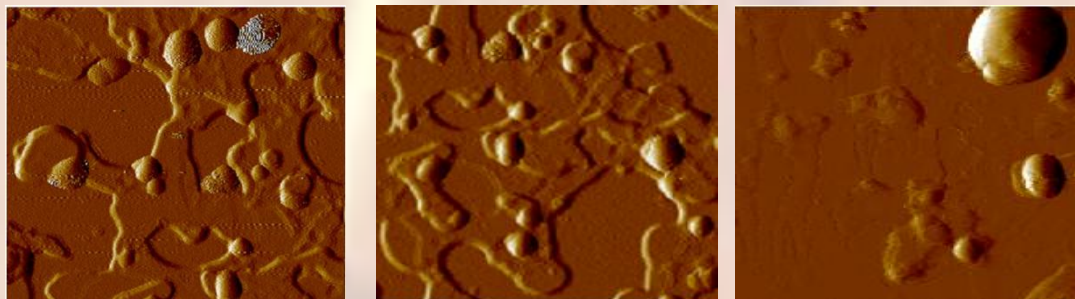


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO
(-)-TERPINEN-4-OL

NATÁLIA FERRI ANGELIERI



ORIENTADOR: Prof. Dra. Maria Virgínia C. Scarpa

ARARAQUARA – SP

2013

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

**OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS
CONTENDO (-)-TERPINEN-4-OL**

NATÁLIA FERRI ANGELIERI

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

ORIENTADOR: Prof. Dra. Maria Virgínia C. Scarpa

ARARAQUARA – SP

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNESP – Campus de Araraquara

Angelieri, Natalia Ferri
A582d Obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas contendo (-)-terpinen-4-ol /
Natalia Ferri Angelieri. – Araraquara, 2013
131 f.

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

Orientador: Maria Virgínia Costa Scarpa

1. Nanopartículas lipídicas solidas. 2. Terpinen-4-ol. 3. Liberação in vitro.
4. Tecnologia farmacêutica. I. Scarpa, Maria Virginia Costa, orient.. II. Título.

CAPES: 40300005

DEDICATÓRIA

*Ao meu pai **José Ricardo** (in memorian) e a minha mãe **Lilian** por todo apoio, amor, carinho e dedicação durante toda a minha formação e por me ensinarem a ir em busca dos meus sonhos e serem o meu porto seguro.*

*A minha avó **Shirley** (in memorian) e a meu avô **Helio** por todo amor, paciência, dedicação, apoio e por confiarem e acreditarem no meu potencial.*

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por sempre guiar meu caminho e não me desamparar, mostrando que os obstáculos são parte do nosso amadurecimento.

A minha família em especial meus pais Lilian e José Ricardo e a meus avós Shirley e Helio por todo incentivo, paciência e amor.

As minhas amigas Bruna, Carol, Liginha, Marília e Mariana, por sempre me mostrarem o verdadeiro significado da amizade.

A minha orientadora Prof. Dra. Maria Virgínia C. Scarpa por dar a oportunidade não apenas de conhecê-la com a profissional professora e pesquisadora, mas também por toda amizade e incentivo. Muito obrigada por acreditar no meu potencial e por toda sua dedicação como minha orientadora.

Aos meus colegas de laboratório Ana Claudia, Kamila, Márcia, Mirela e em especial a Fatiminha por toda a ajuda, companherismo, paciência e amizade. A Flávia Maccari e Eliete por me ensinarem a trabalhar com o HPLC e o permeador.

Ao pessoal do Controle Microbiológico, Andressa, Camila, Eliane, Flávia, Josi, Lucas e Thaisa pelas conversas e auxílios com o HPLC. Ao pessoal do laboratório de Ciências dos Materiais Aplicado a Farmácia (CMAF), Juliana, Eloísa, João e em especial a Nathalia pelas risadas e conversas. Aos colegas da Farmacotécnica Crisitane, Karisa, Fabíola, Fer Kolenyak, Gisela, Gustavo, Lilian, Marcela e Roberta pelas conversas, sugestões e auxílio.

A Prof. Dra Renata Fonseca Vianna por permitir o uso do *light scattering* e a técnica do laboratório Patrícia por me auxiliar no manuseio do equipamento.

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

Ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira pelo auxílio e atenção dada ao desenvolvimento deste projeto, bem como pela utilização do homogeneizador de alta pressão.

Ao Prof. Dr. Celso Santilli e ao Departamento de físico-química do Instituto de Química da UNESP-Araraquara pela utilização do DSC e TG. A técnica do laboratório Danúbia pela paciência e auxílio nas análises.

A Prof. Dra. Marisa Spirandeli Crespi e o Prof. Dr. Marcos Antônio Corrêa pelas sugestões na minha banca de qualificação.

A todos os técnicos e funcionários do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP- Araraquara, por toda a colaboração e auxílio, em especial as técnicas Margareth e Natália.

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

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização desta dissertação, meu agradecimento.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

RESUMO

A busca por novos fármacos, principalmente derivados de plantas medicinais tem sido alvo de estudo em busca de tratamentos mais eficazes para o câncer. MACCARI (2009) comprovou que o (-)-terpinen-4-ol (TERP) possui atividade contra células tumorais através de um estudo *in vitro* da atividade antiproliferativa. Durante as últimas décadas, os sistemas transportadores nanoparticulados têm sido objecto de pesquisa para a encapsulação de fármacos utilizados na terapia do câncer. Sabe-se que fármacos com baixa solubilidade em água, como o TERP, quando encapsulados em sistemas nanoparticulados, tendem a diminuir a sua degradação, permitem o controle de sua liberação, alteram sua biodistribuição, permitindo até que órgãos e tecidos alvos sejam atingidos. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo TERP. A NLS foi obtida pela técnica de homogeneização de alta pressão (HAP) que foi padronizada para a passagem da amostra por 10 ciclos a uma pressão de 7.200psi. A concentração de monoestearato de glicerila (GMS) que foi utilizado como lipídio foi pré-estabelecida para 5% e a proporção de tensoativo foi de 1:1 de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FSH), e poloxâmer 188 (P-188) na concentração de 3%. O estudo de estabilidade preliminar com o TERP frente ao calor de 70°C pela análise de TG, DSC e quantificação provou que o fármaco pode ser incorporado através da técnica de HAP. AS NLS 2,5 e NLS 5 apresentaram tamanho de partículas em escala nanométrica enquanto as NLS 10, NLS 15 e NLS 20 apresentaram partículas em escala nano e micrométrica. A análise de TG e DSC comprovou que em menores concentrações o TERP interage com o sistema encontrando-se em grande parte no interior da matriz o que promoveu um sistema de liberação prolongada para as NLS 2,5 e NLS 5, enquanto a NLS 20 teve um efeito *burst* elevado, liberando quase 80% do total de TERP presente na formulação. A caracterização morfológica confirmou os resultados obtidos pela técnica de espectroscopia de fotocorrelação, pois as NLS placebo e NLS 2,5 apresentaram apenas nanopartículas enquanto as NLS 20 apresentaram a formação de outros agregados em escala micrométrica, assim como, grande quantidade de fármaco fora da matriz lipídica. As NLS 2,5, NLS 5 e NLS 20 apresentaram perfil de liberação *in vitro* segundo o modelo matemático de Weibull, sendo que o transporte de TERP através das NLS ocorre por um processo de erosão seguido de difusão do fármaco. Com a incorporação do TERP em baixas concentrações foi possível melhorar a estabilidade térmica do TERP, o que favorece e torna as NLS contendo TERP um alvo potencial para o estudo da atividade farmacológica na terapia do câncer.

ABSTRACT

The search for new drugs, mostly derived from medicinal plants has been studied in search of a more effective treatment for cancer. MACCARI (2009) proved that the drug (-)-terpinen-4-ol (TERP) has activity against tumor cells through an *in vitro* study of antiproliferative activity. During the last decades nanoparticulate carrier systems have been the subject of research for the encapsulation of drugs used in cancer therapy. It is known that drugs with low aqueous solubility, as the TERP, when encapsulated in nanoparticle systems, tend to decrease their degradation, allow control release, alter biodistribution, even allowing targets organ and tissue are achieved. The objective of this work was the development and characterization of solid lipid nanoparticles (NLS) containing TERP. The NLS was obtained by high pressure homogenization (HAP) technique which has been standardized for the passage of the sample for 10 cycles at a pressure of 7.200psi. The lipid concentration which was the glyceril monostearate (GMS) was pre-stipulated to 5% and the proportion of surfactant consisting of 1:1 ratio of hydrogenated soy phosphatidilcholine (FSH) and poloxamer 188 (P-188) in surfactant concentration of 3%. The preliminary stability study of the TERP in front of the heating at 70 ° C by TG and DSC analysis and also the quantification proved that the drug can be incorporated using the HAP technique. The NLS 2,5 and NLS 5 showed particle size in the nanometer range while the NLS10, NLS 15 and NLS 20 showed particles in nano and micrometer size. The TG and DSC analysis showed that at lower concentrations, the TERP interacts with the system and is found in large quantity inside the lipid matrix which promoted a prolonged release for NLS 2,5 and NLS 5 system, while NLS 20 had a high *burst* effect, releasing about 80% of the total amount of TERP present in the formulation. Morphological characterization confirmed the results obtained by the *light scattering* technique because the NLS placebo and NLS 2,5 showed only nanoparticles while the NLS 20 showed aggregates formation in microparticles scale, as well as a large amount of drug outside of the lipid matrix. The NLS 2,5, NLS 5 and NLS 20 showed an *in vitro* release profile according to Weibull mathematical model, and the transport of TERP from the NLS occurs through a process of erosion followed by diffusion of the drug. With the incorporation of TERP in low concentrations it was possible to improve the thermal stability of TERP, which facilitates and makes the NLS -containing TERP a potential target for the pharmacological activity study in cancer therapy.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

CC% – capacidade de carga

CV – coeficiente de variação

DP – desvio padrão

DPR – desvio padrão relativo

DSC – calorimetria diferencial exploratória

EE% – eficiência de encapsulação

FMA – microscopia de força atômica

FSH – fosfatidilcolina de soja hidrogenada

GMS – monoestearato de glicerila

HAP – homogeneização de alta pressão

NLS – nanopartículas lipídicas sólidas

P-188 – poloxamer 188

PDI – índice de polidispersidade

PTFE – Politetrafluoretileno (Teflon ®)

PZ – potencial zeta

TERP – (-)-terpinen-4-ol

TG – termogravimetria

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de incorporação de fármaco nos três tipos de NLS.....	26
Figura 2: Monoestearato de glicerila	28
Figura 3: Poloxamer 188.....	28
Figura 4: Fosfatidilcolina.....	29
Figura 5: Estrutura química do (-)-terpinen-4-ol	32
Figura 6: Dispositivo de ultrafiltração utilizado no ensaio de eficiência de encapsulação das NLS.....	48
Figura 7: Cromatograma referente à análise da NLS sem fármaco	57
Figura 8: Cromatograma referente à solução padrão de 50µg.ml ⁻¹ de TERP.....	58
Figura 9: Curva analítica do TERP em fase móvel, equação da reta (y) coeficiente de correlação (R ²).....	59
Figura 10: Curva analítica do TERP em água, equação da reta (y) coeficiente de correlação (R ²).....	60
Figura 11: Curva analítica do TERP em solução de cloreto de sódio 0,9% com 1 % de polissorbato 80, equação da reta (y) coeficiente de correlação (R ²).....	61
Figura 12: Comparação entre tamanho de partícula e PDI das formulações F4, F5 e F6 em relação ao número de ciclos aplicados na técnica de HAP com pressão de 7.200 psi.....	67
Figura 13: Comparação entre tamanho de partícula e PDI das formulações F4, F5 e F6 submetidas a 5 ciclos no HAP em relação à pressão aplicada.....	69
Figura 14: Comparação entre tamanho de partícula e PDI das formulações F4, F5 e F6 submetidas a 10 ciclos no HAP em relação à pressão aplicada.....	69
Figura 15: Comparação entre tamanho de partícula e PDI da amostra submetida a 10 ciclos com pressão de 7.200psi contendo a proporção de P-188:FSH de 1:1	71
Figura 17: Distribuição do tamanho de partícula das NLS 2,5	75

Figura 16: Distribuição do tamanho de partícula das NLS placebo	75
Figura 19: Distribuição do tamanho de partícula das NLS 10.....	75
Figura 18: Distribuição do tamanho de partícula das NLS 5.....	75
Figura 21: Distribuição do tamanho de partícula NLS 20	75
Figura 20: Distribuição do tamanho de partícula NLS 15	75
Figura 22: Curva DSC do TERP.....	84
Figura 23: Curva TG do TERP	85
Figura 24: Curva DSC Isoterma do TERP por 30 minutos a $80 \pm 2,57^{\circ}\text{C}$	86
Figura 25: Curva DSC da matéria prima GMS: (a) Aquecimento; (b) Resfriamento.	87
Figura 26: Curva DSC da mistura binária de GMS/TERP: (a) Aquecimento; (b) Resfriamento.	87
Figura 27: Curva TG da matéria prima GMS	90
Figura 28: Curva DSC da matéria prima P-188: (a) Aquecimento; (b) Resfriamento	91
Figura 29: Curvas DSC da mistura binária P-188/TERP: (a) Aquecimento; (b) Resfriamento	92
Figura 30: Curva TG da matéria prima P-188	93
Figura 31: Curva DSC da matéria prima FSH: (a) Aquecimento; (b) Resfriamento.....	94
Figura 32: Curva DSC da mistura binária de FSH/TERP: (a) Aquecimento; (b) Resfriamento	96
Figura 33: Curva TG da matéria prima FSH	98
Figura 34: Curva DSC da mistura física da formulação F5 (a) Aquecimento; (b) Resfriamento.....	99
Figura 35: Curva DSC da mistura física da formulação F5 com TERP (a) Aquecimento; (b) Resfriamento.....	101

Figura 36: Curva TG da mistura física placebo (a) e da mistura física contendo 2,5% e 20% de TERP (b)	102
Figura 37: Curva DSC da NLS placebo (a) Aquecimento ; (b) Resfriamento	104
Figura 38: Curva DSC das NLS contendo TERP (a) Aquecimento; (b) Resfriamento.....	105
Figura 39: Curva TG das NLS (a) NLS placebo; (b) NLS 2,5 e NLS 20	107
Figura 40: Imagem de amplitude de AFM da amostra de NLS placebo (a) escala de 5 μ m; (b) escala de 1 μ m.....	110
Figura 41: Imagem topografica da amostra de NLS placebo na escala de 5 μ m.....	110
Figura 42: Imagem de amplitude de AFM da amostra de NLS 2,5 na escala de 1 μ m.	111
Figura 43: Imagem topografica da amostra de NLS 2,5 na escala de 1 μ m.	113
Figura 44: Imagem de amplitude da amostra de NLS 20 na escala de 3 μ m.....	113
Figura 45: Imagem topografica da amostra NLS 20 na escala de 3 μ m.	114
Figura 46: Imagem de amplitude da amostra de NLS 20 (a) escala de 10 μ m; (b) escala de 4 μ m.	115
Figura 47: Perfil de liberação de TERP a partir das formulações NLS 2,5, NLS 5 e NLS 20.	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados da curva analítica em fase móvel.....	59
Tabela 2: Resultados obtidos no estudo de estabilidade do TERP frente ao armazenamento em estufa a temperatura controlada de 70°C por um período de 24 horas	62
Tabela 3: Tamanho médio e PDI das NLS obtidas para avaliação da proporção de P-188:FSH	64
Tabela 4: Tamanho médio e PDI das NLS obtidas para avaliação do número de ciclos aplicados na técnica de HAP.....	66
Tabela 5: Tamanho médio e PDI das NLS obtidas para avaliação da pressão aplicada na técnica de HAP por 5 e 10 ciclos	68
Tabela 6: Tamanho médio e Pdi das NLS obtidas para avaliação da concentração de tensoativo com as proporções de 1:1 de P-188 e FSH.....	71
Tabela 7: Composição das formulações de NLS contendo TERP.....	73
Tabela 8: Tamanho de partícula e PDI das NLS obtidas com diferentes concentrações percentuais de TERP	73
Tabela 9: Potencial zeta da NLS placebo e das NLS com TERP	76
Tabela 10: Quantidade de TERP recuperada na validação do dispositivo de ultrafiltração ...	78
Tabela 11: Resultados obtidos para a eficiência de encapsulação (EE%), capacidade de carga (CC%), perda e rendimento no processo de obtenção das NLS com TERP.....	80
Tabela 12: Resultados obtidos do tamanho de partícula, índice de polidispersidade (PDI), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulação (EE) das NLS contendo TERP.....	82
Tabela 13: Dados de DSC para a mistura binária GMS/TERP	89
Tabela 14: Dados de DSC para a mistura binária P-188/TERP.....	93
Tabela 15: Dados de DSC para a mistura binária FSH/TERP.....	97
Tabela 16: Dados de DSC para a mistura física da formulação F5 com TERP.....	100

Tabela 17: Dados de DSC para a NLS com TERP	104
Tabela 18: Liberação do TERP a partir da formulação NLS 2,5	117
Tabela 19: Liberação do TERP a partir da formulação NLS 5	117
Tabela 20: Liberação do TERP a partir da formulação NLS 20	118
Tabela 21: Coeficiente de correlação (R^2) calculado pelo ajuste de cada modelo matemático: zero ordem, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-peppas, Weibull e Hixon-Crowell.....	119

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)	21
1.1.1. Métodos de desenvolvimento das NLS	22
1.1.2. Tipos de NLS.....	25
1.1.3. Componentes das NLS estudadas.....	27
1.2. NLS na terapia do câncer.....	30
1.3. (-)-terpinen-4-ol (TERP).....	31
1.5. NLS contendo óleo essencial.....	33
2. OBJETIVO.....	36
2.1. Objetivo geral	36
2.2. Objetivos específicos	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1. Materiais	38
3.2. Métodos	40
3.2.1. Metodologia analítica para quantificação do TERP por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	40
3.2.2. Estudo de estabilidade do TERP frente ao calor aplicado na técnica de HAP	43
3.2.3. Obtenção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS).....	43
3.2.4. Estudo de caracterização das NLS.....	45
3.2.5. Estudo de estabilidade das NLS-TERP	50
3.2.6. Estudo de análise térmica	51
3.2.7. Análise morfológica das NLS.....	53
3.2.8. Determinação do perfil de liberação “ <i>in vitro</i> ”	54

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1. Quantificação do TERP por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	57
4.2. Estudo de estabilidade do TERP frente ao calor aplicado na técnica de HAP	61
4.3. Obtenção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS).....	63
4.3. Estudo de caracterização das NLS.....	74
4.3.1. Análise de tamanho de partícula.....	74
4.3.2. Análise de potencial zeta (PZ).....	76
4.3.4. Eficiência de encapsulação (EE%) e capacidade de carga das NLS (CC%)	77
4.4. Estudo de estabilidade das NLS	81
4.5. Estudo de análise térmica	82
4.5.1. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) e Termogravimetria (TG)	82
4.6. Análise morfológica – Microscopia de força atômica (AFM).....	109
4.7. Determinação do perfil de liberação in vitro do TERP.....	115
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO.....	122
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, com exceção de alguns cânceres, como no caso de tumores de mama, cujo tratamento pode ser realizado com imunoterapia ou hormônio terapia, os fármacos citotóxicos compõem a classe terapêutica de maior relevância na terapia contra o câncer, atuando principalmente através da destruição de células de crescimento e divisão acelerada, o que é considerado uma das principais características e meios de proliferação de células tumorais (McGUIRE, 2003).

Sabe-se que esses fármacos são administrados principalmente pela via intravenosa através de infusão ou bolus, tipicamente em uma solução de fármaco livre. Apesar de sua longa história de uso e do desenvolvimento de vários regimes de tratamento, os mesmos continuam não sendo plenamente eficazes; sendo os principais obstáculos para quimioterapia convencional do câncer a elevada toxicidade, baixa seletividade e a suscetibilidade dessas células cancerígenas em adquirir resistência a esses fármacos (WONG *et al.*, 2007).

Assim, derivados de plantas medicinais e extratos vegetais têm sido alvo de pesquisa na busca de novos fármacos para a terapia do câncer. O (-)-terpinen-4-ol, isômero negativo do terpeno derivado do metabolismo secundário de algumas plantas como a *Melaleuca alternifolia*, provou ser capaz de atuar contra linhagens celulares de câncer de mama, melanoma e colon-retal (MACCARI, 2009).

Durante as últimas décadas, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas com sistemas compostos de micro e nanopartículas para liberação de fármacos, sendo estes muitas vezes estudados com a finalidade de superar os principais obstáculos relacionados à quimioterapia convencional para o tratamento do câncer.

A encapsulação de fármacos em sistemas coloidais tem sido uma das alternativas aplicadas para fármacos de baixa solubilidade em meio aquoso, como o (-)-terpinen-4-ol (TERP). Este sistema transportador tem capacidade de evitar a degradação dos fármacos quando em contato com os fluidos biológicos, além de promover a possibilidade de manipular a liberação e alterar a biodistribuição desse fármaco, permitindo até mesmo que órgãos e tecidos alvos sejam atingidos (ALLEN & CULLINS, 2004; GUPTA, 1990).

Assim, as nanopartículas têm sido um sistema de liberação controlada de alto potencial para a incorporação de fármacos, sendo classificadas de acordo com o material ou veículo transportador utilizado. Os sistemas poliméricos e lipídicos são os mais conhecidos.

Sistemas nanoparticulados poliméricos são principalmente desenvolvidos através de métodos que requerem o uso de solventes orgânicos que devem ser removidos completamente da formulação final; no entanto, essa remoção não ocorre de forma plena. Outra desvantagem está diretamente relacionada com o material polimérico utilizado, pois muitos possuem potencial toxicológico e a administração rotineira tende a produzir metabólitos tóxicos, devido à lenta biodegradação destes polímeros (ALLE'MANN, GURNY e DOELKR, 1993).

As nanoemulsões lipídicas são muito utilizadas como fonte de calorias para nutrição parenteral, e vem sendo extensivamente pesquisadas como sistema transportador de fármaco, contudo, têm sido relatados muitos problemas e dificuldades relacionadas à coalescência, aumento do tamanho de partícula e vazamento de fármaco (COLLINS-GOLD, LYONS e BARTHOLOW, 1990; WASHINGTON, 1996; WRETILIND, 1981).

Assim, as nanopartículas lipídicas sólidas surgiram a fim de evitar os problemas relacionados a estes sistemas coloidais, além de conciliar suas vantagens, como a facilidade de escalonamento das nanoemulsões e a presença de uma matriz sólida capaz de incorporar o

fármaco e impedir seu vazamento, o que comumente ocorre em sistemas coloidais poliméricos (WONG et al, 2007).

1.1. Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)

As NLS são partículas coloidais presentes em uma matriz lipídica que na temperatura corpórea encontram-se no estado sólido. Normalmente, são compostas por lipídios (ácidos graxos, ésteres graxos, glicerídeos e ceras biodegradáveis), tensoativos (anfóteros, não iônicos, aniônicos e catiônicos) e fármaco, podendo também ser adicionado um co-tensoativo a formulação (MUHLEN, SCHAWRZ e MEHNERT, 1998). Esses sistemas coloidais apresentam diâmetros entre 50 a 1000nm. A fase externa da NLS é composta pelo tensoativo, água e co-tensoativo e a fase interna pela matriz lipídica onde o fármaco encontra-se disperso (MANJUNATH, REDDY e VENKATESWARLU, 2005).

Desde sua descoberta tem sido objeto de pesquisa como um sistema de liberação controlada de fármacos administrados por diferentes vias, como a oral, parenteral, tópica, retal, entre outras (WONG *et al.*, 2007).

Esse veículo tem sido proposto como alternativa para outros sistemas de liberação controlada, como as emulsões lipídicas, lipossomas e nanopartículas poliméricas (WONG *et al.*, 2007). Suas vantagens em proporção aos demais sistemas estão relacionadas a possibilidade de liberação sustentada de fármacos; a possibilidade de incorporar fármacos lábeis e sensíveis a degradação e coalescência; menor toxicidade por serem produzidas com lipídios fisiologicamente compatíveis e biodegradáveis e devido a imobilização do fármaco na matriz lipídica, não havendo risco de vazamento de fármaco, o que é comumente observado em lipossomas e nanoemulsões. Outras vantagens estão ligadas a possibilidade de

produção em larga escala, a esterelização e principalmente, permite a incorporação de fármacos lipofílicos e hidrofílicos (KIPP, 2004; MEHNERT e MÄDER, 2001).

Diante destas qualidades as NLS têm se tornado alvo atrativo para liberação de agentes quimioterápicos para o tratamento de câncer (WONG *et al.*, 2007).

1.1.1. Métodos de desenvolvimento das NLS

As NLS podem ser obtidas através de diferentes métodos já descritos na literatura, entre eles: microemulsão a quente, dupla emulsificação, emulsificação e evaporação de solvente, difusão de solvente, homogeneização a quente empregando alto cisalhamento e/ou ultrassom, homogeneização à alta pressão (HAP), entre outros.

Microemulsão

Método desenvolvido por Gasco (1993), no qual o lipídio é fundido a uma temperatura de 5 a 10°C acima de seu ponto de fusão. Uma solução aquosa de tensoativo e co-tensoativo na mesma temperatura é vertida sobre a fase oleosa formando uma microemulsão. Esta microemulsão a quente é dispersa em um volume adequado de água gelada com temperatura de 2 a 3°C sob agitação vigorosa. O excesso de água presente na formulação é retirado através da técnica de liofilização ou ultrafiltração com membrana de diálise. Este método de obtenção das NLS é indicado para a encapsulação de fármacos lipofílicos, entretanto, fármacos hidrofílicos também podem ser encapsulados através do desenvolvimento de uma emulsão inicial A/O/A ao invés de uma simples emulsão O/A (HOU *et al.*, 2003; MEHNERT & MÄDER, 2001; PEDERSEN *et al.*, 2006).

Método de dupla emulsão a/o/a

O método de dupla emulsificação é muito utilizado para incorporação de fármacos hidrofílicos, no qual uma solução contendo alta concentração de fármaco é dispersa na fase oleosa composta do lipídio previamente fundido e tensoativo, formando-se uma emulsão O/A. Esta primeira emulsão é subsequentemente dispersa em uma solução aquosa contendo outro tensoativo sob vigorosa agitação, formando-se finalmente uma emulsão A/O/A. Esta emulsão a quente é dispersa em água gelada e agitada vigorosamente para a obtenção das NLS (WONG *et al.*, 2007).

Emulsificação e evaporação do solvente

Nessa técnica faz-se necessário a utilização de solvente orgânico imiscível com a água, no qual o lipídio é solubilizado. Esta solução orgânica contendo o lipídio tem o solvente evaporado em baixa pressão e através da precipitação do lipídio no meio aquoso a dispersão de NLS é formada. Este método é muito utilizado para a incorporação de fármacos termolábeis, pois não há necessidade de aplicação de calor durante o processo de obtenção das nanopartículas (MEHNERT & MÄDER, 2001; MENDOZA *et al.*, 2009). Sua desvantagem está diretamente relacionada à presença residual de solvente orgânico na dispersão final (WISSING, KAYSERB e MÜLLER, 2004).

Difusão de solvente

O solvente aplicado nesta técnica é parcialmente miscível com a água e para aquisição de um equilíbrio termodinâmico entre os líquidos, o mesmo é saturado pela água. O lipídio é dissolvido nesta solução que em seguida é dispersa e emulsificada sob agitação em uma solução aquosa saturada de tensoativo em temperatura acima do ponto de fusão do lipídio. A

obtenção da dispersão de NLS ocorre após a evaporação do solvente orgânico em baixa pressão (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2008; MENDOZA *et al.*, 2009). Este método apresenta como principal desvantagem a dificuldade de desenvolvimento em larga escala e a presença residual de solvente orgânico no produto final (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2008; HU, JIANG e DU, 2005; HU *et al.*, 2006).

Homogeneização a quente empregando alto cisalhamento e/ou ultrassom

O lipídio fundido é disperso em uma solução aquosa com a ajuda de um homogeneizador de alto cisalhamento como o Ultra-turrax e/ou sonicador. A emulsão obtida é resfriada em temperatura ambiente. Essa técnica de preparo das NLS é altamente difundida tanto por cisalhamento quando por ultrassonicação, pois ambas são de fácil manuseio. No entanto, as dispersões obtidas normalmente são comprometidas pela presença de partículas e micropartículas (MEHNERT & MÄDER, 2001; MENDOZA *et al.*, 2009).

Homogeneização de alta pressão (HAP)

Em relação às demais técnicas, o método é de fácil escalonamento, já que homogeneizadores de diferentes tamanhos estão disponíveis comercialmente.

As NLS podem ser preparadas por esta técnica por dois métodos básicos: homogeneização à quente e homogeneização à frio (ATTAMA e MÜLLER-GOYMANN, 2008).

Na técnica de HAP à quente, o fármaco encontra-se na fase oleosa onde é disperso ou dissolvido no lipídio fundido a uma temperatura de 5 a 10°C, acima do seu ponto de fusão. Uma solução aquosa composta de tensoativo é aquecida à mesma temperatura e dispersa sob a fase oleosa através de agitação, formando-se uma pré-emulsão O/A. A HAP é então

aplicada nesta pré-emulsão com a finalidade de obter-se uma nanoemulsão que ao ser resfriada promove a recristalização do lipídio formando a dispersão de NLS (MEHNERT & MADER, 2001). Este método é utilizado principalmente no encapsulamento de fármacos lipofílicos.

A técnica de HAP à frio é indicada para fármacos hidrofílicos, na qual o fármaco é disperso ou dissolvido no lipídio fundido com a presença ou não de um tensoativo. Essa mistura é solidificada através de gelo seco ou nitrogênio líquido e passada por moagem para a obtenção de micropartículas de tamanho de aproximadamente 50 a 100µm. As micropartículas obtidas são dispersas em uma solução aquosa de tensoativo a frio e emulsionadas sob agitação para a obtenção da pré-emulsão. Finalmente esta pré-emulsão é passada pelo homogeneizador de alta pressão em temperatura próxima a 0°C ou em temperatura ambiente, obtendo-se as NLS (MEHNERT & MÄDER, 2001)

Deve-se ressaltar que a técnica de HAP à frio tende a produzir partículas de tamanhos maiores e um sistema mais heterogêneo do que as NLS obtidas pela técnica de HAP á quente (MEHNERT & MÄDER, 2001; MENDOZA *et al.*, 2009).

1.1.2. Tipos de NLS

Na literatura, existem três modelos de NLS descritos para explicar os mecanismos de incorporação do fármaco: em uma matriz homogênea (solução sólida), cápsula rica em fármaco e núcleo rico em fármaco (Figura 1) (MÜLLER, MÄDER e GOHLA, 2000).

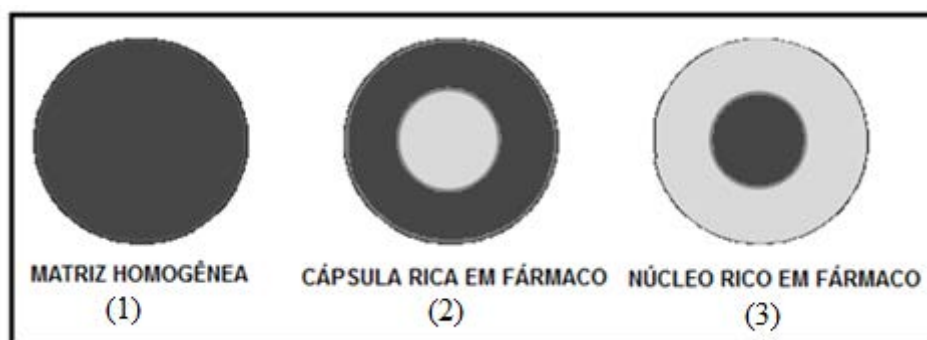


Figura 1: Modelo de incorporação de fármaco nos três tipos de NLS

O primeiro modelo de NLS (1), mostra uma matriz lipídica na qual o fármaco encontra-se molecularmente disperso, ou seja, o fármaco e o lipídio formam uma mistura mútua. Este tipo de partícula é comumente obtido através da técnica de HAP à frio. Os demais tipos de NLS são obtidos através de técnicas de obtenção das NLS à quente.

O segundo modelo (2), denominado cápsula rica em fármaco é caracterizada por uma camada externa rica em fármaco, ou seja, o fármaco encontra-se na superfície da matriz lipídica. Este modelo pode ocorrer devido a solubilidade do fármaco no tensoativo presente no meio aquoso quando o sistema encontra-se à quente durante o processo de desenvolvimento das NLS, o que possibilita que parte do fármaco deixe a matriz lipídica e se solubilize na fase aquosa. Neste caso, a matriz lipídica normalmente se recristaliza antes do fármaco devido ao seu maior ponto de recristalização, assim o fármaco ao invés de distribuir-se no interior da matriz lipídica, distribui-se na superfície. As NLS compostas pelo núcleo rico em fármaco (modelo 3) apresentam características de um sistema reservatório, o mesmo ocorre quando a precipitação do fármaco ocorre antes do lipídio no processo de recristalização (FRICKER *et al.*, 2010; MENDOZA *et al.*, 2009).

Sabe-se que os perfis de liberação de fármacos através da dispersão de NLS está diretamente relacionado com a sua localização nas nanopartículas, sendo que o modelo 2

(capsula rica em fármaco) pode promover um “efeito burst”, ou seja uma liberação imediata do fármaco. O modelo de NLS 3 (núcleo rico em fármaco) promovem uma liberação mais controlada. No entanto, a interação fármaco-lipídio também tem influência neste perfil de liberação, ou seja, quanto maior a interação, mais controlada é a liberação (KÜCHLER *et al.*, 2010; WONG, et al., 2007). O modelo 1 representando a matriz homogênea composta pela mistura fármaco e lipídio, também pode apresentar ambos os perfis de liberação.

Não apenas a localização do fármaco na NLS tem influência no perfil de liberação de fármacos através desse sistema, ou seja, o tipo de lipídio e tensoativo, assim como o método de obtenção das NLS podem afetar consideravelmente o processo de liberação do fármaco das NLS.

O processo de liberação de fármaco através de NLS normalmente ocorre por dois mecanismos, o primeiro acontece por um processo de difusão do fármaco através da matriz lipídica e o segundo pela degradação do lipídio (MENDOZA *et al.*, 2009).

1.1.3. Componentes das NLS estudadas

Monostearato de glicerila (GMS)

O GMS (figura 2) é um monoglicerídio considerado como tensoativo não-iônico de característica lipofílica que apresenta equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) igual a 3,8. Apresenta como característica funcional ser emoliente, solubilizante, estabilizante, agente lubrificante no desenvolvimento de comprimidos e cápsulas, e também pode ser utilizado como matriz lipídica no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos. É considerado um material não tóxico e não irritante, sendo amplamente utilizado em formulações para uso tópico e oral (ROWE, SHESKEY e QUIN, 2009).

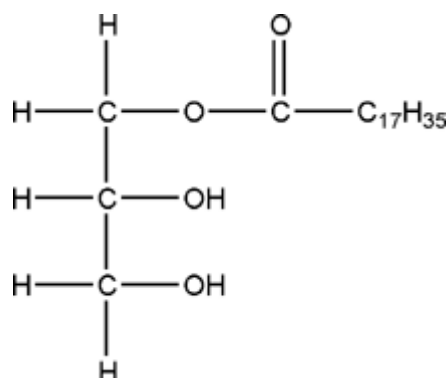


Figura 2: Monoestearato de glicerila

Poloxamer 188 (P-188)

O P-188 é um tensoativo hidrofílico não iônico constituído de copolímero de polioxietileno-polioxipropileno (figura 3), a porção hidrofóbica encontra-se no segmento de polioxipropileno enquanto a porção hidrofílica é representada pelo segmento de polioxietileno (ROWE, SHESKEY e QUIN, 2009).

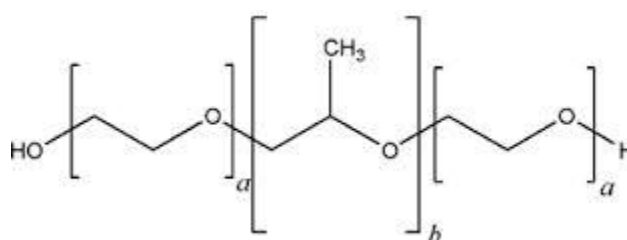


Figura 3: Poloxamer 188

Na área farmacêutica é utilizado como emulsionante em emulsões para nutrição parenteral, solubilizante, estabilizante, agente molhante em pomadas e supositórios, e como polímero para a formação de géis. O P-188 não é metabolizado pelo organismo e é

considerado atóxico, sendo licenciado pelo Food and Drug Administration (FDA) para administração intravenosa, oftálmica, pulmonar, tópica e oral (HOWE, et al., 2006).

Fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FSH)

Comumente utilizada em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos, como dispersante e estabilizante. Como adjuvante farmacotécnico pode ser utilizada para formas farmacêuticas injetáveis de administração intravenosa e intramuscular, dietas enterais e parenterais, e para a administração pulmonar e oftálmica (ROWE, SHESKEY e QUIN, 2009).

Como representado na figura 4, a estrutura química da fosfatidilcolina é composta por duas longas cadeias de hidrocarbonetos, caracterizando a porção apolar da molécula e também possui grupamentos zwitteriônicos polares. No entanto, a molécula é considerada lipofílica demais (EHL entre 3-4), para gerar estabilidade eletrostática plena as nanopartículas (PARK et al., 1999).

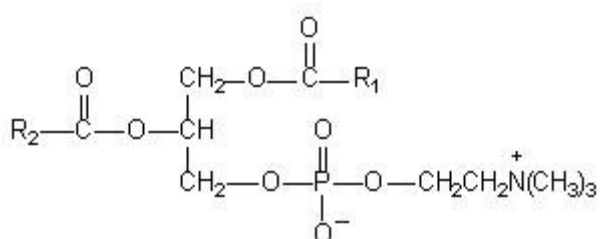


Figura 4: Fosfatidilcolina

1.2. NLS na terapia do câncer

As NLS além das vantagens citadas em 1.1., também podem favorecer a permeação de maior quantidade de fármaco em tumores sólidos, pois seu tamanho sub-micrométrico facilita a permeação destas nanopartículas no interior dos tumores, o que consequentemente aumenta a capacidade do sistema em driblar o sistema linfático tumoral, podendo diminuir os problemas resultantes da baixa especificidade relacionadas a fármacos citotóxicos e também o potencial destes tumores para desenvolvimento de resistência ao fármaco (XIAO YU WU, Y L. et al., 2007).

O sistema fagocitário constitui uma barreira importante a ser ultrapassada por esses transportadores de fármacos antes de atingirem os tumores, pois o mesmo reconhece essas nanopartículas como um objeto estranho e as remove do sistema circulatório de forma que as mesmas não são capazes de atingir os respectivos alvos. Contudo, estudos comprovam que transportadores de fármacos constituídos de polímeros hidrofílicos como os poloxamer, as poloxaminas ou o polietilenoglicol são capazes de ultrapassar a barreira fagocitária, pois esses polímeros quando presentes nas superfícies das NLS permitem a adsorção de proteínas de superfície e suprime a opsonização e consequentemente a fagocitose (XIAO YU WU, *et al.* 2007; HUANG, *et al.*, 2010). Assim o polímero de escolha para o desenvolvimento das NLS será o poloxamer 188, por ser um tensoativo não iônico, de baixa toxicidade e muito utilizado em formas farmacêuticas de uso parenteral (HUANG, *et al.*, 2010).

No desenvolvimento de NLS será empregado estrategicamente a fosfatidilcolina de soja hidrogenada com o intuito de produzir NLS com maior capacidade de encapsulação do fármaco e desenvolver um sistema que mimetize as células do organismo e não sofram a fagocitose (MULLER, OLBRICH e KAISER, 2002).

A escolha do monoestearato de glicerila como matriz lipídica foi devido ao seu baixo custo e a capacidade de formar matrizes lipídicas de lenta cristalização, devido ao tamanho de sua cadeia de ácido graxo (MULLER, *et al.*, 2002; WONG *et al.*, 2007).

1.3. (-)-terpinen-4-ol (TERP)

O TERP (figura 5) é o principal componente do óleo de *Melaleuca alternifolia*, mas também pode ser produzido pelo metabolismo secundário de outras plantas, como *Alpinia zerumbet*, *Camellia sinensis*, *Eucalyptus globulus*, *Laurus nobilis*, *Artemisia*, *Cinnamomum*, *Citrus*, *Cuminum*, *Cupressus*, *Cymbopogon*, *Lantana*, *Lippia*, *Myrsine*, *Origanum*, *Pimpinella*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Thymus*, entre outras (PRIEST & PRIEST, 2002; BETTONI, 2004; VIEIRA *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2005.). Possui atividade anti-inflamatória, antifúngica e antimicrobiana. Estudos *in vitro* demonstram eficácia da *Melaleuca alternifolia* e do (+)-terpinen-4-ol na inibição das células M14 do melanoma (CALCABRINI *et al.*, 2004). Outros autores demonstraram elevada citotoxicidade da *Melaleuca alternifolia*, que apresenta em sua composição aproximadamente 40% de terpinen-4-ol, em células cancerígenas do pulmão (A549), mama (MCF-7) e próstata (PC-3) (LIU, *et al.*, 2009).

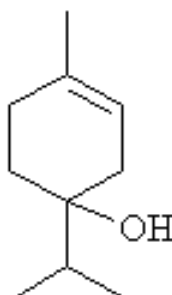


Figura 5: Estrutura química do (-)-terpinen-4-ol

Segundo MACCARI (2009), os estudos da atividade antiproliferativa do óleo de melaleuca, do isômero positivo e negativo do terpinen-4-ol, provaram que o isômero negativo do terpinen-4-ol ((-)-terpinen-4-ol), apresenta atividade citostática seletiva em câncer de mama (MCF-7 e GI50 = 44,6µg/ml), e moderado na linhagem celular de melanoma (UACC, GI 50 = 126,5µg/ml). Por outro lado o (-)-terpinen-4-ol apresenta efeito citostático fraco para linhagem celular de câncer colorretal (HT-29, GI50= 224,7 µg/mL) e leucemia (K-562, GI50= 250.00 µg/mL).

Sabe-se que muitas substâncias ativas de origem vegetal, como TERP, são compostos voláteis o que limita sua aplicação na área farmacêutica (SUN *et al.*, 2012). No entanto a encapsulação deste fármaco em sistemas coloidais como o proposto neste projeto pode favorecer a liberação controlada deste fármaco, assim como proteção e diminuição de volatilização.

Diante de pesquisa, foi comprovado que o TERP apresenta ponto de fulgor em torno de 90°C e ponto de ebulição acima de 200°C o que viabiliza a aplicação de aquecimento no momento de obtenção das NLS (SUN *et al.*, 2012).

1.5. NLS contendo óleo essencial

Atualmente vários trabalhos associando as NLS a óleos essenciais já foram publicados, muitos destes focados tanto na área de interesse farmacêutico como produtos para tratamento do câncer, micoses e infecções, assim como na área agrícola como herbicida (SINGH, 2011, PUGLIA, et al., 2012, SHI et al., 2012).

O terpinen-4-ol já foi incorporado a NLS por SUN e colaboradores (2012) com o objetivo de viabilizar um tratamento eficaz contra o biofilme produzido pelo microorganismo da *Candida Albicans*. As NLS foram produzidas pelo método de emulsificação e evaporação de solvente, com a finalidade de viabilizar a passagem do TERP através deste biofilme de característica hidrofílica, assim nas NLS foi utilizado como tensoativo hidrofílico o estearato de polietilenoglicol associado à glicina. Como resultado foi comprovado o aumento da efetividade do TERP no combate ao microorganismo através da ultrapassagem do biofilme pela NLS.

Outros óleos essenciais incorporados a NLS foram os óleos frankincense e myrrh derivados de espécies vegetais da família *Burceraceae* provinda do nordeste da África, que são muito utilizados na medicina tradicional chinesa. Atualmente, pesquisas revelaram sua atividade antitumoral, anti-inflamatória e no tratamento de doenças neurodegenerativas. Assim o objetivo do estudo de SHI, et al, (2012) foi incorporar estes óleos essenciais às NLS, a fim de viabilizar a administração oral do fármaco. As NLS foram obtidas pela técnica de homogeneização de alta pressão a quente no qual foi utilizado uma pressão de 800 bar por 6 ciclos. As partículas obtidas tiveram tamanho unimodal de aproximadamente 120 nm e a eficiência de encapsulação foi acima de 90%.

O óleo essencial de *Nigella Sativa L.* também foi incorporado a NLS pelo método de homogeneização à quente empregando alto cisalhamento pelo uso do Ultra-Turrax, a fim de viabilizar uma maior permeação cutânea do fármaco (ALHAJ, et al, 2010).

Em razão da atividade antitumoral comprovada do TERP e de sua insolubilidade em meio aquoso, é de grande relevância o desenvolvimento tecnológico de sistemas de administração como as dispersões de NLS, a fim de viabilizar um potencial sistema para a terapia do câncer.

_____ *Objetivo*

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto é desenvolver e caracterizar nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo o fármaco (-) -terpinen-4-ol (TERP).

2.2. Objetivos específicos

1. Obter NLS contendo TERP;
2. Caracterização físico-química das NLS;
3. Avaliar a interação fármaco e NLS desenvolvidas;
4. Avaliar a estabilidade do TERP nas NLS;
5. Avaliar o perfil de liberação “*in vitro*” do TERP a partir das NLS.

Materiais e
métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Reagentes

- Acetonitrila grau HPLC, J T Barker;
- Água ultra pura;
- Cloreto de sódio, Merck;
- Fosfatidilcolina de soja hidrogenada (Epikuron 200SH), Lucas Meyer;
- Membrana de acetato de celulose 0,45 µm, Sigma-Aldrich;
- Metanol grau HPLC, J T Barker;
- Monoestearato de glicerila, Synth;
- Polissorbato 80 (Tween[®] 80), Vetec;
- Poloxamer 188, (Lutrol[®] F68), BASF;
- Propilenoglicol, Vetec;
- Tetrahydro furantoina grau HPLC J T Baker;
- (-)-terpinen-4-ol, Sigma-Aldrich;
- α-alumina., Sigma-Aldrich.

Equipamentos

- Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Agilent modelo 1100, detector Uv-vis;
- Analisador de partículas por *Light Scattering*- Zetasizer ZS90 Malvern Instruments;
- Balança analítica, METTLER[®], modelo H51;

- Balança semi-análitica Sartorius BP 210S;
- Balança termoanalítica TA Instruments, modelo SDT-Q600;
- Banho de ultrasom, Branson, modelo 1210;
- Bomba a vácuo, Tecnal – TE – 058;
- Célula calorimétrica TA Instruments, modelo DSC – Q100;
- Centrífuga Fisher modelo 255;
- Coluna Agilent Eclipse XDB, 4,6 x 250mm, 5µm;
- Dispositivo de ultrafiltração AMICON® ultra, ultracel -100k (Millipore);
- Estufa Fabbe;
- Filtros descartáveis para seringas de membrana de teflon (PTFE), porosidade 0,45 µm, HVLPO4700, Millipore;
- Homogeneizador de Alta Pressão Nano Debee 45-1;
- Liofilizador Thermo Fisher Scientific, modelo micromodulyo-115;
- Microett HANSON 0700-1251;
- Microscópio de Força Atômica Bruker-Dimension Icon Scan Asyst do Instituto de Física de São Carlos.
- Termômetro Inconterm;
- Ultracentrifuga ThermoScientific, modelo – Sorvall Biofuge Stratos;
- pHmetro Micronal;
- Purificador de água (Milli-Q Plus - Millipore®);
- Software HP Chemstation;
- Software Origin 8.1;
- Software TA Instruments Universal Analysis 2000.

3.2. Métodos

3.2.1. Metodologia analítica para quantificação do TERP por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Condições cromatográficas

Com o objetivo de quantificar o TERP nos ensaios de análise de teor, estabilidade, eficiência de encapsulação, capacidade de carga e de liberação “*in vitro*”, curvas analíticas em fase móvel, em água e em solução receptora foram obtidas.

A metodologia utilizada foi previamente validada por MACCARI (2009), baseada no método proposto por Nielsen & Nielsen (2006), porém com modificações relacionadas à vazão da fase móvel e a coluna cromatográfica. As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent modelo 1100, com detector Uv-Vis, empregando uma coluna C18 Agilent Zorbax Eclipse XDB, 4,6 X 250 mm, 5µm. A fase móvel foi composta de acetonitrila: água ultra pura (55:45), com vazão de 1 mL.min⁻¹, injeção de 30 µL e detecção no comprimento de onda de 200 nm. A fase móvel foi preparada e filtrada em membrana de teflon (PTFE) de 0,45 µm (HVLPO 4700, Millipore) e degaseificada durante 30 minutos em banho de ultrassom (Branson, modelo 1210).

Especificidade

A fim de garantir que os componentes da NLS não iriam interferir na quantificação do TERP durante os ensaios, amostras sem o fármaco foram comparadas a uma solução padrão de TERP de 50 µg.mL⁻¹. Para isso 0,1 g de NLS (placebo) foram pesadas em balança analítica e transferidas para um balão volumétrico de 10 ml. O volume foi completado com

tetrahidro furantoína (THF) e a solução foi homogeneizada até completa solubilização das NLS. Uma alíquota de 5 mL da solução placebo foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com fase móvel, obtendo-se uma solução final de 1mg.mL^{-1} de NLS.

Todas as amostras foram filtradas em membrana filtrante de PTFE $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (HVLPO 4700, Millipore) e analisadas em triplicata.

O THF foi o solvente de escolha para solubilizar as NLS placebo, pois os demais solventes orgânicos como o metanol e ACN apenas precipitavam o lipídio, o que inviabilizaria a continuidade do ensaio.

Curva analítica em fase móvel

A curva analítica em fase móvel foi utilizada com a finalidade de avaliar o teor de fármaco frente à condição de estresse gerada pela aplicação de calor pela técnica de homogeneização de alta pressão (HAP) à quente.

A curva analítica foi expressa em função da média dos valores obtidos na análise de doze concentrações diferentes do analito 2, 4, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 300, 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em triplicata.

As soluções estoques foram preparadas na concentração de $1,0\text{ mg.mL}^{-1}$, na qual 50 mg do fármaco foi pesado em balança analítica, e transferido para um balão de 50 mL e completado o volume com fase móvel. Estas soluções foram diluídas para a obtenção das soluções de trabalho. Cada solução de trabalho foi filtrada em membrana filtrante de PTFE $0,45\mu\text{m}$ (HVLPO 4700, Millipore) e analisadas em triplicata.

De acordo com as médias dos valores das áreas obtidas e das concentrações analisadas para as três curvas analíticas, determinou-se a equação da reta através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Para a curva analítica ser considerada linear, o coeficiente de correlação (R) deve ser no mínimo 0,99, e o desvio padrão relativo (DPR) da média tanto do intercepto com o eixo y como da inclinação da equação da regressão linear das curvas não devem ultrapassar 5% (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Curva analítica em solução receptora

Para o ensaio de liberação "*in vitro*", foi construída uma curva analítica em solução receptora (Solução de cloreto de sódio 0,9% contendo 1% de polissorbatato 80) utilizando em triplicata concentrações de 2 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O resultado obtido para a curva analítica foi expresso com as médias das áreas obtidas das curvas analíticas, sendo que todas as injeções foram feitas em triplicata.

Curva analítica em água

Uma curva analítica em água nas mesmas concentrações (2 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) também foi construída com a finalidade de ser utilizada no estudo de eficiência de encapsulação e capacidade de carga das NLS. A curva analítica em água foi obtida a partir de uma solução estoque de 1 mg.mL^{-1} de TERP em acetonitrila (ACN). As soluções de trabalho foram obtidas com a diluição da solução estoque em água ultra-pura. O resultado obtido para a curva analítica foi expresso com as médias das áreas obtidas da curva analítica, sendo que todas as injeções foram feitas em triplicata.

3.2.2. Estudo de estabilidade do TERP frente ao calor aplicado na técnica de HAP

Com o objetivo de avaliar a estabilidade do TERP em relação a técnica de HAP, uma alíquota de fármaco de 10 mg foi armazenada na estufa Fabee a temperatura de 70°C (temperatura de aquecimento utilizada na técnica de HAP), sendo que nos tempos de 5, 10, 15 e 30 minutos e 1, 2, 4, 8, 12, 16 e 24 horas alíquotas de TERP foram coletadas para o preparo de soluções padrões em fase móvel de 100 µg.mL⁻¹. Estas soluções foram quantificadas por CLAE para avaliar a presença de compostos de degradação, e perda de fármaco por volatilização durante o processo de obtenção das NLS. Todas as análises foram realizadas em triplicata e seus respectivos desvios padrões (DP) e desvios padrões relativos (DPR) foram calculados.

3.2.3. Obtenção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)

As NLS foram desenvolvidas pelo método de homogeneização de alta pressão (HAP) à quente, no qual a amostra presente no interior do equipamento é forçada a passar em alta pressão (1450-29000 psi) através de um pistão estreito (de escala nanométrica), o qual é acelerado em uma pequena distância e a uma alta velocidade (mais de 1000 km/h). Assim, a amostra é submetida a um grande estresse, onde forças de cavitação rompem as gotículas, gerando as nanopartículas (MUHLEN, SCHAWRZ e MEHNERT, 1998).

Técnica de preparo das NLS

1. Foi definida a concentração percentual (%) de monoestearato de glicerila (GMS), poloxamer 188 (P-188), fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FSH) e água ideal para a formação de um sistema estável e de baixa viscosidade;

2. Primeiramente, as pré-emulsões obtidas foram desenvolvidas aquecendo-se a fase oleosa (GMS e FSH) à 70°C, ou seja, aproximadamente 10°C acima do ponto de fusão do GMS (60°C). A fase aquosa (água e P-188) foi aquecida à mesma temperatura. Finalmente, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa e agitada manualmente para, em seguida ser levada ao homogeneizador de alta pressão;

3. Para obtenção das nanopartículas foi realizado um estudo preliminar com o homogeneizador de alta pressão, no qual foi padronizado o número de ciclos e a pressão ideal para a obtenção de nanopartículas de tamanhos desejados.

Para selecionar as melhores NLS, estas foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula e índice de polidispersidade (PDI) descritos no item 3.2.4.1.

Para a obtenção das NLS contendo fármaco, o TERP foi adicionado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 15% e 20% em relação a massa de lipídio (GMS). O fármaco foi adicionado à fase oleosa previamente fundida a 70°C. Posteriormente a fase aquosa, à mesma temperatura, foi vertida sobre a fase oleosa e agitada manualmente.

A pré-emulsão obtida foi levada ao HPH por 10 ciclos, aproximadamente 5 minutos, a uma pressão de 7200 psi. As dispersões de NLS e NLS-TERP foram retiradas do

equipamento a uma temperatura de $55 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e resfriadas em temperatura ambiente ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$).

3.2.4. Estudo de caracterização das NLS

3.2.4.1. Determinação do tamanho de partícula e índice de polidispersidade (PDI)

Este ensaio mede a intensidade de espalhamento da luz através do movimento das partículas (movimento browniano), fornecendo o raio hidrodinâmico das partículas coloidais, tendo capacidade de analisar partículas de tamanhos nanométricos e micrométricos (até $6\text{ }\mu\text{m}$). A técnica de espectroscopia de fotocorrelação consiste em atravessar a amostra com um feixe de laser, de modo que as partículas presentes no meio espalhem a luz. A luz espalhada é captada em sinal e enviada ao correlator, que processa os dados e os envia para um computador, onde o software realiza os cálculos de tamanho médio das partículas e PDI (MEHNERT & MADER, 2001). Os ensaios foram realizados no equipamento Zetasizer Nano ZS90 Malvern Instruments.

As amostras foram preparadas com a diluição da dispersão de NLS em água ultra-pura na proporção de 1:20. As preparações foram mantidas em frascos de cintilação isentos de poeira, que foram colocados na câmara de análise de modo que o feixe de laser atravessasse a dispersão em toda sua extensão. O foto multi-sinal foi posicionado a 90° do feixe de laser. A temperatura do sistema foi mantida a 25°C e o comprimento de onda do feixe de laser foi de 532 nm . As medidas foram feitas em triplicata e os valores médios e desvios padrões foram calculados.

3.2.4.2. Determinação do Potencial Zeta

O potencial zeta (PZ) foi determinado no equipamento Zetasizer nano ZS90 Malvern. Para a análise de PZ, as amostras foram diluídas em água ultra-pura na proporção de 1:20, e analisadas em triplicata, calculando-se os valores médios e os respectivos desvios padrões.

O PZ tem por função avaliar a estabilidade de sistemas coloidais através de cargas de superfície presentes nas partículas. Quanto maior o PZ, mais estável é considerado o sistema, sendo um módulo superior a 30 mV ideal, como indicativo de estabilidade da formulação (UNER, M., 2006).

A medida efetuada por este equipamento é baseada no “efeito de Doppler, ou seja, na alteração da frequência sofrida pela luz dispersa por uma partícula em movimento. Este produz uma intensidade de sinal em que sua taxa é proporcional a velocidade das partículas. Assim, um processador de sinal digital é usado para extrair o resultado.

3.2.4.3. Cálculo da porcentagem de perda de TERP durante o processo de obtenção das NLS

Para avaliar a quantidade de fármaco real presente na dispersão de NLS, faz-se necessário o cálculo da quantidade de TERP perdida durante o processo de desenvolvimento do sistema de NLS, principalmente em vista de que o TERP por ser um composto volátil pode vir a ter uma perda significativa, ainda mais devido à aplicação de calor, mesmo que em temperatura controlada.

Assim uma alíquota de 1ml de NLS foi precipitada com 3ml de ACN e centrifugada a 3000 rpm por 20 minutos na centrífuga Fisher Scientific modelo 225. O sobrenadante foi coletado e diluído na proporção de 1:10 em água ultra-pura. As amostras foram quantificadas por CLAE.

A porcentagem de fármaco perdida durante o processo de obtenção das NLS foi calculado através da equação 1 (MANDAWGADE & PATRAVALE, 2008).

(Equação 1)

$$\% Perda = \left(\frac{Q_{real}}{Q_{teórica}} \right) \times 100$$

Na qual:

% de Perda = Porcentagem de TERP perdida durante o processo de obtenção das NLS;

Q real = Quantidade de TERP quantificada por CLAE;

Q teórica = Quantidade de TERP adicionada à formulação para a obtenção das NLS.

3.2.4.4. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE%) foi realizada com o dispositivo de Ultrafiltração AMICOM Ultra – 4 (Millipore 100 Kda). Este dispositivo é composto de dois compartimentos separados por uma membrana filtrante de celulose regenerada de porosidade de 100 kda.

Como mostra a figura 6, na parte superior do dispositivo (na unidade filtrante) foi adicionado 1 ml da dispersão de NLS. Na ultracentrifuga Sorvall Biofuge Stratos, a amostra foi centrifugada a 5000 g por 20 minutos a uma temperatura de 25°C.

A fração livre de TERP foi coletada na parte inferior do dispositivo, ou seja, no tubo de centrifuga e quantificada por CLAE (ZANG et al, 2008).

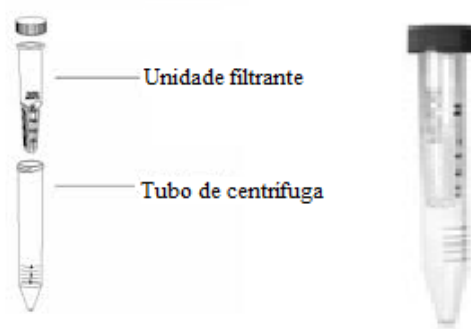


Figura 6: Dispositivo de ultrafiltração utilizado no ensaio de eficiência de encapsulação das NLS.

A quantidade de TERP encapsulado foi calculada a partir da equação 2 (SUN, LI-MING et al 2012).

(Equação 2)

$$EE\% = \frac{T0 - F0}{T0} \times 100$$

Na qual:

EE% = Eficiência de encapsulação (porcentagem de TERP encapsulado);

T0 = Quantidade real de fármaco presente na dispersão de NLS;

F0 = Quantidade de fármaco livre detectada no tubo de centrífuga por CLAE.

Deve-se ressaltar que um estudo preliminar foi realizado a fim de se validar o dispositivo de ultrafiltração quanto à velocidade e o tempo aplicados a centrifuga.

Validação do dispositivo de ultrafiltração para o ensaio de eficiência de encapsulação

O dispositivo de ultrafiltração AMICON Ultra (Millipore, 100 Kda), utilizado na separação do fármaco livre do encapsulado foi validado, a fim de se certificar de que toda a solução contendo TERP livre atravessou a membrana. Assim uma solução aquosa de TERP ($454,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi preparada e quantificada por CLAE. Desta solução 1mL foi adicionado no compartimento superior do dispositivo de ultrafiltração e submetido a 20 minutos de centrifugação na ultracentrifuga Sorvall Biofuge Stratos , à 5000 g a 25°C. A concentração de TERP que atravessou a membrana do dispositivo foi determinada por CLAE (TAVEIRA, 2009).

A membrana de celulose regenerada utilizada no dispositivo apresenta caráter hidrofílico o que pode reter uma porcentagem de fármaco livre em sua porosidade através de ligações não específicas com o TERP de característica hidrofóbica. Baseado no trabalho de LEE e colaboradores (2003), um pré-tratamento da membrana foi também avaliado a fim de se impedir a ocorrência destas ligações não específicas entre fármaco e membrana.

Este pré-tratamento foi realizado adicionando-se 100 μL de solução aquosa contendo 5% de polissorbato 80. Esta permaneceu em contato com a membrana por 5 minutos e em seguida foi centrifugada a 3000 g por 10 minutos. A quantidade remanescente desta solução foi retirada através da lavagem do dispositivo de ultrafiltração com 1ml de água ultra-pura.

Após o pré-tratamento da membrana de celulose regenerada, o ensaio foi conduzido seguindo a mesma metodologia.

3.2.4.5. Capacidade de Carga

A capacidade de carga (CC%) tem como objetivo relacionar a quantidade de fármaco encapsulado na NLS em função da quantidade de lipídio presente na formulação. O cálculo foi realizado de acordo com a equação 3 (SUN, *et al.*, 2012).

(Equação 3)

$$CC\% = \frac{T0 - F0}{WP} \times 100$$

Na qual:

CC% = Capacidade de carga;

T0 = Quantidade real de fármaco presente na dispersão de NLS;

F0 = Quantidade de fármaco livre detectada no tubo de centrífuga por CLAE;

WP = Quantidade de lipídio (GMS) presente nas NLS.

3.2.5. Estudo de estabilidade das NLS-TERP

Um volume de 15 mL das dispersões de NLS-TERP nas concentrações de 2,5, 5, 10, 15 e 20% em relação à massa lipídica (GMS) foram armazenadas em frascos âmbar por 60

dias, a temperatura de 4°C e a temperatura ambiente ($25 \pm 3^\circ\text{C}$). As mudanças relacionadas ao tamanho de partícula, PDI, PZ e a EE% foram avaliados (GHAFARI, et al, 2010).

3.2.6. Estudo de análise térmica

3.2.6.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram determinadas em um equipamento TA (modelo: DSC Q100), capaz de operar no intervalo de temperatura de -90 a 550°C, sendo o equipamento acoplado a um módulo de resfriamento por N₂. A calibração do sistema foi realizada com padrão Índio, conforme recomendações do fabricante.

As curvas DSC foram obtidas em de atmosfera de N₂, com vazão média de 50 ml.min⁻¹. Como porta amostras foi utilizado um cadinho de alumínio hermeticamente fechado, sendo que um cadinho vazio foi utilizado como referência. A massa da amostra foi na ordem de 5mg. Foi aplicado as análises uma razão de aquecimento e resfriamento de 10°C. min⁻¹, no intervalo de 0 a 125°C. Para o TERP o intervalo de temperatura estudado foi de 0 a 250°C. Um estudo de isoterma de 30 minutos a 70°C foi realizado para avaliação de uma possível perda de massa em decorrência da aplicação de calor a amostra.

As amostras analisadas foram às matérias primas GMS, P-188, FSH e TERP; as misturas físicas binárias GMS-TERP, P-188-TERP, FSH-TERP, as misturas físicas das formulações com e sem TERP e finalmente as formulações liofilizadas NLS placebo e NLS-TERP. Para a liofilização, alíquotas de 5ml das dispersões de NLS com e sem fármaco foram congeladas por 48 horas à temperatura de $-8 \pm 0,2^\circ\text{C}$ e em seguida por mais 24 horas foi liofilizada através do equipamento Thermo Fisher Scientific, modelo micromodulyo-115.

Os valores de entalpia (ΔH) foram fornecidos pelo programa computacional do equipamento de DSC (Software TA Instruments Universal Analysis 2000), com base na massa da amostra informada. Caso não haja interação das matérias-primas dentro de uma mistura o valor de ΔH para cada uma deve ser proporcional a sua concentração na amostra. Assim, foi calculado o valor de ΔH obtido e ΔH esperado.

O ΔH obtido é o valor de entalpia fornecido pelo programa computacional para cada evento térmico, independente da composição qualitativa e/ou quantitativa da amostra, ou seja, se a amostra é composta por uma substância pura ou uma mistura de substâncias.

O ΔH esperado foi calculado para cada evento térmico de uma substância, sempre levando em consideração o ΔH obtido da substância pura e o seu fator de contribuição na composição da mistura (ci), conforme representado pelas equações 4 e 5 .

$$ci = \frac{100}{ci(\%)} \quad (\text{Equação 4}) \qquad \Delta H \text{ esperado} = \frac{\Delta H \text{ obtido}}{ci} \quad (\text{Equação 5})$$

No qual: ci (%) = concentração ponderal percentual do componente na mistura.

3.2.6.2. Termogravimetria (TG)

As amostras analisadas foram às matérias primas isoladas (GMS, P-188, FSH), o TERP, as misturas físicas referentes à NLS placebo, NLS 2,5 e NLS 20 e as NLS placebo, NLS 2,5, NLS 20. As dispersões de NLS com e sem fármaco foram liofilizadas e o TERP por ser um composto líquido e volátil foi associado a α -alumina na proporção de 3:7 com a finalidade de formar uma mistura sólida evitando-se assim a ebulição do fármaco e uma

possível contaminação da balança termoanalítica. As amostras foram adicionadas em cadinho de alumina na ordem de 5mg para a determinação das curvas termogravimétricas. As condições experimentais foram semelhantes às aplicadas para a determinação das curvas DSC, no qual foi aplicada uma razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C. min}^{-1}$, em atmosfera dinâmica de N_2 , com vazão média de 50 ml.min^{-1} . O intervalo de aquecimento foi de 25 a 600°C .

Os calculos de perda de massa foram feitos empregando o software Software TA Instruments Universal Analysis 2000, através da curva da termogravimetria derivada (DTG), no qual os eventos de perda de massa foram delimitados.

3.2.7. Análise morfológica das NLS

A análise morfológica das NLS e NLS-TERP foi realizada com a amostra diluída em água ultra-pura na proporção de 1:100, sendo esta depositada no substrato de mica previamente clivado, conforme a técnica de “Dip”. A secagem da amostra sobre a mica foi à temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por um período de 15 minutos.

Para o ensaio foi utilizado o microscópio de força atômica (Bruker-Dimension Icon Scan Asyst) do Instituto de Física de São Carlos. O ensaio foi conduzido em operação de "não contato" através de sondas de silicone e cantilever triangular, com frequência de varredura de 1Hz.

O ensaio de microscopia foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Roberto Mendonça Faria e com o Prof. Dr. Marcelo de Assunção Pereira da Silva.

3.2.8. Determinação do perfil de liberação “*in vitro*”

Os experimentos foram realizados utilizando células de difusão modificada (células de Franz) com área de difusão de $1,77 \text{ cm}^2$ e volume aproximado de 7 mL, no equipamento Microette Hanson 0700-1251. Uma membrana de acetato de celulose (Sigma-Aldrich) com poro de $0,45 \mu\text{m}$ foi colocada entre o compartimento doador e receptor da célula de difusão. Aliquotas de $300 \mu\text{L}$ das amostras das formulações escolhidas foram colocadas sobre a membrana e o compartimento receptor foi preenchido com solução receptora previamente validada quanto a condição *sink* por MACCARI (2009). A solução receptora foi composta de uma solução salina 0,9% adicionada de 1% de polissorbato 80.

Aliquotas de 2ml foram coletadas nos intervalos de 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20 e 24 horas para avaliar a cinética de liberação. As amostras coletadas foram filtradas em membrana PTFE com porosidade de $0,45 \mu\text{m}$ e quantificadas por CLAE, utilizando a curva analítica do fármaco obtida em solução receptora.

Um volume de 0,8mL de solução receptora foi desprezado antes do início de cada coleta. O volume coletado e o volume desprezado foram repostos automaticamente com solução receptora e os valores foram utilizados nos cálculos da quantidade real liberada por tempo em função da área de exposição. Os resultados foram colocados em gráficos para a definição do modelo de cinética adequado para cada formulação. A quantidade real de fármaco liberado (Q_{real}) em determinado tempo, foi calculado através da equação 6:

(Equação 6)

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

Em que:

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

C_t = concentração obtida referente ao tempo t ;

V_r = volume da solução receptora (7 mL);

C_c = concentração da amostragem anterior;

V_c = volume amostrado (coleta + limpeza).

Resultados e *discussões*

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Quantificação do TERP por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O método analítico previamente validado por MACCARI (2009) foi utilizado para a quantificação do TERP nos estudos de estabilidade frente ao calor aplicado na técnica de homogeneização de alta pressão (HAP), eficiência de encapsulação, capacidade de carga e na avaliação do perfil de liberação “*in vitro*”.

Especificidade

Observando-se os cromatogramas das figuras 7 e 8 pode-se comprovar que o método analítico é capaz de quantificar o TERP sem que os componentes da formulação interfiram nas análises, pois os picos obtidos com a solução de NLS não apresentaram-se próximos ou no mesmo tempo de retenção do fármaco (aproximadamente 9,8 minutos).

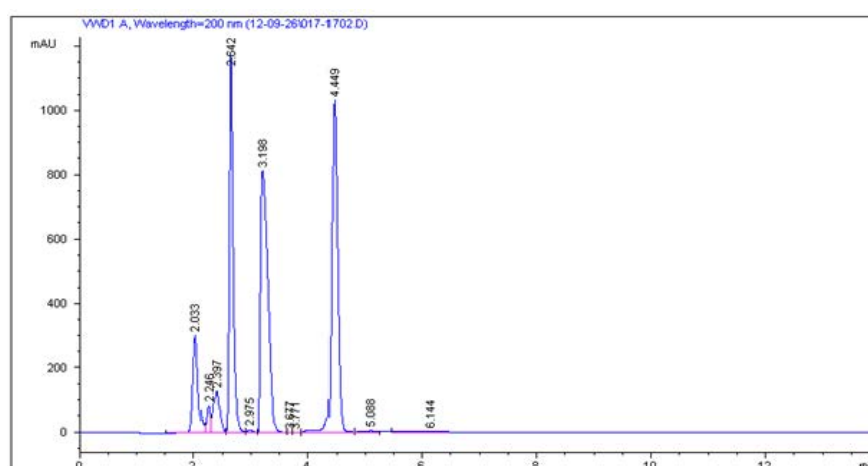


Figura 7: Cromatograma referente à análise da NLS sem fármaco

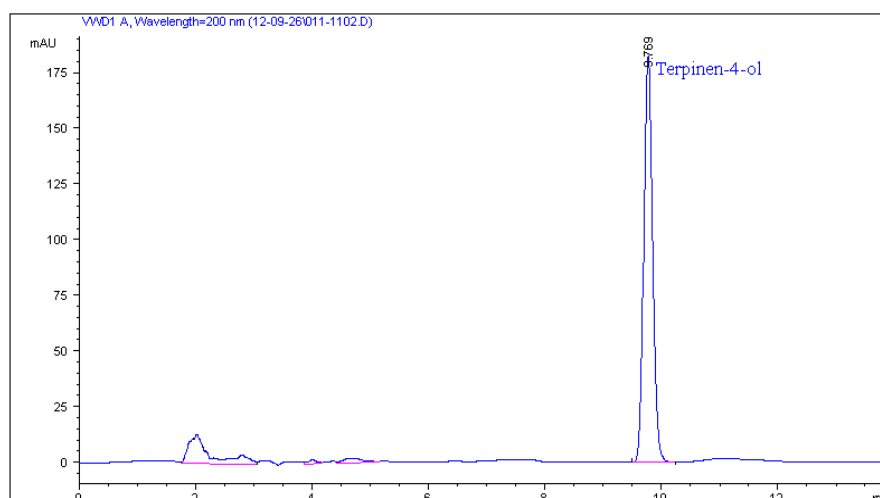


Figura 8: Cromatograma referente à solução padrão de $50\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de TERP

Curva analítica em fase móvel

A curva analítica de TERP em fase móvel foi obtida com objetivo de quantificar o fármaco no ensaio de estabilidade frente à aplicação de calor utilizado no processo de obtenção das NLS.

Através da equação de regressão linear obtida pela média de três curvas analíticas a linearidade foi determinada. Como ilustrado na figura 9, o coeficiente de correlação encontrado foi de 0,99996, o que comprova o resultado linear da curva analítica obtida. Na tabela 1 encontram-se os resultados obtidos a partir da média das doze injeções do TERP das três curvas analíticas realizadas em triplicata sendo que o DPR das amostras de mesma concentração foi relativamente baixo, sendo o maior valor de 2,27% para o padrão de $4\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. O Desvio Padrão Relativo entre todas as amostras, em todas as concentrações, representado como DPR geral, foi de 0,958%.

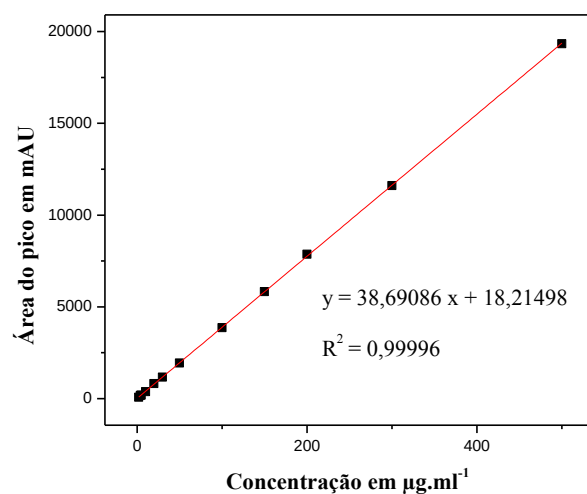


Figura 9: Curva analítica do TERP em fase móvel, equação da reta (y) coeficiente de correlação (R^2)

Tabela 1: Dados da curva analítica em fase móvel

<i>[] teórica em $\mu\text{g.ml}^{-1}$</i>	<i>Área média dos picos*</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>DPR (%)**</i>	<i>DPR geral</i>
2	74,16	1,0738	1,4480	0,95805
4	181,80	4,1236	2,2682	
5	193,37	1,4236	0,7362	
10	384,79	0,2424	0,063	
20	814,40	17,5047	2,1494	
30	1167,66	13,9642	1,1959	
50	1944,30	0,086	0,0442	
100	3867,22	3,9867	0,1031	
150	5832,39	45,006	0,7717	
200	7865,33	98,5348	1,2577	
300	11602,22	75,5674	0,6513	
500	19336,10	156,2014	0,8078	

* Média das 3 curvas em triplicata. ** DPR- desvio padrão relativo, calculado em função da média e desvio padrão das áreas obtidas.

Curva analítica em água

Para o estudo de eficiência de encapsulação é necessário quantificar o fármaco presente no meio dispersante, ou seja, fora da NLS. Para realizar essa quantificação, foi construída uma curva analítica do TERP em água. Na Figura 10 encontra-se a curva analítica que apresentou um perfil linear na faixa de concentração considerada, e o coeficiente de correlação encontrado foi de 0,99953.

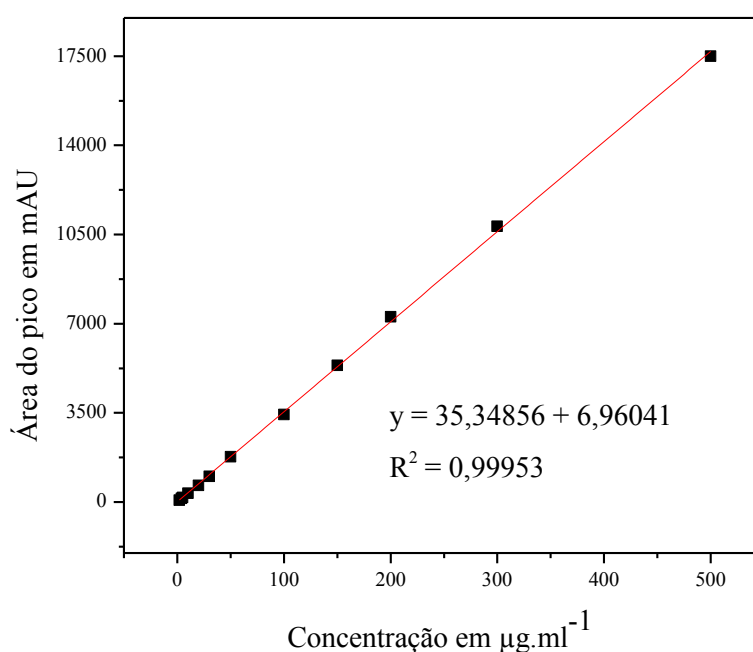


Figura 10: Curva analítica do TERP em água, equação da reta (y) coeficiente de correlação (R^2)

Curva em solução receptora

Com o objetivo de quantificar o TERP nos ensaios de liberação “*in vitro*”, foi construída a curva analítica em solução receptora (solução de cloreto de sódio 0,9% com 1% de polissorbato 80). Na figura 11 pode-se observar que a curva analítica encontrada apresentou um resultado linear, pois o coeficiente de correlação encontrado foi de 0,99945.

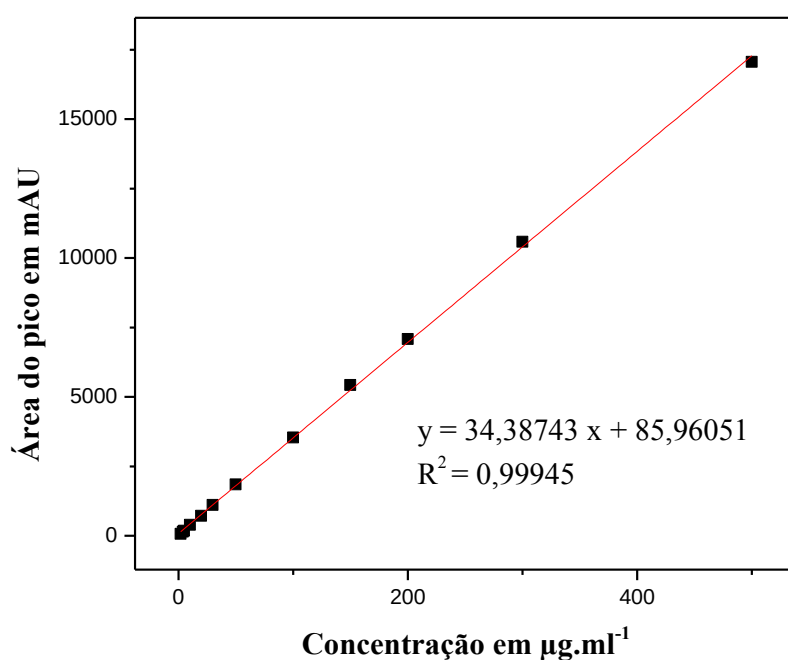


Figura 11: Curva analítica do TERP em solução de cloreto de sódio 0,9% com 1 % de polissorbato 80, equação da reta (y) coeficiente de correlação (R^2)

4.2. Estudo de estabilidade do TERP frente ao calor aplicado na técnica de HAP

Nos resultados apresentados na tabela 2 é possível observar que nos primeiros 10 minutos de ensaio não houve nenhuma diferença significativa na concentração de TERP nas soluções padrões pesquisadas. A partir de 15 minutos a influência do calor passou a reduzir à quantidade de TERP encontrada, entretanto, a grande porcentagem de perda ocorre a partir 30 minutos de ensaio, tempo no qual a perda de massa é de aproximadamente 35%. O aumento da volatilização do TERP ou até mesmo um processo de degradação podem ser os

responsáveis pelo resultado obtido. Contudo deve-se ressaltar que todos os cromatogramas não ilustraram nenhum pico de produto de degradação, porém os mesmos podem muitas vezes não serem detectados no comprimento de onda utilizado na pesquisa.

Com os resultados obtidos, pode-se dizer que a temperatura de 70°C utilizadas por 4,6 minutos (tempo necessário para passar a amostra pelo HAP) pode ser aplicada ao TERP sem comprometer a integridade do fármaco.

Tabela 2: Resultados obtidos no estudo de estabilidade do TERP frente ao armazenamento em estufa a temperatura controlada de 70°C por um período de 24 horas

<i>Tempo</i>	<i>Área média dos picos*</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>DPR (%)**</i>	<i>[] encontradas em µg.mL⁻¹</i>	<i>Recuperação (%)</i>
0min	3868,0513	3,88766	0,0101	100,021	100
5min	3867,7249	9,977842	0,2580	100,013	99,992
10min	3867,6428	9,54985	0,2469	100,010	99,989
15min	3828,9702	10,12289	0,2617	99,010	98,989
30min	3751,9731	2,808342	0,0726	97,019	96,999
1h	3596,9348	9,1847	0,2375	93,009	92,990
2h	3518,0729	4,26683	0,1104	90,969	90,950
4h	3404,1819	10,74281	0,2824	85,026	85,008
8h	3246,7244	3,69978	0,1140	78,955	78,937
12h	3024,6528	7,22368	0,2388	72,211	72,196
16h	3022,9433	5,44856	0,1802	68,165	68,151
24h	3021,1296	7,96051	0,2635	62,118	62,105

* Média das áreas dos picos realizadas em triplicata. ** DPR- desvio padrão relativo, calculado em função da média e desvio padrão das áreas obtidas.

4.3. Obtenção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)

O TERP já foi incorporado em NLS por SUN e colaboradores (2012) utilizando um método de sonicação e formação de filme lipídico para a incorporação do fármaco, entretanto a grande desvantagem deste método é a necessidade de solvente orgânico.

Assim o estudo do desenvolvimento das NLS contendo TERP neste trabalho foi focado em uma metodologia de fácil escalonamento e que não necessita de solvente orgânico. Todavia um estudo preliminar com o TERP foi conduzido com a finalidade de avaliar a influência que a submissão do TERP as condições de aquecimento e ao tempo de homogeneização poderiam acarretar, como possível formação de produtos de degradação, bem como sua volatilização.

As NLS foram desenvolvidas pela técnica de HAP, e para a escolha da melhor amostra para a incorporação do TERP, um estudo preliminar foi realizado com o objetivo de padronizar a técnica e a concentração dos excipientes na formulação (GMS, FSH e P-188).

A seleção das melhores amostras foi realizada após estudo de tamanho de partícula e índice de polidispersidade (PDI) descritos no item 3.2.4.1.

A técnica de HAP foi escolhida devido à facilidade de escalonamento e por produzir partículas de tamanhos menores se comparado às demais técnicas, o que viabilizou o objeto de estudo deste trabalho.

Estudo da proporção de tensoativos

Para a escolha da proporção entre os tensoativos (P-188:FSH), foi estabelecido como variáveis fixas a concentração de lipídio (GMS) de 5% e tensoativo de 3% sendo que as

amostras foram passadas pelo homogeneizador por 3 e 5 ciclos com pressão de 7.200 psi (500 bar). A proporção de P-188:FSH foi variada de 1:9 a 9:1.

Pelos resultados obtidos que se encontram na tabela 3, é possível observar que o aumento no número de ciclos de 3 para 5 proporcionou uma diminuição no tamanho de partícula. Em 5 ciclos pode-se verificar que da formulação F3 à F6 as partículas obtiveram tamanhos semelhantes, sendo o menor valor para F5 (102,50 nm) e o maior para F4 (108,85 nm), sendo que não há diferença significativa entre as amostras ($P>0,05$).

O PDI das formulações, semelhante ao tamanho de partícula, também diminuiu conforme o aumento do número de ciclos de 3 para 5, entretanto os melhores resultados foram para as amostras F4 (0,38), F5 (0,409) e F6 (0,474), sendo que houve diferença significativa entre os PDIs das amostras ($P<0,05$). A partir da amostra F7 houve um aumento no diâmetro médio das partículas e PDI, bem como após 2 dias do preparo, as amostras adquiriram viscosidade semelhante a de uma emulsão.

Tabela 3: Tamanho médio e PDI das NLS obtidas para avaliação da proporção de P-188:FSH

Amostras	Proporção de tensoativo		Tamanho médio de partícula (nm)*		PDI*	
	P-188	FSH	3 CICLOS	5 CICLOS	3 CICLOS	5 CICLOS
F1	9	1	625,35 ($\pm$ 36,32)	741,55 ($\pm$ 25,63)	0,623 ($\pm$ 0,072)	0,505 ($\pm$ 0,056)
F2	8	2	254,35 ($\pm$ 38,47)	187,70 ($\pm$ 22,66)	0,677 ($\pm$ 0,055)	0,598 ($\pm$ 0,042)
F3	7	3	198,60 ($\pm$ 35,49)	107,15 ($\pm$ 18,75)	0,642 ($\pm$ 0,087)	0,542 ($\pm$ 0,058)
F4	6	4	139,95 ($\pm$ 26,94)	108,85 ($\pm$ 12,25)	0,462 ($\pm$ 0,048)	0,380 ($\pm$ 0,012)
F5	5	5	155,35 ($\pm$ 25,51)	102,50 ($\pm$ 12,42)	0,489 ($\pm$ 0,066)	0,409 ($\pm$ 0,024)
F6	4	6	227,50 ($\pm$ 38,22)	106,60 ($\pm$ 18,13)	0,711 ($\pm$ 0,084)	0,474 ($\pm$ 0,033)
F7	3	7	397,24 ($\pm$ 72,18)	222,15 ($\pm$ 37,45)	0,724 ($\pm$ 0,122)	0,523 ($\pm$ 0,048)
F8	2	8	525,89 ($\pm$ 69,33)	378,17 ($\pm$ 55,66)	0,715 ($\pm$ 0,094)	0,567 ($\pm$ 0,052)
F9	1	9	522,35 ($\pm$ 101,12)	391,26 ($\pm$ 47,12)	0,624 ($\pm$ 0,089)	0,535 ($\pm$ 0,063)

*Média de três leituras realizadas em triplicata com seus respectivos desvios padrões.

Sabe-se que a associação de tensoativos de caráter hidrofílico e lipofílico geralmente tende a produzir partículas de tamanhos menores e mais estáveis (SIEKMANN e WESTESEN, 1992; OLBRICH e MULLER, 1999). SOO-JEONG e CHONG-KOOK (2002), estudaram diferentes formulações de NLS compostas por diferentes proporções entre polissorbato 80 e fosfatidilcolina de ovo. Os resultados demonstram que nanopartículas estabilizadas 100% com o tensoativo hidrofílico obtiveram tamanho médio de 397,1nm e formulações estabilizadas 100% com o fosfolípido apresentaram 487nm em seu diâmetro médio. Contudo, a diminuição entre a proporção de polissorbato 80 e fosfatidilcolina para 46:54 permitiu a obtenção de partículas menores (222,7nm) e mais estáveis.

De acordo com SCHUBERT e MULLER (2005), grandes quantidades de fosfolípidos podem gerar aumento no movimento browniano das partículas, promovendo a interação entre as bicamadas lipídicas e consequentemente a agregação das NLS gerando fenômenos de instabilidade como coalescência e aumento de viscosidade. Assim, pode-se dizer que a instabilidade das formulações F7, F8 e F9 podem ter sido em decorrência do excesso de FSH presente nas amostras.

Em relação às amostras F1, F2 e F3, pode-se considerar que o tamanho e PDI elevados ocorrem devido a incapacidade do P-188 de estabilizar completamente o sistema por impedimento estérico. No trabalho de SOO-JEONG e CHONG-KOOK (2002), as formulações contendo altas concentrações de tensoativos não iônico, apresentaram baixo potencial zeta (PZ), pois partículas contendo 100% de polissorbato 80 resultaram em PZ próximos a zero, ou seja, a partícula apresentava baixa estabilidade eletrostática e a quantidade de tensoativo não era suficiente para gerar uma estabilidade estérica plena. Conforme aumentou-se a quantidade de fosfatidilcolina, o PZ aumentou na faixa de -11 a -20mV. Apesar de o PZ estar abaixo do módulo de 30 mV, ou seja inferior ao potencial

elétrico considerado ideal para garantir a estabilidade do sistema, o polissorbato 80 associado a este potencial elétrico gerou NLS estáveis devido a promoção adicional de estabilidade por impedimento estérico.

Mediante os resultados obtidos, as amostras F4, F5 e F6 foram selecionadas para dar continuidade ao estudo.

Estudo do número de ciclos aplicados na técnica de HAP

Com as formulações selecionadas (F4, F5 e F6) foi realizado o estudo para avaliar qual o melhor número de ciclos aplicados à técnica de HAP. Utilizaram-se como variáveis fixas a pressão, de 7.200 psi, a concentração de GMS de 5% e a de tensoativo de 3%. O número de ciclos aplicados às amostras foi de 3, 5, 10, 15 e 20 como apresentado na tabela 4.

Tabela 4: Tamanho médio e PDI das NLS obtidas para avaliação do número de ciclos aplicados na técnica de HAP

<i>Número de ciclos</i>	<i>Tamanho de partículas (nm)*</i>			<i>PDI*</i>		
	<i>F4</i>	<i>F5</i>	<i>F6</i>	<i>F4</i>	<i>F5</i>	<i>F6</i>
3	136,32(±25,37)	142,18(±33,65)	227,5(±57,27)	0,415(±0,091)	0,423(±0,073)	0,691(±0,103)
5	128,85(±19,74)	112,5(±12,90)	106,6(±42,33)	0,368(±0,037)	0,328(±0,058)	0,494(±0,046)
10	104,2(±24,83)	98,75(±15,82)	105,08(±09,21)	0,322(±0,055)	0,260(±0,022)	0,330(±0,021)
15	98,34(±31,66)	102,05(±22,12)	116,0(±18,54)	0,351(±0,044)	0,270(±0,027)	0,337(±0,028)
20	94,73(±15,24)	102,1(±36,78)	116,1(±27,89)	0,387(±0,036)	0,303(±0,033)	0,422(±0,034)

*Média de três leituras realizadas em triplicata com seus respectivos desvios padrões

Como apresentado na tabela 4 pode-se observar na figura 12, que em todas as amostras F4, F5 e F6, o tamanho de partícula a partir de 10 ciclos não tem uma redução

significativa ($P>0,05$), mantendo-se praticamente estável em todas as amostras. A maior redução de tamanho de partícula foi para F4 na qual de 10 para 20 ciclos o tamanho de partícula reduziu aproximadamente 10 nm. Para as amostras F5 e F6 de 10 para 20 ciclos houve um aumento do tamanho das nanopartículas de aproximadamente 4 e 11 nm.

O menor PDI em relação a todas as formulações ocorre em 10 ciclos, sendo que em 20 ciclos todas as formulações têm seus PDI's aumentados. Quando compara-se os resultados de PDI entre as amostras não há diferença significativa ($P>0,05$).

Assim concluiu-se que a passagem da amostra por 10 ciclos promoveu um sistema de NLS mais homogêneo e com tamanho de partícula menor.

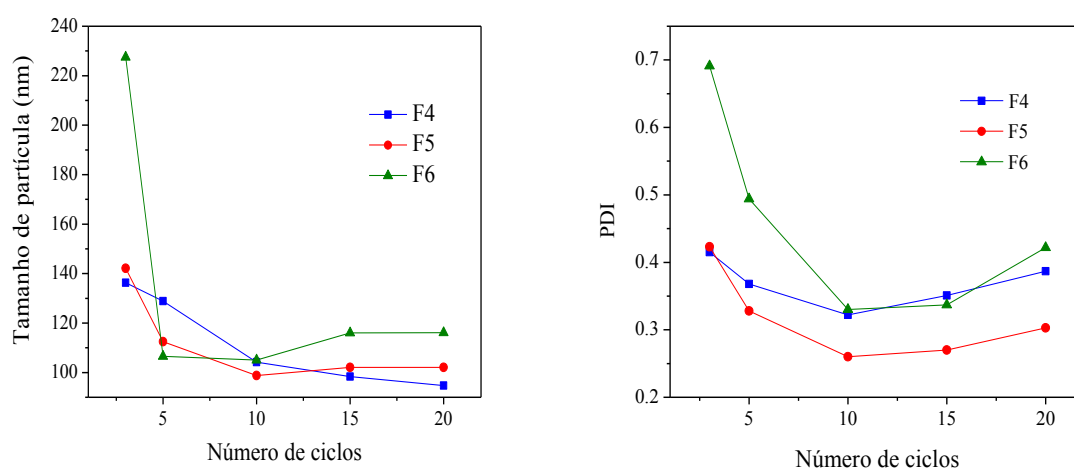


Figura 12: Comparação entre tamanho de partícula e PDI das formulações F4, F5 e F6 em relação ao número de ciclos aplicados na técnica de HAP com pressão de 7.200 psi

Estudo da pressão aplicada à técnica de HAP

Com as mesmas formulações (F4, F5 e F6), o estudo para avaliar a melhor pressão aplicada ao homogeneizador foi realizado. Utilizou-se como variáveis fixas as concentrações

de GMS (5%) e tensoativo (3%) e o número de ciclos de 5 e 10. As pressões estudadas foram 7.200 psi (500 bar), 10.800 psi (750 bar), 14.400 psi (1000 bar) e 21.600 psi (1500 bar).

Tabela 5: Tamanho médio e PDI das NLS obtidas para avaliação da pressão aplicada na técnica de HAP por 5 e 10 ciclos

<i>Pressão (psi)</i>	<i>Amostras passadas por 5 ciclos no HAP</i>					
	<i>F4</i>		<i>F5</i>		<i>F6</i>	
	<i>Tamanho de partícula (nm)*</i>	<i>PDI*</i>	<i>Tamanho de partícula (nm)*</i>	<i>PDI*</i>	<i>Tamanho de partícula (nm)*</i>	<i>PDI*</i>
7.200	155,04 (±32,13)	0,368 (±0,064)	112,72(±47,24)	0,311(±0,087)	110,60 (±12,54)	0,478 (±0,051)
10.800	184,12 (±21,24)	0,312 (±0,053)	126,33(±39,61)	0,304(±0,053)	120,96 (±15,34)	0,373 (±0,048)
14.400	202,09(±22,63)	0,296 (±0,044)	142,90(±32,55)	0,283(±0,066)	134,72(±25,03)	0,340 (±0,063)
21.600	218,33 (±18,37)	0,282(±0,052)	149,31(±24,13)	0,255(±0,061)	155,12 (±09,66)	0,312 (±0,032)
<i>Pressão (psi)</i>	<i>Amostras passadas por 10 ciclos no HAP</i>					
	<i>F4</i>		<i>F5</i>		<i>F6</i>	
	<i>Tamanho de partícula (nm)*</i>	<i>PDI*</i>	<i>Tamanho de partícula (nm)*</i>	<i>PDI*</i>	<i>Tamanho de partícula (nm)*</i>	<i>PDI*</i>
7.200	107,44 (±32,13)	0,302 (±0,097)	98,47 (±24,31)	0,245 (±0,054)	108,15 (±12,54)	0,322 (±0,060)
10.800	128,37 (±21,24)	0,274 (±0,062)	115,2 (±27,7)	0,235 (±0,069)	110,12 (±15,34)	0,306 (±0,057)
14.400	134,6 (±22,63)	0,250 (±0,063)	149,3 (±16,37)	0,232 (±0,044)	140,9 (±25,03)	0,298 (±0,083)
21.600	149,23 (±18,37)	0,267 (±0,072)	142,12 (±15,95)	0,230 (±0,049)	152,32 (±09,66)	0,293 (±0,041)

*Média de três leituras realizadas em triplicata com seus respectivos desvios padrões

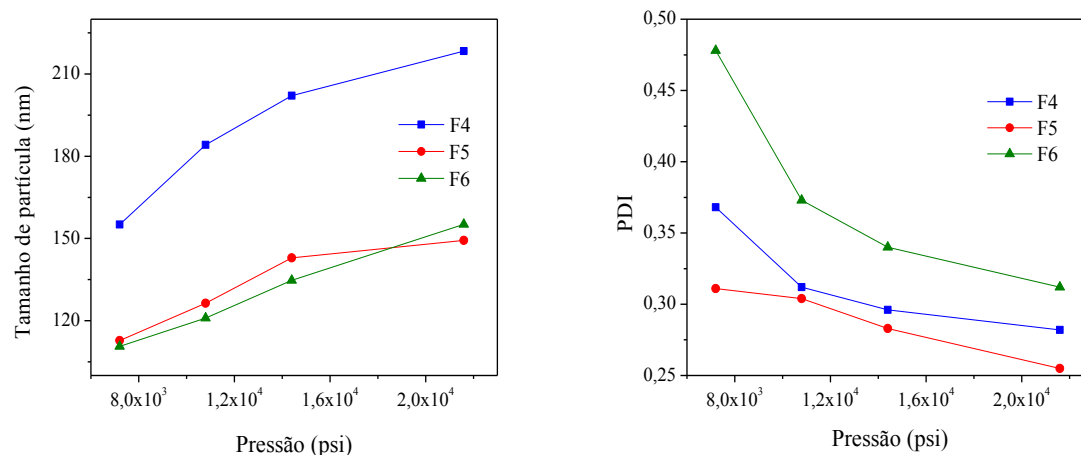


Figura 13: Comparação entre tamanho de partícula e PDI das formulações F4, F5 e F6 submetidas a 5 ciclos no HAP em relação à pressão aplicada.

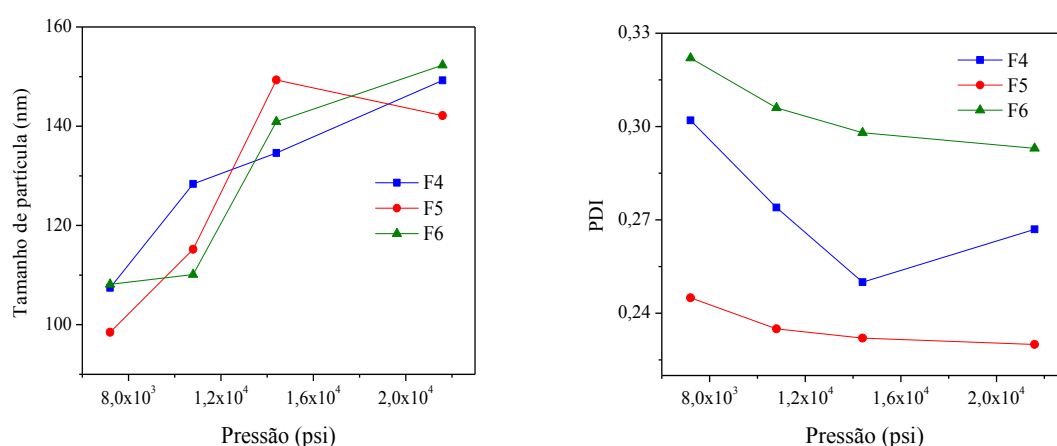


Figura 14: Comparação entre tamanho de partícula e PDI das formulações F4, F5 e F6 submetidas a 10 ciclos no HAP em relação à pressão aplicada.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 5 e nas figuras 13 e 14, pode-se observar que com o aumento da pressão de 7.200 para 21.600 psi, em ambos os números de ciclos (5 e 10), houve aumento do tamanho de partícula e redução do PDI.

Sabe-se que tanto o aumento de pressão quanto o número de ciclos aplicados na técnica de HAP para o desenvolvimento de sistemas coloidais são fatores que devem ser controlados, pois com o aumento de ambos ocorre consequentemente um aumento de energia aplicada à amostra. Esta energia assim como pode acarretar a diminuição de tamanho de partícula e produção de sistemas mais homogêneos, também pode ocasionar instabilidade no sistema, pois a energia aplicada aumenta o movimento (energia cinética) e consequentemente o choque entre as partículas, fato que pode acarretar o aumento do tamanho da partícula e coalescência do sistema (KHALIL, et al., 2011).

Apesar de nenhuma amostra apresentar sinal de instabilidade em ambas às situações de estudo, com a pressão de 7.200 psi as NLS obtidas apresentaram tamanhos de partículas menores para todas as formulações. Analisando os resultados apresentados na tabela 4, é possível observar que a melhor amostra foi a F5, pois teve o menor diâmetro de partícula e um PDI inferior a 0,3, o que significa que o sistema pode ser considerado homogêneo (MEHNERT e MÄDER, 2001).

Assim, a técnica ficou padronizada com um número de 10 ciclos e pressão de 7.200 psi. A amostra de escolha para dar continuidade ao estudo foi a F5 cuja proporção entre P-188 e FSH foi de 1:1.

Estudo da concentração de tensoativo

Após a padronização do método e a definição da proporção entre os tensoativos utilizados, foi avaliado a concentração de tensoativo aplicada as NLS. As variáveis fixas neste caso foi a concentração de GMS (5%), a proporção entre P-188 e FSH de 1:1, a pressão de 7.200 psi e a passagem da amostra no equipamento por 10 ciclos.

Tabela 6: Tamanho médio e Pdi das NLS obtidas para avaliação da concentração de tensoativo com as proporções de 1:1 de P-188 e FSH

Concentração de tensoativo(%)	Tamanho de partícula*	PDI*
1,0	230,10 ($\pm 33,13$)	0,821 ($\pm 0,028$)
1,5	167,37 ($\pm 03,03$)	0,484 ($\pm 0,042$)
2,0	141,14 ($\pm 13,23$)	0,383 ($\pm 0,052$)
2,5	92,63 ($\pm 09,28$)	0,304 ($\pm 0,022$)
3,0	98,60 ($\pm 14,38$)	0,291 ($\pm 0,023$)
3,5	96,58 ($\pm 27,60$)	0,353 ($\pm 0,042$)
4,0	105,07 ($\pm 07,96$)	0,407 ($\pm 0,027$)
4,5	104,95 ($\pm 32,25$)	0,739 ($\pm 0,021$)
5,0	105,12 ($\pm 27,56$)	0,702 ($\pm 0,063$)

*Média de três leituras realizadas em triplicata com seus respectivos desvios padrões

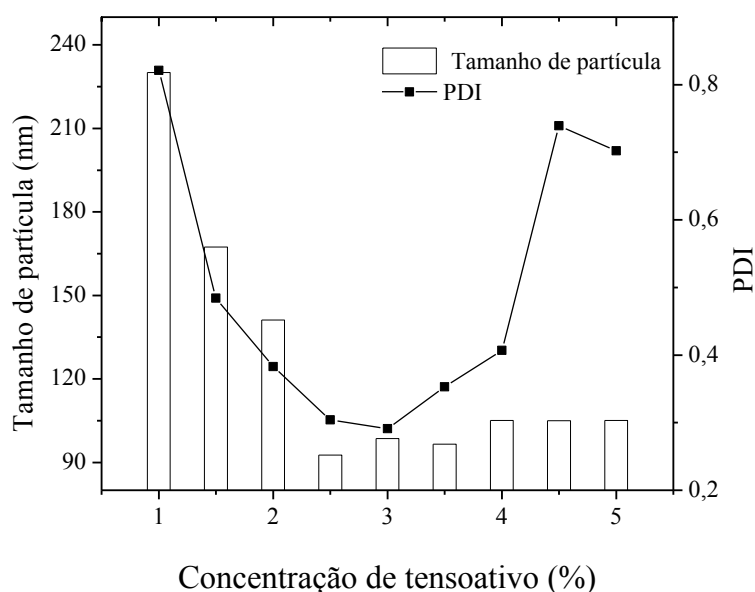


Figura 15: Comparação entre tamanho de partícula e PDI da amostra submetida a 10 ciclos com pressão de 7.200psi contendo a proporção de P-188:FSH de 1:1

Na tabela 6 estão apresentados os resultados de tamanho de partícula e PDI das NLS produzidas com diferentes concentrações de tensoativos. Na figura 15, correlacionando os

resultados obtidos, é possível observar que até a concentração de 2,5% de tensoativo houve diminuição do diâmetro médio das partículas, entretanto a partir da concentração de 3% a diferença de tamanho entre as amostras não foi de grande relevância. Pode-se considerar que a faixa de concentração entre 2,5 e 3% de tensoativo é ideal para que haja uma diminuição da tensão interfacial entre o meio aquoso (dispersante) e a nanopartícula e para que toda a superfície da nanopartícula seja revestida pelo tensoativo (LIU, 2007). Em relação ao PDI, as amostras contendo os melhores resultados encontram-se também na faixa de 2,5 a 3% de tensoativo. Acima e abaixo desta faixa de concentração os sistemas ficaram bastante heterogêneos, principalmente aqueles compostos por 1% e 4,5% de tensoativo. Na primeira situação associando-se os resultados de tamanho e PDI elevados, com a quantidade de tensoativo que não foi suficiente para recobrir as partículas protegendo-as de colisão e possível agregação. Com a concentração de tensoativo acima de 3%, pode-se inferir que houve a formação de outros tipos de sistemas relacionados ao excesso de tensoativo, como por exemplo, micelas.

Finalmente escolheu-se a NLS composta por 3% de tensoativo para dar continuidade ao trabalho, em vista de que seu PDI foi inferior as amostras contendo 2,5% de tensoativo e seu tamanho médio foi aproximadamente 6 nm maior. Assim a composição final das NLS placebo foi de 5% de GMS, 1,5% de FSH como fase oleosa e 1,5% de P-188 e q.s.p 100% de água ultra-pura como fase aquosa.

Obtenção das NLS contendo TERP

Nas NLS a porcentagem de fármaco incorporada as formulações está diretamente relacionada à concentração em massa de lipídio, assim foram desenvolvidas 5 formulações

com concentrações de TERP de 2,5, 5, 10, 15 e 20% em relação a massa de GMS. A tabela 7 mostra a composição das formulações contendo o fármaco.

Tabela 7: Composição das formulações de NLS contendo TERP

<i>Formulações</i>	<i>Composição(%)</i>				
	<i>TERP</i>	<i>GMS</i>	<i>FSH</i>	<i>P-188</i>	<i>ÁGUA q.s.p.</i>
<i>NLS 2,5</i>	0,125	4,875	1,5	1,5	100
<i>NLS 5</i>	0,25	4,75	1,5	1,5	100
<i>NLS 10</i>	0,5	4,5	1,5	1,5	100
<i>NLS 15</i>	0,75	4,25	1,5	1,5	100
<i>NLS 20</i>	1	4	1,5	1,5	100

As NLS compostas de TERP tiveram seus tamanhos reduzidos em relação às NLS placebo. Provavelmente, isto ocorre devido à diminuição de massa de GMS, ou seja, na concentração de lipídio sólido. Entretanto, com o aumento na concentração percentual de TERP o PDI das formulações também aumentou como pode ser verificado nos resultados que se encontram na tabela 8.

Tabela 8: Tamanho de partícula e PDI das NLS obtidas com diferentes concentrações percentuais de TERP

<i>% de TERP</i>	<i>Tamanho de partícula (nm)*</i>	<i>PDI*</i>
<i>2,5</i>	89,80(±07,70)	0,290(±0,036)
<i>5</i>	82,54(±13,78)	0,287(±0,015)
<i>10</i>	69,46(±14,29)	0,336(±0,046)
<i>15</i>	67,92(±35,18)	0,355(±0,102)
<i>20</i>	68,36(±24,27)	0,338(±0,093)

*Média de três leituras realizadas em triplicata com seus respectivos desvios padrões

4.3. Estudo de caracterização das NLS

A caracterização das NLS contendo TERP foi realizada 24 horas após a obtenção das NLS. Devido a pequena variação entre o tamanho de partícula e o PDI das amostras contendo quantidades crescentes de TERP, todas as NLS com fármaco foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, PDI, potencial zeta, eficiência de encapsulação e capacidade de carga, para finalmente serem submetidas ao estudo de estabilidade e assim identificar qual a melhor formulação para o estudo do perfil de liberação “*in vitro*” e a melhor temperatura de armazenamento.

4.3.1. Análise de tamanho de partícula

As NLS placebo apresentaram distribuição bimodal de tamanho de partículas. Na figura 16 está ilustrada a distribuição de tamanho de uma amostra de NLS placebo. O maior pico apresentou partículas de 130,09 nm com intensidade de 92,7% e o menor pico de 25,68 nm com intensidade de 7,3%, obtendo-se como tamanho médio 95,20 nm e PDI de 0,289.

As figuras de 17 a 21 apresentam os gráficos de distribuição do tamanho de partícula em função da intensidade das amostras de NLS com TERP nas diferentes concentrações. É possível observar que a amostra de NLS contendo TERP até a concentração de 5% apresentou distribuição de tamanho bimodal (figuras 17 e 18), no entanto, as NLS contendo maiores quantidades de fármaco tiveram sua distribuição de tamanho com característica trimodal sendo que partículas em escala micrométrica passaram a ser identificadas, o que resultou no aumento do PDI das amostras NLS 10, NLS 15 e NLS 20, como apresentado na tabela 8 e mostrado nas figuras 19, 20 e 21.

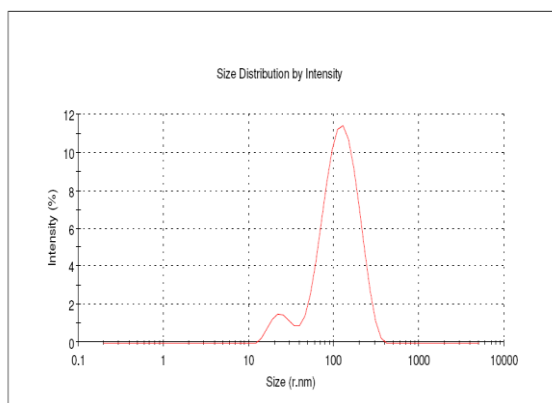


Figura 17: Distribuição do tamanho de partícula das NLS placebo

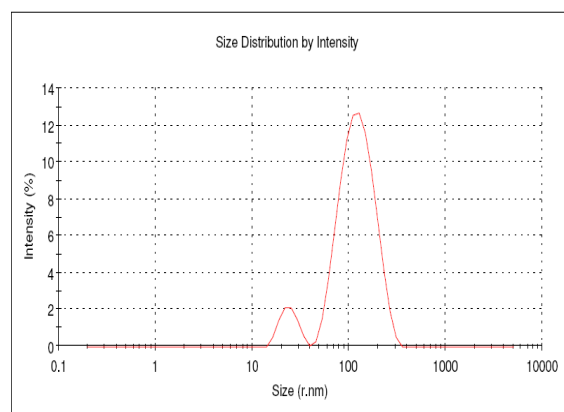


Figura 16: Distribuição do tamanho de partícula das NLS 2,5

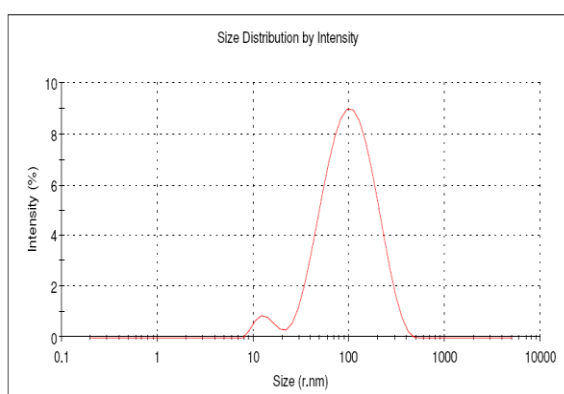


Figura 19: Distribuição do tamanho de partícula das NLS 5

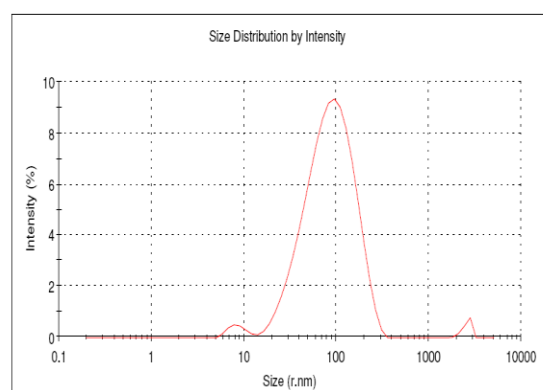


Figura 18: Distribuição do tamanho de partícula das NLS 10

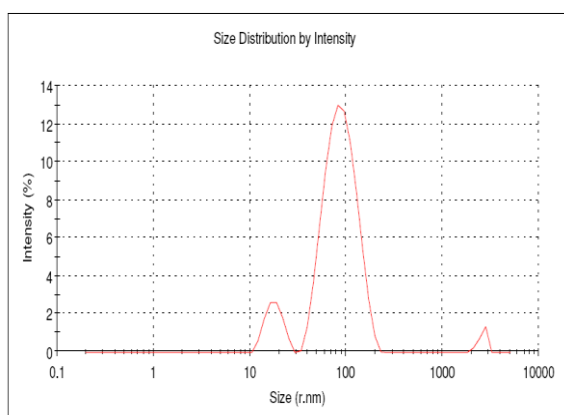


Figura 21: Distribuição do tamanho de partícula NLS 15

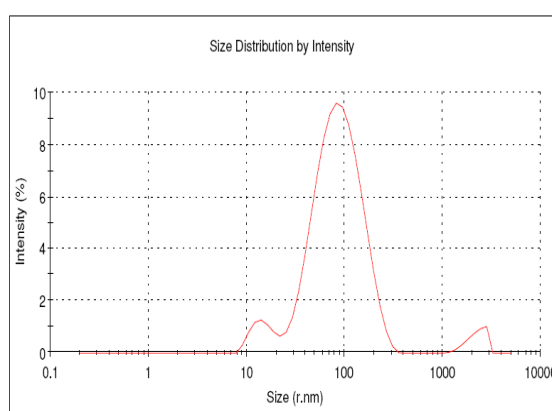


Figura 20: Distribuição do tamanho de partícula NLS 20

4.3.2. Análise de potencial zeta (PZ)

O PZ é um potencial elétrico que sofre influências pela mudança na interface entre partícula e meio dispersante devido à dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio dispersante. Esse potencial elétrico normalmente ocorre na maioria das partículas que entram em contato com um líquido e adquirem carga na sua superfície (HEURTAUL, et al., 2003; SHAFFAZICK et al., 2003).

Sabe-se que o PZ é muito utilizado para prever a estabilidade de sistemas coloidais. O potencial zeta acima do módulo 30 mV é um indicativo da presença de estabilidade eletrostática (UNER, 2006). Nos resultados apresentados na tabela 9 é possível observar o aumento do PZ com a presença de TERP nas NLS e também o aumento gradativo de PZ conforme o aumento na concentração de TERP nas NLS.

Tabela 9: Potencial zeta da NLS placebo e das NLS com TERP

<i>Formulações</i>	<i>Potencial zeta (mV)*</i>	<i>Desvio Padrão*</i>
<i>NLS placebo</i>	-16,70	± 0,424
<i>NLS 2,5</i>	-17,65	± 0,071
<i>NLS 5</i>	-22,60	± 0,495
<i>NLS 10</i>	-24,95	± 5,091
<i>NLS 15</i>	-28,20	± 1,777
<i>NLS 20</i>	-34,10	± 4,737

*Média de três leituras realizadas em triplicata

O aumento gradativo do PZ conforme o aumento da concentração de TERP nas NLS ocorre devido ao aumento da porção de TERP adsorvido na superfície das partículas e a presença do grupamento hidroxila de carga negativa presente na molécula de fármaco. Assim,

uma parte do fármaco encontra-se ao redor da matriz lipídica enquanto outra encontra-se no interior desta matriz (ZHANG et al., 2006).

Assim, o aumento do PZ neste caso não está diretamente relacionado a um indicativo de estabilidade, pois as formulações compostas por maiores concentrações de TERP após dois dias de armazenamento tiveram aumento de viscosidade, assemelhando-se a uma emulsão.

4.3.3. Perda e rendimento no processo de obtenção das NLS

A avaliação da perda de fármaco no processo de obtenção das NLS é de extrema importância para o cálculo da eficiência de encapsulação (EE%), principalmente porque o processo de HAP tende a gerar muitas perdas de amostra, pois no mínimo 5ml de amostra ficam retidos ao equipamento no momento da coleta, ou seja 25% da quantidade total de formulação obtida. Outro fator de grande influência é que o TERP por ser um fármaco volátil, pode apresentar perdas quando exposto a aplicação de calor, mesmo que em temperaturas abaixo do seu ponto de fulgor, pois o processo pode aumentar sua volatilização.

De acordo com os resultados que se encontram na tabela 11 é possível observar que a maior perda foi para a NLS 20 que teve um rendimento de 68,46% do total de TERP adicionado à formulação e o maior rendimento foi para a NLS 15 no qual houve um rendimento de 78,53%.

4.3.4. Eficiência de encapsulação (EE%) e capacidade de carga das NLS (CC%)

O método de ultrafiltração é muito utilizado no estudo de eficiência de encapsulação de fármacos em nanopartículas, principalmente por ser um método rápido e eficiente

comparado aos demais métodos aplicados para tal como a separação de fármaco livre por cromatografia de exclusão em gel, assim este foi escolhido para o ensaio.

Como descrito no item 3.2.4.4. a validação do dispositivo de ultrafiltração é necessário para a padronização do tempo e da velocidade aplicada na ultracentrifuga para que todo o material encapsulado seja separado do material não encapsulado.

Validação do dispositivo de ultrafiltração para o ensaio de eficiência de encapsulação

Para a validação do dispositivo de ultrafiltração empregado, uma solução aquosa de TERP na concentração de 454,03 µg/ml foi preparada e quantificada por CLAE, para a padronização da velocidade e do tempo necessário para que toda a quantidade de TERP livre ultrapassasse pela membrana do dispositivo de ultrafiltração, ou seja, para que atingisse o compartimento inferior do mesmo. Uma alíquota de 1 ml desta solução foi adicionada ao compartimento superior do dispositivo e centrifugada a 5000 g por 20 minutos ou até que toda a solução tivesse passado para o compartimento inferior do mesmo. Na tabela 10 encontra-se os resultados de concentração de TERP obtida e a porcentagem de TERP recuperado.

Tabela 10: Quantidade de TERP recuperada na validação do dispositivo de ultrafiltração

	Concentração em µg.ml ⁻¹ *	% Recuperada
Sem pré-tratamento	300,68	66,22
Com pré-tratamento	446,69	98,42

* Média de 3 concentrações em triplicata

De acordo com o estudo de LEE e colaboradores (2003), fármacos lipofílicos como o TERP tendem a ficar retido na membrana de celulose regenerada presente no dispositivo de ultrafiltração, em decorrência de forças adsorptivas geradas por ligações não específicas entre a matriz de celulose e o fármaco em questão. Nesta pesquisa foi investigado a modulação e o fator de redução deste tipo de ligação com a utilização de um pré-tratamento da membrana com soluções aquosas de polissorbato 80 em concentrações variando de 0,5 a 5%. Contudo, foi comprovado que quanto maior a concentração do tensoativo na solução de pré-tratamento, menor eram estas ligações não específicas entre a membrana e o fármaco lipofílico pesquisado. Assim, foi utilizado um pré-tratamento com uma solução aquosa contendo 5% de polissorbato 80. Os resultados apresentados na tabela 10 demonstram a diferença entre a quantidade de fármaco recuperada no dispositivo com e sem o pré-tratamento da membrana. Em vinte minutos de centrifugação no dispositivo de ultrafiltração sem o pré-tratamento, a porcentagem de TERP recuperada foi 1,48 vezes menor do que a recuperação obtida no dispositivo previamente tratado com a solução de polissorbato 80.

A recuperação de quase 99% TERP só foi possível com vinte minutos de centrifugação a 5000 g, em temperatura de 25°C, após o pré-tratamento da membrana. Assim, a eficiência de encapsulação pode ser calculada uma vez que o fármaco livre é capaz de atravessar a membrana nas condições pré-determinadas e o fármaco encapsulado nas NLS fica retido no compartimento superior do dispositivo.

A eficiência de encapsulação avalia qual a porcentagem total de fármaco presente na partícula em relação à quantidade de fármaco total adicionada a amostra, ou seja, parte da quantidade de fármaco adicionada na formulação estará encapsulada e parte estará livre na dispersão.

A capacidade de carga avalia a quantidade total de fármaco presente na partícula, porém em relação à massa de lipídio presente na amostra (MUCHOW et al., 2008).

Com base nos resultados apresentados na tabela 11 é possível observar que em todas as NLS houve mais de 50% do fármaco encapsulado, valor considerado elevado para o sistema. Essa alta eficiência de encapsulação pode estar diretamente relacionada à característica lipofílica do fármaco ou até mesmo com a interação do fármaco com os componentes das NLS. No entanto, a partir da concentração de 10% de TERP a EE% diminuiu para todas as NLS. Assim como a EE% a capacidade de carga (CC%) também foi reduzida a partir das formulações contendo 10% de fármaco. A capacidade de carga é dependente da solubilização do fármaco no lipídio sólido e há casos no qual a solubilidade do fármaco é tão alta que a capacidade de carga chega a ser superior a 50% (DINGLER et al., 1999). A baixa capacidade de carga obtida pode ser em decorrência de uma mudança estrutural da nanopartícula referente a uma mudança na transição de fase do fosfolipídio utilizado na formulação, como mostra a figura 32 e tabela 15.

Tabela 11: Resultados obtidos para a eficiência de encapsulação (EE%), capacidade de carga (CC%), perda e rendimento no processo de obtenção das NLS com TERP.

<i>Formulações</i>	<i>EE%*</i>	<i>CC%*</i>	<i>Perda%*</i>	<i>Rendimento %</i>
<i>NLS 2,5</i>	82,00 ($\pm 1,97$)	11,72 ($\pm 0,12$)	23,43($\pm 9,18$)	76,57
<i>NLS 5</i>	88,56 ($\pm 3,01$)	12,52 ($\pm 0,34$)	25,97($\pm 7,84$)	74,03
<i>NLS 10</i>	67,94 ($\pm 3,36$)	8,66 ($\pm 1,03$)	24,65($\pm 9,03$)	75,35
<i>NLS 15</i>	62,75 ($\pm 2,87$)	8,26 ($\pm 0,52$)	21,47($\pm 8,71$)	78,53
<i>NLS 20</i>	55,13 ($\pm 2,52$)	4,718 ($\pm 0,94$)	31,54($\pm 6,12$)	68,46

*Média de três leituras realizadas em triplicata com seus respectivos desvios padrões.

4.4. Estudo de estabilidade das NLS

Após a obtenção das NLS, estas foram resfriadas em temperatura ambiente e em seguida, alíquotas de 15 ml foram armazenadas em temperatura de 4°C e a temperatura ambiente (25±3°C). O ensaio foi padronizado para todas as amostras contendo TERP.

As NLS 10, 15 e 20 adquiriram viscosidade semelhante a de uma emulsão, em menos de 24 horas quando armazenadas a 4°C, assim, não foi possível prosseguir as análises de tamanho de partícula, PDI, PZ e de EE% e estas amostras acabaram sendo descartadas do ensaio. Em temperatura ambiente essas mesmas amostras também apresentaram um aumento na viscosidade, porém com menor intensidade e maior tempo de armazenamento (aproximadamente 30 dias). Com 60 dias de armazenamento alíquotas de 2ml destas amostras foram retiradas para as devidas análises, no entanto com a tensão aplicada a pipeta no momento da coleta, a viscosidade da amostra aumentou impossibilitando o uso do material para os ensaios.

As NLS 2,5 e NLS 5 permaneceram aparentemente estáveis durante os 60 dias, tanto armazenadas a temperatura de 4°C quanto armazenadas a temperatura ambiente. No entanto, foi possível observar as diferenças entre as amostras armazenadas nas diferentes condições.

Como mostra a tabela 12, as maiores alterações estão relacionadas às amostras armazenadas em temperatura ambiente, pois houve o aumento do diâmetro médio das partículas e PDI, além do aumento do potencial zeta e redução da quantidade de fármaco encapsulada. A diferença observada entre as NLS armazenadas a 4°C e a temperatura ambiente ocorre, pois em temperatura mais elevada, há uma maior energia responsável pelo aumento do movimento das partículas no meio dispersante, o que facilita a colisão entre elas e uma possível formação de agregados. Isto explica o motivo do aumento do tamanho de

partículas e do PDI (GHAFFARI, et al, 2011). O aumento do potencial zeta pode estar relacionado a uma maior difusão do fármaco do interior da matriz lipídica para a superfície, bem como para o meio dispersante, o que explica a menor eficiência de encapsulação.

Tabela 12: Resultados obtidos do tamanho de partícula, índice de polidispersidade (PDI), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulação (EE) das NLS contendo TERP

<i>Formulações</i>	<i>Armazenamento Tempo e temperatura</i>	<i>Tamanho de partícula (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>PZ (mV)</i>	<i>EE (%)</i>
NLS 2,5	<i>1 dia</i>	89,80 ($\pm$ 7,70)	0,291 ($\pm$ 0,036)	-17,65 ($\pm$ 0,071)	82 ($\pm$ 1,97)
	<i>60 dias a 4 °C</i>	92,43 ($\pm$ 15,88)	0,248 ($\pm$ 0,044)	-15,8 ($\pm$ 0,23)	80,4 ($\pm$ 3,15)
	<i>60 dias a TA**</i>	138,33 ($\pm$ 18,62)	0,383 ($\pm$ 0,096)	-19,2 ($\pm$ 0,18)	76,04 ($\pm$ 2,92)
NLS 5	<i>1 dia</i>	82,54 ($\pm$ 13,78)	0,287 ($\pm$ 0,015)	-22,60 ($\pm$ 0,50)	88,56 ($\pm$ 3,36)
	<i>60 dias a 4 °C</i>	99,38 ($\pm$ 24,86)	0,242 ($\pm$ 0,013)	-22,2 ($\pm$ 0,74)	82,97 ($\pm$ 5,05)
	<i>60 dias a TA**</i>	174,7 ($\pm$ 20,19)	0,355 ($\pm$ 0,028)	-24,6 ($\pm$ 0,35)	72,38 ($\pm$ 7,69)

*Média de três leituras realizadas em triplicata com seus respectivos desvios padrões. ** TA: Temperatura Ambiente

4.5. Estudo de análise térmica

4.5.1. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) e Termogravimetria (TG)

A técnica de DSC é de extrema importância na caracterização das NLS, pois consegue informações relativas ao estado físico da nanopartícula e seu grau de cristalinidade. Com o estudo do comportamento térmico é possível avaliar os parâmetros utilizados na obtenção das NLS, uma vez que o fármaco é adicionado à fase oleosa previamente aquecida que, em seguida, é dispersa em uma solução aquosa de tensoativo, também à quente, e após a

submissão desta pré-emulsão a técnica de HPA, a amostra é finalmente resfriada a temperatura ambiente.

Frente ao processo de desenvolvimento das NLS, as amostras foram aquecidas e resfriadas com a finalidade de se observar possíveis interações entre o TERP e os excipientes presentes nas NLS e também modificações como diferença de entalpia e temperatura de fusão e cristalização durante o processo de obtenção das nanopartículas.

A técnica de TG foi empregada com a finalidade de complementar as informações cedidas pelas análises de DSC, em vista de que o fármaco por não apresentar pico de fusão, tem que ser avaliado quanto à variação de massa (perda de massa), liberação de compostos voláteis e ou processo de degradação (SILVA, et al., 2007). Outro objetivo é avaliar as temperaturas de degradação das matérias primas utilizadas no desenvolvimento das NLS e a diminuição da perda de massa de fármaco, quando o mesmo encontra-se incorporado na dispersão de nanopartículas.

O TERP, por ser um óleo essencial, apresenta-se na forma líquida e é considerado um material volátil. A fim de avaliar suas mudanças em decorrência da aplicação de calor, o TERP foi submetido a uma programação controlada de temperatura entre -90 e 250°C. Na figura 22 pode-se observar que o TERP apresenta três eventos endotérmicos. O primeiro pico pode estar relacionado a uma transição vítrea do fármaco na temperatura de -65,89°C. O segundo pico tem início em 82,86°C e pico máximo em 121,86°C ($\Delta H = 50,72 \text{ J.g}^{-1}$) e provavelmente está relacionado com o ponto de fulgor do fármaco, ou seja a temperatura na qual o fármaco torna-se mais volátil. Finalmente o terceiro pico em 231,38°C ($\Delta H = 61,87 \text{ J.g}^{-1}$) é atribuído ao seu ponto de ebulição no qual há a volatilização completa e/ou decomposição do TERP (SIGMA ALDRICH, 2011). A não ocorrência de nenhum evento exotérmico pode ter sido em decorrência do porta amostra não ser completamente hermético,

e assim com o aumento programado da temperatura na análise, o fármaco presente pode ter sido evaporado.

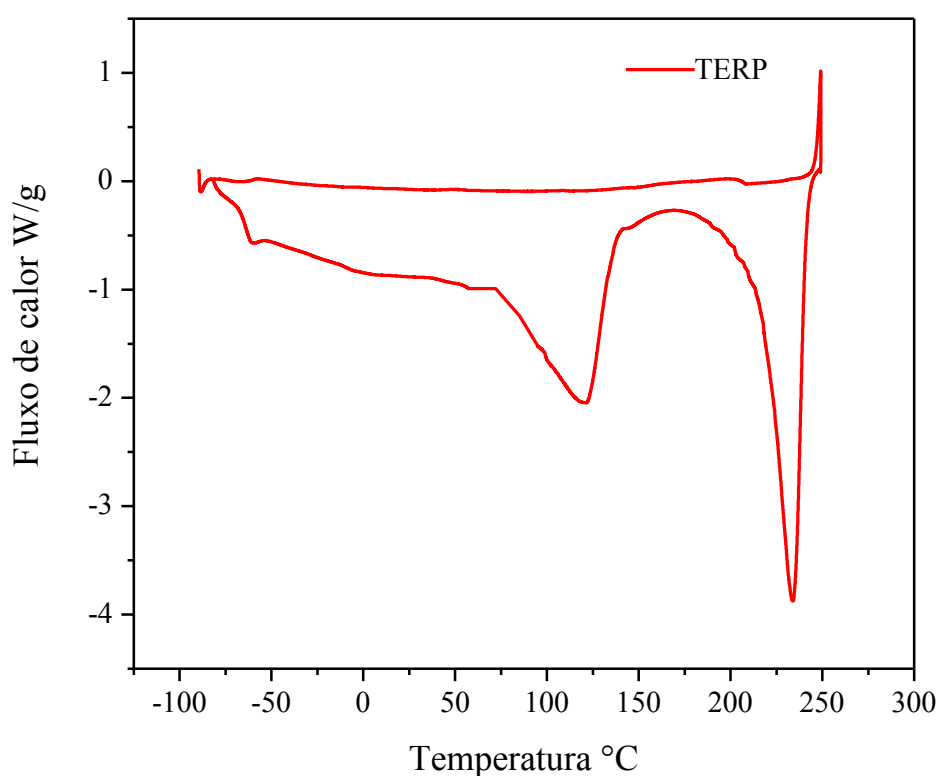


Figura 22: Curva DSC do TERP

Para a análise de TG foi necessário fazer uma mistura binária entre o TERP e a α -alumina na proporção de 3:7, com o intuito de proteger a balança termoanalítica de uma possível ebulição do fármaco. A α -alumina na termoanalítica é considerado um material inerte, ou seja, não gera influência nos resultados do ensaio. Deve-se ressaltar que este material é o mesmo utilizado na confecção dos cadinhos utilizados como porta amostra na análise de TG (SILVA, et al., 2007).

Na figura 23, é possível observar que a perda de massa de 27,37% ocorre entre as temperaturas de 85,82 e 214,89°C, tendo sua perda máxima na temperatura de 123,85°C. Esse resultado assemelha-se aos resultados obtidos na análise de DSC (figura 22), no qual o segundo evento endotérmico corresponde à temperatura máxima de perda de massa de TERP.

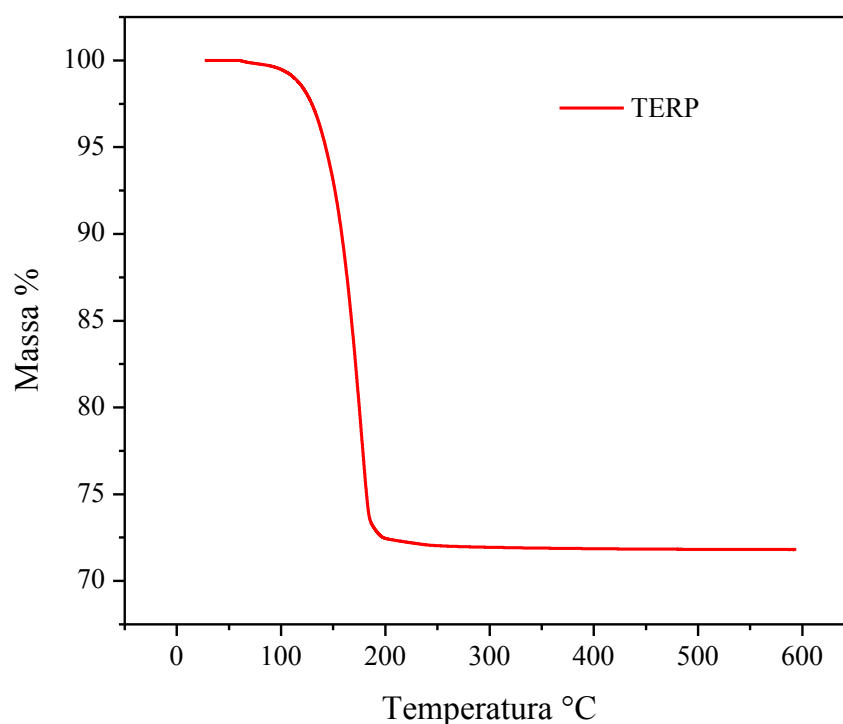


Figura 23: Curva TG do TERP

Um estudo de isoterma do TERP em 30 minutos a $80 \pm 2,57^\circ\text{C}$ como representado na figura 24, também foi realizado com o objetivo de comparar o estudo de estabilidade do TERP frente ao calor. Contudo, pode-se observar que nenhum evento térmico foi observado. Assim, foi comprovado que o tempo de aplicação e a temperatura empregada na obtenção das NLS por HAP, não tem influência significativa na perda de massa do TERP.

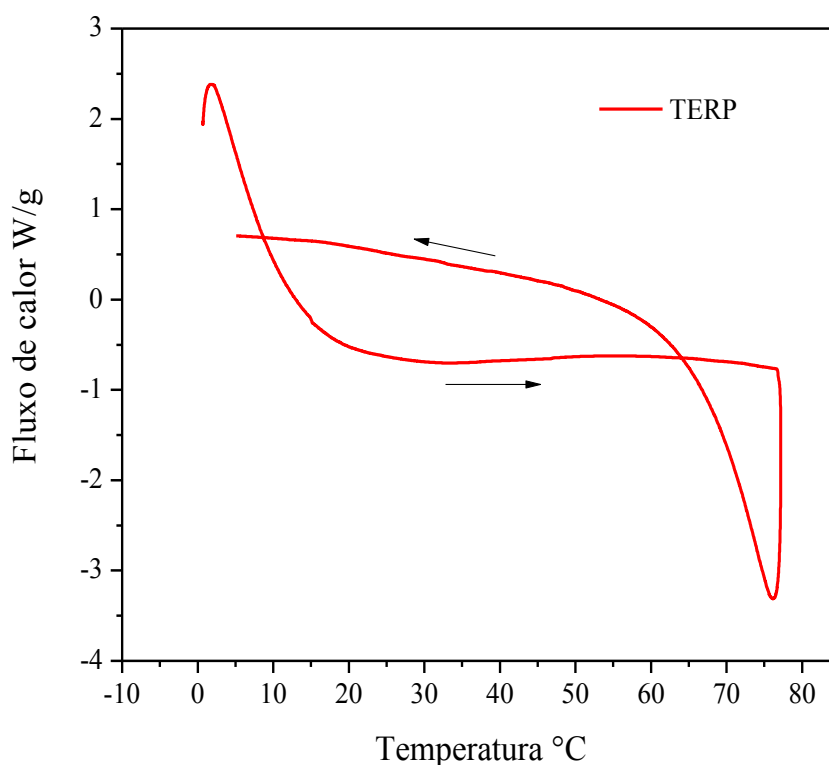


Figura 24: Curva DSC Isoterma do TERP por 30 minutos a $80 \pm 2,57^\circ\text{C}$

A curva de DSC da matéria-prima GMS, apresentada na figura 25, mostra a presença de um único evento endotérmico com início em $59,88^\circ\text{C}$ correspondente a fusão do material lipídico em $61,92^\circ\text{C}$ ($\Delta H = 134,4 \text{ J.g}^{-1}$). No resfriamento da amostra pode-se observar 2 eventos exotérmicos, sendo o primeiro em $52,39^\circ\text{C}$ e o segundo em $49,85^\circ\text{C}$ ($\Delta H = 69,8 \text{ J.g}^{-1}$), mostrando que o processo de recristalização do lipídio ocorre em duas etapas. Resultados semelhantes foram obtidos por ZIMMERMANN e colaboradores (2005) e YAJIMA e colaboradores (2002).

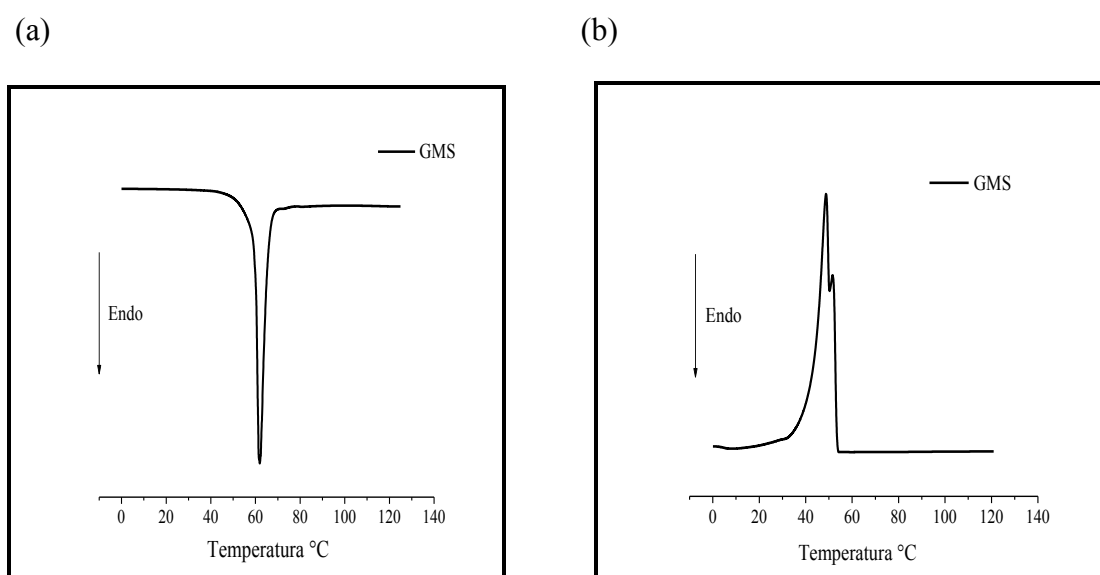


Figura 25: Curva DSC da matéria prima GMS: (a) Aquecimento; (b) Resfriamento.

Com o objetivo de avaliar a interação do TERP com o GMS, foram construídas curvas DSC da mistura binária de GMS-TERP nas proporções utilizadas para o desenvolvimento das NLS, como representado na figura 26.

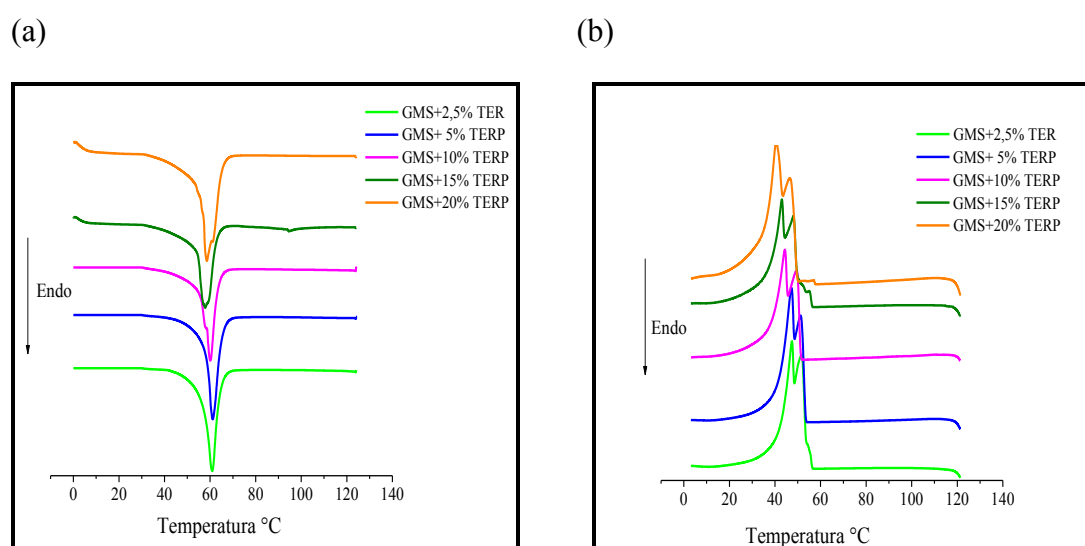


Figura 26: Curva DSC da mistura binária de GMS/TERP: (a) Aquecimento; (b) Resfriamento.

Observa-se que o aumento na concentração de TERP promoveu alargamento gradual do pico de fusão da mistura, sendo que a diferença entre a temperatura inicial de fusão e a temperatura máxima de fusão aumentou de 2,04°C do GMS puro para 8,97°C do GMS contendo 20% de TERP. A partir da concentração de 10% a característica do pico é alterada, isto porque a fusão da mistura começa a ocorrer em 2 etapas. Houve diminuição na entalpia de fusão obtida em relação à entalpia esperada para todas as amostras, como mostra a tabela 13. Entretanto, esta diferença torna-se reduzida a partir da concentração de 10% de fármaco na mistura, evidenciando que a interação entre o GMS e TERP ocorre de forma favorável para a incorporação do fármaco até a concentração de 5%, pois o mesmo promove maior desestruturação da matriz lipídica.

Na recristalização da mistura é possível observar a presença de 2 eventos exotérmicos, semelhantes ao do GMS puro. Assim como na curva de aquecimento os picos também ficaram mais alargados com a diminuição da temperatura inicial do evento de cristalização do GMS puro para a mistura contendo 20% TERP de 3,92°C para o primeiro pico e 6,77°C para o segundo. A entalpia obtida foi menor que a esperada para todas as amostras, o que é indicativo de que o TERP interage com o GMS (ZIMMERMANN; SOUTO; MULLER, 2005).

Tabela 13: Dados de DSC para a mistura binária GMS/TERP

<i>Parâmetros DSC</i>	<i>Mistura binária de GMS com TERP em concentrações crescentes (m/m)</i>					
	<i>0%</i>	<i>2,5%</i>	<i>5%</i>	<i>10%</i>	<i>15%</i>	<i>20%</i>
Endotérmico						
$T_{inicial} (^{\circ}C)$	59,88	58,95	58,12	54,17	54,16	56,47
$T_{pico} (^{\circ}C)$	61,92	60,92	61,12	54,74 e 60,28	56,74 e 63,13	58,40 e 65,44
$\Delta H_{otido}(J.g^{-1})$	134,4	110,6	107,1	105,85	104,92	106,8
$\Delta H_{esperado}(J.g^{-1})$	-	131,04	127,68	120,96	114,24	107,52
Exotérmico						
$T_{inicial} (^{\circ}C)$	53,32 e 49,85	53,71 e 48,30	53,24 e 48,32	51,09 e 45,4	49,33 e 43,95	49,4 e 43,08
$T_{pico} (^{\circ}C)$	52,39 e 48,71	52,09 e 47,15	51,55 e 47,09	49,75 e 44,30	48,20 e 42,93	47,04 e 40,20
$\Delta H_{obtido}(J.g^{-1})$	69,77	65,47	62,31	51,12	45,94	39,17
$\Delta H_{esperado}(J.g^{-1})$	-	68,03	66,28	62,79	59,30	55,82

A figura 27 ilustra a curva TG da matéria prima GMS na qual a perda de massa ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, a perda é equivalente a 21,07% da massa total de GMS e ocorre entre as temperaturas de 108,38 e 247,28°C, na segunda etapa, a perda de massa é maior chegando a 74,53%, evento que ocorre entre as temperaturas de 296,15 e 416,53°C. Assim, é possível inferir que a degradação do GMS ocorre em temperaturas superiores à utilizada na técnica de obtenção do sistema de NLS.

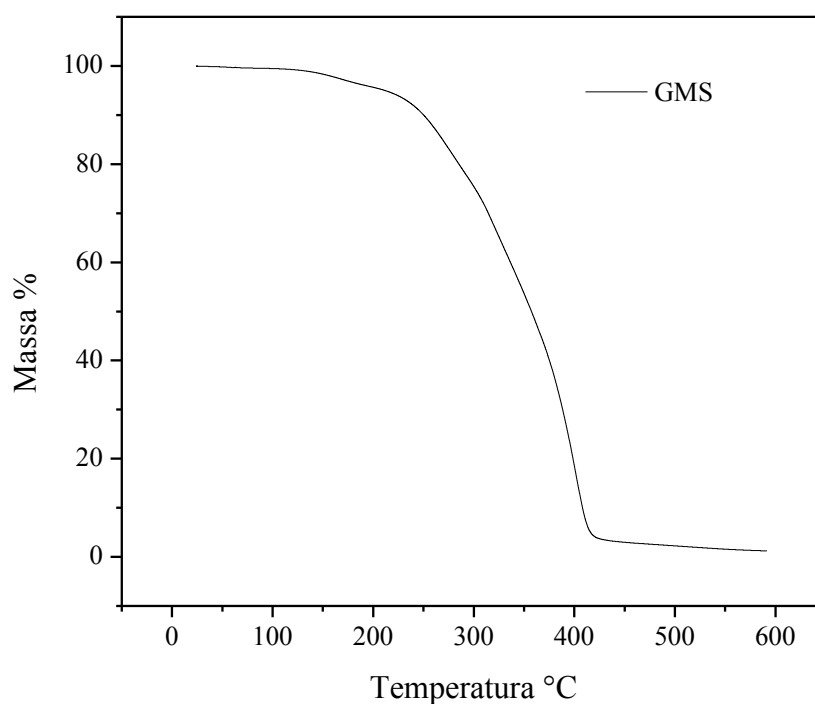


Figura 27: Curva TG da matéria prima GMS

Outros componentes também foram utilizados no desenvolvimento das NLS como o tensoativo P-188. A figura 28 apresenta a curva DSC para o P-188 puro, no qual apenas um evento endotérmico referente ao ponto de fusão do P-188 em 53,73°C ($\Delta H = 101,6 \text{ J.g}^{-1}$) é evidenciado (ROWE, SHESKEY e OWEN, 2006). O processo de recristalização da matéria prima ocorre também através de um único evento exotérmico na temperatura de 31,41°C ($\Delta H = 90,95 \text{ J.g}^{-1}$).

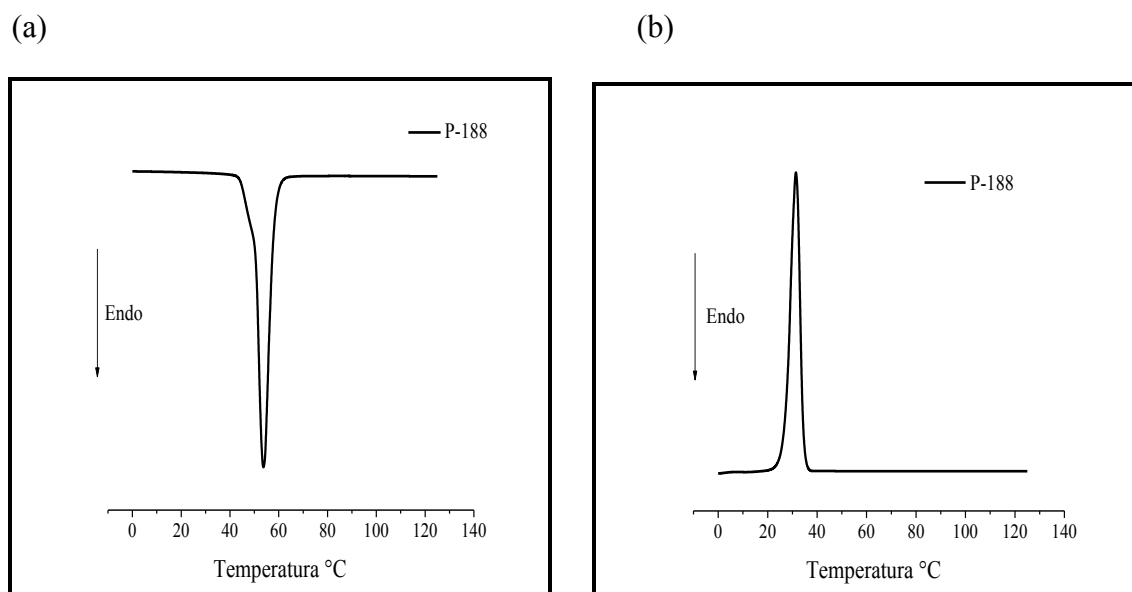


Figura 28: Curva DSC da matéria prima P-188: (a) Aquecimento; (b) Resfriamento

As misturas binárias de P-188 e TERP também foram estudadas através das curvas DSC construídas com a aplicação de concentrações semelhantes às utilizadas nas NLS, como mostra a figura 29. O deslocamento e alargamento do pico de fusão foram gradual ao aumento da concentração de TERP na mistura binária, fato relacionado à desorganização estrutural do P-188 devido a alta concentração de TERP.

Como representado na tabela 14, a entalpia de fusão obtida foi menor do que a entalpia esperada para todas as misturas binárias, o que mostra a interação entre o fármaco e o tensoativo.

Nos eventos exotérmicos o alargamento dos picos também ocorreu, porém em menor intensidade, pois as temperaturas iniciais dos eventos não sofreram alteração significativa. Entretanto, para as misturas contendo 15 e 20% de TERP o deslocamento do pico de cristalização foi intenso, chegando a um evento térmico de cristalização igual a 17,15 e 15,01°C. As entalpias obtidas nos eventos exotérmicos também foram inferiores a entalpia

esperada, sugerindo-se a interação entre o TERP e o P-188 sendo que maiores concentrações de fármaco promovem um grande desarranjo da matriz polimérica, fato que pode ser responsável por uma diminuição da efetividade do P-188 como tensoativo responsável pela estabilidade estérica nas nanopartículas. De acordo com o estudo de estabilidade as formulações contendo maiores quantidades de TERP (NLS 10, NLS 15 e NLS 20) apresentaram sinais de instabilidade devido ao aumento aparente de viscosidade.

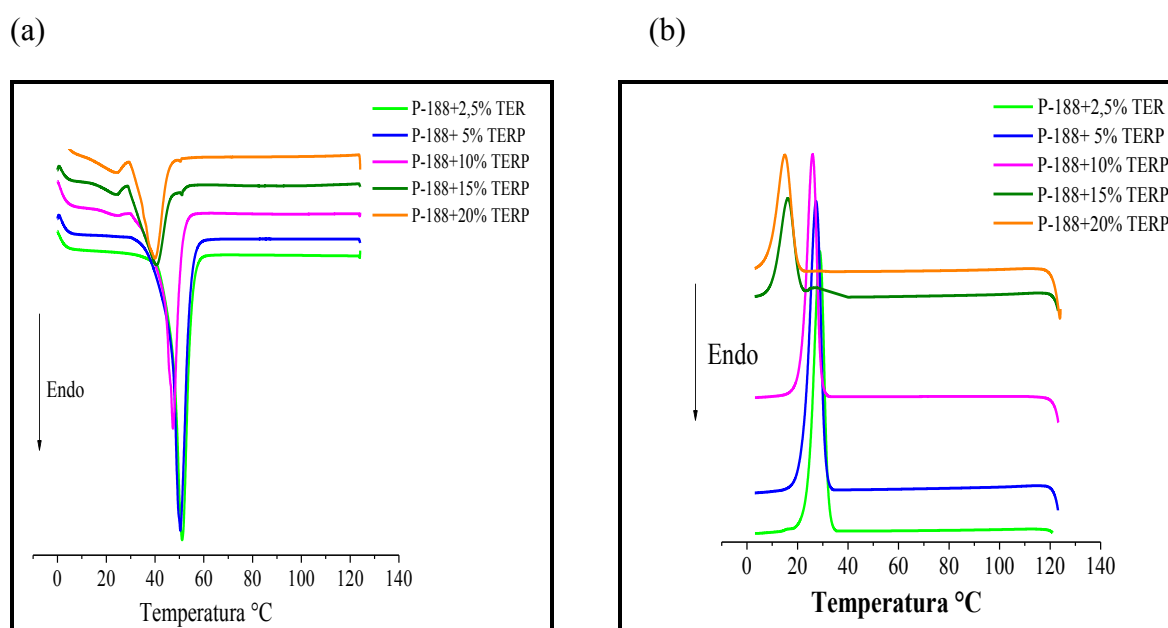


Figura 29: Curvas DSC da mistura binária P-188/TERP: (a) Aquecimento; (b) Resfriamento

Tabela 14: Dados de DSC para a mistura binária P-188/TERP

<i>Parâmetros DSC</i>	<i>Mistura binária de P-188 com TERP em concentrações crescentes (m/m)</i>					
	<i>0%</i>	<i>2,5%</i>	<i>5%</i>	<i>10%</i>	<i>15%</i>	<i>20%</i>
Endotérmico						
$T_{inicial} (^{\circ}C)$	49,96	46,87	43,78	39,20	28,98	32,89
$T_{pico} (^{\circ}C)$	53,73	51,15	49,57	44,99	40,54	40,01
$\Delta H_{otido}(J.g^{-1})$	101,6	85,58	86,29	62,92	43,08	54,92
$\Delta H_{esperado}(J.g^{-1})$	-	93,81	87,06	76,39	67,73	60,84
Exotérmico						
$T_{inicial} (^{\circ}C)$	34,43	32,05	29,84	27,38	33,31 e 20,76	17,15
$T_{pico} (^{\circ}C)$	31,41	28,82	26,15	23,89	30,28 e 17,17	15,01
$\Delta H_{obtido}(J.g^{-1})$	90,95	79,81	77,34	61,36	42,26	50,36
$\Delta H_{esperado}(J.g^{-1})$	-	83,98	77,93	68,38	60,63	54,46

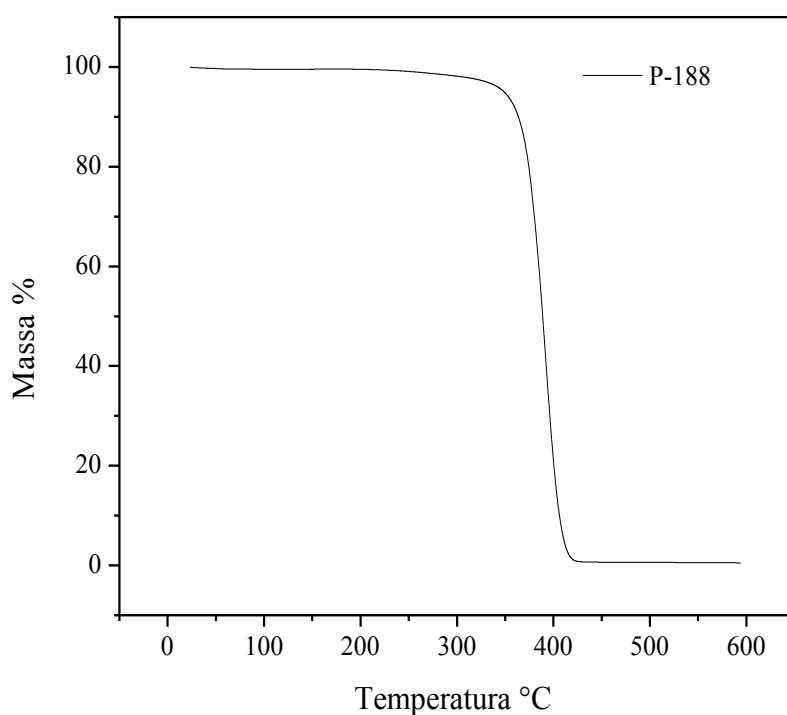


Figura 30: Curva TG da matéria prima P-188

A figura 30 mostra a análise de TG do P-188, no qual a perda de massa de 96,55% ocorre em um único evento entre as temperaturas de 326,17 e 369,77°C. Essa perda de massa pode estar relacionada a um processo de degradação da matéria-prima que neste estudo não deve ser levada em consideração, tendo em vista que o calor aplicado no desenvolvimento das amostras não ultrapassa os 70°C.

O último excipiente presente na formulação é a FSH. Sua curva DSC (figura 31) apresentou três diferentes eventos endotérmicos referente à fusão da matéria prima, o primeiro em 70,70°C, o segundo em 83,67°C e o terceiro em 99,46°C. A entalpia de fusão foi de 48,33 J.g⁻¹. Na curva de resfriamento é possível observar a presença de três eventos, no entanto apenas o segundo evento é bastante pronunciado e o principal responsável pela recristalização do lipídio. Os eventos exotérmicos ocorrem nas temperaturas de cristalização de 76,50°C no primeiro pico, 86,39°C no segundo e 90,31°C no terceiro, com a entalpia de 49,56 J.g⁻¹.

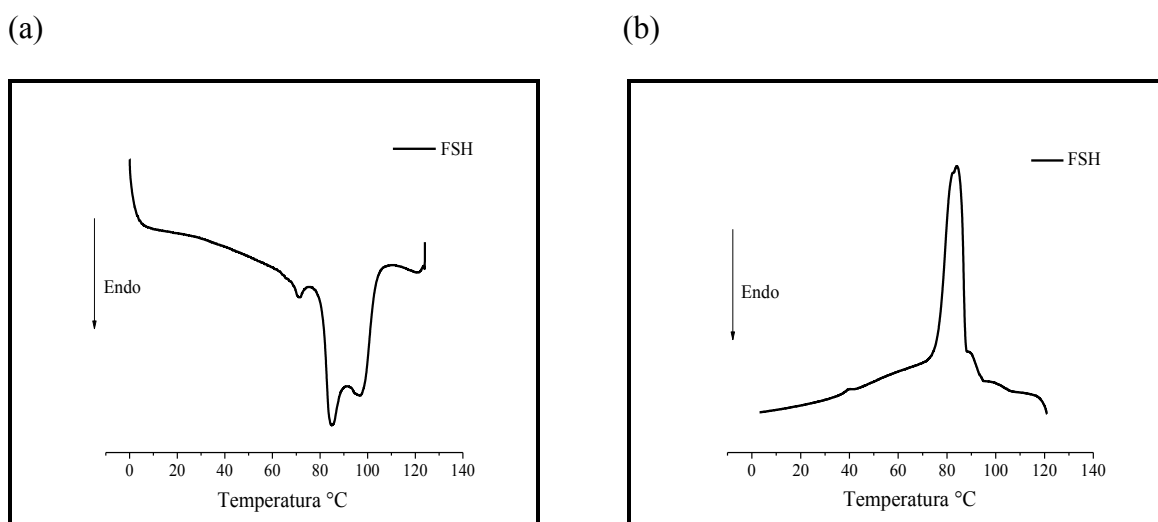


Figura 31: Curva DSC da matéria prima FSH: (a) Aquecimento; (b) Resfriamento

Na mistura binária entre a FSH e o TERP é possível observar a forte interação entre o fármaco e a matéria prima, principalmente devido à mudança estrutural dos eventos. Conforme o aumento da concentração de TERP o número de eventos endotérmicos é reduzido, principalmente para a concentração de 20% de fármaco. Na tabela 15 e figura 32 é possível observar que há um deslocamento significativo dos eventos endotérmicos frente à matéria prima FSH, pois a mistura binária de menor concentração de TERP tem seus eventos térmicos em temperaturas inferiores a 70°C e a FSH pura tem seus eventos em temperaturas superiores. Vale ressaltar que após a concentração de 10% de fármaco na mistura a curva de aquecimento começa a apresentar 2 eventos e finalmente na concentração de 20% um único evento. A partir da concentração de 5% de TERP a entalpia de fusão obtida foi maior que a esperada para todas as concentrações o que sugere a forte interação do TERP com o fosfolípido.

CRISTANI e colaboradores (2007) avaliaram como os monoterpenos atuam na membrana celular de microorganismos promovendo atividade bactericida, sendo que a interação entre fosfolípidios e fármaco foi avaliada através da técnica de DSC. No estudo observou-se a diminuição na temperatura de transição de fase de três diferentes fosfolípidios devido a capacidade que os monoterpenos têm de interagir com a superfície da bicamada e promover uma inclinação da cadeia acil, pois a parte polar da molécula do monoterpeno. No caso do TERP a hidroxila, poderia estar interagindo com a parte polar da bicamada; enquanto que a cadeia alifática do TERP, poderia interagir com a parte interna da bicamada afetando a estrutura molecular do fosfolípido. O que explica o resultado obtido entre a interação de TERP e FSH.

Na caracterização do perfil de recristalização da mistura binária é possível confirmar a mudança estrutural evidenciada com o aumento da concentração de TERP nas amostras, em

vista de que o número de eventos exotérmicos também foi reduzido, chegando a apenas um único evento a partir da concentração de 10%, como mostra a figura 32. O deslocamento dos picos de cristalização das misturas binárias em relação a FSH pura é evidenciado, pois o início do primeiro evento para as amostras contendo o fármaco foram inferiores a 80°C e para a matéria prima pura foi de 90°C.

Correspondendo aos eventos endotérmicos, a entalpia de cristalinização obtida na mistura a partir da concentração de 5% de TERP foi maior do que a esperada, provando-se assim a forte interação entre TERP e FSH.

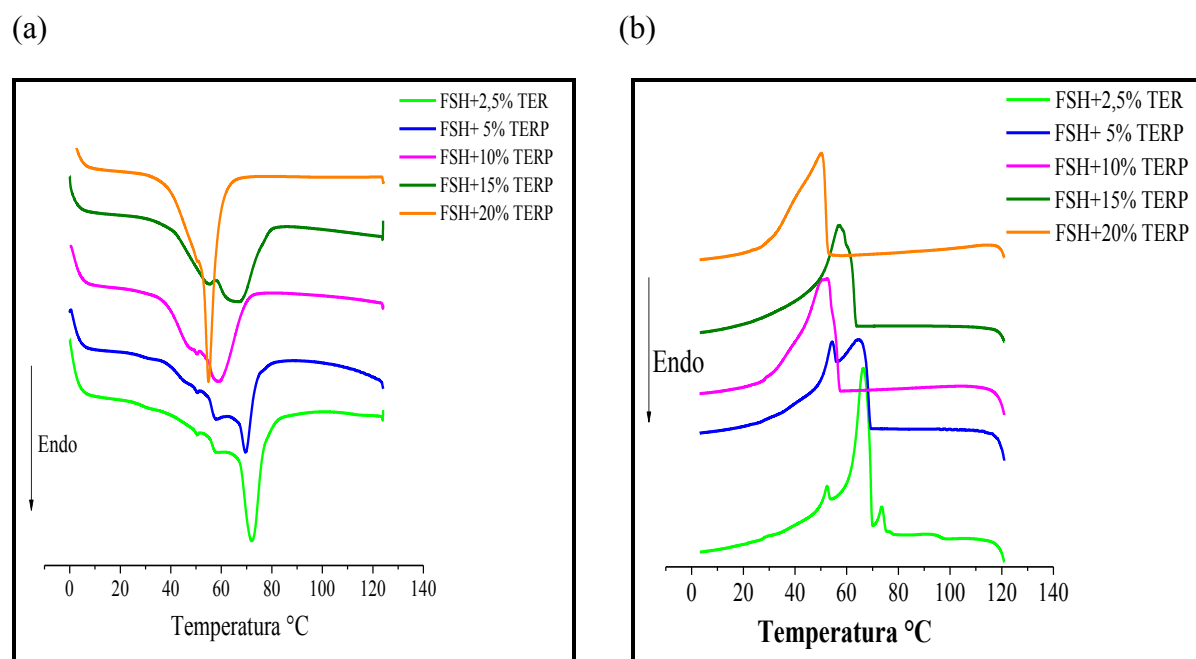


Figura 32: Curva DSC da mistura binária de FSH/TERP: (a) Aquecimento; (b) Resfriamento

Tabela 15: Dados de DSC para a mistura binária FSH/TERP

Parâmetros DSC	Mistura binária de FSH com TERP em concentrações crescentes (m/m)					
	0%	2,5%	5%	10%	15%	20%
Endotérmico						
$T_{inicial} (^{\circ}\text{C})$	68,44/81,15/92,99	48,98/55,76/67,54	49,04/55,62/66,93	41,38/54,25	45,46/58,70	51,73
$T_{pico} (^{\circ}\text{C})$	70,70/83,64/99,46	50,30/57,77/72,57	50,27/57,13/66,48	46,65/60,63	53,78/68,59	54,84
$\Delta H_{otido} (\text{J.g}^{-1})$	48,33	38,55	42,02	48,29	60,36	58,30
$\Delta H_{esperado} (\text{J.g}^{-1})$	-	44,63	41,41	36,34	32,22	28,94
Exotérmico						
$T_{inicial} (^{\circ}\text{C})$	92,83/87,42/79,93	74,92/69,73/53,38	69,04/55,76	52,61	53,17	52,53
$T_{pico} (^{\circ}\text{C})$	90,31/86,39/76,50	73,52/66,55/52,31	66,48/53,84	57,10	61,93	50,25
$\Delta H_{obtido} (\text{J.g}^{-1})$	49,56	41,82	49,62	44,42	48,61	46,58
$\Delta H_{esperado} (\text{J.g}^{-1})$	-	45,76	42,47	37,26	33,04	29,68

Com a análise de TG da matéria prima FSH (figura 33) é possível afirmar que a perda de massa de 90,05% ocorre em três etapas, sendo a primeira entre 201,49 e 241,19°C com perda de 8,5%, a segunda entre 279,22 e 317,72°C, que corresponde ao evento de maior intensidade com perda de massa de 76,15% e a terceira entre 382,34 e 456,87°C com perda de 5,39%. Provavelmente essa perda de massa assim como no caso do GMS e P-188 ocorre devido à degradação da matéria prima. Assim, concluí-se que o fosfolipídio aplicado a formulação, não sofre nenhum processo de degradação na temperatura utilizada para o desenvolvimento deste trabalho.

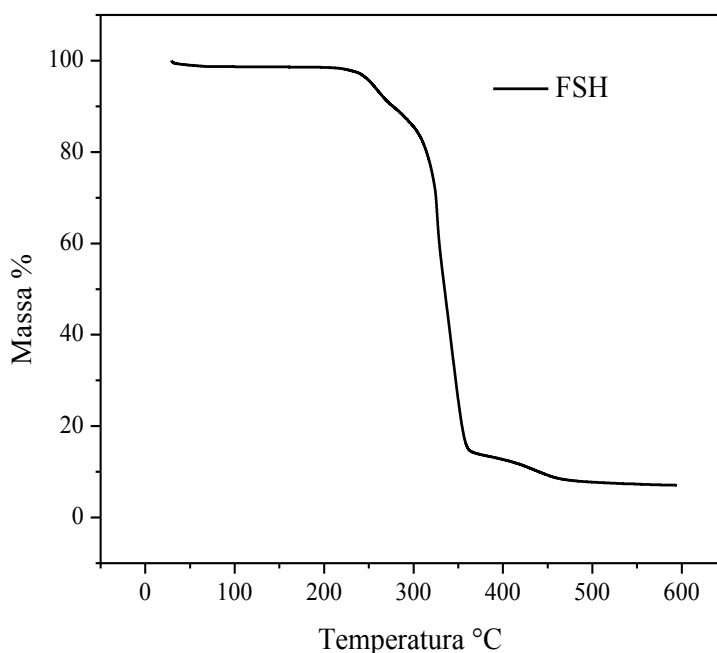


Figura 33: Curva TG da matéria prima FSH

Para a avaliação da interação dos excipientes utilizados no desenvolvimento das NLS, foi obtida uma curva DSC com mistura física, nas mesmas proporções, de cada matéria prima utilizada na preparação das nanopartículas.

A figura 34 mostra que a curva de aquecimento da mistura física das NLS apresenta três eventos térmicos. O primeiro pico está relacionado à fusão do P-188 com a temperatura máxima 4,31°C inferior à matéria-prima pura ($\Delta H = 7,07 \text{ J.g}^{-1}$). Os demais eventos endotérmicos, correspondentes à fusão do GMS e do fosfolípido, acontecem praticamente de forma simultânea, sendo um em 62,86°C e o outro em 65,28°C ($\Delta H = 52,23 \text{ J.g}^{-1}$). Como não houve a presença de eventos endotérmicos em temperaturas próximas e acima de 70°C, pode-se inferir que houve uma interação entre o GMS e a FSH e que o P-188 tem uma leve

interação com o GMS, principalmente pelo fato de que a entalpia de fusão de todos os eventos diminui drasticamente se comparado as entalpias de fusão das matérias primas puras.

Os eventos exotérmicos apresentaram 3 picos de recristalização. O primeiro e segundo pico são referente à interação GMS e FSH que ocorreram nas temperaturas de 52,4 e 56,5°C ($\Delta H = 47,8 \text{ J.g}^{-1}$) e o último pico é referente à matéria-prima P-188 na temperatura de 23,7°C ($\Delta H = 14,2 \text{ J.g}^{-1}$)

Sabe-se que a mistura de lipídios de diferentes comprimentos de cadeia carbônica e diferentes estruturas possuem uma solubilidade mútua o que pode ser observado pela interação do FSH ao GMS (JENNING, THUNEMANN e GOHLA, 2000; BUNJES, WESTESEN e KOCH, 1996).

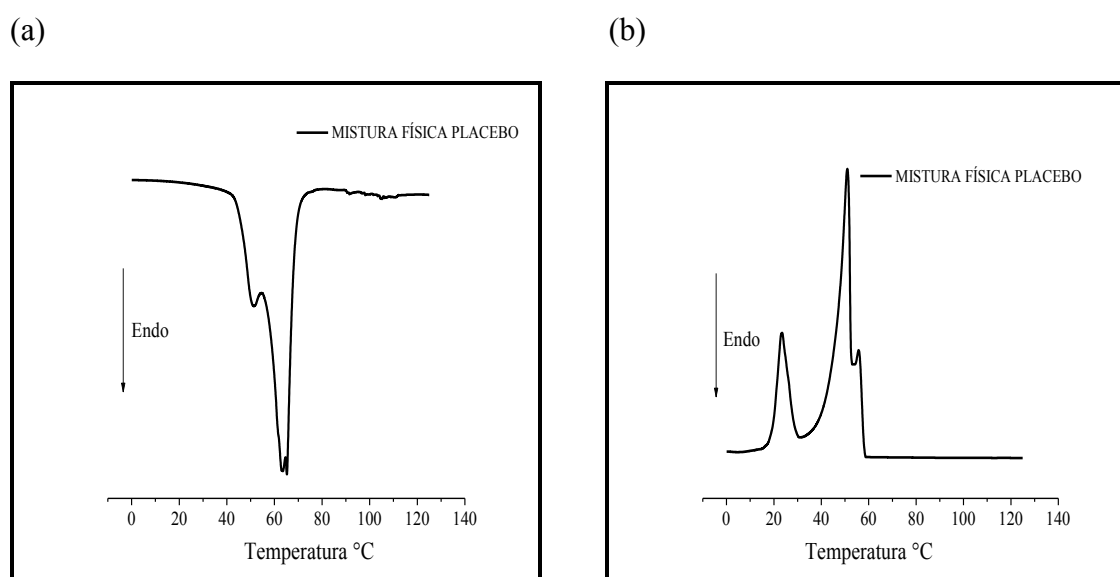


Figura 34: Curva DSC da mistura física da formulação F5 (a) Aquecimento; (b) Resfriamento.

Na análise da mistura física contendo TERP (figura 35) é possível observar o alargamento dos picos endotérmicos devido a diminuição da temperatura inicial de fusão de 4,2°C para o primeiro pico e 2,3°C para o segundo pico na mistura composta pela concentração de 20% de fármaco em relação à mistura física sem a presença do TERP. De acordo com a tabela 16, as entalpias de fusão diminuíram conforme o aumento na concentração de TERP na amostra, de 7,07 J.g⁻¹ para 2,27 J.g⁻¹ para o pico do P-188 e de 52,23 J.g⁻¹ para 40,01 J.g⁻¹ para o pico dos lipídios, mostrando a interação do fármaco com os excipientes.

No processo de recristalização da mistura física contendo TERP é possível observar a ocorrência dos 3 eventos exotérmicos, contudo o terceiro pico de cristalização referente ao lipídio aumentou drasticamente com a presença de TERP, sendo que a somatória das entalpias de cada amostra referente ao processo de recristalização dos lipídios diminuiu em relação a amostra sem fármaco. A entalpia de cristalização do P-188 mostra um aumento a partir das amostras contendo 10% de TERP.

Tabela 16: Dados de DSC para a mistura física da formulação F5 com TERP

Parâmetros DSC	Mistura física da formulação F5 com TERP em concentrações crescentes (m/m)					
	0%	2,5%	5%	10%	15%	20%
Endotérmico						
<i>T_{inicial}</i> (°C)	45,8/58,2	44,9/56,5	42,4/57,1	42,03/55,77	41,8/55,7	41,6/55,9
<i>T_{pico}</i> (°C)	49,4/63,6/65,3	49,08,/60,8/62,8	47,6/60,7/61,8	45,26/59,35/62,89	46,1/60,9/62,8	44,7/59,5/62,7
$\Delta H_{\text{otido}}(\text{J.g}^{-1})$	7,07/52,23	5,4/50,5	5,7/44,8	4,56/44,68	4,74/41,01	2,27/40,1
Exotérmico						
<i>T_{inicial}</i> (°C)	58/52,4/28,6	61,9/50,2/26,2	61,02/50,5/25,4	60,02/46,6/24,7	59,6/43,1/25	56,5/42,9/21,9
<i>T_{pico}</i> (°C)	56,5/50,9/23,7	59,7/48,5/22,5	58,8/49/20,2	58/48,3/44,8/47/21	57,7/45,64/44,9/21,3	46,4/45,7/41,6/19,8
$\Delta H_{\text{otido}}(\text{J.g}^{-1})$	47,8/14,2	20,8/15,2/13	18,5/15,6/12,3	18,4/13,7/13,4	18,55/11,3/13,3	17,4/7,04/13,7

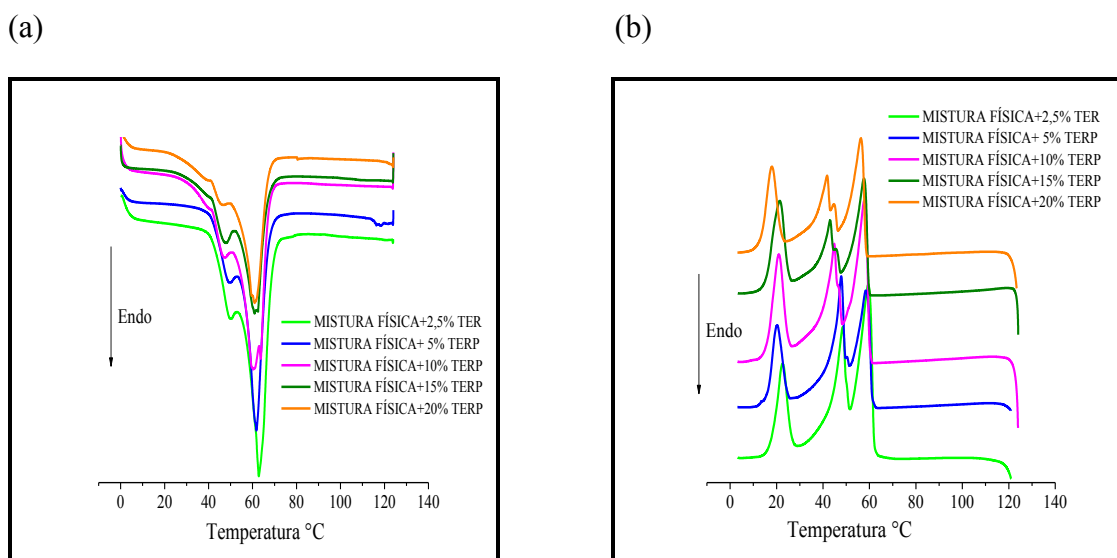
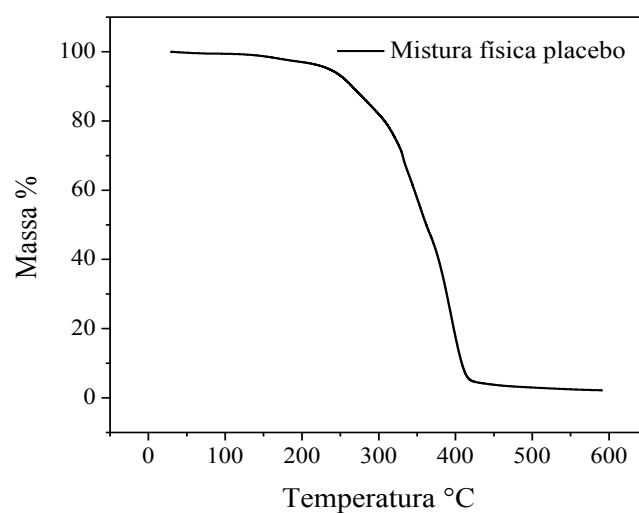


Figura 35: Curva DSC da mistura física da formulação F5 com TERP (a) Aquecimento; (b) Resfriamento.

A curva TG referente a misturas física da amostra de NLS placebo (figura 36 a), mostra uma perda de massa de 97,66% que ocorre entre as temperaturas de 148,13 e 422,36°C. De acordo com os dados obtidos da curva TG das misturas físicas adicionadas de TERP, é notória a diferença de perda de massa em relação a amostra placebo, pois a mesma ocorre em três etapas, sendo a primeira entre 137,8 e 190,04°C com perda de massa de 5,45%, a segunda entre 194,53 e 237,12°C com perda de 10,24% e a terceira entre 249,17 e 416,24°C com perda de massa de 80,79% . Para a amostra contendo 2,5% de TERP e para a amostra composta de 20% de TERP, o primeiro evento ocorreu entre as temperaturas de 132,32 e 183,44°C com perda de massa de 14,12%, o segundo evento entre as temperaturas de 187,24 e 249,21 com perda de 15,16% e o terceiro evento entre as temperaturas de 257,82 e 414,79,°C com perda de 69,08%. Assim, é possível observar a presença do fármaco a mistura física, bem como o aumento da perda de massa referente ao primeiro evento, conforme a adição de fármaco.

A interação entre os excipientes pode ser confirmada devido ao aumento da estabilidade térmica do TERP quando associado à mistura física, pois a temperatura inicial de perda de massa das amostras foram superiores a temperatura de perda de massa máxima do fármaco puro que é de 123,85°C.

(a)



(b)

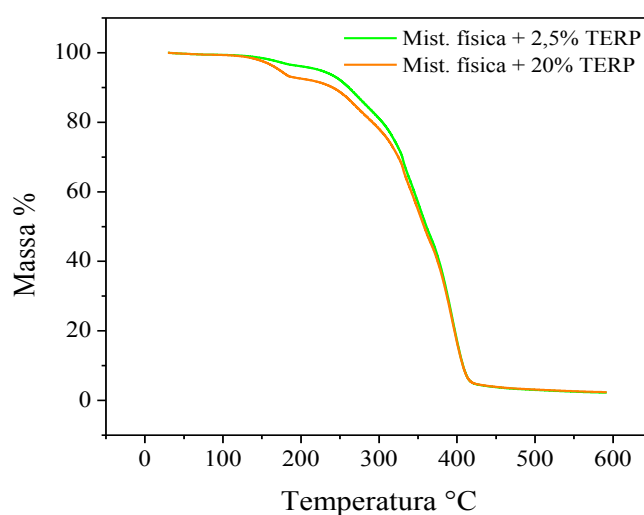


Figura 36: Curva TG da mistura física placebo (a) e da mistura física contendo 2,5% e 20% de TERP (b)

Para avaliar as condições aplicadas no processo de desenvolvimento das NLS, assim como a interação entre os excipientes quando a amostra é passada pelo HAP, uma curva DSC da amostra placebo de NLS foi analisada como ilustrado na figura 37.

É possível observar que houve a presença de dois eventos endotérmicos relevantes, sendo que em comparação com a figura 34 é notório que a passagem da mistura física pelo processo de aquecimento e homogeneização diminuiu a interação do GMS com o P-188, devido ao aumento da entalpia do pico de fusão do P-188 de 3,22 vezes em relação ao ΔH obtido do P-188 presente na mistura física. O ΔH obtido para a fusão dos lipídios representado pelo segundo evento endotérmico foi reduzido em aproximadamente 1,4 vezes em relação à mistura física. É compreensível esta diminuição de entalpia quando pensamos que a amostra em análise é composta por partículas em escala nanométrica. A diminuição da temperatura inicial dos eventos endotérmicos, bem como do ponto de fusão também está diretamente relacionado ao tamanho nanométrico das partículas devido a influência do aumento de área de superfície das mesmas e a influência do tensoativo (JENNING, THUNEMANN e GOHLA, 2000; BUNJES, SIEKMANN e WESTESEN, 1998). A presença de outros eventos associados ao pico de fusão do lipídio comprova a forte interação entre o GMS e o FSH, pois de acordo com as tabelas (18 e 19) um evento a mais foi evidenciado na temperatura de 57,78°C na curva DSC das NLS (TAVEIRA, 2009).

No resfriamento da amostra, a ocorrência de um número maior de eventos exotérmico também foi evidenciada, o que comprova a interação entre os excipientes presentes na NLS.

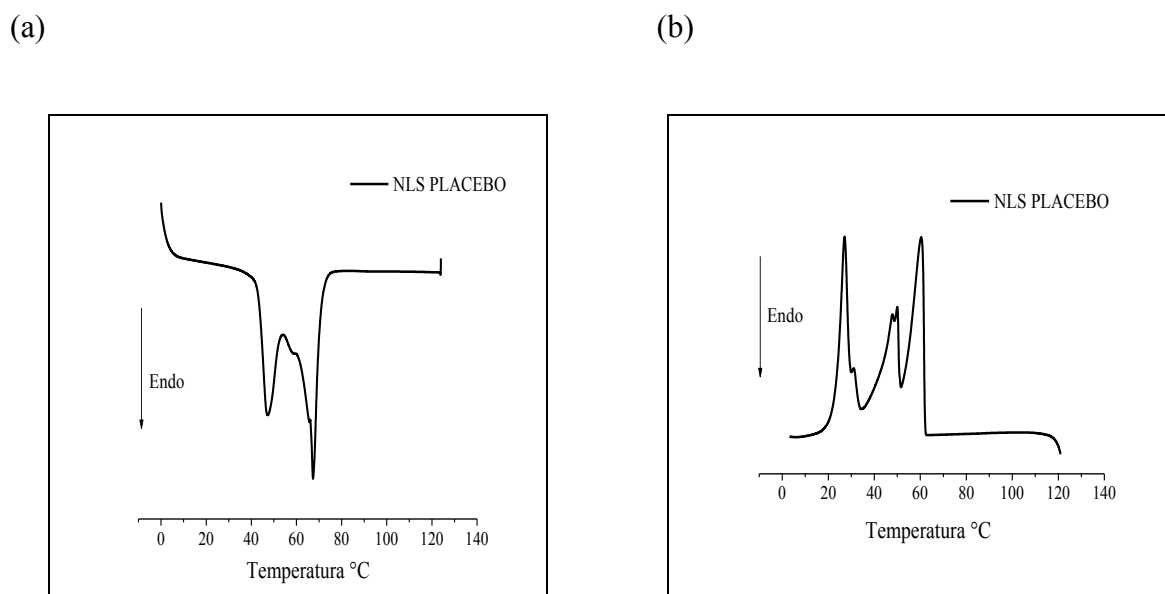


Figura 37: Curva DSC da NLS placebo (a) Aquecimento ; (b) Resfriamento

Tabela 17: Dados de DSC para a NLS com TERP

Parâmetros DSC	NLS da formulação F5 com TERP em concentrações crescentes (m/m)					
	0%	2,5%	5%	10%	15%	20%
Endotérmico						
$T_{inicial} (^{\circ}C)$	43,21/46,62	41,39/ 43,34	41,86/42,24	41,42/ 47,12	43,8/47,46	43,72/ 47,35
$T_{pico} (^{\circ}C)$	46,77/ 57,78/ 66,23/ 67,39	46,45/ 57,84/ 64,96/ 65,11	46,51/ 58,81/ 64,75/ 64,80	47,66/60,82/ 65,46/67,87	47,91/ 59,66/ 65,61/ 67,92	47,92/ 60,31/ 66,56/ 67,70
$\Delta H_{otido}(J.g^{-1})$	22,80/ 39,36	15,97/ 33,41	15,60/ 29,47	15,30/ 32,37	15,36/ 32,35	10,72/ 37,74
Exotérmico						
$T_{inicial} (^{\circ}C)$	61,96/ 51,38/ 28,10	61,78/ 51,13/ 28,27	62,10/ 50,95/ 27,79	62,18/51,11/ 43,28/ 28,25	62,19/ 50,92/ 27,36	62,23/ 51,49/ 48,18/ 28,46
$T_{pico} (^{\circ}C)$	60,63/49,39 / 48,98/ 22,34	59,7/49,23/ 48,5/21,5	56,5/45,7/ 41,6/17,8	58,00/48,3/ 44,8/18,21	57,7/45,64/ 44,9/ 21,3	58,8/50,77/ 50,5/ 20,2
$\Delta H_{obtido}(J.g^{-1})$	23,10/ 15,35/ 11,7	19,61/13,04/ 12,70	20,05/ 14,41/ 15,87	20,79/7,29/ 16,01	21,97/ 9,27/ 16,88	21,93/ 9,64/ 16,36

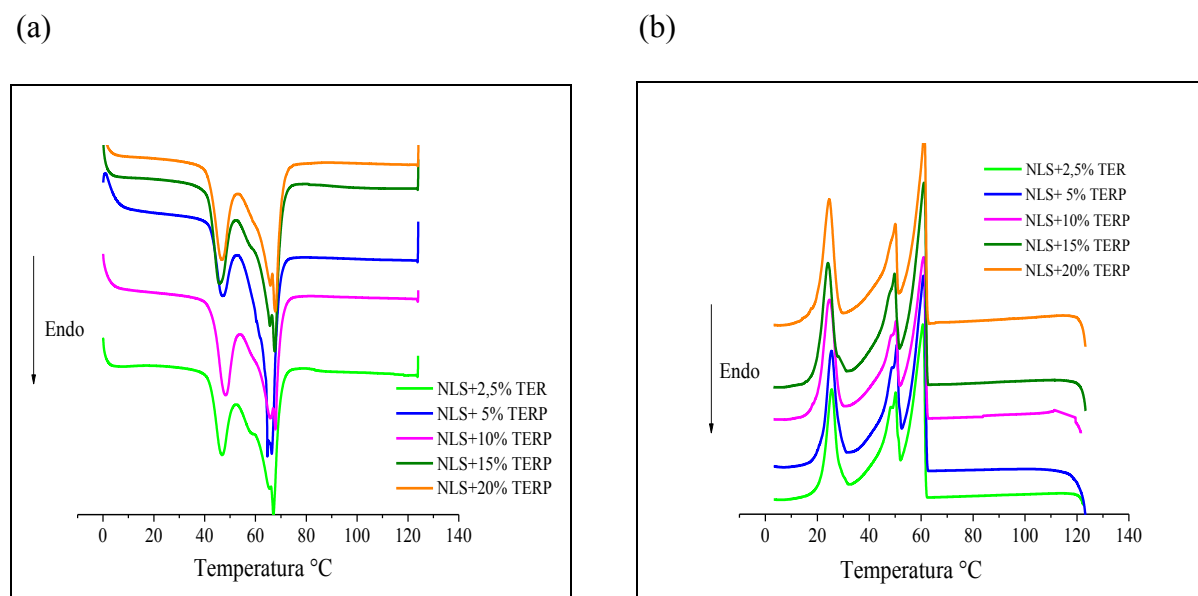


Figura 38: Curva DSC das NLS contendo TERP (a) Aquecimento; (b) Resfriamento.

Com a incorporação do TERP as NLS (figura 38) é possível observar que em todas as concentrações a entalpia de fusão para o primeiro evento, referente ao P-188 aumenta se comparado ao mesmo evento na mistura física, o que está diretamente relacionado a uma menor interação do P-188 aos lipídios após o processo de obtenção das NLS.

Na tabela 17, observa-se que o evento endotérmico referente a fusão da matriz lipídica teve uma redução na entalpia de aproximadamente 6 e 10 J.g⁻¹ para as NLS 2,5 e NLS 5, no entanto a partir da NLS 10 essa diferença de entalpia torna-se reduzida chegando a uma diferença de 1,95 J.g⁻¹ entre a NLS placebo e NLS 20, o que pode estar relacionado a um diferente rearranjo da matriz lipídica, pois de acordo com a curva DSC da mistura binária de FSH e TERP, a partir da concentração de 10% o TERP promove uma modificação na transição de fases da bicamada de fosfolipídio, o que corresponde as formulações com menor eficiência de encapsulação e sinais de instabilidade.

De acordo com JENNING e colaboradores (2000) e BUNJES e colaboradores (1996), matrizes lipídicas de rearranjos mais flexíveis, ou seja com maiores imperfeições, tendem a incorporar maiores quantidades de fármaco, enquanto que matrizes lipídicas em conformações termodinamicamente mais estáveis tendem a expulsar o fármaco do interior da matriz e aumentar a viscosidade da formulação gerando instabilidade.

Com o processo de recristalização das NLS é possível garantir a não formação de sistemas líquidos super-resfriados, pois a fusão das NLS ocorre acima da temperatura de 40°C e a recristalização acima de 25°C, o que é considerado ideal quando se pensa na obtenção da matriz lipídica sólida (JENNING, THUNEMANN e GOHLA, 2000).

Um estudo de perda de massa foi realizado com as amostras de NLS placebo e NLS com as concentrações mínimas e máximas de TERP representadas pelas NLS 2,5 e NLS 20 (figura 39).

Observando-se na curva TG da NLS placebo (figura 39 a) que a perda de massa de 96,78% ocorre em duas etapas, sendo a primeira entre as temperaturas de 190,01 e 275,48°C com perda de 15,04% e a segunda entre as temperaturas de 278,54 e 406,86°C com a perda de massa de maior intensidade (81,74%), possivelmente relacionada a degradação das nanopartículas.

Na figura 39 b, as diferenças entre as curvas TG da NLS 2,5 e NLS 20 são notórias sendo que para a NLS 2,5 a perda de massa ocorre em duas etapas, entre as temperaturas de 194,30 e 227,58°C com perda equivalente a 14,18% e entre as temperaturas de 282,54 e 388,08°C com perda de 81,50%, enquanto que a perda de massa para as NLS 20 ocorre em três etapas sendo a primeira entre as temperaturas de 138,12 e 187,54°C, com uma perda equivalente a 15,63%, a segunda entre as temperaturas de 202,81 a 233,05°C, com perda de

massa de 17,18%, e finalmente, o terceiro evento responsável pela maior perda de massa (62,92%) entre as temperaturas de 296,33 e 408,12°C.

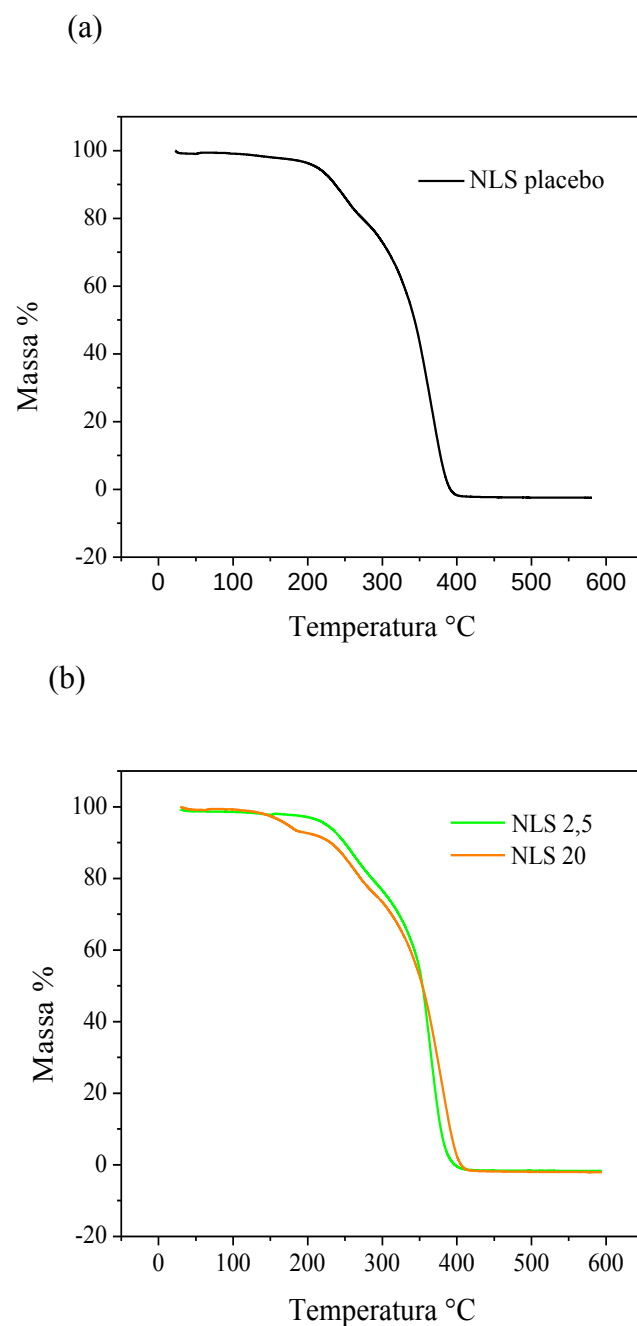


Figura 39: Curva TG das NLS (a) NLS placebo; (b) NLS 2,5 e NLS 20

Se compararmos as figuras 36b e 39b é possível garantir que a curva TG da mistura física referente à NLS 2,5 e a formulação NLS 2,5 diferem entre si, o que certifica que o TERP no caso da dispersão de nanopartículas encontra-se incorporado à matriz lipídica. Já as curvas TG referentes a mistura física da NLS 20 e a formulação de NLS 20 são praticamente iguais, o que comprova que uma grande quantidade de fármaco encontra-se adsorvido a superfície da partícula o que aumenta a perda de massa referente ao primeiro evento das curvas TG. OLIVEIRA, et al (2013), através da análise termogravimétrica das misturas físicas e das micropartículas poliméricas contendo diferentes concentrações de metotrexato e do polímero poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA), avaliou a interação fármaco e polímero, bem como a localização do fármaco em relação a matriz, observando que o aumento da concentração de fármaco em relação ao polímero aumentava a similaridade entre as curvas TG da mistura física e das micropartículas e através de microscopia eletrônica conseguiu provar que essa similaridade estava diretamente relacionada a um aumento na concentração de fármaco amorfo adsorvido a superfície das micropartículas. Provavelmente está ocorrendo com o aumento na concentração de TERP em relação as NLS.

Observando-se a curva TG das NLS contendo TERP o aumento da estabilidade térmica do fármaco pode ser confirmado, devido a perda de massa iniciar em temperaturas superiores para ambas as amostras (NLS 2,5 e NLS20), pois o fármaco puro tem sua perda de massa com início em 85,82°C e o fármaco associado as NLS tem início de perda de massa nas temperaturas de 194,30°C para a NLS 2,5 e 138,2°C para a NLS 20, o que prova que a incorporação do fármaco as NLS diminuiu sua volatilidade. Fato extremamente positivo, principalmente, quando pensa-se na incorporação de óleos essenciais as NLS.

4.6. Análise morfológica – Microscopia de força atômica (AFM)

A análise de microscopia de força atômica (AFM) foi utilizada com a finalidade de se avaliar a superfície da partícula, bem como seu formato e a possível ocorrência de outras estruturas nas amostras. A técnica de AFM tem capacidade de fornecer informações com alta resolução, em três dimensões e em escala nanométrica (SCHAFFAZICK, et al., 2003).

A escolha da AFM foi devido a facilidade de preparo da amostra, sem a necessidade de uma material condutor como o ouro aplicado na técnica de microscopia eletrônica de varredura e o ácido fosfotúngstico aplicado na microscopia de transmissão eletrônica.

A análise foi conduzida no modo de “não contato”, pois o material lipídico apesar de estar no estado sólido, à técnica de “contato” pode alterar a superfície da partícula devido ao contato direto da sonda (MUHLER, et al., 1996).

De acordo com as imagens de amplitude referente às figuras 40 (a) e 40 (b) foi possível observar a presença das NLS com característica aproximadamente esférica. No entanto o tamanho de partícula obtido na análise morfológica das nanopartículas foi maior se comparado à análise de tamanho de partícula por espectroscopia de fotocorrelação que foi de $98,6 \pm 14,38\text{nm}$, pois os resultados de AFM mostraram partículas com tamanho na ordem de 100 a 400nm. O processo de secagem das partículas na placa de mica pode ter influenciado no tamanho, mas não se observa agregados com partículas de tamanhos em escalas micrométricas (MONTASSER, et al., 2002).

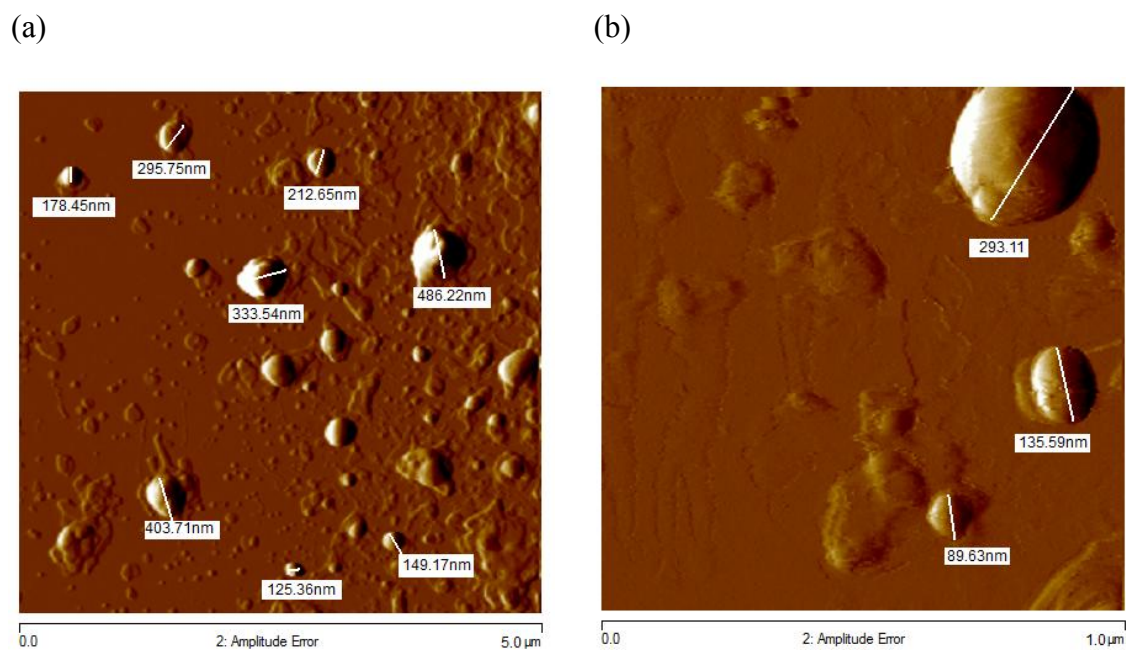


Figura 40: Imagem de amplitude de AFM da amostra de NLS placebo (a) escala de 5 μ m; (b) escala de 1 μ m.

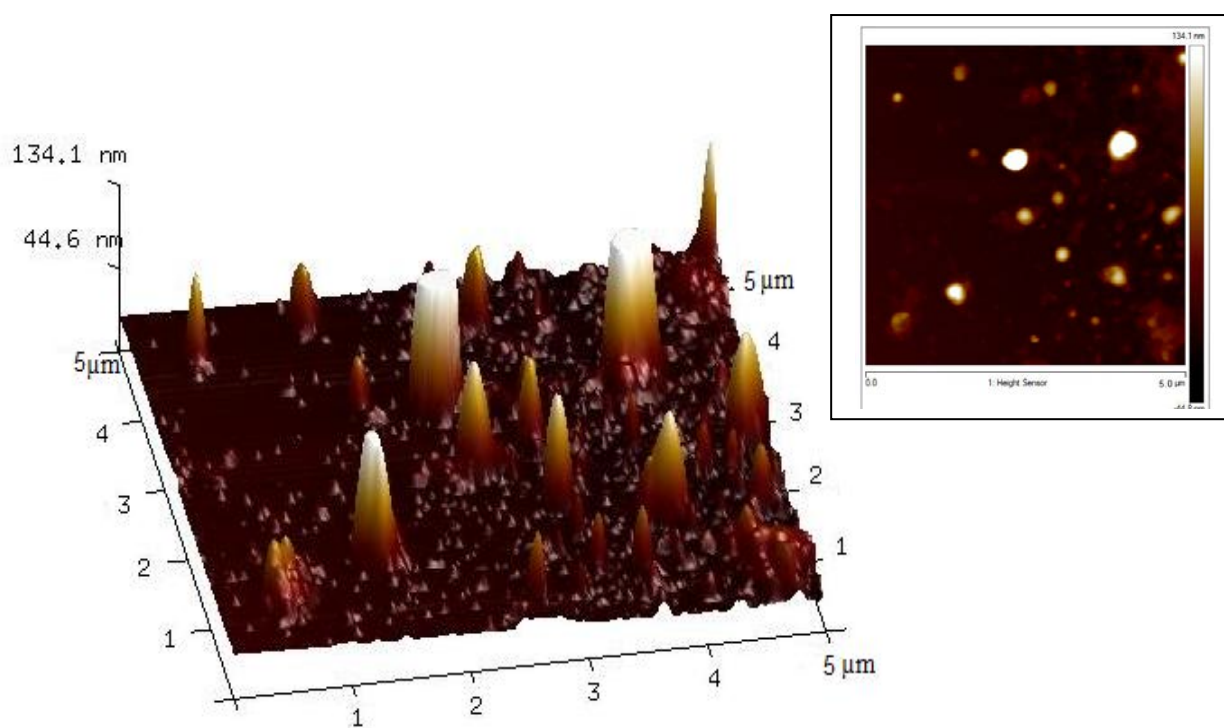


Figura 41: Imagem topografica da amostra de NLS placebo na escala de 5 μ m.

Na figura 41, representada pela imagem topografica da NLS placebo foi possível observar que as nanopartículas apresentam uma altura máxima de 134,1nm. A associação da imagem de amplitude (figura 40) com a imagem topografica mostra a presença de partículas com altura menor do que o diâmetro, o que comprova que a amostra de NLS placebo não apresenta uma matriz completamente rígida, pois de acordo com a secagem da amostra sobre a placa de mica, o diâmetro da partícula aumenta e a altura diminui. Resultados semelhantes foram obtidos por WESTESEN & SIEKMANN (1997) e BUNJES, STEINIGER e RICHTER (2007).

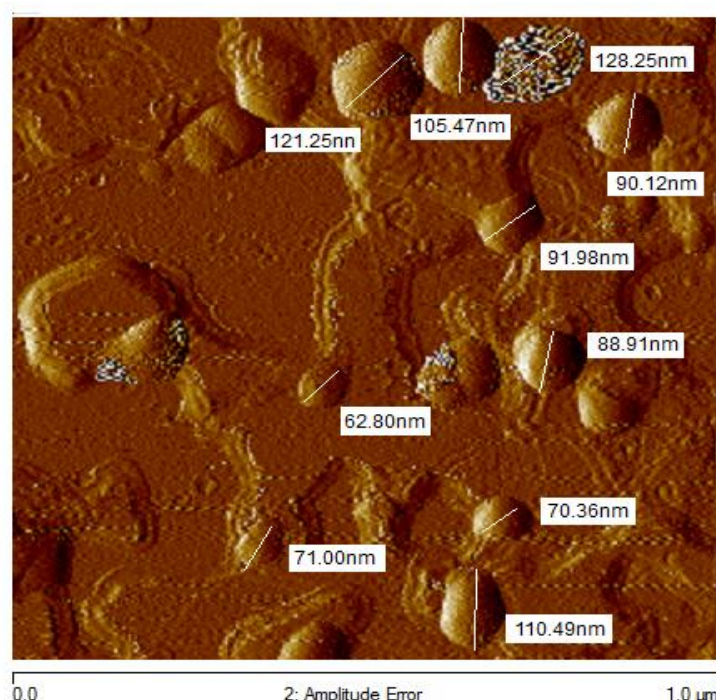


Figura 42: Imagem de amplitude de AFM da amostra de NLS 2,5 na escala de 1μm.

A figura 42 representa a amostra de NLS composta por 2,5% de TERP (NLS 2,5), na qual é possível observar a formação das nanopartículas com tamanhos menores do que as NLS placebo, semelhante aos resultados de tamanho obtidos pela técnica de espectroscopia

de fotocorrelação. Uma maior heterogeneidade do sistema foi observada em relação à análise de tamanho pela técnica de espectroscopia de fotocorrelação, pois o tamanho das partículas variou de 128,25 e 62,8nm na análise microscópica, enquanto que através da avaliação do raio hidrodinâmico das partículas a variação foi de 97,5 a 82,2nm. No entanto, foi possível observar a presença de diferentes estruturas ao redor de algumas partículas, o que está relacionado à adsorção de uma parte do fármaco ao redor da matriz lipídica. Sabe-se que moléculas pequenas como o TERP apresentam um coeficiente de difusividade maior do que as moléculas de grandes cadeias carbônicas, como as moléculas de lipídios (OLIVEIRA, *et al.*, 2003). Assim é possível inferir que a adsorvidade do fármaco ao redor da matriz lipídica ocorre pela maior difusividade do TERP do interior da matriz lipídica para o meio dispersante, bem como pela precipitação do lipídio e não do fármaco durante o processo de recristalização das nanopartículas.

A imagem topográfica da amostra de NLS 2,5 (figura 43) mostra a mesma diferença entre altura e diâmetro das partículas observada com as NLS placebo, sendo a altura máxima das NLS 2,5 de 79,9 nm. A nanopartícula cujo TERP encontra-se adsorvido ao redor da matriz apresenta-se com aspecto morfológico não homogêneo, com a presença de rugosidade ao redor da partícula.

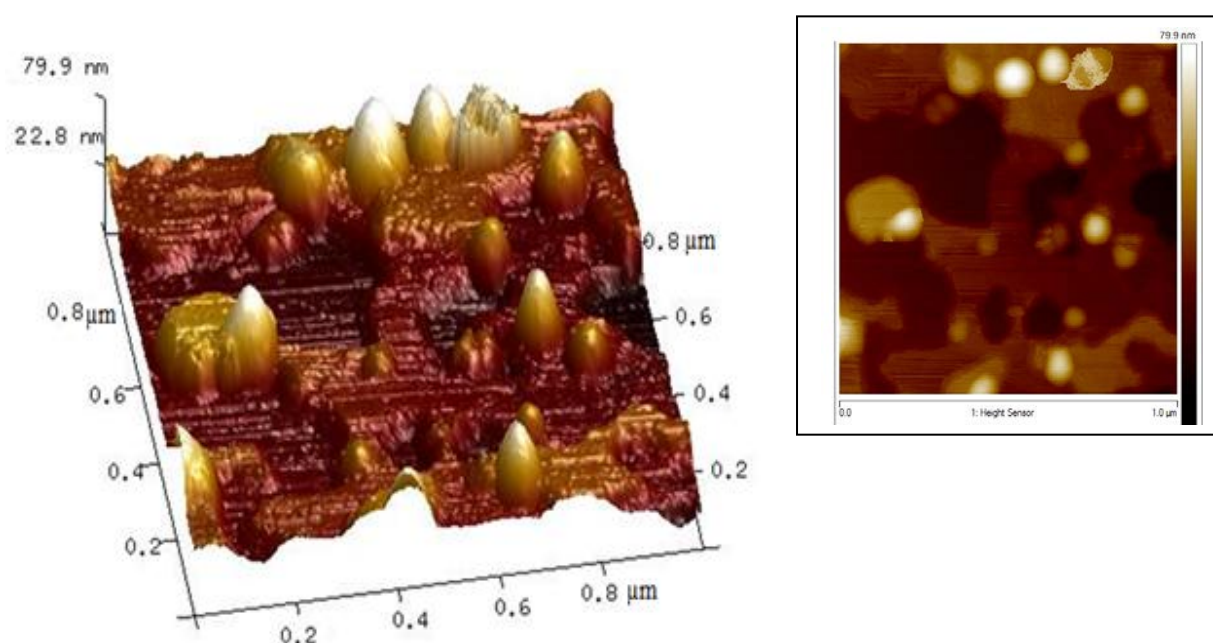


Figura 43: Imagem topografica da amostra de NLS 2,5 na escala de 1 μm.

A imagem de amplitude da amostra de NLS 20 (figura 44), ilustra a quantidade de fármaco na superfície das nanopartículas, bem como a quantidade de fármaco dissociado das mesmas (quantidade de TERP livre), o que está diretamente relacionado a menor eficiência de encapsulação encontrada para as NLS 20 e a menor interação do TERP com as NLS observada na análise de DSC e TG e ao aumento do potencial zeta das dispersões.

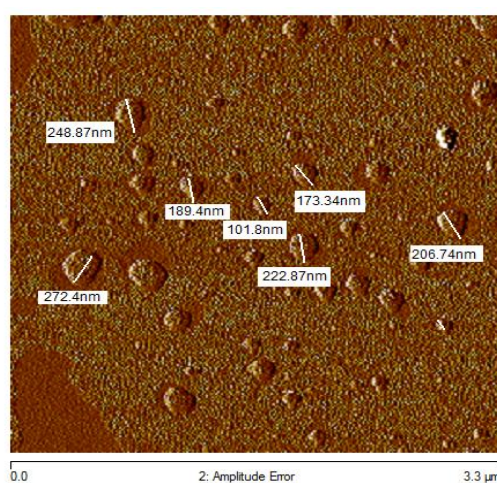


Figura 44: Imagem de amplitude da amostra de NLS 20 na escala de 3 μm.

Na figura 45 o tamanho de partícula variou de aproximadamente 100 a 250nm, e assim como para as demais amostras, o resultado obtido encontra-se maior do que os resultados obtidos pela técnica de espectroscopia de fotocorrelação, na qual o raio hidrodinâmico das partículas variou de 44,09 a 92,63 nm. A altura máxima das nanopartículas foi de 33,3nm, o que mostra uma diferenciação da estrutura das mesmas, pois elas se encontram muito mais achatadas do que as NLS placebo e NLS 2,5. Há um aumento da rugosidade em todo o sistema e não apenas ao redor de algumas partículas como na amostra de NLS 2,5. Essa mudança estrutural no sistema pode ser um dos sinais de instabilidade referentes às NLS10, NLS 15 e NLS 20.

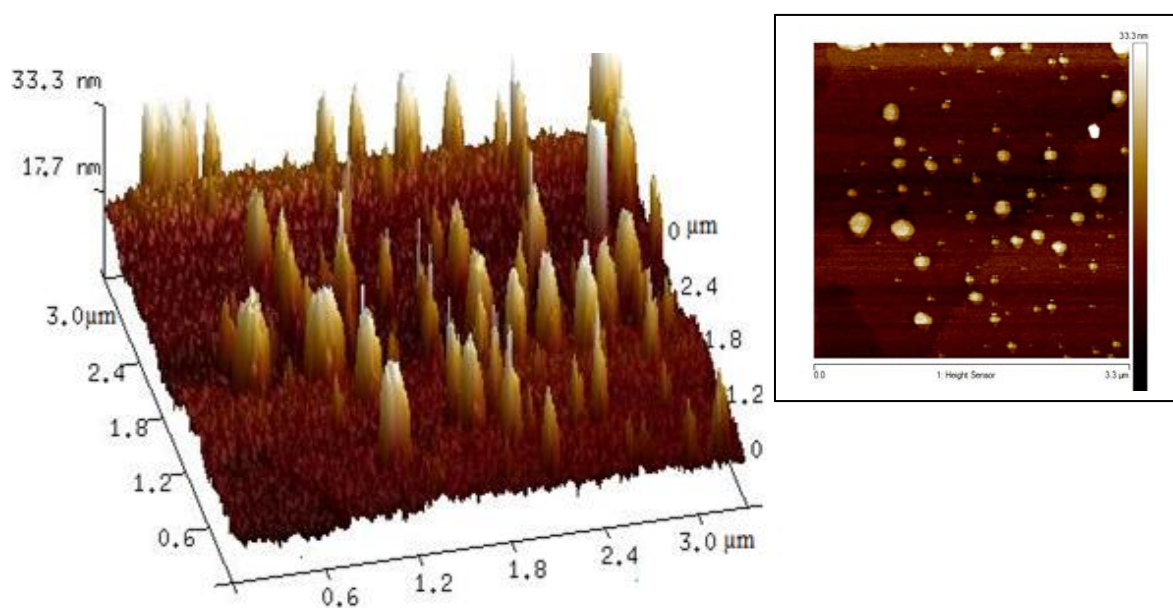


Figura 45: Imagem topografica da amostra NLS 20 na escala de 3μm.

Quando fizemos uma varredura da amostra de NLS 20, foi possível visualizar a formação de diferentes estruturas em escala micrométrica (figura 46). Este resultado assemelha-se aos resultados de tamanho de partícula obtido na análise de espectroscopia de

fotocorrelação em que as amostras NLS 10, NLS 15 e NLS 20 apresentavam partículas com raios hidrodinâmicos superiores a 1 μm .

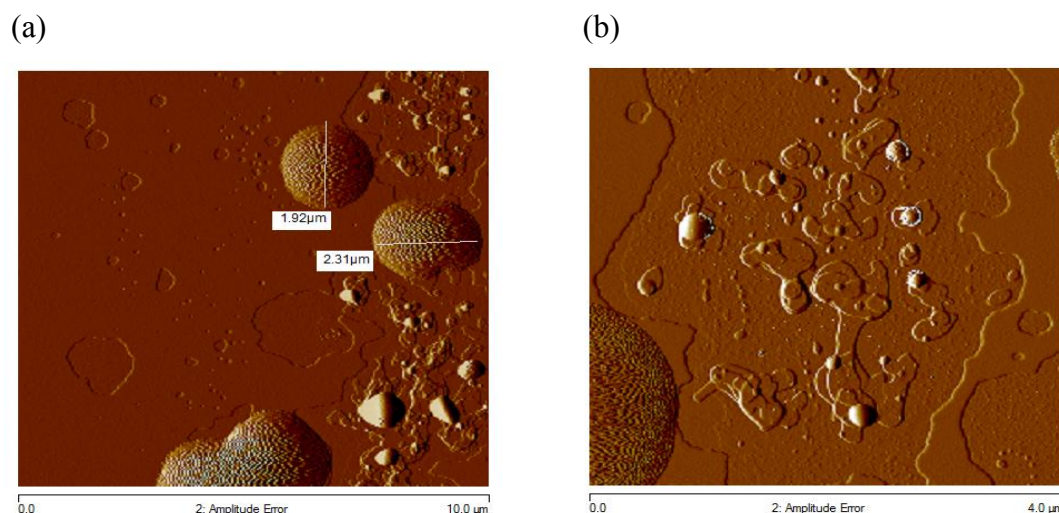


Figura 46: Imagem de amplitude da amostra de NLS 20 (a) escala de 10 μm ; (b) escala de 4 μm .

4.7. Determinação do perfil de liberação *in vitro* do TERP

Utilizando a célula de difusão do tipo Franz foi possível avaliar a quantidade de fármaco que passou através de uma membrana sintética semi-permeável e atravessando o compartimento doador (local onde a amostra é adicionada) para o compartimento receptor que encontra-se preenchido com solução receptora.

A quantidade de TERP liberada foi determinada pelo método analítico previamente validado por MACCARI (2009), sendo que os valores das áreas obtidas foram aplicados na equação da reta da curva analítica do TERP em solução receptora (solução salina adicionada de 1% de polissorbato 80). Os perfis de liberação foram determinados pela relação percentual

da concentração de TERP liberada em função do tempo. Os resultados da liberação de TERP a partir das NLS 2,5, NLS 5 e NLS 20 após 24 horas de ensaio estão representados na figura 47.

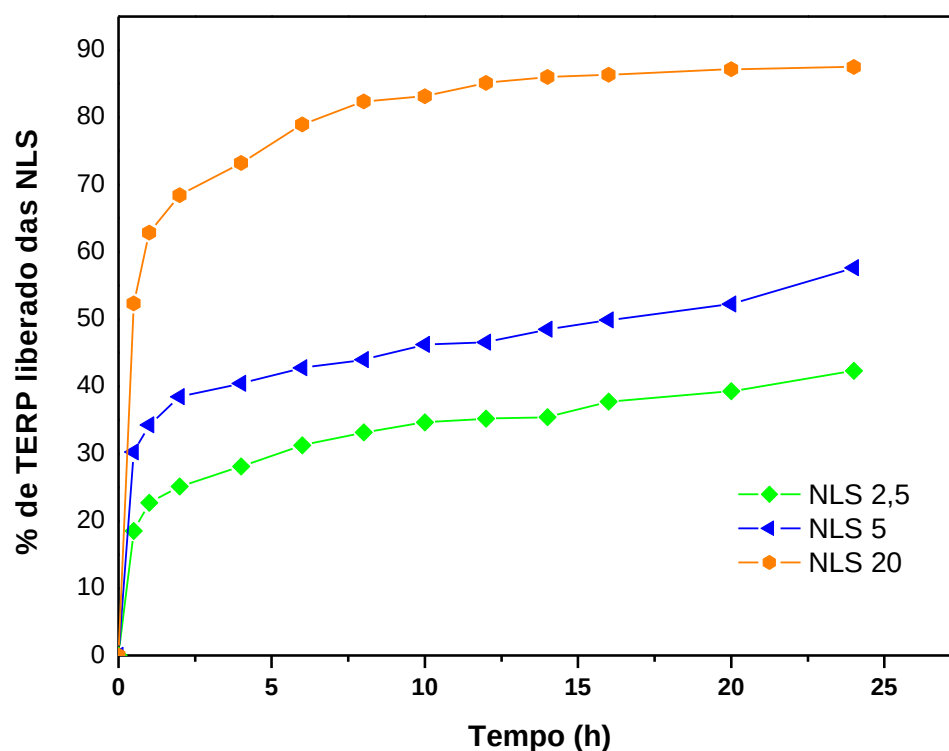


Figura 47: Perfil de liberação de TERP a partir das formulações NLS 2,5, NLS 5 e NLS 20.

A quantidade real permeada em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ foi calculada utilizando-se a equação 6 descrita no item 3.7, tendo-se calculado a média e o desvio padrão relativo. As tabelas 18, 19 e 20 apresentam as porcentagens de fármaco que liberadas por cm^2 , em relação à quantidade de amostra e concentração do princípio ativo depositado no anel dosador, sendo que os valores de DPR para todas as formulações foram inferiores 10%.

Tabela 18: Liberação do TERP a partir da formulação NLS 2,5

<i>tempo (h)</i>	<i>Q real($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i>	<i>%</i>	<i>DPR(%)*</i>
0,5	39,18	18,493	9,00376
1	48,06	22,685	6,01254
2	53,25	25,134	7,27682
4	59,55	28,107	7,22136
6	66,22	31,256	8,45548
8	70,25	33,159	5,38267
10	73,42	34,656	5,64693
12	74,63	35,224	8,19551
14	75,10	35,448	4,96979
16	79,98	37,752	4,85362
20	83,21	39,276	5,14243
24	89,72	42,348	5,01263

*Desvio padrão relativo, calculado em função da média e desvio padrão das áreas obtidas.

Tabela 19: Liberação do TERP a partir da formulação NLS 5

<i>tempo (h)</i>	<i>Q real ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i>	<i>%</i>	<i>DPR(%)*</i>
0,5	128,1773	30,2499009	7,94332
1	145,1519	34,2559142	8,76152
2	162,9432	38,454669	8,44168
4	171,3637	40,4419108	9,13272
6	181,1436	42,7499717	4,16183
8	186,2822	43,9626836	2,51438
10	195,9612	46,246932	3,97412
12	197,2844	46,5592078	3,69523
14	205,3714	48,4677435	5,64758
16	211,3569	49,8803242	4,12675
20	221,2836	52,2230299	5,05789
24	244,1798	57,6265434	3,12695

*Desvio padrão relativo, calculado em função da média e desvio padrão das áreas obtidas

Tabela 20: Liberação do TERP a partir da formulação NLS 20

<i>tempo (h)</i>	<i>Q real ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i>	<i>%</i>	<i>DPR (%) *</i>
0,5	887,6681262	52,37252	6,57143
1	1065,447107	62,8615	6,83542
2	1160,036756	68,4423	7,08091
4	1241,551854	73,2517	5,18976
6	1355,377059	79,9674	5,00152
8	1378,922776	81,3566	4,36286
10	1409,09221	83,1366	7,19213
12	1443,222653	85,1503	3,27826
14	1458,032794	86,0241	3,63661
16	1463,848037	86,3672	2,39272
20	1477,936145	87,1984	3,10281
24	1482,729357	87,4812	4,69362

*Desvio padrão relativo, calculado em função da média e desvio padrão das áreas obtidas

Pela análise do gráfico (figura 47) e tabelas 18, 19 e 20 foi possível observar que todas as amostras apresentaram efeito *burst* nas primeiras 6 horas de ensaio. No entanto, as NLS 2,5 e NLS 5 liberaram menos da metade de fármaco presente na formulação, 31,256 % para a NLS 2,5 e 42,75% para a NLS 5, enquanto a NLS 20 liberou quase 80% da concentração de TERP presente na formulação. Este resultado confirma o fato de que provavelmente o aumento da concentração de TERP nas NLS altera a estrutura da nanopartícula, o que aumenta a quantidade de fármaco adsorvido na superfície da partícula e a quantidade de fármaco livre presente na dispersão. Essa distribuição do fármaco seria responsável pela quantidade elevada de TERP liberada a partir das NLS 20 nas primeiras horas de ensaio.

O perfil de liberação de TERP das NLS foi avaliado através da utilizando-se modelos matemáticos, com o objetivo de caracterizar o processo de liberação de TERP no sistema. Na

tabela 21 encontram-se os valores do coeficiente de correlação (R^2) relativos a cada modelo matemático, e verifica-se que para as NLS 2,5 e NLS 5 o modelo matemático que mais se adequa é o de Weibull (PAPADOPOULOU *et al.*, 2006), enquanto que para a formulação NLS 20 tanto o modelo de Weibull, quanto o de Korsmeyer-peppas (KORSMEYER, *et al.*, 1983) podem ser considerados.

Tabela 21: Coeficiente de correlação (R^2) calculado pelo ajuste de cada modelo matemático: zero ordem, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-peppas, Weibull e Hixon-Crowell.

<i>Formulações</i>	<i>Ordem zero</i>	<i>Primeira ordem</i>	<i>Higuchi</i>	<i>Korsmeyer-peppas</i>	<i>Weibull</i>	<i>Hixon-crowell</i>
<i>NLS 2,5</i>	0,8885	0,8046	0,952	0,9794	0,9899	0,9075
<i>NLS 5</i>	0,9108	0,8729	0,9552	0,9724	0,9842	0,9448
<i>NLS 20</i>	0,6947	0,6961	0,8226	0,9604	0,9569	0,7816

O modelo matemático de Weibull (PAPADOPOULOU *et al.*, 2006) apresenta uma equação empírica genérica que exprime a fração cumulativa de fármaco na solução ao tempo t:

(Equação 7)

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

Na qual:

a = escala temporal do processo;

T_i = intervalo de tempo antes do início da liberação (na maioria das vezes equivale a zero);

b = parâmetro de forma que caracteriza a curva como exponencial quando $b = 1$ (cinética de ordem zero), sigmóide quando $b > 1$ (cinética de liberação rápida) ou parabólica quando $b < 1$ (cinética de liberação lenta) (PAPADOPOULOU *et al.*, 2006).

Assim, neste modelo é o valor de b que caracteriza o mecanismo de transporte de fármaco através da matriz, sendo que estimativas de valores de b inferiores a 0,75 sugerem difusão fickiana. Para valores de b entre 0,75 e 1 o transporte de fármaco acontece através da associação da difusão fickiana com intumescimento ou erosão e para valores de b acima de 1 o transporte é de maior complexidade, no qual vários mecanismos estão associados, como a difusão, o intumescimento e a erosão da matriz (PAPADOPOULOU *et al.*, 2006).

Para todas as formulações o transporte do TERP a partir das NLS ocorre pela associação de um processo de erosão da matriz lipídica seguido de difusão fickiana, pois o valor de b para a NLS 2,5 foi de 0,7811, para a NLS 5 foi de 0,8142 e para as NLS 20 foi de 0,9714, sendo que este aumento gradativo do valor de b pode estar relacionado a mudança conformacional da estrutura das nanopartículas ocasionado pela adição de TERP.

Conclusões

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Considerando-se que o TERP pode ser incorporado as NLS pela técnica de HAP, pois o estudo de estabilidade frente ao processo de calor aplicado a técnica e a análise de TG provou a ausência de degradação, bem como a ausência de perda de massa na temperatura e no tempo utilizado durante o processo. Assim, a metodologia de obtenção das NLS pela técnica de HAP foi validada, provando-se que os melhores resultados de tamanho de partícula e PDI foram obtidos quando uma pressão de 7.200 psi por 10 ciclos foi aplicada a pré-emulsão. A concentração e proporção de tensoativo aplicada ao sistema também foi avaliado, obtendo-se como melhor resultado a proporção de 1:1 entre P-188 e FSH, proporção na qual a estabilidade estérica promovida pelo P-188 é auxiliada pela estabilidade eletrostática provinda de cargas negativas que a molécula zwitteriônica do FSH adquire na superfície da partícula.

Através da caracterização físico-química verificou-se que o tamanho de partícula ocorrem de forma bimodal para as NLS placebo e NLS 2,5 e 5 e que os sistemas contendo concentrações superiores de TERP apresentaram tamanho de partícula distribuído de forma trimodal com a presença de partículas de escala micrométricas. Este resultado associado à avaliação da interação entre fármaco e NLS realizada por análise de DSC e TG mostraram que em baixas concentrações maior quantidade de fármaco tende a estar no interior da matriz lipídica, o que pode ser comprovado pela análise morfológica.

A partir da associação do estudo de estabilidade com o de análise térmica conseguiu-se comprovar que grandes quantidades de fármaco nas dispersões de NLS provavelmente alteraram a conformação estrutural das nanopartículas, o que consequentemente aumentou a viscosidade do sistema gerando instabilidade nas NLS 10, 15 e 20.

Houve um aumento na estabilidade térmica do TERP quando incorporado em baixas concentrações as NLS, o que consequentemente diminuiu sua característica volátil e confirmou sua incorporação nas nanopartículas.

A análise morfológica comprovou a formação das NLS, e que o fármaco foi incorporado tanto no interior da matriz lipídica como na superfície da partícula. Nas concentrações altas ocorre a presença de diferentes estruturas de escalas micrométricas e a presença de grandes quantidades de fármaco livre na dispersão de NLS. Assim, pode-se dizer que a obtenção do sistema de nanopartículas lipídicas sólidas estáveis contendo TERP ocorre, porém com baixas concentrações de fármaco incorporadas ao sistema (NLS 2,5 e NLS 5%).

Sabe-se que a distribuição do fármaco nas partículas é um parâmetro que deve sempre ser considerado no desenvolvimento de sistemas nano e microparticulados, pois está diretamente correlacionado com a liberação do fármaco e consequentemente sua biodisponibilidade. O perfil de liberação *in vitro* seguiu o modelo matemático de Weibull, sendo que para todas as formulações o transporte de TERP ocorreu devido à associação de um processo de erosão da matriz lipídica seguido de difusão do fármaco. O efeito *burst* foi evidenciado em todas as formulações, todavia as NLS 20 apresentaram aproximadamente o dobro de fármaco liberado rapidamente, fato ocorrido devido a menor eficiência de encapsulação dessa formulação. Nas formulações de NLS 2,5 e NLS 5 foi evidenciada a liberação sustentada do TERP a partir de 6 horas de ensaio.

Assim sendo, devemos concluir que as NLS contendo menores concentrações de TERP podem ser consideradas um potencial para futuras pesquisas relacionadas a um sistema de liberação sustentada como forma de terapia para patologias na qual o TERP possui atividade terapêutica, até mesmo para o câncer.

Referências

_____ *Bibliográficas*

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHAJ, N. A.; SHAMSUDIN, M. N.; ALIPIAH, N. M.; ZAMRI, H. F. Characterization of *Nigella Sativa* L. Essential Oil-Loaded Solid Lipid Nanoparticles. **American J. Pharm. Toxic.**, n. 5, p. 52-57, 2010.

ALLE'MANN, E.; GURNY, R.; DOELKER, E. Drug-loaded nanoparticles-preparation methods and drug targeting issues. **Eur. J. Pharm Biopharm.**, n. 39, p. 173–191, 1993.

ALLEN, T. A.; CULLIS, P. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science.**, n. 3003, p. 1818–1822, 2004.

ATTAMA, A.A.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid lipid nanoparticle crystallinity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.** v. 315, n. 1-3, p. 189–195, 2008.

BRASIL. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, BRASIL, Resolução RE nº 899, “Guia para validação de métodos analíticos e bionanalíticos” 2003.

BETTONI, D. Óleo de Melaleuca. **International Journal of Pharmaceutical Compounding** (edição brasileira)., Austin. v.6, n.5, p. 268-269, 2004.

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

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

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

CALCABRINI, A.; STRINGARO, A.; TOCCACIELI, L.; MESCHINI, S.; MARRA, M.; COLONE, M.; GIUSEPPE, S.; MONDELLOW, F.; ARANCIA, G.; MOLINARI, A. Terpinen-4-ol, The Main Component of Melaleuca Alternifolia (Tea Tree) Oil Inhibits the In

Vitro Growth of Human Melanoma Cells. **Journal of Invest. Dermatol.**, v. 122, p. 349–360, 2004.

CHATTOPADHYAY, N.; ZASTRE, J.; WONG, H-L.; WU, X. Y.; BENDAYAN, R. Solid lipid nanoparticles enhance the delivery of the HIV protease inhibitor, atazanavir, by a human brain endothelial cell line. **Pharm. Res.**, v. 25, n. 10, p. 2262-2271, 2008.

COLLINS-GOLD, L. C., LYONS, R. T., BARTHOLOW, L. C. Parenteral emulsions for drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, n.5, p.189–208, 1990.

CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; MICIELI, D.; VENUTI.; BISIGNANO, G.; SAIJA, A; TROMBETTA, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. **J. Agric. Food. Chem.**, n. 15, p. 6301-6308, 2007.

DINGLER, A., BLUM, R. P., NIEHUS, H., MULLER, R. H., GOHLA, S. Solid Lipid Nanoparticles (SLN/Lipopearls)—a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products. **J. Microencapsul.**, v.16, n.6, p.751-767, 1999.

FRICKER, G.; KROMP, T.; WENDEL, A.; BLUME, A.; ZIRKEL, J.; REBMANN, H.; SETZER, C.; QUINKERT, R.-O.; MARTIN, F.; MÜLLER-GOYMANN, C. Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. **Pharm. Res.**, v. 27, p. 1469–1486, 2010.

GASCO, M.R., 1993. **Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution.** United States Patent, USS 188837.

GHAFFARI, S.; VARSHOZAS, J.; SAADAT, A; ATYABI, F. Stability and antimicrobial effect of amikacin-loaded solid lipid nanoparticles. **Int J Nanomedicine.**, n.6, p. 35-43, 2011.

GUPTA, P. K. Drug targeting in cancer chemotherapy: a clinical perspective. **J. Pharm. Sci.**, n. 79, p. 949–962, 1990.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.-E.; BENOIT, J.-P. Physicochemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials.**, v. 24, p. 4283–4300, 2003.

HOU, D.; XIE, C.; HUANG, K.; ZHU, C. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). **Biomaterials.**, v. 24, n. 10, p. 1781–1785, 2003.

HU, F-Q.; JIANG, S-P.; DU, Y-Z. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. **Colloid. Surface. B.**, v. 45, n. 3-4, p. 167–173, 2005.

HU, F.-Q.; JIANG, S.-P.; DU, Y.-Z.; YUAN, H.; YE, Y.-Q.; ZENG, S. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. **Int. J. Pharm.**, v. 314, n. 1, p. 83–89, 2006

HUANG, L.H., YAN, F., ZHANG, C., ZHENG, Y., MEI, L., TANG, L. SONG, C. The effect of poloxamer 188 on nanoparticles morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. **Nanomedicine.**, n.6, p. 170-178, 2010.

ICH Topic Q2 (R1) **Validation of analytical procedures: text and methodology.** 2005.

JENNING, V.; THÜNEMANN, A. F.; GOHLA, S. H. Characterization of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. **Int. J. pharm.**, v. 199, p. 167-177, 2000.

KHALIL, M.; SHEGOKAR, R.; GOHLA, S.; MULLER, R. H.; ANSELMINI, C. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. **J. Pharm.**, v.414, n. 2, p. 267-275, 2011.

KIPP, J. E., The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. **Int. J. Pharm.**, v.284, n. 1-2, p. 109-122, 2004.

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

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

LEE, K. J.; MOWER, R. HOLLENBECK, T.; CASTELO, J.; JOHNSON, N.; GORDON, P.; SINKO, P. J.; HOLME, K. Modulation of Nonspecific Binding in Ultrafiltration Protein Binding Studies. **Pharm Research.**, v. 20, n. 7, p. 1015-1021, 2003.

LIU, J; GONG, T.; WANG, C.; ZHONG, Z.; ZHANG, Z. Solid lipid nanoparticles loaded with insulin by sodium cholate-phosphatidylcholine-based mixed micelles: Preparation and characterization. **Int. J. Pharm.**, v. 340, p. 153-162, 2007.

LIU, X.; ZU, Y.; FU, Y.; YAO, L.; GU, G.; WANG, W.; EFFERTH, T. Antimicrobial activity and cytotoxicity towards cancer cells of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Eur Food Research Techn.**, v. 253, p. 229-247, 2009.

MACCARI F.L.R. **Avaliação da atividade anti-proliferativa in vitro, liberação, permeação e retenção cutânea in vitro e estabilidade de emulsões contendo (-)-terpinen-4-ol.** 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

MANDAWGADE, S. D.; PATRAVALE, V. B. Novel cosmetic delivery systems: an application update. **Int. J. Cosmet Sci.**, v. 30, n.1, p. 19-33, 2008.

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

McGUIRE, J.J. Anticancer antifolates: current status and future directions, **Curr Pharm.**, v. 9, p. 2593-2613, 2003.

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

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

MONTASSER, I., FESSI, H., COLEMAN, A. W. Atomic force microscopy imaging of novel type of polymeric colloidal Nanostructures. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.54, n.3, p.281-284. 2002.

MUCHOW, M; MAINCENT, F.; MULLER, R. H. Lipid Nanoparticles with a Solid Matrix (SLN®, NLC®, LDC®) for Oral Drug Delivery. **Drug Develop. Ind. Pharm.** v. 34, p. 1394-1405, 2008.

MUHLEN, A.Z; MUHLEN, E.Z; NIEHUS, H; MEHNERT, W. Atomic Force Microscopy Studies of Solid Lipid Nanoparticles. **Pharm Research**, v. 13, n. 9, p. 1412-1416, 1996.

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

MULLER, R. H., MADER, K., GOHLA, S., Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery- a review of the state of the art. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 50, n. 1, p.161-177, 2000.

MULLER, R. H., OLBRICH, C., KAISER, O. Lipase degradation of Dynasan 114 and 116 solid lipid nanoparticles (SLN) – effect of surfactant, storage time and crystallinity. **Int. J. Pharm.**, v. 237, n. 1-2, p. 119-128, 2002.

NASCIMENTO, N.R.F; LEAL_CARDOSO, J.H.; LESSA, L.M.A.; RORIZ-FILHO, J.S.; CUNHA, K.M.A.; FONTELES, M.C. Terpinen-4-ol: mechanisms of relaxation on rabbit duodenum. **J. Pharm. Pharmacol.**, p. 467, 2005.

NIELSEN, J. B., NIELSEN, F. Topical use of tea tree oil reduces the dermal absorption of benzoic acid and methiocarb. **Archives of Dermatological Research.**, v. 297, p. 395–402, 2006.

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

OLBRICH,C.; MULLER, R. H., Enzymatic degradation of SLN-effect of surfactant and surfactant mixtures. **Int. J. Pharm.**, n.180, p. 31-39, 1999.

PAPADOPOULOU, V.; KOSMIDIS, K.; VLACHOU, M.; MACHERAS, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **Int. J. Pharm.**, v. 309, p. 44–50, 2006.

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

PEDERSEN, N.; HANSEN, S.; HEYDENREICH, A. V.; KRISTENSEN, H. G.;POULSEN, H. S. Solid lipid nanoparticles can effectively bind DNA, streptavidin and biotinylated ligands. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 62, n. 2, p. 155–162, 2006.

PRIEST, D.C.; PRIEST, M.D. Antimicrobiano e Antiinflamatório Naturais para a Acne. **Cosmet.Toilet** (edição em Português)., Austrália, v.14, n.1, p.55-57, 2002.

PUGLIA,C.; BONINA, F.; RIZZA, P.;SCHOUBBEN, A.; PERROTA, R.; TARIC, M. S.; DAMIANI, E. Lipid nanoparticles as carrier for octyl-methoxycinnamate: *in vitro*percutaneous absorption and photostability studies. **J. Pharm. Sci.**, n. 101, p. 301-311, 2012.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P.J.; OWEN, S. C. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 5th ed. London: The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain and The American Pharmaceutical Association, p. 536 e 739, 2006.

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

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

SCHUBERT, M. A.; MULLER-GOYMANN, C. C. Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and nonionic emulsifier. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.61, n.2, p. 77-86, 2005.

SHI, F.; ZHAO,J.;LIU, Y.; WANG, Z.; ZANG, Y, FENG, N. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with frankincense and myrrh oil. **Int. J. Nanotech.**, n.7, p. 2033-2043, 2012.

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

SILVA, E. C.; PAOLA, M. V. R. V.; MATOS, J. R. Análise térmica aplicada a cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 347-348, 2007.

SINGH, P.; MALIK, T.; PANT, S.; CHAUHAN, N.; LOHANI, H. Potentiation of Antimicrobial Activity of Ciprofloxacin by *Pelargonium graveolens* Essential Oil against Selected Uropathogens. **Phyto. Research.**, v 25, n. 8, p. 1225-1228, 2011.

SOO-JEONG, L.; CHONG-KOOK, K. Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. **Int. J. Pharm.**, v. 243, n. 1, p. 135-146, 2002.

SUN, LI-MING; ZHANG, CHEN-LU; LI PING. Characterization, Antibiofilm, and Mechanism of Action of Novel PEG-Stabilized Lipid Nanoparticles Loaded with Terpinen-4-ol. **J. Agric. Food Chem.**, n.60, p. 6150-6156, 2012.

TAVEIRA, S. F. **Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para tratamento tópico de câncer do pele.** Ribeirão Preto: USP, tese de Doutorado-Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

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

VIEIRA, T.R.; BARBOSA, L.C.A.; MALTHA, C.R.A. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (MYRTACEAE). **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p.536-539, 2004.

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

WRETLIND, A. Development of fat emulsions. **J. Parent. Enteral Nutr.**, n. 5, p. 230–235, 1981.

WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsions for drug delivery. **Adv. Drug Deliv.Rev.**, n. 20, p.131–145, 1996.

WISSING, S. A.; KAYSERB, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 56, n. 9, p. 1257– 1272, 2004.

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

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

XIAO YU WU, Y. L., WONG, H. L., BENDAYAN, R., RAUTH, A. M., Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Adv. Drug Deliv. Rev.** n.59, p. 491-504, 2007.

ZHANG, N.; PINGB, G.; XUA, W.; CHNGA, Y.; HANA, X. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. **Int. J. Pharm.**, v. 327, p. 153-159, 2006.

ZHANG, L.; GU, F. X.; CHAN, J. M.; WANG, A. Z.; LANGER, R. S.; FAROKHZAD, O. C. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. **Clin. Pharmacol. Ther.**, n. 83, p. 761-769, 2008.

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