



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

Câmpus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos



**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
MICRO/NANOSSUSPENSÕES COM PROPRIEDADES MUCOADESIVAS  
PARA LIBERAÇÃO CÓLON-ESPECÍFICA DE METOTREXATO**

ALINE MARTINS DOS SANTOS

Araraquara

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
MICRO/NANOSSUSPENSÕES COM PROPRIEDADES MUCOADESIVAS  
PARA LIBERAÇÃO CÓLON-ESPECÍFICA DE METOTREXATO

ALINE MARTINS DOS SANTOS

Araraquara

2015

ALINE MARTINS DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
MICRO/NANOSSUSPENSÕES COM PROPRIEDADES MUCOADESIVAS  
PARA LIBERAÇÃO CÓLON-ESPECÍFICA DE METOTREXATO**

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.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

Coorientadora: Profa. Dra. Flávia Chiva Carvalho

Araraquara

2015

**Ficha Catalográfica**

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

**S237d**

Santos, Aline Martins dos

Desenvolvimento e caracterização de micro/nanossuspensões com propriedades mucoadesivas para liberação cólon-específica de metotrexato / Aline Martins dos Santos – Araraquara, 2015  
160 f.

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

Orientador: Maria Palmira Daflon Gremião

Coorientador: Flávia Chiva Carvalho

1. Micro/nanossuspensões. 2. Bottom-up. 3. Metotrexato. 4. Sistemas mucoadesivos. I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II. Carvalho, Flávia Chiva, coorient. III. Título.

**CAPES: 40300005**

ALINE MARTINS DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
MICRO/NANOSSUSPENSÕES COM PROPRIEDADES MUCOADESIVAS  
PARA LIBERAÇÃO CÓLON-ESPECÍFICA DE METOTREXATO

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.

Data da aprovação: 03/07/2015

Titulação: Mestrado em Ciências Farmacêuticas

**Comissão Examinadora**

Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião (*Presidente*)

Profa. Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury (*Examinador*)

Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud (*Examinador*)

Araraquara, 03 de Julho de 2015.

***Dedico este trabalho aos meus pais, Ivaldo e Leonice e as  
minhas orientadoras, Palmira e Flávia.***

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a **DEUS** o maior responsável por realizar este sonho, sem ele nada seria possível. Agradeço por ter me dado fé, força, determinação, paciência nos momentos difíceis, momentos estes que me fizeram crescer. Agradeço por nunca ter me deixado fraquejar e desistir. E por ter colocado pessoas especiais em meu caminho,

Em especial, aos meus pais **Ivaldo Martins dos Santos** e **Leonice Ferrarezi dos Santos** que são meus alicerces, exemplos de vida, sabedoria e determinação. Por sonharem junto comigo, sempre me incentivando, me apoiando e acreditando no meu sucesso,

Às minhas irmãs **Andréia Ap. Martins dos Santos**, **Valéria Martins dos Santos** e **Débora Martins dos Santos**, que acompanharam minha trajetória, por todas as palavras de carinho e incentivo,

Ao meu noivo **Evandro Dimas Marin**, por seu amor, carinho, dedicação, por seu companheirismo, pela compreensão, pelas palavras de incentivo, sempre me encorajando para vencer meus desafios, estando ao meu lado em todos os momentos,

Aos meus sogros **Francisco Dimas Marin** e **Marisa Paiva Fortes Marin**, por toda sua ajuda, por acreditarem e torcerem pelo meu sucesso,

À minha orientadora **Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião**, exemplo de ser humano e profissional, pela oportunidade, pela paciência,

## *Agradecimentos*

dedicação, pelo incentivo, pela amizade, pela confiança no meu trabalho e por todo conhecimento transmitido, que foram fundamentais para meu crescimento profissional,

À minha coorientadora querida **Dra. Flávia Chiva Carvalho**, pela paciência, pela grande amizade, por toda confiança depositada em mim, por toda sua dedicação e contribuição para realização deste trabalho,

À **Profa. Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury**, pela grande contribuição no exame geral de qualificação, pela amizade, pelo apoio, discussões e ensinamentos transmitidos,

Ao **Prof. Dr. Marlus Chorilli**, pela amizade e pela grande contribuição no exame geral de qualificação,

Aos amigos do laboratório: **Bruno da Fonseca dos Santos, Ana Luiza Ribeiro, Charlene Kill, Flávio Campos, Cristiane Pissinato, Lilian Barbassa, Gisela Rolfsen, Leonardo Miziara** obrigada pela amizade, pelo apoio, companheirismo, ideias e contribuição para realização deste trabalho,

Em especial, à amiga **Andréia Bagliotti Meneguim**, pela amizade, por toda sua ajuda, por estar sempre disposta, pela enorme contribuição, por seus conhecimentos transmitidos, pelo grande incentivo e por acreditar na minha capacidade para realização deste trabalho. Obrigada por ter se tornado essa amiga especial, verdadeira, presente, com quem sempre posso contar e pelas palavras de conforto nos momentos de angústia. À amiga **Valéria Maria de Oliveira Cardoso**, pela amizade, pelo carinho, pelo apoio, pela força e por toda sua ajuda. À amiga **Márcia Helena Oyafuso**, umas das primeiras pessoas que

## *Agradecimentos*

tive contato no laboratório, obrigada pelo apoio e amizade. Agradeço à Deus por ter colocado vocês em meu caminho,

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP)**, especialmente à técnica de Laboratório **Natália**, pela amizade e pela ajuda prestada para realização de meus experimentos,

À Seção de Pós-graduação, em especial à **Cláudia, Flavia, Daniela, Joyce e Márcia**, pela atenção e apoio,

Ao **CNPq**, pelo apoio financeiro na forma de Bolsa de Mestrado.

*"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito.*

*Não sou o que deveria ser,  
mas graças a Deus,  
não sou o que era antes".*

*(Marthin Luther King)*

## RESUMO

O metotrexato (MTX) é um fármaco com solubilidade pH dependente, utilizado no tratamento de doenças do trato gastrointestinal, como a doença de Crohn, retocolite ulcerativa e carcinomas colorretal. O desenvolvimento de micro/nanossuspensões podem ser uma estratégia promissora para incorporação de fármacos que possuem solubilidade pH dependente, oferecendo vantagens como a redução do tamanho da partícula do fármaco que pode levar ao aumento da taxa de dissolução e da permeabilidade. Adicionalmente, polímeros estímulo-responsivos podem sofrer transição de fase sol-gel *in situ*, promovendo a mucoadesão e uma maior retenção do sistema no local de ação. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver micro/nanossuspensões contendo polímeros mucoadesivos para liberação cólon-específica do MTX. As partículas foram obtidas pelo método *Bottom-up*, utilizando reações de ácido-base e estabilizadas com hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e poloxâmero 407 (P407), através de agitação em Ultra-turrax ou Sonicador. Foram incorporados polímeros derivados do ácido poliacrílico como, Carbopol® ETD 2020 e Ultrez 10NF, poloxâmero 407 e goma gelana, pois estes polímeros atuam por diferentes mecanismos na mucoadesão como pH, temperatura e concentração iônica. A caracterização físico-química das micro/nanossuspensões foi realizada por espalhamento de luz, medida do potencial zeta, microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise de textura (TPA) e ensaios de mucoadesão *ex vivo*. No método *Bottom-up* foram otimizadas condições para alcançar a solubilização e principalmente a precipitação do fármaco. Essa variação nas condições de precipitação, demonstrou que o aumento da proporção de ácido, permite modular o tamanho da partícula para a escala micro/nanométrica, na ausência de estabilizante. As nanossuspensões apresentaram pH acima de 5, enquanto para as microssuspensões o valor de pH ficou abaixo de 4. Para as microssuspensões, a análise dos resultados mostraram que dependendo do processo de agitação e tipo de estabilizante empregado foi possível obter partículas na escala micrométrica e nanométrica. A incorporação de polímeros mucoadesivos apresentaram capacidade de geleificação *in situ*, características mecânicas e propriedades mucoadesivas adequadas para liberação retal, promovendo uma maior retenção da formulação no local de ação. O perfil de liberação *in vitro* demonstrou que as micro/nanossuspensões contribuíram para o aumento das taxas de dissolução do fármaco em pH 6,8. O conjunto desses resultados sugere que pelo método *Bottom-up* é possível modular o tamanho das partículas e que parâmetros como, precipitação, processo de agitação, presença e tipo de estabilizante estão diretamente relacionados com as propriedades destas partículas (tamanho, índice de podispersão e potencial zeta). As micro/nanossuspensões contendo polímeros com propriedades mucoadesivas são estratégias promissoras para a liberação cólon-específica do MTX através da via retal.

**Palavras-chave:** micro/nanossuspensões, *Bottom-up*, metotrexato, sistemas mucoadesivos.

## ABSTRACT

The methotrexate (MTX) is pH-dependent solubility drug used in the treatment of gastrointestinal diseases, such as Crohn's disease, ulcerative colitis and colorectal carcinomas. The micro/nanosuspensions development is a promising strategy to incorporate this type of drug, since it offers important advantages, such as particle size reducing of drug, which may lead to the increase of the dissolution and permeability rates of the drug. Additionally, responsive-polymers can undergo *in situ* sol-gel phase transition, promoting mucoadhesion process followed by a greater retention of system in the action site. In this sense, the aim of this work was to develop micro and nanosuspensions associated to mucoadhesive polymers for colon specific release of MTX. The particles were obtained from Bottom-up method by acid-base reactions, employing the Ultra-Turrax or Sonicator and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) and poloxamer 407 (P407) as stabilizing. Polyacrylic acid (PAA), poloxamer 407 and gellan gum, which have different mucoadhesion mechanisms (pH, temperature and ionic concentration) were incorporated. The physic-chemical characterization of micro/nanosuspensions was realized by light scattering, measurement of zeta potential, scanning electron microscopy (SEM), texture profile analysis (TPA) and *ex vivo* mucoadhesion test. In the bottom-up method, the conditions were optimized to reach the solubilization and, mainly, the precipitation of drug. This variation in precipitation conditions showed that increasing the acid proportion is possible to modulate the particle size to the micro/nano-range, in the absence of stabilizer. The nanosuspensions exhibited pH above 5.0, while the microsuspensions below 4.0. For microsuspensions, analysis of the results showed that depending on the stirring process and type of stabilizer used it was possible to obtain micrometer and nanometer particles. *Ex vivo* mucoadhesion tests revealed that polymers employed have *in situ* gelling ability and suitable mechanical and mucoadhesive properties for rectal administration, promoting a greater retention of the formulation in the action site. *In vitro* release profiles showed that micro/nanosuspensions contributed to the increase of the drug release rates in pH 6.8. The set of results suggests that using bottom-up method is possible to modulate the particle size and parameters such as precipitation, stirring process, presence and type of stabilizer are directly related to the properties of these particles (size, polydispersity index and zeta potential). Micro/nanosuspensions associated mucoadhesive polymers are a promising strategy for colon-specific release of MTX through the rectum.

**Keywords:** micro/nanosuspensions, *Bottom-up*, methotrexate, mucoadhesive system.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1- Anatomia do cólon .....                                                                                                                                                                                        | 27 |
| Figura 2 - Estrutura química do metotrexato (a) e do ácido fólico (b).....                                                                                                                                               | 33 |
| Figura 3 - Representação da precipitação química através de reações de ácido-base para a produção de nanopartículas de fármaco. ....                                                                                     | 40 |
| Figura 4 - Estrutura química hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (A) e poloxâmero 407 (P407) (B). ....                                                                                                                     | 42 |
| Figura 5 - Representação do mecanismo de formação do hidrogél do APA. ...                                                                                                                                                | 45 |
| Figura 6 - Representação do mecanismo de geleificação do poloxâmero 407. 46                                                                                                                                              |    |
| Figura 7 - Estrutura da goma gelana e seus substituintes L-gliceril e L-acetil. 47                                                                                                                                       |    |
| Figura 8 - Representação do mecanismo de formação do hidrogél de gelana. 48                                                                                                                                              |    |
| Figura 9 - Representação esquemática da obtenção das suspensões de MTX. ....                                                                                                                                             | 56 |
| Figura 10 - Comportamento de ionização do MTX. ....                                                                                                                                                                      | 58 |
| Figura 11 - Preparo das micro/nanossuspensões por precipitação química através de reações ácido-base, utilizando HCl em diferentes proporções molares.....                                                               | 59 |
| Figura 12 - Esquema do preparo das micro/nanossuspensões por Bottom-up obtidas com Ultra turrax. ....                                                                                                                    | 60 |
| Figura 13 - Esquema do preparo das micro/nanossuspensões por Bottom-up obtidas no Sonicador.....                                                                                                                         | 63 |
| Figura 14 - Representação esquemática do analisador de textura TA-XT plus, para realização do teste TPA (Texture profile analysis). ....                                                                                 | 69 |
| Figura 15 - Representação esquemática do ensaio de mucoadesão <i>ex vivo</i> . .                                                                                                                                         | 70 |
| Figura 16 - Fotografia do texturômetro para o teste de mucoadesão <i>ex vivo</i> . .                                                                                                                                     | 71 |
| Figura 17 - Espectros de absorção do MTX nos meio HCl 0,1 M pH 3 (A), HCl 0,1 M pH 4 (B), tampão fosfato pH 5,5 (C), tampão fosfato pH 7 (D), tampão fosfato pH 9 (E) e tampão fosfato pH 11 (F).....                    | 74 |
| Figura 18 - Espectro de absorção do MTX em HCl 0,1 M (A) e tampão fosfato 0,1 M pH 6,8 (B). ....                                                                                                                         | 79 |
| Figura 19 - Curva analítica do MTX em HCl 0,1M (A) e em tampão fosfato 0,1M pH 6,8 (B). ....                                                                                                                             | 80 |
| Figura 20 - Espectros de absorção obtidos na região do UV, da solução de MTX em HCl 0,1 M, das nanossuspensões com e sem HPMC (A), das micro/nanossuspensões com P407 e na presença dos polímeros mucoadesivos (B). .... | 85 |
| Figura 21 - Espectros de absorção obtidos na região do UV, da solução de MTX em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8), das micro/nanossuspensões com e sem HPMC e P407 (A), e na presença dos polímeros mucoadesivos (B). ....   | 86 |
| Figura 22 - Fotografias da redispersabilidade das suspensões. ....                                                                                                                                                       | 96 |

|                                                                                                                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 23 - Fotografias da redispersabilidade das micro/nanossuspensões obtidas no Ultra turrax. ....                                                                                                                                | 97  |
| Figura 24 - Tamanho médio e índice de polidispersão das partículas para as amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)H0,5 com volume de 10, 20 e 40 mL, sonicadas na amplitude 15, por 4 minutos. ....                                             | 100 |
| Figura 25 - Tamanho médio de partícula e índice de polidispersidade (Pdl), para diferentes concentrações de HPMC, obtidas por sonicação. ....                                                                                        | 101 |
| Figura 26 - Tamanho médio de partícula e índice de polidispersidade (Pdl) de N(A1+1)H1 e N(A1+1)H0,5 variando a posição da haste de sonicação (superfície e ao meio da amostra), realizada na amplitude 15 por 4 min. ....           | 102 |
| Figura 27 - Tamanho médio de partícula e índice de polidispersidade (Pdl) de N(A1+1)H1 e N(A1+1)H0,5 produzidas em diferentes tempos de sonicação (3, 5 e 10 min). ....                                                              | 104 |
| Figura 28 - Tamanho médio de partícula e Pdl das amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)H0,5, testando o uso da amplitude fixa de 15 ou o aumento gradual (7-15). ....                                                                          | 105 |
| Figura 29 - Tamanho médio de partícula e índice de polidispersidade (Pdl) das amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)H0,5 produzidas em diferentes amplitudes de sonicação (10, 15 e 20). ....                                                  | 106 |
| Figura 30 - Tamanho de partícula e índice de polidispersidade (Pdl) com diferentes concentrações de MTX (5; 10; 15 e 25 mg/mL) nas amostras, utilizando HPMC (1:1) como estabilizante. ....                                          | 113 |
| Figura 31 - Tamanho de partícula e índice de polidispersidade (Pdl) comparando as diferentes concentrações de MTX (10 e 25 mg/mL) para as amostras com P407 (2,5 e 5%). ....                                                         | 114 |
| Figura 32 - Fotomicrografia obtida por MEV-FEG (5000x; 10000x e 15000x) da superfície do pó de MTX (A). ....                                                                                                                         | 116 |
| Figura 33 - Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG (15000x; 30000x e 50000x) das amostras sem estabilizante N(A1+1)H0 (B) e com HPMC como estabilizante N(A1+1)H1 (C). ....                                                            | 117 |
| Figura 34 - Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG (500x; 1000x e 5000x) das nanossuspensões com P407 como estabilizante N(A1+1)P5 (D). ....                                                                                           | 118 |
| Figura 35 - Tamanho médio de partícula e índice de polidispersidade (Pdl) da amostra N(A1+1)H1 obtida no homogeneizador de alta pressão em diferentes pressões (500; 1000 e 1400 bar) durante 5, 10 e 15 ciclos. ....                | 122 |
| Figura 36 - Tamanho médio de partícula e índice de polidispersidade (Pdl) da amostra N(A1+1)P2,5, obtida no homogeneizador de alta pressão em diferentes pressões (500 e 1000 bar) durante 5, 10 e 15 ciclos de homogeneização. .... | 124 |
| Figura 37 - Tamanho médio de partícula e índice de polidispersidade (Pdl) da amostra SA2H1, obtida no homogeneizador de alta pressão a uma pressão de 500 bar durante 5, 10 e 15 ciclos de homogeneização. ....                      | 125 |

|                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 38 - Avaliação da estabilidade com a medida do tamanho de partícula e Pdl das micro/nanossuspensões obtidas pelo método Bottom-up, avaliadas no dia da preparação, 24 horas e 7 dias, armazenadas a 25 °C.....                         | 127 |
| Figura 39 - Avaliação das propriedades mecânicas das micro/nanossuspensões (N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5) associadas aos polímeros mucoadesivos carbopol ETD2020, poloxâmero 407 e goma gelana. ....                                                 | 129 |
| Figura 40 - Força de mucoadesão - FMA e trabalho de mucoadesão - TMA das micro/nanossuspensões (N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5) associadas aos polímeros mucoadesivos carbopol ETD2020, poloxâmero 407 e goma gelana (n=5, média ± desvio padrão)..... | 132 |
| Figura 41 - Fotografias ilustrando a quantidade aderida ao tecido colônico das amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5, sem e com a adição do polímero mucoadesivo Ultrez.....                                                                         | 135 |
| Figura 42 - Fotografia do teste de escoamento das micro/nanossuspensões na ausência do polímero mucoadesivo Ultrez.....                                                                                                                       | 136 |
| Figura 43 - Fotografia do teste de escoamento das micro/nanossuspensões na presença do polímero mucoadesivo Ultrez. ....                                                                                                                      | 137 |
| Figura 44 - Perfis de liberação do MTX a partir das amostras N(A1+1)H1, N(A1+0)H1, N(A1+1)P5, SA2H1 em comparação com o fármaco livre em meio tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8).....                                                              | 139 |
| Figura 45 - Perfis de liberação do MTX para avaliar a influência do tamanho das partículas no perfil de liberação das amostras N(A1+1)H1, N(A1+0)H1, N(A1+1)P5 e SA2H1. ....                                                                  | 141 |
| Figura 46 - Perfis de liberação do MTX das amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5 com os polímeros mucoadesivos carbopol ETD2020, poloxâmero 407 e goma gelana. ....                                                                                  | 143 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 1 - Estratégias para o desenvolvimento de sistemas de liberação cólon-específica de fármacos. ....                                                                                             | 29  |
| Tabela 2 - Sistemas de liberação contendo MTX destacando as vias de administração empregadas, objetivos e os principais resultados alcançados..                                                       | 36  |
| Tabela 3 - Nomenclatura das suspensões de MTX e proporções de HCl e HPMC testadas. ....                                                                                                               | 56  |
| Tabela 4 - Nomenclatura das micro/nanossuspensões com diferentes proporções de HCl e HPMC testadas para precipitação e estabilização, respectivamente. ....                                           | 61  |
| Tabela 5 - Nomenclatura das micro/nanossuspensões produzidas por Bottom-up utilizando proporções reduzidas de base e ácido.....                                                                       | 62  |
| Tabela 6 - Parâmetros testados para a obtenção das micro/nanossuspensões utilizando o sonicador.....                                                                                                  | 64  |
| Tabela 7 - Nomenclatura das micro/nanossuspensões, contendo diferentes proporções de P407 testadas para estabilização. ....                                                                           | 65  |
| Tabela 8 - Curvas analíticas em meios com diferentes valores de pH.....                                                                                                                               | 77  |
| Tabela 9 - Solubilidade do MTX em meios com diferentes valores de pH. ....                                                                                                                            | 78  |
| Tabela 10 - Dados das curvas analíticas obtidas nos diferentes meios. ....                                                                                                                            | 81  |
| Tabela 11 - Dados de precisão intra-corrida e inter-corrida nos diferentes meios.....                                                                                                                 | 82  |
| Tabela 12 - Resultados obtidos para a exatidão do método analítico nos diferentes meios. ....                                                                                                         | 83  |
| Tabela 13 - Valores de LD e LQ obtidos nos diferentes meios. ....                                                                                                                                     | 84  |
| Tabela 14 - Tamanho médio das partículas, Pdl, potencial zeta e pH final das suspensões estabilizadas com diferentes concentrações de HPMC (média±DP). ....                                           | 88  |
| Tabela 15 - Tamanho médio das partículas, Pdl, potencial zeta e pH final das micro/nanossuspensões sem HPMC, utilizando diferentes proporções de HCl e NaOH, obtidas em Ultra turrax (média±DP). .... | 90  |
| Tabela 16 - Tamanho das partículas, Pdl, potencial zeta e pH final das micro/nanossuspensões com HPMC. (média±DP). ....                                                                               | 93  |
| Tabela 17 - Tamanho de partícula, índice de polidispersidade (Pdl) e potencial zeta das amostras utilizando Ultra turrax, estabilizadas com poloxâmero 407 (média±DP). ....                           | 108 |
| Tabela 18 - Tamanho de partícula e índice de polidispersidade (Pdl) das amostras utilizando Sonicador, estabilizadas com poloxâmero 407, (média±DP). ....                                             | 109 |
| Tabela 19 - Tamanho médio das partículas, Pdl e potencial zeta das amostras estabilizadas com P407, utilizando menores proporções de HCl e NaOH, utilizando Sonicador (média±DP). ....                | 111 |

|                                                                                                                                                                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 20 - Concentrações de MTX solúvel (mg/mL e porcentagem %) encontrado no sobrenadante das micro/nanossuspensões estabilizadas com HPMC e P407, determinado por espectrofotômetro UV-VIS (média $\pm$ DP).... | 119 |
| Tabela 21 - Avaliação da mucoadesão através da medida da quantidade das amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5, sem e com a adição do polímero mucoadesivo Ultrez, retidas na mucosa colônica (média $\pm$ DP).....        | 134 |
| Tabela 22 - Quantidade de escoamento das amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5, sem e com a adição do polímero mucoadesivo Ultrez, após o contato com tecido colônico (média $\pm$ DP). ....                              | 136 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ANVISA:** Agência de Vigilância Sanitária

**APA:** polímeros derivados do ácido poliacrílico

**CMC:** concentração micelar crítica

**CV:** coeficiente de variação

**DP:** desvio padrão

**HCl:** ácido clorídrico

**HPMC:** hidroxipropilmetilcelulose

**HPMC 1:2; 1:1; 1:0,5; 1:0,25:** proporção de hidroxipropilmetilcelulose utilizado em relação a massa de fármaco

**LD:** limite de detecção

**LQ:** limite de quantificação

**MEV-FEG:** Microscopia eletrônica de varredura com campo ampliado

**MTX:** Metotrexato

**NaOH:** hidróxido de sódio

**Pdl:** índice de polidispersão

**pKa:** constante de dissociação ácida

**P407:** poloxâmero 407

**P407 1, 2,5 e 5%:** concentração de poloxâmero 407 utilizado em relação ao volume de formulação

**TGI:** Trato gastrointestinal

**UV-Vis:** Ultravioleta-visível

## SUMÁRIO

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                              | 20 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                                                                                  | 23 |
| 2.1 Doenças inflamatórias do trato gastrointestinal: Doença de Crohn e retocolite ulcerativa .....              | 23 |
| 2.2 Carcinoma colorretal .....                                                                                  | 25 |
| 2.3 Cólon como local para liberação de fármacos .....                                                           | 26 |
| 2.4 Via retal para liberação de fármacos.....                                                                   | 30 |
| 2.5 Metotrexato .....                                                                                           | 31 |
| 2.5.1 Propriedades Físico-químicas do MTX.....                                                                  | 32 |
| 2.5.2 Mecanismo de ação do MTX .....                                                                            | 33 |
| 2.5.3 Farmacocinética e Toxicidade .....                                                                        | 34 |
| 2.5.4 Sistemas de liberação contendo MTX .....                                                                  | 35 |
| 2.6 Micro/nanossuspensões.....                                                                                  | 39 |
| 2.7 Sistemas mucoadesivos.....                                                                                  | 43 |
| 2.7.1 Polímeros derivados do ácido poliacrílico (APA) .....                                                     | 44 |
| 2.7.2 Poloxâmero 407.....                                                                                       | 46 |
| 2.7.3 Goma gelana .....                                                                                         | 47 |
| 3. OBJETIVOS.....                                                                                               | 49 |
| 3.1 Etapas .....                                                                                                | 49 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                                                    | 50 |
| 4.1 Materiais.....                                                                                              | 50 |
| 4.1.1 Matérias-primas .....                                                                                     | 50 |
| 4.1.2 Equipamentos.....                                                                                         | 50 |
| 4.2 MÉTODOS .....                                                                                               | 51 |
| 4.2.1 Desenvolvimento de métodos espectrofotômero para avaliação do MTX .....                                   | 51 |
| 4.2.2 Avaliação do equilíbrio de solubilidade do MTX em meios aquosos com diferentes valores de pH .....        | 51 |
| 4.2.3 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do MTX em meios com diferentes valores de pH ..... | 52 |
| 4.2.4 Construção das curvas analíticas .....                                                                    | 52 |

|        |                                                                                                    |    |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.5  | Quantificação do MTX nas micro/nanossuspensões por espectrofotometria UV-VIS .....                 | 52 |
| 4.2.6  | Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do MTX na região do UV .....                | 53 |
| 4.2.7  | Linearidade .....                                                                                  | 53 |
| 4.2.8  | Precisão .....                                                                                     | 53 |
| 4.2.9  | Exatidão .....                                                                                     | 53 |
| 4.2.10 | Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....                                                 | 54 |
| 4.2.11 | Especificidade e Seletividade .....                                                                | 55 |
| 4.3    | Preparo das suspensões de MTX .....                                                                | 55 |
| 4.3.1  | Preparo das micro/nanossuspensões por Bottom-up utilizando Ultra turrax .....                      | 57 |
| 4.3.2  | Solubilização do MTX .....                                                                         | 57 |
| 4.3.3  | Obtenção das partículas por precipitação química .....                                             | 57 |
| 4.3.4  | Estudo de otimização das condições de solubilização e precipitação do MTX por Bottom-up .....      | 61 |
| 4.3.5  | Preparo das micro/nanossuspensões por Bottom-up utilizando Sonicador .....                         | 62 |
| 4.3.6  | Estudo do efeito estabilizante do poloxâmero 407 .....                                             | 65 |
| 4.3.7  | Variação da concentração de MTX no preparo das micro/nanossuspensões por sonicação .....           | 65 |
| 4.4    | Caracterização físico-química das suspensões e micro/nanossuspensões .....                         | 66 |
| 4.4.1  | Análise do tamanho das partículas .....                                                            | 66 |
| 4.4.2  | Medida do potencial zeta .....                                                                     | 66 |
| 4.4.3  | Avaliação da redispersabilidade .....                                                              | 66 |
| 4.4.4  | Estudos de morfologia das micro/nanossuspensões .....                                              | 66 |
| 4.4.5  | Avaliação do MTX nas partículas das micro/nanossuspensões ...                                      | 67 |
| 4.5    | Preparo das micro/nanossuspensões por Top-down associadas ou não ao processo Bottom-up .....       | 67 |
| 4.6    | Estabilidade física das micro/nanossuspensões .....                                                | 68 |
| 4.7    | Avaliação da adição dos polímeros mucoadesivos nas micro/nanossuspensões .....                     | 68 |
| 4.8    | Avaliação das propriedades mecânicas das micro/nanossuspensões com os polímeros mucoadesivos ..... | 68 |
| 4.9    | Ensaio ex vivo de mucoadesão .....                                                                 | 69 |

|       |                                                                                                           |     |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.9.1 | Avaliação da força mucoadesiva .....                                                                      | 69  |
| 4.9.2 | Avaliação da mucoadesão por análise gravimétrica.....                                                     | 70  |
| 4.9.3 | Avaliação da mucoadesão utilizando teste de escoamento .....                                              | 72  |
| 4.10  | Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do metotrexato .....                                  | 72  |
| 4.11  | Análise estatística .....                                                                                 | 73  |
| 5.    | RESULTADOS .....                                                                                          | 74  |
| 5.1   | Desenvolvimento de métodos espectrofotométrico para avaliação do MTX                                      | 74  |
| 5.1.1 | Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do MTX em meios com diferentes valores de pH ..... | 74  |
| 5.1.2 | Construção das curvas analíticas .....                                                                    | 76  |
| 5.1.3 | Determinação do equilíbrio de solubilidade do MTX em meios aquosos com diferentes valores de pH.....      | 77  |
| 5.2   | Quantificação do MTX nas micro/nanossuspensões por espectrofotometria UV-VIS .....                        | 78  |
| 5.2.1 | Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do MTX na região do UV .....                       | 79  |
| 5.2.2 | Linearidade.....                                                                                          | 80  |
| 5.2.3 | Precisão.....                                                                                             | 81  |
| 5.2.4 | Exatidão.....                                                                                             | 83  |
| 5.2.5 | Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....                                                         | 83  |
| 5.2.6 | Especificidade e Seletividade .....                                                                       | 84  |
| 5.3   | Caracterização físico-química das suspensões e micro/nanossuspensões .....                                | 87  |
| 5.3.1 | Suspensões de MTX .....                                                                                   | 87  |
| 5.3.2 | Micro/nanossuspensões por Bottom-up utilizando o Ultra turrax..                                           | 89  |
| 5.3.3 | Avaliação da redispersabilidade .....                                                                     | 96  |
| 5.4   | Micro/nanossuspensões por Bottom-up utilizando Sonicador.....                                             | 98  |
| 5.4.1 | Estudo do volume de amostra a ser sonicada .....                                                          | 98  |
| 5.4.2 | Estudo da proporção de MTX:HPMC .....                                                                     | 100 |
| 5.4.3 | Estudo da posição da haste de sonicação .....                                                             | 102 |
| 5.4.4 | Estudo do tempo de sonicação.....                                                                         | 103 |
| 5.4.5 | Estudo da variação da amplitude de sonicação .....                                                        | 104 |
| 5.5   | Estudo da adição do estabilizante poloxâmero 407 .....                                                    | 107 |

|        |                                                                                                    |     |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.6    | Variação da concentração de MTX no preparo das micro/nanossuspensões por sonicação .....           | 112 |
| 5.7    | Estudos de morfologia das micro/nanossuspensões .....                                              | 115 |
| 5.8    | Avaliação do MTX nas partículas das micro/nanossuspensões.....                                     | 118 |
| 5.9    | Preparo das micro/nanossuspensões por Top-down associadas ou não ao processo Bottom-up .....       | 120 |
| 5.10   | Estabilidade física das micro/nanossuspensões .....                                                | 126 |
| 5.11   | Avaliação das propriedades mecânicas das micro/nanossuspensões com os polímeros mucoadesivos ..... | 128 |
| 5.12   | Ensaio <i>ex vivo</i> de mucoadesão .....                                                          | 131 |
| 5.12.1 | Avaliação da força mucoadesiva .....                                                               | 131 |
| 5.12.2 | Avaliação da mucoadesão por análise gravimétrica .....                                             | 133 |
| 5.12.3 | Avaliação da mucoadesão utilizando teste de escoamento .....                                       | 135 |
| 5.13   | Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do metotrexato .....                           | 137 |
| 6.     | DISCUSSÃO.....                                                                                     | 145 |
| 7.     | CONCLUSÃO .....                                                                                    | 150 |
| 8.     | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                   | 151 |

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença de Crohn e a retocolite ulcerativa são os dois tipos de doença crônica inflamatória do trato gastrointestinal, que acometem o cólon. No tratamento, os fármacos podem ser inativados ou absorvidos antes de chegarem ao cólon, não atingindo o tecido inflamado. Além disso, o aumento da produção de muco que ocorre em decorrência destas doenças, dificultam a permanência do fármaco no cólon. (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012).

Outra patologia que afeta o cólon é o carcinoma colorretal. Esta neoplasia atinge grande parte da população mundial, sendo considerada a terceira principal causa de óbito por câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). De modo geral, o tratamento convencional envolve cirurgia conciliada com radioterapia e/ou quimioterapia (SADANANDAM et al., 2013; SCHWARTZ; BLANKE; PESKO, 2004).

O metotrexato (MTX) é um fármaco utilizado no tratamento de doenças inflamatórias do intestino, bem como para os carcinomas colorretal. O MTX é um fármaco classificado como antimetabólico, que vem sendo empregado como agente imunossupressor e quimioterápico. Ele possui uma solubilidade pH dependente em água, além de apresentar efeitos adversos associados a altas doses (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012; DABROWSKA et al., 2009; MENCIA et al., 2011; RUBINO, 2001).

O tratamento das doenças colônicas, como a doença de Crohn, a retocolite ulcerativa e o carcinoma colorretal, podem ser otimizados através do uso de sistemas de liberação cólon-específica de fármacos, devido a proteção do fármaco contra degradação, aumento da biodisponibilidade, promoção da liberação do fármaco no local específico, redução da dose e dos efeitos adversos (FREIRE, 2006; PINTO, 2010; SINHA; KUMRIA, 2003).

A via retal tem sido muito explorada para administração de fármacos no cólon, pois oferece vantagens como ação local, aumentando a concentração do fármaco no sítio de ação, e absorção sistêmica de fármacos (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012; NUNES; SARMENTO; NEVES, 2014).

Dentre os vários sistemas de liberação de fármacos, o desenvolvimento de micro/nanossuspensões são uma estratégia promissora para fármacos

poucos solúveis, insolúveis em água e óleo ou que possuem solubilidade pH dependente, como o MTX (RABINOW, 2004).

As micro/nanossuspensões são dispersões coloidais de partículas formadas apenas pelo fármaco e normalmente são estabilizadas com uso de tensoativos ou polímeros. Elas podem ser preparadas por dois métodos conhecidos por *Top-down* e *Bottom-up* (RABINOW, 2004; VERMA; GOKHALE; BURGESS, 2009).

O processo *Top-down* envolve a redução de partículas do fármaco por meio de técnicas como moagem, microfluidização e homogeneização à alta pressão. Já o processo *Bottom-up*, também conhecido como precipitação química, ocorre por precipitação do fármaco utilizando um antissolvente na presença de estabilizantes. Nos casos em que o fármaco tem solubilidade pH dependente, a precipitação pode ser realizada por reações ácido-base. Visto que o MTX possui alta solubilidade em solução básica, este pode ser precipitado pela adição de um ácido (CHEN et al., 2008; RUBINO, 2001; SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013; THORAT; DALVI, 2012; VERMA; GOKHALE; BURGESS, 2009).

O uso de polímeros como estabilizantes nas micro/nanossuspensões, vem sendo extensivamente explorado para o controle do tamanho das partículas. Esta estabilização é fortemente influenciada pelas propriedades destes polímeros, como o comprimento das cadeias poliméricas e a presença de alguns grupos funcionais. Dentre eles, os mais utilizados são a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e o copolímero tribloco poloxâmero 407 (P407) (THORAT; DALVI, 2012; VERMA; GOKHALE; BURGESS, 2009).

A vantagem da redução do tamanho da partícula do fármaco é o aumento da taxa de liberação do fármaco. Além disso, um tamanho menor de partícula pode levar ao aumento da mucoadesão, em razão de que partículas micro/nanométricas podem penetrar e ficar retidas no muco. Desta forma, estas partículas ficam aderidas nas áreas inflamadas do cólon, podendo aumentar o tempo de permanência do fármaco no cólon (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012; RABINOW, 2004).

Sistemas de liberação cólon-específica de fármacos podem ter sua eficácia melhorada com uma maior retenção do sistema no local de ação. Essa retenção pode permitir um maior tempo de contato da formulação com o local

de absorção, aumentando o gradiente de concentração do fármaco. Dessa forma, os sistemas de liberação com propriedades mucoadesivas e tamanho reduzido são uma potencial ferramenta para promover a retenção do fármaco no local de ação ou absorção (CARVALHO et al., 2010; SMART, 2005).

Os sistemas mucoadesivos podem agir normalmente por dois mecanismos: adesão por ligações hidrofóbicas, eletrostáticas ou de hidrogênio, e também pelo aumento da viscosidade promovido por algum estímulo fisiológico (PARK; ROBINSON, 1984). Este último mecanismo pode ser desempenhado por polímeros estímulo-sensitivos, que podem sofrer transição de fase sol-gel *in situ*, após o contato com o estímulo como pH, temperatura ou íons específicos, induzida pelo ambiente fisiológico (CARVALHO, 2012; QI, et al., 2007).

Polímeros que possuem propriedades de geleificação *in situ* como os derivados do ácido poliacrílico (APA), poloxâmeros e a goma gelana podem ser explorados no desenvolvimento de sistemas com propriedades mucoadesivas, pois estes sistemas ao entrarem em contato com o estímulo fisiológico, aumentam sua viscosidade, contribuindo assim para uma maior retenção da formulação sobre a superfície da mucosa (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; BARREIRO-IGLESIAS; ALVAREZ-LORENZO; CONCHEIRO, 2001; TABERNER et al., 2002; WEBER; MOYERS-GONZÁLEZ; BURGHELEA, 2012). Esta propriedade mucoadesiva pode ser muito vantajosa para ser aplicada no cólon, o qual possui um ambiente fisiológico (pH neutro; temperatura; presença de íons) favorável ao intumescimento destes polímeros, que provocará um aumento da viscosidade, promovendo assim a mucoadesão.

Tendo em vista o potencial das micro/nanossuspensões como estratégia para desenvolver formulações de fármacos com solubilidade pH dependente e reduzir o tamanho da partícula do fármaco, juntamente com as propriedades dos sistemas mucoadesivos em melhorar a eficácia de fármacos que agem nas mucosas ou são absorvidos através delas, este trabalho tem como objetivo desenvolver e caracterizar micro/nanossuspensões com propriedades mucoadesivas para liberação cólon-específica do MTX.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Doenças inflamatórias do trato gastrointestinal: Doença de Crohn e retocolite ulcerativa**

A doença de Crohn e a retocolite ulcerativa são dois tipos de doenças crônicas inflamatórias do trato gastrointestinal, que acometem o cólon, com uma grande incidência na população mundial. As taxas de incidência variam no mundo todo de 0,1 à 16 para doença de Crohn e de 0,5 à 25,5 para retocolite ulcerativa, por 100.000 habitantes (LIU et al., 2015).

Ambas apresentam os mesmos sintomas como diarreia, fezes sanguinolentas, dores abdominais combinadas à perda de peso, febre e carcinomas. Entretanto, elas se diferenciam na manifestação clínica. Na doença de Crohn, a inflamação afeta todo o TGI, atingindo a camada serosa, a camada mais profunda do tecido, sendo o íleo distal o principal local da inflamação. A retocolite ulcerativa atinge o tecido mais superficialmente (camada mais interna), limitando a inflamação às áreas mais próximas do cólon, a partir do reto. Estas patologias podem afetar indivíduos de qualquer idade, embora existe um fator genético que confere uma maior probabilidade do surgimento em jovens adultos, na faixa etária dos 15 aos 35 anos (BOTH et al., 1983; COLLNOT; ALI; LEHR, 2012).

O tratamento das doenças inflamatórias, como a doença de Crohn ou a retocolite ulcerativa, compreende o uso de anti-inflamatórios, corticosteróides, antibióticos e/ou imunossupressores. Os fármacos mais comumente utilizados são o ácido 5-aminossalicílico (5-ASA) e corticosteróides (CHONG; HANAUER; COHEN, 2001; FREIRE, 2006).

O ácido 5-aminossalicílico é o anti-inflamatório mais utilizado para induzir e manter a remissão dessas doenças em seu estágio leve a moderado, e vem sendo aplicado nas formas farmacêuticas de supositórios, enemas ou por via oral, através de comprimidos de liberação controlada (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012; FREIRE, 2006).

Os corticosteróides são utilizados nos tratamentos a curto prazo, devido aos seus efeitos adversos provenientes do seu uso prolongado em terapias de manutenção, limitando assim sua aplicabilidade. Desta forma, em estágios mais graves das doenças, são empregados agentes imunossupressores, tais como azatiopina, ciclosporina e/ou metotrexato (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012; SAIBENI et al., 2012; SHMIDT et al., 2013).

O metotrexato tem sido utilizado para induzir e manter a remissão da doença de Crohn e em pacientes com remissão da retocolite ulcerativa, empregando a terapia por via oral ou intramuscular (BARON; TRUSS; ELSON, 1993; COLLNOT; ALI; LEHR, 2012; MAÑOSA et al., 2011).

A recaída das doenças inflamatórias do trato gastrointestinal, podem ocorrer normalmente em fases com ausência de sintomas. Desta maneira, a principal terapia consiste na indução e manutenção da fase de remissão, para minimizar as recaídas. Assim, os pacientes necessitam fazer uso da medicação por longos períodos, os quais contribuem para causar dependência e severidade dos efeitos adversos.

Outra limitação na terapia é que fármacos administrados pela via oral podem ser absorvidos pelo intestino, ou inativados pelo metabolismo pré-sistêmico antes de chegarem ao cólon, não alcançando o tecido inflamado. Além disso, a dificuldade de se alcançar um tratamento eficiente, também está relacionada com a presença de muco, movimentos peristálticos e outros fatores que tornam difícil a permanência do fármaco no cólon. A presença do muco, constitui uma barreira física, uma vez que nessas doenças ocorre um aumento na produção de muco, formando-se uma camada mais espessa nas áreas de ulceração. Ainda, nas regiões do tecido inflamado encontram-se altas concentrações de proteínas carregadas positivamente, reduzindo a afinidade para substâncias com cargas catiônicas (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012).

Estratégias como o desenvolvimento de sistemas de liberação cólon-específica de fármacos, possibilitam a vetorização e liberação do fármaco para o local ativo da inflamação, melhorando sua biodisponibilidade, reduzindo os efeitos adversos, proporcionando assim benefícios no tratamento das doenças do trato gastrointestinal (EVANGELISTA, 2006; FREIRE, 2006).

## **2.2 Carcinoma colorretal**

O carcinoma colorretal é outro tipo de doença que também acomete o cólon e o reto, sendo considerada umas das neoplasias que mais atinge a população mundial, uma vez que se tornou a terceira principal causa de óbito por câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015; SADANANDAM et al., 2013; SCHWARTZ; BLANKE; PESKO, 2004). Em 2015, estima-se ser diagnosticados cerca de 93.090 casos de câncer de cólon e 39.610 casos de câncer retal (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

A doença na maioria das vezes se dá de forma invasiva e a probabilidade de sobrevivência está fortemente relacionada ao estágio da doença no momento do diagnóstico. A sobrevida para pacientes com o câncer localizado no cólon é de 90%, para os pacientes com metástase envolvendo órgãos e linfonodos próximos do local é de 66%, reduzindo para 9% para as pessoas com metástase para órgãos distantes (SCHWARTZ; BLANKE; PESKO, 2004).

O aparecimento do câncer colorretal pode estar relacionado com a hereditariedade familiar ou não. Este risco é aumentado com as doenças inflamatórias do trato gastrointestinal, a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa. O surgimento do câncer colorretal em pacientes com retocolite ulcerativa chega a 4%. Outros fatores de risco também associados são idade, obesidade e tabagismo (SCHWARTZ; BLANKE; PESKO, 2004).

Os sinais e sintomas do carcinoma colorretal compreendem sangue na fezes, alterações no trânsito intestinal, sangramento no reto, cólicas e dores abdominais, redução do apetite e perda de peso. Estes sinais e sintomas não surgem no estágio inicial da doença, mas em estágios mais avançados, e variam de acordo com tamanho e localização do tumor. Os tumores normalmente localizados no cólon descendente e reto são considerados mais agressivos do que os encontrados no cólon ascendente (SCHWARTZ; BLANKE; PESKO, 2004).

De maneira geral, o tratamento convencional envolve cirurgia conciliada com radioterapia e quimioterapia com antineoplásicos. Os antineoplásicos mais utilizados na terapia isolada ou combinada são: 5-fluorouracil, leucovorina,

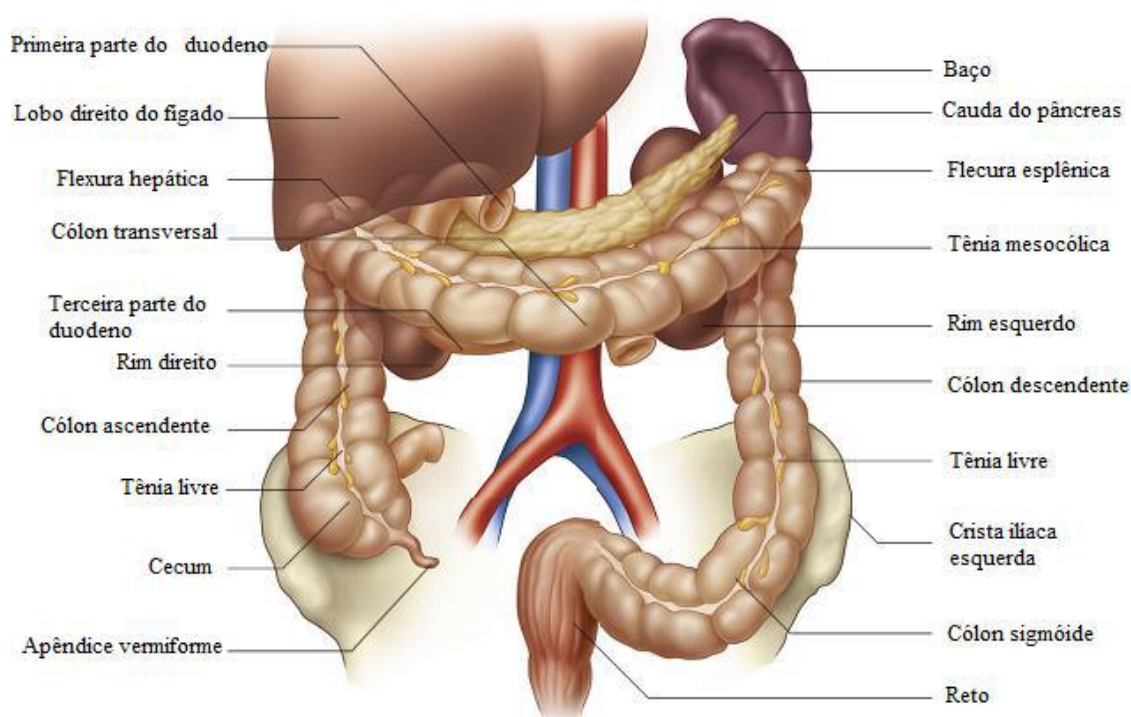
irinotecano e metotrexato (SADANANDAM et al., 2013; SCHWARTZ; BLANKE; PESKO, 2004).

### 2.3 Cólon como local para liberação de fármacos

O cólon está localizado na porção extrema do trato gastrointestinal (TGI), formado pelo apêndice, ceco, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, cólon sigmóide e encontra-se unido ao reto e ânus. É um órgão de aproximadamente 1,5 m, com um diâmetro de cerca de 6,5 cm, totalizando uma área de 0,3 m<sup>2</sup> (ELLIS, 2011; FREIRE et al., 2006; SINHA; KUMRIA, 2003). A anatomia do cólon está representada na Figura 1.

O cólon apresenta funções fundamentais como a absorção de água e eletrólitos para que ocorram a alteração do conteúdo intestinal das fezes, a eliminação destas no tempo adequado, a secreção de potássio e bicarbonato, a secreção de muco para a proteção da parede do cólon e a construção de um ambiente adequado para o crescimento de microrganismos (FREIRE et al., 2006; MARONI et al., 2012).

No cólon encontram-se cerca de 400 espécies distintas de bactérias, em sua maioria anaeróbicas, com uma população que corresponde 10<sup>11</sup> a 10<sup>12</sup> UFC (unidade formadora de colônia). As principais bactérias que constituem mais da metade da flora intestinal, *Bacteróides*, *Bifidobacterium* e *Eubacterium*, são importantes para a produção de enzimas redutoras (azoredutases e nitroredutases) e hidrolíticas (glicosidases). Estas enzimas participam do processo de fermentação de carboidratos e proteínas que não foram digeridos nas porções superiores do TGI (MENEGUIN; CURY; EVANGELISTA, 2014; SINHA; KUMRIA, 2003; YANG, 2008).

**Figura 1- Anatomia do cólon**

(Fonte: ELLIS, 2011).

A parede do cólon é composta por várias camadas. Analisando da camada exterior para interior tem-se a serosa, muscular externa, submucosa e mucosa. A mucosa rósea e úmida do cólon é constituída pela mucosa muscular, a lâmina própria e o epitélio, e sua cavidade interna é chamada de lúmen (FREIRE et al., 2006; SARASIJA; HOTA, 2002).

A superfície da mucosa gastrointestinal é recoberta por muco, que possui propriedades viscoelásticas para sua proteção e lubrificação, e pode constituir uma barreira à difusão do fármaco do lúmen para o epitélio. O muco é constituído por duas camadas, uma fortemente aderida à mucosa (fixa) e a outra próxima ao lúmen (móvel), que pode ser removida com facilidade através da digestão enzimática, erosão ou sucção. A camada de muco no cólon possui espessura  $830 \pm 110 \mu\text{m}$ , porém a camada intimamente aderida à mucosa é de apenas  $116 \pm 51 \mu\text{m}$  (ENSIGN et al., 2012; VARUM et al., 2008). Embora o cólon apresente a maior espessura de muco, a baixa taxa de renovação do muco e a motilidade reduzida, representam condições favoráveis para o

desenvolvimento de sistemas de liberação colônica de fármacos (VARUM et al., 2008; EVANGELISTA, 2006).

O cólon tem sido um órgão alvo para o desenvolvimento de sistemas de liberação específica de fármacos, tanto para o tratamento de patologias locais como sistêmicas, pois apresenta um meio fisiológico menos hostil, com pH mais perto da neutralidade, atividade proteolítica reduzida e tempo de trânsito prolongado (MENEGUIN; CURY; EVANGELISTA, 2014; SINHA; KUMRIA, 2003).

O tratamento de patologias colônicas, como a doença de Crohn, a retocolite ulcerativa e o carcinoma colorretal, podem ser otimizadas com estes sistemas de liberação cólon-específica de fármacos, já que oferecem vantagens na proteção do fármaco contra a degradação, aumento da biodisponibilidade, promoção da liberação do fármaco no local específico, redução da dose e dos efeitos adversos (FREIRE, 2006; PINTO, 2010; SINHA; KUMRIA, 2003).

A absorção de fármacos neste órgão acontece principalmente através do cólon ascendente, em razão da baixa viscosidade do conteúdo intestinal nesta porção. Já no cólon transversal e descendente a absorção do fármaco é restrita, em consequência do aparecimento de gases, reduzida quantidade de água e a solidificação do conteúdo fecal (FREIRE et al., 2006; WILSON, 2010).

A vetorização de fármacos para o cólon representa um grande desafio, uma vez que se faz necessário ultrapassar as porções superiores do TGI, para que o fármaco não seja degradado pelo pH ácido do estômago ou pelas enzimas presentes no intestino delgado (PINTO, 2010; SINHA; KUMRIA, 2003).

Para o desenvolvimento de sistemas de liberação cólon-específica de fármacos, diferentes estratégias podem ser exploradas, baseadas nas características principais deste órgão, como o pH colônico, o tempo de trânsito gastrointestinal, a pressão intraluminal e a microflora colônica (Tabela 1) (EVANGELISTA, 2006; YANG; CHU; FIX, 2002).

**Tabela 1** - Estratégias para o desenvolvimento de sistemas de liberação cólon-específica de fármacos.

| Sistemas de liberação cólon-específica de fármacos | Propriedades                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sistemas tempo-dependentes                         | A liberação do fármaco é dependente do tempo de esvaziamento gástrico. Utilização de polímeros gastrorresistentes. Apresenta limitações, em virtude da variação dos tempos de retenção gástrica, associadas ao estado de alimentação (FREIRE et al., 2006).                                                                               |
| Sistemas pH-dependentes                            | Exploram as mudanças de pH ao longo do TGI para liberação do fármaco, utilizando polímeros com solubilidade dependente do pH. Apresenta limitações, devido à similaridade de pH entre o intestino delgado e o cólon e as variações inter/intra individual relacionadas à quadros patológicos (FREIRE et al., 2006; YANG; CHU; FIX, 2002). |
| Sistemas degradáveis pela microflora colônica      | Promovem a liberação do fármaco através do metabolismo bacteriano e atividade enzimática presentes no cólon. Ocorre principalmente a fermentação de polissacarídeos pelas bactérias presentes no cólon (EVANGELISTA, 2006; YANG; CHU; FIX, 2002).                                                                                         |
| Pró-fármacos                                       | Moléculas farmacologicamente inativas são transformadas em moléculas farmacologicamente ativas, através de enzimas da microflora bacteriana. A clivagem das ligações entre o fármaco e o transportador ocorre através da ação metabólica da microflora bacteriana (reações de redução e hidrólise) (SINHA; KUMRIA, 2003).                 |

## 2.4 Via retal para liberação de fármacos

A via retal têm sido explorada para liberação de fármacos, principalmente fármacos que sofrem metabolismo pré-sistêmico e apresentam baixa biodisponibilidade pela via oral, pois possibilita o aumento da concentração do fármaco no sítio de ação ou a absorção de fármacos (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012; NUNES; SARMENTO; NEVES, 2014).

Apresenta diversas vantagens como baixa atividade enzimática, altas concentrações de fármaco podem ser administradas, rápido efeito farmacológico e pode ser utilizada em pacientes inconscientes (NUNES; SARMENTO; NEVES, 2014).

A via retal é muito utilizada no tratamento de doenças do cólon com o objetivo de aumentar a concentração do fármaco no local de ação, resultando na diminuição de dose e frequência de administração, e consequentemente na redução dos efeitos adversos. O fármaco é administrado nas formas farmacêuticas de soluções, suspensões e emulsões e nas formas de géis, cremes e pomadas. As formas farmacêuticas líquidas permitem uma fácil administração e um melhor alcance do fármaco no reto, podendo atingir porções superiores do cólon, porém, podem escorrer causando um desconforto para o paciente, além da absorção imprecisa do fármaco (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012; NUNES; SARMENTO; NEVES, 2014).

O sistema de liberação de fármaco adequado para administração via retal deve ser facilmente aplicado, e portanto ter baixa viscosidade para permitir a extrusão do sistema através do dispositivo, além de assegurar a administração do fármaco para o interior do reto, atingindo o colón. Isto pode ser alcançado com a utilização de polímeros que possuem capacidade de geleificação *in situ* e sofrem transição de fase sol-gel após o contato com a mucosa. Desta maneira, sistemas com propriedades mucoadesivas têm sido explorados para administração retal, devido sua capacidade de promover um contato mais íntimo entre o sistema e a mucosa colônica, aumentando o tempo de permanência do fármaco no local de ação. (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012; HE; KIM; LEE, 2008; NUNES; SARMENTO; NEVES, 2014).

## **2.5 Metotrexato**

O metotrexato (MTX), também denominado de ametofterina, foi sintetizado pela primeira vez em 1940 como antagonista do ácido fólico e pertence a classe dos antimetabólicos. Ele é um ácido dicarboxílico orgânico fraco e apresenta solubilidade pH-dependente. Esta solubilidade encontra-se maior em pH básico, estando essencialmente na forma aniônica, sendo um obstáculo para atravessar a membrana celular. Deste modo, necessita do mesmo transportador do folato para entrar nas células (PRASAD, 2007; RUBINO, 2001; GRIM; CHLÁDEK; MARTÍNKOVÁ, 2003).

O MTX possui propriedades anti-inflamatória, antiproliferativa e imunossupressora. É um fármaco citotóxico com atividade antineoplásica muito utilizado no tratamento de vários tipos de neoplasias, tais como leucemia, osteosarcoma, câncer de mama, bexiga, cabeça, pescoço e carcinoma colorretal. Como agente imunossupressor, o MTX vem sendo comumente usado no transplante de órgãos, na terapia de artrite reumatóide e psoríase (MCGUIRE, 2003; MORALES et al., 2005; PRASAD et al., 2007; RUBINO, 2001).

Na terapia da artrite reumatóide, o MTX foi empregado provavelmente devido seus mecanismos anti-inflamatórios como a inibição da proliferação de linfócitos e a diminuição da produção de citocinas inflamatórias (CHAN; CROSTEIN, 2002; GRIM; CHLÁDEK; MARTÍNKOVÁ, 2003).

Para o tratamento da psoríase ele tem sido utilizado desde 1960, em razão do seu mecanismo de ação imunossupressor através da inibição da síntese de DNA em células imunocompetentes (GRIM; CHLÁDEK; MARTÍNKOVÁ, 2003; MARQUES, 2009; PRASAD et al., 2007).

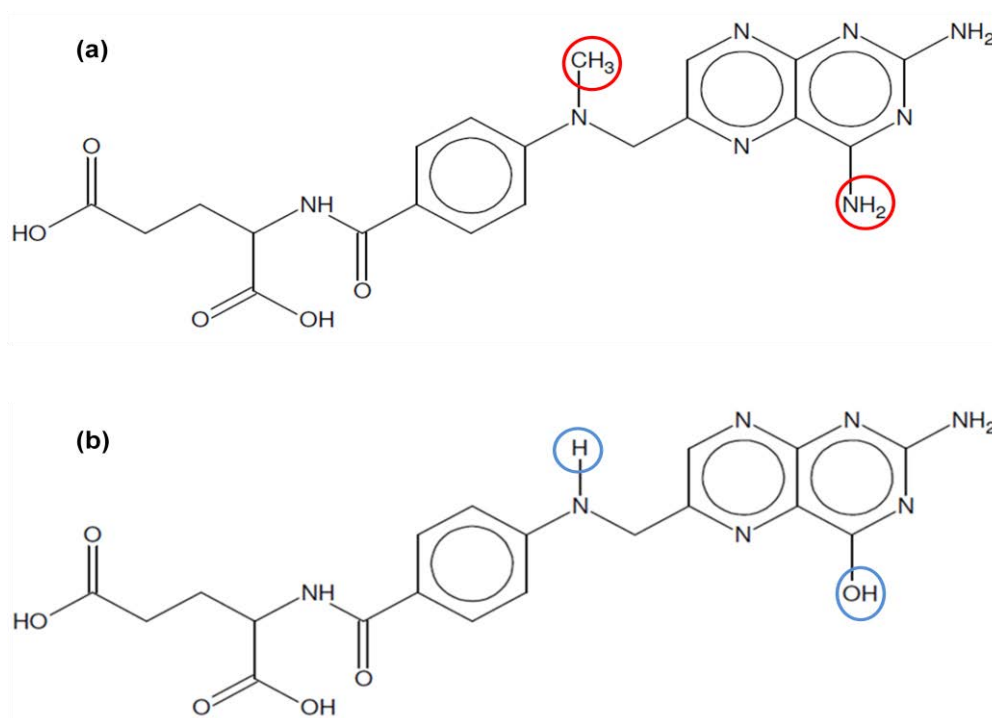
Nos últimos 10 anos, o MTX vem sendo utilizado na terapia de doenças inflamatórias do intestino, como a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa em consequência da sua elevada atividade anti-inflamatória (SCHRODER; STEIN, 2003).

O MTX também é um fármaco de escolha para o tratamento de doenças oftálmicas como o linfoma intraocular primário (PIOL) e a uveíte, doença inflamatória ocular (SARTORI, 2007).

### **2.5.1 Propriedades Físico-químicas do MTX**

O MTX é um pó cristalino amarelo ou laranja, quase insolúvel em água e solventes orgânicos (etanol, clorofórmio e éter) e solúvel em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos e de carbonatos. Sua massa molar é de 454,4 g/mol e seu ponto de fusão encontra-se entre 182 a 189°C (FARMACOPÉIA, 2012; SARTORI, 2007).

Possui solubilidade aquosa pH dependente, alterando de 0,9 mM em pH 5 para 20 mM em pH 7. A estrutura química do MTX é composta por um anel heterocíclico (anel pterina 2,4-diamino-substituído), unido a uma porção *p*-aminobenzoil que, está ligada a uma unidade do ácido glutâmico. Essa molécula apresenta dois grupos carboxílicos com as constantes de dissociação (pka) de 3,36 ( $\alpha$ -carboxil) e 4,70 ( $\gamma$ -carboxil), sem contar com uma diversidade de funções nitrogenadas, potencialmente protonadas, sendo possivelmente o grupamento N-1 guanídico do anel pterina (pka 5,71) a mais básica. A diferença estrutural do MTX em comparação a seu análogo ácido fólico, está na substituição do grupo hidroxila por um grupo amina no C2 e a adição do grupo metila no N10, como indicado na Figura 2 (RUBINO, 2001).

**Figura 2** - Estrutura química do metotrexato (a) e do ácido fólico (b).

### 2.5.2 Mecanismo de ação do MTX

O mecanismo de ação do MTX está relacionado com a interferência no metabolismo do ácido fólico, atuando como um inibidor competitivo reversível da enzima dihidrofolato redutase (DHFR), responsável por converter dihidrofolatos em tetrahidrofolatos. A inibição reduz a presença de folatos na forma reduzida, prejudicando a síntese de DNA e RNA, impedindo a proliferação e a divisão celular das células tumorais, levando a morte celular. O MTX apresenta propriedade antiproliferativa em altas concentrações (CARRETERO et al., 2010; GRIM; CHLÁDEK; MARTÍNKOVÁ, 2003; MCGUIRE, 2003; RUBINO, 2001; SCHORODER; STEIN, 2003).

A atividade antiinflamatória, em baixas concentrações ocorre em razão da poliglutamação (formação de poliglutamatos intracelulares), levando ao aumento da produção de adenosina, que é um potente mediador anti-inflamatório endógeno. Também em baixas concentrações, o MTX possui ação

imunossupressora, inibindo a proliferação de linfócitos (CD3 e CD4) e outras células imunocompetentes (monócitos, macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares) (CARRETERO et al., 2010; GRIM; CHLÁDEK; MARTÍNKOVÁ, 2003; SCHRODER; STEIN, 2003).

### **2.5.3 Farmacocinética e Toxicidade**

As vias de administração do MTX comumente utilizadas são: oral, subcutânea, intramuscular, intravenosa e intratecal (SCHRODER; STEIN, 2003). O MTX é administrado por via oral, na forma farmacêutica de comprimido, em dose única semanal de 10-25 mg ou 2,5 mg em intervalos de 12 horas, três vezes por semana. A dose pela via intramuscular ou intravenosa é única de 10-25 mg uma vez por semana. Após atingir a resposta terapêutica efetiva, a dose do MTX necessita de ajuste e redução, devido sua toxicidade ser dose-dependente. Alguns de seus efeitos adversos são hepatotoxicidade, depressão da medula óssea, leucopenia, trombocitopenia, mucosite, anemia, estomatite ulcerativa, náuseas e distensão abdominal (PRASAD, 2007; RUBINO, 2001; SCHRODER; STEIN, 2003).

Baixas doses de MTX (<25 mg/m<sup>2</sup> de superfície corporal) apresenta uma rápida absorção no trato gastrointestinal, porém em doses elevadas (3 g/m<sup>2</sup>) exibe uma absorção irregular e biodisponibilidade variável, necessitando de administração parenteral (RUBINO, 2001).

Na circulação sanguínea, o MTX é distribuído nos tecidos corporais de forma rápida, podendo se concentrar no fígado e rins, sendo eliminado do sangue, apresentando uma farmacocinética trifásica, com  $t_{1/2}$  de absorção de 10 minutos, distribuição cerca de 2 horas e eliminação por volta de 8 horas.

Cerca de 30 a 70 % do MTX no sangue encontra-se ligado as proteínas plasmáticas, principalmente albumina (RUBINO, 2001).

Os metabólitos produzidos pelo MTX são 4-amino-4desoxi-N<sup>10</sup>-ácido metilpteroico (DAMPA), 7-hidroxi-metotrexato e poliglutamatos. O DAMPA é gerado na flora intestinal, enquanto o 7-hidroxi-metotrexato é convertido no

fígado através da metabolização hepática (CHAN; CROSTEIN, 2002; RUBINO, 2001; SCHRODER; STEIN, 2003).

Devido aos seus efeitos adversos associados a altas doses e sua solubilidade pH dependente, torna-se necessário a busca por novos sistemas de liberação para o MTX, que possibilite modular e controlar sua liberação, melhorando assim sua eficácia terapêutica.

#### **2.5.4 Sistemas de liberação contendo MTX**

Sistemas de liberação controlada de fármacos podem oferecer vantagens como, direcionamento do fármaco para sítios específicos, manutenção da concentração plasmática, proteção do fármaco contra processos de degradação, diminuição na frequência de administração, redução dos efeitos adversos e melhora na adesão do paciente ao tratamento (EVANGELISTA, 2006).

A Tabela 2 apresenta alguns sistemas de liberação contendo MTX, as vias de administração, objetivos e os principais resultados alcançados.

**Tabela 2** - Sistemas de liberação contendo MTX destacando as vias de administração empregadas, objetivos e os principais resultados alcançados.

| Sistemas de liberação contendo MTX                                                     | Vias de administração | Objetivos                                                                                                    | Principais resultados                                                                                      | Referências Bibliográficas             |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Microesferas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) carregadas de MTX       | Subcutânea            | Empregar PLGA como um carreador de fármaco, visando aumentar a eficácia antitumoral do MTX.                  | Liberação controlada do MTX, manutenção da concentração plasmática por um período adequado.                | SINGHI; UDUPA, 1997.                   |
| Hidrogéis de monômeros de ácido acrílico e acrilamida e Microemulsões O/A e A/O de MTX | Tópica                | Aumentar a eficácia na liberação do MTX, para tratamento da psoríase.                                        | Aumento da concentração do MTX na pele, na qual foram identificadas quantidades significativas do fármaco. | ALVAREZ-FIGUEROA; BLANCO-MÉNDEZ, 2001. |
| Lipossomas deformáveis de MTX                                                          | Tópica                | Preparar lipossomas deformáveis, objetivando aumentar a penetração cutânea do MTX no tratamento da psoríase. | Aumento da permeação cutânea de MTX.                                                                       | TROTTA, 2004.                          |
| Nanocápsulas de PLA (ácido poli-D,L-láctico) e PLA-PEG (ácido poli-D,L-láctico-co-     | Ocular tópica         | Desenvolver com PLA e PLA-PEG um sistema carreador de MTX para                                               | Melhora da permeação do MTX através da córnea e aumento da sua                                             | FARIA; CAMPOS;                         |

|                                                                                            |                |                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                |                       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| polietilenoglicol) contendo MTX                                                            |                | os tecidos intraoculares.                                                                                             | concentração nos tecidos oculares.                                                                                                                                             | SENNA, 2005.          |
| Nanopartículas de poli-butilcianocrilato revestidas com polissorbato 80 carregadas com MTX | Intravenosa    | Avaliar a influência de diferentes diâmetros de partículas no transporte do MTX através da barreira hematoencefálica. | Aumento do transporte do MTX através da barreira hematoencefálica em ratos, melhorando assim a concentração do fármaco nos tecidos cerebrais.                                  | GAO; JIANG, 2006.     |
| Nanopartículas de MTX conjugadas à albumina humana                                         | Não mencionada | Avaliar a citotoxicidade em células tumorais.                                                                         | Aumento do efeito citotóxico em linhagem de células tumorais T47D, obtendo uma maior atividade anti-tumoral do MTX.                                                            | TAHERI et al., 2011.  |
| Nanopartículas de quitosana/ciclodextrina                                                  | Não mencionada | Desenvolver sistema carreador para fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos.                                              | Liberação prolongada do MTX.                                                                                                                                                   | JINGOU et al., 2011.  |
| Implantes poliméricos contendo poli ( $\epsilon$ -caprolactona (PCL) e MTX                 | Subcutânea     | Avaliar a liberação sustentada do MTX, a partir de implantes em tumores sólidos de ratos.                             | Liberação controlada e sustentada do MTX, com redução do crescimento do tumor, o regresso das áreas de necrose do tumor, além da diminuição dos efeitos colaterais sistêmicos. | PEREIRA et al., 2014. |
| Carreadores lipídicos                                                                      | Transdérmica   | Avaliar o potencial de carreadores                                                                                    | Aumento da liberação e permeação                                                                                                                                               | PINTO et al.,         |

---

|                                   |                                                                                 |                                                                                    |       |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| nanoestruturados (NLCs) de<br>MTX | lipídicos como sistema carreador de<br>MTX no tratamento tópico da<br>psoríase. | cutânea de MTX, revelando sua<br>capacidade em atravessar as barreiras<br>da pele. | 2014. |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------|

---

## 2.6 Micro/nanossuspensões

As micro/nanossuspensões são formadas a partir da redução do tamanho das partículas do fármaco, que normalmente são estabilizadas com uso de tensoativos ou polímeros, ou uma combinação de ambos. Elas podem ser preparadas por dois métodos conhecidos por *Top-down*, que esta relacionada com a quebra das partículas maiores ou *Bottom-up*, através da precipitação química (RABINOW, 2004; VERMA; GOKHALE; BURGESS, 2009).

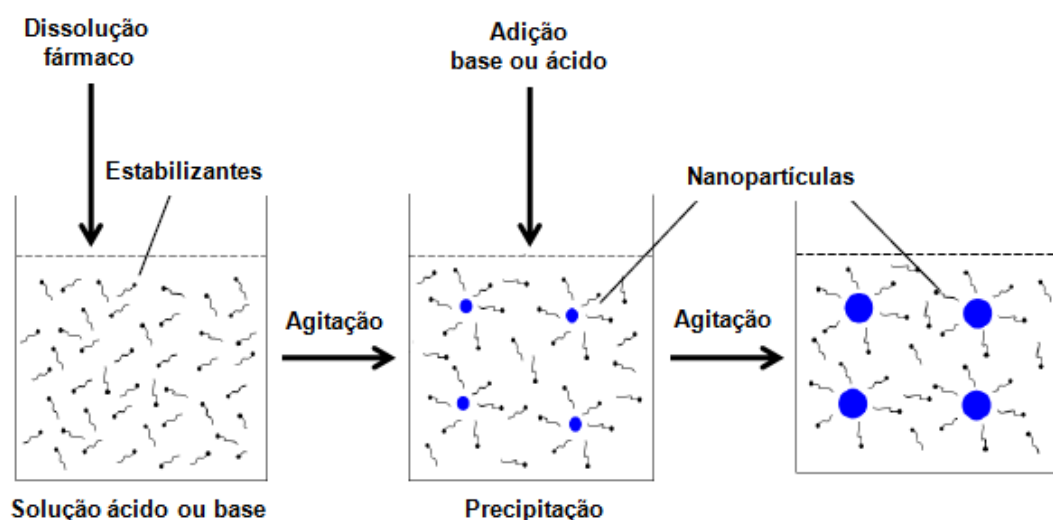
O processo por *Top-down* envolve a redução do tamanho das partículas do fármaco por meio de técnicas como moagem, microfluidização e homogeneização de alta pressão (RABINOW, 2004; VERMA; GOKHALE; BURGESS, 2009).

A moagem úmida e o homogeneização de alta pressão são métodos amplamente explorados, os quais possuem eficiência na produção de partículas pequenas, não havendo a necessidade do uso de solventes orgânicos, tornando-se mais viável para indústria. Desta maneira, existe um grande número de patentes e produtos comercialmente produzidos por essas técnicas. Entretanto, essas técnicas envolvem uma alta energia, gerando um calor que inviabiliza a produção de materiais termolábeis, podendo ocasionar degradação química. Além disso, a alta quantidade de energia pode produzir partículas amorfas e deformações nos cristais. Outra limitação destas técnicas está na capacidade de redução do tamanho da partícula, uma vez que o processo necessita de muito tempo e energia para a redução das partículas para um tamanho abaixo de 100 nm (CHEN et al., 2008; SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013; VERMA; GOKHALE; BURGESS, 2009).

No processo *Bottom-up*, também conhecido como precipitação química, as partículas são formadas a partir do estado molecular. Este método baseia-se na precipitação das partículas a partir de uma solução supersaturada do fármaco. Essa precipitação do fármaco pode ser produzida através dos métodos de cristalização, evaporação do solvente, fluido supercrítico,

precipitação química e precipitação antissolvente, em que o fármaco é dissolvido num solvente orgânico e, em seguida, é precipitado pela adição de um antissolvente. Em casos em que o fármaco tem solubilidade pH dependente, a precipitação pode ser realizada por reações ácido-base, nas quais o fármaco é dissolvido numa solução básica ou ácida na presença de estabilizantes, e logo depois é precipitado pela adição de um ácido ou base, respectivamente (Figura 3) (CHEN et al., 2008; RABINOW, 2004; SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013; VERMA; GOKHALE; BURGESS, 2009).

**Figura 3** - Representação da precipitação química através de reações de ácido-base para a produção de nanopartículas de fármaco.



Adaptado de: CHEN et al., 2008.

O método *Bottom-up* necessita de baixa energia, sendo interessante para materiais termolábeis, além de utilizar equipamentos simples e baratos. Os métodos *Bottom-up* e *Top-down* podem ser utilizados em combinação para obtenção de partículas menores e mais estáveis (CHEN et al., 2008; SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013; VERMA; GOKHALE; BURGESS, 2009).

Nas micro/nanossuspensões, o uso de polímeros como estabilizantes é fundamental para o controle do tamanho das partículas. Além disso, a adsorção do polímero na superfície da partícula provoca a inibição do crescimento do cristal e evita a aglomeração das partículas através da barreira repulsiva, tornando o sistema estável (RABINOW, 2004). Esta estabilização é fortemente influenciada pelas propriedades destes polímeros, como o comprimento das cadeias poliméricas e a presença de grupos funcionais (THORAT; DALVI, 2012; VERMA; GOKHALE; BURGESS, 2009). Os grupos de polímeros comumente utilizados são: polímeros iônicos, que estabilizam as partículas pelo mecanismo de repulsão eletrostática e os polímeros não iônicos, que proporcionam um impedimento estérico. Uma combinação dos polímeros iônicos e não iônicos pode ser utilizada, uma vez que estes mecanismos eletrostáticos e estéricos se completam (RABINOW, 2004).

A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e o poloxâmero 407 (P407), são polímeros não iônicos amplamente utilizados como estabilizantes na produção de micro/nanossuspensões, como tem sido relatado na literatura (CHEN et al., 2008; DENG; HUANG; LIU, 2010; MOU et al., 2011; VERMA; GOKHALE; BURGESS., 2009).

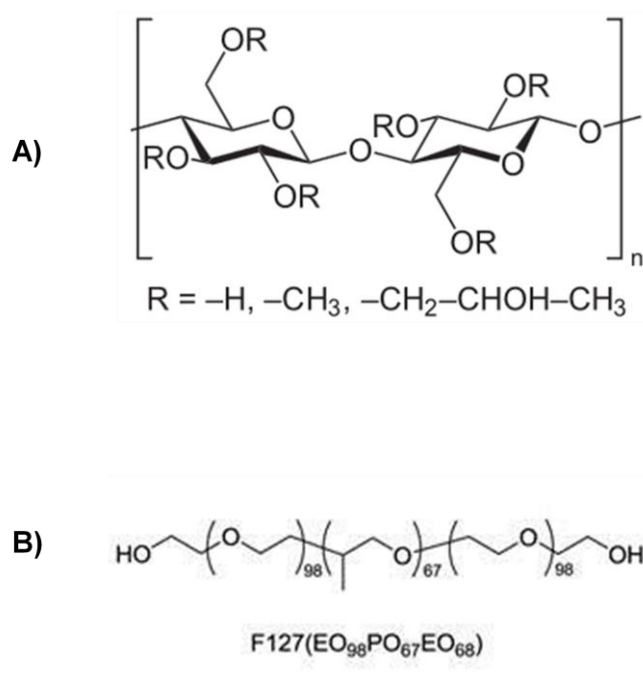
O HPMC é um polímero hidrofílico, derivado do éter de celulose utilizado nas micro/nanossuspensões como estabilizante estérico, devido sua capacidade de adsorção sobre a superfície das partículas, formando uma barreira física entre elas, evitando assim que ocorra sua agregação. Esta estabilização estérica está relacionada com a estrutura do HPMC ser de cadeia aberta (BOSE et al., 2012; GHOSH et al., 2011; SIEPMANN; PEPPAS, 2012). Além disso, o HPMC permite a formulação de uma micro/nanossuspensão mais viscosa, favorecendo na redução da taxa de sedimentação (SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013; WANG et al., 2013).

O P407 é um copolímero de bloco, composto de óxido de etileno (OE) e óxido de propileno (OP), utilizado como estabilizante devido a sua propriedade tensoativa de reduzir a tensão interfacial. A adsorção do tensoativo nas partículas, reduz as forças hidrofóbicas, levando a redução do crescimento das partículas e evitando sua agregação. O P407 é utilizado como estabilizante nas micro/nanossuspensões em concentrações abaixo da concentração micelar

crítica (CMC), pois acima desta concentração ele possui a capacidade de formar micelas. Além disso, acima da CMC, o P407 pode favorecer a solubilização do fármaco (DUMORTIER et al., 2006; SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013; WANG et al., 2013).

A estrutura química dos estabilizantes HPMC e P407 estão apresentadas na Figura 4.

**Figura 4** - Estrutura química hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (A) e poloxâmero 407 (P407) (B).



A vantagem das nanossuspensões está na diminuição do tamanho da partícula do fármaco, que promove o aumento da taxa de liberação do fármaco. Além disso, um tamanho menor de partícula pode levar ao aumento da mucoadesão, em razão das partículas micro/nanométricas favorecem a penetração no muco. Desta forma, estas nanopartículas podem ficar aderidas às áreas inflamadas do cólon, podendo ampliar o tempo de permanência do fármaco neste órgão (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012; RABINOW, 2004).

## **2.7 Sistemas mucoadesivos**

A bioadesão pode ser determinada como um estado em que dois materiais, no qual pelo menos um é de natureza biológica, sejam mantidos em contato por um período prolongado, através de forças interfaciais (SMART, 2005). Quando a ligação adesiva ocorre no muco, o fenômeno é descrito como mucoadesão, mas estes termos podem ser intercambiáveis, uma vez que é difícil diferenciar se a interação acontece na superfície celular ou na camada de muco (PARK; ROBINSON, 1984; SMART, 2005).

Os sistemas mucoadesivos são uma potencial ferramenta para favorecer a liberação do fármaco em um sítio alvo, em virtude de promover o contato íntimo entre o sistema e a mucosa, aumentando o tempo de residência e o gradiente de concentração local, contribuindo assim para o aumento da permeabilidade e biodisponibilidade do fármaco (HÄGERSTRÖM; EDSMAN; STRØMME, 2003; SMART, 2005).

As mucosas são caracterizadas por uma camada epitelial, recoberta por muco constituído por glicoproteínas, lipídios, sais inorgânicos e mais de 95% de água, possuindo uma elevada hidratação. A mucina é a glicoproteína que proporciona uma estrutura de gel ao muco. A principal função do muco é proteger e lubrificar o epitélio, podendo proporcionar funções adicionais decorrente do tipo de epitélio que estará recobrindo. Sua espessura varia de 800 µm no TGI, para abaixo de 1 µm na cavidade oral (SMART, 2005).

A presença do muco e dos movimentos ciliares responsáveis pela depuração mucociliar podem dificultar a difusão do fármaco através da mucosa, além de reduzir sua permanência na mucosa. Dessa maneira, os sistemas de liberação mucoadesivos permitem promover um aumento do tempo de retenção e como consequência, aumentam a absorção e/ou o efeito local do fármaco, otimizando sua ação (CARVALHO et al., 2010; SMART, 2005).

Algumas teorias elucidam o fenômeno de mucoadesão, tais como atração eletrostática, difusão e interpenetração das cadeias poliméricas, força

de adesão da ligação mucoadesiva, adsorção, molhabilidade e fratura. Porém, estas teorias de forma individual, não são capazes de explicar o fenômeno complexo de mucoadesão, sendo assim, elas devem ser consideradas complementares para compreender a interação do muco com o substrato biológico (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; CARVALHO, 2012; SMART, 2005).

O processo de mucoadesão está diretamente relacionado com as propriedades mucoadesivas dos polímeros, como o grau de reticulação, presença de grupos funcionais e comprimento das cadeias poliméricas (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009). Os mecanismos de mucoadesão podem ocorrer através de ligações hidrofóbicas, eletrostáticas e de hidrogênio entre o polímero e a mucina e também pelo aumento da viscosidade promovido por estímulo fisiológico (CARVALHO, 2012; PARK; ROBINSON, 1984).

Existem diversos polímeros capazes de responder aos estímulos fisiológicos, como os polímeros estímulo-sensitivos, que podem sofrer transição de fase sol-gel *in situ*, após o contato com a mucosa. Esta transição ocorre devido à alterações físicas ou químicas, em resposta ao pH, temperatura ou presença de íons induzida pelo ambiente fisiológico (CARVALHO 2012; QI et al., 2007).

Os polímeros derivados do ácido poliacrílico (APA), poloxâmeros e goma gelana são responsivos ao estímulo fisiológico e geleificam quando entram em contato com pH, temperatura ou íons, respectivamente (AGUILAR et al., 2007; HE; KIM; LEE, 2008).

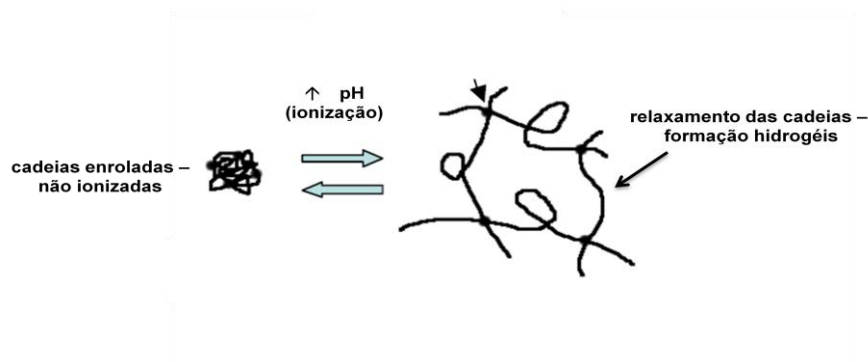
### **2.7.1 Polímeros derivados do ácido poliacrílico (APA)**

Os polímeros derivados do ácido poliacrílico (APA), como os carbopois, possuem propriedades de intumescimento e dissolução pH dependentes, que podem ser exploradas no desenvolvimento de sistemas mucoadesivos. Estes sistemas, ao entrarem em contato com o pH neutro, sofrem geleificação *in situ* aumentando a viscosidade, o que contribui para um aumento do tempo de

residência da formulação no local de ação e/ou absorção (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; AGUILAR et al., 2007; HE; KIM; LEE, 2008).

As moléculas destes polímeros em pH ácido encontram-se não ionizadas e como um conjunto de cadeias enoveladas, resultando numa dispersão não intumescida. Com o aumento do pH, ocorre a ionização dos grupos carboxílicos, havendo uma repulsão das cargas negativas ao longo da cadeia do polímero. Deste modo, ocorre o relaxamento das cadeias poliméricas formando uma rede acompanhada com aumento da viscosidade, resultando na formação de hidrogéis (Figura 5) (AGUILAR et al., 2007; BARREIRO-IGLESIAS; ALVAREZ-LORENZO; CONCHEIRO, 2001; TABERNER et al., 2002; WEBER; MOYERS-GONZÁLEZ; BURGHELEA, 2012).

**Figura 5** - Representação do mecanismo de formação do hidrogél do APA.



(Fonte: adaptado de: AGUILAR et al., 2007).

As propriedades mucoadesivas pH-dependente do APA, podem ser vantajosas para aplicação no cólon, o qual possui um ambiente fisiológico, favorável ao intumescimento destes polímeros, que provocará um aumento da viscosidade, promovendo assim a mucoadesão do sistema.

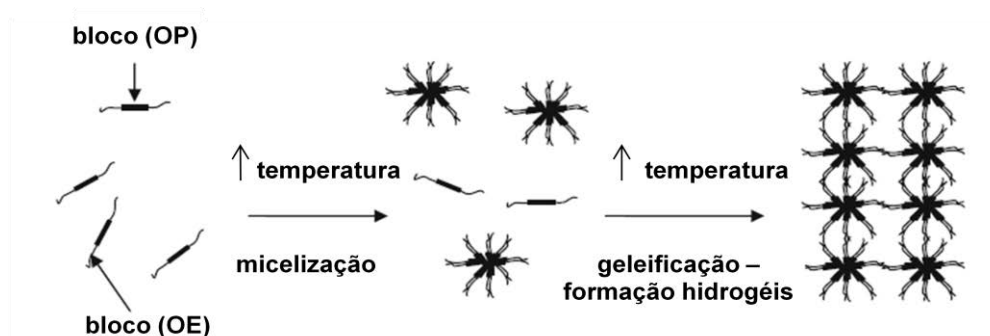
### 2.7.2 Poloxâmero 407

O P407 é um copolímero de bloco, anfifílico constituído por óxido de etileno (OE) e óxido de propileno (OP), ordenados em cadeia com estrutura tribloco ( $\text{OE}_x\text{-OP}_y\text{-OE}_x$ ), e comercialmente encontra-se disponível principalmente como Pluronic® F127 (ALEXANDRIDIS, 1996; DUMORTIER et al., 2006).

O P407 apresenta propriedade de geleificação termorreversível, em consequência da transição de fase sol-gel próximo da temperatura fisiológica (37 °C). Essa geleificação, que ocorrerá micelização (formação de micelas) é dependente da concentração do polímero que deverá estar acima da concentração micelar crítica (CMC) (DUMORTIER et al., 2006; AGUILAR et al., 2007).

Assim, o processo de geleificação ocorre quando, em soluções aquosas, e concentrações acima da CMC, as moléculas do P407 se organizam em micelas com o aumento da temperatura. Essa formação de micelas leva ao aumento da viscosidade, resultando em hidrogéis (Figura 6). Além de altas concentrações do polímero (~20% p/v), a geleificação também é influenciada pelo comprimento das cadeias de OE e OP (DUMORTIER et al., 2006; AGUILAR et al., 2007).

**Figura 6** - Representação do mecanismo de geleificação do poloxâmero 407.



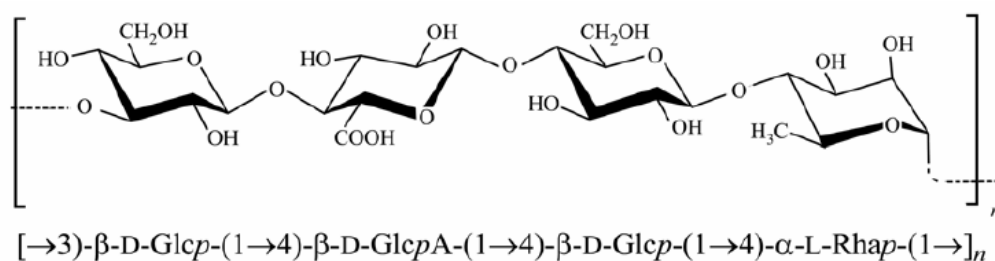
(Fonte: adaptado de DUMORTIER et al., 2006).

Além das suas propriedades termorresponsível e mucoadesiva, o P407 têm sido amplamente utilizado em sistemas de liberação de fármacos para administração nasal, ocular, vaginal e retal, devido o caráter anfifílico deste polímero, podendo incorporar fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos (DUMORTIER et al., 2006; HE; KIM; LEE, 2008).

### 2.7.3 Goma gelana

A goma gelana é um polissacarídeo natural (aniônico), secretado pela bactéria *Pseudomonas elodea*. Possui uma estrutura constituída de unidades repetidas de  $\alpha$ -L-ramnose,  $\beta$ -D-glicose e  $\beta$ -D-ácido glucurônico nas proporções 1:2:1. Na sua forma nativa, contém dois substituintes acila (L-gliceril e L-acetil), que podem ser removidos por hidrólise alcalina, produzindo a gelana desacetilada ou de baixa acetilação (Figura 7) (HÄGERSTRÖM, 2003; OSMALEK; FROELICH; SYLWIA, 2014).

**Figura 7** - Estrutura da goma gelana e seus substituintes L-gliceril e L-acetil.

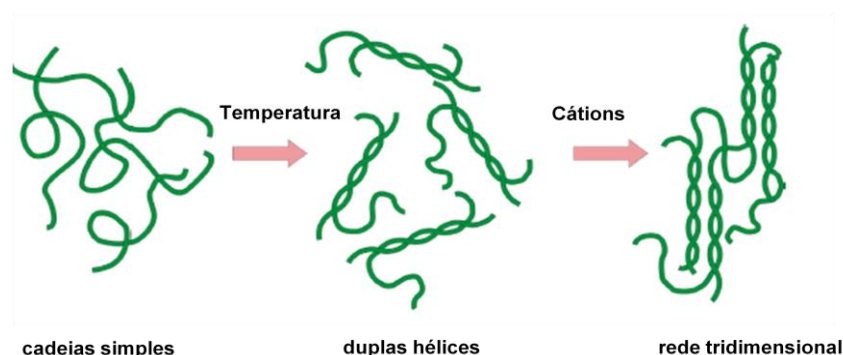


(Fonte: HÄGERSTRÖM, 2003).

O mecanismo de formação de hidrogel de goma gelana é influenciado pela força iônica, presença de cátions e temperatura. A geleificação através da temperatura envolve a presença de cadeias simples, em estado desordenado,

que após o resfriamento, essas cadeias ordenam-se em duplas hélices, resultando em hidrogéis termorreversíveis. Além disso, essas cadeias em dupla hélice sofrem complexação com cátions e formação de ligações de hidrogênio com a água, formando uma rede tridimensional (Figura 8) (HÄGERSTRÖM, 2003; NARKAR; SHER; PAWAR, 2010; YAMAMOTO, 2006).

**Figura 8** - Representação do mecanismo de formação do hidrogél de gelana.



(Fonte: adaptado de adaptado de MIYOSHI et al., 1996).

A goma gelana apresenta características importantes como, atoxicidade, biodegradabilidade, capacidade de retenção de água, geleificação na presença de cátions e propriedades mucoadesivas. Assim, estas propriedades promissoras da goma gelana vem sendo exploradas no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, principalmente destinados à administração oral, nasal e oftálmica (HÄGERSTRÖM, 2003; OSMALEK; FROELICH; SYLWIA, 2014). Além disso, estudos relataram a utilização da goma gelana para administração retal (EL-KAMEL; EL-KHATIB, 2006).

### 3. OBJETIVOS

Desenvolver e caracterizar micro/nanossuspensões contendo polímeros com propriedades mucoadesivas e estímulo-sensitivas para administração cólon específica do MTX.

#### 3.1 Etapas

- ✓ Determinar o equilíbrio de solubilidade do MTX em diferentes pH.
- ✓ Determinar as concentrações de base e ácido, mais adequadas para a preparação das micro/nanossuspensões.
- ✓ Investigar os processos (*Bottom-up* ou *Top-down*) para a obtenção das micro/nanossuspensões.
- ✓ Selecionar o agente estabilizante.
- ✓ Caracterizar as propriedades físico-químicas das micro/nanossuspensões.
- ✓ Avaliar a incorporação dos polímeros mucoadesivos nas micro/nanossuspensões.
- ✓ Avaliar a mucoadesão das micro/nanossuspensões.
- ✓ Avaliar o perfil de liberação do MTX.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Materiais**

#### **4.1.1 Matérias-primas**

- ✓ Ácido clorídrico (Quemis, Indaiatuba-SP, Brasil);
- ✓ Água purificada (Milli Q);
- ✓ Carbopol® ETD 2020 e Ultrez 10 NF (Lubrizol, Cleveland, EUA);
- ✓ Cloreto de sódio (NaCl) (Synth®);
- ✓ Fosfato de potássio monobásico (Quemis);
- ✓ Hidróxido de sódio (Grupo Química);
- ✓ Hidroxipropilmetilcelulose (Sigma, Steinhein, Alemanha);
- ✓ Metotrexato (Fermion, Finlândia)
- ✓ Poloxâmero P407 (Sigma, Aldrich, Brasil);
- ✓ Goma gelana (Kelcogel®);

#### **4.1.2 Equipamentos**

- ✓ Analisador de textura TA-XTplus, Stable Micro System®, Surrey, Inglaterra;
- ✓ Aquecedor e agitador magnético Fisatom 752A, São Paulo, Brasil;
- ✓ Balança digital Ohaus AS200, Fiocham Park, EUA;
- ✓ Centrífuga Labnet, modelo Spectrafuge 16M;
- ✓ Dissolutor Hanson Research®, SR-8 Plus;
- ✓ Espectrofotômetro de UV-VIS, Hewlett Packard 8453, com HP UV-Visible Chemstation Software;

- ✓ Homogeneizador de alta pressão EmulsiFlex C3, Avestin, Inc, Ottawa, Canadá;
- ✓ Homogeneizador de tubos, modelo AP22, Phoenix;
- ✓ Lavadora Ultrassônica Unique, Indaiatuba, Brasil;
- ✓ Microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-7500F);
- ✓ Peagômetro Digimed DM23, São Paulo, Brasil;
- ✓ Sistema de purificação de água Millipore, Milli-Q Plus;
- ✓ Ultraturrax Turratec TE-102, Tecnal, Piracicaba, Brasil;
- ✓ Sonicador QSonica Sonicator, Ultrasonic Processor Q700, U.S.A;
- ✓ Zetasizer nano series, Malvern, Worcestershire, Inglaterra;

## **4.2 MÉTODOS**

### **4.2.1 Desenvolvimento de métodos espectrofotômico para avaliação do MTX**

### **4.2.2 Avaliação do equilíbrio de solubilidade do MTX em meios aquosos com diferentes valores de pH**

A solubilidade do MTX foi determinada nos meios HCl 0,1 M (pH 3 e 4) e tampão fosfato 20 mM (pH 5,5; 7; 9 e 11), pelo método de solubilidade no equilíbrio (TONG e WEN, 2008). As amostras foram preparadas adicionando MTX em excesso nos meios com diferentes valores de pH, a fim de garantir a saturação. Estas amostras foram submetidas a agitação em homogeneizador de tubos durante 24 h e, em seguida, centrifugadas a 14000 rpm, durante 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado através de filtros de membrana de acetato de celulose 0,45 µm e as amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV-VIS para a determinação da concentração do MTX nos respectivos meios. Foram utilizadas as curvas analíticas obtidas para cada meio.

#### **4.2.3 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do MTX em meios com diferentes valores de pH**

A fim de verificar o comprimento de onda no qual o fármaco apresenta seu pico de máxima absorção nos meios ácidos (HCl 0,1 M pH 3 e 4) e nos meios tamponados (20 mM pH 5,5; 7; 9 e 11), soluções de MTX a 10 µg/mL nos respectivos meios, foram submetidas à varredura na região entre 200 e 400 nm, em espectrofotômetro UV-VIS.

#### **4.2.4 Construção das curvas analíticas**

Foram construídas curvas analíticas de MTX nos diferentes meios testados HCl 0,1 M (pH 3 e 4) e tampão fosfato 20 mM (pH 5,5; 7; 9 e 11). A partir de soluções estoque contendo 100 µg/mL do fármaco, foram preparadas diluições com concentrações variando de 1 a 30 µg/mL, em triplicata.

#### **4.2.5 Quantificação do MTX nas micro/nanossuspensões por espectrofotometria UV-VIS**

A validação foi realizada seguindo os parâmetros especificidade, seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Farmacopeia Americana e Conferência Internacional de Harmonização (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2011). Foram validadas duas metodologias para a quantificação do MTX em diferentes meios: meio ácido HCl 0,1 M e tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8).

#### **4.2.6 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do MTX na região do UV**

Soluções de MTX na concentração de 10 µg/mL em HCl 0,1 M (pH 1,2) e tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8), foram submetidas a varredura na região de 200 a 400 nm, em espectrofotômetro UV-VIS para obtenção do comprimento de onda, no qual o fármaco apresenta seu pico de máxima absorção.

#### **4.2.7 Linearidade**

A linearidade do método foi determinada a partir da curva analítica do MTX em HCl 0,1 M e tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8). A partir de soluções estoque de MTX a 100 µg/mL, foram preparadas diluições em diferentes concentrações (1; 2,5; 5; 10; 15; 20; 25 e 35 µg/mL) em triplicata. A curva analítica foi obtida através do cálculo da regressão linear entre o valor de absorbância e a concentração do fármaco em µg/mL.

#### **4.2.8 Precisão**

A precisão do método foi avaliada em três níveis de concentração da curva analítica, sendo baixa (2,5 µg/mL), média (15 µg/mL) e alta (25 µg/mL), as quais foram preparadas em triplicata no mesmo dia e também em dias diferentes para analisar a repetibilidade (precisão intra-corrída) e a precisão intermediária (precisão inter-corrída).

#### **4.2.9 Exatidão**

A exatidão foi avaliada através de três diferentes concentrações, baixa (2,5 µg/mL), média (15 µg/mL) e alta (25 µg/mL), contemplando o intervalo linear do método. A exatidão foi calculada pela relação percentual entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica, a partir da Eq. 1:

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{C}{C_0} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

onde: C é a média da concentração experimental e  $C_0$  é a concentração teórica.

#### 4.2.10 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados a partir de três curvas analíticas construídas com as concentrações decrescentes do fármaco, calculado através das Eq. 2 e 3:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (\text{Equação 2})$$

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad (\text{Equação 3})$$

em que o  $DP_a$  é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e IC é o coeficiente angular da curva analítica.

#### **4.2.11 Especificidade e Seletividade**

A especificidade e seletividade demonstram a capacidade do método em analisar o MTX na presença de outros componentes da formulação, que poderiam interferir na sua determinação.

Para averiguar a interferência da presença dos estabilizantes HPMC e P407 na quantificação do MTX nas micro/nanossuspensões, a especificidade e seletividade foram determinadas pela comparação de espectros de absorção da solução de MTX nos meios HCl 0,1M e tampão fosfato 0,1M (pH 6,8), com espectros das micro/nanossuspensões na presença e ausência destes estabilizantes. Para tanto, as micro/nanossuspensões foram centrifugadas a 14000 rpm durante 15 minutos. Deste sobrenadante foi retirado 1mL e transferido para balões de 10 mL e o volume foi completado com os respectivos meios. As amostras foram então analisadas de acordo com a metodologia validada para cada meio testado.

Além disso, com o objetivo de avaliar a interferência dos polímeros mucoadesivos na quantificação do MTX, a especificidade e seletividade também foi determinada pela comparação dos espectros de absorção da solução de MTX contaminadas com 100 µg/mL de goma gelana, poloxâmero 407 e carbopol ETD 2020, com os espectros de absorção da solução de MTX sem a presença destes polímeros nos meios analisados (HCl 0,1 M e tampão fosfato pH 6,8).

#### **4.3 Preparo das suspensões de MTX**

As suspensões de MTX foram preparadas com a adição do estabilizante (HPMC) em soluções aquosas de HCl 1M, em diferentes razões molares em relação ao MTX, 1:1; 2:1 e 3:1 (HCl:MTX). A mistura foi mantida sob agitação magnética sem aquecimento, até a completa solubilização do estabilizante utilizado nas proporções 1:1; 0,5:1; 0,25:1; 0:1 (p/p), em relação à massa de

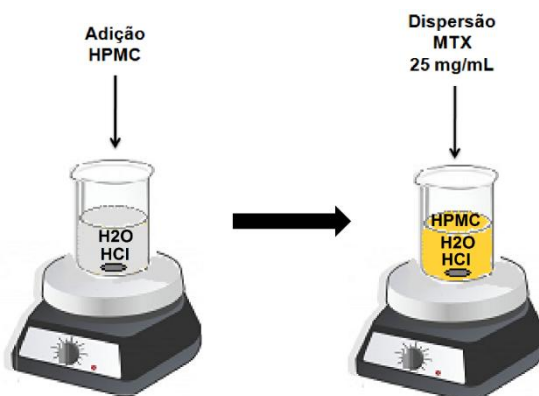
fármaco, que foi incorporado logo em seguida na concentração de 25 mg/mL. Na Figura 9 encontra-se um esquema da obtenção das suspensões de MTX.

As suspensões foram denominadas conforme a proporção molar de HCl em relação ao MTX (1:1; 2:1; 3:1) e a proporção de HPMC em relação ao MTX (1:1; 0,5:1; 0,25:1; 0:1), como mostrado na Tabela 3. Como a proporção de fármaco é fixa, tanto em relação ao HPMC como em relação ao HCl, nas nomenclaturas das suspensões (S) foram representadas apenas as proporções do ácido (A) e do estabilizante (H), respectivamente.

**Tabela 3** - Nomenclatura das suspensões de MTX e proporções de HCl e HPMC testadas.

| HCl:MTX (M/M) | HPMC:MTX (p/p) |         |          |       |
|---------------|----------------|---------|----------|-------|
|               | 1:1            | 0,5:1   | 0,25:1   | 0:1   |
| 1:1           | SA1H1          | SA1H0,5 | SA1H0,25 | SA1H0 |
| 2:1           | SA2H1          | SA2H0,5 | SA2H0,25 | SA2H0 |
| 3:1           | SA3H1          | SA3H0,5 | SA3H0,25 | SA3H0 |

**Figura 9** - Representação esquemática da obtenção das suspensões de MTX.



#### **4.3.1 Preparo das micro/nanossuspensões por Bottom-up utilizando Ultra turrax**

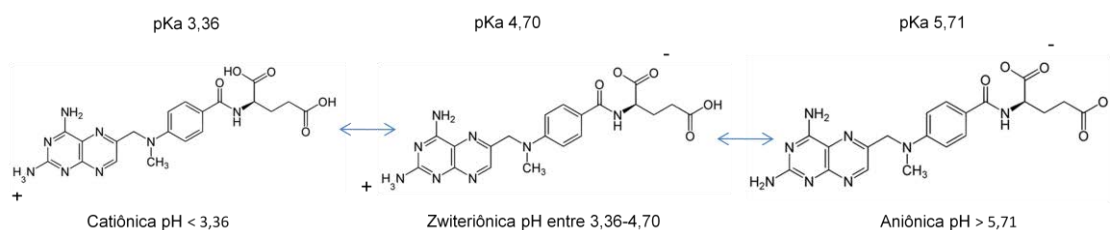
A obtenção das micro/nanossuspensões foi realizada pelo processo *Bottom-up*, com a precipitação do MTX, no qual as partículas são formadas a partir do estado molecular. Para isso, o fármaco foi dissolvido numa solução básica, seguida da adição do estabilizante, e depois foi precipitado pela adição de um ácido. Estas etapas estão detalhadamente descritas a seguir.

#### **4.3.2 Solubilização do MTX**

O MTX foi dissolvido em solução aquosa de NaOH 1M (pH 10), na razão molar de 1 MTX: 2 NaOH, para garantir a solubilização do fármaco. A mistura foi mantida sob agitação magnética até a completa dissolução do fármaco, seguida da adição do estabilizante. O estabilizante (HPMC) foi adicionado nas proporções 1:1; 0,5:1; 0,25:1; 0:1 (p/p) em relação à massa de fármaco.

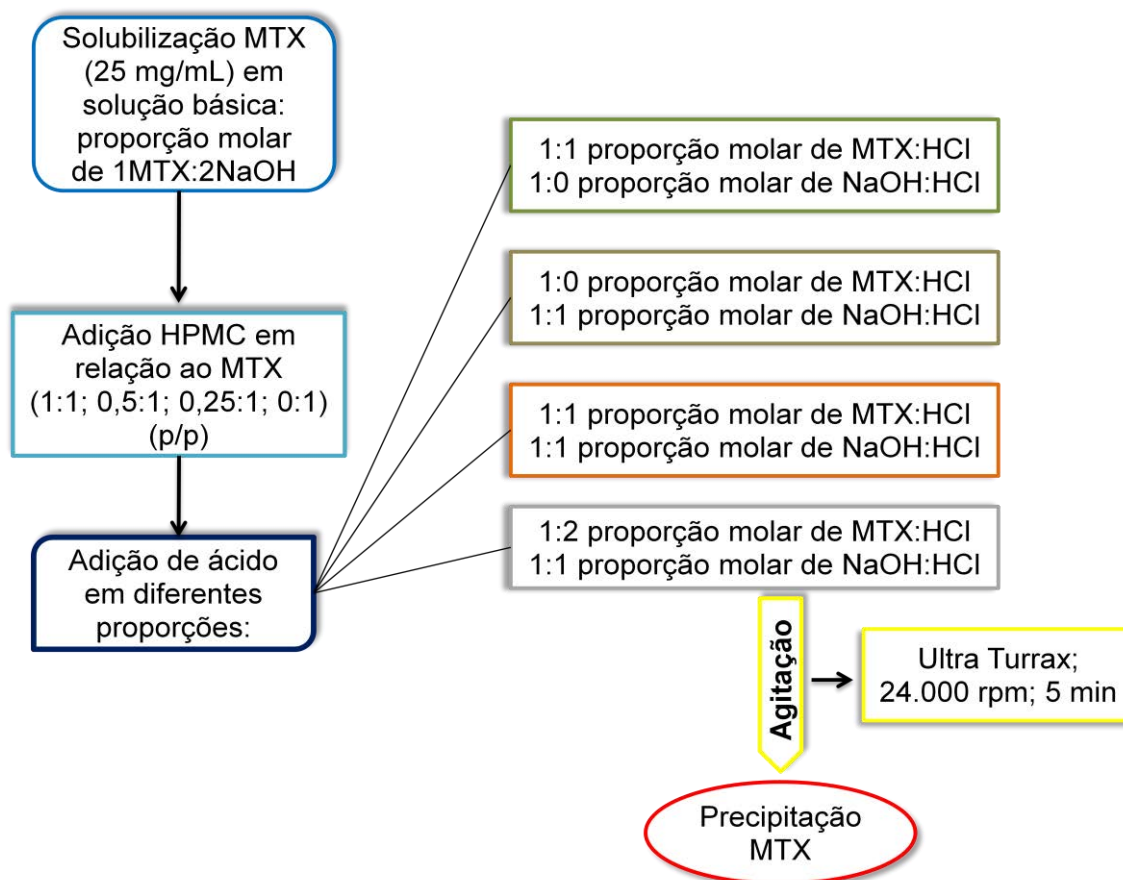
#### **4.3.3 Obtenção das partículas por precipitação química**

O MTX apresenta diferentes formas iônicas, dependendo do pH da solução, como indicado na Figura 10. Dado que o MTX possui alta solubilidade em solução alcalina, sua precipitação pode ser alcançada pela adição de um ácido.

**Figura 10** - Comportamento de ionização do MTX.

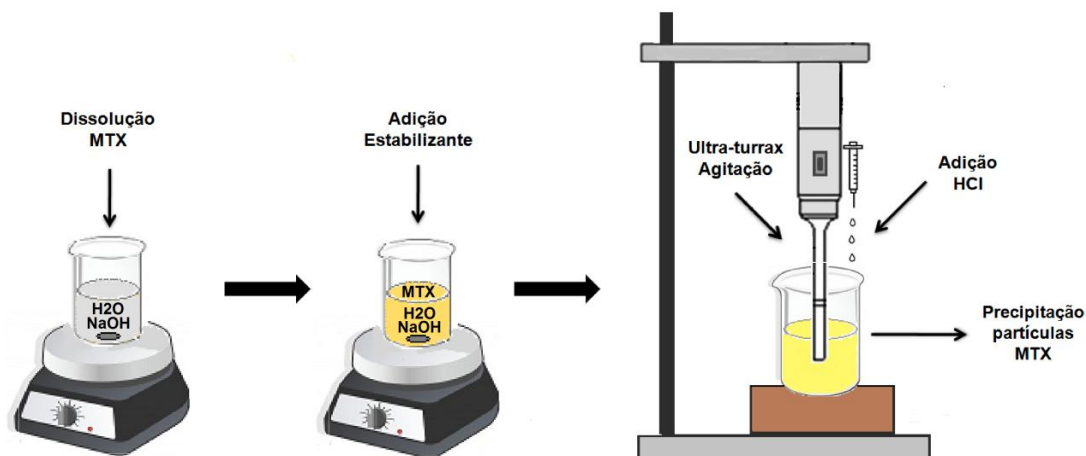
Foram testadas várias condições de precipitação utilizando HCl. Desta forma, após a solubilização do fármaco foi adicionado HCl em diferentes proporções molares em relação ao MTX (0:1; 1:1; 2:1), para que ocorresse a neutralização dos dois grupos carboxílicos. Além disso, foi necessário neutralizar também a base utilizada no processo de dissolução do fármaco, empregando-se desta maneira um maior volume de HCl, respeitando a relação molar de NaOH presente no sistema. A Figura 11 apresenta o esquema do preparo das micro/nanossuspensões.

**Figura 11** - Preparo das micro/nanossuspensões por precipitação química através de reações ácido-base, utilizando HCl em diferentes proporções molares.



Para adição do HCl, foi preparado uma solução na concentração de 1 M, e o volume adicionado foi calculado de acordo com as proporções molares especificadas acima. Este volume foi adicionado no sistema mantido sob agitação em Ultra Turrax (Turratec TE-102, Tecnal, Piracicaba, Brasil), a 24.000 rpm por 5 min. Na Figura 12 encontra-se um esquema do processo de obtenção das micro/nanossuspensões.

**Figura 12** - Esquema do preparo das micro/nanossuspensões por Bottom-up obtidas com Ultra turrax.



As micro/nanossuspensões foram denominadas conforme a proporção molar de  $HCl$  em relação ao  $MTX$  (0:1; 1:1; 2:1), proporção molar de  $HCl$  em relação ao  $NaOH$  (0:1; 1:1) e a proporção de HPMC em relação ao  $MTX$  (1:1; 0,5:1; 0,25:1; 0:1) (p/p), como mostrado na Tabela 4. Como a proporção de fármaco é fixa, tanto em relação ao HPMC como em relação ao  $HCl$ , nas nomenclaturas das micro/nanossuspensões (N) foram representadas apenas as proporções do ácido (A) e do estabilizante (H), respectivamente. Desta forma, a amostra  $N(A0+1)H1$  contém: 0:1 proporção molar de  $HCl$  em relação ao  $MTX$ , 1:1 proporção molar de  $HCl$  em relação ao  $NaOH$  e 1:1 concentração de HPMC em relação ao  $MTX$ .

**Tabela 4** - Nomenclatura das micro/nanossuspensões com diferentes proporções de HCl e HPMC testadas para precipitação e estabilização, respectivamente.

| HCl:MTX<br>(M/M) | HCl:NaOH<br>(M/M) | HPMC:MTX (p/p) |             |              |           |
|------------------|-------------------|----------------|-------------|--------------|-----------|
|                  |                   | 1:1            | 0,5:1       | 0,25:1       | 0:1       |
| 0:1              | 1:1               | N(A0+1)H1      | N(A0+1)H0,5 | N(A0+1)H0,25 | N(A0+1)H0 |
| 1:1              | 0:1               | N(A1+0)H1      | N(A1+0)H0,5 | N(A1+0)H0,25 | N(A1+0)H0 |
| 1:1              | 1:1               | N(A1+1)H1      | N(A1+1)H0,5 | N(A1+1)H0,25 | N(A1+1)H0 |
| 2:1              | 1:1               | N(A2+1)H1      | N(A2+1)H0,5 | N(A2+1)H0,25 | N(A2+1)H0 |

#### 4.3.4 Estudo de otimização das condições de solubilização e precipitação do MTX por Bottom-up

O objetivo deste estudo foi reduzir as quantidades de NaOH e HCl utilizadas no processo de solubilização e precipitação do fármaco no método *Bottom-up*.

Inicialmente, para a solubilização do MTX foi utilizado 2,2 mL de solução de NaOH 1M. Porém, foi verificado experimentalmente que com 1,8 mL de base, já ocorria a solubilização do fármaco. A partir desta quantidade utilizada de NaOH testou-se várias proporções de HCl em relação à base. Desta maneira, no preparo das micro/nanossuspensões por *Bottom-up*, estas quantidades reduzidas de base e ácido também foram estudadas.

As amostras foram denominadas de acordo com a proporção de ácido em relação a base e a proporção de HPMC em relação ao MTX (1:1; 0:1) (p/p), e as proporções foram representadas pelas letras (A) e (H), respectivamente. Nas nomenclaturas das micro/nanossuspensões (N), a quantidade de base (1,8 mL) foi representada apenas com a letra (B) (Tabela 5).

**Tabela 5** - Nomenclatura das micro/nanossuspensões produzidas por Bottom-up utilizando proporções reduzidas de base e ácido.

| NaOH 1M (mL) | (HCl:NaOH) | HCl 1M (mL) | HPMC:MTX (p/p) |             |
|--------------|------------|-------------|----------------|-------------|
|              |            |             | 1:1            | 0:1         |
| 1,8          | 0,5:1      | 0,9         | N(A0,9+B)H1    | N(A0,9+B)H0 |
| 1,8          | 0,7:1      | 1,4         | N(A1,4+B)H1    | N(A1,4+B)H0 |
| 1,8          | 0,8:1      | 1,5         | N(A1,5+B)H1    | N(A1,5+B)H0 |
| 1,8          | 1:1        | 1,8         | N(A1,8+B)H1    | N(A1,8+B)H0 |

#### 4.3.5 Preparo das micro/nanossuspensões por Bottom-up utilizando Sonicador

Na obtenção das micro/nanossuspensões utilizando o sonicador diversos parâmetros foram avaliados, como o volume de formulação, posição da haste de sonicação, proporções de fármaco e estabilizante (MTX:HPMC), tempo e amplitude de sonicação. Na Figura 13 está disposto o esquema do processo de obtenção das micro/nanossuspensões no sonicador, e na Tabela 6 os parâmetros testados.

**Figura 13** - Esquema do preparo das micro/nanossuspensões por Bottom-up obtidas no Sonicador.

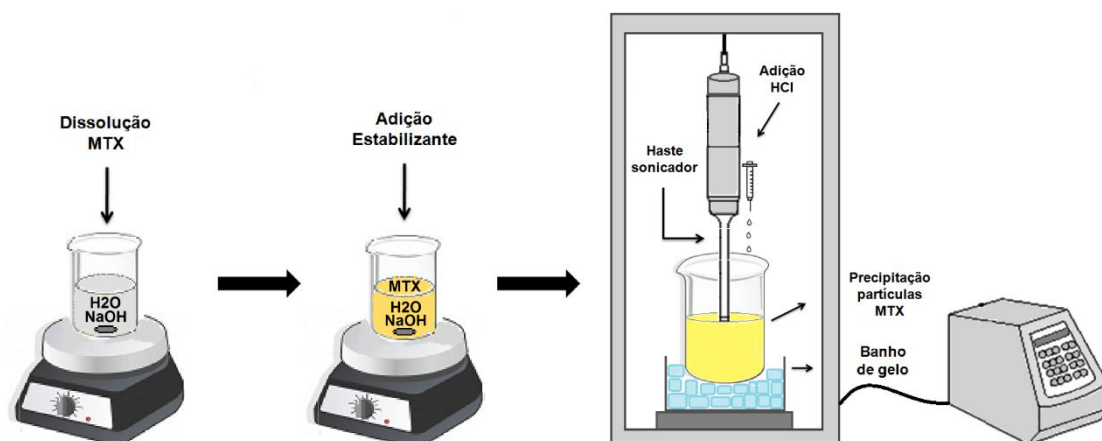


**Tabela 6** - Parâmetros testados para a obtenção das micro/nanossuspensões utilizando o sonificador.

| Parâmetros testados | Estudos avaliados:   |                               |                       |                    |                                                      |
|---------------------|----------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------|------------------------------------------------------|
|                     | Volume de formulação | Posição da haste de sonicação | Proporção de MTX:HPMC | Tempo de sonicação | Amplitude de sonicação                               |
| Volume              | 5; 10 e 40 mL        | 40 mL                         | 40 mL                 | 40 mL              | 40 mL                                                |
| Posição             | Superfície           | Superfície/ Meio              | Superfície            | Superfície         | Superfície                                           |
| MTX:HPMC            | 1:1 e 1:0,5          | 1:1 e 1:0,5                   | 1:2; 1:1 e 1:0,5      | 1:1 e 1:0,5        | 1:1 e 1:0,5                                          |
| Tempo               | 4 min                | 4 min                         | 4 min                 | 3; 5 e 10 min      | 4 min                                                |
| Amplitude           | 10 e 15              | 15                            | 15                    | 15                 | Aumento gradual (7-15) e Fixa (15)/<br>(10; 15 e 20) |

#### 4.3.6 Estudo do efeito estabilizante do poloxâmero 407

Com objetivo de avaliar o efeito do polímero P407 como estabilizante nas micro/nanossuspensões obtidas com Ultra turrax e Sonicador, foram utilizados as concentrações de 1; 2,5 e 5% de polímero em relação ao volume total de formulação.

As micro/nanossuspensões foram denominadas conforme a proporção molar de HCl em relação ao MTX (1:1), proporção molar de HCl em relação ao NaOH (1:1) e a concentração de P407 em relação ao volume de formulação (1; 2,5; 5%). Nas nomenclaturas das micro/nanossuspensões foram representadas apenas as proporções do ácido (A) e do estabilizante (P), respectivamente (Tabela 7).

**Tabela 7** - Nomenclatura das micro/nanossuspensões, contendo diferentes proporções de P407 testadas para estabilização.

|               |                | P407% (p/v) |             |           |
|---------------|----------------|-------------|-------------|-----------|
| HCl:MTX (M/M) | HCl:NaOH (M/M) | 1%          | 2,5%        | 5%        |
| 1:1           | 1:1            | N(A1+1)P1   | N(A1+1)P2,5 | N(A1+1)P5 |

#### 4.3.7 Variação da concentração de MTX no preparo das micro/nanossuspensões por sonicação

Neste estudo foi verificado o emprego de concentrações menores de MTX (15; 10 e 5 mg/mL) no preparo das micro/nanossuspensões utilizando o Sonicador. O estabilizante HPMC foi testado na proporção de 1:1 em relação a massa de fármaco e o P407 nas concentrações de 2,5% e 5% em relação ao volume total de formulação.

---

#### **4.4 Caracterização físico-química das suspensões e micro/nanossuspensões**

##### **4.4.1 Análise do tamanho das partículas**

O diâmetro médio e a distribuição granulométrica das partículas das suspensões e micro/nanossuspensões foram determinadas por espalhamento de luz, utilizando o equipamento Zetasizer nano series, Malvern, Worcestershire, Inglaterra. As amostras foram diluídas (1:9 v/v) em água Milli-Q para a realização das medidas.

##### **4.4.2 Medida do potencial zeta**

A determinação da carga de superfície das partículas foi realizada pela medida do potencial zeta utilizando o equipamento Zetasizer nano series, Malvern, Worcestershire, Inglaterra. As amostras foram diluídas (1:9 v/v) em água Milli-Q para a realização das medidas.

##### **4.4.3 Avaliação da redispersabilidade**

A redispersabilidade das suspensões e micro/nanossuspensões foram avaliadas visualmente. As amostras permaneceram em repouso durante 24 horas, em seguida foram agitadas manualmente para a análise do processo de redispersão e coleta de dados através de fotos.

##### **4.4.4 Estudos de morfologia das micro/nanossuspensões**

O estudo da morfologia das partículas das micro/nanossuspensões obtidas foi realizado por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) em equipamento Jeol JSM-7500F. Para a análise, as amostras foram secas sobre alumínio no dessecador e após foram recobertas com uma camada fina de carbono.

#### **4.4.5 Avaliação do MTX nas partículas das micro/nanossuspensões**

Este teste foi realizado para avaliar o MTX nas partículas das micro/nanossuspensões através do método *Bottom-up*. Para tanto, as micro/nanossuspensões foram centrifugadas a 14000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante foi filtrado em membrana de acetato de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$ . O fármaco solúvel foi quantificado em espectrofotômetro UV-VIS utilizando a curva analítica previamente obtida e validada.

#### **4.5 Preparo das micro/nanossuspensões por Top-down associadas ou não ao processo Bottom-up**

Com a finalidade de explorar uma técnica complementar para a redução do tamanho das partículas, o *Top-down* foi empregado na obtenção das micro/nanossuspensões de MTX, associadas ou não ao processo *Bottom-up*.

Para o preparo das micro/nanossuspensões, foi utilizado o equipamento homogeneizador de alta pressão EmulsiFlex C3, Avestin, Inc, Ottawa, Canadá. Diferentes pressões (500; 1000 e 1400 bar) e ciclos (5; 10 e 15) de homogeneização foram avaliados para determinar e otimizar as melhores condições de homogeneização. Os parâmetros avaliados foram diâmetro médio e a polidispersão (Pdl) das partículas.

#### **4.6 Estabilidade física das micro/nanossuspensões**

Para avaliar a estabilidade, as micro/nanossuspensões foram produzidas e mantidas em frascos de vidro âmbar, fechados, armazenados a 25 °C e protegidos da luz. Os parâmetros avaliados foram o tamanho médio das partículas e a polidispersão (Pdl) no dia do preparo, 24 horas e 7 dias depois.

#### **4.7 Avaliação da adição dos polímeros mucoadesivos nas micro/nanossuspensões**

Os polímeros poloxâmero 407 (15% p/v) e os derivados do ácido poliacrílico (APA) carbopol Ultrez e ETD2020 (3% p/v) foram adicionados diretamente nas micro/nanossuspensões (N(A1+1)H1; N(A1+1)P5) previamente preparadas, sob agitação magnética até a dispersão total dos polímeros. Já a goma gelana (2% p/v) foi dispersa em água a 50 °C, sob agitação magnética até a completa homogeneização. Em seguida a dispersão de goma gelana foi adicionada nos sistemas.

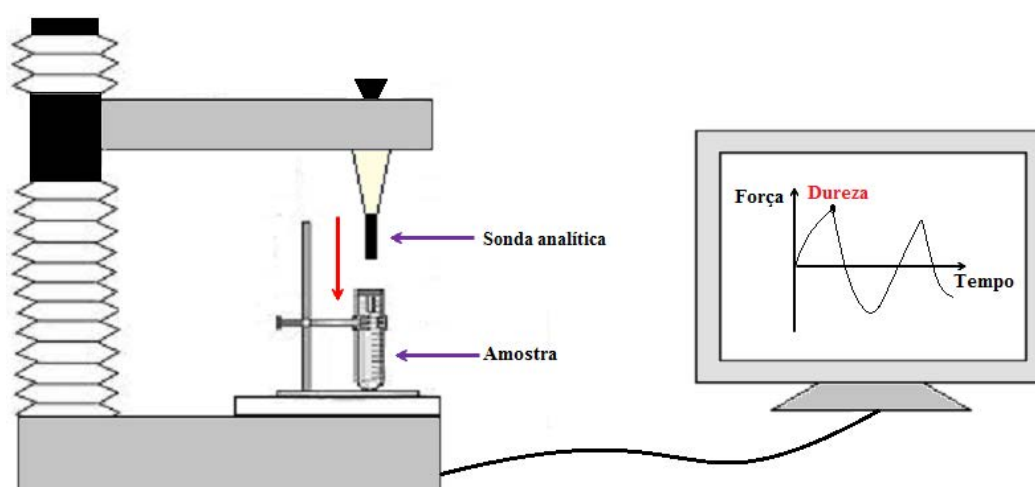
#### **4.8 Avaliação das propriedades mecânicas das micro/nanossuspensões com os polímeros mucoadesivos**

As propriedades mecânicas das micro/nanossuspensões na presença dos polímeros mucoadesivos, foram determinadas utilizando um analisador de textura *TA-XT plus*, através do modo TPA (*Texture profile analysis*).

As amostras (8g) foram cuidadosamente colocadas em tubos de centrífuga de fundo cônico, para evitar a introdução de ar na amostras e mantidas em repouso durante 24 horas. Antes da análise os tubos foram mantidos em banho a 37 °C, para simular a temperatura fisiológica. As análises foram realizadas em quintuplicata.

O teste de TPA baseia-se em dois ciclos de compressão da amostra, através de uma sonda analítica (10 mm), que penetra na amostra a uma profundidade de 10 mm, numa velocidade de 0,5 mm/s, com um intervalo de 5 s entre os dois ciclos de compressão. A partir do gráfico de força *versus* tempo (Figura 14), construído pelo software *Texture Exponent Lite*, foram obtidos os valores de dureza, adesividade e coesividade.

**Figura 14** - Representação esquemática do analisador de textura TA-XT plus, para realização do teste TPA (Texture profile analysis).



## 4.9 Ensaios *ex vivo* de mucoadesão

### 4.9.1 Avaliação da força mucoadesiva

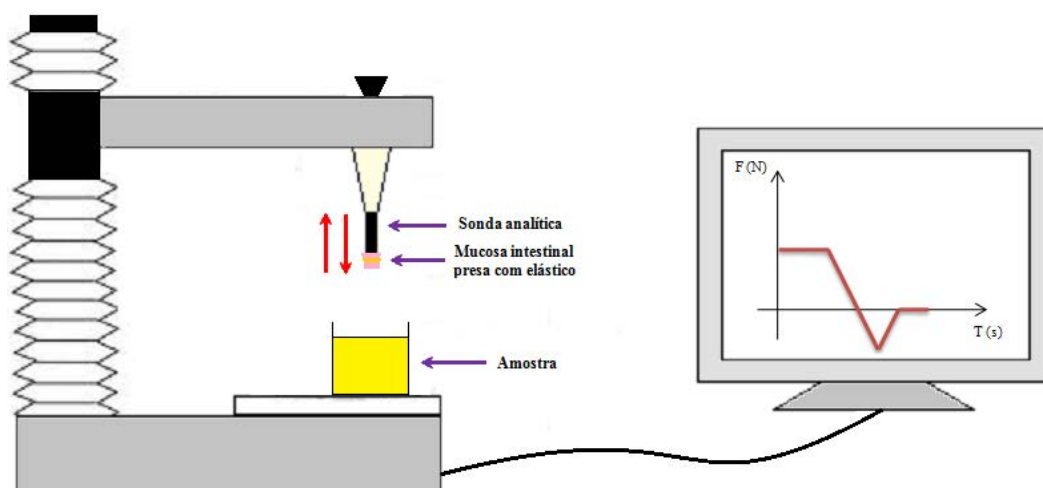
A mucoadesão foi avaliada utilizando um analisador de textura *TA-XT plus* (*Texture Analyser- Stable Micro Systems*).

A mucosa intestinal suína foi mantida em solução salina a 37 °C, a fim de garantir a integridade da camada de muco. Secções da mucosa intestinal

suína (aproximadamente 2 cm<sup>2</sup>) foram fixadas a sonda analítica e suas bordas presas com elástico de borracha (Figura 15).

Para realização do teste, as amostras foram dispostas abaixo da sonda analítica. Para assegurar o contato com a amostra, a mucosa foi introduzida 1 mm de profundidade a partir da superfície da amostra e mantida por 60 s, sem a aplicação de força durante a fase de contato. Em seguida, a sonda foi removida com velocidade constante de 0,5 mm/s e a partir dos dados pela área sob a curva força *versus* tempo, foram determinados a força de mucoadesão ( $F_{MA}$ ), correspondente à força de destacamento máxima (N) e o trabalho de mucoadesão ( $T_{MA}$ ) (N.s).

**Figura 15** - Representação esquemática do ensaio de mucoadesão *ex vivo*.



#### 4.9.2 Avaliação da mucoadesão por análise gravimétrica

Para a avaliação da mucoadesão, foi realizada a extração da mucosa colônica de ratos utilizando o método descrito por Cinto et al. (2009). Ratos machos adultos (210 – 250 g), mantidos em jejum por 8h, foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital de sódio (40 mg/kg) e o cólon foi imediatamente dissecado, lavado com solução TC-199 a 10 °C e colocado em

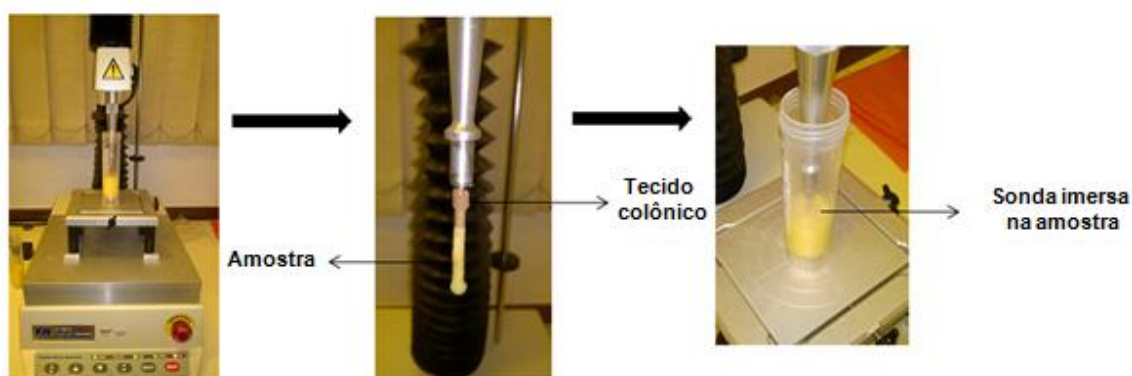
meio de cultura (TC 199) na mesma temperatura, sendo o tampão TC-199 composto de NaCl (145 mM), KCl (4,56 mM),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1,25 mM),  $\text{NaHPO}_4$  (5 mM) e glicose (10 mM).

Todos os procedimentos utilizados seguiram os Princípios sobre cuidados e uso de animais de laboratório do "National Institute of Health (NIH)" e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (protocolo CEUA/FCF/CAr nº 47/ 2012).

O teste de mucoadesão foi realizado em analisador de textura TA-XTplus para as amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5 sem e com a adição do polímero mucoadesivo carbopol Ultrez. As amostras (20 mL) foram colocadas em tubos de centrifuga e mantidas em repouso por 24 horas antes do teste.

O cólon foi cuidadosamente invertido com auxílio de uma haste flexível, expondo a mucosa interna ao contato com a amostra. A mucosa colônica foi colocada na sonda analítica do texturômetro (10 mm de diâmetro) e o conjunto foi pesado. A sonda penetrou na amostra e o tempo de contato da formulação foi de 30 minutos, depois da retirada da sonda, o peso da mucosa colônica foi novamente determinado (Figura 16). A mucoadesão foi determinada gravimetricamente através do calculo da diferença do peso inicial com peso final. As medidas foram realizadas em triplicata.

**Figura 16** - Fotografia do texturômetro para o teste de mucoadesão *ex vivo*.



#### 4.9.3 Avaliação da mucoadesão utilizando teste de escoamento

O teste de escoamento foi desenvolvido para avaliar a capacidade de geleificação *in situ* do polímero mucoadesivo carbopol Ultrez, simulando o comportamento no interior do cólon. Para a determinação da mucoadesão foram utilizadas as amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5, sem e com a adição do polímero mucoadesivo.

Utilizando a mucosa colônica de rato, uma das extremidades do cólon foi fechada utilizando fio de sutura e o segmento colônico preenchido com 1 mL de formulação. A outra extremidade do segmento colônico foi então fechada com auxílio de fios de sutura, de forma que o comprimento final do segmento do cólon foi de aproximadamente 6 cm. Após o período de 30 min, a extremidade inferior do cólon foi aberta para permitir o fluxo da formulação e o volume coletado foi determinado.

#### 4.10 Determinação do perfil de liberação *in vitro* do metotrexato

Inicialmente, a solubilidade do MTX foi determinada no meio tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8), através do método do equilíbrio (TONG e WEN, 2008).

A amostra foi preparada adicionando excesso de MTX no meio tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8), a fim de garantir a saturação da solução. Esta amostra foi submetida a agitação em homogeneizador de tubos por 24 h e em seguida centrifugada a 14000 rpm, durante 15 minutos, e o sobrenadante foi filtrado em filtro de membrana de acetato de celulose 0,45 µm. O fármaco solúvel foi quantificado em espectrofotômetro UV-VIS e para a determinação da concentração do MTX no meio tampão fosfato 0,1 M (pH6,8), foi utilizada a curva analítica previamente obtida e validada.

Os ensaios de dissolução para a determinação do perfil de liberação *in vitro* do metotrexato foram realizados para as amostras N(A1+1)H1; N(A1+0)H1; N(A1+1)P5 e SA2H1. Foi utilizado um volume de 5 mL de amostra correspondente a 125 mg de MTX.

O ensaio foi realizado utilizando-se o aparato II (pá), sob velocidade de agitação de 50 rpm e temperatura de  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Foi utilizado como meio de dissolução 900 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,8, a fim de simular o pH do meio colônico e garantir as condições *sink*. Alíquotas (2 mL) foram retiradas em intervalos de tempo pré-estabelecidos e filtradas em membrana de acetato de celulose 0,45  $\mu\text{m}$ . Foi feita a reposição imediata de meio à mesma temperatura e o ensaio foi conduzido por tempo suficiente para que no mínimo 80% do fármaco fosse liberado. A quantidade de MTX liberada foi determinado em espectrofotômetro UV-VIS, em 303 nm e as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.11 Análise estatística

As diferenças significativas entre os valores obtidos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey e adotou-se nível de significância de 5%.

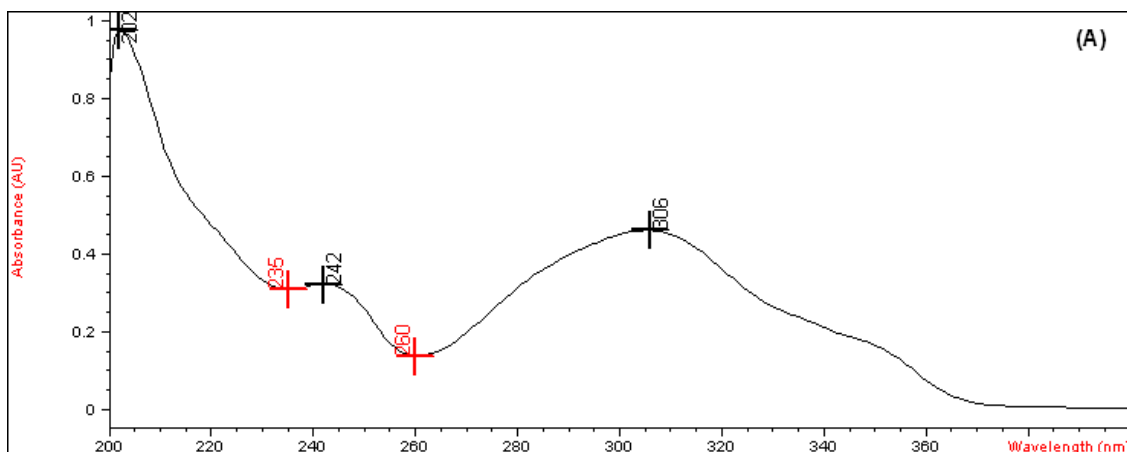
## 5. RESULTADOS

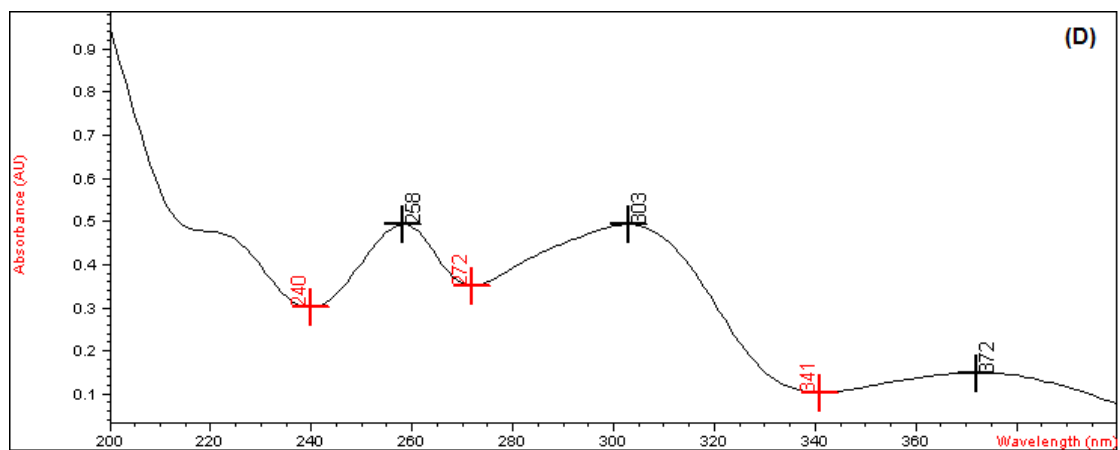
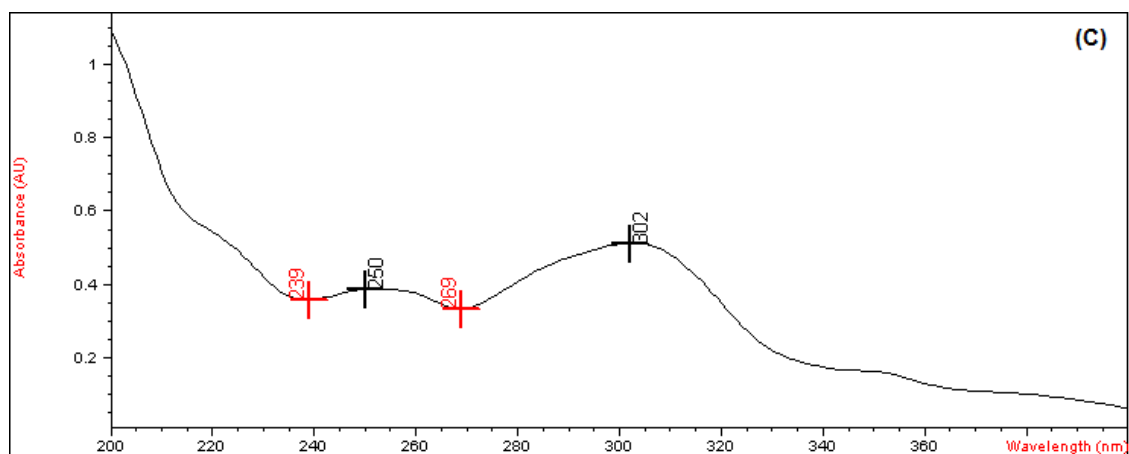
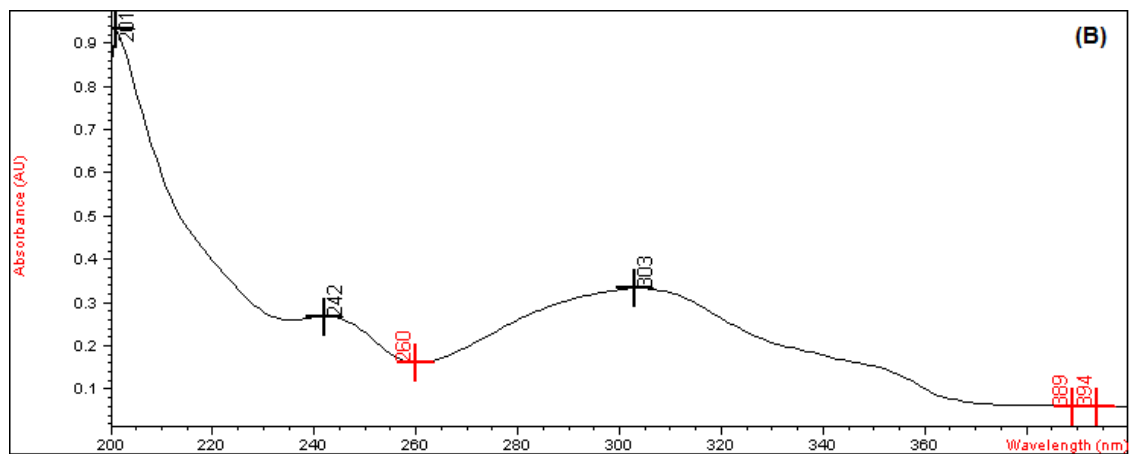
### 5.1 Desenvolvimento de métodos espectrofotométrico para avaliação do MTX

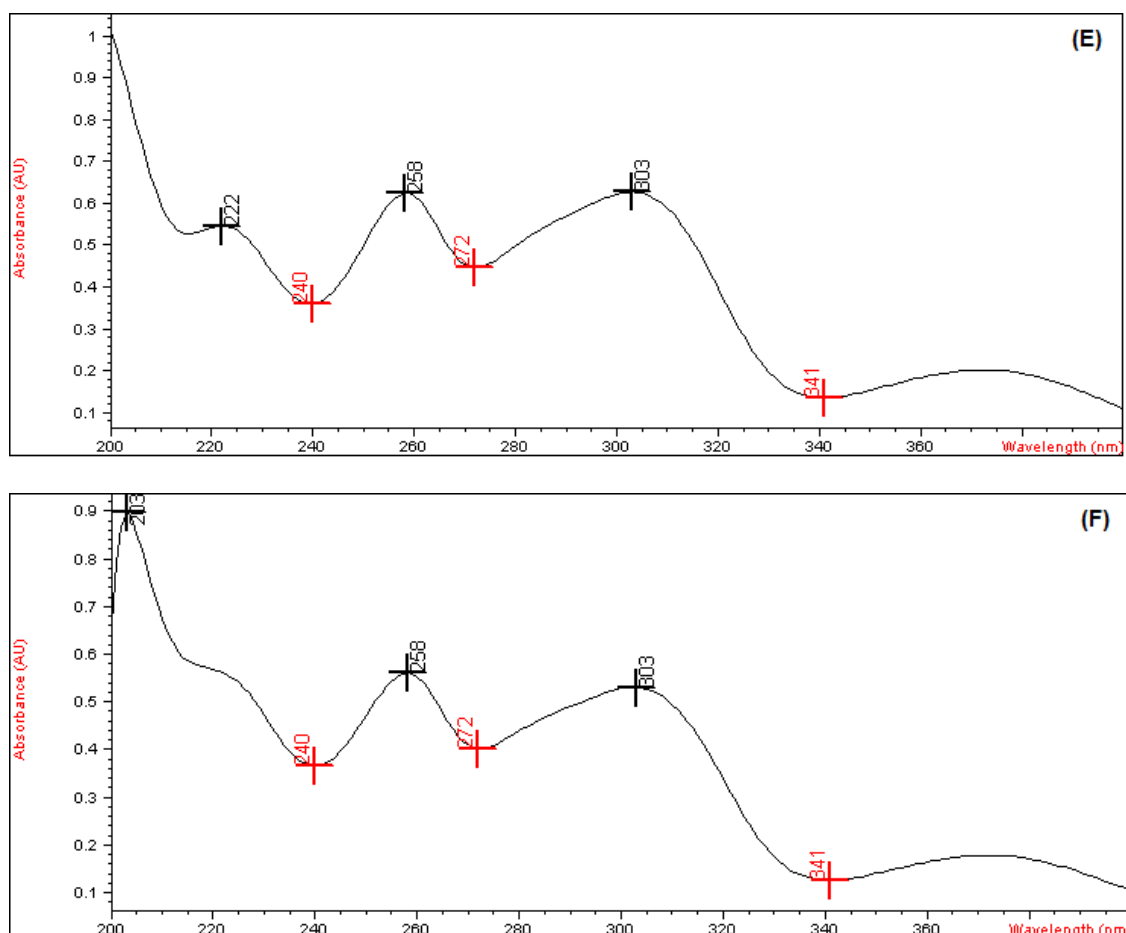
#### 5.1.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do MTX em meios com diferentes valores de pH

Os espectros de absorção do MTX na região do UV nos diferentes meios HCl 0,1 M (pH 3 e 4) e tampão fosfato 20 mM (pH 5,5; 7; 9 e 11), com picos de absorção em 306, 303, 302, 303, 303 e 303, respectivamente estão apresentados na Figura 17.

**Figura 17** - Espectros de absorção do MTX nos meio HCl 0,1 M pH 3 (A), HCl 0,1 M pH 4 (B), tampão fosfato pH 5,5 (C), tampão fosfato pH 7 (D), tampão fosfato pH 9 (E) e tampão fosfato pH 11 (F).







A variação em pH ácido (3; 4 e 5,5) promove uma diminuição da intensidade de absorção em todos os comprimentos de onda, levando ao desaparecimento do cromóforo pterina. Essas observações confirmam que a absorbância do MTX é dependente do pH da solução analítica (RUBINO, 2001).

### 5.1.2 Construção das curvas analíticas

Foram construídas curvas analíticas nos meios HCl 0,1 M (pH 3; 4), tampão fosfato 20 mM (pH 5,5; 7; 9; 11), no intervalo entre 1 e 30  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados obtidos a partir da regressão linear, como a equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ) das curvas analíticas estão dispostos na Tabela 8.

**Tabela 8** - Curvas analíticas em meios com diferentes valores de pH.

| Parâmetros            |                          |                        |                                |
|-----------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------------|
| Meios                 | Comprimento de onda (nm) | Equação da reta        | Coefficiente de correlação (r) |
| HCl 0,1 M pH 3        | 306                      | $y = 0,0482x - 0,0111$ | 0,9987                         |
| HCl 0,1 M pH 4        | 303                      | $y = 0,0368x + 0,0473$ | 0,9975                         |
| Tampão fosfato pH 5,5 | 302                      | $y = 0,0518x + 0,0298$ | 0,9994                         |
| Tampão fosfato pH 7   | 303                      | $y = 0,0511x - 0,0149$ | 0,9996                         |
| Tampão fosfato pH 9   | 303                      | $y = 0,0477x - 0,0045$ | 0,9993                         |
| Tampão fosfato pH 11  | 303                      | $y = 0,0520x - 0,0098$ | 0,9998                         |

### 5.1.3 Determinação do equilíbrio de solubilidade do MTX em meios aquosos com diferentes valores de pH

A solubilidade do fármaco foi determinada em meios com diferentes valores de pH para avaliar o comportamento de ionização do MTX, uma vez que sua solubilidade é pH dependente.

Na Tabela 9 estão apresentados a solubilidade do MTX nos meios HCl 0,1 M pH 3 e pH 4 e tampão fosfato 20 mM pH 5,5; pH 7; pH 9 e pH 11.

**Tabela 9** - Solubilidade do MTX em meios com diferentes valores de pH.

| Meios para solubilização | Concentração de MTX solubilizado (mg/mL) |
|--------------------------|------------------------------------------|
| HCl 0,1 M pH 3           | 0,07 mg/mL                               |
| HCl 0,1 M pH 4           | 0,04 mg/mL                               |
| Tampão fosfato pH 5,5    | 0,89 mg/mL                               |
| Tampão fosfato pH 7      | 36,53 mg/mL                              |
| Tampão fosfato pH 9      | 400 mg/mL                                |
| Tampão fosfato pH 11     | 400 mg/mL                                |

O MTX apresentou baixa solubilidade em pH ácido, variando de 0,04 a 0,89 mg/mL para pH 3, 4 e 5,5. Nestas condições, o pH ácido contribui para os grupamentos carboxílicos do fármaco estarem na forma não ionizada, ou seja, insolúvel. Em pH 7, tem-se um aumento na solubilidade do MTX (36,53 mg/mL), devido à ionização dos grupos carboxílicos.

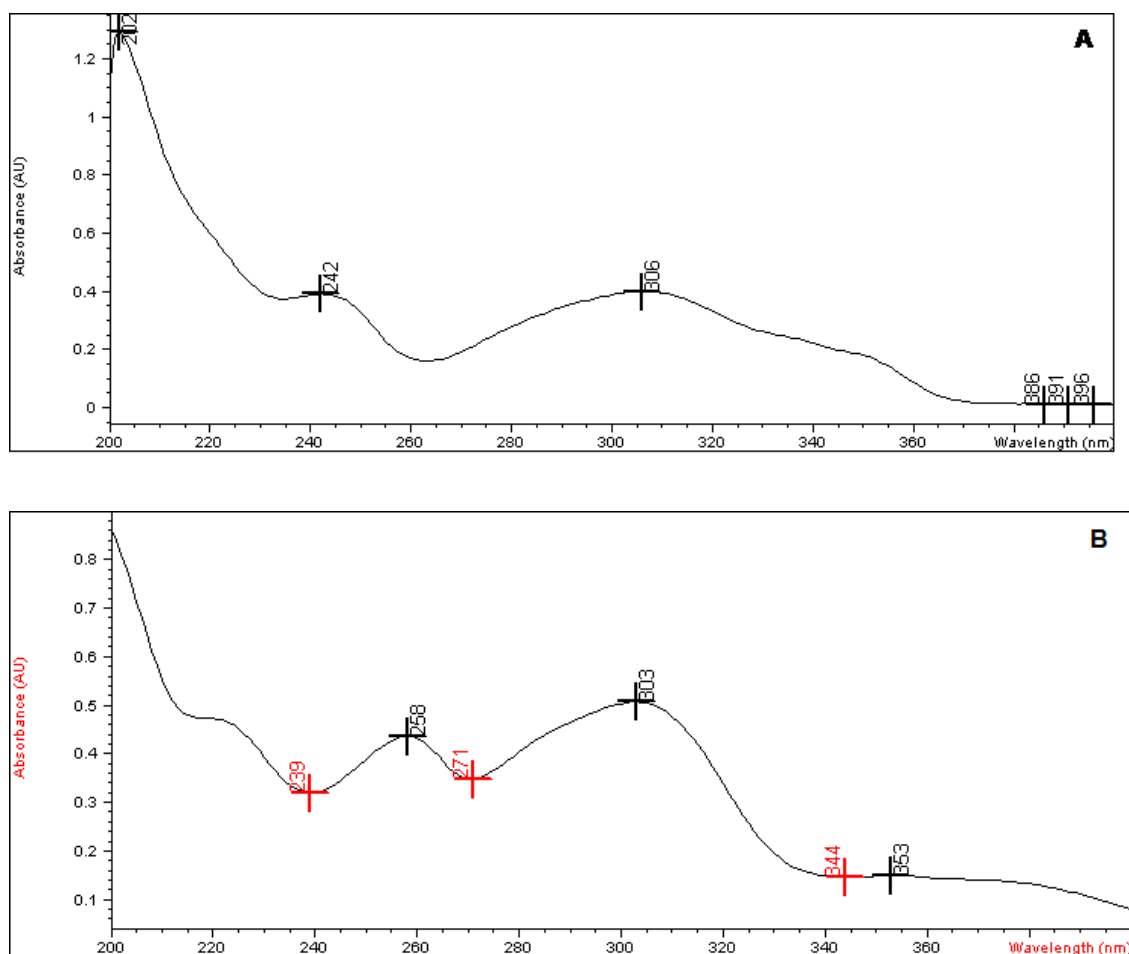
A maior solubilidade do MTX ocorreu em tampão fosfato pH 9 e 11, encontrando-se totalmente solubilizado em uma concentração de 400 mg/mL. Desta maneira, este estudo confirma a solubilidade pH-dependente do fármaco, mostrando que será possível solubilizar o MTX em base e precipitar em meio ácido para a obtenção das micro/nanossuspensões através de reações ácido-base.

## 5.2 Quantificação do MTX nas micro/nanossuspensões por espectrofotometria UV-VIS

### 5.2.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do MTX na região do UV

Os espectros de absorção do MTX em solução aquosa de HCl 0,1 M e no meio tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8) foram obtidos por espectrofotometria na região do UV. Os picos de absorção em 306 e 303 nm, respectivamente, foram selecionados para a realização das análises quantitativas do fármaco. A Figura 18 apresenta os espectros de absorção do MTX na região do ultravioleta em solução aquosa de HCl 0,1 M e no meio tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8).

**Figura 18** - Espectro de absorção do MTX em HCl 0,1 M (A) e tampão fosfato 0,1 M pH 6,8 (B).

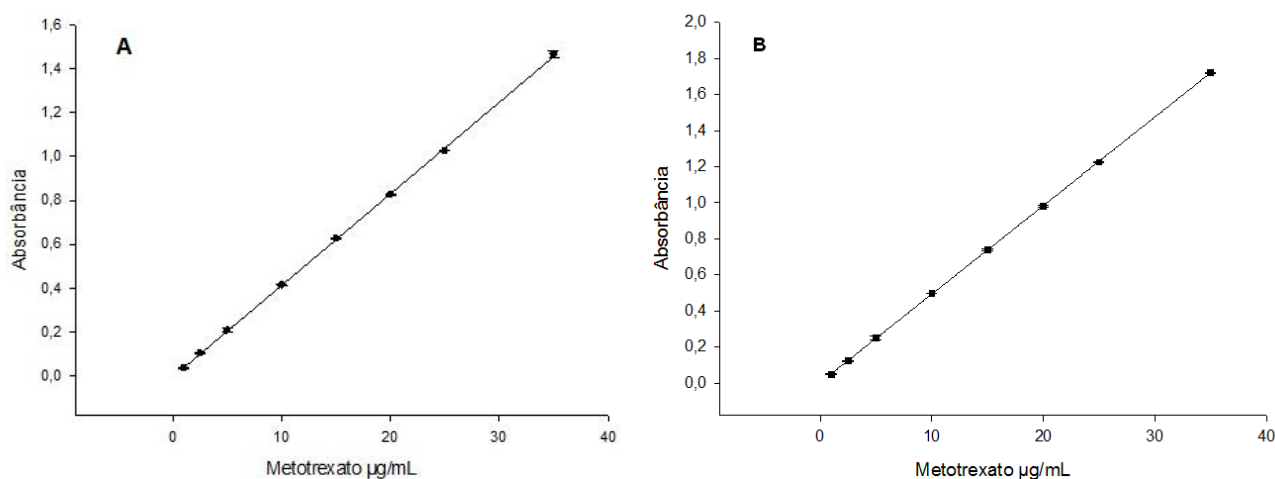


### 5.2.2 Linearidade

A linearidade de um método analítico é a capacidade de mostrar que os resultados são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico (BRASIL, 2003).

As curvas analíticas foram construídas com base no valor da absorbância em função da concentração do MTX (Figura 19).

**Figura 19** - Curva analítica do MTX em HCl 0,1M (A) e em tampão fosfato 0,1M pH 6,8 (B).



Os dados adquiridos a partir da regressão linear das curvas analíticas estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10** - Dados das curvas analíticas obtidas nos diferentes meios.

| Parâmetros                            | HCl 0,1 M | Tampão fosfato 0,1 M<br>(pH 6,8) |
|---------------------------------------|-----------|----------------------------------|
| <b>Coefficiente angular</b>           | 0,0417    | 0,0491                           |
| <b>Intercepto</b>                     | 0,0045    | 0,0013                           |
| <b>Coefficiente de correlação (r)</b> | 0,9998    | 1,0000                           |

A linearidade pode ser observada na faixa de concentração de 1 a 35 µg/mL, confirmada pelos coeficientes de correlação (r), estando de acordo com o preconizado pela ANVISA, comprovando a linearidade do método para o intervalo estabelecido.

### 5.2.3 Precisão

A precisão de um método analítico é a proximidade dos resultados adquiridos de uma série de medidas produzidas para uma mesma amostra (BRASIL, 2003).

A precisão pode ser avaliada em três níveis: a repetibilidade ou precisão intra-corrida, a intermediária ou precisão inter-corrida e a reprodutibilidade ou precisão inter-laboratorial. A repetibilidade ou precisão intra-corrida é a concordância dos resultados obtidos dentro de um curto período de tempo, utilizando o mesmo analista e a mesma instrumentação. A intermediária ou precisão inter-corrida é a concordância dos resultados obtidos em um mesmo laboratório, porém em dias diferentes, utilizando analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Já a reprodutibilidade ou precisão inter-laboratorial avalia a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios distintos (BRASIL, 2003).

A precisão foi avaliada através da análise de três níveis de concentração, baixa (2,5 µg/mL), média (15 µg/mL) e alta (25 µg/mL). Os resultados obtidos para a repetibilidade (intra-corrida) e precisão intermediária (inter-corrida) estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11** - Dados de precisão intra-corrida e inter-corrida nos diferentes meios.

| Meios                               | Intra-corrida                |                                   |      |      | Inter-corrida                     |      |      |
|-------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|------|------|-----------------------------------|------|------|
|                                     | Concentração teórica (µg/mL) | Concentração experimental (µg/mL) | DP   | CV%  | Concentração experimental (µg/mL) | DP   | CV%  |
| <b>HCl 0,1M</b>                     | 2,5                          | 2,53                              | 0,01 | 0,53 | 2,62                              | 0,01 | 0,54 |
|                                     | 15                           | 15,11                             | 0,02 | 0,10 | 15,16                             | 0,01 | 0,09 |
|                                     | 25                           | 24,77                             | 0,05 | 0,21 | 25,25                             | 0,13 | 0,50 |
| <b>Tampão fosfato 0,1M (pH 6,8)</b> | 2,5                          | 2,55                              | 0,02 | 0,78 | 2,65                              | 0,06 | 2,26 |
|                                     | 15                           | 15,12                             | 0,01 | 0,07 | 14,99                             | 0,03 | 0,20 |
|                                     | 25                           | 24,86                             | 0,06 | 0,24 | 25,31                             | 0,15 | 0,59 |

O método demonstrou que é preciso, uma vez que os valores dos coeficientes de variação (CV) foram menores que 5%, conforme os limites aceitáveis pela ANVISA (BRASIL, 2003).

#### 5.2.4 Exatidão

A exatidão expressa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em relação ao valor adotado como verdadeiro (BRASIL, 2003).

Os valores obtidos na exatidão (Tabela 12) estão dentro da faixa de 80 a 120%, conforme recomendado pela ANVISA (BRASIL, 2003).

**Tabela 12** - Resultados obtidos para a exatidão do método analítico nos diferentes meios.

| Meios                           | Concentração<br>teórica<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Concentração média<br>experimental<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Exatidão% |
|---------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------|
| HCl 0,1M                        | 2,5                                             | 2,53                                                       | 101,39    |
|                                 | 15                                              | 15,11                                                      | 100,73    |
|                                 | 25                                              | 24,77                                                      | 99,08     |
| Tampão fosfato<br>0,1M (pH 6,8) | 2,5                                             | 2,55                                                       | 102,00    |
|                                 | 15                                              | 15,12                                                      | 100,80    |
|                                 | 25                                              | 24,86                                                      | 99,44     |

#### 5.2.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O Limite de Detecção (LD) é a menor concentração do analito presente na amostra que o método consegue detectar, porém não necessariamente quantificado com exatidão. O Limite de Quantificação (LQ) é a menor

concentração do analito presente na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis pelo método estabelecido (BRASIL, 2003).

Os valores de LD e LQ obtidos estão apresentados na Tabela 13, constatando que a metodologia desenvolvida é adequada para detectar e quantificar concentrações muito baixas de fármaco.

**Tabela 13** - Valores de LD e LQ obtidos nos diferentes meios.

| Parâmetros                      | HCl 0,1M | Tampão fosfato 0,1M<br>(pH 6,8) |
|---------------------------------|----------|---------------------------------|
| Limite de detecção (µg/mL)      | 0,12     | 0,21                            |
| Limite de quantificação (µg/mL) | 0,41     | 0,72                            |

#### 5.2.6 Especificidade e Seletividade

A especificidade e seletividade expressam a capacidade do método analítico em analisar uma substância na presença de outras substâncias, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

A especificidade e seletividade foram verificadas pela comparação de espectros de absorção da solução analítica de MTX em solução aquosa de HCl 0,1 M e no meio tampão fosfato 0,1M (pH 6,8) a 10 µg/mL, usado como referência com os espectros das micro/nanossuspensões (N) na presença e ausência dos estabilizantes HPMC e P407. Além disso, verificou-se também se algum polímero mucoadesivo (goma gelana, carbopol ETD2020 ou poloxâmero 407) interferem na quantificação do MTX nos diferentes meios. Na Figura 20 e 21 estão apresentados os espectros de absorção da solução de MTX, das micro/nanossuspensões com e sem HPMC e P407 e na presença dos polímeros mucoadesivos em HCl 0,1 M e em tampão fosfato 0,1M (pH 6,8), respectivamente.

**Figura 20** - Espectros de absorção obtidos na região do UV, da solução de MTX em HCl 0,1 M, das nanossuspensões com e sem HPMC (A), das micro/nanossuspensões com P407 e na presença dos polímeros mucoadesivos (B).

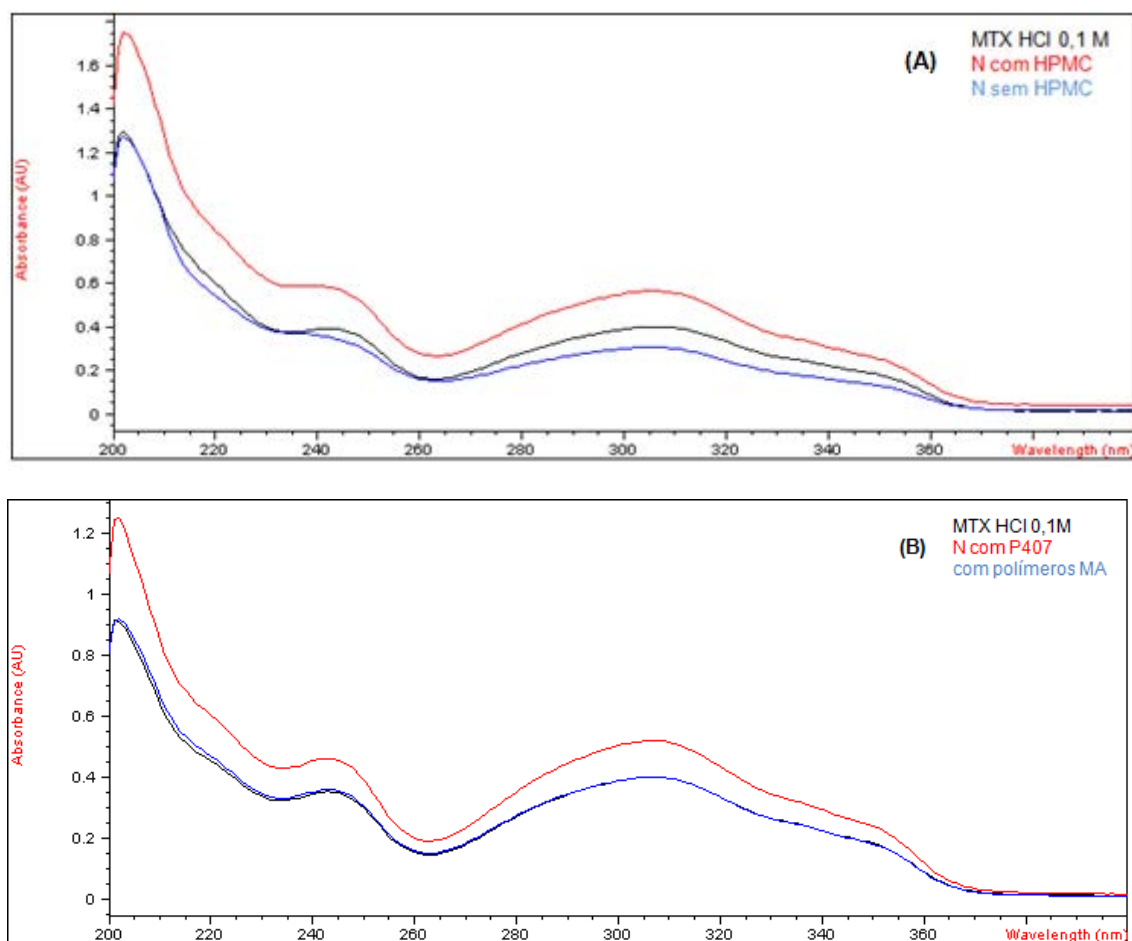
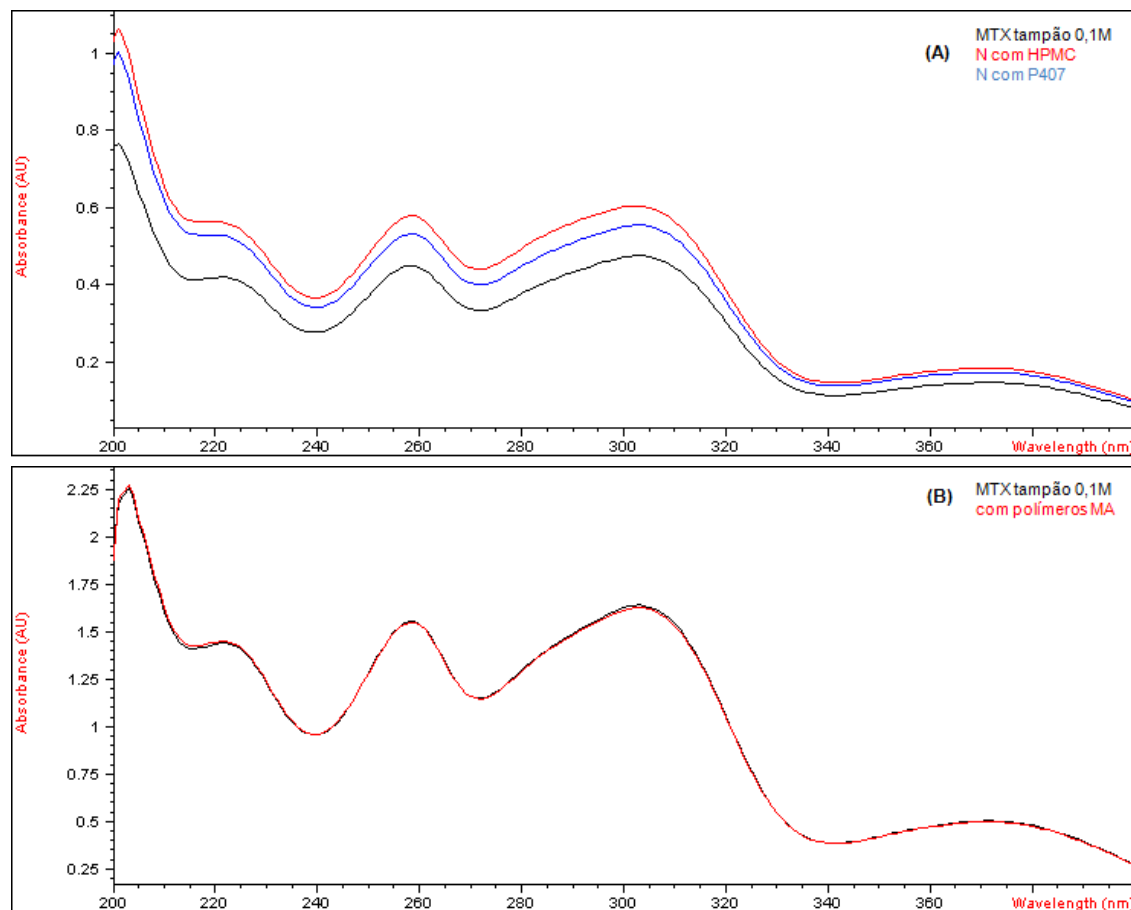


**Figura 21** - Espectros de absorção obtidos na região do UV, da solução de MTX em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8), das micro/nanossuspensões com e sem HPMC e P407 (A), e na presença dos polímeros mucoadesivos (B).



Os resultados demonstram que não houve interferência da presença dos polímeros no comprimento de onda de absorção do fármaco para os dois meios analisados, comprovando que o método analítico proposto possui especificidade e seletividade.

### **5.3 Caracterização físico-química das suspensões e micro/nanossuspensões**

#### **5.3.1 Suspensões de MTX**

Os parâmetros avaliados foram: tamanho médio das partículas, índice de polidispersão (PDI), medida do potencial zeta e o pH final das suspensões de MTX, utilizando diferentes proporções de HCl e diferentes concentrações de estabilizante (HPMC), apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14** - Tamanho médio das partículas, Pdl, potencial zeta e pH final das suspensões estabilizadas com diferentes concentrações de HPMC (média±DP).

| HCl:MTX<br>(M/M) | Quantidade<br>HCl 1M (mL) | HPMC:MTX<br>(p/p) | Amostra  | pH   | Tamanho médio<br>(nm) | Pdl          | Potencial<br>zeta (mV) |
|------------------|---------------------------|-------------------|----------|------|-----------------------|--------------|------------------------|
| 1:1              | 1,09                      | 1:1               | SA1H1    | 1,19 | 3775,33 ± 534,60      | 0,266 ± 0,06 | -0,22 ± 0,74           |
| 1:1              | 1,09                      | 0,5:1             | SA1H0,5  | 1,24 | 3870,33 ± 280,24      | 0,154 ± 0,04 | 0,60 ± 0,07            |
| 1:1              | 1,09                      | 0,25:1            | SA1H0,25 | 1,56 | 5177,67 ± 262,21      | 0,164 ± 0,02 | 1,02 ± 0,38            |
| 1:1              | 1,09                      | 0:1               | SA1H0    | 1,48 | 9886,67 ± 100,61      | 0,965 ± 0,06 | 3,41 ± 0,47            |
| 2:1              | 2,19                      | 1:1               | SA2H1    | 1,26 | 2517,33 ± 74,00       | 0,209 ± 0,01 | 0,53 ± 0,22            |
| 2:1              | 2,19                      | 0,5:1             | SA2H0,5  | 1,42 | 2536,33 ± 99,52       | 0,149 ± 0,05 | 1,62 ± 0,13            |
| 2:1              | 2,19                      | 0,25:1            | SA2H0,25 | 1,34 | 3329,33 ± 193,98      | 0,184 ± 0,06 | 3,73 ± 0,27            |
| 2:1              | 2,19                      | 0:1               | SA2H0    | 1,62 | 8607,67 ± 112,72      | 0,286 ± 0,15 | 16,80 ± 3,05           |
| 3:1              | 3,29                      | 1:1               | SA3H1    | 1,14 | 2632,00 ± 31,22       | 0,200 ± 0,05 | 0,95 ± 0,03            |
| 3:1              | 3,29                      | 0,5:1             | SA3H0,5  | 1,20 | 2730,33 ± 267,64      | 0,283 ± 0,07 | 1,86 ± 0,31            |
| 3:1              | 3,29                      | 0,25:1            | SA3H0,25 | 1,17 | 3474,00 ± 161,78      | 0,199 ± 0,05 | 3,68 ± 0,09            |
| 3:1              | 3,29                      | 0:1               | SA3H0    | 1,15 | 5049,67 ± 10,79       | 0,343 ± 0,10 | 25,10 ± 0,69           |

Os resultados das análises das amostras sem adição de HPMC demonstram que proporções crescentes de HCl promoveu uma redução do tamanho das partículas. Isto pode ser atribuído ao valores de potencial zeta mais elevados (+25 mV). Estes valores elevados de potencial zeta promovem a repulsão eletrostática entre as partículas, evitando que ocorra aglomeração entre elas, contribuindo para a estabilização do sistema.

A adição do estabilizante HPMC promoveu uma diminuição no tamanho das partículas e no Pdl, indicando homogeneidade na distribuição do tamanho médio das partículas e garantindo a organização do sistema.

Os valores de potencial zeta, tornaram-se mais próximos de zero com aumento da concentração de estabilizante, que pode ser atribuído ao comportamento de adsorção do HPMC na superfície da partícula do MTX, cobrindo a carga presente (VERMA et al., 2009). Desta maneira, ao se empregar HCl em diferentes proporções molares, verificamos que a adição deste ácido contribuiu para a forma insolúvel do fármaco (não ionizada), sendo desejável para produção de suspensões de MTX. Além disso, a utilização do HPMC permitiu uma maior estabilização das partículas das suspensões.

### **5.3.2 Micro/nanossuspensões por Bottom-up utilizando o Ultra turrax**

Os parâmetros avaliados para as micro/nanossuspensões preparadas através do método *Bottom-up* sem HPMC foram: tamanho médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH final estão apresentados na Tabela 15. Avaliou-se também a influência das diferentes proporções de NaOH e HCl utilizados na solubilização e precipitação do fármaco através do método *Bottom-up*.

**Tabela 15** - Tamanho médio das partículas, Pdl, potencial zeta e pH final das micro/nanossuspensões sem HPMC, utilizando diferentes proporções de HCl e NaOH, obtidas em Ultra turrax (média±DP).

| Quantidade<br>NaOH 1M (mL) | HCl:NaOH | Quantidade<br>HCl 1M (mL) | HPMC:MTX<br>(p/p) | Amostra     | pH   | Tamanho médio<br>(nm) | Pdl          | Potencial<br>zeta (mV) |
|----------------------------|----------|---------------------------|-------------------|-------------|------|-----------------------|--------------|------------------------|
| 1,8                        | 0,5:1    | 0,9                       | 0:1               | N(A0,9+B)H0 | 6,36 | 131,60 ± 4,50         | 0,157 ± 0,01 | -49,72 ± 0,30          |
| 2,2                        | 0,5:1    | 1,09                      | 0:1               | N(A1+0)H0   | 6,48 | 186,53 ± 1,60         | 0,165 ± 0,17 | -50,20 ± 0,10          |
| 1,8                        | 0,7:1    | 1,4                       | 0:1               | N(A1,4+B)H0 | 5,06 | 3253,93 ± 356,00      | 0,674 ± 0,16 | -43,88 ± 0,70          |
| 1,8                        | 0,8:1    | 1,5                       | 0:1               | N(A1,5+B)H0 | 4,01 | 3927,00 ± 160,21      | 0,742 ± 0,05 | -31,33 ± 0,15          |
| 1,8                        | 1:1      | 1,8                       | 0:1               | N(A1,8+B)H0 | 3,19 | 5164,66 ± 436,37      | 0,841 ± 0,29 | -17,30 ± 0,20          |
| 2,2                        | 1:1      | 2,19                      | 0:1               | N(A0+1)H0   | 2,65 | 7308,33 ± 808,29      | 1,000 ± 0,00 | -14,50 ± 1,73          |
| 2,2                        | 1,5:1    | 3,28                      | 0:1               | N(A1+1)H0   | 1,38 | 2873,67 ± 148,91      | 0,583 ± 0,00 | 7,56 ± 1,39            |
| 2,2                        | 2:1      | 4,38                      | 0:1               | N(A2+1)H0   | 1,16 | 6816,33 ± 243,43      | 1,000 ± 0,00 | 18,63 ± 1,03           |

Avaliando-se as diferentes proporções de NaOH e HCl testadas para solubilização e precipitação do fármaco através do método *Bottom-up*, verificou-se que menores quantidades de HCl promoveram uma redução no tamanho das partículas para escala nanométrica, com baixo índice de polidispersão indicando homogeneidade na distribuição do tamanho. Ainda podemos destacar, que o excesso de HCl está favorecendo a aglomeração das partículas.

Da mesma forma, o potencial zeta pode estar contribuindo para a estabilização das partículas do fármaco, uma vez que valores elevados de potencial zeta, promove a repulsão eletrostática entre as partículas, evitando que ocorra aglomeração entre elas. Assim, a diminuição da quantidade de HCl elevou os valores de potencial zeta para próximos de - 50 mV, favorecendo a estabilização das partículas.

É importante destacar que essas amostras apresentaram valores de pH 6, não sendo interessante para adição de polímeros pH responsivos (derivados do APA), uma vez que neste pH ocorre a geleificação deste polímero.

Com aumento da quantidade de ácido utilizada na precipitação do fármaco, ocorreu aglomeração das partículas, resultando em partículas com tamanho e índice de polidispersão elevados, podendo ser atribuído ao grau de supersaturação causado pela precipitação ácido-base (CHEN et al., 2004). Além disso, esta condição de precipitação não foi o suficiente para induzir a nucleação e a cristalização do fármaco e produzir partículas nanométricas.

Verificou-se que a amostra N(A1+1)H0 apresentou menor tamanho de partícula e índice de polidispersão, em comparação entre as amostras que também continham valores elevados de ácido e partículas micrométricas.

O método de *Bottom-up* produz energia livre entre as partículas, favorecendo a aglomeração entre elas, tornando as micro/nanossuspensões termodinamicamente instáveis. Deste modo, a adição de estabilizante evita a formação de agregados frouxos e a aglomeração das partículas (GEORGE; GHOSH, 2013). Consequentemente, é fundamental que uma micro/nanossuspensão seja estável para a obtenção de um sistema com o menor tamanho de partícula e com uma distribuição de tamanho monodispersa (RABINOW, 2004).

A interação da partícula do fármaco e o estabilizante também exerce um papel importante na estabilização das micro/nanossuspensões (VERMA et al., 2009).

O HPMC foi utilizado como estabilizante devido ao efeito significativo na inibição e estabilização do crescimento do cristal. A adsorção do HPMC na superfície das partículas do fármaco forma uma barreira física, impedindo o contato entre elas. Esta estabilização estérica é devido a sua estrutura ser de cadeia aberta (BOSE et al., 2012; GHOSH et al., 2011).

A influência de diferentes concentrações de HPMC no tamanho médio das partículas e no índice de polidispersão das micro/nanossuspensões preparadas pelo método *Bottom-up* estão apresentados na Tabela 16. A medida do potencial zeta e o pH final das formulações também foram avaliados.

**Tabela 16** - Tamanho das partículas, Pdl, potencial zeta e pH final das micro/nanossuspensões com HPMC. (média±DP).

| Quantidade<br>NaOH 1M (mL) | HCl:NaOH | Quantidade<br>HCl 1M (mL) | HPMC:MTX<br>(p/p) | Amostra      | pH   | Tamanho médio<br>(nm) | Pdl          | Potencial zeta<br>(mV) |
|----------------------------|----------|---------------------------|-------------------|--------------|------|-----------------------|--------------|------------------------|
| 1,8                        | 0,5:1    | 0,9                       | 1:1               | N(A0,9+B)H1  | 5,21 | 174,19 ± 1,53         | 0,197 ± 0,01 | -10,09 ± 0,72          |
| 2,2                        | 0,5:1    | 1,09                      | 1:1               | N(A1+0)H1    | 5,42 | 233,83 ± 2,24         | 0,225 ± 0,01 | -11,50 ± 1,11          |
| 2,2                        | 0,5:1    | 1,09                      | 0,5:1             | N(A1+0)H0,5  | 5,86 | 180,60 ± 2,12         | 0,203 ± 0,01 | -14,00 ± 0,06          |
| 2,2                        | 0,5:1    | 1,09                      | 0,25:1            | N(A1+0)H0,25 | 6,01 | 226,33 ± 1,82         | 0,180 ± 0,00 | -19,33 ± 1,21          |
| 1,8                        | 0,7:1    | 1,4                       | 1:1               | N(A1,4+B)H1  | 4,98 | 1701,33 ± 67,88       | 0,205 ± 0,09 | -7,42 ± 0,08           |
| 1,8                        | 0,8:1    | 1,5                       | 1:1               | N(A1,5+B)H1  | 3,76 | 1884,33 ± 139,78      | 0,197 ± 0,04 | -4,05 ± 0,05           |
| 1,8                        | 1:1      | 1,8                       | 1:1               | N(A1,8+B)H1  | 3,04 | 3376,00 ± 320,89      | 0,287 ± 0,03 | -3,80 ± 0,07           |
| 2,2                        | 1:1      | 2,19                      | 1:1               | N(A0+1)H1    | 3,01 | 3406,33 ± 69,67       | 0,330 ± 0,05 | -0,69 ± 0,11           |
| 2,2                        | 1:1      | 2,19                      | 0,5:1             | N(A0+1)H0,5  | 3,15 | 4307,67 ± 183,67      | 0,451 ± 0,04 | -1,23 ± 0,06           |
| 2,2                        | 1:1      | 2,19                      | 0,25:1            | N(A0+1)H0,25 | 2,89 | 6334,00 ± 42,44       | 0,543 ± 0,09 | -1,28 ± 0,03           |
| 2,2                        | 1,5:1    | 3,28                      | 1:1               | N(A1+1)H1    | 1,51 | 1415,00 ± 32,91       | 0,218 ± 0,02 | 0,21 ± 0,06            |
| 2,2                        | 1,5:1    | 3,28                      | 0,5:1             | N(A1+1)H0,5  | 1,28 | 2092,67 ± 36,30       | 0,193 ± 0,04 | 0,17 ± 0,06            |
| 2,2                        | 1,5:1    | 3,28                      | 0,25:1            | N(A1+1)H0,25 | 1,42 | 3784,67 ± 140,61      | 0,165 ± 0,05 | 0,24 ± 0,10            |
| 2,2                        | 2:1      | 4,38                      | 1:1               | N(A2+1)H1    | 1,09 | 2159,33 ± 37,17       | 0,195 ± 0,03 | 0,97 ± 0,27            |
| 2,2                        | 2:1      | 4,38                      | 0,5:1             | N(A2+1)H0,5  | 1,97 | 2849,00 ± 68,35       | 0,190 ± 0,04 | 1,93 ± 0,27            |
| 2,2                        | 2:1      | 4,38                      | 0,25:1            | N(A2+1)H0,25 | 1,77 | 4274,00 ± 290,96      | 0,196 ± 0,06 | 3,83 ± 0,21            |

As amostras obtidas com menores proporções de HCl, preparadas com HPMC, apresentaram comportamento semelhante ao anterior, exibindo partículas na escala nanométrica e com baixos valores de índice de polidispersão, comparadas com as mesmas amostras sem a adição do HPMC. Esses valores (tamanho e Pdl) se encontram próximos entre estas amostras. A análise destes resultados demonstram que essas condições de solubilização e precipitação do fármaco, utilizando menores quantidades de HCl favorecem para formação de partículas nanométricas, mesmo não empregando estabilizante. Desta forma, o método *Bottom-up* se mostrou eficaz na produção das nanossuspensões.

Avaliando as amostras com maiores quantidades de HCl, estas apresentaram uma redução no tamanho de partícula com a utilização do HPMC, quando comparadas com as mesmas amostras na ausência de estabilizante. A adição do HPMC como estabilizante resultou em partículas com menores tamanhos micrométricos. Verificou-se ainda, para as amostras N(A0+1); N(A1+1) e N(A2+1) em que foram testadas diferentes concentrações de HPMC (1:1; 0,5:1; 0,25:1), que o aumento da concentração de estabilizante promoveu uma redução no tamanho das partículas, sendo a maior concentração de HPMC mais eficaz.

A amostra N(A1+1)H1 contendo 2,2 mL de NaOH e 3,28 mL de HCl, apresentou também o menor tamanho de partícula (1415 nm), como visualizado para a mesma sem o uso de estabilizante, quando comparada as outras amostras utilizando a maior concentração de HPMC, diferentes proporções de NaOH e HCl e com pH abaixo de 5.

Avaliando a polidispersão das amostras contendo maiores proporções de HCl, verificou-se que a utilização do estabilizante reduziu os valores de Pdl, em relação as amostras sem HPMC. Estas amostras obtidas com estabilizante, exibiram um índice de polidispersão inferior a 0,3, indicando uma homogeneidade na distribuição dos tamanhos das partículas, sugerindo que o sistema é monodisperso (BOSE et al., 2012). Entretanto, as amostras N(A0+1)H0,5 e N(A0+1)H0,25 apresentaram valores superiores de Pdl (0,451 e 0,543), respectivamente.

A análise do potencial zeta pode ser estabelecida a partir da mobilidade das partículas perante um campo elétrico, na qual essa mobilidade depende da carga de superfície (SINGH et al., 2011).

O potencial zeta é fundamental para a estabilidade física das micro/nanossuspensões, uma vez que promove a repulsão eletrostática entre as partículas, prevenindo a agregação e aglomeração entre elas. Valores elevados de potencial zeta são desejáveis, geralmente  $\pm 30$  mV para sistemas eletrostáticos. Já para sistemas estabilizados por impedimento estérico valores reduzidos de potencial zeta indicam uma maior estabilidade estérica do sistema, maior impedimento físico entre as partículas (GEORGE; GHOSH, 2013; GUO et al., 2013). Em algumas situações, o potencial zeta próximo de 20 mV é capaz de estabilizar o sistema em associação com a estabilização estérica (SINGH et al., 2011).

Os resultados do potencial zeta, mostram que conforme aumenta a concentração de HPMC, os valores tornam-se mais próximo de zero. Isto pode ser devido a adsorção do HPMC sobre a superfície da partícula do fármaco, que recobre a carga presente (VERMA et al., 2009).

Na ausência de estabilizante os valores do potencial zeta se tornam positivos para as amostras N(A1+1)H0 (7,56 mV) e N(A2+1)H0 (18,63 mV), indicando a carga presente na superfície da partícula. Já para as amostras N(A0,9+B)H0; N(A1+0)H0; N(A1,4+B)H0; N(A1,5+B)H0 e N(A1,8+B)H0 o potencial zeta encontra-se negativo (Tabela 15).

Os maiores valores de potencial zeta foram obtidos para as amostras N(A1+0)H0 (-50,20 mV), N(A0,9+B)H0 (-49,72 mV); N(A1,4+B)H0 (-43,88 mV); N(A1,5+B)H0 (-31,33 mV); N(A1+0)H0,25 (-19,33 mV), acompanhado da N(A2+1)H0 (18,63 mV). O potencial zeta elevado destas amostras é devido a ausência de HPMC ou uma menor concentração utilizada de estabilizante.

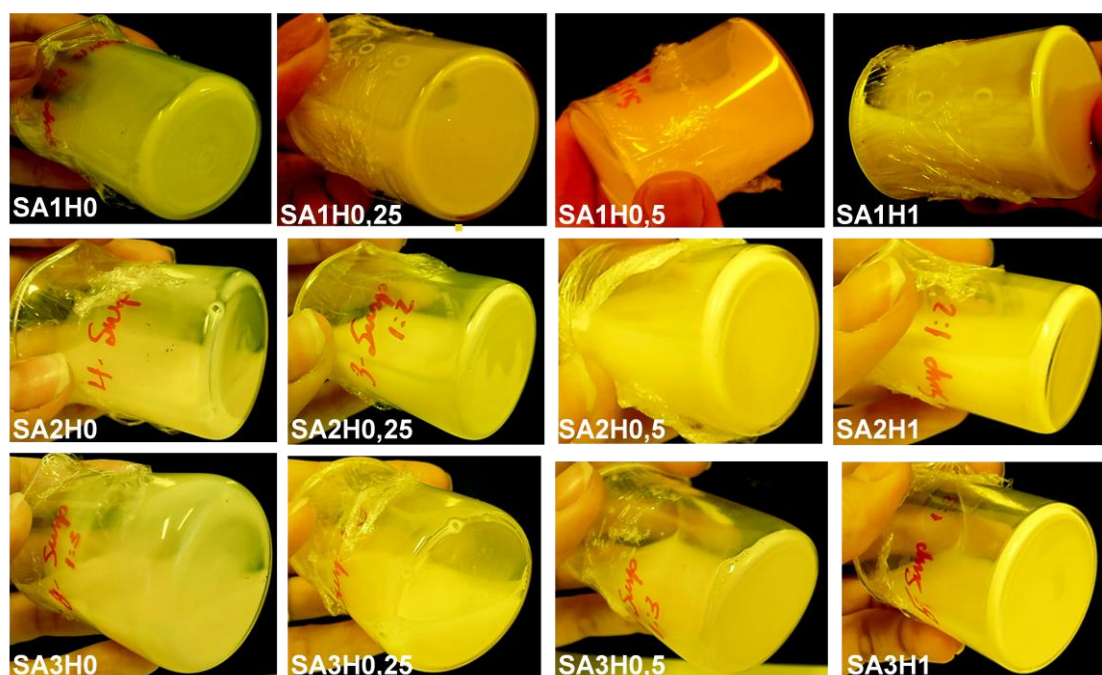
O conjunto de resultados obtidos indica que os diferentes fatores, como as proporções de HCl, a presença de estabilizante e o pH final das amostras exercem influência sobre o tamanho da partícula, Pdl e potencial zeta. Verificou-se ainda, que o emprego de estabilizante foi relevante, uma vez que promoveu homogeneidade no tamanho das partículas. Além disso, os valores

do tamanho, (Pdl) e potencial zeta estão diretamente relacionados com as concentrações de HPMC utilizados.

### 5.3.3 Avaliação da redispersabilidade

Uma suspensão deve permitir uma fácil redispersão após movimentação, sem a formação de sedimento compacto (AULTON, 2005). Assim, foram avaliadas visualmente a redispersabilidade das suspensões e micro/nanossuspensões, apresentadas na Figura 22 e 23, respectivamente.

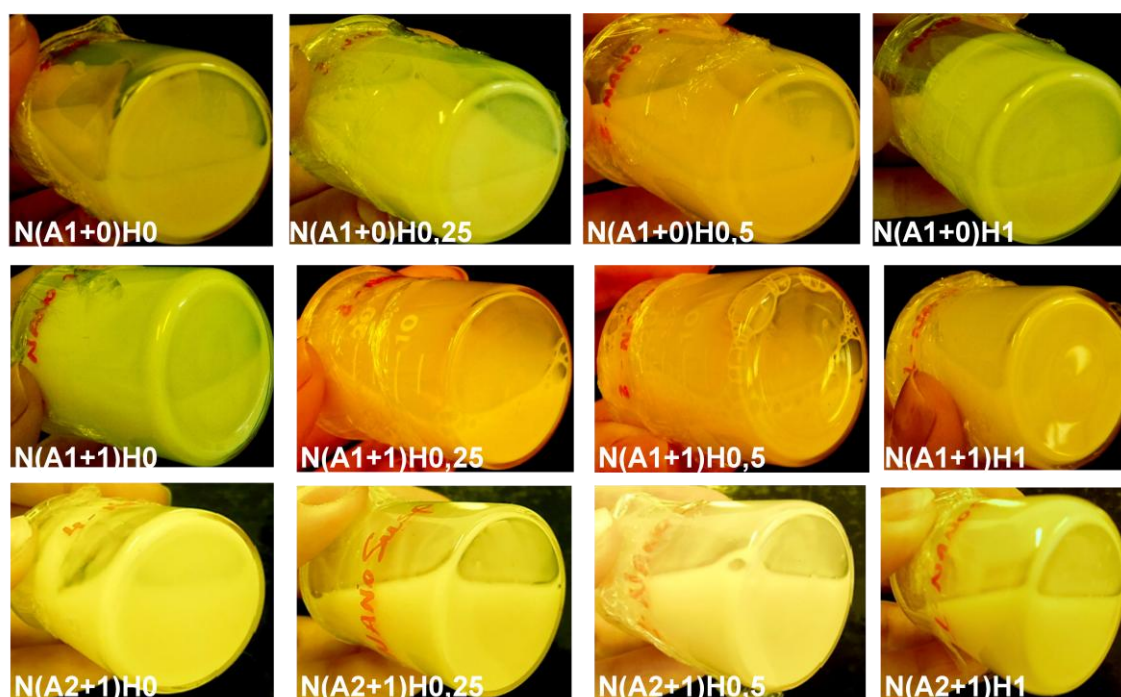
**Figura 22** - Fotografias da redispersabilidade das suspensões.



A Figura 22 mostra que praticamente todas as suspensões, apresentaram de uma maneira geral formação de sedimento compacto, difícil de ressuspender, observados no fundo do béquer. Apenas as suspensões

SA2H0 e SA3H0 não apresentaram formação de sedimento compacto, podendo ser atribuído aos valores mais elevados de potencial zeta (+16,80 e +25,10 mV), respectivamente, promovendo a repulsão eletrostática entre as partículas, evitando que ocorra aglomeração entre elas. A amostra SA1H0, que também não contém HPMC, apresentou a formação de sedimento compacto, possivelmente em razão do baixo valor de potencial zeta (+3,41 mV), que resulta na agregação das partículas. A suspensão SA3H0,25 permitiu uma fácil redispersão, sem a formação de sedimento compacto, uma vez que possui uma homogeneidade na distribuição do tamanho das partículas.

**Figura 23** - Fotografias da redispersabilidade das micro/nanossuspensões obtidas no Ultra turrax.



As micro/nanossuspensões mostraram-se mais estáveis, visto que não apresentaram sedimento compacto (Figura 23). Isto pode estar relacionado ao processo por *Bottom-up*, que controlou o tamanho das partículas obtendo-se

homogeneidade na distribuição do tamanho das partículas (PDI), facilitando a redispersão da formulação.

#### **5.4 Micro/nanossuspensões por Bottom-up utilizando Sonicador**

A sonicação foi utilizada com o objetivo de avaliar outra técnica de agitação para a redução do tamanho das partículas, utilizando maiores proporções de HCl, uma vez que estas amostras apresentaram pH mais ácido, tornando-se interessante para a adição do carbopol.

Os parâmetros avaliados foram: volume de amostra, proporções de fármaco e estabilizante (MTX:HPMC), posição da haste, tempo e amplitude de sonicação.

##### **5.4.1 Estudo do volume de amostra a ser sonicada**

As amostras utilizadas para os testes utilizando agitação por sonicação foram N(A1+1)H1 e N(A1+1)H0,5, visto que exibiram menores tamanhos de partículas no Ultra Turrax entre as amostras com maiores proporções de HCl. Assim, a proporção utilizada para a precipitação do fármaco induzida pela neutralização do MTX e da base foi de 1 mol HCl: 1 mol MTX e 1 mol HCl: 1 mol NaOH e as concentrações foram mantidas para os volumes testados. As amostras que apresentaram pH acima de 4 foram descartadas deste estudo, mesmo apresentando menor tamanho de partícula.

Com volume de sonicação de 10 mL, a amostra N(A1+1)H0,5 apresentou um tamanho médio de partículas de 9771 nm, com um índice de polidispersão de 0,640, indicando uma distribuição de tamanho das partículas heterogênea. Para a amostra N(A1+1)H1 o processo de sonicação ocorreu somente até 2min50s, em seguida houve a formação de espuma e extravasamento do tubo. As partículas exibiram tamanho de 3123,33 nm, com

um índice de polidispersão de 0,182. Mesmo com a utilização de um tubo maior (tubo de 20 mL para o volume de 10 mL), para as amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)H0,5, não foi possível concluir o processo de sonicação. As partículas obtidas exibiram diâmetro médio de 2482,67 nm e 3654,00 nm e uma polidispersão de 0,176 e 0,262, respectivamente.

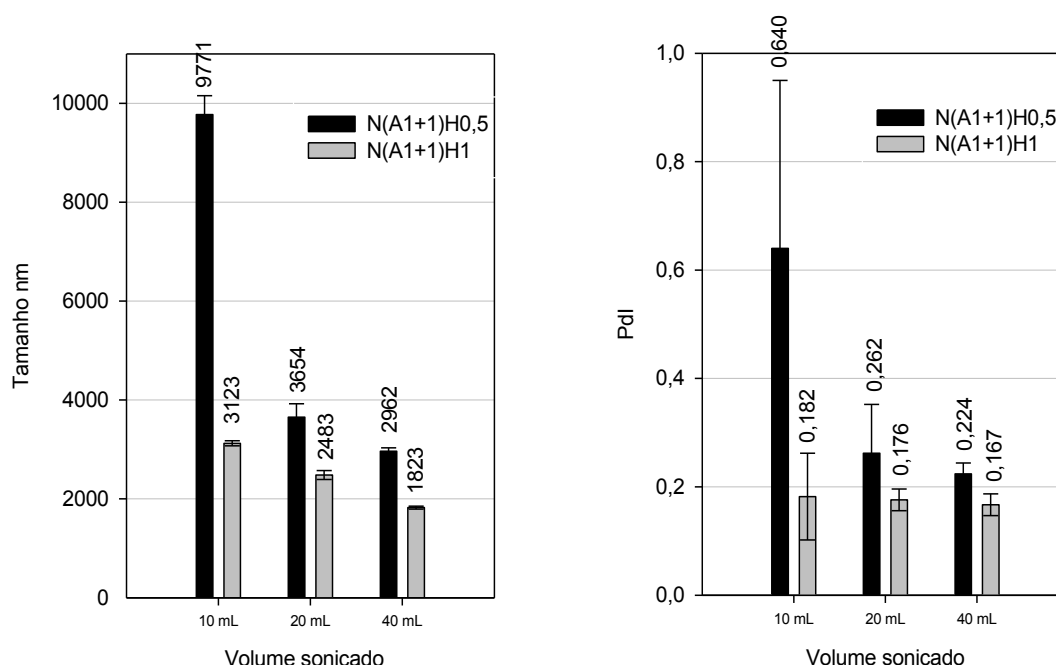
Para este mesmo processo diminuiu-se a amplitude de 15 para 10, a fim de evitar a formação de espuma para a amostra N(A1+1)H0,5, resultando em partículas com tamanho de 4040,33 nm e Pdl de 0,292. Logo, a diminuição da amplitude não reduziu o tamanho das partículas quando um volume de 10 mL é utilizado.

Com a redução do volume para 5mL e a utilização de um valor de amplitude 10, não foi possível concluir o processo de sonicação para amostra N(A1+1)H1, devido a formação de espuma, resultando em partículas com tamanho de 2869,33 nm e Pdl de 0,141.

Para o volume de 40 mL, o processo de sonicação foi executado para as amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)H0,5, obtendo partículas com os menores tamanhos e índice de polidispersão, com os respectivos valores do diâmetro médio de 1822,67 nm e 2562,36 nm e Pdl de 0,167 e 0,224.

Para visualizarmos o melhor volume de amostra a ser sonicado, os resultados comparativos estão apresentados na Figura 24.

**Figura 24** - Tamanho médio e índice de polidispersão das partículas para as amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)H0,5 com volume de 10, 20 e 40 mL, sonicadas na amplitude 15, por 4 minutos.



Os resultados mostram que o volume de 40 mL foi mais adequado para produção das micro/nanossuspensões (N(A1+1)H1; N(A1+1)H0,5) através do processo de sonicação, pois apresentou melhores resultados no tamanho de partícula e polidispersão, em relação aos menores volumes testados. Além disso, não houve extravasamento da amostra e o processo de sonicação foi concluído sem nenhum problema.

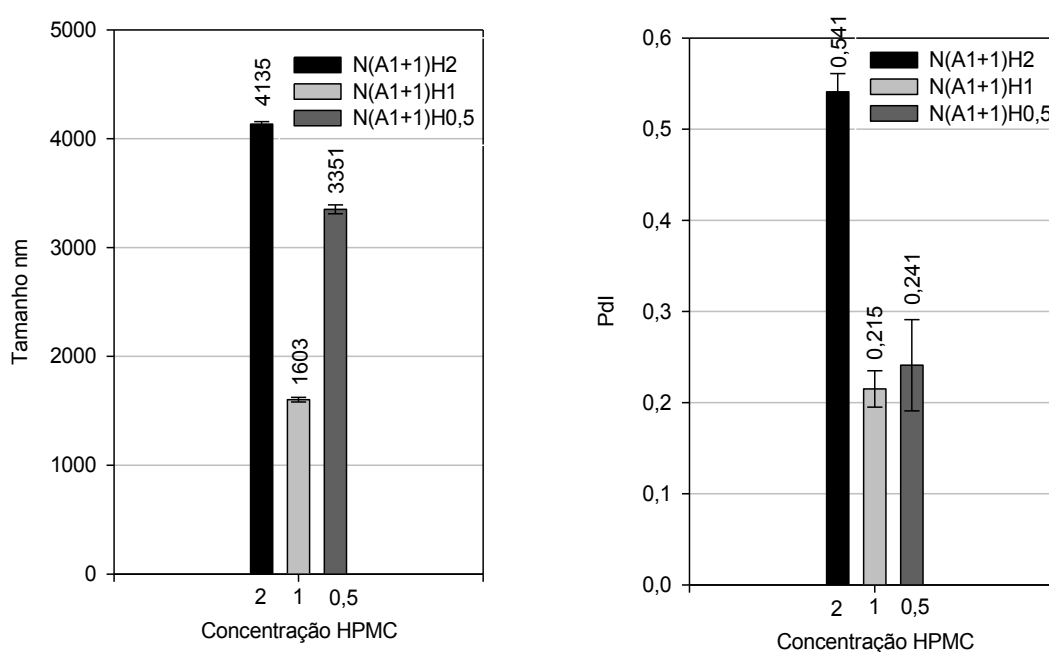
#### 5.4.2 Estudo da proporção de MTX:HPMC

O estudo da concentração de estabilizante é importante para o desenvolvimento das micro/nanossuspensões, para que a quantidade utilizada

seja suficiente para ser adsorvida na superfície das partículas, formando uma barreira que evita a aglomeração (VAN EERDENBRUGH; VAN DEN MOOTER; AUGUSTIJNS, 2008).

Este estudo sobre a concentração de estabilizante foi realizado para comparar as diferentes proporções utilizadas de HPMC, a fim de avaliar qual a quantidade de HPMC mais adequada para a obtenção das micro/nanossuspensões utilizando agitação por sonicação. Foram testadas as proporções de 1:0,5 (MTX:HPMC); 1:1 (MTX:HPMC); 1:2 (MTX:HPMC), em relação a massa do fármaco (Figura 25).

**Figura 25** - Tamanho médio de partícula e índice de polidispersidade (Pdl), para diferentes concentrações de HPMC, obtidas por sonicação.



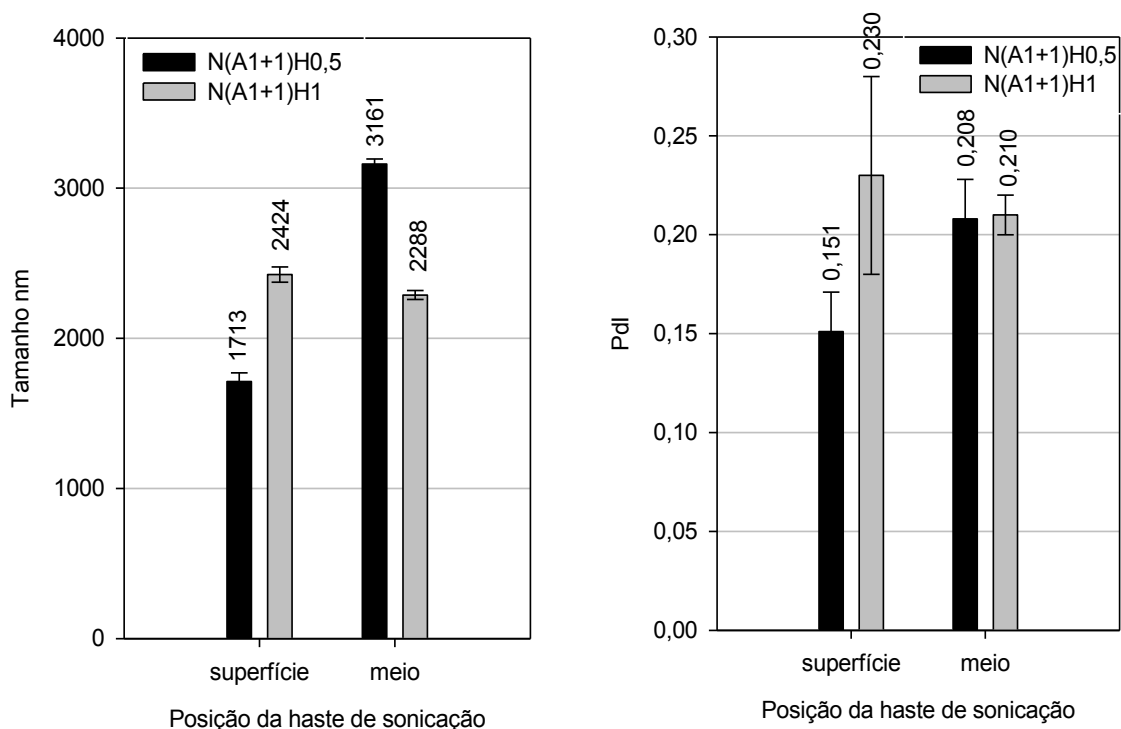
Os resultados mostram que para a proporção 1:1 (MTX:HPMC), permitiu a redução do tamanho de partícula e índice de polidispersão (1603 nm e Pdl 0,215), porém em todas as condições as partículas apresentaram-se na escala

micrométrica. Quando houve adição de maior concentração de estabilizante (1MTX: 2HPMC), o diâmetro médio e o Pdl aumentaram, respectivamente.

### 5.4.3 Estudo da posição da haste de sonicação

A imersão da haste de sonicação pode afetar a taxa de crescimento do cristal, sendo necessária que a profundidade de imersão seja estabelecida experimentalmente (NISHIDA, 2004). A Figura 26 mostra os resultados do tamanho médio das partículas e o índice de polidispersidade para o estudo da posição da haste do sonicador para as amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)H0,5.

**Figura 26** - Tamanho médio de partícula e índice de polidispersidade (Pdl) de N(A1+1)H1 e N(A1+1)H0,5 variando a posição da haste de sonicação (superfície e ao meio da amostra), realizada na amplitude 15 por 4 min.

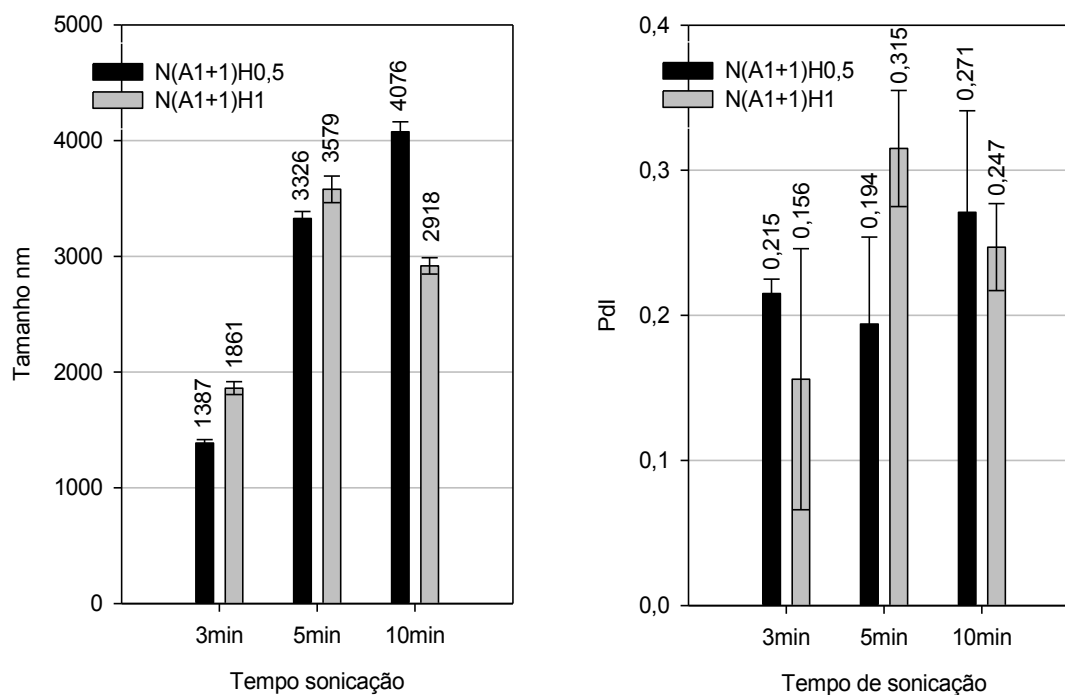


A análise dos resultados mostram que para a amostra N(A1+1)H1 não houve diferença na redução do tamanho de partícula com a alteração na posição da haste e nem para o índice de polidispersão. Já para a amostra N(A1+1)H0,5 a haste na superfície contribuiu para reduzir o tamanho das partículas e o Pdl, obtendo-se desta maneira o menor diâmetro médio. Isto pode ser atribuído, pela menor concentração de estabilizante presente nesta amostra, sendo mais fluída, influenciando no processo de sonicação e na redução do tamanho das partículas. Assim, a posição da haste de sonicação na superfície foi estabelecida, para obtenção das micro/nanossuspensões utilizando Sonicador.

#### **5.4.4 Estudo do tempo de sonicação**

Na Figura 27 estão representados os resultados de tamanho médio de partícula e Pdl das amostras produzidas em diferentes tempos de sonicação.

**Figura 27** - Tamanho médio de partícula e índice de polidispersidade (Pdl) de N(A1+1)H1 e N(A1+1)H0,5 produzidas em diferentes tempos de sonicação (3, 5 e 10 min).



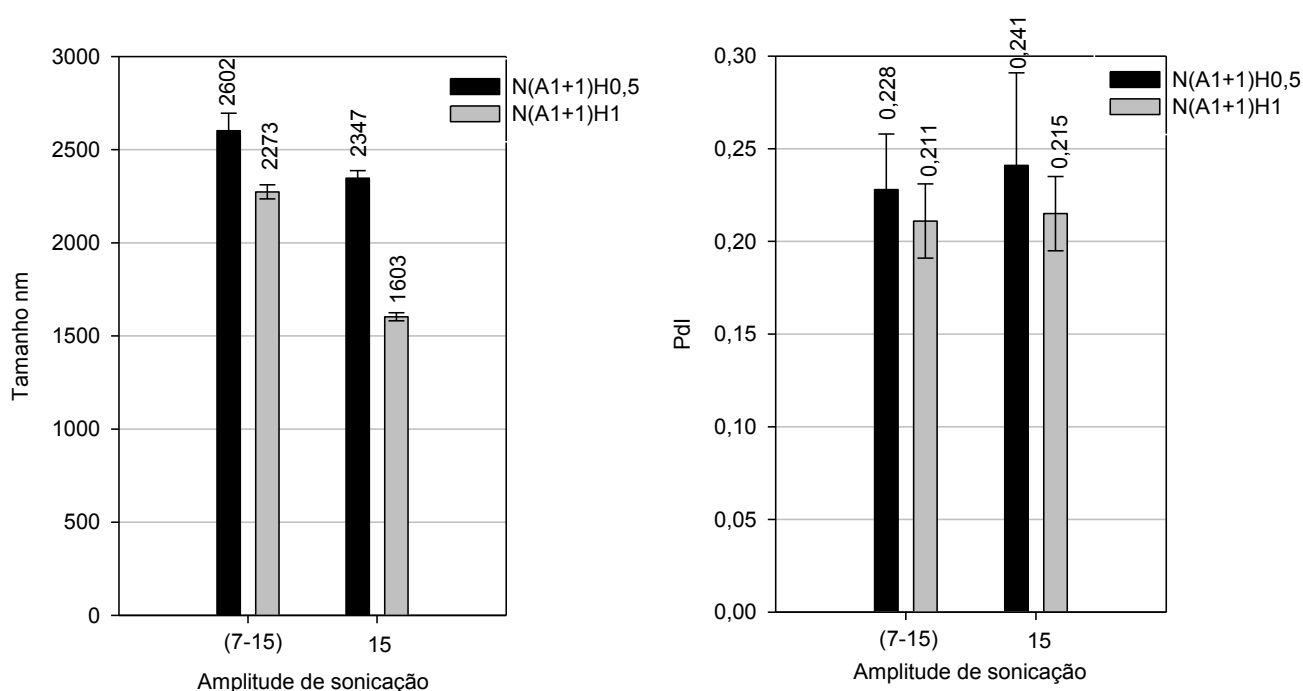
Os resultados acima demonstram que quanto maior o tempo de sonicação, maior o tamanho médio e Pdl das partículas, além de aumentar o desvio padrão das amostras no índice de polidispersidade. O aumento da energia provoca a aglomeração das partículas, devido a intensificação da colisão entre elas, tendo a formação de partículas maiores (SINHA; MÜLLER; MÖSCHWITZER, 2013). Desta maneira, o menor tempo de sonicação (3min) permitiu a redução do tamanho das partículas para as amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)H0,5, porém para a amostra N(A1+1)H1 houve um crescimento no Pdl.

#### 5.4.5 Estudo da variação da amplitude de sonicação

Primeiramente foi avaliado se é mais eficiente o aumento gradual da amplitude (7-15) durante o processo *Bottom-up* no Sonicador, ou realizar este processo sob uma amplitude fixa de 15.

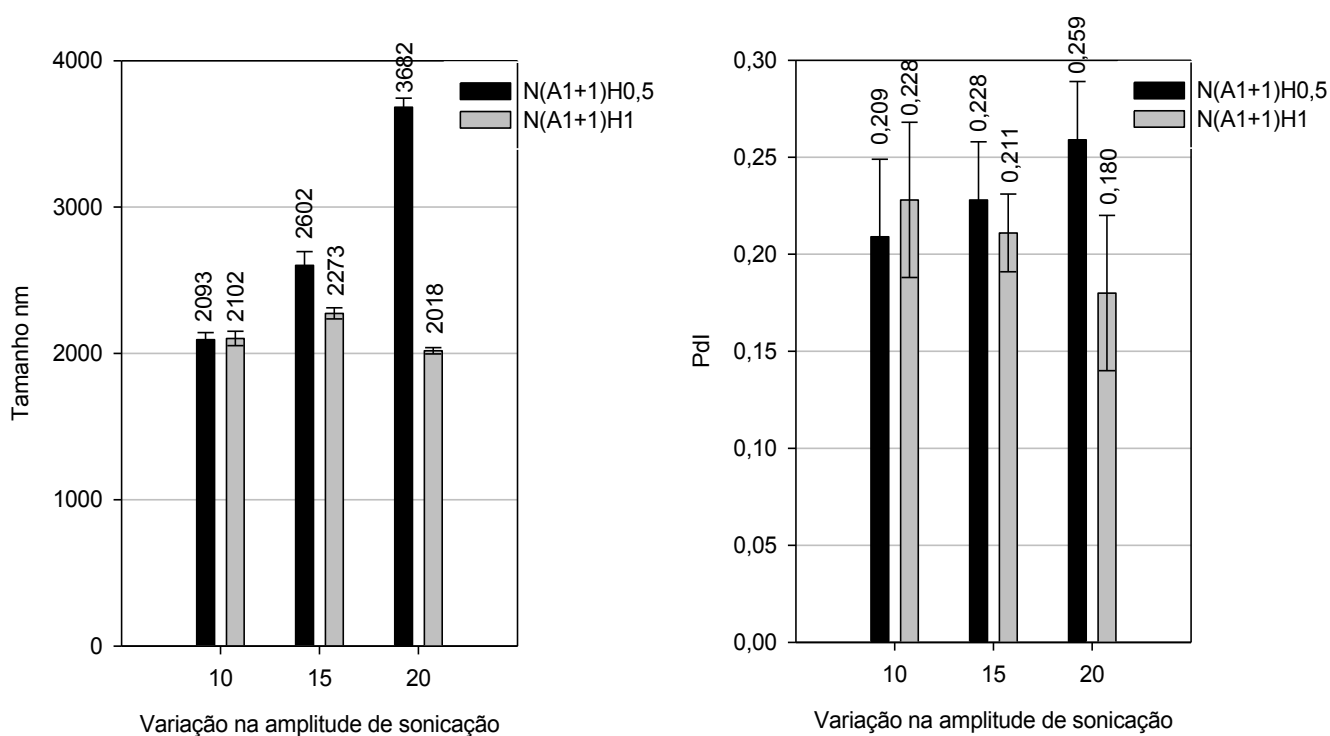
A Figura 28 mostra que fixar o valor da amplitude para as amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)H0,5, partículas menores são formadas, quando comparado com o aumento gradual da amplitude durante o processo de sonicação. Portanto, este resultado demonstra que a utilização da amplitude fixa contribui para a diminuição do tamanho das partículas das micro/nanossuspensões.

**Figura 28** - Tamanho médio de partícula e Pdl das amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)H0,5, testando o uso da amplitude fixa de 15 ou o aumento gradual (7-15).



O segundo teste foi para verificar a influência da amplitude fixa no tamanho médio e Pdl das partículas para obtenção das micro/nanossuspensões. A Figura 29 apresenta os resultados da variação dos valores da amplitude de sonicação (10, 15 e 20).

**Figura 29** - Tamanho médio de partícula e índice de polidispersidade (Pdl) das amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)H0,5 produzidas em diferentes amplitudes de sonicação (10, 15 e 20).



Os dados acima mostram que maiores valores de amplitude de sonicação contribuem para o aumento do tamanho médio e do Pdl das partículas, exceto para a amostra N(A1+1)H1 que não demonstrou uma grande diferença. Já para a amostra N(A1+1)H0,5, a elevação da amplitude levou ao aumento do tamanho das partículas e do índice de polidispersão. Por isso, este

estudo demonstra que um menor valor de amplitude favoreceu a obtenção de partículas menores nas microssuspensões.

Baseado nos dados anteriores, os parâmetros selecionados para o processo de sonicação na obtenção das micro/nanossuspensões foram: amplitude 10, durante 3 minutos, com a haste do sonicador na superfície usando um volume de 40 mL de amostra.

### **5.5 Estudo da adição do estabilizante poloxâmero 407**

A fim de avaliar o efeito de outro estabilizante para evitar a agregação das partículas das micro/nanossuspensões, obtidas pelos processos de Ultraturrax e Sonicador, o poloxâmero 407 (P407) foi testado em diferentes concentrações (1; 2,5 e 5%). Os resultados estão apresentados nas Tabelas 17 e 18, respectivamente.

**Tabela 17** - Tamanho de partícula, índice de polidispersidade (Pdl) e potencial zeta das amostras utilizando Ultra turrax, estabilizadas com poloxâmero 407 (média±DP).

| Quantidade<br>HCl 1M (mL) | HCl:NaOH | Quantidade<br>NaOH 1M (mL) | P407%<br>(p/v) | Amostra     | Tamanho médio<br>(nm) | Pdl        | Potencial zeta<br>(mV) |
|---------------------------|----------|----------------------------|----------------|-------------|-----------------------|------------|------------------------|
| 3,28                      | 1,5:1    | 2,2                        | 1%             | N(A1+1)P1   | 6771,67±1967,18       | 0,877±0,21 | 4,86±0,77              |
| 3,28                      | 1,5:1    | 2,2                        | 2,5%           | N(A1+1)P2,5 | 4732,33±848,17        | 0,326±0,08 | 4,57±0,63              |
| 3,28                      | 1,5:1    | 2,2                        | 5%             | N(A1+1)P5   | 2168,00±488,08        | 0,281±0,13 | 3,66±0,70              |

As amostras obtidas utilizando Ultra turrax, demonstraram que o aumento da concentração de P407 diminuiu o tamanho e o índice de polidispersão das partículas, exibindo um tamanho médio de partículas e Pdl variando entre 6.771,67 e 2.168,00 nm, 0,877 e 0,281, respectivamente. Os resultados demonstraram também que o aumento da concentração de estabilizante provocou uma redução no desvio padrão do tamanho das partículas.

Os valores do potencial zeta diminuíram com aumento da concentração do P407 (4,86 mV para 3,66 mV), tornando-se mais próximo de zero, em virtude do poloxâmero 407 ser um polímero não iônico e sua adsorção sobre a superfície das partículas, reduz a medida do potencial zeta (CHEN et al., 2013; HILLERY; FLORENCE, 1996).

**Tabela 18** - Tamanho de partícula e índice de polidispersidade (Pdl) das amostras utilizando Sonicador, estabilizadas com poloxâmero 407, (média±DP).

| Quantidade<br>HCl 1M (mL) | HCl:NaOH | Quantidade<br>NaOH 1M (mL) | P407%<br>(p/v) | Amostra     | Tamanho médio<br>(mV) | Pdl        |
|---------------------------|----------|----------------------------|----------------|-------------|-----------------------|------------|
| 3,28                      | 1,5:1    | 2,2                        | 1%             | N(A1+1)P1   | 4063,00±1689,66       | 0,290±0,04 |
| 3,28                      | 1,5:1    | 2,2                        | 2,5%           | N(A1+1)P2,5 | 3552,17±2052,55       | 0,075±0,08 |
| 3,28                      | 1,5:1    | 2,2                        | 5%             | N(A1+1)P5   | 370,80±265,71         | 0,470±0,14 |

Para as amostras empregando o Sonicador, os resultados mostram que uma maior concentração de poloxâmero P407 (5%) reduziu o tamanho das partículas, obtendo-se escala nanométrica, com o índice de polidispersidade acima de 0,4. Para as menores concentrações de poloxâmero (1 e 2,5%)

houve um aumento do tamanho das partículas, resultando em partículas micrométricas, além de um maior desvio padrão.

Para uma análise mais detalhada do tamanho médio das partículas, as amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5 obtidas através do Sonicador, foram comparadas. Nos dados anteriores, as partículas estabilizadas com HPMC apresentaram diâmetro médio superiores a 1400 nm. Com a utilização do poloxâmero 407 como estabilizante, as partículas apresentaram-se na escala nanométrica (370,80 nm).

Estes resultados podem sugerir que o HPMC demonstrou um efeito de estabilização sobre as partículas, promovendo um impedimento físico entre elas, enquanto que o P407 através da sua ação tensoativa foi capaz de reduzir o tamanho das partículas, devido sua capacidade de adsorver nas suas interfaces. Além disso, conclui-se que de acordo com o estabilizante usado no preparo das micro/nanossuspensões, este pode ser fundamental para promover uma redução no tamanho da partícula, além de evitar que ocorra aglomeração entre elas.

Verificou-se ainda, que a sonicação causa a redução do tamanho da partícula, uma vez que esta técnica pode induzir a nucleação e a cristalização do fármaco de forma mais rápida. As ondas de choque provocada por cavitação, pode reduzir o contato entre as partículas do fármaco, impedindo a aglomeração, formando partículas mais homogêneas (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO CAPOTE, 2007).

Portanto, o conjunto de resultados indica que a propriedade tensoativa do P407 em conjunto com o processo de sonicação foram mais eficazes na redução do tamanho das partículas do fármaco para escala nanométrica.

Com objetivo de avaliar a influência de outras condições de solubilização e precipitação para a obtenção das nanossuspensões utilizando Sonicador estabilizadas com P407, foram testadas menores proporções de NaOH e HCl, já utilizadas anteriormente no estudo realizado com HPMC e Ultra turrax. Os resultados estão apresentados na Tabela 19.

**Tabela 19** - Tamanho médio das partículas, Pdl e potencial zeta das amostras estabilizadas com P407, utilizando menores proporções de HCl e NaOH, utilizando Sonicador (média±DP).

| Quantidade<br>HCl 1M (mL) | HCl:NaOH | Quantidade<br>NaOH 1M (mL) | P407%<br>(p/v) | Amostra     | Tamanho médio<br>(nm) | Pdl        | Potencial zeta<br>(mV) |
|---------------------------|----------|----------------------------|----------------|-------------|-----------------------|------------|------------------------|
| 1,4                       | 0,7:1    | 1,8                        | 5%             | N(A1,4+B)P5 | 463,45±212,65         | 0,386±0,03 | -26,23 ± 0,10          |
| 1,5                       | 0,8:1    | 1,8                        | 5%             | N(A1,5+B)P5 | 627,03±526,07         | 0,447±0,07 | -14,70 ± 0,07          |
| 1,8                       | 1:1      | 1,8                        | 5%             | N(A1,8+B)P5 | 976,39±373,26         | 0,322±0,09 | -9,81 ± 0,04           |

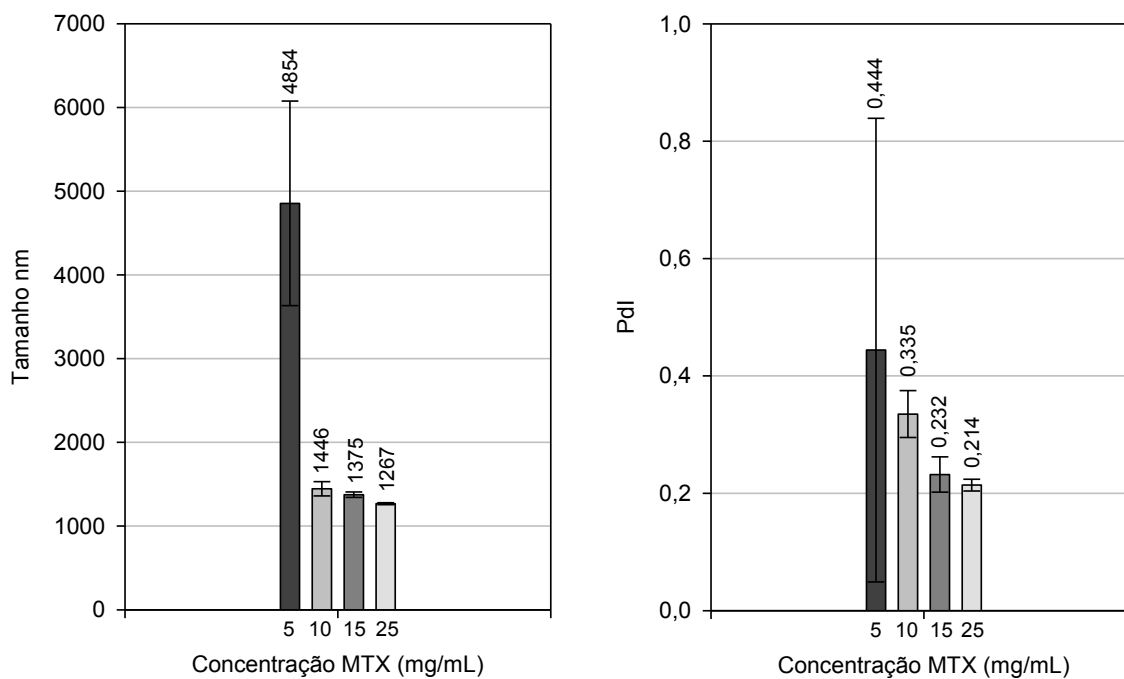
Os resultados demonstram que estas condições de solubilização e precipitação, utilizando menores quantidades de HCl, também favoreceram para a redução do tamanho das partículas, como já visto anteriormente. Com a utilização da sonicação e do P407 (5%) foi possível obter partículas com tamanho mais reduzido, obtendo-se partículas na escala nanométrica.

Avaliando-se o potencial zeta, houve uma diminuição nos valores com a utilização do P407 (5%) como observado anteriormente, devido a sua adsorção sobre a superfície das partículas, resultando na redução da medida do potencial zeta. Estas amostras N(A1,4+B); N(A1,5+B); N(A1,8+B), apresentaram valores de potencial zeta de (-43,88 mV); (-31,33 mV); (-17,30 mV), e com a adição do P407 esses valores foram reduzidos para (-26,20 mV); (-14,70 mV) e (-9,81 mV), respectivamente.

#### **5.6 Variação da concentração de MTX no preparo das micro/nanossuspensões por sonicação**

Com objetivo de avaliar o efeito de concentrações menores que 25 mg/mL de MTX no tamanho das partículas das micro/nanossuspensões empregando Sonicador, diferentes concentrações de MTX foram testadas (5; 10 e 15 mg/mL). Foram utilizados para este teste a amostra N(A1+1)H1 e como estabilizante o HPMC na proporção de 1:1, em relação a massa de fármaco. O tamanho e o Pdl das partículas com diferentes concentrações de MTX estão apresentadas na Figura 30.

**Figura 30** - Tamanho de partícula e índice de polidispersidade (Pdl) com diferentes concentrações de MTX (5; 10; 15 e 25 mg/mL) nas amostras, utilizando HPMC (1:1) como estabilizante.

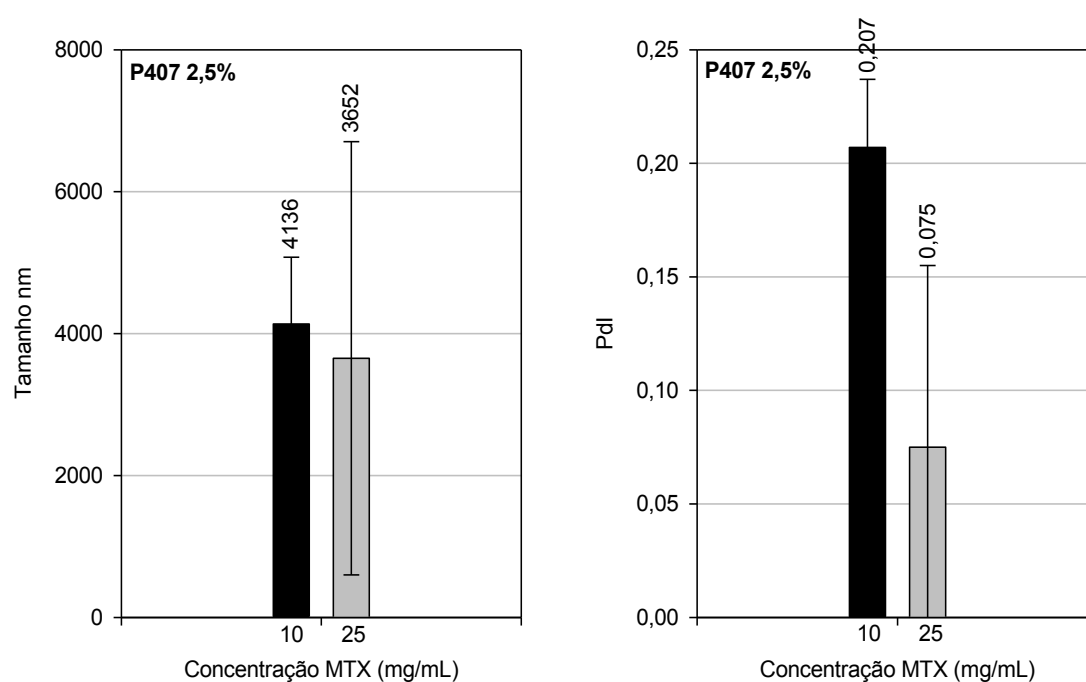


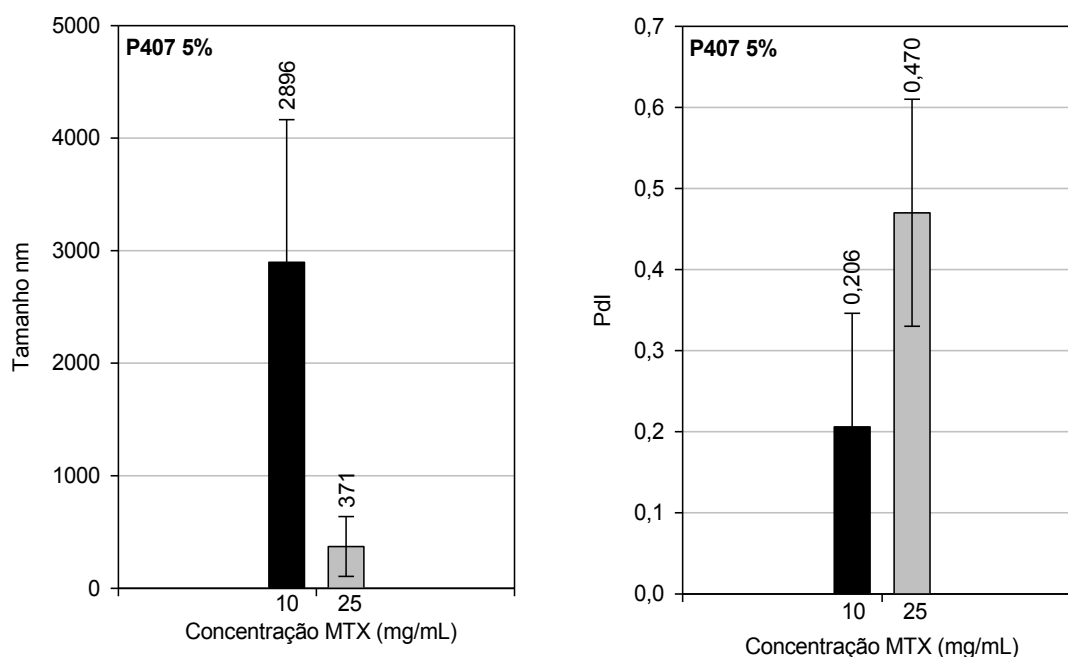
A redução da concentração de MTX para 10 e 15 mg/mL nas amostras N(A1+1)H1, não diminuiu significativamente o tamanho das partículas em relação à mesma amostra utilizando 25 mg/mL de fármaco. Por outro lado, a menor concentração utilizada de MTX (5 mg/mL), promoveu um aumento no tamanho das partículas. Ao mesmo tempo o índice de polidispersão também teve seu crescimento em função da redução da concentração de MTX. Estes resultados demonstram que uma menor quantidade de fármaco no preparo das micro/nanossuspensões não influenciou na redução do tamanho das partículas. Além disso, uma menor concentração de fármaco durante a precipitação química, favoreceu para a aglomeração das partículas, resultando em tamanhos elevados.

Para a amostra N(A1+1) utilizando poloxâmero como estabilizante, nas concentrações de 2,5 e 5%, foi analisada a concentração 10 mg/mL de MTX e

comparada com os resultados obtidos anteriormente, usando 25 mg/mL de fármaco. A Figura 31 apresenta o tamanho e o Pdl das partículas, para as amostras usando concentrações de 10 e 25 mg/mL de MTX, estabilizadas com poloxâmero 407 (2,5 e 5%), respectivamente.

**Figura 31** - Tamanho de partícula e índice de polidispersidade (Pdl) comparando as diferentes concentrações de MTX (10 e 25 mg/mL) para as amostras com P407 (2,5 e 5%).





Os resultados mostram que com o decréscimo da concentração de MTX nas amostras obtidas com Sonicador utilizando P407 2,5% provocou uma diminuição no desvio padrão, porém também não reduziu o tamanho das partículas. Para as amostras com P407 5%, ocorreu um forte aumento no tamanho das partículas, porém verificou-se uma redução na polidispersão. Estes dados demonstram, que o tamanho de partícula também está relacionado com a concentração de fármaco utilizado na obtenção das micro/nanossuspensões, indicando que a concentração de 25 mg/mL de MTX foi a mais adequada para o controle do tamanho das partículas.

### 5.7 Estudos de morfologia das micro/nanossuspensões

A microscopia eletrônica de varredura possibilita a caracterização da morfologia das micro/nanossuspensões, avaliando a modificação da superfície das partículas pela interação com tensoativos e polímeros.

A fotomicrografia obtida por MEV-FEG apresentada na Figura 32, corresponde a morfologia da superfície do pó (adquirido comercialmente).

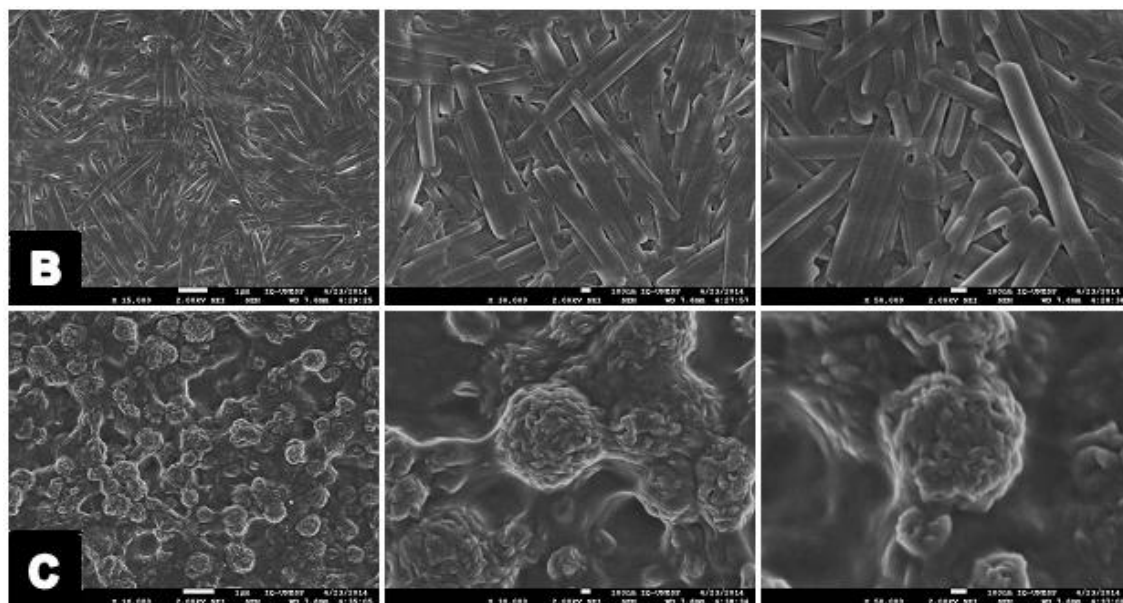
**Figura 32** - Fotomicrografia obtida por MEV-FEG (5000x; 10000x e 15000x) da superfície do pó de MTX (A).



O pó (adquirido comercialmente) de MTX é caracterizado pela presença de cristais irregulares, que variam de 1  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$  (CHEN et al., 2012).

A Figura 33 apresenta a morfologia da superfície das partículas das amostras obtidas por sonicação, com ausência e presença de estabilizante (HPMC).

**Figura 33** - Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG (15000x; 30000x e 50000x) das amostras sem estabilizante N(A1+1)H0 (B) e com HPMC como estabilizante N(A1+1)H1 (C).

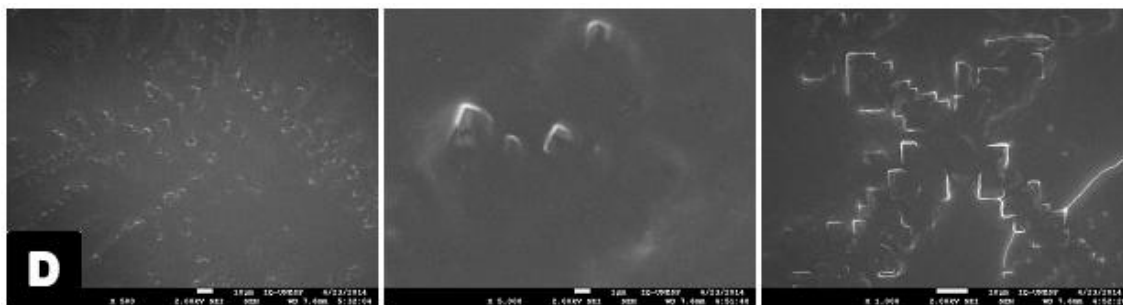


As amostras produzidas sem estabilizante, pelo método de precipitação formou partículas na forma de bastão, provavelmente devido ao elevado grau de supersaturação gerado pela neutralização ácido-base, que ocasionou a formação de um grande número de partículas, pela falta do uso de estabilizante para impedir a aglomeração das partículas de MTX (GHOSH et al., 2011; MOU et al., 2011; VERMA; GOKHALE; BURGESS, 2009).

As amostras contendo HPMC como estabilizante estérico apresentaram partículas esféricas. A Figura 33 (C) permite observar um grande aglomerado de partículas de MTX com formas esféricas, sugerindo que o HPMC formou uma cobertura na superfície partícula.

As fotomicrografias das nanossuspensões obtidas por sonicação, contendo P407 como estabilizante estão apresentadas na Figura 34.

**Figura 34** - Fotomicrografias obtidas por MEV-FEG (500x; 1000x e 5000x) das nanossuspensões com P407 como estabilizante N(A1+1)P5 (D).



O P407 é um copolímero tribloco muito utilizado como estabilizante e sua adsorção nas partículas é acompanhada pela sobreposição de cadeias vizinhas. Ele se revelou como um importante inibidor no crescimento das partículas de MTX, provavelmente devido ao grupo de óxido de polipropileno (BECK et al., 2013; GHOSH et al., 2011). No entanto, como se pode observar, o poloxâmero 407 como estabilizante nas nanossuspensões modificou a forma da partícula do fármaco, produzindo formas geométricas quadradas. Mou e colaboradores (2011) relataram comportamento semelhante com nanossuspensões de itraconazol estabilizadas com P407.

## 5.8 Avaliação do MTX nas partículas das micro/nanossuspensões

O objetivo deste estudo é avaliar o MTX nas partículas das micro/nanossuspensões através da técnica *Bottom-up*. Para isso, foram selecionadas as amostras obtidas com Ultra turrax, que apresentaram maior (N(A0+1)H0,5) e menor (N(A1+0)H0,5) tamanho de partícula, utilizando HPMC na proporção de 1:0,5 (p/p), em relação à massa de fármaco.

Para as amostras obtidas empregando Sonicador, preparadas com o P407 em diferentes concentrações 1; 2,5 e 5% (N(A1+1)P1; N(A1+1)P2,5; N(A1+1)P5), o propósito foi investigar uma possível dissolução do fármaco nas amostras com poloxâmero, em razão de que em concentrações acima da

concentração micelar crítica (CMC), o P407 facilita a solubilização de fármacos que são fracamente solúveis em água, como o MTX (DUMORTIER et al., 2006).

As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi filtrado em membrana de acetato de celulose 0,45  $\mu$ m. O fármaco solúvel foi quantificado em espectrofotômetro UV-VIS, utilizando a curva analítica previamente obtida e validada em solução de HCl 0,1M.

Os valores das absorbâncias foram lidos em triplicata e substituídos na equação da reta para encontrar o valor da concentração do MTX solúvel no sobrenadante de cada nanossuspensão. Os resultados obtidos para as micro/nanossuspensões estabilizadas com HPMC e P407, estão apresentados na Tabela 20.

**Tabela 20** - Concentrações de MTX solúvel (mg/mL e porcentagem %) encontrado no sobrenadante das micro/nanossuspensões estabilizadas com HPMC e P407, determinado por espectrofotômetro UV-VIS (média  $\pm$  DP).

| Amostras    | Concentração MTX solúvel<br>(mg/mL) | Concentração MTX<br>solúvel (%) |
|-------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| N(A0+1)H0,5 | 0,04 $\pm$ 0,01                     | 0,14 $\pm$ 0,03                 |
| N(A1+0)H0,5 | 5,25 $\pm$ 0,19                     | 20,99 $\pm$ 0,77                |
| N(A1+1)P1   | 0,15 $\pm$ 0,01                     | 0,55 $\pm$ 0,01                 |
| N(A1+1)P2,5 | 0,19 $\pm$ 0,01                     | 0,71 $\pm$ 0,01                 |
| N(A1+1)P5   | 0,23 $\pm$ 0,02                     | 0,85 $\pm$ 0,02                 |

Os resultados mostram que a amostra que exibiu maior tamanho de partícula obtida por Ultra turrax utilizando HPMC (N(A0+1)H0,5), apresentou

uma pequena concentração de MTX na forma molecular (0,14%), estando relacionado com o pH final desta amostra encontrar-se ácido, indicando baixa solubilidade do fármaco. A nanossuspensão N(A1+0)H0,5 apresentou 20,99% de fármaco solúvel, ou seja, uma maior quantidade de MTX na forma molecular. Isso pode estar relacionado com pH final desta amostra estar mais próximo do valor de pH básico, quando os grupamentos carboxílicos encontram-se ionizados, sendo a forma mais solúvel do MTX.

Os dados do poloxâmero P407 mostram que mesmo utilizando uma proporção de 5%, acima da CMC (4% p/v), uma pequena concentração de MTX encontra-se solúvel nas nanossuspensões (0,85%) (ALEXANDRIDIS; HOLZWARTH; HATTON, 1994; SHARMA et al., 2011). Esta concentração de estabilizante se torna interessante para o processo de obtenção das nanossuspensões com P407, sendo que na proporção de 5%, o poloxâmero reduziu o tamanho das partículas para a escala nanométrica, como mostrado nos resultados anteriores.

### **5.9 Preparo das micro/nanossuspensões por Top-down associadas ou não ao processo Bottom-up**

A técnica *Top-down* utilizando homogeneizador de alta pressão, foi avaliada na produção das suspensões e micro/nanossuspensões de MTX, com o objetivo de reduzir o tamanho das partículas. Esta técnica consiste na redução do tamanho das partículas, na qual a formulação é forçada sob alta pressão por uma abertura com uma velocidade rápida (EERDENBRUGH; MOOTER; AUGUSTIJNS, 2008).

O efeito de diferentes pressões e números de ciclos de homogeneização, associadas ou não ao processo de precipitação química (*Bottom-up*) sobre o tamanho médio e Pdl das suspensões e micro/nanossuspensões foram avaliadas, determinando a influência destes parâmetros sobre a estabilidade física das partículas.

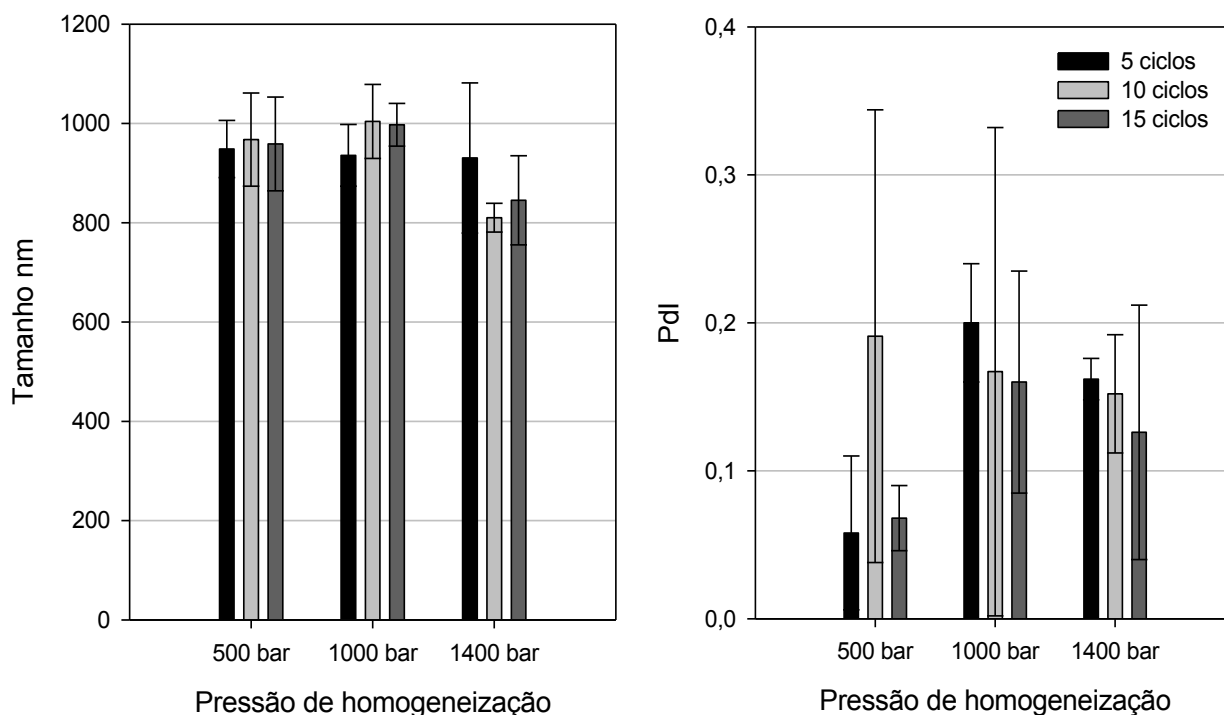
Foram utilizadas as amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)P2,5, as quais inicialmente foram submetidas ao processo de precipitação química e agitação com Sonicador, e em seguida foram homogeneizadas a alta pressão.

Para a amostra N(A1+1)H1 foram testadas pressões de 500, 1000 e 1400 bar, durante 5, 10 e 15 ciclos. Na amostra N(A1+1)P2,5, foram aplicadas pressões de 500 e 1000 bar com o mesmo número de ciclos da amostra anterior.

A suspensão SA2H1 foi submetida somente ao método *Top-down* utilizando homogeneizador de alta pressão com uma pressão de 500 bar durante 5, 10 e 15 ciclos.

Na Figura 35 está representado o tamanho médio e o Pdl da amostra N(A1+1)H1, homogeneizada em diferentes pressões (500; 1000 e 1400 bar) durante 5, 10 e 15 ciclos.

**Figura 35** - Tamanho médio de partícula e índice de polidispersidade (Pdl) da amostra N(A1+1)H1 obtida no homogeneizador de alta pressão em diferentes pressões (500; 1000 e 1400 bar) durante 5, 10 e 15 ciclos.



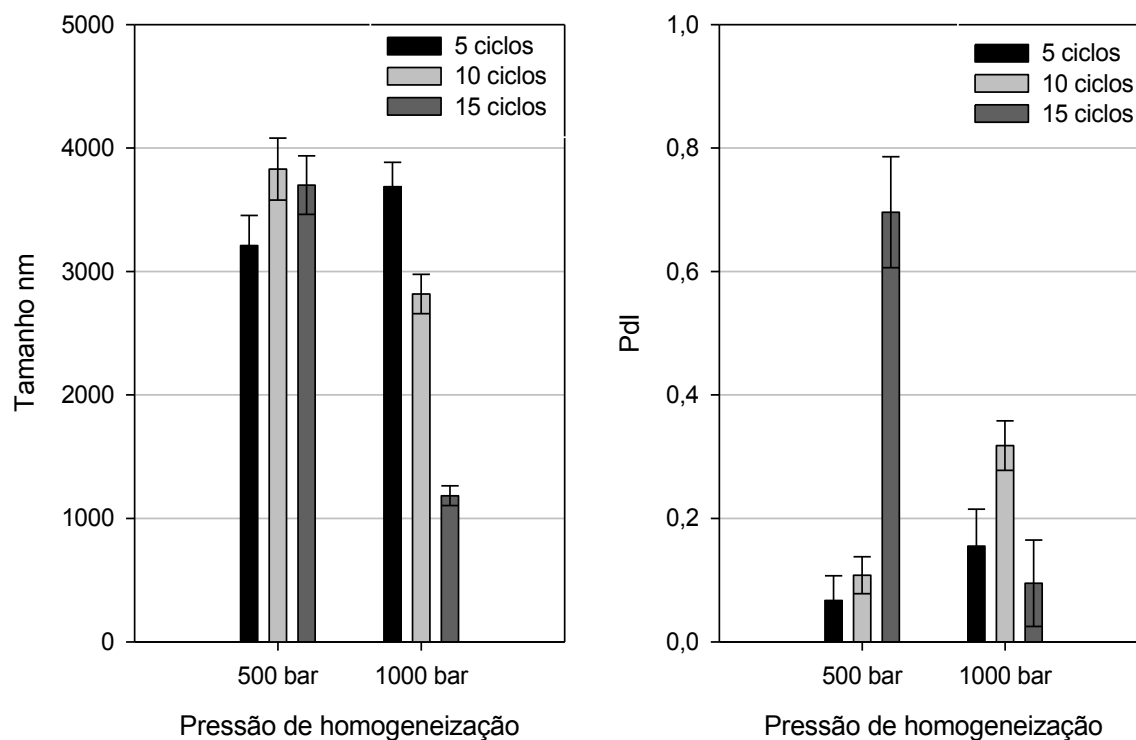
Os resultados mostram que à medida que a pressão aumentou, chegando a 1400 bar, houve uma redução no tamanho de partícula com 10 e 15 ciclos de homogeneização. Com 5 ciclos, ocorreu o aumento do diâmetro médio e do desvio padrão. No índice de polidispersidade, podemos observar um aumento no desvio padrão com 10 ciclos de homogeneização, utilizando pressões de 500 e 1000 bar. Entretanto, o maior valor de pressão utilizada, provocou um aumento na viscosidade da amostra, devido a alta temperatura durante o processo, dificultando a conclusão da homogeneização. Além disso, esta viscosidade apresentada pode ocasionar o entupimento da mangueira do homogeneizador de alta pressão. Outro problema encontrado foi que a pressão não se manteve estável em 1400 bar, gerando oscilações para 1200 e 1300

bar. Desta maneira, a pressão de homogeneização de 1400 bar foi descartada do estudo.

A homogeneização a 500 bar apresentou uma tendência a estabilidade do sistema, não havendo uma grande variação no tamanho de partícula com crescimento no número de ciclos de homogeneização, mantendo o sistema estável mesmo com o aumento da energia do processo. Porém, houve uma intensa elevação no índice de polidispersidade e no desvio padrão com 10 ciclos. Assim, a pressão de 500 bar com 5 e 15 ciclos de homogeneização, foram os resultados mais adequados apresentados no Pdl.

A Figura 36 apresenta o tamanho médio e o Pdl da amostra N(A1+1)P2,5 homogeneizada em diferentes pressões (500 e 1000) durante 5, 10 e 15 ciclos de homogeneização.

**Figura 36** - Tamanho médio de partícula e índice de polidispersidade (Pdl) da amostra N(A1+1)P2,5, obtida no homogeneizador de alta pressão em diferentes pressões (500 e 1000 bar) durante 5, 10 e 15 ciclos de homogeneização.

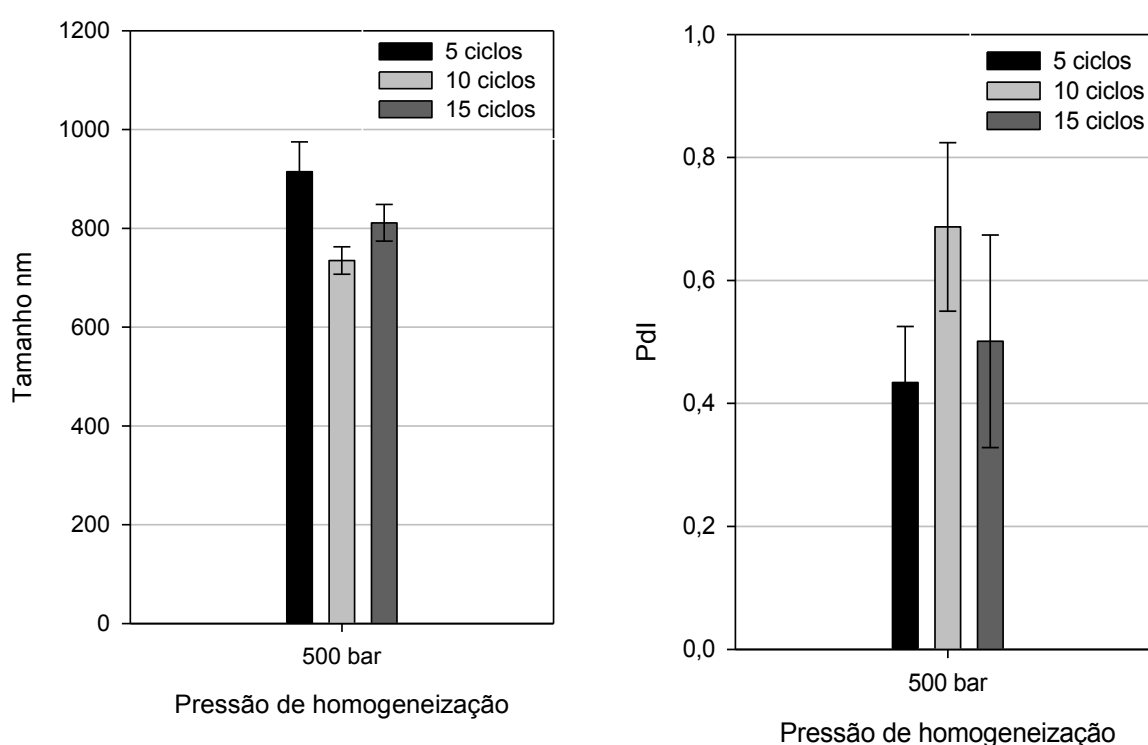


Os resultados indicam que na homogeneização a 500 bar, a elevação no número de ciclos provocou o crescimento no diâmetro médio de partículas. A medida que o número de ciclos aumentou, o índice de polidispersidade também tornou-se maior.

Quando a pressão de homogeneização atingiu 1000 bar, esse aumento reduziu o tamanho das partículas conforme o crescimento no número de ciclos. Além disso, chegando a 15 ciclos de homogeneização também houve uma diminuição na polidispersão em comparação com 5 e 10 ciclos. Deste modo, com aumento da pressão e com aumento no número de ciclos de homogeneização, ocorreu uma diminuição no tamanho e no Pdl.

Para a amostra SA2H1 foi utilizado somente a técnica por *Top-down*, no homogeneizador de alta pressão, a uma pressão de 500 bar durante 5, 10 e 15 ciclos de homogeneização (Figura 37).

**Figura 37** - Tamanho médio de partícula e índice de polidispersidade (Pdl) da amostra SA2H1, obtida no homogeneizador de alta pressão a uma pressão de 500 bar durante 5, 10 e 15 ciclos de homogeneização.



Os dados demonstram que para a suspensão SA2H1, na pressão de 500 bar com 10 ciclos de homogeneização, obteve-se uma redução no tamanho de partícula, em relação aos outros ciclos de homogeneização. Porém, houve um aumento na polidispersão e no desvio padrão, indicando uma não homogeneidade na distribuição do tamanho das partículas.

Para análise mais detalhada, o método por precipitação (*Bottom-up*) com Sonicador, resultou em partículas com tamanho acima de 1200 nm para a

amostra N(A1+1)H1. Para a amostra N(A1+1)P2,5 estabilizada com P407, apresentou tamanho de partículas de 3652,17 nm.

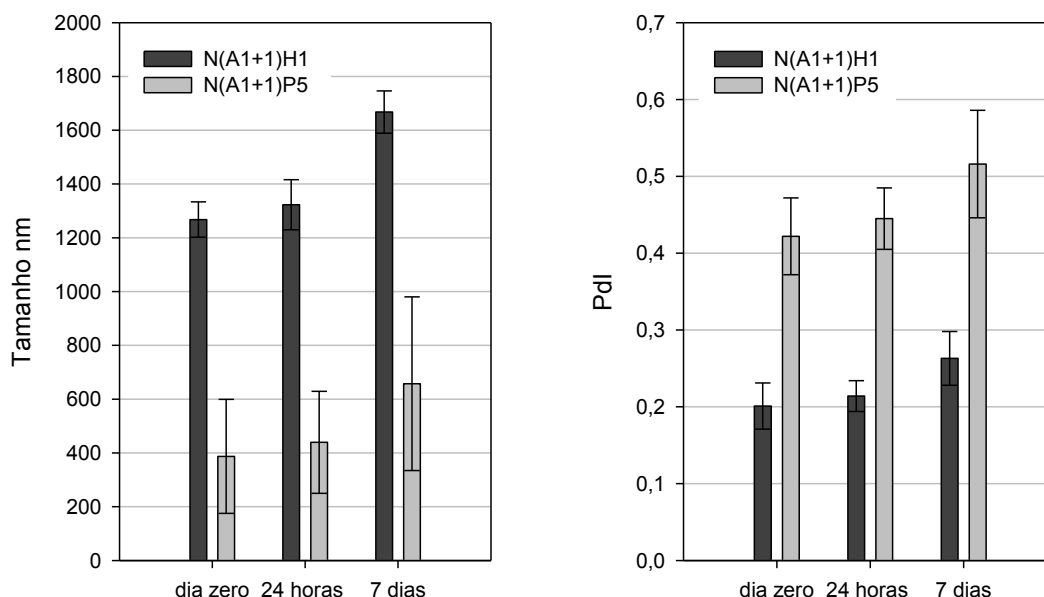
Os métodos de precipitação (*Bottom-up*) associada a homogeneização (*Top-down*) para as amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)P2,5 resultaram em tamanhos de partículas de 935,8 e 1184 nm, respectivamente. Estes resultados demonstram que houve redução do tamanho das partículas quando a técnica *Top-down* foi associada ao *Bottom-up*. Por outro lado, para a amostra SA2H1, a utilização do processo *Top-down* também promoveu redução do tamanho das partículas, porém não apresentou homogeneidade. Portanto, estes resultados não demonstraram relevância para a produção das micro/nanossuspensões de MTX.

#### **5.10 Estabilidade física das micro/nanossuspensões**

O estudo de estabilidade foi realizado com objetivo de verificar o efeito do método de obtenção *Bottom-up* através do Sonicador, além dos estabilizantes utilizados no desenvolvimento das micro/nanossuspensões de MTX.

O tamanho das partículas e o Pdl foram avaliados para as amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5, imediatamente após a preparação (dia zero), 24 horas e 7 dias, armazenadas em 25 °C, em frascos de vidro âmbar (Figura 38).

**Figura 38** - Avaliação da estabilidade com a medida do tamanho de partícula e Pdl das micro/nanossuspensões obtidas pelo método Bottom-up, avaliadas no dia da preparação, 24 horas e 7 dias, armazenadas a 25 °C.



Os resultados mostram que não houve uma alteração significativa no tamanho das partículas e Pdl das amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5, mesmo após 24 horas de armazenamento. Depois de 7 dias, ocorreu um pequeno aumento no tamanho das partículas e Pdl para as duas amostras, porém as partículas da amostra N(A1+1)P5 permaneceram na escala nanométrica. Verificou-se ainda, que a N(A1+1)P5 apresentou valores de Pdl acima de 0,5, indicando heterogeneidade no tamanho das partículas, podendo facilitar a agregação.

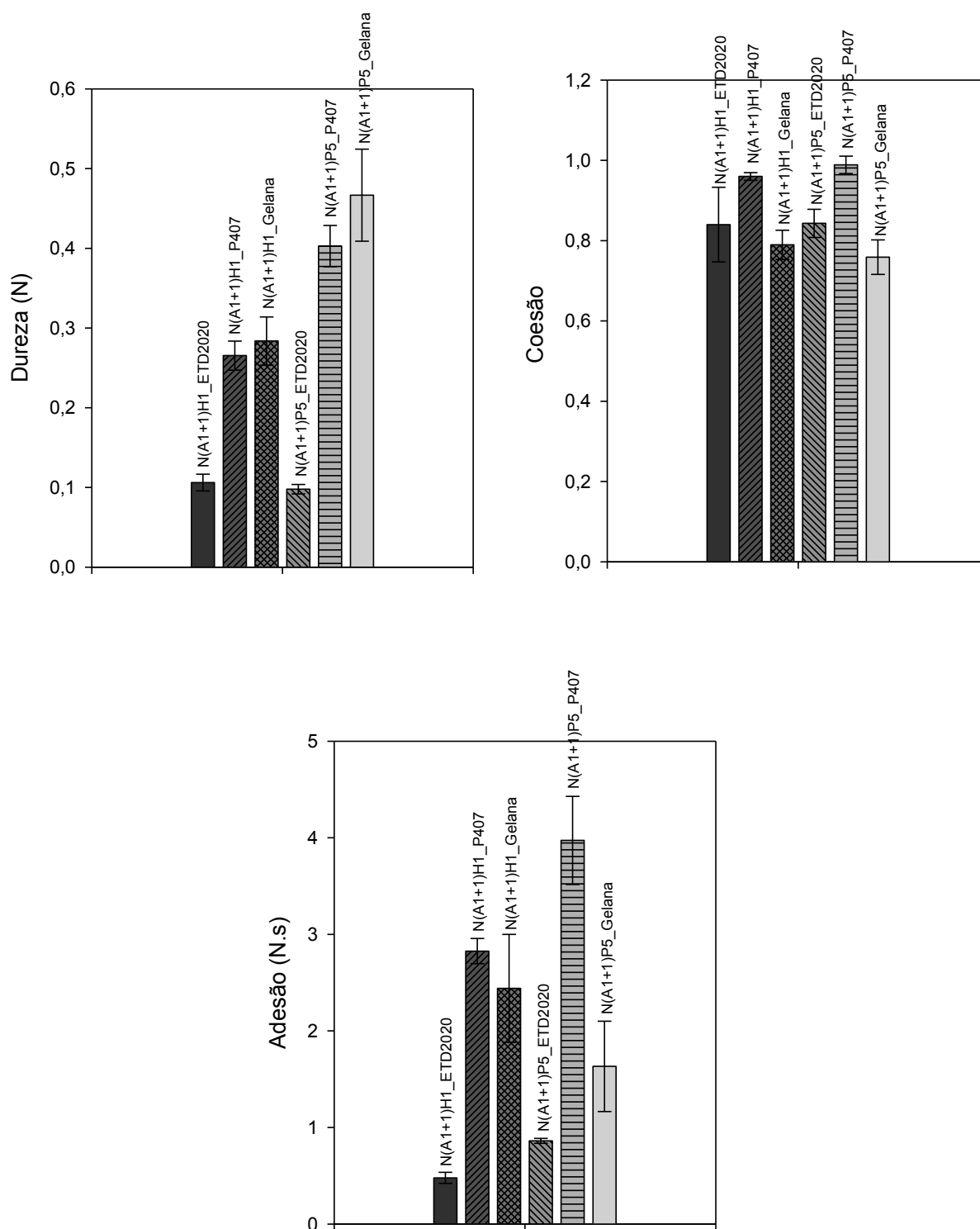
Estes resultados podem sugerir que o HPMC e P407 utilizados no preparo das micro/nanossuspensões estabilizaram o tamanho das partículas, durante 7 dias de armazenamento.

### **5.11 Avaliação das propriedades mecânicas das micro/nanossuspensões com os polímeros mucoadesivos**

A avaliação das propriedades mecânicas foi realizada para as amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5 associadas aos polímeros mucoadesivos carbopol ETD2020, poloxâmero 407 e goma gelana. Para simular e analisar a textura adquirida em contato com ambiente colônico, foi realizado o ajuste de pH para 6,0 utilizando solução NaOH 0,2 M.

As propriedades mecânicas avaliadas foram: dureza (força máxima necessária para que ocorra uma determinada deformação na amostra), adesividade (trabalho necessário para vencer a força de atração existente entre a amostra e a sonda analítica) e coesividade (determina a taxa que um material se rompe sob uma ação mecânica), apresentadas na Figura 39 (EXPONENT LITE, 2009).

**Figura 39** - Avaliação das propriedades mecânicas das micro/nanossuspensões (N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5) associadas aos polímeros mucoadesivos carbopol ETD2020, poloxâmero 407 e goma gelana.



As amostras N(A1+1)P5\_P407 e N(A1+1)P5\_Gelana, foram as que apresentaram maiores valores de dureza, sem diferença estatisticamente significativa entre si ( $p > 0,05$ ), porém são diferentes estatisticamente em comparação as demais amostras ( $p < 0,05$ ). O mesmo comportamento foi observado para as amostras N(A1+1)H1\_P407 e N(A1+1)H1\_Gelana.

Entre as amostras que obtiveram os menores valores para dureza N(A1+1)H1\_ETD2020 e N(A1+1)P5\_ETD2020, ambas contendo o polímero carbopol ETD2020, não apresentaram diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Para as amostras com poloxâmero 407, N(A1+1)H1\_P407 e N(A1+1)P5\_P407 ( $p < 0,05$ ), o maior valor de dureza foi obtido pela amostra que apresentava uma maior concentração do P407 (N(A1+1)P5\_P407), mostrando que a dureza foi aumentada com o aumento da concentração do polímero.

Esses maiores valores de dureza indicam uma maior resistência da amostra à compressão, estando diretamente relacionada com a rigidez da amostra e sua resistência durante a aplicação.

A coesividade presente em sistemas poliméricos está associada as interações moleculares entre os componentes, tais como ligações de hidrogênio e ligações cruzadas com grupos carboxílicos livres (PEREIRA, 2011).

O menor valor de coesão caracteriza sistemas com estruturas mais fracas, mostrando que o trabalho necessário para sonda analítica penetrar na amostra no segundo ciclo de compressão foi menor, já que a primeira compressão provocou uma desestruturação da amostra.

Os maiores valores de coesão foram obtidos para as amostras com poloxâmero 407. Estas amostras N(A1+1)H1\_P407 e N(A1+1)P5\_P407 não demonstraram diferença estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ), mas apresentaram diferença estatística em comparação com as outras amostras ( $p < 0,05$ ).

A coesividade presente nas amostras N(A1+1)H1\_ETD2020, N(A1+1)P5\_ETD2020, N(A1+1)H1\_Gelana e N(A1+1)P5\_Gelana são semelhantes, não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Portanto, estas amostras são iguais entre si.

A adesividade é um parâmetro que está relacionada com a mucoadesão presente nos sistemas.

As amostras com carbopol ETD2020 (N(A1+1)H1\_ETD2020, N(A1+1)P5\_ETD2020) apresentaram menores valores de adesividade e não demonstraram diferença estatisticamente ( $>0,05$ ). Para as nanossuspensões utilizando goma gelana (N(A1+1)H1\_Gelana; N(A1+1)P5\_Gelana), os valores de adesão obtidos foram iguais, não houve diferença significativa entre as amostras ( $p>0,05$ ). Além disso, a N(A1+1)H1\_Gelana apresentou adesividade semelhante a N(A1+1)H1\_P407 ( $p>0,05$ ). O mesmo comportamento ocorreu entre as amostras N(A1+1)P5\_Gelana e N(A1+1)P5\_ETD2020 ( $>0,05$ ).

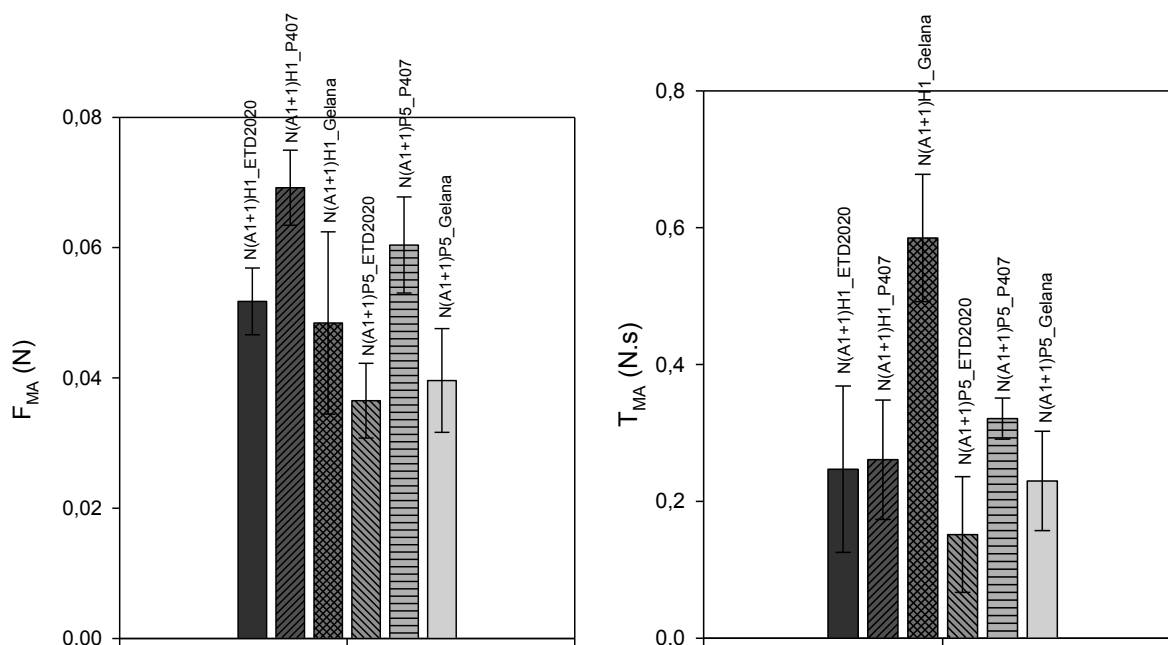
A maior adesividade foi obtida com as nanossuspensões utilizando polímero P407 (N(A1+1)H1\_P407 e N(A1+1)P5\_P407) ( $p<0,05$ ). O aumento da concentração do poloxâmero 407 aumentou os valores de adesão, assim como a dureza e coesão. Desta maneira, estes resultados indicam que uma maior dureza e adesão maior será a mucoadesão, favorecendo a retenção do sistema no local de ação, como a mucosa do cólon.

## 5.12 Ensaios *ex vivo* de mucoadesão

### 5.12.1 Avaliação da força mucoadesiva

A avaliação da mucoadesão *ex vivo* (força de mucoadesão -  $F_{MA}$ ) e trabalho de mucoadesão -  $T_{MA}$ ) foi realizada para as amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5 associadas aos polímeros mucoadesivos carbopol ETD2020, poloxâmero 407 e goma gelana, utilizando mucosa suína como membrana modelo (Figura 40). Para avaliar a influência da geleificação *in situ* na capacidade de mucoadesão dos polímeros, foi realizado o ajuste de pH para 6,0 utilizando solução NaOH 0,2 M, a fim de simular o contato com ambiente colônico e as amostras foram aquecidas a 37 °C antes do teste.

**Figura 40** - Força de mucoadesão - F<sub>MA</sub> e trabalho de mucoadesão - T<sub>MA</sub> das micro/nanossuspensões N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5 associadas aos polímeros mucoadesivos carbopol ETD2020, poloxâmero 407 e goma gelana (n=5, média  $\pm$  desvio padrão).



As amostras N(A1+1)H1\_P407 e N(A1+1)P5\_P407 apresentaram maiores valores F<sub>MA</sub>, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre elas ( $p > 0,05$ ), mostrando que uma maior concentração do polímero P407 não influenciou na força mucoadesiva. Além disso, a F<sub>MA</sub> da N(A1+1)H1\_P407 apresentou diferença estatisticamente ( $p < 0,05$ ) em comparação com as outras amostras que possuem os polímeros carbopol ETD2020 e goma gelana.

Já a N(A1+1)P5\_P407 apresentou valores semelhantes de F<sub>MA</sub> ( $p > 0,05$ ) com as amostras N(A1+1)H1\_Gelana e N(A1+1)H1\_ETD2020, enquanto que em relação as nanossuspensões N(A1+1)P5\_ETD2020 e N(A1+1)P5\_Gelana, houve diferença estatisticamente significativa na F<sub>MA</sub> ( $p < 0,05$ ).

As amostras N(A1+1)H1\_ETD2020; N(A1+1)P5\_ETD2020, N(A1+1)H1\_Gelana e N(A1+1)P5\_Gelana, demonstraram valores de F<sub>MA</sub> similares ( $p > 0,05$ ).

Os valores do trabalho de mucoadesão ( $T_{MA}$ ), foi maior para a amostra N(A1+1)H1\_Gelana ( $p<0,05$ ), indicando uma maior capacidade de interação com a camada de muco intestinal. A goma gelana apresenta reconhecidas propriedades mucoadesivas, estando relacionada principalmente aos seus grupos funcionais que interagem com a mucina (LEE; PARK; ROBINSON, 2000; NARKAR; SHER; PAWAR, 2010).

Apenas entre as amostras N(A1+1)P5\_ETD2020 e N(A1+1)P5\_P407 houve diferença estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ), nos valores obtidos de  $T_{MA}$ .

### 5.12.2 Avaliação da mucoadesão por análise gravimétrica

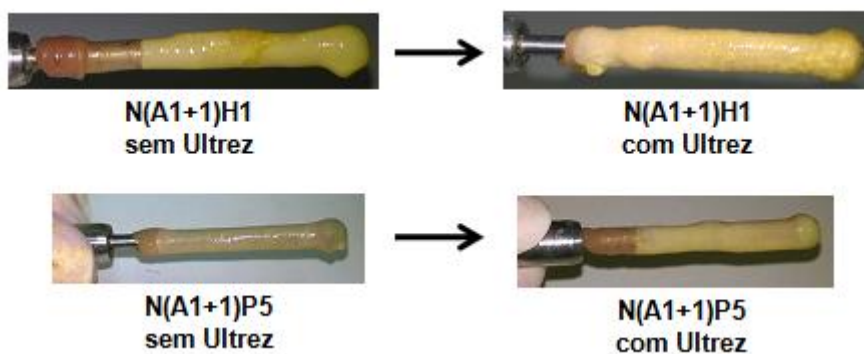
O teste de mucoadesão utilizando o texturômetro, foi realizado para as micro/nanossuspensões N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5 associadas ao carbopol Ultrez e comparadas com as mesmas amostras sem a adição do polímero mucoadesivo, através da análise gravimétrica. A mucoadesão foi medida pela quantidade de amostra aderida na mucosa colônica, calculando o aumento de massa retida no tecido, através da diferença do peso inicial com peso final. Essas medidas foram realizadas em triplicata (média $\pm$ DP) e estão apresentadas na Tabela 21.

**Tabela 21** - Avaliação da mucoadesão através da medida da quantidade das amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5, sem e com a adição do polímero mucoadesivo Ultrez, retidas na mucosa colônica (média±DP).

| Parâmetros       |                  |                |                      |
|------------------|------------------|----------------|----------------------|
| Amostra          | Peso inicial (g) | Peso final (g) | Aumento de massa (g) |
| N(A1+1)H1        | 8,843±0,008      | 8,858±0,009    | 0,015±0,006          |
| N(A1+1)H1_Ultrez | 8,876±0,079      | 8,965±0,068    | 0,089±0,019          |
| N(A1+1)P5        | 8,853±0,065      | 8,877±0,058    | 0,024±0,006          |
| N(A1+1)P5_Ultrez | 8,847±0,083      | 8,941±0,078    | 0,062±0,008          |

Os resultados mostram um aumento de massa sobre o tecido colônico das micro/nanossuspensões associadas ao polímero carbopol Ultrez, para as quais uma maior quantidade de amostra permaneceu aderida a superfície da mucosa, devido o aumento da viscosidade promovida pelo carbopol Ultrez em contato com tecido (Figura 41). Este aumento da viscosidade, proporcionou uma maior retenção da formulação sobre a superfície da mucosa, resultando na mucoadesão. Porém, as amostras não apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ).

**Figura 41** - Fotografias ilustrando a quantidade aderida ao tecido colônico das amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5, sem e com a adição do polímero mucoadesivo Ultrez.



### 5.12.3 Avaliação da mucoadesão utilizando teste de escoamento

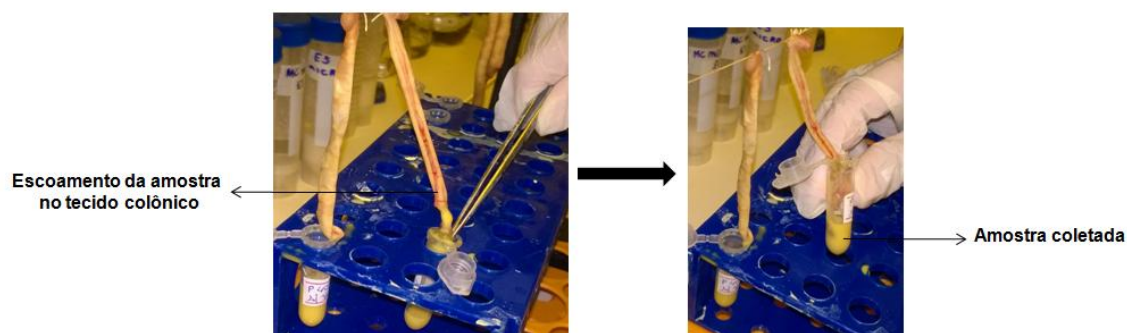
O teste de escoamento avaliou a capacidade de resposta de geleificação *in situ* do polímero mucoadesivo carbopol Ultrez, simulando este comportamento no interior do cólon, diretamente em contato com fluídos fisiológicos. O cólon de rato foi preenchido com 1 mL de cada amostra, N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5, sem e com a adição do polímero mucoadesivo Ultrez. Após o período de 30 min, o cólon foi cortado e a amostra presente no interior do tecido colônico foi coletada utilizando eppendorf, determinando a quantidade de formulação coletada, sendo as medidas realizadas em triplicata (média±DP) (Tabela 22).

**Tabela 22** - Quantidade de escoamento das amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5, sem e com a adição do polímero mucoadesivo Ultrez, após o contato com tecido colônico (média±DP).

| Amostra          | Quantidade escoada de amostra (mL) |
|------------------|------------------------------------|
| N(A1+1)H1        | 0,90 ± 0,10                        |
| N(A1+1)H1_Ultrez | Não houve escoamento               |
| N(A1+1)P5        | 0,97 ± 0,06                        |
| N(A1+1)P5_Ultrez | Não houve escoamento               |

Os dados indicam que as amostras sem a adição do polímero mucoadesivo carbopol Ultrez, a formulação foi quase completamente coletada, apresentando aspecto fluído (Figura 42).

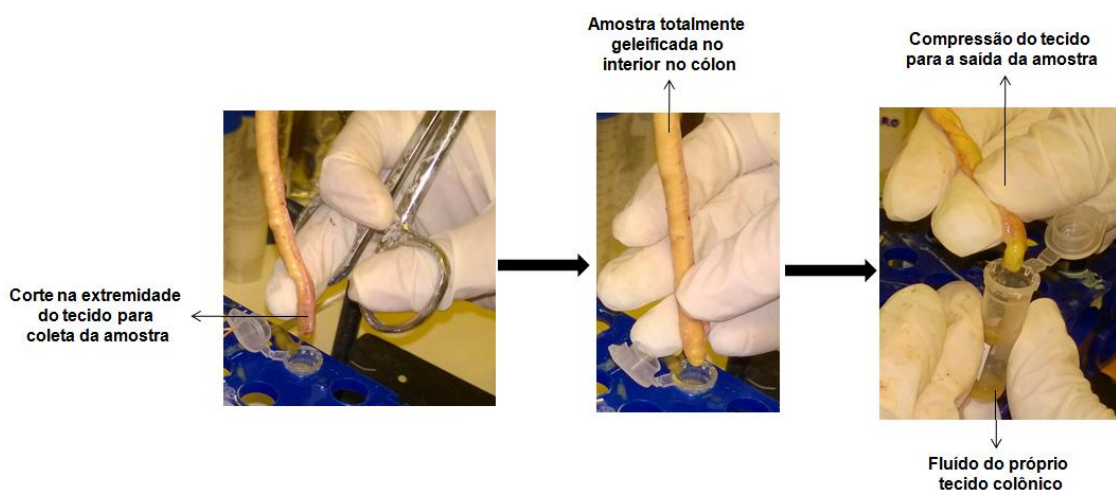
**Figura 42** - Fotografia do teste de escoamento das micro/nanossuspensões na ausência do polímero mucoadesivo Ultrez.



As amostras associadas ao carbopol Ultrez, demonstraram resistência no preenchimento do cólon, quando foi injetada amostra no tecido. Neste momento, conseguimos observar a promoção da geleificação *in situ*. Ainda as amostras apresentaram resistência ao escoamento, não sendo possível

realizar a coleta. Dessa maneira, as amostras exibiram aspecto totalmente viscoso em contato com a mucosa do cólon, dificultando a saída da formulação do interior tecido (Figura 43).

**Figura 43** - Fotografia do teste de escoamento das micro/nanossuspensões na presença do polímero mucoadesivo Ultrez.



Polímeros derivados do ácido poliacrílico (APA) como o carbopol Ultrez, possuem propriedades mucoadesivas, estabelecidas pelo aumento da viscosidade quando entram em contato com algum estímulo fisiológico (PARK; ROBINSON, 1984). Quando estas amostras entraram em contato com a mucosa colônica de rato, no pH fisiológico, ocorreu a ionização do polímero Ultrez, aumentando assim a viscosidade do sistema e resultando na mucoadesão.

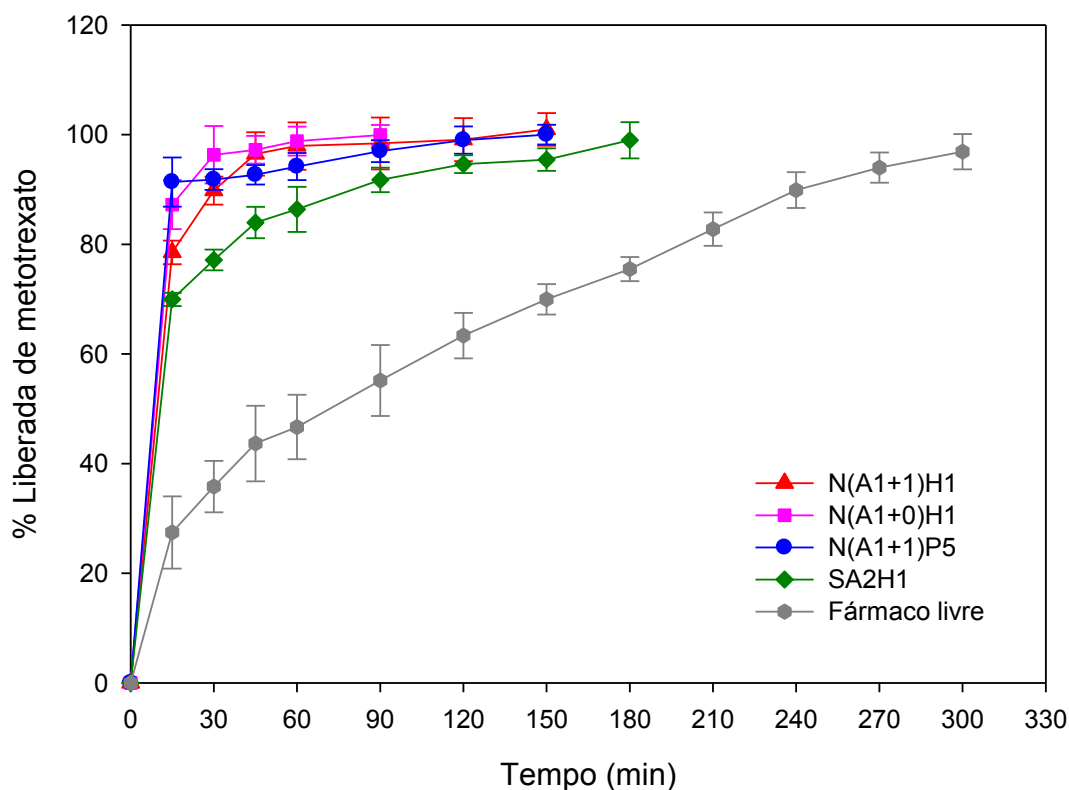
### 5.13 Determinação do perfil de liberação *in vitro* do metotrexato

A solubilidade do fármaco é um importante parâmetro para o ensaio de liberação, dado que é preciso trabalhar sob condições *sink* (volume de meio de 10 vezes o necessário para obter a saturação do fármaco). Portanto, a solubilidade do MTX foi determinada no meio de dissolução utilizado tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8). A solubilidade do MTX encontrada no meio tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8) foi de 24,6 mg/mL.

A dissolução é um processo pelo qual o fármaco é liberado da sua matriz e se torna disponível nos fluídos fisiológicos. Assim, o ensaio de dissolução é uma importante ferramenta no desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, visando à otimização da eficácia e segurança, pois fornece informações da velocidade de liberação do fármaco, permitindo prever o comportamento *in vivo* do sistema (correlação *in vivo-vitro*) (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; STORPIRTIS et al., 2009).

Os estudos de liberação foram realizados para as amostras N(A1+1)H1, N(A1+0)H1, N(A1+1)P5, SA2H1, comparadas com o fármaco livre (pó de MTX). Os perfis de liberação estão apresentados na Figura 44.

**Figura 44** - Perfis de liberação do MTX a partir das amostras N(A1+1)H1, N(A1+0)H1, N(A1+1)P5, SA2H1 em comparação com o fármaco livre em meio tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8).



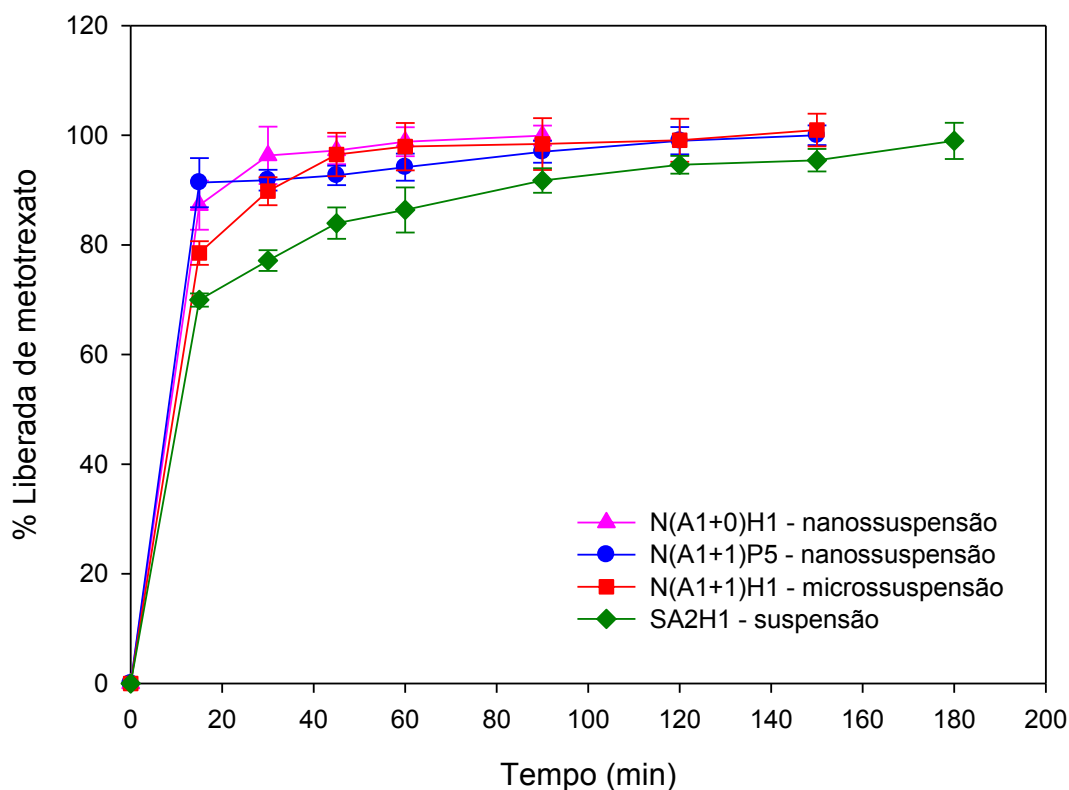
Os perfis de liberação *in vitro* do MTX a partir das amostras desenvolvidas (N(A1+1)H1, N(A1+0)H1, N(A1+1)P5, SA2H1) exibiram altas taxas de liberação do fármaco, apresentando um efeito *burst* durante os primeiros 15 minutos de ensaio, atingindo uma liberação acima de 70%. O fármaco livre liberou cerca de 30% no mesmo intervalo de tempo. O aumento da taxa de dissolução é atribuído ao tamanho das partículas, uma vez que o tamanho das partículas de fármaco destas amostras foram reduzidas, quando comparadas as partículas do fármaco. Esta diminuição do diâmetro da partícula ocasiona o aumento da área superficial do fármaco e consequentemente o aumento da velocidade de liberação. Além disso, este comportamento também

pode ser atribuído que um menor tamanho de partícula do fármaco, aumenta a área de superfície e a solubilidade de saturação, segundo a equação de Ostwald-Freundlich (ZHANG et al., 2013).

O mecanismo de liberação do fármaco esta relacionado com a partição do fármaco a partir da superfície das partículas. Assim, a taxa de liberação foi influenciada pela taxa de dissolução das partículas do fármaco. Entre os fatores que podem influenciar na cinética de liberação estão: tipo de fármaco, solubilidade, polimorfismo e tamanho de partícula (EL-ARINI; LEUENBERGER, 1995).

Foi realizado um estudo comparativo entre as amostras N(A1+1)H1, N(A1+0)H1, N(A1+1)P5, SA2H1, a fim de verificar a influência do tamanho das partículas sob a taxa de dissolução do fármaco (Figura 45). O tamanho das partículas destas amostras foram: N(A1+0)H1 233,83 nm, N(A1+1)P5 370,80 nm, N(A1+1)H1 1267,65 nm e SA2H1 2517,33 nm.

**Figura 45** - Perfis de liberação do MTX para avaliar a influência do tamanho das partículas no perfil de liberação das amostras N(A1+1)H1, N(A1+0)H1, N(A1+1)P5 e SA2H1.



A amostra SA2H1 apresentou a menor taxa de liberação do MTX em comparação com as nanossuspensões ( $p < 0,05$ ), liberando aproximadamente 80% do fármaco somente em 45 minutos, enquanto que as N(A1+0)H1 e N(A1+1)P5 liberaram em 15 minutos. Isto está relacionado com os maiores tamanhos de partículas apresentados pela SA2H1, uma vez que esta amostra consiste em uma suspensão de MTX, sem a utilização de precipitação química ou de métodos de agitação vigorosos para sua obtenção. Esta amostra não demonstrou diferença estatisticamente significativa com a N(A1+1)H1, devido que ambas obtiveram tamanho de partículas micrométricos, se diferenciando apenas no método de obtenção, uma vez que foi utilizado o método de *Bottom-*

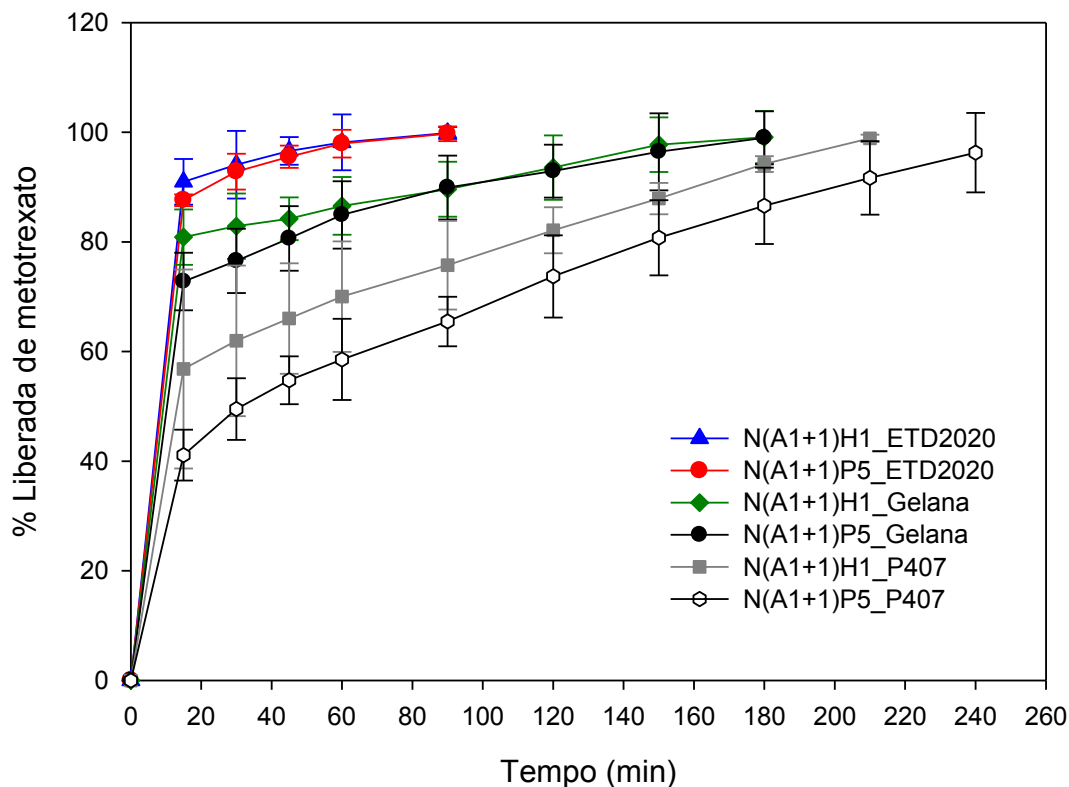
up para a N(A1+1)H1. Portanto, podemos constatar que o tamanho de partícula influenciou na taxa de liberação do MTX.

Entretanto, as amostras N(A1+0)H1 e N(A1+1)H1 não apresentaram diferença estatisticamente entre si ( $p>0,05$ ). Esse comportamento pode ser atribuído ao estabilizante, uma vez que ele contribui para o aumento da taxa de dissolução, em virtude de uma melhor molhabilidade da partícula do fármaco, favorecendo a dissolução. Além disso, tem sido relatado que o tipo de polímero utilizado como estabilizante é um parâmetro importante para o aumento da taxa de dissolução. O polímero HPMC vem apresentando esta propriedade de aumentar a taxa de dissolução de fármacos (SINGH et al., 2011; TRAN et al., 2014).

Verificou-se, ainda, que em 30 minutos de ensaio as nanossuspensões N(A1+1)P5, N(A1+0)H1 e a microssuspensão N(A1+1)H1, não demonstraram diferença estatística ( $p>0,05$ ) sob a taxa de liberação do fármaco.

Também foi realizado um estudo com o objetivo de avaliar o efeito da adição dos polímeros mucoadesivos, carbopol ETD2020, poloxâmero 407 e goma gelana na taxa de liberação a partir da nanossuspensão N(A1+1)P5 e da microssuspensão N(A1+1)H1 (Figura 46). Neste estudo a nanossuspensão N(A1+0)H1 não foi selecionada para fins de comparação, pois esta amostra apresentou pH acima de 5, não sendo interessante para incorporação do carbopol ETD2020, uma vez que neste pH ele geleifica.

**Figura 46** - Perfis de liberação do MTX das amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5 com os polímeros mucoadesivos carbopol ETD2020, poloxâmero 407 e goma gelana.



A avaliação do perfil de liberação do MTX a partir das amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)P5 associadas à polímeros mucoadesivos, mostram que o poloxâmero 407 reduziu a taxa de liberação do fármaco e promoveu uma liberação constante, em relação aos outros polímeros mucoadesivos ( $p < 0,05$ ).

Este comportamento pode ser atribuído à propriedade deste polímero de geleificação *in situ*, aumentando a viscosidade com o aumento da temperatura. No início do ensaio, observamos este comportamento quando a amostra entrou em contato com o meio a 37 °C ocorrendo a geleificação do sistema.

Estudos reportaram que sistemas matriciais compostos por P407, controlaram a liberação do fármaco principalmente através da dissolução do gel do que pela difusão, seguindo uma cinética de liberação de ordem zero (MOORE et al., 2000; ZHANG et al., 2002).

Além disso, é importante ressaltar que o P407 apresentou elevados valores de dureza e coesão, obtendo a formação de uma estrutura mais rígida e forte que pode diminuir a capacidade de dissolução do fármaco.

Entre as amostras N(A1+1)H1\_P407 e N(A1+1)P5\_P407, a microssuspensão com HPMC apresentou uma maior taxa de dissolução do fármaco, demonstrando que houve diferença estatisticamente significativa entre elas ( $p < 0,05$ ). Apesar da nanossuspensão N(A1+1)P5\_P407 exibir tamanho de partículas na escala nanométrica, dado que levaria ao aumento da taxa de dissolução como relatado anteriormente, ela mostrou uma menor liberação do fármaco. Este fato pode ser justificado pela maior concentração de P407 presente nesta amostra aumentar a sua viscosidade, reduzindo a taxa de dissolução. Também esse aumento da concentração do poloxâmero 407, promoveu aumento dos valores de dureza e coesão, indicando uma amostra com estrutura mais rígida, conforme mostrado no teste de TPA.

Nos primeiros 45 minutos de ensaio, verificou-se uma diferença estatística ( $p < 0,05$ ) nas taxas de liberação do MTX a partir das amostras com carbopol ETD2020 e goma gelana, sendo que as amostras associadas a goma gelana, demonstraram uma menor taxa de dissolução. Esta redução da capacidade de dissolução do fármaco para o meio das amostras contendo goma gelana, pode ser atribuído à formação de estrutura mais rígida e compacta para estas amostras, observado através do TPA. Maiores valores de dureza e coesão foram exibidos pela gelana, enquanto as amostras com carbopol ETD2020 apresentaram os menores valores destes parâmetros. Entretanto, é importante ressaltar que não foi observado a geleificação *in situ* do carbopol ETD2020, como ocorreu para o poloxâmero 407, não sendo possível verificar o aumento da viscosidade da amostra. A propriedade de geleificação deste polímero é pH-dependente, levando ao aumento da viscosidade quando entra em contato com pH neutro. Este comportamento pH-dependente levando ao aumento da viscosidade em contato com pH neutro, pode ser evidenciado nos estudos de mucoadesão *ex vivo*, devido a presença de um meio mais biorrelevante da mucosa colônica de rato.

## 6. DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar sistemas com propriedades mucoadesivas para administração cólon específica do MTX.

Foram desenvolvidas suspensões de MTX, em solução ácida, uma vez que neste pH o MTX se encontra insolúvel. Verificou-se que o aumento das proporções de HCl, levou a redução do tamanho de partícula, devido aos elevados valores de potencial zeta, que favorecem a estabilização eletroestática das partículas. A utilização do HPMC permitiu uma maior redução do tamanho e homogeneidade das partículas, porém o tamanho permaneceu micrométrico. As suspensões também apresentaram a formação de sedimento compacto.

Nos estudos de solubilidade, foi demonstrado que o MTX é fracamente solúvel em pH ácido e com a elevação de pH ocorre um aumento da solubilidade do fármaco, garantindo sua completa solubilização em pH acima de 8. Esta solubilidade pH dependente do MTX foi explorada como estratégia para o desenvolvimento das micro/nanossuspensões. Desta maneira, o fármaco foi solubilizado em base seguido da precipitação das partículas com ácido. A precipitação química possibilita a obtenção de partículas, e o controle da reação ácido-base é importante para obtenção de partículas com tamanho adequado.

A vantagem das micro/nanossuspensões encontradas neste trabalho em relação as suspensões está na formação de partículas mais homogêneas, evitando a formação de sedimentos compactos, garantindo maior estabilidade ao sistema e o aumento das taxas de liberação do fármaco.

O processo de agitação também é um parâmetro crítico, que em conjunto com o tipo de estabilizante pode influenciar o tamanho das partículas.

O método *Bottom-up* utilizando Ultra turrax, favoreceu para a formação de partículas na escala micro/nanométrica, permitindo modular o tamanho de partícula com diferentes proporções de HCl e na ausência de estabilizante. As condições de precipitação empregando maiores proporções de HCl, resultou em partículas micrométricas e com pH abaixo de 4. Quando foram empregadas

menores proporções de HCl foram obtidas partículas nanométricas, resultando em sistemas com valores de pH acima de 5. Logo, estas amostras não são adequadas para adição de polímeros derivados do APA, pois seria necessário um pH ácido para o mesmo não geleificar. Verificou-se ainda, que nestas nanossuspensões com valores de pH acima de 5, cerca de 79% do fármaco encontra-se na forma particulada.

Nas condições de solubilização e precipitação, utilizando maiores quantidades de ácido, ocorreu aglomeração das partículas, resultando em partículas com tamanho elevados, podendo ser atribuído ao grau de supersaturação causado pela precipitação ácido-base (CHEN et al., 2004). Além disso, o processo de *Bottom-up* produz energia livre entre as partículas favorecendo sua aglomeração.

Deste modo, a adição de estabilizante é fundamental para a estabilidade das partículas, com menor tamanho de partícula e com distribuição monodispersa (GEORGE; GHOSH, 2013; RABINOW, 2004).

As amostras obtidas em Ultra turrax, utilizando maiores proporções de HCl para precipitação do fármaco e HPMC como estabilizante, apresentaram tamanho de partícula na escala micrométrica. A adição de HPMC levou a redução no tamanho de partícula e Pdl, quando comparadas com as mesmas amostras sem estabilizante. Além disso, a maior concentração de HPMC contribuiu de maneira mais eficiente para reduzir o tamanho da partícula, sugerindo que o emprego de estabilizante foi relevante, uma vez que promoveu homogeneidade no tamanho das partículas. Dentre estas amostras a N(A1+1), apresentou menor tamanho de partícula e Pdl, utilizando 2,2 mL de NaOH e 3,28 mL de HCl para solubilização e precipitação do fármaco, e com pH abaixo de 4, sendo proporções de base e ácido selecionadas para os próximos estudos.

Avaliou-se também o uso do P407 como estabilizante na produção das partículas utilizando maiores proporções de HCl e Ultra turrax. Os resultados mostraram que conforme aumentou a concentração do P407, levou a redução do tamanho de partícula e Pdl, na escala micrométrica. Concluiu-se ainda, que o P407 favoreceu a aglomeração das partículas neste processo de agitação, resultando em partículas com tamanhos superiores em relação ao HPMC.

O processo de agitação é um parâmetro importante para formação da partícula do fármaco. Desta maneira, foi utilizada a sonicação para reduzir o tamanho da partícula de MTX, utilizando maiores proporções de ácido.

Os resultados demonstraram que a utilização de maiores concentrações de HPMC promoveu redução no tamanho de partícula e Pdl empregando o Sonicador, o mesmo comportamento verificado anteriormente em Ultra turrax. Porém, não ocorreu redução significativa no tamanho de partícula para escala nanométrica.

Para as amostras obtidas com sonicação empregando a maior concentração de P407 (5%), houve uma redução do tamanho das partículas para a escala nanométrica e com Pdl acima de 0,3. Verificou-se ainda que utilizando a concentração de 5%, próxima da CMC, mais de 98% do fármaco estava na forma particulada. Portanto, a propriedade tensoativa do P407 em conjunto com o processo de agitação por sonicação foram eficientes para a formação de partículas nanométricas e com menor concentração de fármaco na forma molecular.

A técnica *Top-down* utilizando homogeneizador de alta pressão também foi avaliada para a produção das suspensões e micro/nanossuspensões de MTX. Para as amostras N(A1+1)H1 e N(A1+1)P2,5 utilizando a associação das técnicas *Bottom-up* e *Top-down*, promoveu uma redução no tamanho de partícula. Já utilizando a técnica *Top-down* para a suspensão SA2H1, também favoreceu na redução do tamanho de partícula, porém com elevado Pdl. Assim, mesmo com a associação da técnica *Top-down*, os resultados não demonstraram-se relevantes.

Os sistemas com os polímeros mucoadesivos, derivados do ácido poliacrílico, poloxâmero e goma gelana, utilizando diferentes mecanismos de mucoadesão (pH, temperatura e concentração iônica), demonstraram-se promissores para serem aplicados no cólon. Quando estes polímeros entrarem em contato com pH, temperatura fisiológica ou íons presentes no cólon, resultará no aumento da viscosidade do sistema, promovendo assim a mucoadesão e uma maior retenção na mucosa.

Foi realizado um estudo de mucoadesão *ex vivo*, utilizando mucosa colônica de rato com polímero carbopol Ultrez. Os resultados demonstraram

que o carbopol Ultrez, promoveu geleificação *in situ*, quando o sistema entrou em contato com a mucosa do rato. A mucoadesão pode ser atribuída ao aumento da viscosidade do sistema, resultado das interações intermoleculares entre a amostra e o fluido fisiológico presente na mucosa. Além disso, o carbopol Ultrez não foi afetado pela presença de eletrólitos gerados na precipitação através das reações ácido-base, visto que, os polímeros derivados do ácido poliacrílico podem sofrer influência de eletrólitos, reduzindo sua capacidade de geleificação (LUBRIZOL, 2011). Portanto, o comportamento pH-dependente verificado é muito interessante para os propósitos deste trabalho, uma vez que deve contribuir para uma maior retenção do sistema na mucosa colônica. Este estudo foi realizado para avaliar a capacidade de geleificação dos polímeros derivados do APA, porém foi utilizado outro derivado do APA o carbopol ETD2020 para os próximos estudos de propriedades mecânica e mucoadesão.

Para o desenvolvimento de um sistema de liberação para administração retal, a avaliação das propriedades mecânicas são muito importantes, uma vez que devem apresentar propriedades como dureza e adesão, visando melhorar a retenção da formulação no local de ação, como na mucosa colônica. Além disso, a adesão está relacionada com a propriedade mucoadesiva do sistema. Assim, polímeros com propriedades mucoadesivas foram testados, como o carbopol ETD2020, P407 e a goma gelana.

As amostras compostas pelos polímeros poloxâmero 407 e goma gelana apresentaram maior dureza e adesão, estando diretamente relacionada com uma maior rigidez e adesão da amostra, favorecendo sua retenção na mucosa.

A avaliação da medida da força mucoadesiva utilizando mucosa suína, demonstrou que as amostras com polímero P407 obtiveram maior  $F_{MA}$ , enquanto as amostras com os polímeros carbopol ETD2020 e goma gelana essa propriedade mostrou-se semelhante.

Nos ensaios de liberação *in vitro* do MTX, os resultados mostraram que aumento da taxa da liberação do fármaco está diretamente relacionado com tamanho da partícula. Partículas na escala micro/nanométrica favoreceram o aumento da liberação do MTX, e conseqüentemente na velocidade de dissolução. É importante ressaltar que partículas com tamanho reduzido são

promissoras para sistemas aplicados no cólon, uma vez que contribui para o aumento da permeabilidade do fármaco no local de ação. O perfil de liberação *in vitro* do MTX a partir das amostras associadas aos polímeros mucoadesivos, mostrou que o comportamento de geleificação *in situ* do P407 contribuiu para um maior controle das taxas de liberação. Tem sido reportado na literatura sistemas de geleificação *in situ* como estratégia para prolongar a liberação do fármaco.

No teste de dissolução, sugere-se que a goma gelana e o carbopol ETD2020 não encontraram condições adequadas para geleificação *in situ* no meio, já o P407 como é termorresponsivo, em 37 °C foi o suficiente para a geleificação do mesmo ocorrer. Desta maneira, seria necessário um meio mais biorrelevante para avaliação da geleificação *in situ* destes polímeros.

O conjunto de resultados apresentados mostraram-se promissores para a obtenção de micro/nanossuspensões de MTX, demonstrando que o método *Bottom-up* representa uma estratégia promissora para fármacos com solubilidade pH dependente. Estes sistemas associados à polímeros com propriedades mucoadesivas, mostram vantagens para a aplicabilidade na via retal, facilitando a administração e aumentando o tempo de retenção do sistema no cólon, devido à capacidade de geleificação *in situ* destes polímeros. Adicionalmente, estes sistemas podem ser explorados para outras vias de administração como, oral, bucal e nasal.

## 7. CONCLUSÃO

O método de *Bottom-up* utilizando reações de ácido-base permitiu a obtenção de micro/nanossuspensões de MTX, com tamanho micro/nanométricos, distribuição homogênea e estabilidade das partículas.

A estratégia de precipitação química representa uma plataforma promissora para a preparação e obtenção de micro/nanossuspensões para fármacos que apresentam solubilidade pH dependente.

Este trabalho foi fundamental para compreender como as técnicas de precipitação e homogeneização podem influenciar a redução do tamanho das partículas de MTX.

Os parâmetros como: proporções de ácido, pH, processos de agitação, tipo e concentração de estabilizante permitem controlar e modular as propriedades das partículas: tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta.

O tamanho das partículas promoveu o aumento das taxas de liberação do MTX em meio colônico.

A incorporação de polímeros mucoadesivos ao sistema torna-se uma estratégia promissora para administração retal, já que promove a geleificação *in situ* do sistema, resultando no aumento da viscosidade sob condições fisiológicas, contribuindo para a retenção no local de ação.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, M. R.; ELVIRA, C.; GALLARDO, A.; VÁZQUEZ, B.; ROMÁN, J. S. **Smart Polymers and Their Applications as Biomaterials**. In: Topics in Tissue Engineering, ed. ASHAMMAKHI, N.; REIS, R.; CHIELLINI, E., v. 3, 2007.

ALEXANDRIDIS, P. Amphiphilic copolymers and their applications. **Current Opinion in Colloid e Interface Science**., v. 1, p. 490-501, 1996.

ALEXANDRIDIS, P.; HOLZWARTH, J. F.; HATTON, T. A. Micellization of Poly(ethylene oxide)- Poly (propylene oxide)- Poly (ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. **Macromolecules**., v. 27, n. 9, p. 2414-2425, 1994.

ALVAREZ-FIGUEROA, M. J.; BLANCO-MÉNDEZ, J. Transdermal delivery of methotrexate: iontophoretic delivery from hydrogels and passive delivery from microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**., v. 215, p. 57-65, 2001.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts e figures 2015. Atlanta: **American Cancer Society**, 2015.

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

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

BARON, T. H.; TRUSS, C. D.; ELSON, C. O. Low-Dose Oral Methotrexate in Refractory Inflammatory Bowel Disease. **Digestive Diseases and Sciences**., v. 38, n. 10, p. 1851-1856, 1993.

BARREIRO-IGLESIAS, R.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A. Incorporation of small quantities of surfactants as a way to improve the rheological and diffusional behavior of Carbopol gels. **Journal of Controlled Release**., v. 77, p. 59-75, 2001.

BECK, C.; SIEVENS-FIGUEROA, L.; GÄRTNER, K.; JEREZ-ROZO, J. I.; ROMAÑACH, R. J.; BILGILI, E.; DAVÉ, R. N. Effects of stabilizers on particle redispersion and dissolution from polymer strip films containing liquid antisolvent precipitated griseofulvin particles. **Power Technology**., v. 236, p. 37-51, 2013.

BOSE, S.; SCHENCK, D.; GHOSH, I.; HOLLYWOOD, A.; MAULIT, E.; RUEGGER, C. Application of spray granulation for conversion of a nanosuspension into a dry powder form. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**., v. 47, p. 35-43, 2012.

BOTH, H.; TORP-PEDERSEN, K.; KREINER, S.; HENDRIKSEN, B., V. Clinical appearance at diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease in a regional patient group. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**., v. 18, p. 987-991, 1983.

BRASIL, Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em:< <http://www.anvisa.org.br>>. Acesso em: 06 maio. 2014.

BRUSCHI, M. L.; FREITAS, O. Oral Bhioadhesive Drug Delivery Systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**., v. 31, p. 293-310, 2005.

CARRETERO, G.; PUIG, L.; DEHESA, L.; CARRASCOSA, J. M.; RIBERA, M.; SANCHEZ-REGAÑA, M.; DAUDÉN, E.; VIDAL, D.; ALSINA, M.; MUÑOZ-SANTOS, C.; LÓPEZ-ESTEBARANZ, J. L.; NOTARIO, J.; FERRANDIZ, C.; VANACLOCHA, F.; GARCIA-BUSTINDUY, M.; TABERNER, R.; BELINCHÓN, I.; SÁNCHEZ-CARAZO, J.; MORENO, J. C. Guidelines on the Use of Methotrexate in Psoriasis. **Actas Dermo-Sifiliográficas**., v. 101, n.7, p. 600-613, 2010.

CARVALHO, F. C. **Sistemas nanoestruturados mucoadesivos para administração nasal de zidovudina**. 2014. 163f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Araraquara, 2014.

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

CHAN, E. S. L.; CRONSTEIN, B. N. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. **Arthritis Research**., v. 4, n. 4, p. 266-273, 2002.

CHEN, A-Z.; LI, L.; WANG, S-B.; ZHAO, C.; LIU, Y-G.; WANG, G-Y.; ZHAO, Z. Nanonization of methotrexate by solution-enhanced dispersion by supercritical CO<sub>2</sub>. **The Journal of Supercritical Fluids**., v. 67, p. 7-13, 2012.

CHEN, D.; XIA, D.; LI, X.; ZHU, Q.; YU, H.; ZHU, C.; GAN, Y. Comparative study of Pluronic F127-modified liposomes and Chitosan-modified liposomes for mucus penetration and oral absorption of cyclosporine A in rats. **International Journal of Pharmaceutics**., v. 449, p. 1-9, 2013.

CHEN, H.; WAN, J.; WANG, Y.; MOU, D.; LIU, H.; XU, H.; YANG, X. A facile nanoaggregation strategy for oral delivery of hydrophobic drugs by utilizing acid-base neutralization reactions. **Nanotechnology**., v. 19, p. 7, 2008.

CHEN, J. F.; ZHOU, M. Y.; SHAO, L.; WANG, Y. Y.; YUN, J.; CHEN, N. Y. K.; CHAN, H. K. Feasibility of preparing nanodrugs by high-gravity reactive precipitation. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 269, p. 267-274, 2004.

CINTO, P.; SOUZA, A. L. R.; LIMA, A. C.; CHAUD, M. V.; GREMIÃO, M. P. D. LC evaluation of intestinal transport of praziquantel. **Chromatographia**, v. 69, p. 213-217, 2009.

CHONG, R. Y.; HANAUER, S. B.; COHEN, R. D. Efficacy of parenteral methotrexate in refractory Crohn's disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics.**, v. 15, p. 35-44, 2001.

COLLNOT, E. M.; ALI, H.; LEHR, C. M. Nano- and microparticulate drug carriers for targeting of the inflamed intestinal mucosa. **Journal of Controlled Release**, p. 1-12, 2012.

DABROWSKA, M.; MOSIENIAK, G.; SKIERSKI, J.; SIKORA, E.; RODE, W. Methotrexate-induce senescence in human adenocarcinoma cells is accompanied by induction of p21<sup>waf1/cip1</sup> expression and lack of polyploidy. **Cancer Letters.**, v. 284, p. 95-101, 2009.

DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F.; CHAUMEIL, J. C. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical Research.**, v. 23, n. 12, 2006.

EERDENBRUGH, B. V.; MOOTER, G. V.; AUGUSTIJNS, P. Top-down production of drug nanocrystals: Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 364, p. 64-75, 2008.

EL-ARINI, S. K.; LEUENBERGER, H. Modeling of drug release from polymer matrices: effect of drug loading. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 121, p. 141-148, 1995.

EL-KAMEL, A.; EL-KHATIB, M. Thermally reversible in situ gelling carbamazepine liquid suppository. **Drug Delivery.**, v. 13, p. 143-148, 2006.

ELLIS, H. Anatomy of the caecum, appendix and colon. **Surgery**, v. 29, p. 1-4, 2011.

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

EVANGELISTA, R. C. **Sistemas de liberação controlada de fármacos**, Araraquara: Tese (Livre Docência), 2006, 345 f. (Texto sistemático apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos do concurso para obtenção do Título de Livre-Docente em Farmacotécnica).

EXPONENT LITE Software: introduction to texture analysis. Version 4,5 [SI]: TA-XT Plus, Stable Micro Systems, 2009, 1 CD-ROM.

FARIA, T. J.; CAMPOS, A. M.; SENNA, E. L. Preparation and Characterization of Poly (D, L- Lactide) (PLA) and Poly (D, L- Lactide)-Poly (Ethylene Glycol) (PLA-PEG) Nanocapsules Containing Antitumoral Agent Methotrexate. **Macromolecular Symposia.**, v. 229, p. 228-233, 2005.

FREIRE, A. C.; PODCZECK, F.; SOUSA, J.; VEIGA, F. Liberação específica de fármacos para administração no cólon por via oral. I - O cólon como local de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.**, v. 42, p. 319-335, 2006.

GAO, K.; JIANG, X. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 310, p. 213-219, 2006.

GEORGE, M.; GHOSH, I. Identifying the correlation between drug/stabilizer properties and critical quality attributes (CQAS) of nanosuspension formulation prepared by wet media milling technology. **European Journal of Pharmaceutical Sciences.**, v. 48, p. 142-152, 2013.

GRIM, J.; CHLÁDEK, J.; MARTÍNKOVÁ, J. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Methotrexate in Non-Neoplastic Diseases. **Clinical Pharmacokinet.**, v. 42, n. 2, p. 139-151, 2003.

GHOSH, I.; BOSE, S.; VIPPAGUNTA, R.; HARMON, F. Nanosuspension for improving the bioavailability of a poorly soluble drug and screening of stabilizing agents to inhibit crystal growth. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 409, p. 260-268, 2011.

GUO, J-J.; YUE, P-F.; LV, J-I.; HAN, J.; FU, S-S.; JIN, S-X.; JIN, S-Y.; YUAN, H-L. Development and in vivo/in vitro evaluation of novel herpetrione nanosuspension. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 441, p. 227-233, 2013.

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

HÄGERSTRÖM, H.; EDSMAN, K.; STRØMME, M. Low-Frequency Dielectric Spectroscopy as a Tool for Studying the Compatibility between Pharmaceutical

gels and Mucous Tissue. **Journal of Pharmaceutical Sciences.**, v. 92, n. 9, 2003.

HE, C.; KIM, S. W.; LEE, D. .S. In situ gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery. **Journal of Controlled Release.**, v. 127, p. 189–207, 2008.

HILLERY, A. M.; FLORENCE, A. T. The effect of adsorbed poloxamer 188 and 407 surfactants on the intestinal uptake of 60-nm polystyrene particles after oral administration in the rat. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 132, p. 123-130, 1996.

JINGOU, J.; SHILEI, H.; WEIQI, L.; DANJUN, W.; TENGFEI, W.; YI, X. Preparation, characterization of hydrophilic and hydrophobic drug in combine loaded chitosan/cyclodextrin nanoparticles and in vitro release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.**, v. 83, p. 103-107, 2011.

LEE, J. W.; PARK, J. H.; ROBINSON, J. R. Bioadhesive-based dosage forms: the next generation. **Journal of Pharmaceutical Sciences.**, v. 89, n. 7, p. 850-866, 2000.

LIU, X.; WU, Y.; LI, F.; ZHANG, D. Dietary fiber intake reduces risk of inflammatory bowel disease: result from a meta-analysis. **Nutrition Research**, 2015.

LUBRIZOL, Pharmaceutical polymers for liquid and semisolid dosage forms, 2011. Available in [www.pharma.lubrizol.com](http://www.pharma.lubrizol.com)

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Ultrasound-assisted crystallization (sonocrystallization). **Ultrasonics Sonochemistry.**, v.14, n.6, p. 717-724, 2007.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375 -399, 2002.

MAÑOSA, M.; GARCIA, V.; CASTRO, L.; GARCIA-BOSCH, O.; CHAPARRO, M.; ACOSTA, M. B.; CARPIO, D.; AGUAS, M. Methotrexate in ulcerative colitis: A Spanish multicentric study on clinical use and efficacy. **Journal of Crohn's and Colitis.**, v. 5, p. 397-401, 2011.

MARQUES, S. A. Metotrexato na Psoríase. **Sociedade Brasileira de Dermatologia.**, 2009.

MARONI, A.; ZEMA, L.; CURTO, M.D.; FOPPOLI, A.; GAZZANIGA, A. Oral colon delivery of insulin with the aid of functional adjuvants. **Advanced Drug Delivery Reviews.**, v. 64, p. 540-556, 2012.

MCGUIRE, J. J. Anticancer Antifolates: Current Status and Future Directions. **Current Pharmaceutical Design**., v. 9, n. 31, p. 2593-2613, 2003.

MENCIA, N.; SELGA, E.; NOÉ, V.; CIUDAD, C. J. Underexpression of miR-224 in methotrexate resistant human colon cancer cells. **Biochemical Pharmacology**., v. 82, p. 1572-1582, 2011.

MENEGUIN, A. B.; CURY B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Films from resistant starchpectin dispersions intended for colonic drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, n. 2, p. 140-149, 2014.

MIYOSHI, E.; TAKAYA, T.; NISHINARI, K. Effects of salts on the gel-sol transition of gellan gum by differential scanning calorimetry and thermal scanning rheology. **Thermochimica Acta**, v. 267, n. 0, p. 269-287, 1995.

MOORE, T.; CROY, S.; MALLAPRAGADA, S.; PANDIT, N. Experimental investigation and mathematical modeling of Pluronic F127 gel dissolution drug release in stirred systems. **Journal of Controlled Release**., v. 67, p. 191-202, 2000.

MORALES, C.; RIBAS, M.; AIZA, G.; PEINADO, M. A. Genetic determinants of methotrexate responsiveness and resistance in colon cancer cells. **Oncogene**., v. 24, p. 6842-6847, 2005.

MOU, D.; CHEN, H.; WAN, J.; XU, H.; YANG, X. Potent dried drug nanosuspensions for oral bioavailability enhancement of poorly soluble drugs with pH-dependent solubility. **International Journal of Pharmaceutics**., v. 413, p. 237-244, 2011.

NARKAR M.; SHER, P.; PAWAR, A. Stomach-Specific Controlled Release Gellan Beads of Acid-Soluble Drug Prepared by Ionotropic Gelation Method. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 11, n. 1, p. 267-277, 2010.

NISHIDA, I. Precipitation of calcium carbonate by ultrasonic irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**., v. 11, p. 423-428, 2004.

NUNES, R.; SARMENTO, B.; NEVES, J. Formulation and delivery of anti-HIV rectal microbicides: Advances and challenges. **Journal of Controlled Release**., v. 194, p. 278-294, 2014.

OSMALEK, T.; FROELICH, A.; SYLWIA, T. Application of gellan gum in pharmacy and medicine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 466, n. 1-2, p. 328-340, 2014.

PARK, K.; ROBINSON, J.R. Bioadhesive polymers as platforms for oral-controlled drug delivery: method to study bioadhesion. **International Journal of Pharmaceutics**., v. 19, p. 107– 127, 1984.

PRASAD, R.; KOUL, V.; ANAND, S.; KHAR, R. K. Effect of DC/mDC iontophoresis and terpenes on transdermal permeation of methotrexate: In vitro study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 333, p.70-78, 2007.

PEREIRA, A. F.; COSTA, V. M.; SANTOS, M. C. M.; PINTO, F. C. H.; SILVA, G. R. Evaluation of the effects of methotrexate released from polymeric implants in solid Ehrlich tumor. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 68, p. 365-368, 2014.

PEREIRA, R. R. A. **Desenvolvimento e caracterização de sistema mucoadesivo termossensível contendo micropartículas de propólis para potencial tratamento de candidíase vulvovaginal**. 2011. 173f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, 2011.

PINTO, J. F. Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: From the mouth to the colon. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1–2, p. 44-52, 2010.

PINTO, M. F.; MOURA, C. C.; NUNES, C.; SEGUNDO, M. A.; LIMA, S. A. C.; REIS, S. A new topical formulation for psoriasis: Development of methotrexate-loaded nanostructured lipid carries. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, p. 519-526, 2014.

QI, H.; CHEN, W.; HUANG, C.; LI, L.; CHEN, C.; LI, W.; WU, C. Development of a poloxamer analogs/carbopol-based in situ gelling and mucoadhesive ophthalmic delivery system for puerarin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.337, p. 178-187, 2007.

RABINOW, B. E. Nanosuspensions in drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 785-796, 2004

RUBINO, F. M. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. **Journal of Chromatography B**, v. 764, n. 1-2, p. 217-254, 2001.

SADANANDAM, A.; LYSSIoTIS, C. A.; HOMICKO, K.; COLLISON, E. A.; GIBB, W. J.; WULLSCHLEGER, S.; GONZALEZ OSTOS, L. C.; LANNON, W. A.; GROTZINGER, C.; DEL RIO, M.; LHERMITTE, B.; OLSHEN, A. B.; WIEDENMANN, B.; CANTLEY, L. C.; GRAY, J. W.; HANAHAN, D. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. **Nature Medicine**, v. 19, n. 5, 2013.

SAIBENI, S.; BOLLANI, S.; LOSCO, A.; MICHIELAN, A.; SOSTEGNI, R.; DEVANI, M.; LUPINACCI, G.; PIROLA, L.; CUCINO, G.; MEUCCI, G.; BASILISCO, G.; D'INCA, R.; BRUNO, S. The use of methotrexate for treatment of inflammatory bowel disease in clinical practice. **Digestive and Live Disease**, v. 44, p. 123-127, 2012.

SARTORI, T. **Preparação e caracterização de nanopartículas contendo metotrexato. Avaliação da estabilidade e viabilidade do tecido corneal após administração tópica ocular.** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2007. Dissertação ( Mestrado em Farmácia)- Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SARASIJA, S.; HOTA, A. Colon-specific drug delivery systems. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, p.1-8, 2002.

SCHMITD, C.; LAUTENCHLAEGER, C.; COLLNOT, E-M.; SCHUMANN, M.; BOJARSKI, C.; SHULZKE, J-D.; LEHR, C-M.; STALLMACH, A. Nano-and microscaled particles for drug targeting to inflamed intestinal mucosa- A first in vivo study in human patients. **Journal of Controlled Release.**, v.165, p. 139-145, 2013.

SCHRÖDER, O.; STEIN, J. Low Dose Methotrexate in Inflammatory Bowel Disease: Current Status and Future Directions. **The American Journal of Gastroenterology.**, v. 98, n. 3, 2003.

SCHWARTZ, R. N.; BLANKE, C. D.; PESKO, L. J. Targeted therapies in the treatment of colorectal cancer: What managed care needs to know. **Journal of Managed Care Pharmacy.**, v. 10, n. 5, p. S2-S13, 2004.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews.**, v. 64, p. 163-174, 2012.

SINGH, S. K.; SRINIVASAN, K. K.; GOWTHAMARAJAN, K.; SINGARE, D. S.; PRAKASH, D.; GAIKWAD, N. B. Investigation of preparation parameters of nanosuspension by top-down media milling to improve the dissolution of poorly water-soluble glyburide. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.**, v. 78, p. 441-446, 2011.

SINGH, U. V.; UDUPA, N. In vitro characterization of methotrexate loaded poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres and antitumor efficacy in Sarcoma-180 mice bearing tumor. **Pharmaceutica Acta Helvetiae.**, v. 72, p. 165-173, 1997.

SHARMA, P.; ZUJOVIC, Z. D.; BOWMAKER, G. A.; DENNY, W. A.; GARG, S. Evaluation of a crystalline nanosuspension: Polymorphism, process induced transformation and *in vivo* studies. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 408, p. 138-151, 2011.

SINHA, B.; MÜLLER, R. H.; MOSCHWITZER, J. P. Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals. Formulations and factors affecting particle size. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 453, p. 126-141, 2013.

SINHA, V. R.; KUMRIA, R. Review: Microbially triggered drug delivery to the colon. **European Journal of Pharmaceutical Sciences.**, v. 18, p. 3-18, 2003.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews.**, v. 57, n. 11, p. 1556-1568, 2005.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. **Biofarmacotécnica**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, v. 1, p. 352, 2009.

TABERNER, T. S.; MARTIN-VILLODRE, A.; PLA-DELFINA, J. M.; HERRAEZ, J. V. Consistency of Carbopol 971-P NF gels and influence of soluble and cross-linked PVP. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 233, p. 43-50, 2002.

TAHERI, A.; ATYABI, F.; NOURI, F. S.; AHADI, F.; DERA KHSHAN, M. A.; AMINI, M.; GHAREMANI, M. H.; OSTAD, S. N.; MANSOORI, P.; DINARVAND, R. Nanoparticles of Conjugated Methotrexate-Human Serum Albumin: Preparation and Cytotoxicity Evaluations. **Journal of Nanomaterials.**, v. 2011, n. 5, 2011.

TRAN, T. T.; TRAN, P. H.; NGUYEN, M. N. U.; TRAN, K. T. M.; PHAM, M. N.; TRAN, P. C.; VO, T. V. Amorphous isradipine nanosuspension by the sonoprecipitation method. **Journal of Pharmaceutics.**, v. 474, p. 146-150, 2014.

THORAT, A. A.; DALVI, S. V. Liquid antisolvent precipitation and stabilization of nanoparticles of poorly water soluble drugs in aqueous suspensions: Recent developments and future perspective. **Chemical Engineering Journal.**, v. 181-182, p. 1-34, 2012.

TONG, W.-Q.; WEN, H. Preformulation Aspects of Insoluble Compounds. In: LIU, R. (Ed.). **Water-Insoluble Drug Formulation**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap. 4, p.61-90. ISBN 978-0-8493-9644-1.

TROTTA, M.; PEIRA, E.; CARLOTTI, M. E.; GALLARATE, M. Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 270, p. 119-125, 2004.

VAN EERDENBRUGH, B.; VAN DER MOOTER, G.; AUGUSTIJI, P. Top-down production of drug nanocrystals: nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 364, p. 64-75, 2008.

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

VERMA, S.; GOKHALE, R.; BURGESS, D. J. A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of micro/nanosuspensions. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 380, p. 216-222, 2009.

VERMA, S.; HUEY, B. D.; BURGESS, D. J. Scanning probe microscopy method for nanosuspension stabilizer selection. **Langmuir**, v. 25, n. 21, p. 12481-12487, 2009.

WANG, L-L.; ZHENG, W-S.; CHEN, S-H.; FANG, X-Q. Development of *in situ* gelling and bio adhesive 5-Fluorouracil enema. **Plos one**, v. 8, p. 8, 2013.

WEBER, E.; MOYERS-GONZÁLEZ, M.; BURGHELEA, T. I. Thermorheological properties of a Carbopol gel under shear. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 183-184, p. 14-24, 2012.

WILSON, C. G. The transit of dosage forms through the colon. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1-2, p. 17-25, 2010.

XU, Y.; LIU, X.; LIAN, R.; ZHENG, S.; YIN, Z.; LU, Y.; WU, W. Enhanced dissolution and oral bioavailability of aripiprazole nanosuspensions prepared by nanoprecipitation/ homogenization based on acid-base neutralization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 438, p. 287-295, 2012.

YANG, L. Biorelevant dissolution testing of colon-specific delivery systems activated by colonic microflora. **Journal of Controlled Release**, v. 125, p. 77-86, 2008.

YANG, L.; CHU, J. S.; FIX, J. A. Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 235, n. 1-2, p. 115, 2002.

ZHANG, L.; PARSONS, D. L.; NAVARRE, C.; KOMPELLA, U. B. Development and in-vitro evaluation of sustained release Poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. **Journal of Controlled Release**, v. 85, p. 73-81, 2002.

ZHANG, K.; YU, H.; LUO, Q.; YANG, S.; LIN, X.; ZHANG, Y.; TIAN, B.; TANG, X. Increase dissolution and oral absorption of itraconazole/soluplus extrudate compared with itraconazole nanosuspension. **International Journal of Pharmaceutics Biopharmaceutics**, v. 85, p. 1285-1292, 2013.