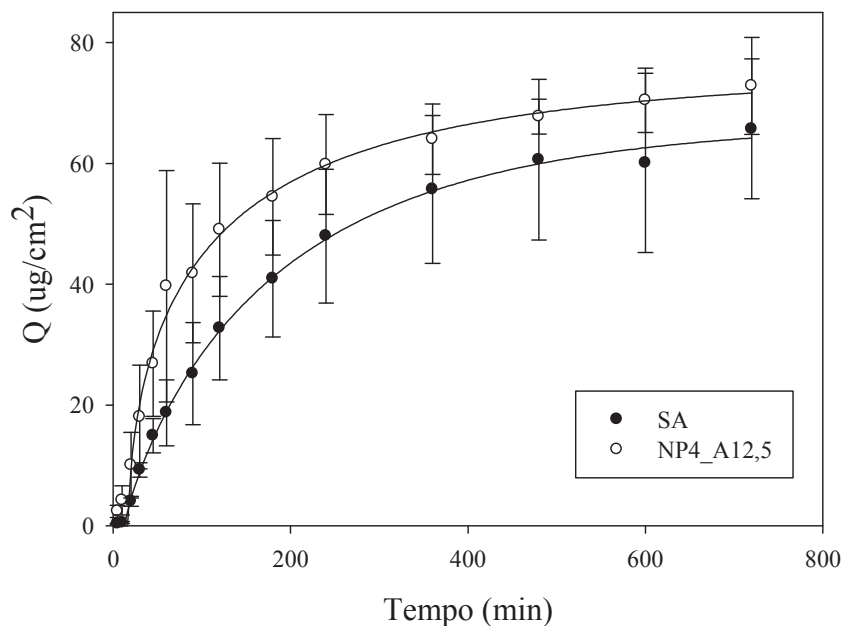
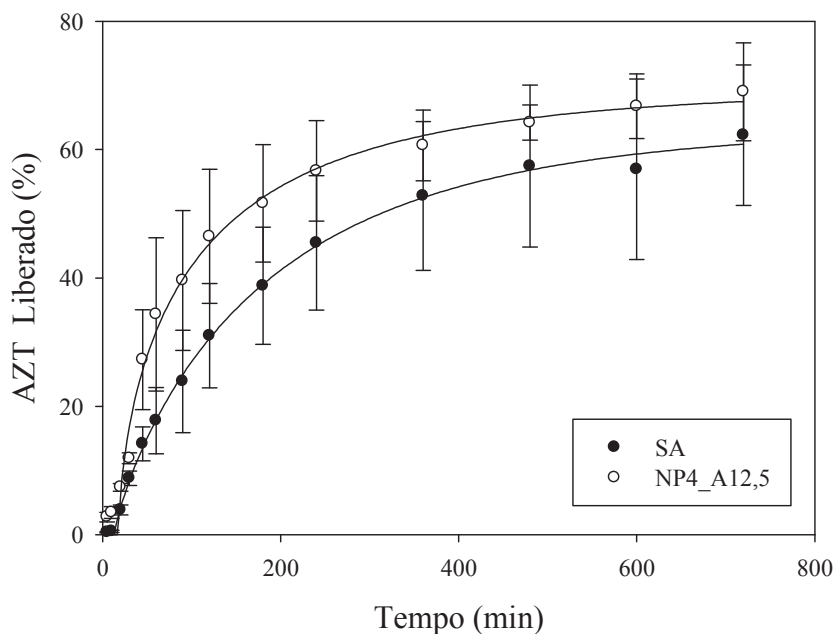


Figura 36. Perfil de permeação das amostras SA (●) e NP4_A12,5 (○) no intervalo de tempo de 12 horas em relação a % de AZT liberada.



Observando-se o gráfico da Figura 35, verifica-se que a amostra NP4_A12,5 apresentou maior quantidade de AZT permeada do que a SA, visto que ambas as amostras estavam na mesma concentração de fármaco e apresentavam mesma relação massa de AZT adicionada/área ($105,53 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Além disso, o gráfico da porcentagem de liberação do AZT

no meio receptor (Figura 36) mostra que a amostra de NPs apresentou uma maior liberação do fármaco, pois em 3 horas a SA liberou cerca de 40%, enquanto que a NP4_A12,5 liberou aproximadamente 50% do fármaco. Conclui-se que o sistema nanoestruturado favorece a permeação do AZT, pois permite uma maior permeação do fármaco.

O fluxo foi calculado a partir da porção linear da reta de Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* tempo conforme dados da literatura (Cornélio, Mayorga, 2007; Silva et al., 2009). Dois valores de fluxo foram encontrados para cada amostra, devido a cinética de permeação. As Figuras 37 e 38, contém os gráficos utilizados para cálculo do fluxo para SA e NP4_12,5, respectivamente. Os valores calculados de fluxo estão presentes na Tabela 23.

Figura 37. Quantidade de AZT Permeado *versus* Tempo, utilizado para cálculo do fluxo da SA. Linearização das duas porções da reta, com suas respectivas equações da reta e o coeficiente de determinação (r^2).

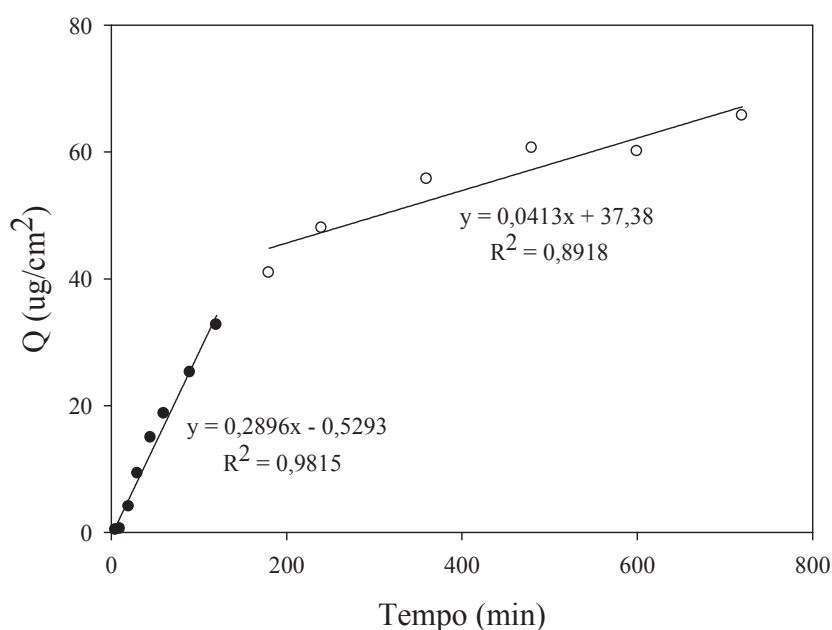


Figura 38. Quantidade de AZT Permeado *versus* Tempo, utilizado para cálculo do fluxo da NP4_A12,5. Linearização das duas porções da reta, com suas respectivas equações da reta e o coeficiente de determinação (r^2).

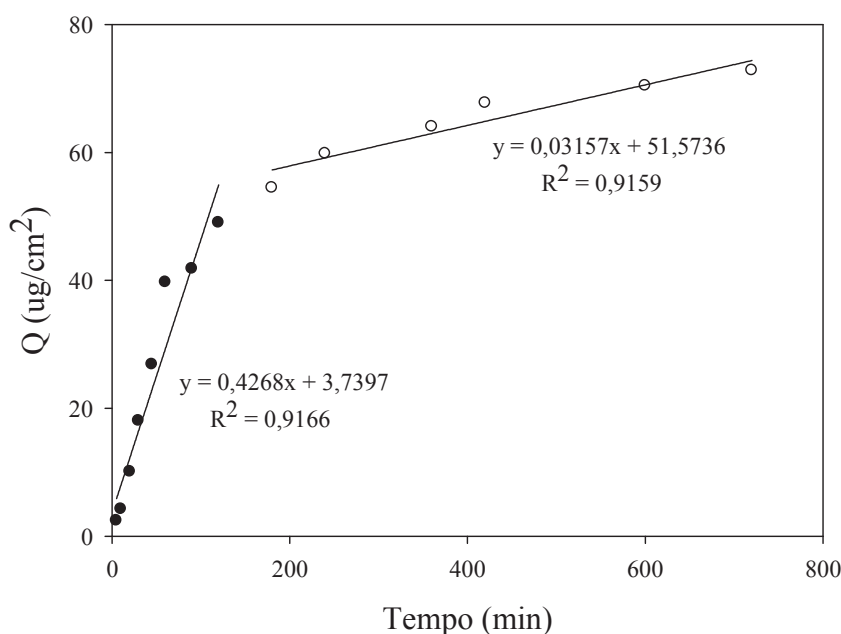


Tabela 23. Valores calculados pra cada fluxo da SA e NP4_A12,5, correspondentes à cada reta obtida.

	Fluxo 1 ($\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$)	Fluxo 2 ($\mu\text{g}.\text{cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$)
SA	0,2896	0,0413
NP4_A12,5	0,4268	0,0316

Quando se trata de via nasal tem que considerar que suas limitações incluem a depuração mucociliar, portanto, uma taxa de fluxo maior é necessária para que uma maior quantidade de fármaco seja absorvida. Além disso, um sistema mucoadesivo pode aumentar a taxa de fluxo, uma vez que proporciona um maior contato da formulação com a mucosa nasal.

Com os resultados da Tabela 23 verifica-se que o fluxo das NPs na primeira etapa é mais rápido que o do fármaco livre e libera cerca de 55% do fármaco, enquanto que a SA libera cerca de 35% do AZT. Na segunda fase, observa-se que o valor de fluxo é menor, sugerindo que as NPs apresentam uma liberação inicial rápida do fármaco, o que é essencial para via nasal, e após certo tempo podem controlar a liberação do mesmo.

6. CONCLUSÃO

- A técnica de gelificação ionotrópica mostrou-se eficaz na formação de nanopartículas de quitosana com TPP. Através dos resultados foi possível confirmar a formação de partículas de tamanho nanométrico, com alto e positivo valor de potencial zeta, que pode facilitar a interação com a mucosa nasal.
- As NPs com o fármaco não apresentaram diferenças significativas de tamanho de partícula e potencial zeta, quando comparada com as amostras sem o fármaco.
- A caracterização através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou partículas sólidas, esféricas ou ligeiramente ovaladas, sendo seu tamanho nanométrico confirmado com os resultados obtidos com a técnica de espalhamento de luz.
- O processo de liofilização alterou a estrutura das NPs e sua carga elétrica de superfície, como foi observado na MEV e potencial zeta obtidos.
- As NPs foram capazes de incorporar o AZT e sua eficiência de encapsulação entre as amostras estudadas variou entre 4,4 a 17,6%.
- A comparação dos valores obtidos nos ensaios de mucoadesão das NPs com os padrões, revelou que as NPs apresentam potencial mucoadesivo.
- O fármaco permeou a mucosa nasal suína, além das NPs apresentarem uma maior liberação do AZT nos ensaios de permeação do que a solução aquosa do fármaco.
- As nanopartículas de quitosana obtidas por gelificação ionotrópica pode ser um potencial sistema para administração intranasal do AZT.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: www.anvisa.org.br.

AMIDI, M.; ROMEIJN, S.G.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H.E.; HENNINK, W.E.; JISKOOT, W. Preparation and characterization of protein-loaded *N*-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. **J. Control. Rel.**, v. 111, p. 107–116, 2006.

AMIDI, M.; ROMEIJN, S. G.; VERHOEF, J. C.; JUNGINGER, H. E.; BUNGENER, L.; HUCKRIEDE, A.; CROMMELIN, D. J. A.; JISKOOT, W. *N*-Trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: Biological properties and immunogenicity in a mouse model, **Vaccine**, v. 25, p. 144–153, 2007.

ANDREWS, G.P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery, **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, 2008.

AULTON, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. Porto Alegre: Artmed. 2.ed, 2005.

BLUM, M.R.; LIAO, S.H.T.; GOOD, S.S.; MIRANDA, P. Pharmacokinetics and bioavailability of zidovudine in humans. **Am. J. Med.**, v. 85, p. 189–194, 1988.

BRASIL 2011. MS: Ministério da Saúde. Aids no mundo. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>. Acessado em: 04 set. 2011.

BRAVO-OSUNA, I.; VAUTHIER, C.; FARABOLLINI, A.; PALMIERI, G. F.; PONCHEL, G. Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. **Biomaterials**, v. 28, p. 2233-2243, 2007.

BRUSCHI, M. L.; JONES, D.S.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M.P.D.; FREITAS, O.; LARA, E.H.G. Semisolid Systems Containing Propolis for the Treatment of Periodontal Disease: In

Vitro Release Kinetics, Syringeability, Rheological, Textural, and Mucoadhesive Properties. **J. Pharm. Sci.**, v. 96, p. 2074–2089, 2007.

CALLENS, C.; CEULEMANS, J.; LUDWIG, A.; FOREMAN, P.; REMON, J.P. Rheological study on mucoadhesivity of some nasal powder formulations. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 55, p. 323-328, 2003.

CARVALHO, F. C. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina**. Araraquara, 2009. 164p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2009.

CARVALHO, F. C., BARBI, M. S., SARMENTO, V. H. V., CHIAVACCI, L. A., NETTO, F. M., GREMIÃO, M. P. D. Surfactant systems for nasal AZT delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties. **J. Pharm. Pharmacology**, v. 62 (4), p. 430-439, 2010b. DOI: 10.1211/jpp.62.04.0004.

CARVALHO, F. C.; BRUSCHI, M. L. B.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 46, n. 1, jan./mar. 2010a.

CERA, R.F.L. **Estudo da Incorporação do Diclofenaco Sódico com Microemulsão Lipídicas: Formulação e Liberação in vitro**. Araraquara, 2001. 145f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

CHEN, F.; ZHANG, Z.-R.; HUANG, Y. Evaluation and modification of *N*-trimethyl chitosan chloride nanoparticles as protein carriers. **Int. J. Pharm.**, v. 336, p. 166–173, 2007.

CHENG, Y.-H.; DYER, A. M.; JABBAL-GILL, I.; HINCHCLIFFE, M.; NANKERVIS, R.; SMITH, A.; WATTS, P. Intranasal delivery of recombinant human growth hormone (somatropin) in sheep using chitosan-based powder formulations, **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 26, p. 9–15, 2005.

CHOWDARY, C. P. R.; RAO, Y. S. Mucoadhesive microspheres for controlled drug delivery. **Biol. Pharm. Bull.** v. 27, n. 11, p. 1717-1724, 2004.

CORNELIO R., MAYORGA P. Estudo da Penetração Cutânea do Flurbiprofeno. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 26 (6), p. 883-888. 2007.

DEMBRI, A.; MONTISCI, M. J.; GANTIER, J. C.; CHACUN, H.; PONCHEL, G. Targeting of 3-Azido-3-Deoxythymidine (AZT)-Loaded Poly(Isohexylcyanoacrylate) Nanospheres to the Gastrointestinal Mucosa and Associated Lymphoid Tissues. **Pharm. Res.**, v. 18, n. 4, 2001.

DYER, A. M.; HINCHCLIFFE, M.; WATTS, P.; CASTILE, J.; JABBAL-GILL, I.; NANKERVIS, R.; SMITH, A.; ILLUM, L. Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: a comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles, **Pharm Res.**, v. 19, p. 998–1008, 2002.

EVANGELISTA, R. C. **Sistemas de liberação controlada de fármacos**. Araraquara: Tese (Livre Docência), 2006, 345 f. (Texto sistemático apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos do concurso para obtenção do Título de Livre-Docente em Farmacotécnica).

FERNANDEZ-URRUSUNO, R.; CALVO, C.; REMUÑAN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles, **Pharm. Res.**, v.16, p.1576–81, 1999.

FRANSÉN N., BJÖRK E., EDSMAN K. Changes in the Mucoadhesion of Powder Formulations after Drug Application Investigated with a Simplified Method. **J. Pharm. Sci.**, v. 97, n. 9, p. 3855 – 3864, 2008. DOI 10.1002/jps.21279.

GAVINI, E.; HEGGE, A. B.; RASSU, G.; SANNA, V.; TESTA, C.; KARLSEN, J.; GIUNCHEDI, P. Nasal administration of Carbamazepine using chitosan microspheres: In vitro/in vivo studies, **Int. J. Pharm.**, v. 307, p. 9–15, 2006.

GAVINI, E.; RASSU, G.; MUZZARELLI, C.; COSSU, M.; GIUNCHEDI, P. Spray-dried microspheres based on methylpyrrolidinone chitosan as new carrier for nasal administration of metoclopramide. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 68, p. 245–252, 2008.

GUIMARÃES, T. F. **Nanopartículas de quitosana como carreadoras de etoposide**. Araraquara, 2005. 101p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2005.

GRABOVAC, V., GUGGI, D., BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers, **Adv. Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1713–1723, 2005.

HÄGERSTRÖM, H. **Polymer Gels as Pharmaceutical Dosage Forms: Rheological performance and physicochemical interactions at the gel-mucus interface for formulations intended for mucosal drug delivery**. Upsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 2003. n. 293, 76p. (Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy).

HÄGERSTRÖM H., BERGSTRÖM C. A. S., EDSMAN K. The importance of gel properties for mucoadhesion measurements: a multivariate data analysis approach. **J. Pharm. Pharmacology**, vol. 56, p.161–168, 2004. DOI: 10.1211/0022357022728.

HÄGERSTRÖM H., EDSMAN K. Interpretation of mucoadhesive properties of polymer gel preparations using a tensile strength method. **J. Pharm. Pharmacology**, v. 53, p. 1589–1599, 2001.

HAGESAETHER E., HIORTH M., SANDE S. A. Mucoadhesion and drug permeability of free mixed films of pectin and chitosan: An in vitro and ex vivo study. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 71, p. 325–331, 2009.

HAN, Y. A.; SINGH, M.; SAXENA, B. B. Development of vaginal rings for sustained release of nonhormonal contraceptives and anti-HIV agents. **Contraception**, v. 76, p. 132–138, 2007.

HILLAIREAU, H.; DOAN, T. L.; APPEL, M.; COUVREUR, P. Hybrid polymer nanocapsules enhance in vitro delivery of azidothymidine-triphosphate to macrophages. **J. Controll. Rel.**, v. 116, p. 346–352, 2006.

ILLUM, E. Nasal drug delivery – possibilities, problems and solutions. **Journal J. Controll. Rel.**, v. 87, p.1 87-198, 2003.

JANES, K.A.; CALVO, P.; ALONSO, M.J. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 47, p. 83-97, 2001.

JIANG, X.; CHEN, L.; ZHONG, W. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 457–463, 2003

JUNGER, H. E.; THANOU, M.; VERHOEF, J. C. Drug Delivery: Mucoadhesive Hydrogels. : Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 3. ed. **Informaworld**. Disponível em: <http://www.informaworld.com/smpp/content~db=all~content=a758558230~tab=conten>. Acesso em: 31 out. 2007.

KANG, M. L.; JIANG, H.-L.; KANG, S. G.; GUO, D. D.; LEE, D. Y.; CHO, C.-S.; YOO, H. S. Pluronic® F127 enhances the effect as an adjuvant of chitosan microspheres in the intranasal delivery of *Bordetella bronchiseptica* antigens containing dermonecrotin. **Vaccine**, v.25, p.4602–4610, 2007.

KAWAGUCHI, T.; HASEGAWA, T.; JUNI, K.; SEKI, T. Rectal absorption of Zidovudine. **Int. J. Pharm.** v.77, p. 71-74, 1991.

KRAULAND, A. H.; GUGGI, D.; BERNKOP-SCHNURCH, A. Thiolated chitosan microparticles: A vehicle for nasal peptide drug delivery. **Int. J. Pharm.**, v. 307, p. 270–277, 2006.

KOHLI, E.; HAN, H. Y.; ZEMAN, A. D.; VINOGRADOV, S. V. Formulations of biodegradable nanogel carriers with 5'-triphosphates of nucleoside analogs that display a reduced cytotoxicity and enhanced drug activity. **J. Controll. Rel.**, v. 121, p. 19–27, 2007.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1–27, 2000.

LAM, T. D., HOANG, V. D., LIEN, N. L., THINK, N. N., DIEN, G. P. Synthesis and characterization of chitosan nanoparticles used as drug carrier. **J. Chemistr**, v. 44(1), p. 105-109, 2006.

LAUS R.; LARANJEIRA, M. C. M.; MARTINS, A. O.; FÁVERE, V. T.; PEDROSA, R. C.; BENASSI, J. C.; GEREMIAS, R. Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro(iii) e manganês(ii) de águas contaminadas pela mineração de carvão. **Quim. Nova**, v. 29(1), p. 34-39, 2006.

LEITNER, V. M.; GUGGI, D.; KRAULAND, A. H.; BERNKOP-SCHNQRCH, A. Nasal delivery of human growth hormone: in vitro and in vivo evaluation of a thiomers/glutathione microparticulate delivery system, **J. Controll. Rel.**, v. 100, p. 87–95, 2004.

LEUNG, S. H. S.; ROBINSON, J. R. Polymer structure features contributing to mucohesion II. **J. Controll. Rel.**, v.12, p. 187-194, 1990.

LUCINDA, R. M. **Preparação e caracterização de micropartículas de quitosana-alginato**. Araraquara, 1999. 154p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 1999.

MAINARDES, R. M. **Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina**. Araraquara, 2007. 152p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2007.

MAINARDES , R.M.; GREMIÃO, M.P.; BRUNETTI, I.L.; FONSECA, L.M.; KHALIL, N.M. Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: Influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. **J. Pharm. Sci.**, v. 98, p. 257-267, 2009. DOI: 10.1002/jps.21406

MAINARDES, R.M.; SILVA, L.P. Drug delivery systems: past, present and future. **Curr. Drug Targets**, v.5 (5), p.389-406, 2004.

MAINARDES, R.M.; URBAN, M.C.C.; CINTO, P.O.; CHAUD, M.V.; EVANGELISTA, R.C.; GREMIÃO, M.P.D. Liposomes and micro/nanoparticles as colloidal carriers for nasal drug delivery. **Current Drug Targets**, v. 3 (3), p. 275-285, 2006.

MAINARDES, R.M.; URBAN, M.C.C.; CINTO, P.O.; KHALIL, N.M.; CHAUD, M.V.; EVANGELISTA, R.C.; GREMIÃO, M.P.D. Colloidal carriers for ophthalmic drug delivery. **Curr. Drug Targets**, v.6(2), 2005.

MANDAL, T.K.; TENJARLA, S. Preparation of biodegradable microcapsules of zidovudine using solvent evaporation: Effect of the modification of aqueous phase. **Int. J. Pharm.**, v. 137, p.187-197, 1996.

NIELSEN, L. S., SCHUBERT, L., HANSEN, J. Bioadhesive drug delivery systems. I. Characterization of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl mono-oleate and glyceryl monolinoleate. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 6, p. 231–239, 1998.

OJEWOLE, E.; MACKRAJ, I.; NAIDOOA, P.; GOVENDER, T. Exploring the use of novel drug delivery systems for antiretroviral drugs. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, 2008. DOI 10.1016/j.ejpb.2008.06.020

OLIVEIRA, B. F.; SANTANA, M. H. A.; RÉ, M. I. Spray-dried chitosan microspheres cross-linked with d, l-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation and characterization. **Brazil. J. Chem. Engineering**, v. 22 (03), p. 353 - 360, July - September, 2005.

OMS, 2009. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, *Aids Epidemic Update*, Genebra: UNAIDS, 2009. Disponível em:

<http://www.unaids.org/en/dataanalysis/epidemiology/2009aidsepidemicupdate/>. Acessado em 04.set.2011.

PHILLIPS, N.C.; SKAMENE, E.; TSOUKAS, C. Liposomal encapsulation of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) results in decreased bone marrow toxicity and enhanced activity against murine AIDS-induced immunosuppression. **J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.** v.4, p. 959-966, 1991.

PHILLIPS, N.C.; TSOUKAS, C. Liposomal encapsulation of azidothymidine results in decreased hematopoietic toxicity and enhanced activity against murine acquired immunodeficiency syndrome. **Blood.** v.79, p. 1137-1143, 1992.

PONTIROLI, A. E. Peptide hormones: Review of current and emerging uses by nasal delivery. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 29, p. 81-87, 1998.

PRABAHARAN, M.; GONG, S. Novel thiolated carboxymethyl chitosan-g-b-cyclodextrin as mucoadhesive hydrophobic drug delivery carriers. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 117-125, 2008.

QUAN, J.-S.; JIANG, H.-L.; KIM, E.-M.; JEONG, H.-J.; CHOI, Y.-J.; GUO, D.-D.; YOO, M.-K.; LEE, H.-G.; CHO, C.-S. pH-sensitive and mucoadhesive thiolated Eudragit-coated chitosan microspheres. **Int. J. Pharm.**, v. 359, p. 205-210, 2008.

RAYMOND, MORIN, F.G., MARCHESSAULT, R.H. Degree of desacetylation of chitosan using conductimetric titration and solid-state NMR. **Carbohydrate Research**, v. 246, p. 331-336, 1993.

ROBERTS, A.F.; DOMSZY, J. G. Determination of the viscometric constants for chitosan. **Int. J. Biol. Macrom.**, v. 4, p. 374-77, 1982.

SADEGHI, A.M.M.; DORKOOSH, F.A.; AVADI, M.R.; SAADAT, P.; RAFIEE-TEHRANI, M., JUNGINGER, H.E. Preparation, characterization and antibacterial activities of

chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods. **Int. J. Pharm.**, v. 355, p. 299–306, 2008.

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

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quím. Nova**, v. 26(5), p. 726-737, São Paulo Sept./Oct., 2003

SEVERINO, P. **Revestimento polimérico e farmacocinética de grânulos gastrorresistentes contendo didanosina incorporada em micropartículas de quitosana.** Campinas, 2008. 137p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

SIGURDSSON, H. H., LOFTSSON, T., LEHR, C.M. Assessment of mucoadhesion by a resonant mirror biosensor. **Int. J. Pharm.**, v. 325, p. 75–81, 2006.

SILVA, C. F. **Micropartículas de quitosana com didanosina e sua formulação em grânulos mucoadesivos.** Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006b, Tese (Doutorado).

SILVA, J. A., SANTANA D. P., BEDOR D. G. C., BORBA V. F. C., LIRA A. A. M., EGITO E. S. T. Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Quim. Nova**, v. 32 (6), p. 1389-1393, 2009.

SILVA, P. **Farmacologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 7.ed. 2006a. p.1081.

SMART, J.D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Adv. Drug Del. Rev.**, n. 57, p. 1556-1568, 2005.

SOANE, R.J.; HINCHCLIFFE, M.; DAVIS, S.S.; ILLUM, L. Clearance characteristics of chitosan based formulations in the sheep nasal cavity, **Int. J. Pharm.**, v. 217, p. 183-191, 2001.

SUBHEET, J.; TIWARY, A.K.; JAIN, N.K. Sustained and targeted delivery of an anti-HIV agent using elastic liposomal formulation: Mechanism of Action. **Curr. Drug Deliv.** v.3, p. 157-166, 2006.

THOMAS, N.S.; PANCHAGNULA, R. Transdermal delivery of zidovudine: effect of vehicles on permeation across rat skin and their mechanism of action. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 18, p. 71-79, 2003.

UNITED STATES PHARMACOPEIA – USP. 30 ed., Rockville, MD, USA, 2002.

UNITED STATES PHARMACOPEIA – USP. 35 ed., Rockville, MD, USA, 2009.

VENTER, J.P.; KOTZÉ, A.F.; AUZÉLY-VELTY, R.; RINAUDO, M. Synthesis and evaluation of the mucoadhesivity of a CD-chitosan derivative, **Int. J. Pharm.**, v. 313, p. 36–42, 2006.

WANG X., ZHENG C., WU Z., TENG D., ZHANG X., WANG Z., LI C. Chitosan-NAC Nanoparticles as a Vehicle for Nasal Absorption Enhancement of Insulin. **J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl Biomater**, v. 88B, p. 150–161, 2009. DOI: 10.1002/jbm.b.31161.

WADELL, C.; BJÖRK, E.; CAMBER, O. Permeability of porcine nasal mucosa correlated with human nasal absorption. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.18, p. 47–53, 2003.

WINTERGERST, U.; ROLINSKI, B.; BOGNER, J.R.; NOTHEIS, G.; GOEBEL, F.D.; ROSCHER, A.A.; BELOHRADSKY, B.H. Pharmacokinetics of zidovudine after rectal administration in human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.41, p. 1143-1145, 1997.

WOODLEY, J. Bioadhesion, new possibilities for drug administration? **Clin. Pharmacokinet**, v.40(2), p. 77-84, 2001.

8. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

8.1. BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

- Bolsa **PIBIC/CNPq**, com o projeto de pesquisa: “Desenvolvimento e caracterização de sistemas microemulsionados e cristais líquidos para administração intranasal de zidovudina”.

Período da bolsa: agosto/2007 a maio/2009.

- Bolsa **FAPESP**, com o projeto de pesquisa: “Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana para administração nasal de zidovudina”.

Período da bolsa: junho/2009 a julho/2011.

8.2. PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS

- IX Encontro da SBPMat, 2010. Ouro Preto, MG.
- XXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2010. Araraquara, SP
- 57º Jornada Farmacêutica da Unesp, 2010. Araraquara, SP
- XX Congresso Pan-Americano de Farmácia e do XIV Congresso de Federação Farmacêutica Sul-Americana, 2010, Porto Alegre, RS.
- XXI Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2009. São José do Rio Preto, SP.
- 56º Jornada Farmacêutica da Unesp, 2009. Araraquara, SP.
- XX Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2008. São José dos Campos, SP.
- 55º Jornada Farmacêutica da Unesp, 2008. Araraquara, SP.
- XIX Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2007. Botucatu, SP.
- 54º Jornada Farmacêutica da UNESP, 2007. Araraquara, SP
- XV Congresso Paulista de Farmacêuticos, 2007. São Paulo, SP
- 53º Jornada Farmacêutica da UNESP, 2006. Araraquara, SP.

8.3. TRABALHO PREMIADO

Menção - XIX Congresso Farmacéutico Argentino e XIII Congresso da Federação Farmacêutica Sul-Americana. Argentina, 2009.

8.4. PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

Carvalho F. C., Rocha e Silva H., Luz G. M., Barbi M. S., Landgraf D. S., Sarmento V. H. V., Chiavacci L. A., Gremião M. P. D. Rheological, mechanical and adhesive properties of surfactant containing systems designed as a potencial platform for drug delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. *In press*.

Carvalho, F. C., Barbi, M. S., Sarmento, V. H. V., Chiavacci, L. A., Netto, F. M., Gremião, M. P. D. Surfactant systems for nasal AZT delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62 (4), p. 430-439, 2010. DOI: 10.1211/jpp.62.04.0004

Carvalho, F. C., Sarmento, V. H. V., Chiavacci, L. A., Barbi, M. S., Gremião, M. P. D. Development and *in vitro* evaluation of surfactant systems for controlled release of zidovudina. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 2367-2374, 2010. DOI: JPS-09-550.R1(22005).

Carvalho F.C., Barbi M.S., Gremião M.P.D. Evaluation of the *in vitro* Release of AZT-Microemulsions by LC. **Chromatographia**. 2009. DOI 10.1365/s10337-009-1015-1.

8.5. TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

Magnani, C., Luz, G. M., Barbi, M. S., Pedreiro, L. N., Gremião, M. P. D. Avaliação das propriedades mucoadesivas de glicolato sódico de amido e polietilenoglicol 8000 em dispersões sólidas contendo dexametasona. **58ª Jornada Farmacêutica da Unesp**, Agosto de 2011.

Kiill, C. P., Barbi, M. S., Carvalho, F. C., Gremião, M. P. D. Avaliação e comparação das propriedades mucoadesivas de diferentes polímeros utilizando analisador de textura. **58ª Jornada Farmacêutica da Unesp**, Agosto de 2011.

Barbi M.S, Carvalho F.C., Cury B. S. F., Gremião, M.P.D. Ex vivo intranasal permeation study of chitosan based nanoparticles containing zidovudine. **8th International Congress of Pharmaceutical Sciences**, Agosto de 2011.

Barbi M. S.; Carvalho F. C.; Kiill C. P.; Gremião M. P. D. Mucoadhesive Evaluation of Chitosan Nanoparticles for Zidovudine Nasal Delivery, **IX Brazilian MRS Meeting**, Ouro Preto, outubro de 2010.

Barbi M. S.; Carvalho F. C.; Kiill C. P.; Gremião M. P. D. Nanopartículas de quitosana para administração nasal de AZT: caracterização, avaliação da eficiência de encapsulação e das propriedades mucoadesivas, **57º Jornada Farmacêutica da UNESP**, agosto de 2010.

Barbi M. S.; Carvalho F. C.; Kiill C. P.; Gremião M. P. D. Validação de metodologia analítica para determinação de AZT em nanopartículas de quitosana por cromatografia líquida de alta eficiência, **XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, agosto de 2010.

F. Carvalho, M. Barbi, T. Benini, I. Hatakeyama, M. Gremião. Surfactant-Lipid-based Mucoadhesive Drug Delivery System: Development and Characterization, **37th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society**, Oregon, USA, July, 2010.

M.S. Barbi, F.C. Carvalho, C. P. Kiill, M.P.D. Gremião. Chitosan/Tripolyphosphate Nanoparticles for Zidovudine Nasal Delivery, **37th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society**, Oregon, USA, July, 2010.

Barbi M. S.; Carvalho F. C.; Kiill C. P.; Gremião M. P. D. Chitosan nanoparticles for AZT nasal administration: particle size and zeta potential, **XX Congresso Pan-Americano de Farmácia**, Porto Alegre, maio de 2010.

Carvalho, F. C., Netto, F. M., Gremião, M. P. D., Barbi, M. S., Sarmiento, V. H. V. Sistemas surfactantes para potencial administración nasal de zidovudina: comportamiento de fases, reología y mocoaderción. In: **XIX Congresso Farmacêutico Argentino e XIII Congresso da Federação Farmacêutica Sul-Americana**, San Juan, Argentina, 2009.

Barbi, M. S., Gremião, M. P. D., Carvalho, F. C. Incorporação de quitosana em sistemas mucoadesivos estabilizados por PPG-5-CETETH-20: caracterização estrutural e reológica. In: **XXI Congresso de Iniciação Científica da Unesp**, São José do Rio Preto, 2009.

Barbi, M. S., Carvalho, F. C., Gremião, M. P. D. Caracterização reológica de sistemas contendo PPG-5-CETETH-20, ácido oléico e água: efeito da adição de quitosana In: **56º Jornada Farmacêutica da Unesp**, Araraquara, 2009.

Kiill, C. P., Barbi, M. S., Carvalho, F. C., Gremião, M. P. D. Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana para administração intranasal de fármacos de origem protéica. In: **56º Jornada Farmacêutica da Unesp**, Araraquara, 2009.

Barbi, M. S., Carvalho, F. C., Gremiao, M. P. D. Avaliação in vitro da mucoadesão de sistemas estabilizados por PPG-5-CETETH-20 através de testes reológicos. In: **56º Jornada Farmacêutica da Unesp**, Araraquara, 2009.

Barbi, M. S., Kiill, C. P., Carvalho, F. C., Gremião, M. P. D. Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana para administração intranasal de zidovudina In: **56º Jornada Farmacêutica da Unesp**, Araraquara, 2009.

Carvalho, F. C., Silva, H. R., Barbi, M. S., Sarmiento, V.H.V., Chiavacci, L. A., Netto, F. M., Gremião, M. P. D. Investigation of PPG-5-CETETH-20 and oleic acid systems mucoadesive properties by tensile strenght method. In: **36th CRS Annual Meeting & Exposition**, Dinamarca, 2009.

Barbi, M. S., Kiill, C. P., Carvalho, F. C., Gremião, M. P. D. Effect of chitosan on structure of bioadhesives systems stabilized with propoxyl 5 OP ethoxyl 20 0E cethyl alcohol. In: **7th International Congress oh Pharmaceutical Sciences**, Ribeirão Preto, 2009.

Barbi, M. S., Carvalho, F. C., Correa, B. C., Gremião, M. P. D. Desenvolvimento de sistemas bioadesivos contendo quitosana e tensoativo álcool cetílico etoxilado 20 OE e e propoxilado 5 OP In: **XX Congresso de Iniciação Científica da Unesp**, São José dos Campos, 2008.

Barbi, M. S., Carvalho, F. C., Correa, B. C., Gremião, M. P. D. Desenvolvimento de sistemas mucoadesivos contendo quitosana e tensoativo álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP In: **55º Jornada Farmacêutica da Unesp**, Araraquara, 2008.

Carvalho, F. C., Barbi, M. S., Souza, A. L. R., Gremião, M. P. D. Development and validation of a HPLC-method for determination of zidovudine In: **COLACRO XII**, Florianópolis, 2008.

Carvalho, F. C., Barbi, M. S., Sarmiento, V.H.V., Gremião, M. P. D. Influence of the water in rheological properties of microemulsions containing propoxyl 5 OP ethoxyl 20 OE cethyl alcohol for intranasal administration of AZT In: **6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology**. Barcelona, 2008.

Costa, M. A., Filho, J. C. R. F., Batista, S. M. A., Baldo, D. C., Barbi, M. S., Mastroianni, P. Avaliação da disponibilidade de medicamentos essenciais em farmácias e drogarias do município de Araraquara In: **XV Congresso Paulista de Farmacêuticos**, São Paulo, 2007.

Souza, J. S., Moraes, M. C. C., Barbi, M. S., Souza, P. F., Legramandi, V. H. P., Costa, G. T., Castro, C. C. H., Bradbury, C. M., Mastroianni, P., Farache Filho, A. Avaliação dos problemas relacionados a medicamentos no município de Araraquara In: **XV Congresso Paulista de Farmacêuticos**, São Paulo, 2007.

Barbi, M. S., Carvalho, F. C., Gremião, M. P. D. Desenvolvimento de sistemas potenciais para administração nasal de fármacos empregando o álcool cetílico etoxilado e propoxilado In: **54º Jornada Farmacêutica da Unesp**, Araraquara, 2007.

Carvalho, F. C., Sarmiento, V.H.V., Barbi, M. S., Gremião, M. P. D. Influência da água nas propriedades reológicas de sistemas coloidais contendo tensoativo álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP In: **XV Congresso Paulista de Farmacêuticos**, São Paulo, 2007.

Barbi, M. S., Carvalho, F. C., Gremião, M. P. D. Desenvolvimento de sistemas coloidais potenciais para administração nasal de fármacos empregando o álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP In: **XIX Congresso de Iniciação Científica da Unesp**, Botucatu, 2007.