



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Campus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos



Obtenção e caracterização de complexos dendrímero PAMAM G4 - ibuprofeno para potencial administração nasal

KAMILA ROTOLO MUSSARELLI

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Vírginia Costa Scarpa

Araraquara-SP
2014



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Campus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos



Obtenção e caracterização de complexos dendrímero PAMAM G4 - ibuprofeno para potencial administração nasal

KAMILA ROTOLO MUSSARELLI

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Vírginia Costa Scarpa

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara-SP
2014

Ficha Catalográfica

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

M989f Mussarelli, Kamila Rotolo
Obtenção e caracterização de complexos dendrímero PAMAM G4 - ibuprofeno para potencial administração nasal / Kamila Rotolo Mussarelli. — Araraquara, 2014
81 f.

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

Orientador: Maria Virginia Costa Scarpa

1. Dendrímero. 2. Ibuprofeno. 3. Via nasal. 4. Sistema mucoadesivo. I. Scarpa, Maria Virginia Costa, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais
Valdir e Norma e a minha querida
irmã Karine pelo amor, apoio,
incentivo e ativa participação em
todos os momentos de minha vida.
A esta família que tanto amo,
admiro e que está sempre comigo!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Valdir e Norma, por todo o amor, apoio, carinho e sacrifícios incondicionais para que eu pudesse atingir esta etapa da minha vida. Não há como expressar toda minha felicidade e orgulho em dedicar este trabalho a vocês, como forma de agradecimento a todo empenho e esforço oferecidos a mim e a minha irmã a fim de nos garantir um futuro melhor. Amo muito vocês!

Agradeço a minha querida irmã, Karine, por ser minha confidente, com quem posso contar com toda confiança e apoio, sempre. Obrigado por entender minhas ausências, pela paciência e principalmente pelos conselhos para que eu nunca perdesse o ânimo e o foco. Amo muito você!

Agradeço ao meu cunhado, Rafael Escher, todo o apoio, ajuda e sabedoria transmitida para minha melhor compreensão em assuntos relacionados não só a esse trabalho.

Aos meus avós Geraldo e Hermínia por ser um exemplo em minha vida. Agradeço a compreensão pelas ausências nas visitas das sextas-feiras e nos almoços aos domingos, e em especial aos mimos feitos para mim.

Aos meus familiares, tios, primos por sempre estarem dispostos a ajudar independente da situação. Agradeço todos os incentivos, conselhos e o apoio de cada um durante essa fase. Sou feliz ao ver o quanto somos unidos.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Maria Virginia Costa Scarpa pela confiança depositada em mim e no meu trabalho, por sempre acreditar que eu poderia ir mais longe me proporcionando assim um enorme crescimento profissional. Agradeço toda sabedoria transmitida, confiança, paciência, dedicação, e por ter tornado esse sonho realidade.

Aos professores do departamento de Fármacos e Medicamentos desta faculdade, pela disponibilidade de utilização de seus equipamentos.

À Maria de Fátima Rodrigues, a famosa Fati, pelo apoio, amizade e carinho. Agradeço toda experiência transmitida desde minha época de estagiária até o momento, e por sempre ajudar nos mais diversos momentos.

Às minhas amigas de laboratório Ana Cláudia Depaoli, Mirela Garcia, Natália Ferri e Márcia Vilchenski por tornarem a rotina do trabalho momentos de alegria e prazer. Foram muitos momentos difíceis, mas com vocês ao lado a jornada foi mais divertida. Obrigado pelo apoio de cada uma.

À minha amiga e companheira Ana Cláudia, por sempre estar comigo nessa fase, do início ao fim e ser essa pessoa tão especial a qual tive o prazer de dividir apartamento, laboratório, medos, angústias, ansiedades, risos e alegrias. Obrigado por ser minha confidente.

À Mirela Garcia, por permitir que nossa amizade florescesse e com isso tornasse não só uma amiga de laboratório, mas sim uma amiga para vida toda. Obrigado por fazer diferença na minha vida.

Aos meus amigos e colegas do laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico: Flávia Fiorentino, Eliane Tótolli, Tahisa Pedroso, Josilene Corrêa, Lucas Chierentin, Ana Carolina Kogawa, Danilo Fernandes pelo carinho e amizade. Um especial agradecimento à Andressa Figueiredo, Camila Tavares e Mariane Curbete pela amizade, apoio e por estarem ao meu lado nos mais diversos momentos.

A todos os amigos e colegas do laboratório da Farmacotécnica, pela ajuda e apoio. Em especial à Charlene Kill e Ana Luiza pela ajuda nos testes mucoadesivos, dedicação, carinho, apoio e amizade. E também à Karisa Belotto, Vanessa Meyagusku e Cristiane Pissinato pela amizade e incentivo desde o início desta jornada.

Aos amigos e colegas do laboratório CMAF: João Augusto, Danila Scatolin, Natália Rissi, Juliana Mendes, Mariana Sato, pelo carinho, apoio, conselhos, risadas durante todo meu trajeto.

Ao laboratório de Biologia Molecular, por disponibilizar o uso do freezer -80°C.

A Bruna Bonifácio e ao Leonardo Marino por tornarem a volta para casa sempre divertida. Obrigado pelos conselhos, carinho e amizade.

Aos meus amigos da graduação, Ana Carolina, Aline Paiva, Ana Carolina Jimenez, Vanessa Oliveira, Luiz Paulo pelo incentivo e apoio para iniciar essa nova jornada. Agradeço

aos quatro anos de convivência, amizade, conselhos e os diversos momentos divididos. Vocês foram essenciais para essa mudança.

Aos meus amigos de Araraquara, Lia Teodoro, Vinicius Boen e Gabriel Fortuna pelos momentos de alegria e prazer. Obrigado pelos conselhos, apoio e as inúmeras risadas, tornando a vida “fora de casa” uma experiência leve e divertida.

Aos meus amigos Maria Angélica, Mayara e Leandro pelo incentivo, apoio e amizade. Agradeço por sempre me animarem de forma que eu nunca desistisse dos meus objetivos, por demonstrar que mesmo ausente fisicamente à amizade sempre será a mesma. Vocês são especiais!

Ao Douglas Cassimiro, pelo auxílio nas análises termoanalíticas.

As funcionárias da secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas Unesp-Araraquara, pela paciência e dedicação.

Ao Profº. Dr. Roberto Mendonça Faria e ao Instituto de Física da USP de São Carlos por permitir a utilização do Microscópio de Força Atômica e ao Profº. Dr. Marcelo Assunção por auxiliar na discussão das análises morfológicas.

Ao Profº. 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 Profº. Dr. Adélia Emilia e a Dr. Luciana Mattoso pela contribuição na minha banca de qualificação.

A CAPES e PADCFAR pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O ibuprofeno é um fármaco do grupo dos antiinflamatórios não esteroidais com ação analgésica, antipirética e antiinflamatória, indicado clinicamente para alívio sintomático de cefáleias, mialgias, osteoartrite, artrite reumatóide. Estudos recentes vêm demonstrando seu potencial no tratamento de doenças neurodegenerativas, por atuar na neuroinflamação. Contudo, sua utilização ainda é limitada. O ibuprofeno causa irritação na mucosa gástrica devido à inibição não seletiva da enzima ciclooxygenase, apresenta baixa solubilidade em água e um número maior de doses com concentrações elevadas do fármaco é necessário para que concentrações adequadas cheguem ao cérebro. Para contornar esses problemas, têm-se buscado novos sistemas de liberação, como os dendrímeros do tipo PAMAM e vias de administrações alternativas que permitam a chegada de fármacos ao sistema nervoso central, como por exemplo, a via nasal. Neste trabalho, estudou-se o desenvolvimento e a caracterização de dendrímeros do tipo PAMAM G4 para potencial administração nasal do ibuprofeno. Para isso, avaliou-se a solubilidade do ibuprofeno após a complexação com o dendrímero PAMAM G4. O complexo formado mostrou-se mais solúvel em meio aquoso que o fármaco puro. O sistema foi caracterizado pelas técnicas de espectroscopia na região do infravermelho, calorimetria diferencial exploratória e análise termogravimétrica, os quais indicaram que a interação fármaco-dendrímero ocorre, principalmente, por ligações eletrostáticas entre os grupamentos aminas do dendrímero com as moléculas de ácido carboxílico presente no ibuprofeno. A análise de microscopia de força atômica indicou a presença de agregados de partículas com tamanhos variados. Nos estudos de mucoadesão, observou-se que o complexo possui atividade mucoadesiva, por apresentar interações moleculares com a mucina, o que pode aumentar o tempo de permanência com a mucosa nasal. Esses resultados sugerem que o complexo ibuprofeno-dendrímero PAMAM G4 apresenta um grande potencial como sistema de liberação de fármacos por administração nasal.

Palavras chave: dendrímero, ibuprofeno, via nasal, sistema mucoadesivo.

ABSTRACT

Ibuprofen is a drug belonging to the group of nonsteroidal antiinflammatory drugs with analgesic, antipyretic and anti-inflammatory action. It is clinically recommended for symptomatic relief of headache, myalgia, osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Recent studies have demonstrated the potential of the ibuprofen for the treatment of neurodegenerative diseases, by acting on neuroinflammation, however, its use is still limited. The Ibuprofen causes gastric mucosal irritation due to non-selective inhibition of cyclooxygenase enzyme. It has low solubility on water and a greater number of doses of the drug at high concentrations is required in order to reach the brain with the appropriate concentration. To minimize these problems, current research has focused on new delivery systems, such as PAMAM dendrimers and alternative routes of administration that allow drugs to reach the CNS, i.e., nasal route. This study investigated the development and characterization of PAMAM G4 dendrimer for nasal administration of ibuprofen. The solubility of the ibuprofen was evaluated after complexation with the PAMAM G4 dendrimer. The complex was proven to be more soluble than the pure drug in an aqueous medium. The system was characterized by using infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis, coming to the conclusion that the dendrimer-drug interaction occurs mostly by electrostatic bonds between the amine groups of the dendrimer molecules and the carboxylic acid present in the ibuprofen. An atomic force microscopy was performed and indicated the presence of particles aggregates with different sizes. Mucoadhesion studies showed that the complex has mucoadhesive activity, due to molecular interactions with the mucin, which may increase the time in the nasal mucosa. The results suggest that ibuprofen-PAMAM dendrimer complex has great potential as a drug delivery system for nasal administration.

Keywords: dendrimer, ibuprofen, nasal, mucoadhesive system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ibuprofeno.....	16
Figura 2. (a) Estrutura química do dendrímero PAMAM de quarta geração; (b) ramificações no interior; (c) núcleo; (d) superfície multivalente.	19
Figura 3. Rota sintética do dendrímero PAMAM	21
Figura 4. Representação esquemática da anatomia nasal humana.....	23
Figura 5. Espectro de absorção na região do ultravioleta do ibuprofeno.	39
Figura 6. Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV em 263 nm para solução aquosa de ibuprofeno.	41
Figura 7. Curva analítica da solução aquosa de ibuprofeno, obtida a 263 nm pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta.	42
Figura 8. Espectro de absorção do dendrímero PAMAM G4.	42
Figura 9. Espectro de absorção do complexo ibuprofeno-dendrímero PAMAM G4.....	44
Figura 10. Imagem de amplitude de AFM do dendrímero PAMAM G4 (a) escala de 5.0 μm ; (b) escala de 1.0 μm	51
Figura 11. Imagem topográfica do dendrímero PAMAM G4 na escala de 2 μm	51
Figura 12. Imagem de amplitude de AFM do complexo IBU-PAMAM G4 em meio aquoso (a) escala de 5 μm ; (b) escala de 2 μm	52
Figura 13. Imagem topográfica do complexo IBU-PAMAM G4 dissolvido em meio aquoso na escala de 2 μm	53
Figura 14. Espectro de absorção FTIR-ATR do (a) ibuprofeno, (b) dendrímero PAMAM G4 e do (c) complexo IBU-PAMAM G4.....	54
Figura 15. Curva DSC ibuprofeno em atmosfera dinâmica de nitrogênio, vazão de 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, razão de aquecimento e resfriamento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	56
Figura 16. Curva DSC dendrímero PAMAM G4 em atmosfera dinâmica de nitrogênio á 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, com razão de aquecimento e resfriamento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	57
Figura 17. Curva DSC do complexo IBU-PAMAM G4 em atmosfera dinâmica de nitrogênio, vazão de 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, razão de aquecimento e resfriamento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	57
Figura 18. Curva TG/DTG do ibuprofeno em atmosfera dinâmica de nitrogênio á 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	59

Figura 19. Curva TG/DTG dendrímero PAMAM G4 em atmosfera dinâmica de nitrogênio á 50mL.min ⁻¹ , com razão de aquecimento de 10°C.min ⁻¹	59
Figura 20. Curva TG/DTG do complexo IBU-PAMAM G4 em atmosfera dinâmica de nitrogênio á 50mL.min ⁻¹ , com razão de aquecimento de 10°C.min ⁻¹	60
Figura 21. Representação gráfica obtida do potencial zeta do complexo em função da concentração de mucina.	63
Figura 22. Curva analítica da solução de BSA em tampão fosfato (25mM; p= 6.2), a 595 nm pelo método espectrofotométrico de quantificação de proteínas totais – Bradford.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores obtidos para construção da curva de Ringbom para ibuprofeno em 263nm.....	31
Tabela 2. Obtenção da curva de Ringbom do método espectrofotométrico na região do ultravioleta para análise do ibuprofeno a 263nm.	40
Tabela 3. Valores de absorvância determinados em 263 nm para a obtenção da curva analítica de ibuprofeno, pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta.	41
Tabela 4. Análises de precisão intra corrida para o ibuprofeno em 263nm por espectroscopia na região do ultravioleta.	43
Tabela 5. Análises de precisão inter corrida para o ibuprofeno em 263nm por espectroscopia na região do ultravioleta.	44
Tabela 6. Solubilidade do ibuprofeno no complexo IBU-PAMAM G4 obtido.	45
Tabela 7. Valores de potencial zeta e tamanho de partícula do dendrímero PAMAM G4 na forma livre e complexada com o ibuprofeno em soluções aquosas.	47
Tabela 8. Valores de potencial zeta e tamanho de partícula do dendrímero PAMAM G4 na forma livre e complexada com o ibuprofeno em tampão fosfato pH 6,2.	49
Tabela 9. Resultados obtidos na análise TG do ibuprofeno, dendrímero PAMAM e do complexo referenciando os eventos e suas respectivas temperaturas (°C) e perdas de massa (%).	61
Tabela 10. Resultados de potencial zeta obtidos na análise de mucoadesão <i>in vitro</i>	62
Tabela 12. Resultados obtidos para a eficiência de ligação entre o complexo IBU-PAMAM e a mucina pelo método de Bradford.	65

LISTAS DE ABREVIATURAS

AFM = Microscopia de Força Atômica

BHE = Barreira hematoencefálica

DA = Doença de Alzheimer

DP = desvio padrão

DPR = desvio padrão relativo

DSC = Calorimetria exploratória diferencial

FTIR = Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

G4 = quarta geração

IBU = ibuprofeno

LD = Limite de detecção

LQ = Limite de quantificação

PAMAM = poliaminoamida

SNC = Sistema Nervoso Central

TG = Análise termogravimétrica

T_g = Temperatura de transição vítrea

UV = Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Ibuprofeno.....	16
1.2	Sistemas de liberação de fármacos	18
1.3	Dendrímeros	19
1.4	Via de administração nasal	22
1.5	Bio e Mucoadesão	24
2	OBJETIVO.....	27
2.1	Objetivos específicos.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	MATERIAL.....	29
3.1.1	Fármaco	29
3.1.2	Solventes, Reagentes e Matérias primas.....	29
3.1.3	Equipamentos e Acessórios	29
3.1.4	Soluções.....	30
3.2	MÉTODOS	30
3.2.1	Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação do ibuprofeno no complexo IBU-PAMAM G4 por espectroscopia UV-vísivel	30
3.2.1.1	Curva de Ringbom	30
3.2.1.2	Validação do método analítico.....	31
3.2.2	Obtenção do complexo IBU-PAMAM G4	33
3.2.3	Determinação da razão molar ibuprofeno-dendrímero no complexo formado	34
3.2.4	Caracterizações físico-químicas do complexo IBU-PAMAM G4.....	34
3.2.4.1	Potencial Zeta.....	34
3.2.4.2	Tamanho de partícula	34
3.2.4.3	Microscopia de Força Atômica (AFM)	34
3.2.4.4	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	35
3.2.4.5	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	35
3.2.4.6	Análise Termogravimétrica (TGA)	35
3.2.5	Avaliação <i>in vitro</i> da mucoadesão do complexo IBU-PAMAM G4	36
3.2.5.1	Interação IBU-PAMAM G4 e a mucina pelo método do Potencial Zeta.....	36
3.2.5.2	Eficiência de ligação com a mucina	36

3.2.5.2.1	Construção da curva analítica para quantificação da mucina	37
4	Resultados e discussão	39
4.1	Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação do ibuprofeno no complexo IBU-PAMAM G4 por espectroscopia UV-vísivel	39
4.1.1	Curva de Ringbom.....	39
4.1.2	Validação do método analítico	41
4.2	Determinação da solubilidade e razão molar ibuprofeno-dendrímero PAMAM G4	44
4.3	Caracterizações físico-químicas do complexo IBU-PAMAM G4	47
4.3.1	Potencial Zeta e Tamanho de partícula	47
4.3.2	Microscopia de Força Atômica (AFM).....	50
4.3.3	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	53
4.3.4	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	55
4.3.5	Análise Termogravimétrica (TGA).....	58
4.4	Avaliação da mucoadesão do complexo IBU-PAMAM G4.....	61
4.4.1	Interação entre as partículas do complexo IBU-PAMAM G4 e a mucina	62
4.4.2	Construção da curva analítica para quantificação da mucina	64
4.4.3	Eficiência de ligação com a mucina	65
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Atualmente têm sido desenvolvidos sistemas de liberação prolongada de fármacos com diversas finalidades, porém não há muitos estudos de sistemas que tenham como alvo o sistema nervoso central (SNC). Apesar de existência de estudos consideráveis, o cérebro e o SNC ainda se cercam de muitos mistérios, e portanto, as patologias que os afetam representam um grande desafio para a ciência biomédica.

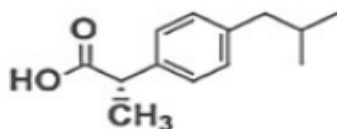
Estratégias terapêuticas para as desordens neurodegenerativas encontram obstáculos que dificultam a entrada de fármacos para o cérebro devido à presença da barreira hematoencefálica (BHE). Para superar as imposições da BHE, o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, como os dendrímeros do tipo PAMAM que possibilitam a veiculação de fármacos aliados a via de administração nasal parecem ser estratégias promissoras para o tratamento de doenças que afetam o cérebro, uma vez que, a cavidade nasal permite a passagem de fármacos para o sistema nervoso central.

A relevância dessa pesquisa é a obtenção e caracterização do dendrímeros do tipo PAMAM G4 como transportadores do ibuprofeno, bem como avaliação da propriedade mucoadesiva que esse sistema exerce para potencial administração nasal.

1.1 Ibuprofeno

O ibuprofeno (ácido 2-(4-isobutilfenil) propiônico) é um fármaco do grupo dos antiinflamatórios não esteroidais (AINES) pertencente ao subgrupo dos derivados do ácido propiônico (BEJARANO, 2006).

Figura 1. Estrutura química do ibuprofeno (BEJARANO, 2006).



Este fármaco exerce funções analgésicas, antipiréticas e antiinflamatórias, geralmente é indicado para o alívio sintomático de cefáleias, mialgias, osteoartrite, artrite reumatóide, febre associada com inflamação, luxações, entre outros (COSTA *et al.*, 2006).

O mecanismo de ação dos derivados do ácido propiônico, incluindo o ibuprofeno, está atribuído à sua capacidade de inibição direta das ciclooxygenases 1 e 2, enzimas chave na

produção de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, os quais tem papel fundamental na resposta inflamatória e nos estímulos aos receptores da dor. O ibuprofeno liga-se no sítio ativo destas enzimas impedindo assim a ligação do ácido araquidônico, seu substrato e sua posterior conversão em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, impedindo assim o processo de inflamação e dor (NEWA *et al.*, 2008).

A administração oral do ibuprofeno, assim como a dos demais AINES, pode levar a erosões gástricas, úlceras no estômago e duodeno, sangramentos e morte por hemorragia gastrointestinal (COSTA *et al.*, 2006).

Estudos recentes apontam a eficiência do ibuprofeno em desencadear mecanismos que levam à morte de células tumorais (PALAYOOR, 1998). Estudos epidemiológicos sugerem que o uso prolongado de AINES, entre eles o ibuprofeno, está associado à redução na incidência de doenças neurodegenerativas (in t' VELD *et al.*, 2001).

Alguns pesquisadores relataram que o uso prolongado de ibuprofeno pode reduzir o risco de desenvolver a doença de Alzheimer além de, retardar o início da doença em modelos de camundongos transgênicos (LIM *et al.*, 2000; YAN *et al.*, 2003; DAM *et al.*, 2010). Outro estudo relata que o ibuprofeno é capaz de aumentar o número de neurônios dopaminérgicos em 47%, protegendo os neurônios contra a excitotoxicidade do glutamato, sugerindo que este fármaco pode atuar como agente neuroprotetor na doença de Parkinson (CASPER *et al.*, 2000).

Desse modo, é aceitável supor que o ibuprofeno exerce efeito neuroprotetor, modificando a patogênese de algumas patologias neurodegenerativas (in t' VELD *et al.*, 2001). Porém alguns estudos sugerem que os AINES são apenas, marginalmente, distribuídos no SNC e sua penetração pela barreira hematoencefálica (BHE) necessitaria de altas doses desses fármacos, aumentando assim os riscos de efeitos adversos (MANNILA *et al.*, 2005). Mannila e colaboradores (2005) determinaram em seus estudos a distribuição de ibuprofeno no parênquima cerebral de ratos após a infusão do medicamento pela veia jugular e demonstraram a baixa penetração de ibuprofeno no cérebro, concluindo que a baixa disponibilidade do ibuprofeno para o SNC pode ser o fator que contribui para a sua ineficiência no tratamento de algumas doenças neurodegenerativas. Contudo, um dos meios alternativos para permitir a liberação de AINES no SNC são os sistemas de liberação controlada de fármacos, os quais possuem diversas vantagens.

1.2 Sistemas de liberação de fármacos

A descoberta de sistemas de liberação controlada de fármacos é uma área em desenvolvimento contínuo de novas plataformas voltadas para tratamentos mais eficazes e específicos de diversas doenças (SVENSON *et al.*, 2009; KUSHAL *et al.*, 2013).

O contínuo crescimento na área de medicamentos tem levado ao desenvolvimento de novos sistemas de liberação prolongada de fármacos. Estes novos sistemas oferecem inúmeras vantagens quando comparados com as formas farmacêuticas convencionais, as quais incluem a melhoria na eficácia, redução da toxicidade, melhoria do conforto e adesão do paciente ao tratamento (WATTS; DAVIE e MELIA 1990; MEHNERT e MADER, 2001; KUSHAL *et al.*, 2013).

Grandes esforços têm sido feitos na busca de sistemas de liberação mais eficientes. Um sistema de liberação ideal deve proporcionar a liberação do fármaco exclusivamente no seu sítio de ação biológica, minimizando, deste modo, os efeitos adversos e a quantidade necessária para a obtenção do efeito terapêutico desejado. Ele também deve ser capaz de aumentar o intervalo de administração bem como modular a velocidade de liberação aumentando a duração do efeito (JUN, 1995; TIWARI *et al.*, 2012).

Os sistemas de liberação são desenvolvidos para melhorar sua farmacocinética e a biodistribuição e/ou fornecer uma cinética de liberação modificada e direcionada para o alvo (ALLEN e CULLIS, 2004), além de melhorar as características indesejáveis intrínsecas de cada fármaco, como por exemplo, a baixa solubilidade, baixa biodisponibilidade e a instabilidade (JUN, 1995; MEHNERT e MADER, 2001).

Nesse contexto uma ampla variedade de sistemas, visando modular a velocidade e direcionar o local de liberação dos fármacos, tem sido objeto de investigação na área de Tecnologia Farmacêutica (LOPES; LOBO e COSTA, 2005). Dentre os sistemas mais estudados encontram-se os lipossomas (ALLEN e CULLIS, 2013), as bombas osmóticas (VERMA; ARORA e GARG, 2004), os revestimentos entéricos (LI *et al.*, 2004), os sistemas transdérmicos (PIERRI e ROSSETTI, 2013), as ciclodextrinas (TIWARI, TIWARI e RAI, 2010), os dendrímeros (PRIETO *et al.*, 2010), entre outros.

A maioria desses sistemas caracteriza-se pelo tamanho reduzido das partículas e compartimentalização de fármacos em ambientes restritos, podendo, com isso, direcionar o fármaco para regiões específicas favorecendo a interação com sistemas biológicos (FORMARIZ *et al.*, 2005).

Existe uma diversidade de sistemas de liberação para vetorizar fármacos, principalmente os que se encontram em escala nanométrica (AGNIESZKA *et al.*, 2012). Contudo, este trabalho vai destacar o uso de sistemas que utilizam dendrímeros do tipo PAMAM como transportadores de fármacos.

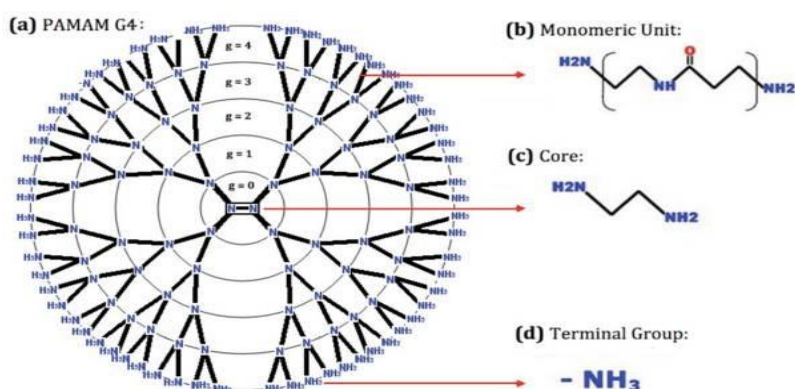
1.3 Dendrímeros

Os dendrímeros são uma classe especial de polímeros que apresentam uma estrutura tridimensional altamente ramificada e regular ao redor do núcleo de onde inicia as ramificações. O termo dendrímero refere-se à aparência da sua estrutura, sendo derivado das palavras gregas *dredons* (árvores) e *meros* (porção) (VOGTLE *et al.*, 2000).

Os dendrímeros são, apesar do seu tamanho molecular grande, estruturas bem definidas, com baixa polidispersividade quando comparado com polímeros tradicionais. A nível molecular os dendrímeros ramificados resultam em estruturas semiglobulares ou globulares, na maioria das vezes com alta densidade funcional na superfície (DYKES, 2001).

As estruturas dendríticas são caracterizadas por “camada” entre cada ponto focal chamado de geração. O número da geração é definido pelo número de pontos focais, vão do núcleo a superfície. As estruturas dos dendrímeros pode ser divididas em três partes: i. superfície multivalente com alto número de sítios reativos em potencial; ii. ramificações que são bem definidas e protegidas pela superfície externa do dendrímero; iii. núcleo, o qual nas gerações altas é protegido pelas ramificações (figura 2). As três partes podem ser adaptadas para objetivos específicos como, por exemplo transportadores de fármacos (HAWKER; WOOLEY e FREKCHET, 1993).

Figura 2. (a) Estrutura química do dendrímero PAMAM de quarta geração; (b) ramificações no interior; (c) núcleo; (d) superfície multivalente.



Os dendrímeros podem ser sintetizados quimicamente por duas formas diferentes, divergente e convergente, conforme. A divergente foi desenvolvida por Tomalia e colaboradores, na qual os dendrímeros são sintetizados a partir do núcleo para a periferia, aumentando geração após geração (TOMALIA *et al.*, 1986). A síntese convergente desenvolvida por Hawker e Frechet inicia-se pelos grupos terminais em direção ao núcleo (HAWKER e FRECHET, 1990).

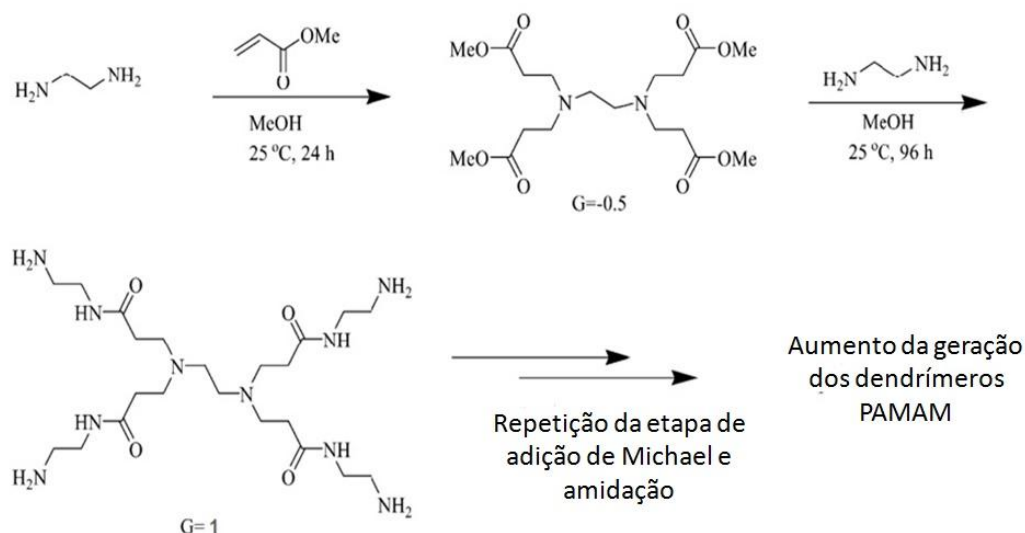
Nos últimos anos, essas estruturas dendríticas mostraram-se como sistemas promissores de liberação de fármacos em aplicações biomédicas, devido as suas características e vantagens. Dentre estas vantagens pode-se citar que os dendrímeros apresentam capacidade de promover liberação controlada de fármacos, boa biocompatibilidade, baixa toxicidade e imunogenicidade, alta capacidade de incorporação de substâncias em seu interior ou superfície e a capacidade de promover o isolamento, em nível molecular, do fármaco durante o trânsito para células alvo e dessa forma protegê-la contra inativação (ESFAND e TOMALIA, 2001).

A primeira família de dendrímeros a ser sintetizada, caracterizada e comercializada foram os dendrímeros de poliaminoamida (PAMAM) sintetizados pelo método divergente (TOMALIA *et al.*, 1985). Atualmente, encontra-se comercialmente toda família de dendrímeros PAMAM (da geração 0 a 10) apresentando um grande número de grupos periféricos (4 a 4096) e diferentes grupos funcionais terminais como amina, ácido carboxílico e hidroxila. O aumento no número de geração (G0, G1, G2, etc.) resulta em aumento no tamanho de partícula, peso molecular e número de grupamentos superficiais (VANDAMME e BROBECK, 2005).

A síntese deste polímero tem como ponto de partida uma molécula de etileno diamina (EDA). A EDA reage com quatro moléculas de acrilato de metila ($\text{HC}=\text{CHCOOCH}_3$) formando o dendrímero de meia geração (G 0.5). Assim sendo, se o dendrímero de meia geração reagir novamente com a EDA será formado o dendrímero de primeira geração (G1). Para obter-se dendrímeros de meia geração é necessário submeter um dendrímero de geração completa a uma reação com acrilato de metila, enquanto que para obter dendrímeros de geração completa é necessário reagir dendrímeros de meia geração com EDA (figura 3) (WANG *et al.*, 2010). Resumindo, a síntese dos dendrímeros PAMAM é realizada mediante a adição de metacrilato ao núcleo, seguida de uma amidação com etilendiamina do grupo éster resultante. A cada repetição desse processo forma-se uma nova geração, a cada geração o

peso molecular do dendrímero aumenta exponencialmente e dobra o número de grupos amino terminais da superfície (VIEIRA, 2006).

Figura 3. Rota sintética do dendrímero PAMAM (WANG *et al.*, 2010)



A arquitetura original dos dendrímeros de PAMAM possibilita a sua interação com fármacos muito ou pouco solúveis em água, formando complexos via encapsulamento molecular, com ligações covalentes e não covalentes. A alta densidade de carga superficiais presente, devido aos múltiplos grupos ionizáveis na periferia, possibilita também a interação eletrostática com diferentes fármacos. Contudo, os dendrímeros atuam aumentando a solubilidade de fármacos lipofílicos (CHAUHAN *et al.*, 2003).

Diversas formas de interação entre a arquitetura dendrímica e moléculas hospedeiras tem sido propostas. Pode ocorrer o aprisionamento de fármacos no centro do dendrímero (envolvendo interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio) e a interação entre o fármaco com a superfície dendrítica (interações eletrostáticas e covalentes). As aplicações deste tipo de sistema resultam em um aumento da solubilidade e da biodisponibilidade da molécula, atuando como modificadores de liberação e no direcionamento da ação de fármacos (D'EMANUELLE e ATTWOOD, 2005).

Dendrímeros PAMAM aumentaram a solubilidade de diversos fármacos com características hidrofóbicas, dentre eles os antiinflamatórios indometacina (CHAUHAN *et al.*, 2004), ibuprofeno (KOLHE *et al.*, 2003), flubiprofeno (YIYUN e XU, 2005), cetoprofeno

(NA *et al.*, 2006), e outras classes terapêuticas como o caso do antipsicótico risperidona (PRIETO *et al.*, 2011) e o antibiótico sulfonamida (MINGLU *et al.*, 2006).

Existem vários relatos na literatura de princípios ativos que apresentaram sua atividade biológica melhorada ou modificada quando complexados com dendrímeros PAMAM. Complexos com oligonucleotídeos, por exemplo, aumentam a entrada de ácidos nucleicos no citoplasma e no núcleo das células (SVENSON e TOMALIA, 2005). Conjugados de cisplatina, agente antineoplásico, com dendrímeros PAMAM levaram a liberação lenta do fármaco, acúmulo de altas concentrações em tumores sólidos e baixa toxicidade comparada com a cisplatina livre (MALIK *et al.*, 1999).

Dendrímeros PAMAM apresentam-se como ótimos promissores de sistemas de liberação de fármacos em diversas vias de administração, dentre as vias podemos incluir a via intravenosa (CHAUHAN *et al.*, 2004), oral (WIWATTANAPATAPEE *et al.*, 2000; D'EMANUELLE *et al.*, 2004), transdérmica (WANG *et al.*, 2003), e ocular (VANDAMME e BROBECK, 2005). No entanto, poucos estudos têm sido realizados para analisar o efeito desses dendrímeros na absorção nasal de fármacos. Em um estudo recente pesquisadores avaliaram os efeitos de dendrímeros do tipo PAMAM na absorção nasal, *in vivo*, de fármacos poucos solúveis, e concluíram que dendrímeros de terceira geração melhoraram e intensificaram a absorção nasal de fármacos sem causar danos à membrana e tecidos nasais (DONG *et al.*, 2010). Essas propriedades fazem dos dendrímeros sistemas promissores para administração nasal em diversas aplicações biomédicas que buscam vias alternativas de administração.

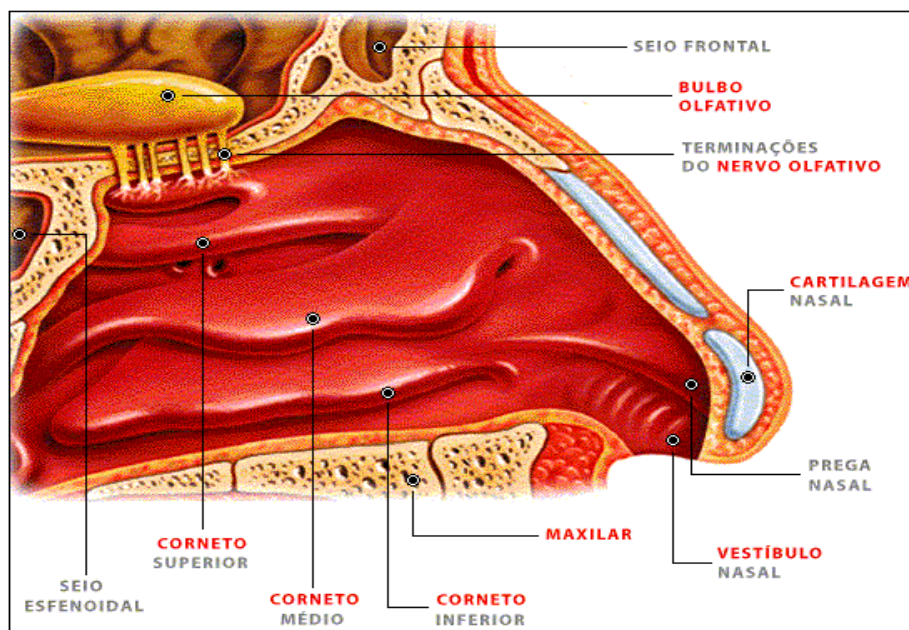
1.4 Via de administração nasal

A via nasal tem gerado grande interesse como rota alternativa para administração de fármacos e biomoléculas que apresentam metabolismo pré-sistêmico ou são suscetíveis à degradação ácida e/ou enzimática, devido às vantagens desta via (GAVINI *et al.*, 2008).

Anatomofisiologicamente, a cavidade nasal divide-se em três áreas funcionais: o vestíbulo nasal, a região respiratória e a região olfatória (figura 4). O vestíbulo nasal (região mais externa do nariz) abrange aproximadamente 15 mm, estendendo-se das narinas até a válvula nasal, com um comprimento de cerca de 60 mm e um volume de 20 mL, que chega até a nasofaringe. Na região respiratória a cavidade nasal encontra-se dividida verticalmente pelo septo nasal em quase toda a sua extensão. Cada parede da cavidade nasal apresenta três

recortes denticulares conhecidos como cornetos. Esses recortes fazem com que a cavidade nasal possua uma área superficial relativamente grande (160 cm^2), em comparação ao seu volume ($300\text{ }\mu\text{L}$). A elevada área superficial da cavidade nasal e abundante vascularização subjacente tornam esta via apropriada para absorção de fármacos (AULTON, 2005).

Figura 4. Representação esquemática da anatomia nasal humana (AULTON, 2005).



A membrana olfativa é encontrada na parte superior da cavidade nasal e abrange 5% da superfície total, a qual apresenta células sensitivas olfativas responsáveis pela passagem de substâncias ao sistema nervoso central sem o contato com a barreira hematoencefálica. Em geral existem três rotas que o fármaco pode seguir após a administração nasal: passagem direta da mucosa nasal para a circulação sanguínea; entrada no bulbo olfatório via transporte neuronal ou entrada direta no encéfalo (GRAFF e POLLACK, 2003). Na literatura há inúmeros trabalhos que analisaram o potencial efeito da administração nasal para atingir o sistema nervoso central (DHURIA, HANSON e FREY, 2010; RODRÍGUEZ e TESTE, 2009; HANSON e FREY, 2007).

Em condições fisiológicas normais, a mucosa nasal é revestida de muco, o qual é composto por duas camadas: externa (densa e viscosa) e interna (fluída e serosa). O muco nasal é constituído por 95% de água, 3% de mucina (uma glicoproteína) e o restante são eletrólitos, lipídios, enzimas e anticorpos (HUSSAIN, 1998). Este funciona como uma barreira protetora contra a entrada de moléculas estranhas ao organismo devido à rede

polimérica constituída pela mucina e enzimas proteolíticas que degradam rapidamente as moléculas, denominado depuração mucociliar. A depuração mucociliar é basicamente uma função de defesa, mas que constitui uma barreira à absorção de fármacos por esta via, pois dificultam a permanência da formulação na mucosa nasal (ILLUM, 2003).

Uma estratégia para retardar a remoção da formulação pela depuração mucociliar é a utilização de promotores de absorção que auxiliam o transporte do fármaco através da cavidade nasal, como no caso de substâncias mucoadesivas. Estas substâncias permitem adesão das partículas à superfície do epitélio aumentando o seu tempo de permanência, para que o fármaco seja absorvido através da rica vascularização presente nesta mucosa (ILLUM 2003).

1.5 Bio e Mucoadesão

A bioadesão pode ser definida como o estado em que dois materiais, dentre os quais pelo menos um é de natureza biológica, sejam mantidos juntos por um período prolongado de tempo através de forças interfaciais (SMART, 2005). Na década de 1980 esse conceito começou ser aplicado em sistemas de liberação de fármacos. Ele consiste na incorporação de moléculas adesivas em algum tipo de formulação farmacêutica, a qual fica em contato íntimo com o tecido de absorção, liberando o fármaco perto do local de ação, com o consequente aumento da biodisponibilidade, promovendo efeitos locais e sistêmicos (WOODLEY, 2001).

O mecanismo responsável pela formação de ligações bioadesivas não se encontra perfeitamente esclarecido. No entanto, para desenvolver um sistema bio/mucoadesivo ideal, é importante compreender as forças responsáveis na formação desses sistemas.

A formação de ligações bio/mucoadesivas envolve essencialmente três etapas: i) estabelecimento de um contato íntimo entre o sistema bioadesivo e o tecido receptor ou camada de muco. A mistura do muco com o polímero conduz à intumescência do polímero bioadesivo acompanhada pelo desenrolamento das cadeias do polímero; ii) seguido da interpenetração das cadeias poliméricas bioadesivas no interior da rede glicoproteica de muco. Este fenômeno é uma consequência da liberação das moléculas poliméricas enroladas e da sua difusão no muco; iii) formação de novas ligações, baseado na formação de ligações interfaciais entre as cadeias interpenetradas quando o contato íntimo é estabelecido. (DUCHÊNE e PONCHEL, 1989).

O número de metodologias empregadas para analisar a mucoadesão está constantemente em crescimento, embora o emprego dos mais diferentes métodos cause às vezes incoerência entre os resultados, os quais ficam difíceis de comparar, devido às diferenças entre os parâmetros e condições experimentais (SIGURDSSO; LOFTSSON; LEHR, 2006). Há várias metodologias propostas, e elas podem ser divididas entre testes *in vivo* e testes *in vitro/ex vivo*.

Como exemplos de testes *in vitro* encontram-se os métodos de escoamento de líquidos que simulam a depuração em mucosas (NIELSEN; SCHUBERT; HANSEN, 1998); métodos que medem a força de mucoadesão e que utilizam a reologia (CARVALHO *et al.*, 2012); métodos que utilizam imagem, como a microscopia eletrônica (MATHIOWITZ; CHICKERING; LEHR, 1999), microscopia de força atômica (CLEARY; BROMBERG; MAGNER, 2004), microscopia de fluorescência e microscopia confocal com varredura a laser (KEELY *et al.*, 2005). Há também as técnicas que analisam interações moleculares envolvidas na mucoadesão, as quais são objetos de estudo desse projeto, como o método do potencial zeta (TAKEUCHI *et al.*, 2005) e eficiência de ligação com a mucosa (SHADAB *et al.*, 2013).

Há uma variedade de materiais empregados no desenvolvimento desses sistemas e os mais estudados são os polímeros derivados do ácido poliacrílico, como o policarbofil e os carbômeros, polímeros derivados da celulose, como a hidroxietilcelulose e a carboximetilcelulose, os alginatos, a quitosana e derivados e, mais recentemente, os chamados sistemas multifuncionais (SMART, 2005).

No desenvolvimento de sistemas mucoadesivos têm-se utilizado, principalmente, moléculas catiônicas, pois estas podem interagir com a superfície de absorção da mucosa nasal, a qual é carregada negativamente em pH fisiológico, devido à natureza química das membranas celulares e das moléculas de mucina (WOODLEY, 2001).

Portanto, o uso de dendrímeros do tipo PAMAM G4 no desenvolvimento de sistemas mucoadesivos fazem dessas moléculas sistemas interessantes para administração nasal do ibuprofeno, uma vez que, em pH fisiológico possuem grupamentos catiônicos superficiais que permitem a interação com a mucosa nasal.

Objetivo

2 OBJETIVO

Obter e caracterizar complexos dendrímeros do tipo PAMAM G4 com fármaco ibuprofeno e avaliar sua atividade mucoadesiva para potencial administração nasal.

2.1 Objetivos específicos

- Obter complexo ibuprofeno-dendrímero PAMAM G4;
- Validar metodologia analítica por espectroscopia da região ultravioleta para a quantificação do ibuprofeno;
- Avaliar a solubilidade do ibuprofeno na presença do dendrímero PAMAM G4;
- Caracterizar o complexo obtido por análise de: tamanho médio de partícula, potencial zeta, microscopia de força atômica, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria;
- Avaliar *in vitro* a mucoadesão do complexo formado.

Materiais e
Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Fármaco

O ibuprofeno (IBU) - Henrifarma® (figura 4) apresenta fórmula molecular $C_{13}H_{18}O_2$ e massa molecular de 206,28 g/mol.

3.1.2 Solventes, Reagentes e Matérias primas.

- Água deionizada MilliQ
- Comassie Blue
- Dendrímero PAMAM geração 4 - Starbust® 10% solução em MeOH – Sigma Aldrich®
- Fosfato de potássio dibásico anidro – J.T.Baker®
- Fosfato de potássio monobásico anidro – Quemis®
- Metanol (grau cromatográfico) – J.T.Baker®
- Mucina tipo II crua de estômago suíno – Sigma Aldrich®
- Ácido fosfórico
- Etanol - Synth®

3.1.3 Equipamentos e Acessórios

- Agitador magnético – Nova Ética®;
- Balança analítica Mettler® - H51;
- Balança termoanalítica TA Instruments® - modelo SDT-Q600;
- Células de difusão tipo “Franz” (Hanson research – Microette Plus Q-Plus™);
- Centrífuga Fisher® – modelo 255;
- DSC Q100 – TA®;
- Espectrofotômetro de infravermelho Thermo Scientific® –Nicolet iS5 acoplado com ATR iD3 com cristal de Germânio;
- Espectrofotômetro UV-Vis Shimatzu® - UVmini-1240;
- Incubadora Shaker Marconi® - MA 420;
- Light Scatering Zetasizer Nano - Malvern®;
- Liofilizador JJ Científica® - LJJ04;
- Medidor de pH B474 – Micronal®;

- Membrana de PVDF com poro de 45µm e 13mm - Millipore®;
- Microscópico de Força Atômica Bruker® - modelo ICON
- Vórtex Biomixer® - Mult Mixer MVS-1

3.1.4 Soluções

- *Reagente de Bradford*

Solubilizou 0,01g de Comassie Blue em 5 mL de etanol, adicionou-se 40 mL de água destilada e 10 mL de ácido fosfórico. Transferiu a solução para um balão volumétrico de 100 mL acertou o menisco com água destilada. A solução formada foi filtrada em papel filtro comum e armazenada em geladeira.

- *Solução de mucina 1mg/mL*

Foram dissolvidos 50 mg de mucina tipo II crua de estômago suíno em 50 mL de tampão fosfato de potássio 25mM pH 6,2.

- *Tampão Fosfato de potássio 25mM pH 6,2*

Foram dissolvidos 3,53g de fosfato de potássio dibásico e 3,39g de fosfato de potássio monobásico em 1000 mL de água destilada e o pH foi ajustado para 6,2 com ácido fosfórico.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação do ibuprofeno no complexo IBU-PAMAM G4 por espectroscopia UV-vísivel

O ibuprofeno foi solubilizado em metanol e analisado em espectrofotômetro UV-Vis em 263nm, visto que nesta região os dendrímeros apresentam baixa ou nenhuma absorbância, garantindo que qualquer sinal obtido a partir do complexo IBU-dendrímero seja, exclusivamente, das moléculas do ibuprofeno.

3.2.1.1 Curva de Ringbom

A curva de Ringbom foi realizada com o objetivo de determinar a faixa de concentração na qual o método espectrofotométrico na região do ultravioleta obedece à linearidade. Foram preparadas soluções de concentrações crescentes de ibuprofeno em água a partir de uma solução estoque de 2mg/mL de ibuprofeno, em metanol, para obtenção da curva analítica de

19 pontos, conforme a tabela 1. As análises foram realizadas em triplicada para cada concentração.

Tabela 1. Valores obtidos para construção da curva de Ringbom para ibuprofeno em 263nm

Pontos	Volume solução metanólica de IBU 2mg/mL (µL)	Concentração final (µg/mL)*
1	50	10
2	100	20
3	150	30
4	200	40
5	250	50
6	500	100
7	750	150
8	1000	200
9	1250	250
10	1500	300
11	1750	350
12	2000	400
13	2250	450
14	2500	500
15	3000	600
16	3500	700
17	4000	800
18	4500	900
19	5000	1000

*diluída em água com auxílio de balão volumétrico de 10 mL

3.2.1.2 Validação do método analítico

O método analítico utilizado para a quantificação do ibuprofeno por espectroscopia UV-visível foi validado com intuito de assegurar sua qualidade e confiabilidade. Para isto foram analisados parâmetros como: linearidade, precisão (intra-corrida e inter-corrida), exatidão,

especificidade, limite de detecção e quantificação, segundo a Resolução-RE nº899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003) e o ICH (2005).

a) Linearidade

A linearidade foi avaliada, em triplicata para cada concentração, através da construção de curvas analíticas, com valores expressos em µg/mL. Soluções de ibuprofeno, em água, foram preparadas nas concentrações de 100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 µg/mL por diluição da solução estoque do fármaco em metanol a 1000 µg/mL.

As análises estatísticas dos dados foram obtidas pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados e expressas pela equação de primeira ordem $y=ax+b$, na qual (a) corresponde ao coeficiente angular, dado pela inclinação da reta, e (b) corresponde ao coeficiente linear, dado pelo ponto de intersecção da reta com o eixo das ordenadas. A faixa linear foi calculada utilizando o coeficiente de correlação linear (r) como o critério mínimo aceitável de $r = 0,99$ (BRASIL, 2003).

b) Especificidade

Estudou-se a interferência do dendrímero PAMAM G4 nas condições de quantificações do ibuprofeno a fim de avaliar os possíveis interferentes experimentais. Para isto, foi preparada solução de dendrímero PAMAM G4 livre na concentração de 1%, em metanol.

c) Precisão

A precisão foi considerada em dois níveis: precisão intra-corrida e inter-corrida. Para determinar a precisão intra-corrida, foram analisadas três concentrações (baixa, média e alta), contemplando o intervalo linear do método, em três replicas para cada concentração. Avaliaram-se soluções de ibuprofeno em água nas concentrações de 100, 250 e 400 µg/mL. Para se determinar a precisão inter-corrida, foram avaliadas soluções de ibuprofeno nas concentrações 100, 250 e 400 µg/mL, em triplicata para cada concentração durante três dias consecutivos. Os resultados foram analisados através do desvio padrão relativo (DPR%) de cada análise.

d) Exatidão

A exatidão do método foi avaliada a partir de nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três

réplicas cada. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme a equação 1.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

A exatidão do método foi avaliada da mesma forma que a precisão intra-corrida, utilizando-se os mesmos dados para os cálculos estatísticos.

e) Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)

O limite de quantificação e o limite de detecção foram calculados com base na obtenção de três curvas analíticas do fármaco e a partir da fórmula descrita na literatura (BRASIL, 2003), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica, conforme a equação 2 e 3 respectivamente.

$$LQ = \frac{10\sigma}{IC} \quad (\text{Equação 2})$$

$$LD = \frac{3,3\sigma}{IC} \quad (\text{Equação 3})$$

Nas quais:

σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, no mínimo, três curvas analíticas construídas com concentrações do fármaco próximo ao suposto limite de quantificação;

IC é a inclinação da curva analítica.

3.2.2 Obtenção do complexo IBU-PAMAM G4

O complexo sólido IBU-PAMAM G4 foi obtido conforme descrito na literatura (KOLHE et al., 2003). O meio reacional foi composto de fármaco e dendrímero PAMAM G4 em razão molar 100:1. Solubilizou-se 61,0 mg de IBU em 25 mL de metanol e adicionou-se 42,0 mg de dendrímero PAMAM G4. O meio reacional foi agitado a 300 rpm durante 24 horas no escuro. Após esse período o metanol foi evaporado em temperatura ambiente com o auxílio de ar comprimido. Em seguida, adicionou-se 25 mL de água e a dispersão formada foi agitada nas condições anteriores. Após, centrifugou-se a suspensão a 6000 rpm durante 10

minutos e filtrou-se o sobrenadante em membrana de PVDF 0,45µm. A solução formada foi congelada em freezer a -80°C e liofilizada para obtenção do complexo na forma de pó.

3.2.3 Determinação da razão molar ibuprofeno-dendrímero no complexo formado

Para a determinação da razão molar ibuprofeno-dendrímero solubilizou-se, em água, cerca de 4,0 mg do complexo liofilizado e analisou-se em espectrofotômetro UV-vis em 263nm, utilizando metodologia validada, conforme item 3.2.1. Com a mesma amostra analisou-se o potencial do complexo IBU-PAMAM G4 em aumentar a solubilidade do ibuprofeno em água.

3.2.4 Caracterizações físico-químicas do complexo IBU-PAMAM G4

3.2.4.1 Potencial Zeta

O potencial zeta do ibuprofeno livre e complexado com o dendrímero PAMAM G4-NH₂, bem como a solução de dendrímero PAMAM G4-NH₂ foi determinado para avaliar as possíveis cargas residuais do dendrímero após a complexação. Para a realização das medidas do potencial zeta, as amostras foram dispersas em solução aquosa e em tampão fosfato (25 mM; pH=6.2), analisadas em triplicatas, calculando-se os valores médios e os respectivos desvios padrões. As análises foram realizadas em analisador de partículas ZetaSizer Nano-ZS, Malvern Instruments.

3.2.4.2 Tamanho de partícula

O tamanho médio de partícula do complexo IBU-PAMAM G4 em solução aquosa e em tampão fosfato (25 mM; pH= 6.2) foi determinado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (Zetasizer Nano – Malvern) a 25°C sob um ângulo de 173°. As medidas foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos a partir do diâmetro médio por intensidade.

3.2.4.3 Avaliação morfológica do complexo IBU-PAMAM G4 por Microscopia de Força Atômica (AFM)

As medidas de AFM foram realizadas no equipamento da Bruker-Dimension Icon Scan Asyst do Instituto de Física de São Carlos, no modo de operação contato intermitente (tapping mode) à temperatura de 25°C. A frequência de oscilação da ponta foi de 300.000 Hz e a constante de mola do cantilever igual a 70N/m.

Seguiu-se o procedimento utilizado na técnica de LbL (Layer by layer) para o preparo das amostras. Para isto, deixou a mica, previamente clivada, em contato com uma solução contendo a amostra de interesse durante 5 min e secou-se em ar de nitrogênio para a realização da análise. As amostras analisadas foram o dendrímero PAMAM G4 livre e o complexo IBU-PAMAM G4, ambos na concentração de 1µg/mL.

3.2.4.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Para investigar as mudanças estruturais do complexo IBU-PAMAM G4 obtido, utilizou-se a Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier acoplada à técnica de Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR). O fármaco, o dendrímero e o complexo fármaco-dendrímero foram dissolvidos em metanol e, individualmente, os espectros (FTIR-ATR) foram analisados em solução. Foi utilizado o espectrômetro Thermo Scientific®, modelo Nicolet iS5 acoplado com ATR iD3 com cristal de germânio. As análises foram realizadas na região de 4000 a 600 cm⁻¹, com resolução de 4cm⁻¹.

3.2.4.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Foi utilizado o DSC Q100 – TA Universal capaz de operar -90 a 350°C, acoplado ao módulo de resfriamento. A calibração do sistema foi realizada com padrões de índio e zinco, conforme as recomendações fornecidas pelo fabricante.

As curvas DSC foram obtidas em atmosfera de N₂ (50mL.min⁻¹). Como suporte de amostra, foi empregado cadinho de alumínio hermeticamente fechado, sendo que um cadinho vazio foi utilizado como referência. A massa da amostra foi da ordem de 4mg. As razões de aquecimento utilizadas foram de 10°C min⁻¹. Convencionalmente adotou-se como endotérmico a disposição dos picos indicados no sentido descendente. Neste estudo, a investigação do comportamento térmico das amostras seguiu o seguinte procedimento: aquecimento entre -90°C a 300°C.

As amostras analisadas por DSC foram o ibuprofeno, complexo IBU-PAMAM G4 e o dendrímero PAMAM G4-NH₂.

3.2.4.6 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi utilizada para avaliar a estabilidade térmica do ibuprofeno, do dendrímero PAMAM G4 bem como do complexo IBU-PAMAM G4 formado. O equipamento utilizado foi SDT 600 Simultaneous DTA-TG da TA Instruments. As

amostras foram acondicionadas em cadinho de alumina e aquecidas até 600°C com taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹, sob fluxo de nitrogênio (50 mL min⁻¹).

3.2.5 Avaliação *in vitro* da mucoadesão do complexo IBU-PAMAM G4

Para as análises *in vitro* de mucoadesão utilizou-se mucina tipo II crua de estômago suíno, a qual era pesada em balança analítica e dissolvida em tampão fosfato de potássio (25 mM; pH = 6.2) sob agitação magnética até completa solubilização.

3.2.5.1 Interação entre o complexo IBU-PAMAM G4 e a mucina pelo método do Potencial Zeta

A interação entre o complexo e a mucina foi avaliada quanto as possíveis cargas residuais do complexo IBU-PAMAM G4 adquiridas após o contato com a solução de mucina sob condições fisiológicas nasais simuladas (tampão fosfato de potássio 25 mM; pH = 6.2). Para a realização das medidas do potencial zeta, o complexo foi disperso em tampão fosfato (25 mM; pH=6.2) e adicionaram-se alíquotas da solução de mucina em concentrações crescentes (30, 60, 90, 120, 150, 180, 300, 400 e 500 µg.mL⁻¹). As misturas foram agitadas (46 rpm) durante 5 minutos a 32,5 ± 1,0 °C a fim de simular a cavidade nasal, para posterior análise no equipamento ZetaSizer Nano-ZS, Malvern Instruments. As amostras foram realizadas em triplicata, calculando-se os valores médios e os respectivos desvios padrão.

3.2.5.2 Eficiência de ligação com a mucina

A interação entre o complexo IBU-PAMAM G4 e a mucina foi avaliada conforme a literatura (YONCHEVA; LIZARRAGA e IRACHE, 2005). Incubaram-se o complexo com a solução de mucina em tampão fosfato (25 mM; pH=6.2) na proporção 4:1, respectivamente. A incubação foi realizada, a fim de simular a cavidade nasal, sob agitação de 700 rpm em temperatura de 32,5°C durante 2 horas. Após, alíquotas de 1 mL das dispersões foram coletadas em diferentes tempos (0,5, 1, 1,5, e 2 horas) e centrifugadas sob 12 000 rpm durante 10 minutos. Alíquotas de 400µL do sobrenadante foram colocadas em contato com 600µL do reagente de Bradford ao abrigo da luz por 5 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro UV-visível no comprimento de onda de 595nm.

A eficiência de ligação com a mucina foi calculada a partir da equação 4.

$$ELM(\%) = \frac{TM - ML}{TM} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Na qual:

ELM (%) = porcentagem de eficiência de ligação com a mucina;

TM = total de mucina inicial;

ML = total de mucina livre (não ligante).

De acordo com o procedimento, fez-se necessário a construção de uma curva analítica para a quantificação da mucina na dispersão formada. Esta foi construída a partir do método de Bradford para quantificação de proteínas totais.

3.2.5.2.1 Construção da curva analítica para quantificação da mucina

Foi construída a curva analítica com a albumina sérica bovina (BSA) em tampão fosfato (25 mM; pH= 6.2). A partir da solução estoque de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ preparou-se as diluições nas concentrações 1, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Cada concentração foi preparada em triplicata. Para leitura no espectrofotômetro Uv-visível retirou-se alíquotas de 400 μL de cada concentração a ser analisada e adicionou-se 600 μL do reagente de Bradford, previamente preparado. Agitou-se a mistura com auxílio do vórtex e deixou reagir por 5 minutos ao abrigo da luz. Após, realizou-se a leitura das amostras a 595 nm. O branco foi composto por 400 μL da solução tampão sem a presença de mucina acrescida de 600 μL do reagente de Bradford.

As análises estatísticas dos dados foram obtidas pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados e expressas pela equação de primeira ordem $y=ax+b$, na qual (a) corresponde ao coeficiente angular, dado pela inclinação da reta, e (b) corresponde ao coeficiente linear, dado pelo ponto de intersecção da reta com o eixo das ordenadas. A faixa linear foi calculada utilizando o coeficiente de correlação linear (r) como o critério mínimo aceitável de $r = 0,99$ (BRASIL, 2003).

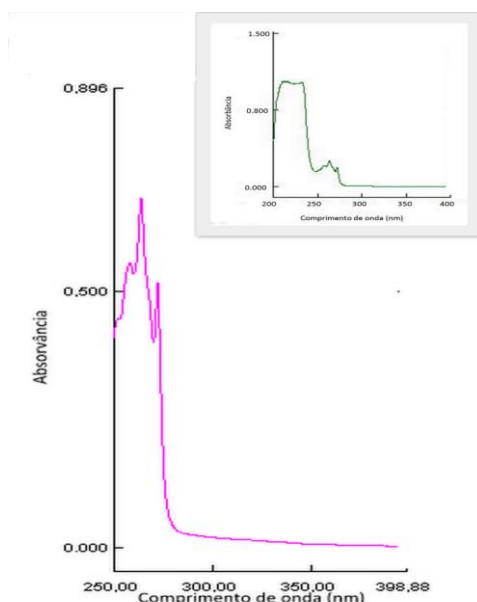
Resultados e Discussões

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação do ibuprofeno no complexo IBU-PAMAM G4 por espectroscopia UV-vísivel

A absorção máxima observada do ibuprofeno em solução aquosa na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ ocorreu no comprimento de onda de 223nm, podendo-se notar outro pico a 263 nm (Figura 5). Assim como citado por Kolhe e colaboradores (2003), verificamos que os dendrímeros apresentam baixa absorbância em comprimentos de onda superiores a 260 nm, o que justifica a escolha da banda no comprimento de onda 263nm para a realização da quantificação do ibuprofeno.

Figura 5. Espectro de absorção na região do ultravioleta do ibuprofeno.



4.1.1 Curva de Ringbom

Os resultados obtidos com a curva de Ringbom, construída para a determinação da faixa linear do método espectrofotométrico na região do ultravioleta, para o ibuprofeno são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Obtenção da curva de Ringbom do método espectrofotométrico na região do ultravioleta para análise do ibuprofeno a 263nm.

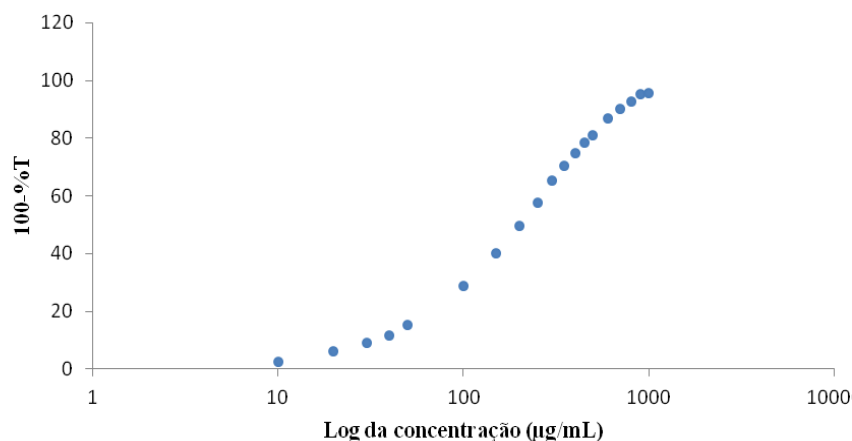
Pontos	Concentração (µg/mL)	Absorbância*	100-T%
1	10	0,010	1,989
2	20	0,027	1,973
3	30	0,042	1,958
4	40	0,054	1,946
5	50	0,073	1,927
6	100	0,147	1,853
7	150	0,223	1,777
8	200	0,296	1,704
9	250	0,374	1,625
10	300	0,461	1,539
11	350	0,529	1,471
12	400	0,597	1,403
13	450	0,665	1,334
14	500	0,723	1,277
15	600	0,882	1,118
16	700	1,004	0,995
17	800	1,131	0,868
18	900	1,310	0,689
19	1000	1,371	0,629

*Média de três determinações

A curva de Ringbom determinou a faixa linear, e de acordo com a Lei de Lambert-Beer, o intervalo de concentração de 100 a 400 µg/mL mostrou-se linear. A curva de Ringbom foi

expressa com os valores de transmitância e de concentração em escala logarítmica (%) em função da absorvância ($100-T\%$), como representada na figura 6.

Figura 6. Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV em 263 nm para solução aquosa de ibuprofeno.



4.1.2 Validação do método analítico

a) Linearidade

Os valores das absorvâncias obtidas pelas diferentes concentrações de ibuprofeno, para a construção da curva analítica, são apresentados na tabela 3.

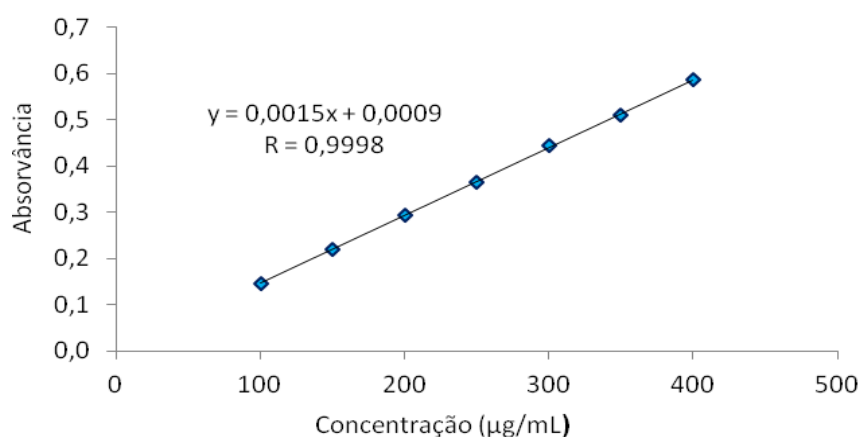
Tabela 3. Valores de absorvância determinados em 263 nm para a obtenção da curva analítica de ibuprofeno, pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta.

Concentração (µg/mL)	Absorvância média $\pm$ DP ^a	DPR ^b (%)
100	0,147 $\pm$ 0,005	3,7
150	0,220 $\pm$ 0,005	2,2
200	0,293 $\pm$ 0,003	1,2
250	0,365 $\pm$ 0,004	1,1
300	0,444 $\pm$ 0,010	2,3
350	0,509 $\pm$ 0,006	1,2
400	0,587 $\pm$ 0,007	1,2

^a DP= Desvio padrão/ ^b DPR= Desvio padrão relativo

A representação gráfica da curva analítica de ibuprofeno (Figura 7) foi construída com as médias dos valores de absorvâncias de três curvas analíticas obtidas durante a avaliação da linearidade do método. A partir da análise estatística de regressão linear dos mínimos quadrados foi possível afirmar que o método desenvolvido para quantificação do ibuprofeno apresentou-se linear no intervalo proposto, com coeficiente de correlação linear adequado ($r = 0,9998$), conforme preconizado pela resolução (BRASIL, 2003).

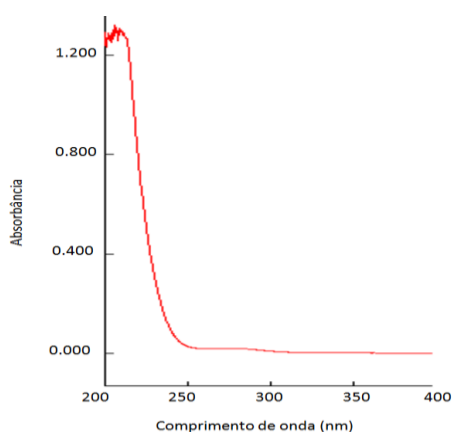
Figura 7. Curva analítica da solução aquosa de ibuprofeno, obtida a 263 nm pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta.



b) Especificidade

Na avaliação da especificidade do método observou-se conforme a figura 8, que o dendrímero PAMAM G4 não apresentou absorvância em 263nm. Assim pode-se considerar que o método é específico e seletivo para o ibuprofeno.

Figura 8. Espectro de absorção do dendrímero PAMAM G4.



c) *Precisão e Exatidão*

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade (precisão intra corrida) e da precisão intermediária (inter corrida), expressando-se o resultado com base no desvio padrão relativo (DPR%). Na precisão intra corrida as amostras foram submetidas a análises sucessivas, e os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, analista e laboratório forneceram DPR menor que 1% e exatidão entre 103 e 97% (Tabela 4). Na precisão inter corrida as amostras foram analisadas em dias diferentes e consecutivos, os dados obtidos após três dias, sob as mesmas condições experimentais forneceram DPR inferior a 1% e exatidão entre 102 e 97% (Tabela 5).

Os resultados obtidos na precisão estão de acordo com o recomendado pela literatura vigente a qual preconiza valores menores que 5% (BRASIL, 2003).

Tabela 4. Análises de precisão intra corrida para o ibuprofeno em 263nm por espectroscopia na região do ultravioleta.

Parâmetros	Precisão intra corrida		
Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	100	250	400
Concentração média obtida ($\mu\text{g/mL}$) $\pm$ DP ^a	103,25 $\pm$ 0,9	244,77 $\pm$ 0,45	391,0 $\pm$ 1,0
n ^b	3	3	3
Precisão (DPR%) ^c	0,9	0,2	0,3
Exatidão (E%)	103,3	97,91	97,75

^a DP= Desvio padrão de 3 determinações/ ^b Número de determinações/ ^c DPR= Desvio padrão relativo ([desvio padrão/média] x100)

Tabela 5. Análises de precisão inter corrida para o ibuprofeno em 263nm por espectroscopia na região do ultravioleta.

Parâmetros	Precisão inter corrida		
Concentração teórica (µg/mL)	100	250	400
Concentração obtida ^a (µg/mL) ± DP ^b	102,75 ± 1,09	245,60 ± 1,97	391,31 ± 1,39
n ^c	3	3	3
Precisão (DPR%) ^d	1,1	0,8	0,4
Exatidão (E%)	102,8	98,24	97,83

^a Média da concentração obtida a partir de 3 determinações em 3 dias diferentes e consecutivos/ ^b DP= Desvio padrão de 3 determinações/ ^c Número de determinações/ ^d DPR= Desvio padrão relativo ([desvio padrão/ média] x 100).

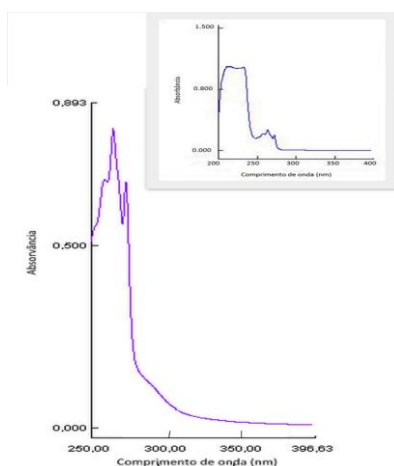
d) Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os valores calculados para LD e LQ foram 7,58 µg/mL e 22,98 µg/mL, respectivamente.

4.2 Determinação da solubilidade e razão molar ibuprofeno-dendrímero PAMAM G4

A solubilidade do ibuprofeno puro e complexado com o dendrímero PAMAM G4 foi determinada em espectrofotômetro Uv-visível em 263nm, bem como a estequiometria de reação. Na figura 9, encontra-se representado o espectro de absorção do complexo formado. Com intuito de verificar que o espectro de absorção do complexo IBU-PAMAM G4 é especificamente das moléculas ibuprofeno complexadas, a solução de análise do complexo foi diluída a fim de obter na concentração final 50µg/mL de ibuprofeno.

Figura 9. Espectro de absorção do complexo ibuprofeno-dendrímero PAMAM G4



Como pode ser observado na figura 9, o complexo formado continua apresentando alta absorção na região de absorção dos dendrímeros livres e do próprio ibuprofeno. Vale relembrar que os dendrímeros apresentam baixa ou nenhuma absorção acima de 260 nm, fato que explica a escolha do comprimento de onda para a determinação da estequiometria do complexo.

Tabela 6. Solubilidade do ibuprofeno no complexo IBU-PAMAM G4 obtido.

Amostra	Solubilidade em água ($\mu\text{g/mL}$)	Aumento da solubilidade ibuprofeno (%)	Razão Molar (mol ibuprofeno/ mol dendrímero)
Ibuprofeno	67,7	---	---
Complexo	465	687	66,6

--- Amostra não analisada

Como cada macromolécula de dendrímero PAMAM pode interagir com várias moléculas do fármaco (dependendo dos grupos superficiais disponíveis), podem-se obter complexos com estequiometria diferente de 1:1, o que resulta em maior aumento da solubilidade de substâncias hidrofóbicas (D'EMANUELLE e ATTWOOD, 2005). De acordo com os dados apresentados na tabela 6, o complexo IBU-PAMAM G4 apresentou estequiometria de 66 moléculas de ibuprofeno por molécula de dendrímero. Diante disso podemos considerar que o dendrímero PAMAM G4 aumentou a solubilidade, em água, do ibuprofeno em 6,8 vezes. Para entender este comportamento é preciso avaliar as características individuais de cada componente do complexo.

Estudos demonstram que as aminas terminais são o fator predominante na solubilização de fármacos hidrofóbicos quando se trata de dendrímeros catiônicos, como o PAMAM G4 (CHENG et al., 2008). As aminas primárias presentes na superfície dos dendrímeros PAMAM G4 possuem pK_a de aproximadamente 9,0. As aminas terciárias presente no seu interior possuem pK_a de 5,8, exceto o grupo terciário central que possui pK_a 3,5 (SHCHARBIN et al., 2005; CAKARA et al., 2003). Deste modo, os dendrímeros PAMAM G4 podem acumular cargas positivas pela protonação das aminas primárias superficiais e das aminas terciárias presente no seu interior. Logo, suas cargas são pH dependente, sendo estas positivas em pH baixo e neutras em pH alto (SHCHARBIN et al., 2005; CAKARA et al., 2003).

Milhem e colaboradores (2000), estudaram o aumento da solubilidade do ibuprofeno a partir do complexo com dendrímeros PAMAM G4 em função do pH. Os autores relataram que a interação eletrostática entre o fármaco e o dendrímero foi responsável pelo aumento da solubilidade do ibuprofeno. Os autores concluíram que em pH básico o ibuprofeno, fracamente ácido, é ionizado e interage eletrostaticamente com os grupos amina na superfície do dendrímero. Em pH 2,0 essa interação não é possível porque o fármaco, em grande parte, permanece não ionizado. Desta forma, em pH 7,0 o dendrímero PAMAM G4 apresenta em sua superfície grupamentos NH_3^+ , podendo apresentar interações eletrostáticas com o ibuprofeno, uma vez que este apresenta grupamentos ácido carboxílicos em suas moléculas (pK_a 5,1), e neste pH esses grupamentos encontram-se, em boa parte, ionizados.

Estudos com complexos ibuprofeno-dendrímero PAMAM G4 relataram que incorporaram 14 moléculas a mais de fármaco em comparação com os 64 grupamentos aminas livres, disponíveis na superfície. Os autores concluíram que essas moléculas podem estar encapsuladas no interior do dendrímero, resultante de interações fracas entre o núcleo e o fármaco (KOLHE *et al.*, 2003). Estudos anteriores relataram que as moléculas de fármacos que não interagiram com os grupos superficiais podiam ser encapsuladas no interior do dendrímero, e o número de moléculas encapsuladas podem aumentar conforme aumenta a geração de dendrímero (KOJIMA *et al.*, 2000).

Através de estudos de modelagem computacional Salas e colaboradores (2012) estudaram as energias de interação entre o dendrímero PAMAM e alguns fármacos pertencente aos grupos dos AINEs, entre eles o ibuprofeno. Avaliaram em seus estudos as propriedades estruturais (geometria, distribuição espacial, densidade, etc.) que modulam a afinidade de complexos dendrímero PAMAM – AINEs. Esses autores relataram que as interações eletrostáticas entre o grupo amino terminal da superfície do dendrímero e o grupo carboxila dos AINEs podem ser a interação principal deste tipo de complexação. Porém, há também interações no interior do dendrímero entre as cavidades hidrofóbicas do dendrímero PAMAM e o anel aromático dos AINEs.

Diante disso, no presente estudo, observa-se que o dendrímero PAMAM de quarta geração tem o potencial para aumentar, significativamente, a solubilidade de fármacos fracamente solúveis em água, tais como ibuprofeno. Evidências indicam que o aumento da solubilidade envolve principalmente interações eletrostáticas entre as aminas superficiais do dendrímero com o grupo funcional do fármaco, porém ligações hidrofóbicas e de hidrogênio

podem contribuir para esta melhora devido ao encapsulamento de moléculas no interior do dendrímero.

Kolhe e colaboradores (2003) em seus estudos incorporaram 78 moléculas de ibuprofeno por molécula de dendrímero PAMAM G4-NH₂ e 32 moléculas para o mesmo dendrímero de terceira geração. Em outro estudo Kolhe e colaboradores (2006) desenvolveram complexos fármaco-dendrímero por conjugação e conseguiram, em seus estudos, que 58 moléculas de ibuprofeno fossem conjugadas covalentemente com uma molécula de dendrímero PAMAM G4-OH. Estes resultados podem sugerir que a quantidade de moléculas de fármaco incorporadas nos complexos depende da escolha do dendrímero, número de geração, da funcionalidade dos grupamentos superficiais e da reatividade do grupo funcional do fármaco utilizado para a complexação (GUPTA *et al.*, 2006), bem como do solvente utilizado no processo, temperatura, pH e concentração de sal no meio reacional (PIETRO *et al.*, 2011).

4.3 Caracterizações físico-químicas do complexo IBU-PAMAM G4

4.3.1 Potencial Zeta e Tamanho de partícula

A Tabela 7 apresenta os valores determinados para o potencial zeta e tamanho de partícula de soluções aquosas do dendrímero PAMAM G4 livre e do complexo obtido.

Tabela 7. Valores de potencial zeta e tamanho de partícula do dendrímero PAMAM G4 na forma livre e complexada com o ibuprofeno em soluções aquosas.

Amostra em solução aquosa	Potencial Zeta (mV) $\pm$ DP*	Tamanho médio de partícula (nm) $\pm$ DP*
PAMAM G4	29,7 $\pm$ 1,19	112,6 $\pm$ 15,91
Complexo IBU-PAMAM G4	21,7 $\pm$ 1,19	193,3 $\pm$ 1,58

*DP= desvio padrão obtido a partir de três determinações.

Nos resultados que se encontram na tabela 7, observa-se que o dendrímero PAMAM G4 e o complexo IBU-PAMAM G4 apresentaram tamanho médio de partícula relativamente grande de 112,6 e 193,3 nm, respectivamente. Acredita-se que houve agregação das partículas em meio aquoso devido à presença dos grupos catiônicos na superfície do dendrímero, o que explicaria o tamanho obtido. Segundo Liu e colaboradores (2009), em pH neutro (~ 7) a estrutura do dendrímero PAMAM G4 apresenta-se com os grupos aminos superficiais

protonados, o que confere maior força de repulsão entre esses grupamentos, abrindo a estrutura da macromolécula e aumentando seu volume. Svenson e Tomalia (2005) em seus estudos relataram que há um aumento linear do diâmetro do dendrímero PAMAM e um crescimento exponencial dos grupos superficiais conforme o aumento da geração. Observaram que o diâmetro do dendrímero PAMAM aumenta a uma taxa de, aproximadamente, 1nm por geração, sendo que a quarta geração (G4) encontra-se com diâmetro de, aproximadamente, 4 nm.

Os resultados da análise de potencial zeta confirmam a carga positiva do dendrímero PAMAM G4 ($+29,7 \pm 1,19$ mV) correspondente aos grupamentos amina (NH_2) presentes em sua estrutura. Após a complexação com o ibuprofeno, a carga residual do complexo é menor do que a do dendrímero puro ($+21,7 \pm 1,19$ mV), demonstrando que a complexação com o fármaco tem influência sobre a carga final do dendrímero.

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Diante disso, realizou-se esta análise para o dendrímero livre e o complexo dispersos em tampão fosfato 25mM pH 6,2 empregado nos estudos de mucoadesão, o qual contém sais que podem alterar o potencial zeta e a formação de agregados.

Os resultados da análise do potencial zeta e tamanho médio de partícula do dendrímero PAMAM G4 e do complexo obtido, em tampão fosfato pH 6,2, estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Valores de potencial zeta e tamanho de partícula do dendrímero PAMAM G4 na forma livre e complexada com o ibuprofeno em tampão fosfato pH 6,2.

Amostra em tampão fosfato pH 6,2	Potencial Zeta (mV) $\pm$ DP*	Tamanho médio de partícula (nm)
PAMAM G4	8,29 $\pm$ 0,69	179,3 (83,8%) 5,98 (16,2%)
Complexo IBU-PAMAM G4	7,20 $\pm$ 0,73	223,2 (66,0%) 6,1 (25,1%) 89,65 (5,7%)

*DP= desvio padrão obtido a partir de três determinações.

Analisando os resultados encontrados na tabela 8, podemos observar que as amostras dispersas em tampão fosfato apresentaram tamanho de partículas variado, e uma carga residual (mV) menor em comparação aos resultados obtidos em meio aquoso.

A dissolução do dendrímero livre em tampão fosfato 25mM pH 6,2 resultou na distribuição de tamanho de partículas em duas populações, uma com 5,98 nm (16,2%) no estado não agregado e outra com 179,3 nm (83,8%) no estado agregado. No complexo IBU-PAMAM G4 as partículas passaram a ser distribuída em três populações, uma com 6,1 (25,1%) outra com 89,65 nm (5,7%) e a última com 223,2 nm (66,0%). Nota-se que as duas últimas populações estão, provavelmente, relacionadas com a forma agregada que essas nanoestruturas adquiriram.

De acordo com os resultados encontrados nas tabelas 7 e 8, podemos notar que ocorreu redução nos valores de potencial zeta do dendrímero livre de +29,7 mV para +8,29 mV quando disperso em água e em tampão fosfato, respectivamente. Além disso, a carga residual do complexo IBU-PAMAM G4 também diminuiu em tampão fosfato, apresentando potencial zeta de +7,20 mV. Observa-se que ao colocar as amostras em tampão fosfato 25mM e pH 6,2, o tamanho médio de partícula e o potencial zeta modificaram seu perfil em comparação quando estas encontram-se dispersas em meio aquoso. Nota-se também, que a técnica de espalhamento dinâmico de luz utilizada para análise do tamanho médio de partícula não permitiu identificar o tamanho nanométrico real do dendrímero PAMAM G4.

As técnicas de espalhamento dinâmico de luzes utilizadas para o estudo de macromoléculas são fortemente influenciadas pelas interações macromoleculares, que

provocam variações apreciáveis em parâmetros tais como intensidade de espalhamento de luz, pressão osmótica e coeficiente de sedimentação (PECORA, 1985). Diante disso, observamos que os tamanhos médios de partículas encontrados nessa análise sofrem influência das interações moleculares envolvidas na formação do complexo IBU-PAMAM G4, as quais provocam variações na intensidade de espalhamento de luz aumentando a polidispersividade das partículas variando seu diâmetro médio.

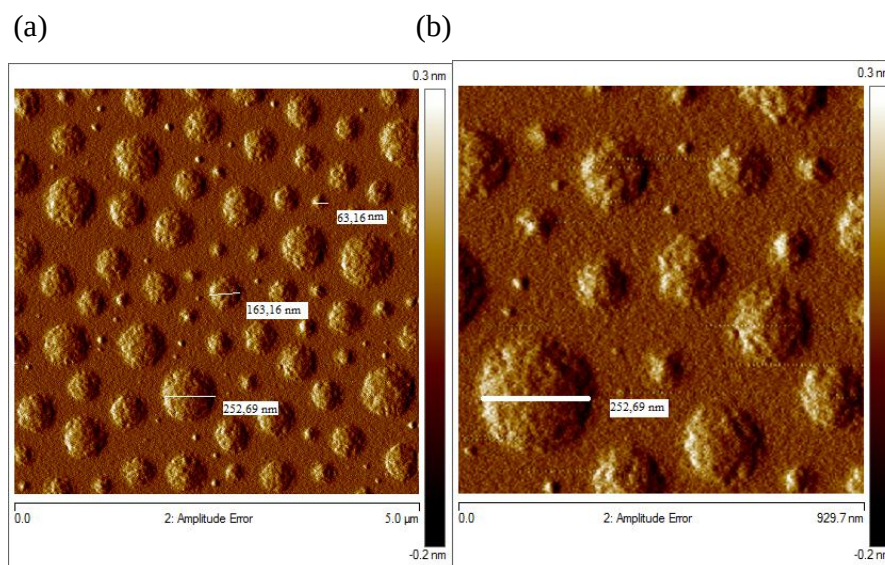
Logo, faz-se necessário a utilização de outra técnica que corroborem com os resultados obtidos e permita identificar o real tamanho nanométrico do dendrímero PAMAM G4.

4.3.2 Avaliação morfológica do complexo IBU-PAMAM G4 por Microscopia de Força Atômica (AFM)

A análise de Microscopia de Força Atômica (AFM) é uma técnica analítica que permite verificar uma série de questões fundamentais relativa às características e propriedades dos dendrímeros PAMAM, como por exemplo, dimensão, uniformidade de tamanho e forma, grau de rigidez, entre outros (LI *et al.*, 2000). Devido ser uma técnica com capacidade de fornecer informações com alta resolução, em três dimensões e em escala nanométrica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003), a AFM foi realizada a fim de verificar a morfologia das partículas obtidas.

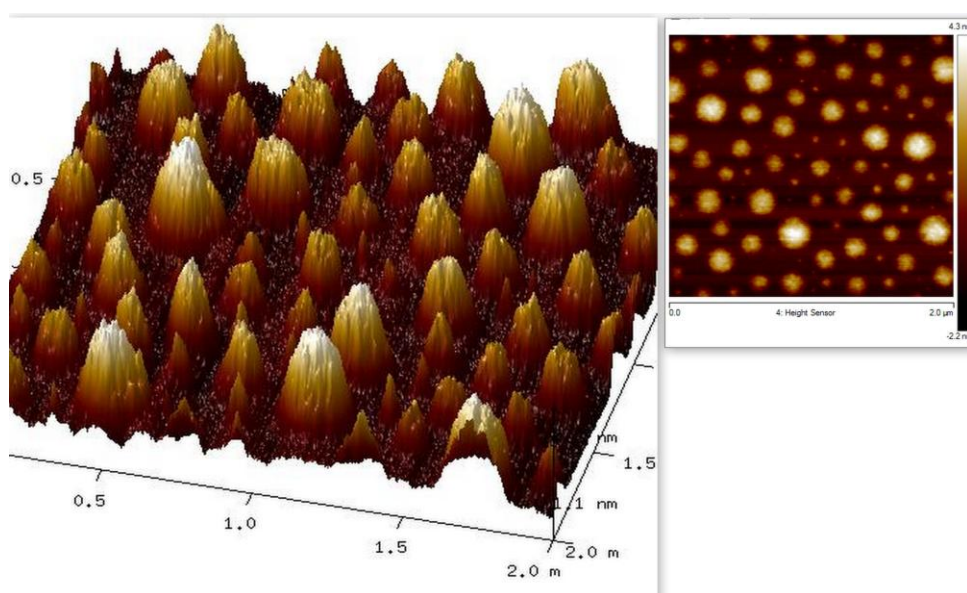
De acordo com a figura 10, foi possível analisar as características morfológicas do dendrímero PAMAM G4 livre, o qual se apresenta com superfície rugosa e partículas com formato esférico. Em relação ao tamanho das partículas observou-se uma polidispersividade com tamanhos que variam entre 60 e 300 nm, aproximadamente. Algumas partículas apresentam tamanhos superiores aos encontrados nas análises de espalhamento dinâmico de luz (item 4.3.1), o que pode estar relacionado à alta concentração de dendrímero PAMAM na solução de análise. Segundo Li e colaboradores (2000), soluções concentradas de dendrímero são depositadas aleatoriamente sob a mica em diferentes tamanhos e apresentam-se como estruturas globulares, caracterizando agregados de partículas. Enquanto que soluções menos concentrada apresentam-se com a formação de um filme de partículas uniformes e de superfície plana.

Figura 10. Imagem de amplitude de AFM do dendrímero PAMAM G4 (a) escala de 5.0 μm ; (b) escala de 1.0 μm .



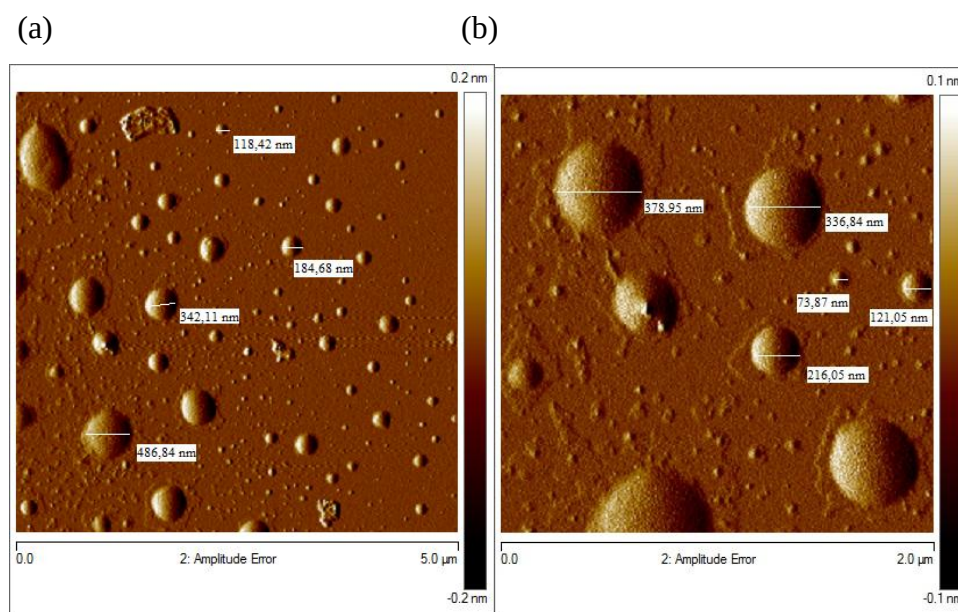
Diante disso, acredita-se que a solução de dendrímero PAMAM G4 preparada para esta análise encontra-se concentrada, porém não foi observada diferença e nem a presença de partículas de menor diâmetro quando esta solução foi diluída. Segundo Li e colaboradores (2000), para o dendrímero PAMAM G4 observa-se sempre a formação de agregados os quais aumentam o diâmetro da partícula não sendo possível verificar partículas individuais deste dendrímero, que segundo a literatura possui aproximadamente 4,5 nm. Os mesmos pesquisadores relataram que nesta técnica as partículas individuais de dendrímero são observadas apenas em dendrímeros PAMAM de gerações superiores.

Figura 11. Imagem topográfica do dendrímero PAMAM G4 na escala de 2 μm .



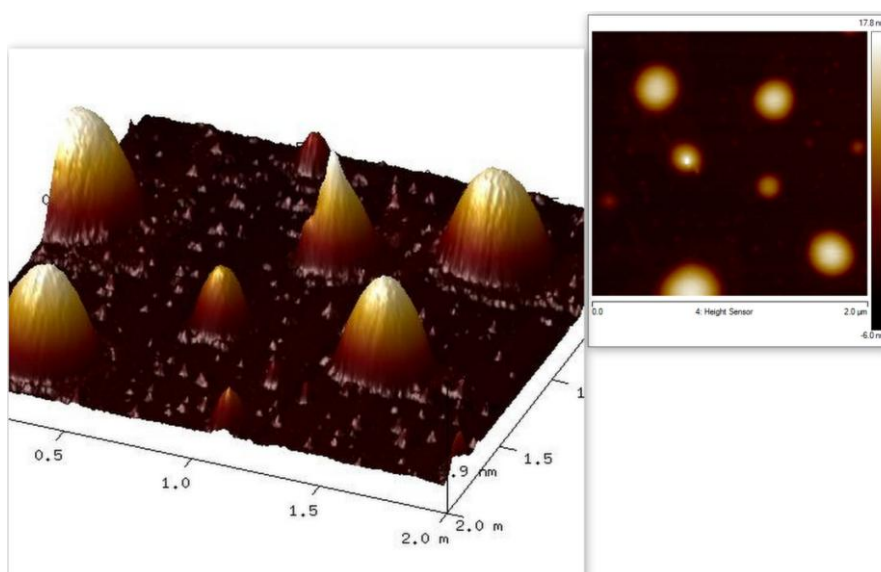
Na imagem topográfica do dendrímero PAMAM G4 livre apresentado na figura 11, foi possível observar que as partículas apresentam uma altura máxima de 4,3 nm. Ao relacionar o diâmetro obtido nesta análise (figura 10) com a altura encontrada, nota-se que o diâmetro das partículas é maior que sua altura, indicando que as moléculas de dendrímero não são totalmente esféricas quando depositadas sob a mica. Com isto, observa-se que o dendrímero PAMAM G4 apresenta partículas com diâmetros muito maiores que o descrito na literatura, isto é devido às moléculas se espalharem e achatarem sob a mica aumentando o tamanho, o que demonstra que o dendrímero em análise não apresenta uma matriz completamente rígida. Segundo Li e colaboradores (2000), a rigidez da matriz molecular dos dendrímeros PAMAM aumenta, drasticamente, com o aumento da sua geração.

Figura 12. Imagem de amplitude de AFM do complexo IBU-PAMAM G4 em meio aquoso (a) escala de 5 μm ; (b) escala de 2 μm .



A figura 12 mostra a imagem de amplitude para o complexo IBU-PAMAM G4 em meio aquoso, na qual é possível observar partículas com tamanhos próximos aos obtidos na análise de espalhamento dinâmico de luz ($\sim 184,68$ nm), porém existe uma polidispersividade entre as partículas, as quais apresentam diâmetros variados que não ultrapassam 500 nm. Ao comparar com a imagem de amplitude do dendrímero PAMAM G4 puro (figura 10) nota-se que o complexo apresenta-se com superfície menos rugosa e diâmetro médio de partículas maiores, o que possivelmente pode ser decorrente da presença do fármaco.

Figura 13. Imagem topográfica do complexo IBU-PAMAM G4 dissolvido em meio aquoso na escala de 2 μ m.



Na imagem topográfica do complexo IBU-PAMAM G4 em meio aquoso, figura 13, pode-se observar que as partículas apresentam alturas de até 17,8 nm. Nota-se novamente que as partículas apresentam diâmetro maior que a altura, o que indica que as moléculas não são totalmente esféricas quando depositadas na superfície da mica como demonstra a figura 12.

Ao analisar as imagens morfológicas obtidas na análise de AFM sugere-se que, possivelmente, o ibuprofeno interage na superfície do dendrímero PAMAM G4, uma vez que houve mudança de superfície rugosa do dendrímero puro para uma superfície lisa do complexo.

4.3.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

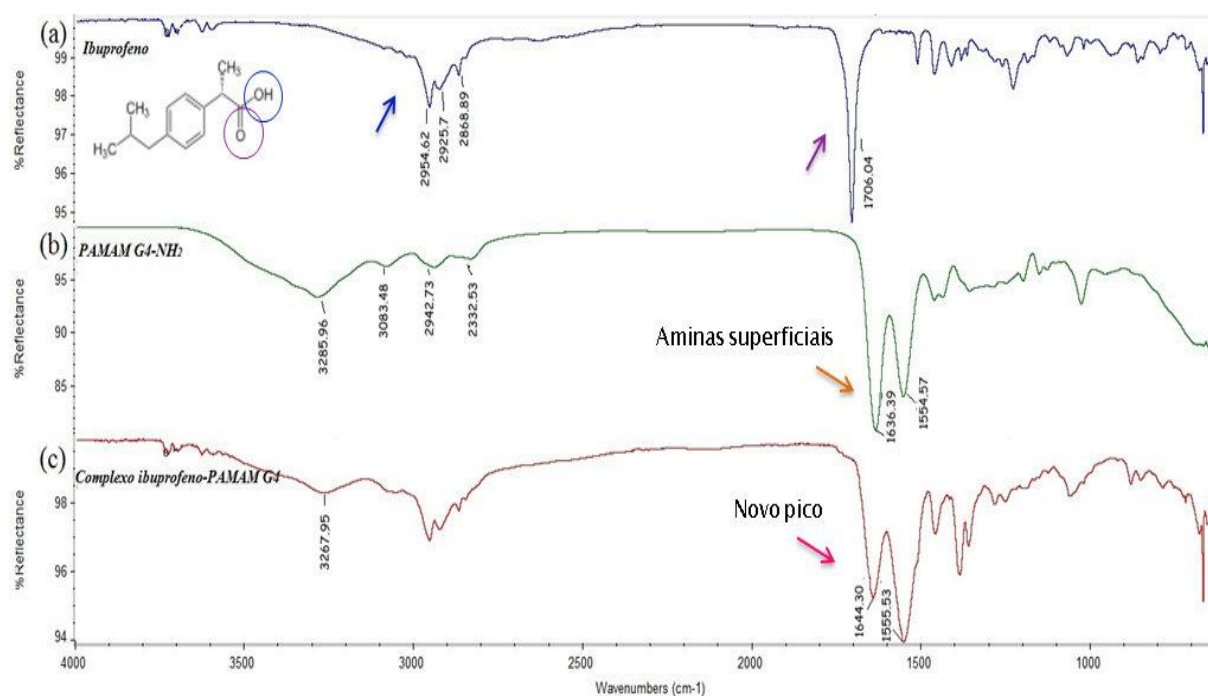
A espectroscopia na região do infravermelho é uma das técnicas mais adequadas para se estudar interações entre fármacos e polímeros (GAREA e GHEBAUR, 2012). Diante disso, após a complexação, as amostras foram analisadas por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier acoplada à técnica de Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR) em busca de mudanças nos perfis espectrais que poderiam evidenciar a formação do complexo.

Os espectros de FTIR-ATR do ibuprofeno, do dendrímero PAMAM G4 e do complexo ibuprofeno-dendrímero PAMAM G4 obtidos estão apresentados na figura 14.

O espectro de infravermelho do ibuprofeno apresenta as seguintes bandas: banda larga entre 3000 – 2800 cm^{-1} relativo ao estiramento O-H do grupamento ácido carboxílico presente

na molécula. Uma forte banda em 1706 cm^{-1} proveniente ao estiramento $\text{C}=\text{O}$, característico da carbonila. A banda na região de $1300 - 1230\text{ cm}^{-1}$ relativa ao estiramento $\text{C}-\text{O}$. Pôde se observar outras bandas na região entre $1600 - 1400\text{ cm}^{-1}$ oriunda ao estiramento $\text{C}=\text{C}$ aromático e na região $900 - 690\text{ cm}^{-1}$ relativa ao dobramento $-\text{CH}$ fora do plano (SILVERSTEIN et al., 1998).

Figura 14. Espectro de absorção FTIR-ATR do (a) ibuprofeno, (b) dendrímero PAMAM G4 e do (c) complexo IBU-PAMAM G4



No espectro de infravermelho do dendrímero PAMAM G4 (figura 14-b) observam-se as seguintes bandas principais: na região entre $3300 - 2800\text{ cm}^{-1}$ relativo ao estiramento $\text{N}-\text{H}$ e $\text{C}-\text{H}$. A banda em 1636 cm^{-1} oriunda do dobramento $\text{N}-\text{H}$ em aminos primárias a qual, segundo Kolhe e colaboradores (2003), é atribuída aos grupamentos aminos encontrados na superfície do dendrímero. Outras bandas podem ser visualizadas na região entre $1350 - 1000\text{ cm}^{-1}$ relativa ao estiramento $\text{C}-\text{N}$.

Ao analisar o espectro do complexo IBU-PAMAM G4 (Figura 14-c) nota-se que não há sobreposição do espectro do ibuprofeno com o dendrímero PAMAM G4, mas sim um novo espectro no qual é possível identificar as bandas características de cada um dos constituintes com algumas alterações. Segundo Al-Marzouqi (2009), o deslocamento de bandas, desaparecimento ou redução da intensidade e aparecimento de novas bandas na

espectroscopia na região do infravermelho pode estar relacionado ao processo de formação de complexos. Diante disso, as mudanças espectrais ocorridas na figura 14-c caracterizam a formação do complexo IBU-PAMAM G4.

As principais mudanças no espectro do complexo formado ocorrem com o aparecimento de um novo pico em 1644 cm^{-1} e o deslocamento da banda em 1706 cm^{-1} da carbonila presente na estrutura do ibuprofeno e do pico em 1636 cm^{-1} do dendrímero PAMAM G4. Outros picos são observados na região 3267 cm^{-1} relativa ao deslocamento da banda N-H oriunda do dendrímero PAMAM e na região entre $3000 - 2800\text{ cm}^{-1}$ relativa ao deslocamento da banda O-H presente na estrutura do ibuprofeno. Resultados semelhantes foram encontrados por Kolhe e colaboradores (2003), que associou o novo pico formado ao estiramento assimétrico do íon COO^- , uma vez que, íons carboxilatos exibem uma forte banda característica na região de $1650 - 1550\text{ cm}^{-1}$. Esses pesquisadores relatam ainda que a formação do íon carboxilato é resultado da interação entre os grupamentos aminos superficiais do dendrímero com o grupamento ácido carboxílico presente na estrutura do ibuprofeno. Logo, sugere-se que a formação do complexo ibuprofeno-dendrímero PAMAM no presente trabalho ocorre devido a interações eletrostáticas na superfície do dendrímero.

4.3.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

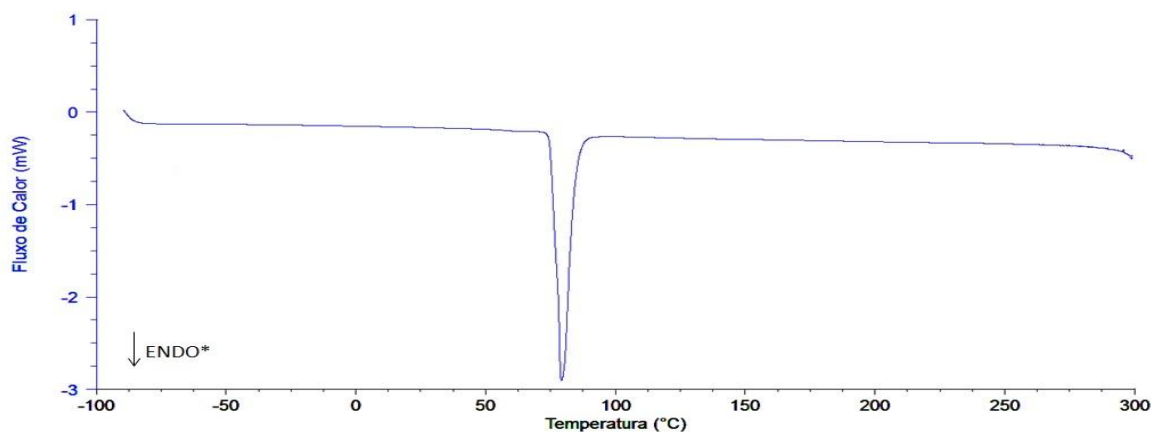
A aplicação de métodos térmicos de análise, em especial a calorimetria exploratória diferencial (DSC) tem sido de fundamental importância no estudo de caracterização de matérias primas e desenvolvimento de produtos farmacêuticos (GIRON, 2002). Na DSC mede-se a diferença de temperatura entre a amostra e o material de referência. A curva resultante é um gráfico que relaciona quantidade de calor ganhado ou perdido durante um intervalo de tempo (IONASHIRO, 2005).

Existem na literatura inúmeros trabalhos que utilizam a análise de DSC para caracterizar a formação de complexos com dendrímeros PAMAM de várias gerações. Popescu e colaboradores (2012) investigaram o comportamento térmico de híbridos nanoestruturados à base de óxido férrico e dendrímero PAMAM através da técnica DSC. Howell e colaboradores (2006) utilizaram a mesma técnica para caracterizar o conjugado platina-dendrímero PAMAM 4.5-OH.

No presente trabalho as análises de DSC foram realizadas a fim de verificar e caracterizar as possíveis interações do ibuprofeno com dendrímero PAMAM G4 que evidenciem o complexo obtido.

A figura 15 apresenta a curva DSC do ibuprofeno na qual observa-se, durante o aquecimento, um pico endotérmico agudo e bem pronunciado entre 71,48 – 92,13°C ($T_{\text{pico}} = 79,36^\circ\text{C}$; $\Delta H = 94,85 \text{ J/g}$), correspondente ao ponto de fusão do ibuprofeno (XU *et al.*, 2004).

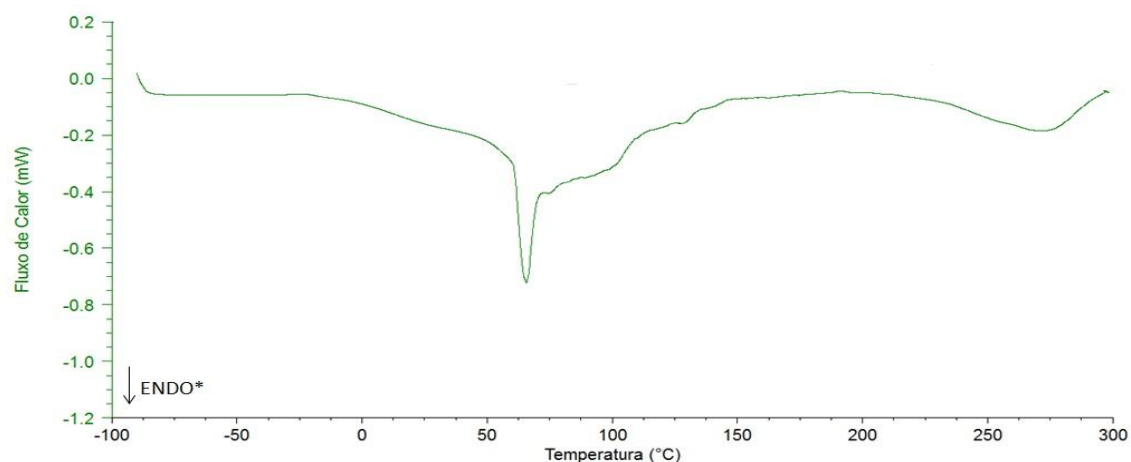
Figura 15. Curva DSC ibuprofeno em atmosfera dinâmica de nitrogênio, vazão de 50 mL.min⁻¹, razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹.



*Endotérmico: picos sentido descendente.

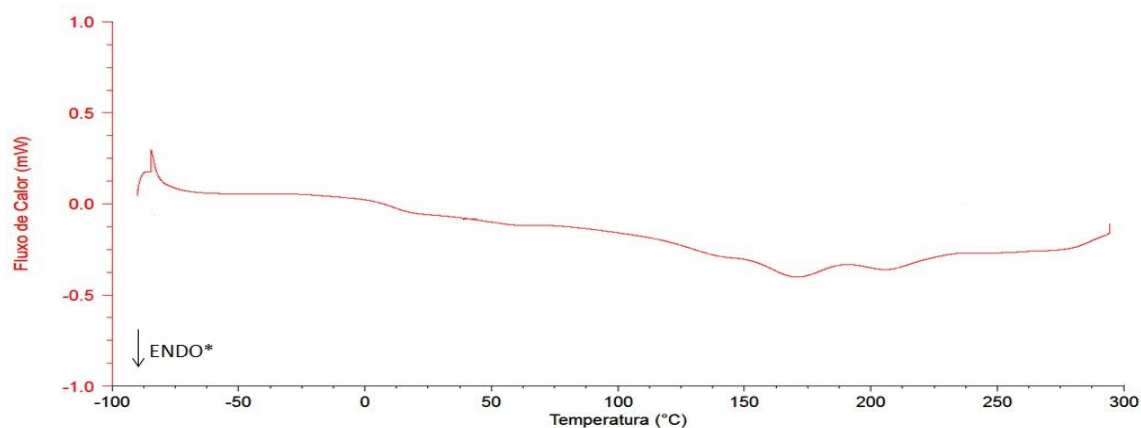
A curva DSC do dendrímero PAMAM G4 (figura 16) apresenta um largo evento endotérmico durante o aquecimento da amostra, entre -20,33 – 147,20°C ($T_{\text{pico}} = 68,22^\circ\text{C}$; $\Delta H = 303,9 \text{ J/g}$). Esse evento refere-se provavelmente à perda de solvente da amostra uma vez que o metanol, solvente presente na solução comercial do dendrímero PAMAM G4, apresenta ponto de ebulição em 64,9°C (MERCK índice, 2001), sugerindo que há presença de solvente na amostra mesmo após sua volatilização. Observa-se outro evento endotérmico durante o aquecimento da amostra, entre 204,21-294,78°C ($T_{\text{pico}} = 225,35^\circ\text{C}$; $\Delta H = 67,71 \text{ J/g}$) referente, possivelmente, a temperatura de decomposição do dendrímero PAMAM G4.

Figura 16. Curva DSC dendrímero PAMAM G4 em atmosfera dinâmica de nitrogênio á 50 mL.min⁻¹, com razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹.



*Endotérmico: picos sentido descendente.

Figura 17. Curva DSC do complexo IBU-PAMAM G4 em atmosfera dinâmica de nitrogênio, vazão de 50mL.min⁻¹, razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹.



*Endotérmico: picos sentido descendente.

A análise do complexo IBU-PAMAM G4 (figura 17), apresenta um perfil calorimétrico diferente dos perfis das figuras anteriores. Neste pode-se notar a presença de um evento, durante o aquecimento, em 10,33°C decorrente da transição vítrea (T_g) do complexo formado. Observam-se também dois eventos endotérmicos durante o aquecimento da amostra decorrentes da decomposição térmica do material, o primeiro ocorre entre 149,4-190,7°C (T_{pico} = 170,5°C; ΔH = 10,14 J/g) e o segundo ocorre entre 190,4-229,8°C (T_{pico} = 206°C; ΔH = 6,21 J/g).

Estes resultados demonstram uma modificação no perfil calorimétrico do ibuprofeno quando este é complexado com o dendrímero PAMAM G4, o que sugere interação entre o ibuprofeno e o dendrímero.

4.3.5 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica tem sido de fundamental importância no estudo de caracterização de matérias primas e desenvolvimento de produtos farmacêuticos. A TGA é uma técnica na qual a variação de massa de uma substância é medida em função da temperatura, enquanto é submetida a uma programação controlada de temperatura. De maneira geral, quando substâncias são submetidas a um aumento programado de temperatura, podem apresentar vários comportamentos, como rearranjos entre as moléculas e mudanças estruturais caracterizadas por ruptura de ligações químicas nas cadeias principais e/ou laterais. Essas modificações são evidenciadas pela diminuição na massa em função do aquecimento com liberação de produtos voláteis (IONASHIRO, 2005).

Desta forma, na tentativa de complementar os resultados obtidos na análise de DSC, realizou-se os estudos de termogravimetria para o complexo IBU-PAMAM G4, comparando-se os componentes separadamente, a fim de verificar interações entre o fármaco e o dendrímero em estudo e analisar a estabilidade térmica da amostra.

Os resultados obtidos pela análise termogravimétrica do fármaco, do dendrímero PAMAM G4, bem como do complexo obtido (Tabela 9) corroboram com as análises de DSC. As curvas TG/DTG do ibuprofeno que se encontram na figura 18 apresentaram um único evento bem definido na temperatura de 200,59°C com perda de massa de 100,5 % ($T_{\text{inicial}} = 140,34\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{final}} = 260,58\text{ }^{\circ}\text{C}$). De acordo com Xu e colaboradores (2004) este evento é decorrente da vaporização do fármaco.

Figura 18. Curva TG/DTG do ibuprofeno em atmosfera dinâmica de nitrogênio á 50mL.min⁻¹, com razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹.

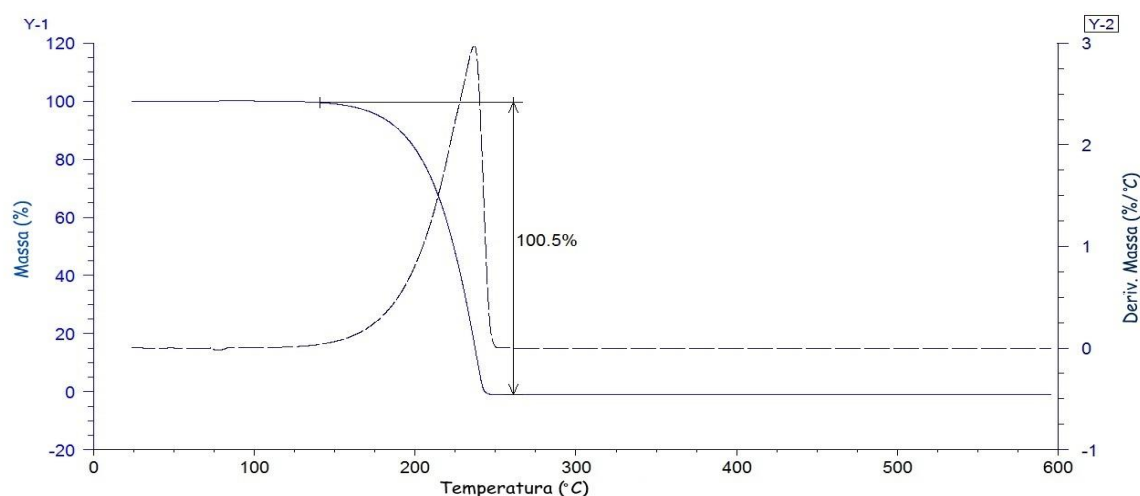
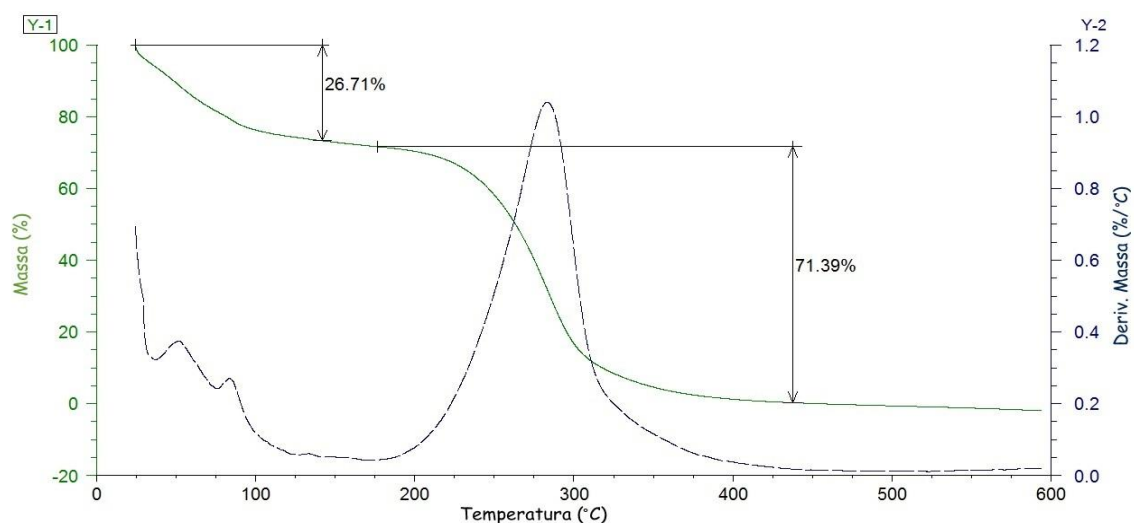


Figura 19. Curva TG/DTG dendrímero PAMAM G4 em atmosfera dinâmica de nitrogênio á 50mL.min⁻¹, com razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹.



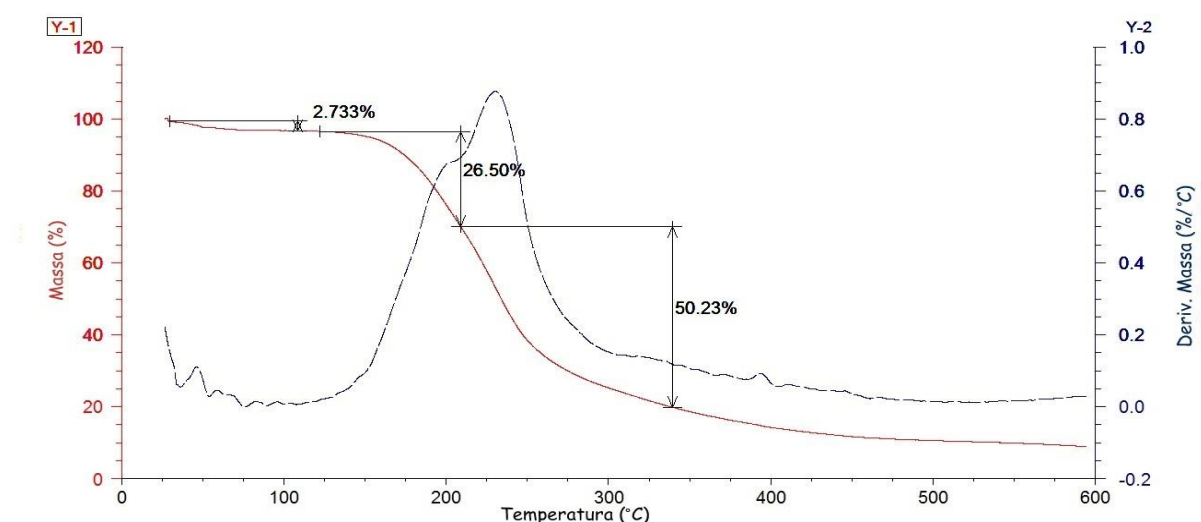
Nas curvas TG/DTG do dendrímero PAMAM G4 livre, que são apresentadas na figura 19, observa-se que a curva TG inicia-se ($T_{\text{inicial}} = 24,64^{\circ}\text{C}$) com perda de massa de 26,71%. Este evento está relacionado à evaporação do solvente residual na amostra, confirmando os dados obtidos na análise de DSC para a mesma amostra (item 4.3.4). Segundo Devarakonda e colaboradores (2004), os dendrímeros puros são armazenados em solução metanólica 10% devido serem altamente higroscópicos.

O evento termogravimétrico mais importante e característico do dendrímero PAMAM G4 livre ocorre entre 176,64 – 437,54°C ($T_{\text{onset}} = 271,62^{\circ}\text{C}$) com perda de massa de 71,39%

em uma única etapa, como pode ser observado pela DTG do mesmo (figura 19), e possivelmente este evento está relacionado com a temperatura de decomposição térmica deste dendrímero. Segundo Huang (2005), a temperatura de decomposição do dendrímero PAMAM G4-NH₃⁺ sob atmosfera de nitrogênio começa aproximadamente em 250°C.

A figura 20 ilustra a curva TG/DTG do complexo IBU-PAMAM, nota-se a presença de três etapas de perda de massa, sendo a primeira pouco significativa. A curva DTG foi de grande valia para interpretação dos resultados, devido a mesma detectar eventos pouco perceptíveis na curva TG.

Figura 20. Curva TG/DTG do complexo IBU-PAMAM G4 em atmosfera dinâmica de nitrogênio á 50mL.min⁻¹, com razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹.



Pode-se observar nas curvas TG/DTG do complexo, apresentados na figura 20, que houve uma pequena perda de massa de 2,73%, pouco perceptível pela curva TG, porém detectado na DTG, em temperaturas inferiores a 120°C. Este evento pode estar relacionado à perda de água, uma vez que, o complexo adquiriu características higroscópicas após a liofilização. Nota-se também uma segunda perda de massa de 26,50% em 172 °C que pode estar relacionada com a vaporização das moléculas de ibuprofeno, as quais encontram-se ligadas ao dendrímero e ao aquecer romperam-se e evaporaram, uma vez que, esta perda de massa encontra-se dentro da faixa de temperatura calculada para vaporização do ibuprofeno.

A terceira perda de massa na curva TG/DTG do complexo observada na figura 20, ocorre em 255,92°C e é referente a 50,23% de massa da amostra. Esta etapa pode estar relacionada com a temperatura de decomposição térmica do material analisado.

Os resultados obtidos na análise termogravimétrica de cada amostra analisada encontram-se agrupados na tabela 9, com a respectiva perda de massa e temperatura de cada evento.

Tabela 9. Resultados obtidos na análise TG do ibuprofeno, dendrímero PAMAM e do complexo referenciando os eventos e suas respectivas temperaturas (°C) e perdas de massa (%).

Amostra		T _{onset} ^a (°C)	Perda de Massa (%)	T _{inicial} ^b (°C)	T _{final} ^c (°C)
Ibuprofeno		200,59	100,5	140,34	260,58
Dendrímero puro	1°	62,65	26,71	24,64	142,04
	2°	271,62	71,39	176,64	437,54
Complexo Ibu-PAMAM	1°	37,68	2,73	27,47	117,09
	2°	172,01	26,50	121,62	207,27
	3°	255,92	50,23	208,97	338,85

^aTonset = temperatura onset extrapolada; ^bTinicial = temperatura inicial; ^cTfinal = temperatura final

A análise dos dados apresentados na tabela 9 permite estabelecer que o dendrímero PAMAM livre apresenta boa estabilidade térmica e quando este é complexado com o fármaco ibuprofeno a estabilidade térmica diminui. Desta forma, acredita-se que as alterações relevantes (1° e 2° etapa da perda de massa) na curva termogravimétrica do complexo são indicio de interação química entre os componentes, estando de acordo com as análises de caracterização apresentadas anteriormente.

4.4 Avaliação da mucoadesão do complexo IBU-PAMAM G4

As metodologias empregadas para analisar a mucoadesão encontram-se em constante crescimento, embora o emprego dos mais diferentes métodos cause, as vezes, incoerência entre os resultados, os quais ficam difíceis de comparar devido às diferenças entre os parâmetros em análise e as condições experimentais (SIGURDSSO; LOFTSSON e LEHR, 2006). Há várias metodologias propostas para análise de mucoadesão, as quais podem ser divididas entre testes *in vivo*, *in vitro* e/ou *ex vivo*. Entre os testes *in vitro*, destacam-se as

técnicas que analisam interações moleculares envolvidas na mucoadesão, as quais são objetos de pesquisa neste trabalho.

De acordo com Khanvilkar e colaboradores (2001), a mucina é um composto pertencente a um grupo das glicoproteínas que são os principais constituintes do muco, o qual ainda apresenta lipídios, eletrólitos e água, o que justifica o uso de solução de mucina para a realização dos testes de mucoadesão *in vitro*.

4.4.1 Interação entre as partículas do complexo IBU-PAMAM G4 e a mucina

No intuito de avaliar a interação entre do complexo IBU-PAMAM G4 na presença de mucina, foram realizadas medidas de potencial zeta após o contato entre as dispersões em condições fisiológicas nasais simuladas (tampão fosfato de potássio 25mM pH 6,2). O objetivo da análise foi avaliar as possíveis modificações na carga residual do complexo em função da concentração de mucina no meio.

Tabela 10. Resultados de potencial zeta obtidos na análise de mucoadesão *in vitro*.

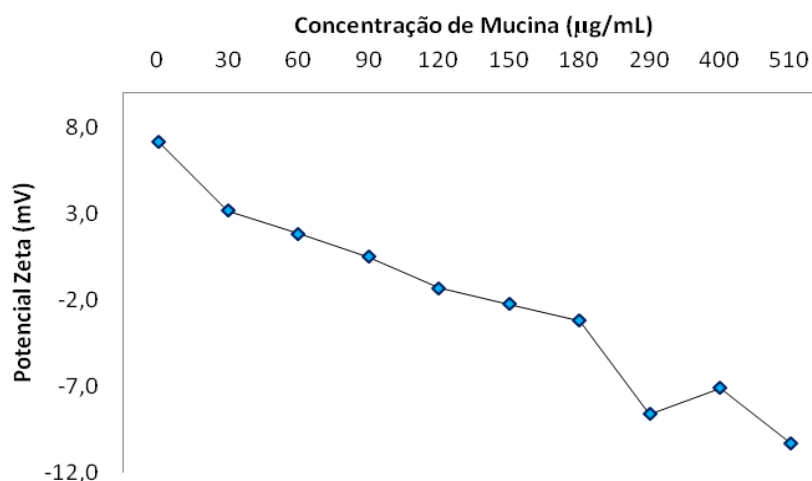
Amostra	Concentração de mucina (µg/mL)	Potencial Zeta (mV) ± DP ^a
Complexo IBU-PAMAM G4	---	7,20 ± 0,09
Mucina livre	---	-6,93±1,01
Mistura ^b 1	30	3,20 ± 0,44
Mistura 2	60	1,80 ± 0,20
Mistura 3	90	0,50 ± 0,03
Mistura 4	120	- 1,30 ± 0,28
Mistura 5	150	- 2,30 ± 0,30
Mistura 6	180	- 3,20 ± 0,28
Mistura 7	300	- 8,60 ± 0,45
Mistura 8	400	- 7,10 ± 0,24
Mistura 9	500	- 10,30 ± 0,54

^a Desvio padrão obtido a partir de três resultados; ^b Mistura= complexo mais mucina; --- amostra não analisada.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 10, observa-se que a mucina livre apresenta carga residual negativa (-6,93±1,01 mV), diferente do complexo IBU-PAMAM G4

que apresenta carga residual positiva ($7,20 \pm 0,09$ mV). Esta carga negativa residual da mucina é atribuída ao ácido siálico que possui pKa 2,6 (YONCHEVA; LIZARRAGA e IRACHE, 2005) presente em sua estrutura, o qual favorece a interação com as cargas positivas presente no complexo. Pelos dados apresentados, observa-se que ao adicionar concentrações crescentes de mucina (até 90 $\mu\text{g/mL}$) as cargas do complexo IBU-PAMAM G4 começam a se neutralizar à medida que aumenta a concentração de mucina (acima de 120 $\mu\text{g/mL}$) a carga residual do complexo deixa de ser positiva e torna-se negativa, o que indica interação entre os componentes da mistura. Esta mudança de potencial zeta encontra-se ilustrada na figura 21.

Figura 21. Representação gráfica obtida do potencial zeta do complexo em função da concentração de mucina.



A atividade mucoadesiva de diversas substâncias é proveniente, geralmente, da formação de ligações moleculares não covalentes, como ponte de hidrogênio, ligação de Van der Waals e interações eletrostáticas, com a superfície da mucosa (SMART, 2005). A mudança do potencial zeta observada na figura 21 pode ser atribuída, possivelmente, a interações eletrostáticas entre o complexo e a mucina. Em um estudo similar, Takeuchi e colaboradores (2005) relataram que a interação entre a quitosana (polímero catiônico) com a mucina em pH 4,5 era devido a interações eletrostática, pois conforme aumentava a concentração do polímero catiônico ocorria um aumento gradativo na carga residual negativa da mucina. O mesmo ocorreu nos estudos de Mazzarino e colaboradores (2009), o qual complementou relatando que a interação com a mucina ocorria devido a protonação dos

grupamentos amino do polímero com as cargas negativas superficiais do grupamentos carboxilato (COO^-) e sulfanóico (SO_3^-) presentes na cadeia da glicoproteína.

Na literatura há inúmeros estudos para avaliação da atividade mucoadesiva com polímeros tais como, quitosana, carbômeros, entre outros. Em contrapartida, encontra-se poucos estudos para avaliação mucoadesiva *in vitro* com dendrímeros PAMAM. Vandamme e Brobeck (2005) avaliaram dendrímeros do tipo PAMAM de várias gerações como veículos oftálmicos para a liberação ocular do nitrato de pilocarpina e em seus estudos, a interação das formulações contendo o dendrímero com a mucina foi avaliada a partir da viscosidade. Recentemente Yandrapu e colaboradores (2013) desenvolveram um sistema mucoadesivo com dendrímeros PAMAM covalentemente ligados a grupamentos tiólicos em sua superfície para liberação controlada de fármacos a partir de uma formulação modelo de aciclovir. Esses autores relatam ainda que o sistema desenvolvido apresenta alta atividade mucoadesiva devido a interação com a mucina por ligações covalentes.

Acredita-se que sistemas que utilizam dendrímero do tipo PAMAM como promotores de propriedades mucoadesivas representam uma plataforma inovadora e em expansão para estudos de liberação de fármacos.

4.4.2 Construção da curva analítica para quantificação da mucina

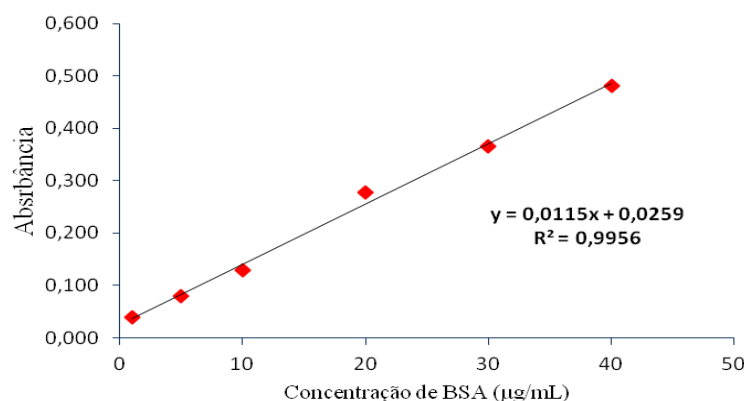
Ao longo dos anos têm sido propostos muitos métodos espectrofotométricos para a determinação de proteínas totais, porém não existe uma metodologia considerada de uso universal. O método de Bradford é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue”. Este método é baseado na interação entre o corante e as macromoléculas de proteínas de alto peso molecular, a qual resulta em um deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595nm (COMPTON e JONES, 1985).

Portanto, fez-se o teste de eficiência de ligação com a mucina com o princípio de verificar a interação entre o complexo IBU-PAMAM G4 e o muco. Para isto, utilizou-se o método de Bradford para quantificar a mucina não ligante ao complexo após o contato entre ambos, a partir de uma curva analítica com o padrão de proteína.

A representação gráfica da curva analítica de BSA, encontrada na figura 22, foi construída a partir das médias dos valores de absorbâncias. Com a análise estatística de

regressão linear dos mínimos quadrados observa-se que a curva analítica apresentou linearidade no intervalo proposto, com coeficiente de correlação linear adequado ($r = 0,9956$).

Figura 22. Curva analítica da solução de BSA em tampão fosfato (25mM; $p = 6,2$), a 595 nm pelo método espectrofotométrico de quantificação de proteínas totais – Bradford.



4.4.3 Eficiência de ligação com a mucina

Os resultados encontrados referentes à eficiência de ligação estão apresentados na tabela 12. Após 2 horas de contato entre as substâncias, o complexo apresentou eficiência de ligação de 88,7 % com a solução de mucina.

Tabela 11. Resultados obtidos para a eficiência de ligação entre o complexo IBU-PAMAM e a mucina pelo método de Bradford.

Tempo (minutos)	Mucina livre ^a (µg/mL) ± DP ^b	Mucina Total ^c (µg/mL)	ELM ^d (%)
30	24,53 ± 0,31	200	87,7
60	26,44 ± 0,33	200	86,8
90	27,83 ± 0,35	200	86,1
120	22,44 ± 0,28	200	88,7

^aMédia das concentrações mucina não ligante; ^bDesvio Padrão calculado a partir de 3 determinações; ^cMucina total inicial; ^dPorcentagem de eficiência de ligação com a mucina.

Conforme apresentado na tabela 12, após 30 minutos de contato com a mucina o complexo IBU-PAMAM G4 obtêm eficiência relativamente alta de 87,7%. Nos demais tempos essa eficiência não varia mais que 2%. De acordo com a análise estatística (teste t de Student, $p < 0,05$) os resultados não apresentaram diferença significativa ao decorrer do tempo. Então, observa-se que as partículas possuem alta eficiência de ligação em todos os tempos analisados. Portanto, sugere-se que as moléculas do complexo possui interação com as partículas de mucina logo nos primeiros 30 minutos, e essa interação permanece durante, no mínimo, 2 horas.

Polímeros catiônicos possuem boas propriedades mucoadesivas, pois apresentam capacidade de desenvolver ligações moleculares por interações eletrostáticas com o muco. Isto ocorre devido a carga negativa atribuída ao ácido siálico (pK_a 2,6) presente na molécula da mucina, a qual dissocia-se em pH neutro conseguindo assim interagir com as cargas positivas desses polímeros (YONCHEVA; LIZARRAGA e IRACHE, 2005). O dendrímero PAMAM G4 utilizado no presente estudo apresenta grupamentos catiônicos, os quais em pH 6,5 possuem algumas moléculas protonadas devido ao grupamentos aminas superficiais que, possivelmente, interagem eletrostaticamente com o ácido siálico do muco. Ao realizar a complexação com o fármaco, o complexo obtido continua a apresentar cargas positivas (item 4.3.1) suficientes para obter-se alta eficiência de ligação.

A alta eficiência de ligação em função do tempo demonstra que o complexo IBU-PAMAM G4 apresenta boas propriedades mucoadesivas, o que pode prolongar o tempo de contato com a mucosa nasal e, conseqüentemente, influenciar na penetração das moléculas encapsuladas. O contato íntimo e a aderência com a mucosa permite que a formulação permaneça por mais tempo no local administrado o que facilita a liberação do fármaco e melhora sua biodisponibilidade, proporcionando diminuição na concentração do fármaco nas doses administradas, além de diminuir a frequência de administração (WOODLEY, 2001).

Conclui-se que a atividade mucoadesiva do complexo IBU-PAMAM G4 ocorre, principalmente, pela interação eletrostática entre as cadeias da camada da mucosa com as cadeias do complexo, o que pode promover a aderência destas partículas na mucosa. Acredita-se que o dendrímero PAMAM G4, um carreador nanoestruturado, permite a liberação do fármaco ibuprofeno a partir do complexo aderido, fazendo com que maior quantidade de fármaco seja, posteriormente, absorvido diretamente pela cavidade nasal.

A via nasal foi proposta como uma rota alternativa para administração do fármaco ibuprofeno, pois favorece a absorção direta para o SNC, porém, ela possui mecanismos de depuração mucociliar, os quais podem eliminar rapidamente o ibuprofeno da cavidade nasal.

Segundo Illum (2003), é possível aumentar a absorção nasal de fármacos através do uso de sistemas mucoadesivos, pois eles permitem uma adesão das partículas à superfície do epitélio nasal aumentando o tempo de permanência, para que o fármaco seja absorvido através da rica vascularização presente nesta mucosa.

Logo, observa-se que complexos com dendrímeros do tipo PAMAM G4 são sistemas promissores com potencial atividade mucoadesiva, permitindo promover o contato prolongado entre a formulação e os sítios de absorção da cavidade nasal, retardando a depuração mucociliar.

Considerações

Finais

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível obter as seguintes conclusões:

- ✓ A metodologia analítica por espectrofotometria na região ultravioleta desenvolvida mostrou-se adequada para a quantificação do ibuprofeno em solução aquosa;
- ✓ A análise de solubilidade em meio aquoso mostrou que o dendrímero PAMAM G4 aumentou em 6,6 vezes a solubilidade do ibuprofeno em água. A estequiometria do complexo obtido foi de 66 moléculas de fármaco para cada molécula do dendrímero. As principais interações formadas entre o dendrímero e o ibuprofeno parecem ser eletrostáticas;
- ✓ A complexação do ibuprofeno com o dendrímero alterou o potencial zeta do dendrímero PAMAM G4, e o complexo IBU-PAMAM G4 apresentou tamanho de 193,3 nm em meio aquoso;
- ✓ A análise de Microscopia de Força Atômica permitiu analisar a morfologia das partículas do complexo IBU-PAMAM G4 bem como do dendrímero puro. As micrografias indicam a presença de agregados;
- ✓ As alterações no perfil dos espectros na análise de Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier sugerem interações eletrostáticas entre as moléculas de ibuprofeno e os dendrímeros PAMAM G4, evidenciando a formação do complexo.
- ✓ A mudança no perfil calorimétrico do ibuprofeno quando este é complexado com dendrímero PAMAM observada na análise de Calorimetria exploratória diferencial e as alterações relevantes nas análises Termogravimétricas do complexo IBU-PAMAM G4 evidenciam interações entre os componentes do complexo.
- ✓ Nos estudos *in vitro* de mucoadesão do complexo IBU-PAMAM G4 pode-se observar que o complexo apresentou atividade mucoadesiva, por apresentar interações moleculares com a mucina, o que pode prolongar o tempo de contato do complexo com a mucosa.

Conclui-se que complexos obtidos com dendrímeros PAMAM G4 são sistemas promissores para potencial administração nasal do ibuprofeno e a utilização desses dendrímeros como promotores de propriedades mucoadesivas representam uma plataforma inovadora e em expansão para estudos de liberação de fármacos.

Referências

Bibliográficas

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNIESZKA, Z. *et al.* Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 62, p. 1020-1037, 2012.
- ALLEN, M. A.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 36-48, 2013.
- ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science**, v. 303, p. 1818-1822, 2004.
- AL-MARZOUQI, A. H. *et al.* Physicochemical properties of antifungal drug-cyclodextrin complexes prepared by supercritical carbon dioxide and by conventional techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 49, p. 227-233, 2009.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed. 2005.
- BEJARANO, P. F. Ibuprofeno y analgesia. **EMB**, v. 5, p.39-42, 2006.
- BOAS, U.; HEEGAARD, P. M. Dendrimers in Drug Research. **Chemical Society Reviews**, v.33, p. 43-63, 2004.
- BRASIL. Resolução RE nº 899, “**Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**”. 2003.
- CAKARA, D.; KLEIMANN, J.; BORKOVEC, M. Microscopic protonation equilibria of poly(amidoamine) dendrimers from macroscopic titrations. **Macromolecules**, v. 36, p. 4201-4207, 2003.
- CARVALHO, F. C. *et al.* Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, p.1-8, 2012.
- CASPER, D. *et al.* Ibuprofen protects dopaminergic neurons against glutamate toxicity in vitro. **Neuroscience Letters**, v. 289, n. 11, p. 201-204, 2000.

- CHAUHAN, A. S. *et al.* Dendrimer-mediated transdermal delivery: enhanced bioavailability of indomethacin. **Journal Control Release**, v. 90, n. 3, p. 335-343, 2003.
- CHENG, Y. *et al.* External electrostatic interaction versus internal encapsulation between cationic dendrimers and negatively charged drugs: Which contributes more to solubility enhancement of the drugs?. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 30, p. 8884-8890, 2008.
- CHENG, Y. Pharmaceutical applications of dendrimers: promising nanocarriers for drug delivery. **Bioscience**, v. 13, p. 1447-1471, 2008
- CLEARY, J. BROMBERG, L.; MAGNER, E. Adhesion of Polyether-Modified Poly(acrylic acid) to Mucin. **Langmuir**, v. 20, p. 9755-9762, 2004.
- COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical Biochemistry**, v. 152, p. 369–374, 1985.
- COSTA, D. *et al.* Antioxidant activity and inhibition of human neutrophil oxidative burst mediated by arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 8, p. 1659-1670. 2006.
- D'EMANUELLE, A. *et al.* The use of a dendrimer-propranolol prodrug to bypass efflux transporters and enhance oral bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v. 95, p. 447-453, 2004.
- D'EMANUELLE, A.; ATTWOOD, D. Dendrimer-drug interactions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 2147-2162, 2005.
- DAM, D. V. *et al.* Ibuprofen modifies cognitive disease progression in an Alzheimer's mouse model. **Journal of Psychopharmacology**, v. 24, n. 3, p. 383-388, 2010.
- DHURIA, S. V.; HANSON, L. R.; FREY, W. H. Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 4, 2010.

DONG, Z. *et al.* Effects of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers on the nasal absorption of poorly absorbable drugs in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 393, p. 244-252, 2010.

DUCHÊNE, D.; PONCHEL, G. Bioadhesion: A new pharmacotechnical method for improving therapeutic efficiency. **S.T.P Pharma Sciences**, v. 5, p. 830-838, 1989.

DYKES, G. M. Dendrimers: a review of their appeal applications. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 76, p. 903-918, 2001.

ESFAND, R.; TOMALIA, D. A. Poly(amidoamine) PAMAM dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. **Research Focus Reviews**, v.6, n. 8, p. 427-436, 2001.

FORMARIZ, T. P. *et al.* Microemulsões e fases líquidos cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 14, p. 301-313, 2005.

GAREA, S. A.; GHEBAUR, A. FT-IR Spectroscopy and thermogravimetric characterization of prodrugs based on different dendritic polymers and antitumoral Drug. **Revista de Materiale e Plastice**. v. 49, n. 1, p. 1 – 4, 2012.

GAVINI, E. *et al.* Spray-dried microspheres based on methylpyrrolidinone chitosan as new carrier for nasal administration of metoclopramide. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.68, p. 245-252, 2008.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 68, p. 335-357, 2002.

GRAFF, C. L.; POLLACK, G. M. P-glycoprotein attenuates brain uptake of substrates after nasal instillation. **Pharmaceutical Research**, v 20, p. 1225- 1230, 2003.

GUPTA, U. *et al.* Dendrimers: Novel polymeric nanoarchitectures for solubility enhancement. **Macromolecules**, v. 7, n. 3, p. 649-658, 2006.

HANSON, L. R.; FREY, H. W. Strategies for intranasal delivery of therapeutics for the prevention and treatment of neuroAIDS. **Journal of NeuroImmune Pharmacology**, v. 2, p. 81-86, 2007.

HARI, B. N. V. *et al.* Dendrimer: Globular nanostructured materials for drug delivery. **International Journal of PharmTech Research**. v. 4, p. 432-451, 2012.

HAWKER, C. J.; FREKCHET, J. M. J. Preparation of Polymers with Controlled Molecular Architecture. A New Convergent Approach to Dendritic Macromolecules. **Journals American Chemical Society**, v. 112, p. 7638-7647, 1990.

HAWKER, C. J.; WOOLEY, K. L.; FRECHET, J. M. J. Unimolecular micelles an globular amphiphiles: dendritic macromolecules as novel recyclable solubilization agents. **Journal of the Chemical Society**, v.1, p. 1287-1297, 1993.

HOWELL, B. A.; FAN, D.; RAKESH, L. Thermal decomposition of a generation 4.5 PAMAM dendrimer platinum drug conjugate. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 85, p. 17-20, 2006.

HUANG, J. F. *et al.* Hydrophobic Brønsted Acid-Base ionic liquids based on PAMAM dendrimers with high proton conductivity and blue photoluminescence. **Journal of the American Chemical Society**. v. 127, p. 12784-12785, 2005.

HUSSAIN, A. A. Intranasal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 29, p. 39-49, 1998.

ICH. **International Conference on Harmonization** – ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), Geneva, 2005.

ILLUM, E. Nasal drug delivery – possibilities, problems and solutions. **Journal of Controlled Release**., v. 87, p. 187-198, 2003.

In t' VELD, B. A., *et al.* Nansteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. **New England Journal of Medicine**, n. 345, p. 1515-1521, 2001.

IONASHIRO, M. **Fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial**. São Paulo: GIZ, 2005. p. 80.

JUN, H.W. The roles of drug delivery systems in pharmacotherapeutics. **Pharmaceutical Technology**, p. 42, 1995.

KEELY, S. *et al.* *In vitro* and *ex vivo* intestinal tissue models to measure mucoadhesion of poly (methacrylate) and Ntrimethylated chitosan polymers. **Pharmaceutical Research.**, v. 22, 2005.

KHANVILKAR, K.; DONAVAN, M. D.; FLANAGAN, D. R. Drug transfer through mucus. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 173-193, 2001

KOJIMA, C. *et al.* Synthesis of polyamidoamine dendrimers having poly(ethylene) glycol grafts and their ability to encapsulate anticancer drugs. **Bioconjugate Chemistry**, v. 11, p. 910-917, 2000.

KOLHE, P. *et al.* Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers. **International journal of pharmaceutics**. v. 259, p. 143-160, 2003.

KOLHE, P. *et al.* Preparation, cellular transport, and activity of polyamidoamine-based dendritic nanodevices with a high drug payload. **Biomaterials**, v. 27, p. 660-669, 2006.

KUSHAL, M. *et al.* Oral controlled release drug delivery system: An overview. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 4, p. 70-76, 2013.

LI, B. *et al.* Enteric-coated layered double hydroxides as a controlled release drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 287, p. 89-95, 2004.

LI, J. *et al.* Visualization and characterization of poly(amidoamine) dendrimers by Atomic force microscopy. **Langmuir**, v 16, p. 5613-5616, 2000.

LIM, G. P., *et al.* Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in mouse model for Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 5709-5714, 2000.

LIU, Y. *et al.* PAMAM Dendrimers undergo pH responsive conformational changes without swelling. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 8, p. 2798-2799, 2009.

LOPES, C. M; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 143-154, 2005.

-
- MALIK, N. et al. Dendrimer-Plantinate: a Novel Approach to Cancer Chemotherapy. **Anticancer Drugs**. v.10, p. 767-776, 1999.
- MANNILA, A., *et al.* Inefficient central nervous system delivery limits the use of ibuprofen in neurodegenerative diseases. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 24, p. 101-105, 2005.
- MATHIOWITZ, E.; CHICKERING, D. E.; LEHR, C. M. Bioadhesive drug delivery systems: fundamentals, novel approaches, and development. **Drug and the Pharmaceutical Sciences**, v. 98, 1999. 670p.
- MAZZARINO, L. *et al.* Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 370, p. 58-66, 2012.
- MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 165-196, 2001.
- MERCK index. 13 ed, Whitehouse Station, Merck Research Laboratories, Division of Merck & Co., 2001, 1741p.
- MILHEM, O. M. *et al.* Polyamidoamine Starburst® dendrimers as solubility enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 197, p. 239-241, 2000.
- MINGLU, M. *et al.* Evaluation of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers as drug carriers of anti-bacterial drugs using sulfamethoxazole (SMZ) as a model drug. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 93-98, 2006.
- NA, M. *et al.* Dendrimers as potential drug carriers. Part II. Prolonged delivery of ketoprofen by in vitro and in vivo studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 670-674, 2006.
- NEWA, M. *et al.* Enhancement of Solubility, Dissolution and Bioavailability of Ibuprofen in Solid Dispersion Systems. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 4, p. 569-574. 2008.
- NIELSEN, L. S.; SCHUBERT, L.; HANSEN, J. Bioadhesive drug delivery systems: Characterization of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl mono-oleate and
-

glyceryl monolinoleate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.6, p. 231-239, 1998.

PALAYOOR, S. T. *et al.* Combined antitumor effect of radiation and ibuprofen in human prostate carcinoma cells. **Clinical Cancer Research**, v. 4, n. 3, p. 763-771. 1998.

PECORA, R. **Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy**. New York: Springer, 1985.

PIERRE, M. B.; ROSSETTI, F. C. Microneedle-Based drug delivery systems for transdermal route. **Current Drug Targets**, 2013.

POPESCU, L. M. *et al.* Investigation of thermal behaviour of hybrid nanostructures based on Fe₂O₃ and PAMAM dendrimers. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 110, p. 357-362, 2012.

PRIETO, M. J. *et al.* Optimization and *in vitro* toxicity evaluation of G4 PAMAM dendrimer-risperidone complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 845-850, 2011.

RODRÍGUEZ, J. C. G.; TESTE, I. S. The nasal route as a potential pathway for delivery of erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke in humans. **Journal The Scientific World**, v. 9, p. 970-981, 2009.

SALAS, F. A. *et al.* Study of interaction energies between PAMAM dendrimer and non-steroidal anti-inflammatory drug using a distributed computational strategy and experimental analysis by ESI-MS/MS. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 7, p. 2031-2039.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n.5, p. 726-737, 2003.

SHADAB, Md. *et al.* Bromocriptine loaded chitosan nanoparticles intended for direct nose to brain delivery: Pharmacodynamic, Pharmacokinetic and Scintigraphy study in mice model. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 393-405, 2013.

-
- SHCHARBIN D., KLAJNERT B.; BRYSEWSKA M. The effect of PAMAM dendrimers on human and bovine serum albumin at different pH and NaCl concentrations. **Journal of Biomaterials Science polymer Ed**, p. 1081-1093, 2005.
- SIGURDSSON, H. H.; LOFTSSON, T.; LEHR, C. M. Assessment of mucoadhesion by a resonant mirror biosensor. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, p. 75-81, 2006.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. **Identificação espectroscópica de compostos orgânicos**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1998.
- SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1556-1568, 2005.
- SVENSON, S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v, 71, p. 445-462, 2009.
- SVENSON, S.; TOMALIA, D. A. Dendrimers in biomedical applications – reflections on the field. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 2106-2129, 2005.
- TAKEUCHI, H. *et al.* Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1583– 1594, 2005.
- TIWARI, G. *et al.* Drug delivery systems: An updated review. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 2, p. 2-11, 2012.
- TIWARI, G.; TIWARI R.; RAI, A. K. Cyclodextrins in delivery systems: Applications. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v.2, p. 72-79, 2010.
- TOMALIA, D. A., *et al.* A new class of polymers: starburst dendritic macromolecules. **Polymer Journal**, v. 17, p. 117-132, 1985.
- TOMALIA, D. A., *et al.* Dendritic macromolecules: synthesis of starburst dendrimers. **Macromolecules**, v.19, p. 2466-2468, 1986.
- VANDAMME, T.F; BROBECK, L. Poly(amidoamine) dendrimers as ophthalmic vehicles for ocular delivery of pilocarpine nitrate and tropicamide. **Journal of Controlled Release**, v. 102, p. 23-58, 2005.
-

VERMA, R. K.; ARORA, S.; GARG, S. Osmotic Pumps in drug delivery. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 21, p. 1-44, 2004.

VIEIRA, N. C. S. **Biossensores de Glicose Nanoestruturados Baseados em Dendrímeros PAMAM e filmes finos de In_2O_3 : Sn**. 2006. 141p. Dissertação (Mestrado – Química) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá.

VOGTLE, F., *et al.* Functional dendrimers. **Progress in Polymer Science**, v. 25, p. 987-1041, 2000.

WANG, P. *et al.* Generation 4 polyamidoamine dendrimers is a novel candidate of nano-carrier for gene delivery agents in breast cancer treatment. **Cancer Letters**, v. 298, p34-49, 2010.

WANG, Z. X. *et al.* Novel transdermal drug delivery system with polyhydroxyalkanoate and starburst polyamidoamine dendrimer. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, p. 541-543, 2003.

WATTS, P. J., DAVIES, M. C., MELIA, C. D. Microencapsulation using emulsification solvent evaporation: an overview of techniques and 150 applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System**, v. 7, n. 3, p. 235-259, 1990.

WIWATTANEPATAPEE, R. *et al.* Anionic PAMAM dendrimers rapidly cross adult rat intestine in vitro: a potential oral delivery system? **Pharmaceutical Research**, v. 17, p. 991-998, 2000.

WOODLEY, J. Bioadhesion, new possibilities for drug administration?. **Clinical Pharmacokinetics**, v.40, p. 77-84, 2001.

XU, F. *et al.* Thermodynamic study of ibuprofen by adiabatic calorimetry and thermal analysis. **Thermochimica Acta**. v. 412, p. 33-37, 2004.

YAN, Q., *et al.* Anti-Inflammatory Drug Therapy Alters β -Amyloid Processing and Deposition in an Animal Model of Alzheimer's Disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 20, p. 7504-7509, 2003.

YANDRAPU, S. K. Development and optimization of thiolated dendrimer as a viable mucoadhesive excipient for the controlled drug delivery: An acyclovir model formulation. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 9, p. 514-522, 2013.

YIYUN, C.; XU, T. Dendrimers as potential drug carriers. Part I. Solubilization of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the presence of polyamidoamine dendrimers. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 1188-1192, 2005.

YONCHEVA, K.; LIZARRAGA, E.; IRACHE, J. M. Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): preparation and evaluation of their bioadhesive properties. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 411-419, 2005.