



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

SISTEMAS NANOESTRUTURADOS MUCOADESIVOS PARA ADMINISTRAÇÃO NASAL DE ZIDOVUDINA

Flávia Chiva Carvalho

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



Araraquara
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

SISTEMAS NANOESTRUTURADOS MUCOADESIVOS PARA
ADMINISTRAÇÃO NASAL DE ZIDOVUDINA

Flávia Chiva Carvalho

Araraquara

2012

Flávia Chiva Carvalho

SISTEMAS NANOESTRUTURADOS MUCOADESIVOS PARA
ADMINISTRAÇÃO NASAL DE ZIDOVUDINA

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

Coorientadora: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara

2012

Ficha Catalográfica

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

C543s Carvalho, Flávia Chiva
Sistemas nanoestruturados mucoadesivos para administração nasal de zidovudina / Flávia Chiva Carvalho. – Araraquara, 2012
163 f.

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

Orientador: Maria Palmira Daflon Gremião
Coorientador: Rosangela Gonçalves Peccinini

1. Mucoadesão. 2. Cristais líquidos. 3. Sistemas nasais. 4. Aids. 5. Farmacocinética. I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient.. II. Peccinini, Rosangela Gonçalves, coorient.. III. Título.

CAPES: 40300005

Flávia Chiva Carvalho

SISTEMAS NANOESTRUTURADOS MUCOADESIVOS PARA ADMINISTRAÇÃO
NASAL DE ZIDOVUDINA

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

Data de aprovação: 31/08/2012

Titulação: Doutorado em Ciências Farmacêuticas

Componentes da banca examinadora da defesa pública:

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

Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres (*examinador*)

Prof. Dr. Marcos Luciano Bruschi (*examinador*)

Prof. Dr. Marlus Chorilli (*examinador*)

Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury (*examinador*)

Araraquara, 31 de agosto de 2012

Dedico este trabalho aos meus pais

Fernando e Lenira

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, responsável por toda minha formação acadêmica.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião pela paciência, dedicação, por todas as oportunidades oferecidas, pelo incentivo, pela grande amizade e por ser um grande exemplo a ser seguido.

À minha coorientadora Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini e Michel Leandro de Campos, Departamento de Princípios Ativos e Naturais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, pela ajuda com os estudos de Farmacocinética.

Ao Prof. David S. Jones e Tao Tyo da *School of Pharmacy, Queen's University*, Belfast, pela supervisão em meu doutorado sanduíche e à Capes pela concessão da bolsa.

À Profa. Dra. Marcela Longhi pelo período de intercâmbio realizado na *Universidad Nacional de Cordoba*, Argentina, e à Capes, pelo apoio financeiro durante este período.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fármacos e Medicamentos e da Seção de Pós-Graduação.

Aos Professores Anselmo G. Oliveira e Marcos Chaud pela grande contribuição em meu exame de qualificação.

Aos Professores Sílvia S. Guterres, Marcos L. Bruschi, Marlus Chorilli, Beatriz S. F. Cury pela participação na banca de minha defesa do doutorado.

Às minhas alunas de iniciação científica Mariana da Silva Barbi, Ilka Narita Hatakeyama e Talita Benini por toda a ajuda neste trabalho.

Ao grupo do Laboratório de Farmacotécnica da FCFAr/UNESP, por toda a cooperação, união e pela grande amizade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro no início deste trabalho, que foi continuado pela FAPESP, possibilitando a conclusão do projeto.

Aos meus queridos pais Fernando e Lenira que são meus alicerces e razão da minha vida, à minha irmã Fernanda, ao meu companheiro Alexandre e aos meus grandes amigos ao redor do mundo conquistados durante toda minha jornada acadêmica.

RESUMO

A zidovudina (AZT) é o fármaco de primeira escolha no tratamento da AIDS, mas sofre metabolismo pré-sistêmico e possui efeitos adversos dose-dependentes. A via nasal é uma alternativa que pode promover a rápida absorção do fármaco e evitar o metabolismo pré-sistêmico. Porém, ela possui mecanismos de depuração mucociliar que pode eliminar rapidamente a formulação da cavidade nasal. Sistemas de liberação mucoadesivos podem aumentar a fixação da formulação, controlar e aumentar a absorção de fármacos através da mucosa nasal. Sistemas compostos por tensoativos podem formar estruturas líquido-cristalinas *in situ* e promover a mucoadesão. O objetivo deste trabalho foi desenvolver sistemas precursores de cristais líquidos compostos pelo tensoativo álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (PPG-5-CETETH-20) para administração nasal do AZT. O comportamento de fases dos sistemas foi investigado pela construção de diagramas de fases binários e ternários combinando o tensoativo com água e fosfatidilcolina ou ácido oleico. As amostras escolhidas foram caracterizadas por microscopia de luz polarizada (MLP), reologia, análise mecânica e de obtenção da força mucoadesiva utilizando texturômetro. Foram realizados estudos de permeação *ex vivo* e testes pré-clínicos em ratos. Os resultados mostram que é possível obter um sistema composto por PPG-5-CETETH-20/ ácido oleico/água com escoamento adequado para administração nasal e alta capacidade de solubilização do AZT. A mistura do sistema com muco artificial forma uma matriz líquido-cristalina com características reológicas, perfil de textura e força mucoadesiva adequados para promover a mucoadesão na cavidade nasal. O ensaio de permeação utilizando mucosa nasal suína mostrou que a formulação não retém a liberação do AZT e aumenta o fluxo J ($0,871 \mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{cm}$) e o coeficiente de permeabilidade K_p ($8710,3 \text{ cm}/\text{min}$) em relação à solução aquosa ($J = 0,046 \mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{cm}$ e $K_p = 460,0 \text{ cm}/\text{min}$). Os estudos pré-clínicos mostraram que o sistema precursor de cristal líquido administrado via nasal resulta num perfil de concentração plasmática do AZT semelhante à administração intravenosa da solução aquosa, alcançando um C_{max} ($2445,1 \text{ ng}/\text{mL}$) maior e muito mais rápido ($T_{max} = 6,67 \text{ min}$) que a administração oral do xarope comercial ($T_{max} = 33 \text{ min}$). Portanto, esta plataforma tecnológica representa uma potencial ferramenta para liberação sistêmica do AZT e outros antirretrovirais, proporcionando novas bases para o tratamento da AIDS.

ABSTRACT

Zidovudine (AZT) is the first choice drug for AIDS treatment, but it undergoes presystemic metabolism and exhibits dose-dependent side effects. The nasal route is an alternative that promotes the rapid absorption of the drug and avoids its presystemic metabolism. However, the mucociliary clearance mechanism can rapidly eliminate the formulation from the nasal cavity. Mucoadhesive drug delivery systems may raise the fixation of the formulation, control and increase AZT absorption through the nasal mucosa. Systems composed of surfactants can form *in situ* liquid crystalline structures and promote the mucoadhesion. The objective of this work was to develop liquid crystal precursor systems composed of the surfactant polyoxypropylene (5) polyoxyethylene (20) cetyl alcohol (PPG-5-CETETH-20) for the nasal administration of AZT. The phase behavior of the systems was investigated by the construction of binary and ternary phase diagrams combining the surfactant with water, phosphatidylcholine or oleic acid. The chosen samples were characterized by polarized light microscopy (PLM), rheology, and mechanical analysis and by obtation of the mucoadhesive force using a texturometer. It was performed *ex vivo* drug permeation studies and pre-clinical tests in rats. The results showed that it is possible to obtain a liquid system composed of PPG-5-CETETH-20/ oleic acid/ water with high capacity for AZT solubilization. The mixture of the system with artificial mucus forms a liquid crystalline matrix with suitable rheological characteristics, texture profile and mucoadhesive force for promoting the mucoadhesion in the nasal cavity. The permeation assay using porcine nasal mucosa showed that the formulation does not retain AZT release and increases the flux J ($0.871 \mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{cm}$) and the permeability coefficient K_p ($8710.3 \text{ cm}/\text{min}$) in relation to the aqueous solution ($J = 0.046 \mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{cm}$ and $K_p = 460.0 \text{ cm}/\text{min}$). The pre-clinical studies showed that the liquid crystal precursor system administered by nasal route results in a plasmatic AZT concentration similar to the intravenous administration of the aqueous solution, reaching a higher C_{max} ($2445.1 \text{ ng}/\text{mL}$) and a faster T_{max} ($6,67 \text{ min}$) than the oral administration of the commercial syrup ($T_{max} = 33 \text{ min}$). Therefore, this technological platform represents a potential tool to the systemic release of the AZT and other antiretroviral drugs, providing new bases for AIDS treatment.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA.....	Agência de Vigilância Sanitária
APA.....	polímeros derivados do ácido poliacrílico
ASC.....	área sob a curva
$ASC_{0-\infty}$	área sob a curva de zero ao infinito
ASC_{0-t}	área sob a curva de zero ao tempo t
AZT.....	zidovudina
C971.....	carbômero homopolímero tipo A
C974.....	carbômero homopolímero tipo B
Cl	<i>clearance</i> plasmático
CLAE.....	cromatografia líquida de alta eficiência
C_{max}	concentração plasmática máxima
DP.....	desvio padrão
DPR.....	desvio padrão relativo
ELL.....	extração líquido-líquido
F	biodisponibilidade
F1.....	sistema contendo 55 % de PPG-5-CETETH-20, 30 % de fosfatidilcolina e 15 % de água (m/m)
F1A.....	sistema F1 contendo o fármaco (AZT)
F1d.....	sistema F1 diluído na proporção 1:1 (m/m)
F2.....	sistema contendo 55 % de PPG-5-CETETH-20, 30 % de ácido oleico e 15 % de água (m/m)
F2A.....	sistema F2 contendo AZT incorporado
F2d.....	sistema F2 diluído na proporção 1:1 (m/m)
F2PF.....	sistema contendo 55 % de PPG-5-CETETH-20, 30 % de ácido oleico e 15 % de dispersão aquosa de policarbofil a 0,1 % (m/v)
F2APF.....	sistema F2PF contendo o fármaco (AZT)
F2C971.....	sistema contendo 55 % de PPG-5-CETETH-20, 30 % de ácido oleico e 15 % de dispersão aquosa de C971 a 0,1 % (m/v)
F2C971d.....	sistema F2C971 diluído na proporção 1:1 (m/m)
F2C974.....	sistema contendo 55 % de PPG-5-CETETH-20, 30 % de ácido oleico e 15 % de dispersão aquosa de C974 a 0,1 % (m/v)

F2C974d	sistema F2C974 diluído na proporção 1:1 (m/m)
F2PFd.....	sistema F2PF diluído na proporção 1:1 (m/m)
F2QS.....	sistema contendo 55 % de PPG-5-CETETH-20, 30 % de ácido oleico e 15 % de dispersão aquosa de QS a 0,1 % (m/v)
F2QSd.....	sistema F2QS diluído na proporção 1:1 (m/m)
FNS.....	fluido nasal simulado
HAART.....	sigla proveniente do Inglês <i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i> (Terapia antirretroviral altamente ativa)
HIV.....	do Inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i> , Vírus da Imunodeficiência Humana
J	fluxo de fármaco no estado de equilíbrio ($\mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{cm}$)
K_{el}	constante de eliminação
K_p	coeficiente de permeabilidade aparente de difusão (cm/min)
LD.....	limite de detecção
LQ.....	limite de quantificação
MLP.....	microscopia de luz polarizada
PF.....	policarbofil
PI.....	padrão interno
P_{MA}	pico de mucoadesão
PPG-5-CETETH-20....	álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP
QS.....	quitosana
r^2	coeficiente de determinação
SLI.....	sistema líquido isotrópico
SNC.....	sistema nervoso central
$T_{1/2}$	meia vida de eliminação
TCA.....	ácido tricloroacético
T_{MA}	trabalho de mucoadesão
T_{max}	tempo para atingir a concentração plasmática máxima
TPA.....	do Inglês <i>Texture Profile Analysis</i> , Análise do perfil de textura
V_d	volume de distribuição

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sugestões terapêuticas para a terapia antirretroviral. Fonte: BRASIL, 2006.....	24
Tabela 2 - Revisão bibliográfica dos sistemas de liberação nanoestruturados encontrados na literatura, ressaltando a via de administração testada, os antirretrovirais e materiais empregados e os principais resultados atingidos.....	29
Tabela 3 - Estratégias que podem ser utilizadas para o desenvolvimento de sistemas mucoadesivos de liberação nasal de fármacos.....	37
Tabela 4 - Resultados da validação do método analítico para quantificar o AZT incorporado nos sistemas.....	88
Tabela 5 - Parâmetros de fluxo dos sistemas precursores de cristais líquidos calculados pela lei das potências (Equação 3).....	94
Tabela 6 - Cálculo da precisão e da exatidão (expressa como porcentagem de recuperação) do método analítico para quantificar o AZT no meio receptor.....	111
Tabela 7 - Mecanismos de liberação correspondentes ao modelo matemático de Weibull para descrever perfis de dissolução de fármacos. Valor do ajuste (r^2) e do parâmetro b obtido com os dados experimentais da formulação F2A.....	116
Tabela 8 - Fluxo de permeação (J) e coeficiente de permeabilidade (K_p) obtidos para 200 μ L das amostras F2A e SA (solução aquosa) contendo AZT a 10 mg/mL, dispostas numa área de 1,77cm ² de mucosa em contato com o meio receptor mantidos nas condições <i>sink</i>	117
Tabela 9 - Precisão e exatidão intra e interdia obtidos a partir de soluções de trabalho em plasma analisadas em quintuplicata.....	120
Tabela 10 - Resultados obtidos no ensaio de recuperação.....	120
Tabela 11 - Análise da estabilidade dos extratos de soluções de trabalho em plasma contendo AZT a 2500 ng/mL.....	121
Tabela 12 - Cálculos dos volumes das formulações administradas em cada animal nos ensaios pré-clínicos.....	122

Tabela 13 - Parâmetros farmacocinéticos calculados a partir das curvas de concentrações plasmáticas de AZT *versus* tempo obtidas com a administração intravenosa, oral e intranasal de solução injetável, xarope e F2A, respectivamente, contendo AZT na dose de 8 mg/kg..... 124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da timidina (a) e do AZT (b).....	25
Figura 2 – Anatomia da cavidade nasal.....	33
Figura 3 – Algumas estruturas típicas estabilizadas por tensoativos. Adaptado de CHEREZOV <i>et. al</i> (2002).....	43
Figura 4 - Ilustração esquemática de um diagrama de fases ternário. A composição do ponto indicado corresponde a 40 % de X (m/m), 40 % de Y (m/m) e 20 % de Z (m/m).....	46
Figura 5 - Esquema ilustrando a construção do diagrama ternário de fases pelo método da titulação aquosa.....	55
Figura 6 - Representação ilustrativa do texturômetro e as adaptações realizadas para o teste TPA (<i>Texture Profile Analysis</i>). A1: resistência à compressão; A2: adesão; A3: segundo ciclo de compressão.....	61
Figura 7 – Fotografia ilustrando a incisão ao longo do septo nasal suíno.....	63
Figura 8 - Esquema ilustrativo das adaptações feitas no texturômetro para o teste de obtenção da força mucoadesiva.....	64
Figura 9 - Esquema da célula de difusão tipo Franz utilizada neste trabalho.....	66
Figura 10 – Esquema ilustrativo do diagrama de fases resultante das misturas binárias de fosfatidilcolina/ água e PPG-5-CETETH-20/ água, além de imagens representativas obtidas por MLP exemplificando os sistemas anisotrópicos obtidos. (SLO) Sistema líquido opaco; (SLI) Sistema líquido isotrópico.....	76
Figura 11 - Estruturas moleculares da fosfatidilcolina, PPG-5-CETETH-20 e ácido oleico.....	78
Figura 12 – Diagrama de fases ternário obtido com a combinação de PPG-5-CETETH-20, fosfatidilcolina e água. SLI: Sistemas líquidos isotrópicos; F1 e F1d: amostras caracterizadas.....	80
Figura 13 – Imagens obtidas por MLP da amostra F1, indicando as cruzes de Malta característico da fase lamelar, e da amostra F1d (F1+H ₂ O 1:1 p/p), indicando a presença de cruzes de Malta juntamente	

com estrias, característico da fase hexagonal.....	80
Figura 14 – Diagrama de fases ternário obtido com a combinação de PPG-5-CETETH-20, ácido oleico e água. SAVT: Sistema de alta viscosidade transparente; (i), (F2) e (F2d): amostras caracterizadas.....	82
Figura 15 – Imagens obtidas por MLP representando (a) região do diagrama ternário de fases da Figura 15 classificada como fase hexagonal, em que é possível observar as estrias características desta fase; (b) imagem obtida para a amostra F2d (F2+H ₂ O 1:1 p/p), em que é possível observar as cruzes de Malta, característico da fase lamelar...	82
Figura 16 - Representação de F2 após substituição da sua fase aquosa por dispersões dos polímeros mucoadesivos PF, C971, C974 e quitosana nas concentrações 0,1 %, 0,5 % e 1% (m/v).....	87
Figura 17 - Incorporação do AZT nas formulações F1A, F2A, F2APF e nos componentes isolados - ácido oleico (AO), PPG-5-CETETH-20 e água.....	90
Figura 18 - Imagens obtidas por MLP das formulações F1, F2 e de suas diluições 1:1 (m/m) em FNS, resultando nas amostras F1d e F2d...	92
Figura 19 - Reogramas de fluxo da formulação F1, F2 e o efeito da substituição da fase aquosa por dispersões dos polímeros mucoadesivos, resultando nas formulações FPF, FC971, FC974 e FQS.	93
Figura 20 – Reogramas obtidos com as medidas de reologia oscilatória de varredura de frequência das amostras F1, F2, F2PF, F2C971, F2C974, F2QS e também das suas misturas com FNS (F1d, F2d, F2PFd, F2C971d, F2C974d, F2QSd). (□ ou □) G ^{''} ; (■ ou ■) G [']	97
Figura 21 - Comparação dos módulos elásticos (G [']) na frequência de 1 Hz das amostras F2d, F2PFd, F2C971d, F2C974d e F2QSd.....	98
Figura 22 – Gráficos das medidas feitas pelo teste TPA, obtendo os parâmetros de dureza, resistência à compressão, adesão e coesão das amostras diluídas em FNS.....	99
Figura 23 – Gráficos das medidas feitas pelo teste TPA, obtendo os parâmetros de dureza, resistência à compressão, adesão e coesão para os hidrogéis de policarbofil utilizados como padrão comparativo.....	100
Figura 24 – Comparação entre as medidas da força mucoadesiva das	

amostras F1, F2, F2PF, F2C971, F2C974, F2QS e água, utilizando mucosa nasal suína e disco de mucina como mucosa modelo (n=6).....	104
Figura 25 – Comparação entre as medidas da força mucoadesiva das misturas dos sistemas precursores de cristais líquidos com FNS e do padrão PF5, utilizando mucosa nasal suína e disco de mucina como mucosa modelo (n=6).....	105
Figura 26 – Esquema ilustrando o aspecto visual do sistema F2 antes da administração nasal e a formação do sistema F2d por meio do contato com o muco depois da administração. As fotografias de F2 e F2d estão acompanhadas de suas respectivas imagens obtidas por MLP, indicando campo escuro e cruces de malta, respectivamente.....	108
Figura 27 - Cromatograma da solução padrão de AZT a 10 µg/mL em tampão fosfato monobásico 20 mM pH 6,8 ($\lambda = 265$ nm).....	110
Figura 28 - Cromatograma do meio receptor da amostra F2 após 1h de ensaio de permeação ($\lambda = 265$ nm). O pico indicado por (i) corresponde aos componentes da amostra.....	110
Figura 29 - Cromatograma do meio receptor da amostra F1A após 1h de ensaio de permeação ($\lambda = 265$ nm). O pico indicado por (i) corresponde aos componentes da amostra.....	111
Figura 30 - Perfil de permeação cumulativa em porcentagem da formulação F2A e solução aquosa (SA).....	112
Figura 31 - Cromatogramas das soluções de trabalho em plasma contendo o AZT e o PI a 5000 ng/mL. Além do AZT e o PI, o cromatograma (a) contém lamivudina, (b) indinavir e (c) efavirenz, todos na concentração de 5000 ng/mL.....	119
Figura 32 – Perfil de concentrações plasmáticas médias de AZT <i>versus</i> tempo obtidas com a administração intravenosa, oral e intranasal de 8 mg/kg de AZT em ratos, sendo cinco replicatas por grupo.....	123

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	19
2.REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1.Tratamento atual da AIDS e seus problemas.....	22
2.2.Zidovudina.....	23
2.3.Novas alternativas para o tratamento da AIDS e a contribuição da nanotecnologia.....	27
2.4. Anatomia e potencial da via nasal para liberação sistêmica de fármacos.....	32
2.5.Sistemas mucoadesivos de liberação de fármacos.....	37
2.6.Sistemas compostos por tensoativos	41
2.7.Sistemas compostos por tensoativos como plataforma tecnológica para o desenvolvimento de formulações mucoadesivas.....	45
3.OBJETIVOS.....	51
3.1.Etapas.....	51
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
4.1.Materiais.....	52
4.1.1.Fármacos e medicamentos.....	52
4.1.2.Adjuvantes, solventes e reagentes.....	52
4.2.Equipamentos.....	53
4.3.Métodos.....	54
4.3.1.Comportamento de fases dos tensoativos fosfatidilcolina e PPG-5-CETETH-20 em água.....	54
4.3.2.Construção dos diagramas de fases ternários dos sistemas contendo PPG-5-CETETH-20/ fosfatidilcolina/ água e PPG-5-CETETH-20/ ácido oleico/ água.....	54
4.3.3.Caracterização dos sistemas por microscopia de luz polarizada (MLP).....	56
4.3.4.Seleção dos sistemas para caracterização físico-química.....	56
4.3.5.Incorporação de polímeros mucoadesivos nos sistemas	

selecionados.....	57
4.3.6.Determinação solubilidade do AZT nos sistemas selecionados.....	57
4.3.6.1.Validação do método analítico para quantificar o AZT incorporado nos sistemas.....	57
4.3.6.2.Incorporação do AZT nos sistemas.....	58
4.3.7.Caracterização reológica por ensaios de fluxo contínuo e ensaios oscilatórios de varredura de frequência.....	59
4.3.8.Caracterização das propriedades mecânicas.....	60
4.3.8.1.Avaliação do perfil de textura (TPA) dos sistemas em contato com FNS.....	60
4.3.8.2.Teste de avaliação da força mucoadesiva.....	62
4.3.9.Análise estatística.....	64
4.3.10.Avaliação da permeação <i>ex vivo</i>	64
4.3.10.1.Validação de método analítico para quantificar o AZT no ensaio de permeação <i>ex vivo</i>	64
4.3.10.1.1.Teste de permeação <i>ex vivo</i> utilizando célula de difusão tipo Franz.....	66
4.3.11.Avaliação pré-clínica dos sistemas precursores de cristais líquidos.....	68
4.3.11.1.Desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação do AZT em plasma de rato.....	68
4.3.11.1.1.Preparo das soluções estoque e soluções padrão.....	68
4.3.11.1.2.Condições cromatográficas.....	68
4.3.11.1.3.Determinação do método de extração do AZT a partir de plasma de rato para análise por CLAE.....	69
4.3.11.1.4.Validação do método bioanalítico.....	70
4.3.11.2.Protocolo experimental.....	71
4.3.11.3.Animais.....	72
4.3.11.4.Procedimento de administração intravenosa, oral e intranasal...	73
4.3.11.5.Coleta, preparo das amostras e análise por CLAE.....	73

4.3.11.6.Análise farmacocinética.....	73
5.RESULTADOS.....	75
5.1.Comportamento de fases dos tensoativos fosfatidilcolina e PPG-5-CETETH-20 em água.....	75
5.2.Construção do diagrama de fases ternário com a combinação de PPG-5-CETETH-20, fosfatidilcolina e água.....	79
5.3.Construção do diagrama de fases ternário com a combinação de PPG-5-CETETH-20, ácido oleico e água.....	81
5.4.Seleção dos sistemas para caracterização físico-química.....	85
5.5.Incorporação de polímeros mucoadesivos nos sistemas selecionados.....	86
5.6.Determinação da solubilidade do AZT nos sistemas selecionados....	88
5.6.1.Método analítico para quantificar o AZT incorporado nos sistemas	88
5.6.2.Avaliação da incorporação do AZT nos sistemas.....	89
5.7.Avaliação do comportamento de fases dos sistemas em presença de muco por MLP.....	91
5.8.Caracterização reológica por ensaio de fluxo contínuo.....	92
5.9.Caracterização da mucoadesão por reologia oscilatória de varredura de frequência.....	95
5.10.Caracterização das propriedades mecânicas.....	98
5.10.1.Avaliação do perfil de textura (TPA) dos sistemas em contato com FNS.....	98
5.10.2.Teste de avaliação da força mucoadesiva.....	103
5.11.Seleção do sistema candidato à administração nasal.....	107
5.12.Avaliação da permeação <i>ex vivo</i>	109
5.12.1.Método analítico para quantificar o AZT em meio receptor.....	109
5.12.2.Teste de permeação <i>ex vivo</i> utilizando célula de difusão tipo Franz.....	112
5.13.Avaliação pré-clínica dos sistemas precursores de cristais líquidos	117
5.13.1.Determinação do método de extração do AZT a partir de plasma de rato para análise por CLAE.....	117

5.13.2.Método bioanalítico para quantificação do AZT em plasma de rato.....	118
5.13.3.Animais e administração dos sistemas.....	121
5.13.4.Análise farmacocinética.....	122
6.DISSCUSSÃO.....	127
7.CONCLUSÕES.....	135
8.PERSPECTIVAS FUTURAS.....	137
9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139
10.PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	156
11.PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	163

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, mais conhecida pelo termo em inglês, AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) é uma doença infecciosa muito grave que desafia mundialmente a saúde pública (UNAIDS, 2009). Os antirretrovirais têm controlado a doença e aumentado a sobrevivência dos pacientes. A zidovudina (AZT) é o fármaco de primeira escolha no tratamento da AIDS devido a sua eficácia e perfil toxicológico favorável, porém, quando administrada pela via oral, sofre extensivo metabolismo pré-sistêmico, o que reduz sua biodisponibilidade. São necessárias altas e frequentes doses para atingir uma concentração plasmática efetiva, favorecendo o surgimento de efeitos indesejados os quais são dose-dependentes, como anemia e supressão da medula óssea (BRASIL, 2006).

Muitos estudos exploram novas vias de administração para modificar o perfil de absorção dos antirretrovirais, pois vias alternativas podem evitar problemas relacionados às barreiras fisiológicas que a via oral apresenta (OJEWOLE et al., 2008). A via nasal tem sido muito explorada para administração de fármacos buscando-se uma ação sistêmica, pois ela promove uma rápida absorção e evita o metabolismo pré-sistêmico (ARORA; SHARMA; GARG, 2002; CALLENS et al., 2003; ILLUM, 2003; 2007; 2012; MAINARDES et al., 2006; 2007; 2009; 2010; UGWOKÉ et al., 2005; VYAS et al., 2006a; 2006b).

Apesar das vantagens apresentadas pela via nasal, ela possui algumas limitações, como a rápida eliminação da formulação pelo mecanismo de depuração mucociliar (MARTTIN et al., 1998). Sistemas de liberação de fármacos mucoadesivos podem promover a fixação e aumentar a absorção do fármaco, processo que não aconteceria se o mesmo fosse administrado em formulações convencionais (UGWOKÉ et al., 2005). O crescimento destes estudos está relacionado à evolução da tecnologia farmacêutica, que possibilita uma maior facilidade no delineamento de novas formulações que possibilita a utilização de outras vias de administração (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2008).

Os sistemas mucoadesivos promovem um contato mais íntimo entre a formulação e o local de administração por ligações fracas como interações

eletrostáticas e ligações de hidrogênio, pela difusão e interpenetração das cadeias poliméricas ou pelo aumento da viscosidade quando o sistema encontra algum estímulo fisiológico, chamado também de sistema estímulo-sensitivo ou de geleificação *in situ* (HE, KIM, LEE, 2008; CARVALHO et al., 2010b; SMART, 2005). Os sistemas estímulo-sensitivos são fáceis de administrar devido à sua baixa viscosidade, mas, após a aplicação, eles são transformados em sistemas de maior viscosidade, responsável pela fixação da formulação no local desejado (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2008).

Sistemas denominados como precursores de cristais líquidos (BOYD et al., 2006) são sistemas compostos por tensoativos liotrópicos com alto grau de organização e podem ser projetados para serem formados *in situ* após a administração (MALMSTEN, 2002). Alguns sistemas compostos por tensoativos em presença de baixa concentração de água são líquidos, como as micelas ou microemulsões reversas. O aumento da fase aquosa pode causar a maior orientação e empacotamento das micelas, resultando nas estruturas nanoestruturadas líquido-cristalinas, como as fases lamelares, hexagonais e cúbicas (FLORENCE, ATTWOOD, 2003). Estas fases podem promover a fixação da formulação e o controle da liberação do fármaco (SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado as propriedades bio(muco)adesivas de sistemas nanoestruturados compostos pelo tensoativo álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (PPG-5-CETETH-20) (CARVALHO et al., 2010a; CARVALHO et al., 2012). Resultados *in vitro* têm mostrado que este tensoativo em contato com fluido nasal simulado (FNS) forma fases líquido-cristalinas reologicamente mais elásticas e adesivas, apresentando um grande potencial como veículo mucoadesivo para administração nasal do AZT (CARVALHO et al., 2010a).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver sistemas de liberação nanoestruturados mucoadesivos precursores de cristais líquidos para promover a absorção nasal do AZT, os quais foram avaliados por testes de permeação *ex vivo* e ensaios pré-clínicos em ratos. A estratégia utilizada foi o comportamento de fases liotrópico do tensoativo PPG-5-CETETH-20, que permite a formação de cristal líquido em contato com fluidos fisiológicos. A

formação da matriz líquido-cristalina na cavidade nasal pode favorecer o contato da formulação com a mucosa, promovendo a permeação e absorção intranasal do AZT. A investigação desta nova plataforma tecnológica pode contribuir assim para a criação de alternativas ao tratamento contra AIDS.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Tratamento atual da AIDS e seus problemas

A AIDS e a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana, conhecido como HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), são problemas mundiais de saúde pública. Dados da UNAIDS (2009) indicam que há cerca de 33,4 milhões de indivíduos infectados e em 2008 foi relatado aproximadamente dois milhões de mortes relacionadas à doença. Em comparação a períodos anteriores, estas estatísticas vêm diminuindo graças ao maior número de pessoas com acesso ao tratamento (UNAIDS, 2009).

A AIDS pode estar associada às escolhas individuais e ao estilo de vida, às questões de gênero e às condições sociais, mas também pode ocorrer definitivamente sem escolha, especialmente no caso de crianças que nascem de mães portadoras do HIV (KASENGA, 2011). Graças aos avanços científicos e o surgimento da terapia antirretroviral, a expectativa e a qualidade de vida de pacientes HIV positivos têm aumentado significativamente. A partir de 1990 houve um aumento tanto no conhecimento sobre a doença como nas alternativas para o tratamento, o que provocou uma mudança no seu perfil epidemiológico. Na metade dos anos 90, o avanço das pesquisas farmacológicas e a chegada dos antirretrovirais inibidores de protease deu início a uma nova era do tratamento, internacionalmente conhecida como HAART, sigla proveniente do Inglês *Highly Active Antirretroviral Therapy* (GEOCZE et al., 2010).

A HAART tem melhorado consideravelmente os resultados clínicos e o controle da doença, além de diminuir a taxa de mortalidade, resultando numa maior qualidade de vida dos pacientes. Apesar disto, a HAART apresenta efeitos adversos severos, como fadiga, náusea, vômitos, diarreias e lipodistrofia. Estes sintomas contribuem para a não adesão do paciente ao tratamento, resultando na diminuição da contagem dos linfócitos T CD4, tolerância contra os antirretrovirais, falha no tratamento e surgimento de infecções oportunistas (GEOCZE et al., 2010). Além disto, muitos antirretrovirais sofrem extensivo metabolismo pré-sistêmico e são instáveis em meio gastrointestinal, resultando em baixa biodisponibilidade. A meia vida da

maioria dos fármacos anti-HIV é curta e frequentes administrações são requeridas para manter o efeito, complicando o esquema terapêutico. Outra limitação da atual HAART é a ineficiência dos regimes terapêuticos em erradicar o HIV de certos compartimentos inacessíveis do organismo, como sistema nervoso central (SNC), sistema linfático e macrófagos. Para eliminar o HIV destes reservatórios, são necessárias altas doses, as quais contribuem para a severidade dos efeitos adversos (OJEWOLE et al., 2008).

Os antirretrovirais são classificados em categorias como inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN), inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN), inibidores de protease (IP), e mais recentemente inibidores de fusão (IF) e de integrase (II). Estes fármacos são administrados em terapia combinada, conhecida como coquetel. Eles adiam o início dos sintomas da doença, diminuindo o ritmo da redução das células de proteção do sistema imunológico, mas, ainda assim, não conseguem eliminar o HIV do organismo (BRASIL, 2006).

Recomenda-se que a terapia se inicie combinando três fármacos. A escolha do esquema terapêutico mais adequado vai depender da apresentação de intolerância, contagem da carga viral, toxicidade, uso concomitante com outros medicamentos, gravidez, entre outros fatores. A Tabela 1 apresenta os esquemas terapêuticos sugeridos pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006) levando em consideração o perfil favorável de toxicidade dos fármacos e sua eficácia.

2.2. Zidovudina (AZT)

O AZT foi sintetizado pela primeira vez em 1964, originalmente destinado para o tratamento do câncer, mas que não apresentou eficácia apropriada. Em 1985, sua atividade contra o HIV foi demonstrada e, devido à gravidade do espalhamento da AIDS, seu uso como antirretroviral foi aprovado pelo FDA, mesmo sem a observação de todos os passos necessários para sua regularização (D'ANDREA; BRISDELLI; BOZZI, 2008).

Tabela 1 - Sugestões terapêuticas para a terapia antirretroviral. Fonte: BRASIL, 2006.

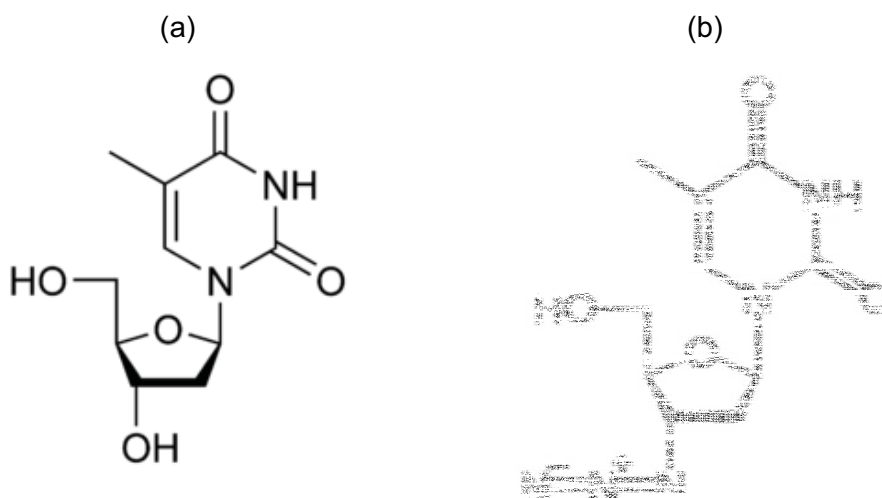
Esquema	Fármacos
1ª escolha	AZT+lamivudina+efavirenz ¹ AZT+lamivudina+indinavir/ritonavir AZT+lamivudina+lopinavir/ritonavir AZT+lamivudina+nelfinavir ²
2ª escolha (contra indicação ao AZT ³)	Estavudina+lamivudina+efavirenz ¹ Estavudina+lamivudina+indinavir/ritonavir Estavudina+lamivudina+lopinavir/ritonavir Estavudina+lamivudina+nelfinavir ²
Alternativa (contra indicação ao AZT e estavudina ⁴)	Tenofovir+lamivudina+efavirenz ¹ Tenofovir+lamivudina+indinavir/ritonavir Tenofovir+lamivudina+lopinavir/ritonavir Considerar outros esquemas antiretrovirais, em função da possibilidade de exposição a vírus resistente.

1. O efavirens não deve ser utilizado em mulheres grávidas ou com possibilidade de gravidez durante o período de quimioprofilaxia, pela possibilidade de efeito teratogênico.
2. A dose do nelfinavir é de 9 ou 10 comprimidos/dia, entretanto pode ser o medicamento de escolha para gestantes.
3. Contraindicação ao AZT entendido como: hemoglobina < 8,0 g % e/ou contagem de neutrófilos < 500/mm³.
4. Contraindicação a estavudina entendido como: pancreatite e/ou neuropatia periférica.
5. O tenofovir pode ser indicado em casos de intolerância ou resistência presumida ao AZT e a estavudina para maiores de 18 anos e que não tenham lesão renal prévia, embora haja menor experiência clínica de seu uso em situações de profilaxia pós-exposição ocupacional ao HIV (em relação ao uso de AZT). Para seu uso, deve-se considerar também a dificuldade logística e incremento potencial no custo.

Inicialmente, o AZT era administrado sozinho em doses muito elevadas, em intervalos de quatro horas, mesmo durante a noite, provocando sérios efeitos adversos. Atualmente, a dosagem é bem menor, administrada três vezes ao dia, melhorando assim a qualidade de vida do paciente. Na maioria das vezes, ele é combinado com outros antirretrovirais para prevenir a mutação do HIV em formas resistentes (D'ANDREA; BRISDELLI; BOZZI, 2008).

O AZT é um nucleosídeo análogo da timidina (Figura 1) que, assim como os outros inibidores de transcriptase reversa, interrompe a replicação do HIV pela inibição desta enzima. Ele tem mostrado ser extremamente benéfico na diminuição da progressão da doença e na supressão da transmissão materno-fetal do vírus. Por isto, o AZT é o fármaco de primeira escolha para compor a HAART (D'ANDREA; BRISDELLI; BOZZI, 2008).

Figura 1 - Estrutura química da timidina (a) e do AZT (b).



Contudo, seu uso é limitado por induzir os pacientes HIV positivos a uma toxicidade severa após o uso prolongado. Os efeitos adversos são relacionados predominantemente às células progenitoras da medula óssea,

manifestando-se como anormalidades hematopoiéticas severas (D'ANDREA; BRISDELLI; BOZZI, 2008).

Seu mecanismo de ação se inicia por sua fosforilação no interior das células pela enzima timidina-quinase em AZT monofosfato, que por ação da timidilato-quinase celular, se converte em difosfato que, por sua vez, é convertido em trifosfato por outras enzimas celulares não específicas. O trifosfato de AZT torna-se um substrato da transcriptase reversa que passa a incorporá-lo na formação do DNA viral, bloqueando o término na cadeia, pois a enzima não reconhece o seu grupamento 3'-azido, evitando a formação da ligação 5'-3'-fosfodiéster. A competição do AZT pela transcriptase reversa do HIV é aproximadamente 100 vezes maior do que para a DNA alfa-polimerase celular, o que dá certa seletividade do fármaco às células infectadas (GOODMAN; GILMAN, 2006).

O AZT é absorvido rápido e quase totalmente pelo trato gastrointestinal, após administração oral; entretanto, devido ao rápido metabolismo pré-sistêmico, sua biodisponibilidade é de aproximadamente 65%. A administração juntamente com alimentação pode diminuir o índice e a extensão da absorção. O AZT atravessa a barreira hematoencefálica e atravessa a placenta, alcançando, na criança, níveis plasmáticos semelhantes àqueles observados no adulto. A ligação do AZT no plasma é baixa, cerca de 30 a 38%. Seu metabolismo dá-se principalmente por glicuronização hepática, em que se forma rapidamente o seu principal metabólito inativo, 3'-azido-3'-desoxi-5'-0-D-glicopiranosol-timidina, que não inibe a replicação do HIV. Em adultos com função renal normal, a meia-vida do AZT por via oral é de cerca de 1 hora (variando entre 0,8 e 1,2 horas) (GLAXOSMITHKLINE, 2008).

Devido ao seu metabolismo, baixa biodisponibilidade e baixa meia vida plasmática, para manter os níveis terapêuticos efetivos, é necessário se administrar altas doses de AZT, que frequentemente alcançam níveis plasmáticos tóxicos, levando aos seus efeitos adversos graves, que são dose-dependentes. Portanto, uma redução da dose total administrada reduziria a severidade desta toxicidade (MAINARDES, 2007). Desta maneira, a busca por novos sistemas de liberação que vise uma liberação mais direcionada e controlada do AZT é extremamente importante para melhorar sua eficácia.

2.3. Novas alternativas para o tratamento da AIDS e a contribuição da nanotecnologia

Atualmente, não são encontrados muitos estudos envolvendo a pesquisa de novos fármacos para o tratamento da AIDS (HAWKINS, 2010), porém muitos pesquisadores têm focado o desenvolvimento de novos sistemas de liberação, os quais podem melhorar a eficácia tanto de novos fármacos como dos já existentes (OJEWOLE et al., 2008).

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos antirretrovirais com o objetivo de reduzir a frequência das doses e melhorar a adesão ao tratamento da AIDS tem se tornado complementar ao descobrimento de novos fármacos (SOSNIK et al., 2009). Na década passada, houve uma explosão no interesse em se desenvolver estes novos sistemas de liberação (OJEWOLE et al., 2008) e uma evidência disto é o surgimento de vários artigos de revisão sobre o assunto nos últimos dois anos (GEOCZE et al., 2010; GUPTA; JAIN, 2010; HAWKINS, 2010; NEVES et al., 2010; SOSNIK et al., 2009, WONG et al., 2010), os quais eram difíceis de encontrar anteriormente.

Dentre as novas pesquisas envolvendo sistemas de liberação de fármacos antirretrovirais, há uma tendência em se aplicar os avanços da nanotecnologia. O conceito básico para se empregar a nanotecnologia envolve a habilidade destes sistemas em compartimentalizar e modificar algumas propriedades dos fármacos no ambiente fisiológico, sem alterar a estrutura da molécula. Através da associação dos antirretrovirais com sistemas nanoestruturados, as propriedades que governam a liberação são determinadas pelas propriedades físico-químicas do sistema, e não mais pelas propriedades do fármaco em si (NEVES et al., 2010). Estas propriedades incluem proteção do fármaco incorporado contra o metabolismo, aumento de tempo de permanência no organismo e a possibilidade de direcioná-lo para sítios específicos, como células e órgãos específicos. Todas estas propriedades permitem pensar na redução da dose e melhora dos regimes terapêuticos, com menores efeitos adversos e maior adesão do paciente ao tratamento. Além disto, há a possibilidade de incorporar diferentes antirretrovirais que compõem o coquetel no mesmo sistema de liberação, o

qual pode contribuir para simplificar o esquema de administração (NEVES et al., 2010).

Apesar da pesquisa de novos sistemas de liberação para terapia antirretroviral ter crescido recentemente, a maioria dos estudos ainda se encontram na fase de pré-formulação ou na fase pré-clínica. Mesmo assim, o potencial para melhorar o tratamento da AIDS através do emprego da nanotecnologia é evidente (CARVALHO; MAINARDES; GREMIÃO, 2011). Por isto, este presente trabalho visa contribuir com as pesquisas nesta área.

Com objetivo de solucionar os problemas relacionados à baixa biodisponibilidade oral dos antirretrovirais, alguns estudos exploram novas vias de administração que podem evitar problemas relacionados às barreiras fisiológicas que a via oral apresenta (OJEWOLE et al., 2008). A via nasal começou a ser explorada em nosso grupo de pesquisa pioneiramente por MAINARDES (2007). Nestes estudos, nanopartículas de ácido polilático (PLA) e blendas PLA-PEG (polietilenoglicol) foram desenvolvidas e os resultados mostraram que elas são eficientes em evitar a ativação de células fagocíticas (MAINARDES et al., 2009). Além disso, elas aumentaram a meia vida e biodisponibilidade do AZT (MAINARDES et al., 2010). Além destes estudos, uma extensa revisão sobre sistemas de liberação nanoestruturados aplicados à terapia antirretroviral pode ser encontrada em trabalho recentemente publicado (CARVALHO; MAINARDES; GREMIÃO, 2011). A Tabela 2 resume os tipos de sistemas encontrados, os materiais e antirretrovirais empregados e os principais resultados atingidos.

Como pode ser visto na Tabela 2, os sistemas mais encontrados são lipossomas e nanopartículas poliméricas. As vias de administração mais testadas são a oral, a injetável, a subcutânea e a transdérmica, além de estudos que testam atividades celulares *in vitro*. A administração de antirretrovirais pela via nasal, até o presente momento, tem sido explorada apenas por nosso grupo de pesquisa, com o desenvolvimento das nanopartículas poliméricas e sistemas compostos por tensoativos, apresentando já alguns resultados promissores (CARVALHO et al. 2010a; MAINARDES et al., 2010).

Tabela 2 - Revisão bibliográfica dos sistemas de liberação nanoestruturados encontrados na literatura, ressaltando a via de administração testada, os antirretrovirais e materiais empregados e os principais resultados atingidos.

Sistema de liberação	Via de administração	Antirretroviral testado	Materiais empregados	Principais resultados atingidos	Referências
Nanoemulsão O/A	Oral	Saquinavir	Fosfatidilcolina de ovo, ácido desoxicólico e óleo de cártamo.	Aumento da biodisponibilidade no SNC.	VYAS; SHAHIWALA; AMIJI, 2008.
Micelas poliméricas	Oral	Efavirenz	Poloxaminas N-metiladas e N alquiladas	Aumento da solubilidade.	CHIAPPETA et al., 2012.
Sistemas de autoassociação	Intravenosa	Pró-fármacos de AZT e didanosina	Colesteril derivados	Direcionamento para os macrófagos.	JIN et al., 2008; 2009; 2010.
Lipossomas	Não determinada	Zalcitabina	Fosfatidilcolina, colesterol	Direcionamento para os macrófagos.	MAKABI-PANZU et al., 1998.
Lipossomas	Intravenosa	AZT	Fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol	Redução da toxicidade da medula óssea.	PHILLIPS et al., 1991.
Lipossomas	Intravenosa	Estavudina	Manose	Direcionamento para os macrófagos, melhora dos parâmetros farmacocinéticos.	GARG et al., 2006.
Lipossomas	Transdérmica	AZT	Lipossomas pegulados	Aumento da permeação cutânea.	JAIN et al., 2006.
Lipossomas	Subcutânea	AZT	Manose	Direcionamento para o baço e linfonodos.	KAUR; NAHAR; JAIN, 2008.

Tabela 2 – continuação.

Sistema de liberação	Via de administração	Antirretroviral testado	Materiais empregados	Principais resultados atingidos	Referências
Lipossomas	Não determinada	Estavudina	Fosfatidilserina e dicetil fosfato	Direcionamento para os macrófagos.	KATRAGADDA; BRIDGMAN; BETAGERI, 2000.
Lipossomas	Não determinada	Estavudina	Manose e galactose	Aumento da meia vida plasmática, diminuição da toxicidade hematológica.	GARG et al., 2006.
Lipossomas	Não determinada	Estavudina, zalcitabina	Lipossomas ligados a anticorpos	Direcionamento para os macrófagos	BETAGERI et al. 1993.
Lipossomas	Subcutânea	Indinavir	Lipossomas ligados a anticorpos	Direcionamento para o sistema linfático.	GAGNÉ et al., 2002.
Nanopartículas lipídicas sólidas	Não determinada	Saquinavir	Polissorbato 80, esterilamina, bromuro de dioctadecildimetil-amonio, Compritol 888 ATO e manteiga de cacao.	Aumento da eficiência de incorporação; liberação sustentada.	KUO; CHEN, 2009.
Nanopartículas lipídicas sólidas	Oral	Lopinavir	Behenato de glicerila	Direcionamento para o sistema linfático; aumento da biodisponibilidade.	AJI ALEX et al., 2010.
Nanopartículas lipídicas sólidas	Intravenosa	Estavudina	Dynasan 114, Solutol, Tween 80, Pluroi Oleique, Poloxamer188	Escalonamento	SHEGOKARA; SINGHA; MÜLLER, 2010.

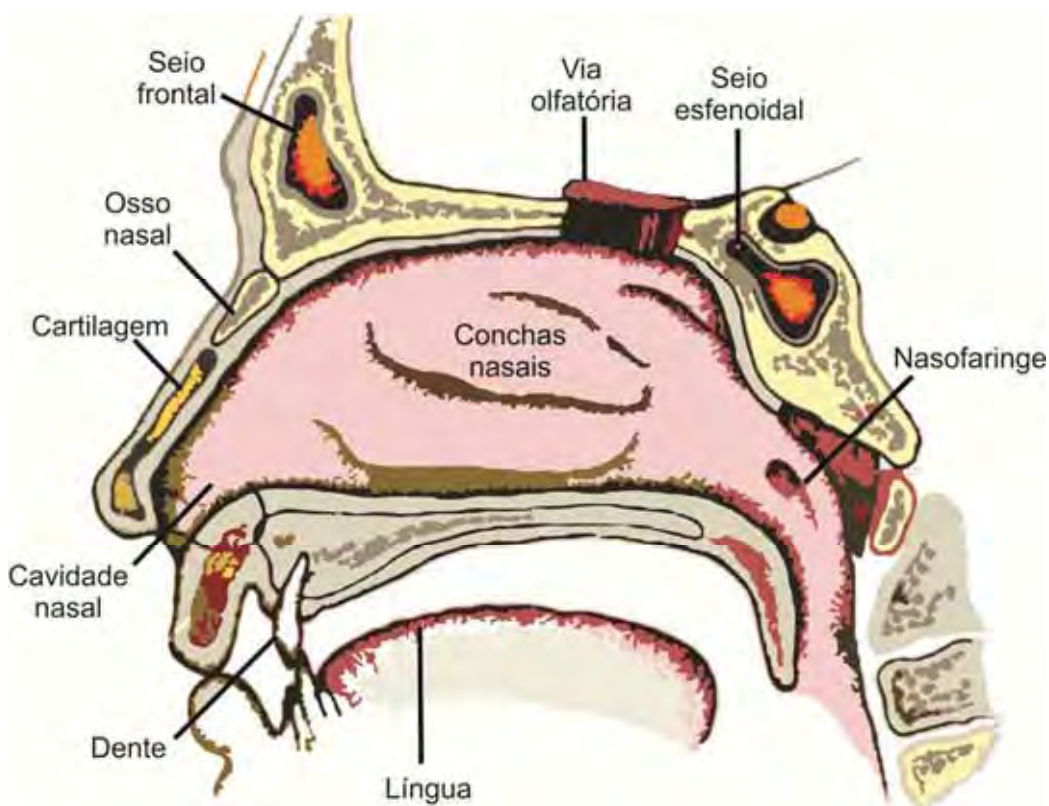
Tabela 2 – continuação.

Sistema de liberação	Via de administração	Antirretroviral testado	Materiais empregados	Principais resultados atingidos	Referências
Nanopartículas poliméricas	Não determinada	AZT, saquinavir e zalcitabina.	Poliálquiloacrilato; polimetilmetacrilato; poli hexil cianoacrilato; Poliepsilon-caprolactona-36-óxido de polietileno; polietilamina; ácido polilactico-co-glicólico; blendas de ácido poliláctico e polietilenoglicol.	Direcionamento para os macrófagos.	SCHÄFER et al., 1992; BENDER et al., 1996; SHAH; AMIJI, 2006; HILLAIREAU et al., 2006; MAINARDES et al., 2009.
Nanopartículas poliméricas	Nasal	AZT	Blendas de ácido poliláctico e polietilenoglicol.	Liberação sustentada, diminuição da constante de eliminação e aumento da biodisponibilidade.	MAINARDES et al., 2010.
Nanopartículas poliméricas	Intravenosa (*) não determinada	AZT, lamivudina e ritonavir.	Metilmetacrilato e sulfopropilmetacrilato; albumina peguiliada e transferrina como ligante superficial; ácido poliláctico e peptídeo Tat como ligante superficial.	Direcionamento para o SNC.	KUO; CHEN, 2006; MISHRA et al., 2006; BORGMANN et al., 2011(*)
Precusores de cristais líquidos	Nasal	AZT	PPG-5-CETETH-20, ácido oleico.	Promoção da mucoadesão	Carvalho et al., 2010

2.4. Anatomia e potencial da via nasal para liberação sistêmica de fármacos

A anatomia da via nasal é composta pela região mais externa do nariz, o vestibulo nasal, que abrange aproximadamente 15 mm, estendendo-se das narinas até a válvula nasal, com um comprimento de cerca de 60 mm e um volume de 20 mL, que chega até a nasofaringe. A cavidade nasal está dividida verticalmente, em quase toda a sua extensão, pelo septo nasal. Suas paredes apresentam três dobras ou recortes denticulares conhecidos como cornetos ou conchas nasais. Estas dobras aumentam significativamente a área superficial (160 cm²), em comparação ao seu volume (300 µL). A Figura 2 representa a anatomia da cavidade nasal. Sua elevada área superficial e abundante vascularização subjacente tornam esta via um local ideal para absorção de fármacos (AULTON, 2005).

O epitélio da mucosa nasal é composto em sua maioria por uma membrana que contém uma mistura de células colunares, calciformes e basais. As células colunares presentes no terço anterior do epitélio são células não ciliadas, enquanto que as restantes são ciliadas. Os cílios são pequenas projeções piliformes localizadas sobre a superfície exposta das células epiteliais. Cada célula contém em torno de 300 cílios, que medem entre 5 e 10 µm de comprimento e 0,1 a 0,3 µm de diâmetro. Esses cílios ondulam em ritmo uniforme, com uma frequência de 10 Hz. Sua função é facilitar o movimento do muco da cavidade nasal para a nasofaringe e, finalmente, para o trato gastrointestinal. O efeito combinado desses cílios é denominado depuração mucociliar. O tempo estimado total de reposição do muco varia de 10 a 15 minutos, aproximadamente, sendo a meia vida de depuração mucociliar estimada em 20 minutos, e a taxa de depuração em torno de 5 mm/min. A depuração mucociliar é basicamente uma função de defesa, mas que constitui uma barreira à absorção de fármacos (AULTON, 2005; HAGERSTROM, 2003; ILLUM, 2003).

Figura 2 – Anatomia da cavidade nasal (Fonte: RAI et al., 2012).

A camada de muco tem, normalmente, uma espessura de 5 a 20 μm (AULTON, 2005) e consiste principalmente em 95 % de água, 2 % de mucina, 1 % de sais, 1 % de outras proteínas como albuminas, imunoglobulinas, lisozimas e lactoferrinas, e menos que 1 % de lipídeos. As moléculas de mucina são responsáveis pela característica viscosa do muco (DAVIES; VINEY, 1998). É produzido diariamente cerca de 1 a 2,0 L de muco nasal, o qual consiste em duas camadas, uma intimamente aderida à mucosa e mais geleificada e outra mais externa, fracamente aderida e solúvel (UGWOKE et al., 2005).

A via nasal tem recebido especial atenção como rota promissora para liberação sistêmica de fármacos, sobretudo de peptídeos e fármacos que sofrem metabolismo pré-sistêmico e, por isso, tornou-se um tema importante de pesquisa (AULTON, 2005; ILLUM, 2003; MAINARDES et al., 2006). Seu epitélio com numerosas microvilosidades e grande área de superfície facilita a

absorção de fármacos. A camada subepitelial altamente vascularizada e a membrana basal com endotélio poroso podem facilitar a permeação do fármaco. Essas características podem fazer com que o fármaco seja absorvido diretamente para a circulação sistêmica, evitando metabolismo pré-sistêmico, atingindo rapidamente níveis plasmáticos terapêuticos. Todos esses fatores podem favorecer a redução da dose, a diminuição de efeitos adversos e a adesão ao tratamento. Comparando-se com outras vias, a nasal tem representado um grande avanço na administração de fármacos como hormônio do crescimento e insulina (UGWOKE et al., 2005).

O reconhecimento do potencial da via nasal tem conduzido a um grande aumento nas pesquisas neste campo nas últimas duas décadas. A lista de produtos no mercado ou em vários estágios de desenvolvimento pré-clínico e clínico está sempre em crescimento (UGWOKE et al., 2005). Os medicamentos para liberação nasal atualmente comercializados ou nos diversos estágios de investigação clínica incluem fármacos para o tratamento de enxaquecas como zolmatriptan (Zomig), sumatriptan (Imitrex) e tartarato de butorfanol (Stadol NS), tratamento de pânico severo, como fentanil (PecFent, Instanyl), tratamento de indivíduos tabaco-dependentes (Nicorette) e tratamento de sintomas da menopausa (Aerodiol), entre outros. Há também uma ampla gama de peptídeos nasais no mercado como calcitonina (Miacalcin, Novartis e Fortical, Unigene), desmopressina (Desmospray, Ferring), busarelina (Suprecur, Sanofi-Aventis), nafarelina (Synarel, Pharmacia), oxitocina (Syntocinon, Unites Pharmacies UK) e muitos estudos envolvendo insulina, interferon, glucagon e vacinas contra influenza, sarampo e poliomielite (ILLUM, 2012).

Apesar das vantagens da via nasal, há algumas barreiras que limitam a absorção de fármacos, como o mecanismo de depuração mucociliar que pode remover imediatamente a formulação da cavidade nasal, além da baixa permeabilidade do seu epitélio que dificulta a absorção de fármacos polares ou de alto peso molecular (ILLUM, 2003; MAINARDES et al., 2006). Uma estratégia para vencer estas barreiras é o emprego de sistemas mucoadesivos. Eles podem aumentar o contato entre a formulação e os locais de absorção na

cavidade nasal, retardando a depuração mucociliar, aumentando assim a permeação e absorção do fármaco (ILLUM, 2003; UGWOKÉ et al., 2005).

2.5. Sistemas mucoadesivos de liberação de fármacos

A bioadesão pode ser definida como o estado em que dois materiais, dentre os quais pelo menos um é de natureza biológica, sejam mantidos juntos por um período prolongado (SMART, 2005). Na década de 1980 esse conceito começou a ser aplicado em sistemas de liberação de fármacos. Sistemas de liberação bioadesivos consistem na incorporação de moléculas adesivas em formas farmacêuticas em que se deseja prolongar o contato com o tecido alvo. Esta propriedade pode promover a liberação do fármaco perto do local de ação ou absorção, com o consequente aumento da biodisponibilidade, promovendo efeitos locais ou sistêmicos (HÄGERSTRÖM; EDSMAN; STRØMME, 2003; WOODLEY, 2001).

Sistemas bioadesivos aplicados em mucosas frequentemente são definidos como mucoadesivos, mas os termos podem ser intercambiáveis. Há autores que definem sistemas mucoadesivos como aqueles que se liga com as moléculas da camada de muco, mas na verdade, é difícil distinguir se a ligação se dá entre a superfície celular ou entre as moléculas da camada de muco (WOODLEY, 2001).

As mucosas do organismo humano possuem relativa permeabilidade e permitem a rápida absorção (JASTI; LI; CLEARY, 2003). As mucosas são recobertas por muco, uma camada de proteção composta por moléculas glicoproteicas, lipídeos, sais inorgânicos e mais de 95 % em massa de água, o que confere alta hidratação à sua superfície. A mucina é a principal glicoproteína que compõe o muco e é responsável por sua geleificação. A função do muco é proteger e lubrificar o epitélio, e tem funções adicionais, dependendo do tipo de epitélio que recobre. Em cada caso, as características e funções do muco são diferentes. Sua espessura pode variar de 50 a 450 μm no estômago, para menos que 1 μm na cavidade oral (SMART, 2005). A mucosa mais utilizada para administração e absorção de fármacos é a gastrointestinal (JUNGINGER; THANOU; VERHOEF, 2006), mas outras vias também são estudadas, como a ocular, bucal, vaginal, retal, oral, periodontal (BRUSCHI et

al., 2007; HÄGERSTRÖM, 2003; WOODLEY, 2001) e a via nasal, a qual é o foco deste trabalho.

A presença do muco e dos movimentos ciliares responsáveis pela depuração mucociliar tornam difícil a permanência de sistemas de liberação em contato com as mucosas. Por isso, sistemas mais sofisticados devem ser desenvolvidos para que haja uma penetração através da camada de muco e adesão do sistema nas mucosas de modo que o mesmo possa exercer seu efeito da maneira mais eficiente possível. Sistemas mucoadesivos apresentam um grande potencial para melhorar a eficácia de fármacos que irão agir ou serem absorvidos através das mucosas; no entanto, é necessário um conhecimento profundo dos processos envolvidos com a depuração do muco. É importante compreender como os componentes endógenos podem influenciar os processos de mucoadesão no meio fisiológico. Além disso, o efeito destes sistemas nos mecanismos de transporte do fármaco através de membranas também deve ser entendido. Os desafios envolvidos no desenvolvimento de sistemas mucoadesivos são grandes, mas podem levar a avanços importantes no desenvolvimento de formulações mais eficientes. Neste contexto, a mucoadesão torna-se uma ótima estratégia para promover a retenção do sistema e a liberação do fármaco, melhorando assim a sua ação (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012).

Várias teorias são apresentadas para explicar os mecanismos envolvidos no processo de mucoadesão. Estas teorias envolvem a interposição mecânica do sistema, atração eletrostática, difusão e interpenetração das cadeias poliméricas, força de adesão da ligação mucoadesiva, processos de adsorção e molhabilidade. Estas teorias devem ser consideradas como processos complementares envolvidos em diferentes estágios da interação do muco com o substrato ou mesmo como processos que ocorrem simultaneamente (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2008; CARVALHO et al., 2010b; SMART, 2005).

Os atributos dos materiais empregados no desenvolvimento de sistemas mucoadesivos que permitem atingir tais mecanismos de mucoadesão são: hidrofiliicidade, carga negativa e presença de grupos formadores de ligações de hidrogênio. Além disso, o sistema deve ser adequado para permitir a

molhabilidade da superfície da mucosa e deve ser flexível para interpenetrar na camada de muco (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2008).

É possível projetar um sistema mucoadesivo nas mais variadas formas farmacêuticas, uma vez que a propriedade da adesão depende das características do material utilizado para sua preparação (EVANGELISTA, 2006). A Tabela 3 resume as principais estratégias que podem ser empregadas no desenvolvimento de sistemas mucoadesivos de liberação nasal de fármacos.

Os mecanismos de mucoadesão podem ser divididos em duas categorias: sistemas que aderem por ligações não específicas e não covalentes, mas de natureza eletrostática ou ligações de hidrogênio; sistemas que intumescem ou aumentam a viscosidade quando entram em contato com algum estímulo fisiológico e sua mucoadesão é resultado da formação de uma matriz mais reticulada (PARK; ROBINSON, 1984). Esta divisão é apenas para efeito didático, pois ambos os mecanismos podem também ocorrer simultaneamente.

Tabela 3 - Estratégias que podem ser utilizadas para o desenvolvimento de sistemas mucoadesivos de liberação nasal de fármacos.

Forma Farmacêutica	Particulada Solução Dispersão coloidal Suspensão extemporânea		Exemplos
Mecanismos de mucoadesão	Ligações de hidrogênio		Polietilenoglicol
	Interações eletrostáticas		Quitosana
	Interações hidrofóbicas		Fosfatidilcolina
	Interpenetração das cadeias poliméricas		Sistemas poliméricos
	Aumento da viscosidade <i>in situ</i> devido a um estímulo fisiológico	Temperatura	Poloxamers
		Concentração iônica	Goma gelana
		pH	Carbômeros
		Fluidos fisiológicos	Sistemas tensoativos

A mucosa possui carga negativa devido a presença de grupos siálicos da mucina presente no muco, uma característica que pode favorecer a interação com polímeros que possuem carga positiva. O grande representante desta categoria é a quitosana, polissacarídeo catiônico biocompatível, amplamente empregada no desenvolvimento de micro e nanopartículas. Resultados indicam que além deste polímero promover a mucoadesão, ele pode formar uma matriz intumescida que pode aumentar a retenção do sistema, além de também promover a abertura transitória das junções celulares, o que aumenta a permeabilidade de fármacos (ILLUM, 2007).

Por ser uma superfície altamente hidratada, a mucoadesão pode ser promovida por polímeros que tenham grupos funcionais formadores de ligações de hidrogênio. Alguns estudos têm recoberto micro e nanopartículas compostas por polímeros hidrofóbicos como o PLA com polímeros hidrofílicos como o PEG (MAINARDES et al., 2008; 2010). Esta estratégia permite que a partícula tenha um centro mais hidrofóbico que pode aumentar a eficiência de encapsulação e a permeação de fármacos, e a superfície hidrofílica aumenta a solubilidade e difusão do sistema através do muco, promovendo a mucoadesão com a formação de ligações de hidrogênio (ENSIGN; CONE; HANES, 2012). Além disso, o PEG pode evitar o reconhecimento das nanopartículas por células do sistema imunológico, que poderiam provocar sua destruição através da fagocitose após o processo de absorção (MAINARDES et al., 2009).

Recentemente, ILLUM (2012) tem discutido que a veiculação de fármacos em nanocarreadores para administração nasal parece não melhorar sua eficiência terapêutica quando comparada com soluções aquosas ou sistemas em pó utilizando o mesmo polímero para produzir os sistemas. A autora conclui que usando polímeros promotores de permeação como quitosana e pectina, a biodisponibilidade de fármacos, principalmente os que não são prontamente absorvidos pela mucosa nasal é aumentada (ILLUM, 2012). Porém, a encapsulação de fármacos em nanopartículas não visa apenas o aumento da biodisponibilidade, mas também a proteção, direcionamento e controle da liberação.

Para algumas vias de administração, sua anatomia requer a aplicação de formas farmacêuticas líquidas para atingir a mucosa onde o sistema irá agir ou promover a absorção do fármaco, por exemplo, a via ocular, periodontal e retal

(BRUSCHI; FREITAS, 2005; COLLNOT; ALI; LEHR, 2012). A via nasal permite a aplicação tanto de sistemas particulados, como de sistemas líquidos que podem ser facilmente gotejados, permitindo sua chegada à cavidade nasal; porém, podem facilmente escorrer para a nasofaringe. Por isso, formas farmacêuticas líquidas devem, por algum estímulo, aumentar a viscosidade quando entram em contato com a mucosa.

Existem vários polímeros que são responsivos a estímulos fisiológicos que podem formar hidrogéis altamente reticulados em ambiente fisiológico, promovendo sua retenção e o contato com a mucosa (PEPPAS; SAHLIN, 1996). Estes materiais são conhecidos como polímeros estímulo-sensitivos de geleificação *in situ*. Alguns possuem intumescimento e propriedades de dissolução pH-dependentes, como polímeros derivados do ácido poliacrílico (APA) e a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). Estes sistemas possuem grande potencial para serem aplicados no trato gastrointestinal, o qual possui variações de pH, e a transição sol-gel pode ser projetada para ocorrer no pH do local em que se deseja que o sistema fique mucoaderido. Além de mudanças de pH, podem ser exploradas também as mudanças de temperatura e concentração iônica, pois há polímeros que aumentam a viscosidade quando entram em contato com a temperatura fisiológica ou íons específicos, como os poloxameros e a goma gelana (HE; KIM; LEE, 2008).

Alguns veículos com este mecanismo de ação podem ser encontrados no mercado, como PecSys (Archimedes Pharma) composto por pectina, cuja geleificação ocorre quando entra em contato com íons cálcio. Este sistema de liberação faz parte do medicamento PecFent para administração nasal de fentanila, o qual foi aprovado no mercado em 2009 na Europa e em 2011 nos Estados Unidos (ILLUM, 2012).

Além de hidrogéis, alguns pesquisadores têm estudado as propriedades liotrópicas de alguns tensoativos em formarem cristais líquidos altamente organizados em contato com fluídos aquosos, e assim como os hidrogéis, podem ser explorados como uma matriz mucoadesiva de liberação de fármacos. Estes sistemas são reportados da literatura como precursores de cristais líquidos (BOYD et al., 2006).

Sejam sistemas de geleificação estímulo-sensitivos ou sistemas particulados, a mucoadesão pode ser resultado também da dispersão e

interpenetração das cadeias poliméricas entre a rede formada pelas glicoproteínas presentes do muco, aumentando o contato e consolidando assim a ligação mucoadesiva. Portanto, os mecanismos de mucoadesão não podem ser tratados de maneira isolada e na maioria das vezes a mucoadesão será resultado de vários processos simultâneos (SMART, 2005).

Atualmente têm sido propostas várias metodologias para se estudar os mecanismos envolvidos na mucoadesão, porém ela ainda não é totalmente compreendida. As técnicas empregadas na quantificação e qualificação desta propriedade ainda são tratadas de forma isolada (CARVALHO et al., 2010b).

As técnicas mais encontradas no caso de sistemas de geleificação estímulo-sensitivo são os testes reológicos, em que podem ser medidos o fluxo e as propriedades viscoelásticas dos sistemas, parâmetros que estão intimamente relacionados com o mecanismo de mucoadesão (CARVALHO et al., 2010b).

Os estudos reológicos têm sido complementados por caracterizações das propriedades mecânicas obtidas por equipamentos que fazem análise de textura, como o texturômetro (JONES; LAWLOR; WOOLFSON, 2002). Este equipamento é amplamente utilizado na caracterização mecânica de alimentos, mas recentemente tem sido muito útil na área farmacêutica para caracterização, por exemplo, de hidrogéis (BRUSCHI et al., 2007; JONES et al., 1997; 2001; 2002; 2009; TAMBURIC; CRAIG, 1997).

O texturômetro é um instrumento muito versátil, capaz de medir forças de compressão e extensão; pode ser programado utilizando vários tempos de análise e velocidades pré-programadas e os dados podem ser tratados de diferentes maneiras com ajuda de uma interface computacional. Ele possui um braço móvel em que é possível conectar vários tipos de provas analíticas disponibilizadas pelos fabricantes, mas que também podem ser adaptadas ou construídas no próprio laboratório, conforme o objetivo do teste (LUBRIZOL, 2008; EXPONENT LITE, 2009). Utilizando o texturômetro é possível obter parâmetros como dureza, resistência à compressão, adesão e coesão (JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997). Além disto, outros parâmetros podem ser correlacionados com ações mecânicas da via oral, como mastigabilidade, gomosidade, elasticidade e fraturabilidade (EXPONENT LITE, 2009).

É possível caracterizar a mucoadesão com a obtenção da força mucoadesiva, ou seja, da força requerida para quebrar a ligação entre o tecido e o sistema em estudo. O texturômetro pode ser programado para medir especificamente a força aplicada na remoção da formulação a partir de uma membrana modelo, que pode ser um disco de mucina ou uma mucosa animal (BROMBERG et al., 2004; BRUSCHI et al., 2007; HÄGERSTRÖM, 2003). Este método pode ser utilizado para analisar sistemas sólidos, como micro e nanopartículas (CHOWDARY; RAO, 2004), mas também materiais semissólidos (BROMBERG et al., 2004; BRUSCHI et al., 2007).

2.6. Sistemas compostos por tensoativos

Os agentes tensoativos são caracterizados por possuir em sua molécula uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica. Os tensoativos quando se dissolvem em água em baixas concentrações existem como monômeros que tendem a procurar a superfície e orientar-se de tal modo que removam o grupo hidrofóbico do meio aquoso, alcançando assim um estado de energia livre mínima (FLORENCE, ATTWOOD, 2003; FAIRHURST et al., 1998). Uma vez que as forças de atração intermoleculares entre as moléculas de água e grupos apolares são menores que aquelas existentes entre duas moléculas de água, a força de contração da superfície é reduzida, e conseqüentemente, tem-se a diminuição da tensão superficial. Com o aumento da concentração, a camada superficial fica saturada com moléculas de tensoativos, cuja parte hidrofóbica vai passar a se proteger contra o ambiente aquoso com a formação de micelas no corpo da solução. Essa concentração em que ocorre a micelização é chamada de concentração micelar crítica (CMC) (FLORENCE, ATTWOOD, 2003).

As micelas são agregados esféricos que exibem um intercâmbio rápido e contínuo de monômeros com o meio externo, o que resulta num agregado desordenado e de alta mobilidade. Há um contínuo movimento de moléculas que se movem para dentro e para fora da interface, levando também a um rápido coeficiente de difusão (FAIRHURST et al., 1998).

O aumento da concentração do tensoativo pode causar maior orientação e empacotamento das micelas, resultando nas estruturas líquido-cristalinas. Os

cristais líquidos são caracterizados pela parcial ordem e desordem, por isso são também denominados como mesofases (HYDE; HOLMBERG, 2001). As mesofases hexagonais, lamelares e cúbicas são estados líquido-cristalinos referidos como cristais líquidos liotrópicos (FLORENCE, ATTWOOD, 2003). As estruturas destes estados estão ilustradas diagramaticamente na Figura 3.

A fase hexagonal pode ser formada a partir de micelas em que o aumento da concentração do tensoativo promove a transição da estrutura esférica típica para uma micela mais alongada ou do tipo bastão. Um aumento maior na concentração pode causar a orientação e o empacotamento rígido destes bastões em formações hexagonais (FLORENCE, ATTWOOD, 2003).

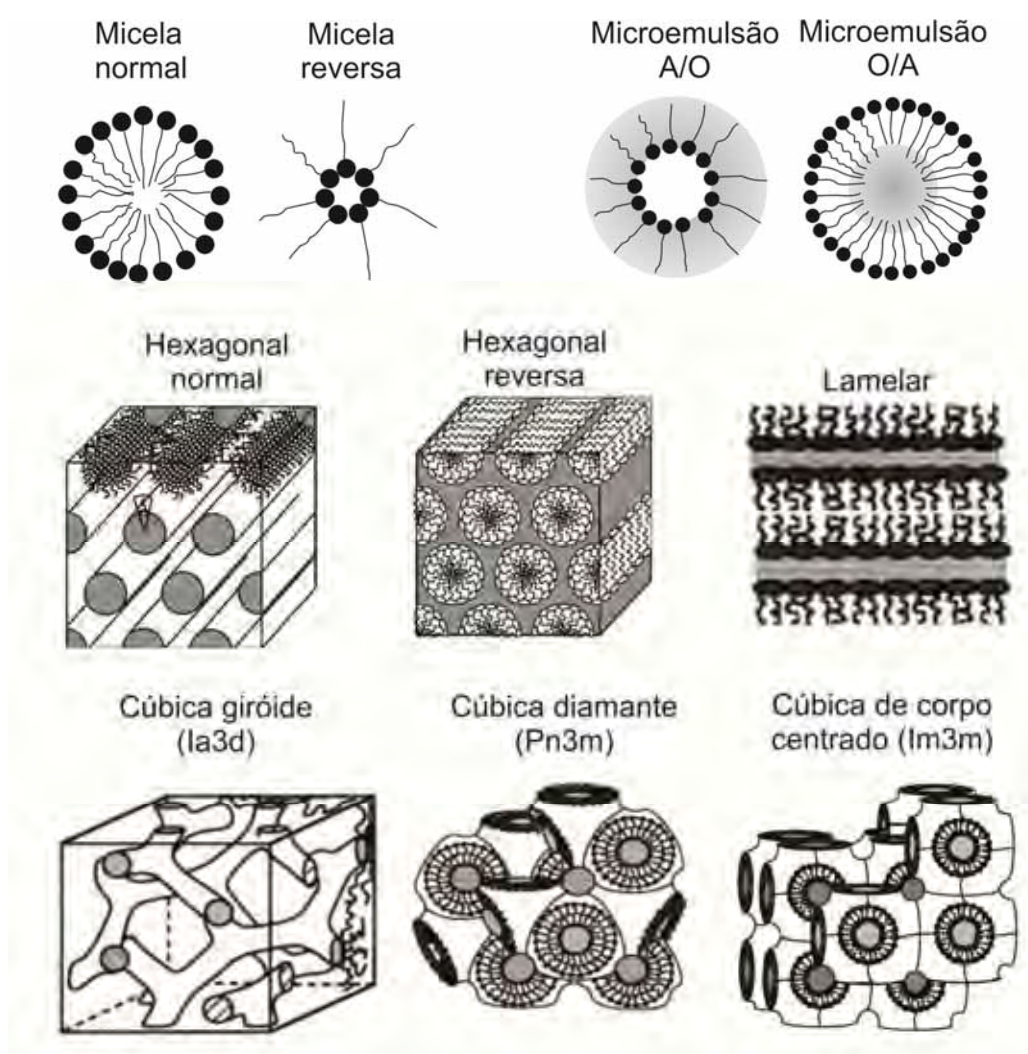
Com alguns tensoativos, adicionais aumentos da concentração podem resultar na separação de uma segunda fase de transição, que tem estrutura lamelar. Na fase lamelar, os tensoativos são arranjados em bicamadas que se estendem em longas distâncias e intercalados por camadas de água. Ela não flui com a gravidade, mas possui baixa viscosidade (FLORENCE, ATTWOOD, 2003).

As fases cúbicas consistem em micelas normais ou reversas justamente empacotadas em simetria cúbica ou bicontínua. Dependendo do tipo da fase cúbica formada, a curvatura do filme tensoativo varia consideravelmente (MALMSTEN, 2002). A fase cúbica é uma estrutura complexa, cuja interface cadeia carbônica/água pode ter curvaturas positivas e negativas (FLORENCE, ATTWOOD, 2003). Alguns exemplos de simetrias que as fases cúbicas podem formar estão ilustrados na Figura 3.

As fases hexagonais e lamelares são anisotrópicas, isto é, suas propriedades físicas variam com a direção. Por isso, quando colocadas entre polarizadores cruzados, promovem a rotação da luz polarizada e isto fornece um meio útil de detecção do estado líquido-cristalino. Um sistema de fase hexagonal, por exemplo, só fluirá paralelamente ao eixo longo dos cilindros; é rígido nas outras duas direções. O plano de luz polarizada é girado quando se desloca ao longo de qualquer eixo, com exceção do eixo longo da fase hexagonal (FLORENCE, ATTWOOD, 2003). Sua textura óptica se distingue pela observação de uma textura fibrosa ou em forma de leques (FAIRHURST et al., 1998). Por outro lado, a fase lamelar é mais fluída e comporta-se como um sólido somente na direção perpendicular àquela das camadas. O plano de

luz polarizada é girado quando se desloca na direção perpendicular às camadas na fase ordenada (FLORENCE, ATTWOOD, 2003). É prontamente identificada por sua textura óptica, caracterizada por listras oleosas tipo mosaico ou cruces de Malta. A fase cúbica é altamente viscosa e isotrópica, diferente dos outros cristais líquidos que são anisotrópicos e desviam a luz polarizada (FAIRHURST et al., 1998).

Figura 3 – Algumas estruturas típicas estabilizadas por tensoativos. Adaptado de Cherezov et al (2002).



Microemulsões são estruturas distintas quando comparadas com sistemas micelares e cristais líquidos. Elas são formadas por água, óleo e

tensoativo(s) e são caracterizadas por serem sistemas líquidos termodinamicamente estáveis, isotrópicos, transparentes e homogêneos macroscopicamente, sendo que em nível microscópico, os componentes hidrofílicos e hidrofóbicos são segregados em domínios separados um do outro pelo filme de tensoativo (GELBART; BEN-SHAUL; ROUX, 1994; MALMSTEN, 2002). Nas suas formas mais simples, as microemulsões são pequenas gotículas (5-140 nm de diâmetro) de um líquido disperso em outro pela presença de uma concentração alta de tensoativo que pode estar associado a um cotensoativo. As microemulsões podem ser dispersões de gotículas de óleo em água ou de água em óleo, cujas estruturas estão representadas na Figura 3.

As microemulsões se distinguem das emulsões pela estabilidade termodinâmica. As microemulsões não requerem trabalho para sua formação e são obtidas espontaneamente. Emulsões, por outro lado, requerem trabalho para sua formação e são instáveis (KUMAR, MITTAL, 1999). O requisito essencial para a formação e estabilidade de microemulsões é a existência de uma tensão interfacial muito baixa. Para tensoativos iônicos, a capacidade de diminuir a tensão interfacial muitas vezes não é suficiente para a formação de microemulsões, e um cotensoativo deve ser adicionado para atingir um empacotamento mais denso na interface e, assim, atingir uma tensão interfacial suficientemente baixa para ocorrer a formação da microemulsão. Para muitos tensoativos não iônicos, por outro lado, devido à ausência de repulsões eletrostáticas, o empacotamento e a autoassociação destes tensoativos na interface leva a uma tensão interfacial suficientemente baixa, e microemulsões podem ser formadas na ausência de cotensoativos (MALMSTEN, 2002).

A determinação da estrutura das microemulsões não é fácil, são necessárias várias técnicas com as quais é possível deduzir uma tendência estrutural e ser comparada com a teoria (GELBART; BEN-SHAUL; ROUX, 1994). A determinação qualitativa de microemulsões água em óleo ou óleo em água pode ser feita com medidas de condutividade. Técnicas de espalhamento como espalhamento de luz, espalhamento de raios-X e espalhamento de nêutrons podem ser utilizadas para determinar o tamanho das gotículas. Técnicas baseadas no transporte de massas como ressonância magnética nuclear (RMN) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) são interessantes

para investigar a estrutura das microemulsões (GARTI et al., 2000; MALMSTEN, 2002).

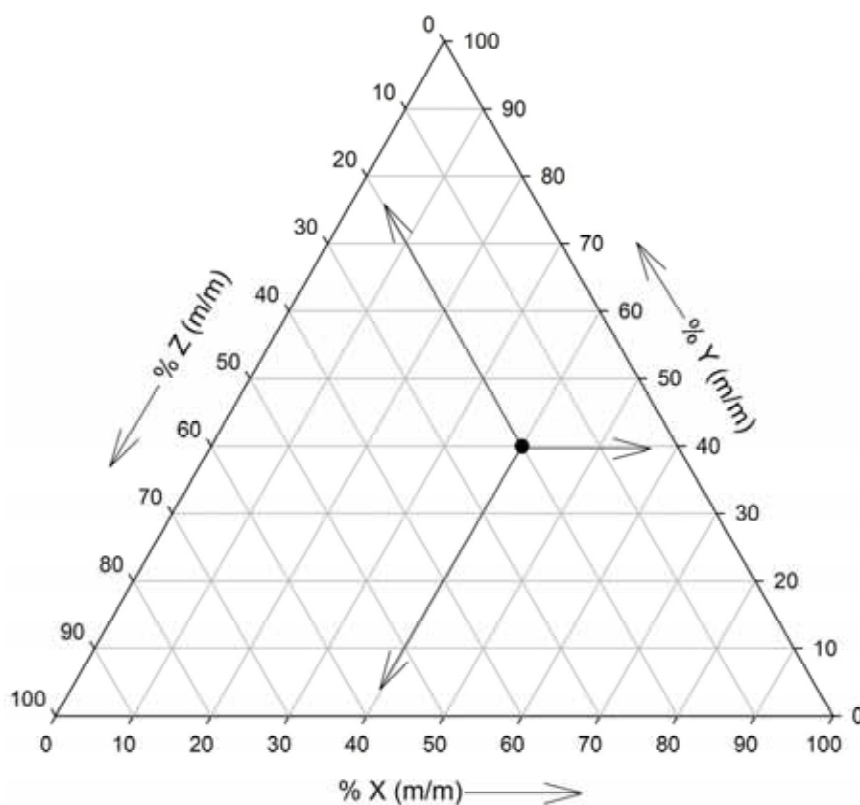
O comportamento de fases de estruturas formadas por tensoativos em geral é normalmente descrito pela construção de diagramas de fases. Quando o tensoativo é misturado apenas com água, por conter dois componentes, o diagrama de fases é descrito como binário e indica as diferentes fases formadas em função da composição. Dependendo do objetivo do estudo, estes diagramas podem ser representados em função da temperatura. Ela é representada no eixo das ordenadas enquanto a composição fracional é representada no eixo das abscissas, no qual em um final está representado o tensoativo puro na ausência do solvente, e no outro o solvente puro na ausência do tensoativo (MALMSTEN, 2002).

Geralmente, porém, os sistemas contendo tensoativos não são compostos apenas pelo tensoativo e a água, mas também por uma fase oleosa. Nestes sistemas, o diagrama de fases resultante é referido como ternário. A Figura 4 mostra uma ilustração esquemática de um diagrama de fases ternário. A combinação de um tensoativo, óleo e solvente resulta num diagrama de fases ternário único e característico apenas desta composição. Além disso, cada ponto no diagrama resultante corresponde a uma diferente composição, que é obtida pela extrapolação para os eixos do triângulo, conforme a Figura 4 (MALMSTEN, 2002).

2.7. Sistemas compostos por tensoativos como plataforma tecnológica para o desenvolvimento de formulações mucoadesivas

Os tensoativos têm desempenhado um papel muito importante no desenvolvimento de novos sistemas de liberação. É possível encontrar na literatura uma ampla gama de sistemas, como sistemas micelares, emulsões, lipossomas, microemulsões e cristais líquidos (KUMAR; MITTAL, 1999). Neste item, será dada ênfase aos sistemas termodinamicamente estáveis como as microemulsões e os cristais líquidos.

Figura 4 - Ilustração esquemática de um diagrama de fases ternário. A composição do ponto indicado corresponde a 40 % de X (m/m), 40 % de Y (m/m) e 20 % de Z (m/m).



Sistemas de liberação compostos por tensoativos em geral oferecem um grande número de vantagens para liberação de fármacos. Primeiro, eles permitem a solubilização de fármacos hidrofílicos e lipofílicos, e as estruturas são formadas pela simples autoassociação dos componentes, o que confere o fácil preparo das formulações (MALMSTEN, 2002; LAWRENCE, REES, 2000). A mistura de componentes de diferentes polaridades, com diferentes constantes dielétricas, como óleo e água, na presença do tensoativo, agregam-se de tal forma a possibilitar diferentes regiões adicionais de solubilização (OLIVEIRA et al., 2004). Isso pode aumentar a solubilidade dos fármacos, diminuir sua degradação e controlar ou prolongar sua taxa de liberação. Sistemas baseados em tensoativos possibilitam a compartimentalização do fármaco, podendo direcioná-lo para os sítios onde deverá exercer o efeito

farmacológico, além de poder controlar a velocidade de liberação, sem alterar a estrutura química da molécula transportada, sendo considerados, portanto sistemas reservatórios (OLIVEIRA et al., 2004). Os tensoativos também podem ter a capacidade de alterar a permeabilidade das células epiteliais modificando a bicamada fosfolipídica, promovendo assim um aumento na permeação de fármacos através dos epitélios (ILLUM, 2003).

As microemulsões possuem excelente estabilidade em longo prazo, são fáceis de serem filtradas em caso de esterilização e, por serem líquidas, permitem sua aplicação por injeção. A taxa de liberação do fármaco incorporado pode ser regulada através da escolha de componentes que resultem numa partição água/óleo mais adequada. Assim, dependendo dos componentes, a liberação de fármacos pode ser controlada (KUMAR; MITTAL, 1999).

As microemulsões são amplamente exploradas como veículos para administração de fármacos destinados a várias vias de administração. Considerando sua capacidade de solubilização, elas podem alterar a estrutura lipídica do estrato córneo, promovendo o transporte do fármaco pela via transdérmica (KUMAR; MITTAL, 1999). As microemulsões podem aumentar a biodisponibilidade oral de fármacos, pois além de promover sua permeabilidade através da mucosa gastrointestinal, com o consequente aumento da absorção, o tamanho reduzido das gotículas pode promover um incremento na solubilização do fármaco e sua proteção, por exemplo, contra ação de enzimas do trato gastrointestinal. A transparência e sua tensão interfacial extremamente baixa oferecem excelentes propriedades de molhabilidade e espalhamento, características que tornam as microemulsões excelentes veículos para administração ocular (FANUN, 2009).

O comportamento de fases de alguns tensoativos que leva à formação de cristais líquidos é extremamente atrativo para a ciência de materiais que foca a nanotecnologia, pois seus arranjos são organizados em escala nanométrica. Os cristais líquidos podem ser explorados na formação de sólidos com nanoporos e podem ser utilizados como moldes na formação de nanopartículas metálicas ou poliméricas. Existem também sistemas denominados hexossomos ou cubossomos, que são formados por meio da sonicação de uma fase hexagonal ou cúbica, que além de possuírem alto poder

de solubilização de moléculas tanto hidrofílicas como hidrofóbicas, promovem a proteção e também o controle da liberação do fármaco, já que estas estruturas são constituídas de uma mesofase com organização mais complexa. Os cristais líquidos possuem alta estabilidade e sua produção permite o escalonamento. Os cristais líquidos podem controlar a viscosidade e textura do sistema, sendo ótimos veículos para aplicação tópica. Sua nanoestrutura favorece a imobilização ou localização da forma farmacêutica em determinados locais de administração, além de poder controlar a liberação do fármaco (LAGERWALL; SCALIA, 2012).

A alta viscosidade dos cristais líquidos, em alguns casos, pode dificultar sua aplicação por meio de algumas vias, pois é difícil a administração de formulações muito rígidas. Por isso, as transições de fases *in situ* de sistemas líquidos para uma mesofase de maior viscosidade são de extrema importância para ampliar o uso dos cristais líquidos como sistemas de liberação (MALMSTEN, 2002).

Há vários parâmetros que podem ser explorados para a transição de fases *in situ* ocorrer. Alguns sistemas compostos por tensoativos aumentam sua organização em temperatura corpórea. Os exemplos mais comuns são os sistemas compostos por monoleína/água ou por poloxamers. Outra maneira de induzir a formação de cristais líquidos *in situ* é pela simples diluição da formulação com o excesso de água presente nos fluidos fisiológicos. Esta estratégia pode permitir a formação de cristais líquidos em várias vias de administração. Sistemas que contêm baixas concentrações de água podem formar micelas reversas e com a diluição em água, esta fase ser transformada numa estrutura líquido-cristalina (MALMSTEN, 2002).

A formação da matriz líquido cristalina *in situ* pode ser explorada para formulações parenterais de depósito (*depot*), por exemplo, para aplicação de formulações intramusculares (MALMSTEN, 2002). Da mesma maneira, permite a aplicação local de anestésicos na cavidade oral ou de antibióticos no tratamento de doenças periodontais (BRUSCHI et al., 2007). Como a alta viscosidade dos cristais líquidos pode promover a fixação da formulação num local de ação desejado após sua administração e formação *in situ*, estas propriedades podem ser uma excelente estratégia para o desenvolvimento de sistemas mucoadesivos.

O mecanismo de mucoadesão envolvido nos sistemas líquido-cristalinos é o mesmo utilizado por hidrogéis estímulo-sensitivo, cujo aumento da viscosidade é dado após um estímulo fisiológico, que pode ser a temperatura, pH ou força iônica (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2008; HE, KIM, LEE, 2008). A formação de uma matriz líquido-cristalina *in situ*, seja estimulada pela temperatura corpórea ou pelo contato com fluidos fisiológicos, faz aumentar a organização e a viscosidade do sistema, e esse aumento na viscosidade pode promover a fixação da formulação em contato com a mucosa. Logo, sistemas baseados em tensoativos também podem atuar como sistemas estímulo-sensitivos para promoverem a mucoadesão.

Nosso grupo de pesquisa tem estudado sistemas compostos pelo tensoativo PPG-5-CETETH-20 para a administração cutânea, oral e nasal de fármacos. Um estudo recentemente publicado mostra como a combinação de PPG-5-CETETH-20 com diferentes fases oleosas, como ácido oleico ou óleo mineral, provoca mudanças significativas na organização estrutural dos sistemas. O ácido oleico permite a formação de sistemas líquidos e isotrópicos, além de fases lamelares e hexagonais, enquanto o óleo mineral diminui a formação de sistemas com fluxo livre e favorece a formação de fases cúbicas extremamente rígidas. Estas diferentes estruturas mostraram ter características reológicas e mecânicas completamente distintas, o que oferece mais opções na aplicação deste tensoativo no desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos (CARVALHO et al., 2012).

Um estudo visando desenvolver um sistema de liberação para administração oral de fluconazol para tratamento de esporotricose mostrou que sistemas compostos por PPG-5-CETETH-20, ácido oleico e água aumentaram seis vezes a solubilidade do fluconazol em relação à solução aquosa. O ensaio de absorção utilizando saco intestinal invertido demonstrou que estas formulações aumentaram 5 vezes o transporte do fluconazol pela membrana intestinal em comparação com a solução aquosa (KLEIN, 2007).

Foi testada a administração cutânea de acetato de dexametasona incorporado num sistema de fase hexagonal contendo PPG-5-CETETH-20, miristato de isopropila e água. Estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* utilizando pele de orelha de porco demonstraram que a fase hexagonal promoveu a permeação e retenção com efeito reservatório do fármaco na pele,

maior que um creme convencional (URBAN, 2004). Em outro estudo visando à administração cutânea de fluconazol foi desenvolvido e caracterizado microemulsões e cristais líquidos compostos por PPG-5-CETETH-20, óleo de copaíba e água. A avaliação histológica de pele de ratos submetidos a um ensaio de toxicidade dérmica mostrou que os sistemas não apresentaram sinais de irritação. A atividade antifúngica do fluconazol contra *Candida albicans* foi aumentada quando incorporado nestas formulações. Além disso, ensaios de permeação cutânea mostraram que os sistemas analisados promoveram a retenção do fármaco nas camadas da pele, o que pode aumentar a eficácia do tratamento de dermatomicoses (ROCHA, 2011).

Nosso grupo de pesquisa tem mostrado avanços no desenvolvimento de sistemas compostos por PPG-5-CETETH-20, ácido oleico e água para a administração nasal do AZT. Sistemas líquidos e isotrópicos contendo estes componentes aumentaram a solubilidade do AZT em relação à solução aquosa, o que é extremamente importante para via nasal, em que um pequeno volume de formulação deve ser administrado e conter a dose (CARVALHO et al., 2009). Estes mesmos sistemas mostraram se transformar em cristais líquidos em contato com muco nasal simulado na temperatura nasal, o que pode ser uma excelente estratégia na sua aplicação para promover a mucoadesão (CARVALHO et al., 2010a).

Tendo em vista as vantagens que os tensoativos podem oferecer no desenvolvimento de sistemas de liberação mucoadesivos e os resultados promissores obtidos por nosso grupo de pesquisa em relação ao tensoativo PPG-5-CETETH-20, este trabalho tem como objetivo explorar estas plataformas tecnológicas para o desenvolvimento de um sistema de liberação nanoestruturado mucoadesivo para a administração nasal do AZT.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar a farmacocinética de sistemas mucoadesivos de liberação precursores de cristais líquidos para promover a absorção nasal do AZT. A estratégia utilizada foi explorar o comportamento de fases liotrópico do tensoativo PPG-5-CETETH-20, que permite a formação de mesofases em contato com fluídos fisiológicos. A formação da matriz líquido-cristalina na cavidade nasal pode favorecer o contato da formulação com a mucosa, promovendo a permeação e absorção intranasal do AZT. A investigação desta nova plataforma tecnológica pode contribuir assim para a criação de alternativas ao tratamento da AIDS.

3.1. Etapas

- ✓ Investigar o comportamento de fases da combinação do tensoativo PPG-5-CETETH-20 com água, fosfatidilcolina e ácido oleico.
- ✓ Testar a incorporação de polímeros mucoadesivos nos sistemas selecionados.
- ✓ Determinar a solubilidade do AZT nos sistemas selecionados.
- ✓ Avaliar o comportamento de fases dos sistemas escolhidos simulando a via de administração nasal.
- ✓ Identificar as composições mais adequadas ao desenvolvimento de sistemas precursores de cristais líquidos.
- ✓ Caracterizar físico-quimicamente os sistemas precursores de cristais líquidos.
- ✓ Investigar a mucoadesão por técnicas reológicas, mecânicas e de medida da força mucoadesiva.
- ✓ Avaliar a liberação e permeação dos sistemas escolhidos através de mucosa nasal.
- ✓ Avaliar a farmacocinética dos sistemas através de estudos pré-clínicos em ratos.
- ✓ Obter os parâmetros farmacocinéticos e a biodisponibilidade do novo sistema de liberação desenvolvido.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Fármacos e medicamentos

- Efavirenz, FAFEPE, Dois Irmãos, Brasil, lote 16325;
- Sulfato de indinavir, FAFEPE, Dois Irmãos, Brasil, lote 16404;
- Ketamina Agener 10 % injetável 10 mL, uso veterinário, União Química, Embu Guaçu, Brasil, lote 1004906;
- Lamivudina padrão secundário, lote 404638/1 Hangzhou Coben Pharmaceutical, Zhejiang, China, pureza 99,80 % \pm 0,64;
- Xilazin 2 % injetável 10 mL, uso veterinário, Hortolândia, Brasil, lote 005/10;
- Zidovir 10 mg/mL, solução injetável 20 mL, Cristália, Itapira, lote 10064285;
- Zidovudina 1 % xarope, LAFEPE, Dois Irmãos, Brasil, lote 10010152;
- Zidovudina padrão secundário, lote CZVC0860002, AB Farmo Química, Anápolis, Brasil, teor 101,6 %;

4.1.2. Adjuvantes, solventes e reagentes.

- 3-isobutil-1metil-xantina (Sigma, Steinheim, Alemanha);
- Acetonitrila, grau HPLC, J.T. Baker, (Cidade do México, México);
- Ácido fórmico, solução 95 %, (Sigma, Steinheim, Alemanha);
- Ácido oleico, Synth, Brasil;
- Ácido tricloroacético, solução 6,1N (Sigma, Steinheim, Alemanha);
- Água deionizada Milli Q;
- Álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP, Procetyl AWS, Croda;
- Carbômero homopolímero tipo A (C971), carbômero homopolímero tipo B (C974), policarbofil (Lubrizol, Cleveland, EUA);
- Fosfatidilcolina de soja 100 %, Lipoid GMBH (Alemanha);
- Metanol, Synth, Brasil;
- Mucina tipo II crua de estômago suíno (Sigma, Steinheim, Alemanha);

- Quitosana de baixo peso molecular, 75-85% desacetilada (Sigma, Steinheim, Alemanha);
- Trietanolamina, solução 98 % (Sigma, Steinheim, Alemanha).

4.1.3. Equipamentos

- Analisador de textura TA-XTplus, Stable Micro System®, Surrey, Inglaterra, Departamento de Fármacos e Medicamentos FCFAR/UNESP;
- Aquecedor e agitador magnético Fisatom 752A, São Paulo, Brasil;
- Balança digital Ohaus AS200, Flocham Park, EUA; Departamento de Fármacos e Medicamentos FCFAR/UNESP;
- Bomba a vácuo, Edwards, Clevedon, Reino Unido, Departamento de Fármacos e Medicamentos FCFAR/UNESP;
- Célula de difusão vertical Microette Plus (Hanson Research, Chatsworth, EUA), Departamento de Fármacos e Medicamentos da FCFAR/UNESP;
- Centrifuga Eppendorf, New York, EUA, Departamento de Ciências Biológicas FCFAR/UNESP;
- Centrífuga Sorval, modelo TC 6 Du Pont; Newtown, EUA, Departamento de Fármacos e Medicamentos FCFAR/UNESP;
- Espectrofotômetro de UV-VIS, Hewlett Packard 8453, com HP UV-Visible ChemStation Software, Departamento de Fármacos e Medicamentos FCFAR/UNESP;
- Homogeneizador de tubos, modelo AP22, Phoenix; Departamento de Fármacos e Medicamentos FCFAR/UNESP;
- Lavadora Ultrassônica Unique, Indaiatuba, Brasil, Departamento de Fármacos e Medicamentos FCFAR/UNESP;
- Microscópio de luz polarizada Axioskop 40, Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha, Departamento de Fármacos e Medicamentos FCFAR/UNESP;
- Peagômetro Digimed DM23, São Paulo, Brasil Departamento de Fármacos e Medicamentos FCFAR/UNESP;

- Reômetro Haake Rheo Stress 1 (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Alemanha); Departamento de Fármacos e Medicamentos FCFAr/UNESP;
- Sistema CLAE Varian, composto por módulo de distribuição de solvente ProStar/Dynamax 210/215, detector UV ProStar 330 UV-VIS PDA e Rheodine VS 7125, Coluna de fase reversa C18 Luna 250 mm x 4.6mm I.D. 5um (Phenomenex, Torrance, EUA) e pré-coluna RP18 3 cm x 4 cm I.D. (Security Guard, Phenomenex, Torrance, EUA); Departamento de Fármacos e Medicamentos FCFAr/UNESP;
- Sistema de purificação de água Millipore, Milli-Q Plus, Departamento de Fármacos e Medicamentos FCFAr/UNESP;
- Ultraturrax Turratec TE-102, Tecnal, Piracicaba, Brasil, Departamento de Fármacos e Medicamentos FCFAr/UNESP.

4.2. Métodos

4.2.1. Comportamento de fases dos tensoativos fosfatidilcolina e PPG-5-CETETH-20 em água

O comportamento de fases liotrópico dos tensoativos fosfatidilcolina e PPG-5-CETETH-20 foi verificado pela mistura destes componentes com concentrações crescentes de água. Cada tensoativo foi misturado com água nas proporções 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. As fases formadas foram identificadas por microscopia de luz polarizada (MLP).

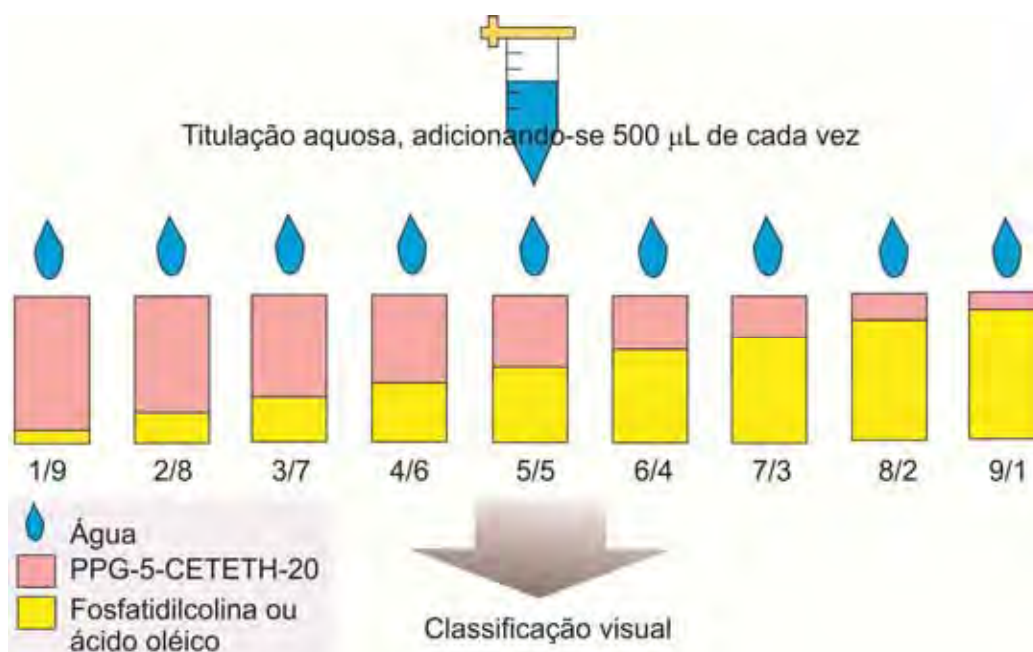
4.2.2. Construção dos diagramas de fases ternários dos sistemas contendo PPG-5-CETETH-20/ fosfatidilcolina/ água e PPG-5-CETETH-20/ ácido oleico/ água.

Os diagramas de fases ternários foram obtidos pela titulação aquosa das misturas contendo o tensoativo PPG-5-CETETH-20 combinado com fosfatidilcolina ou com ácido oleico nas proporções 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. Um volume de 500 μ L de água purificada foi adicionada paulatinamente com uma micropipeta. Após cada adição, os sistemas foram

homogeneizados com auxílio de um bastão de vidro e mantidos em repouso por 24 h. Em caso de formação de bolhas, este tempo foi prolongado até a eliminação das mesmas ser observado. Na Figura 5 encontra-se um esquema explicativo da construção do diagrama de fases pelo método da titulação aquosa.

As mudanças de fases foram identificadas visualmente e classificadas como sistemas líquidos isotrópicos (SLI), sistemas de alta viscosidade transparentes (SAVT), sistemas opacos e separação de fases. Ao identificar a mudança de fase, o percentual (p/p) de cada componente foi calculado e os respectivos sistemas preparados novamente para serem analisados por MLP. Os cálculos também foram utilizados para a construção do diagrama de fases ternário, utilizado o software Sigma Plot 10.

Figura 5 - Esquema ilustrando a construção do diagrama ternário de fases pelo método da titulação aquosa.



4.2.3. Caracterização dos sistemas por microscopia de luz polarizada (MLP)

A caracterização por MLP foi realizada utilizando um microscópio de luz polarizada Axioskop 40. As amostras foram preparadas colocando uma pequena quantidade do sistema em estudo sobre uma lâmina e coberta com lamínula. As imagens foram obtidas num aumento de 20.000 ×.

Com esta técnica é possível classificar os sistemas quanto à isotropia e anisotropia. Sobre um plano de luz polarizada, a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano da luz incidente e isotrópica se não desviar a luz. Cristais líquidos liotrópicos lamelares e hexagonais são anisotrópicos e sua organização estrutural resulta em campos de visualização característicos, como as cruzes de Malta no caso da fase lamelar ou estrias no caso da fase hexagonal. Já a fase cúbica, ou mesmo sistemas micelares, microemulsões e emulsões são isotrópicos e apenas um campo escuro é observado (GOODBY et al., 1998).

4.2.4. Seleção dos sistemas para caracterização físico-química

Os sistemas foram escolhidos com base no seu comportamento de fases liotrópico. Foram selecionados sistemas de baixa viscosidade e que aumentam sua rigidez através da diluição aquosa. A formulação precursora de cristal líquido composta por PPG-5-CETETH-20/ fosfatidilcolina/ água foi nomeada como F1 e a formulação composta por PPG-5-CETETH-20/ ácido oleico/ água como F2.

Para avaliar se os sistemas mudam de fases em contato com o muco e assim atuarem como precursores de cristal líquido, eles foram misturados com fluido nasal simulado (FNS) na proporção 1:1 (p/p), mantidos a 32 °C para simular a temperatura nasal e observadas por MLP para investigar a mudança de fase ocorrida. As amostras diluídas com FNS foram nomeadas como F1d e F2d.

A composição do FNS foi 8 % (p/V) de mucina, 7,45 mg/mL de NaCl, 1,29 mg/mL KCl e 0,32 mg/mL de CaCl₂.2H₂O, pH ajustado para 6,0 (CALLENS et al., 2003).

4.2.5. Incorporação de polímeros mucoadesivos nos sistemas selecionados

Os sistemas selecionados foram avaliados quanto à capacidade de incorporação de polímeros mucoadesivos, em busca de um aumento das propriedades mucoadesivas dos sistemas. Foram testados polímeros derivados do ácido poliacrílico (APA), como carbômero homopolímero tipo A (C971), carbômero homopolímero tipo B (C974), policarbofil (PF) e a quitosana (QS) de baixo peso molecular, 75-85% desacetilada.

Antes da incorporação nos sistemas, estes polímeros foram preparados na forma de dispersão em três concentrações diferentes (0,1 %, 0,5 % e 1,0 % p/V). Os polímeros derivados do APA foram dispersos em água por agitação magnética e o pH ajustado para 6 com trietanolamina. A quitosana foi dispersa em solução de ácido acético glacial 0,75 % V/V. Todas as dispersões foram mantidas em agitação magnética até a completa homogeneização.

A incorporação dos polímeros mucoadesivos foi realizada pela substituição do percentual de água presente nos sistemas pela dispersão dos polímeros. Os sistemas foram homogeneizados em agitador de tubos durante 48 h em temperatura controlada de 25 °C. Foram então centrifugados a 3500 RPM, 5 min (Sorval TC 6) para observação da estabilidade dos mesmos e para caracterização físico-química.

4.2.6. Determinação da solubilidade do AZT nos sistemas selecionados

4.2.6.1. Validação do método analítico para quantificar o AZT incorporado nos sistemas

Para quantificação do AZT nos sistemas, foi validado um método analítico utilizando espectrofotômetro UV HP 8453 a 266 nm.

Foram obtidas curvas analíticas em metanol, etanol e água, de acordo com a melhor seletividade do AZT em presença de cada componente da formulação.

A construção de cada curva analítica foi realizada a partir de diluições de uma solução estoque de AZT a 1 mg/mL no solvente específico.

A linearidade foi obtida com o cálculo da regressão linear da curva analítica, obtendo-se a inclinação, y-intercepto e coeficiente de determinação (r^2). Os critérios de aceitação foram os determinados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003b).

A especificidade e seletividade expressa à capacidade do método em mensurar o AZT na presença dos componentes das formulações. Este parâmetro foi verificado pela comparação de espectros de absorção de soluções de trabalho de AZT nos solventes específicos com espectros das mesmas soluções de trabalho contaminadas com os componentes das formulações.

Para a análise da precisão e exatidão, foram escolhidos três pontos dentro da faixa de concentração das curvas analíticas, os quais foram preparados em triplicata no mesmo dia e também em dias diferentes, para analisar a precisão e exatidão intra e interdia. A exatidão foi calculada pela razão percentual entre a concentração experimental obtida pelas soluções de trabalho e a concentração teórica.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados a partir de três curvas analíticas obtidas para cada solvente, utilizando as Equações 1 e 2, em que o $DP_{y-intercepto}$ é o desvio padrão do y-intercepto e IC é a inclinação da curva analítica.

$$LD = \frac{DP_{y-intercepto} \times 3}{IC} \quad \text{Equação(1)}$$

$$LQ = \frac{DP_{y-intercepto} \times 10}{IC} \quad \text{Equação(2)}$$

4.2.6.2. Incorporação do AZT nos sistemas

Para os SLIs, a incorporação do AZT foi realizada adicionando em cada 3 mL de amostra uma massa de 3 g de fármaco. Elas foram submetidas à agitação constante em homogeneizador de tubos durante 48 h em temperatura controlada de 25 °C.

Para os sistemas SAVT, a agitação foi realizada manualmente com um bastão de vidro durante 5 min. As amostras foram então mantidas em repouso durante cinco dias. Durante este período, o mesmo procedimento de agitação foi repetido diariamente.

Finalizada a homogeneização tanto dos SLIs como dos SAVTs, ambos foram centrifugados (Sorval TC 6) a 3800 RPM por 10 min. O sobrenadante foi adequadamente diluído no solvente determinado na validação do método analítico, para a leitura das amostras.

4.2.7. Caracterização reológica por ensaios de fluxo contínuo e ensaios oscilatórios de varredura de frequência

Os ensaios reológicos foram realizados utilizando reômetro Haake Rheo Stress 1. A geometria utilizada foi de cone e placa separada por uma distância fixa de 0,2 mm. Cada amostra foi cuidadosamente aplicada à placa inferior do reômetro com uma espátula, assegurando o mínimo cisalhamento e permitindo um tempo de repouso (relaxamento da tensão induzida antes da análise) de 2 minutos antes de cada determinação.

O ensaio de fluxo foi realizado variando a velocidade de cisalhamento de 0,01 a 500 1/s. As medidas de fluxo foram tratadas com a aplicação do modelo da Lei das Potências indicada na Equação (3).

$$\sigma = k \cdot \dot{\gamma}^n \quad \text{Equação (3)}$$

em que k é um parâmetro relacionado à consistência (índice de consistência) e n é o índice de escoamento. Neste modelo, $n > 1$ representa um fluido dilatante, $n < 1$ representa um fluido pseudoplástico e $n = 1$ um fluido Newtoniano (BARNES, 1989). Estes parâmetros foram calculados ajustando o modelo matemático da Equação (3) às curvas de ida dos reogramas de fluxo com o *software* Oringin 7.

No ensaio oscilatório de varredura de frequência as formulações foram estudadas com solicitações oscilatórias para determinar a evolução dos módulos de armazenagem (G') e de perda (G'') em função da frequência (0,01

Hz a 10 Hz) a uma tensão de amplitude oscilatória fixa (1,00 Pa) obtida a partir da região viscoelástica linear.

4.2.8. Caracterização das propriedades mecânicas

4.2.8.1. Avaliação do perfil de textura (TPA) dos sistemas em contato com FNS

A avaliação do perfil de textura foi realizada utilizando um analisador de textura TA-XTplus, com o teste conhecido como TPA (*Texture profile analysis*). Este teste consiste em dois ciclos de compressão da amostra com os quais é possível obter algumas características mecânicas, como dureza, resistência à compressão, coesão e adesão.

Para simular a textura dos sistemas na cavidade nasal, os sistemas foram misturados com FNS na proporção 1:1 (p/p). Estas amostras (8 g) foram colocadas em tubos de centrífuga de fundo cônico de 45 mL e foram centrifugadas a 3500 RPM por 3 min. para eliminação das bolhas de ar e tornar suas superfícies lisas. Os tubos foram mantidos em repouso por 24 h. Após o repouso, eles foram imersos em banho a 32 °C, disposto logo abaixo da prova analítica, para simular a temperatura nasal.

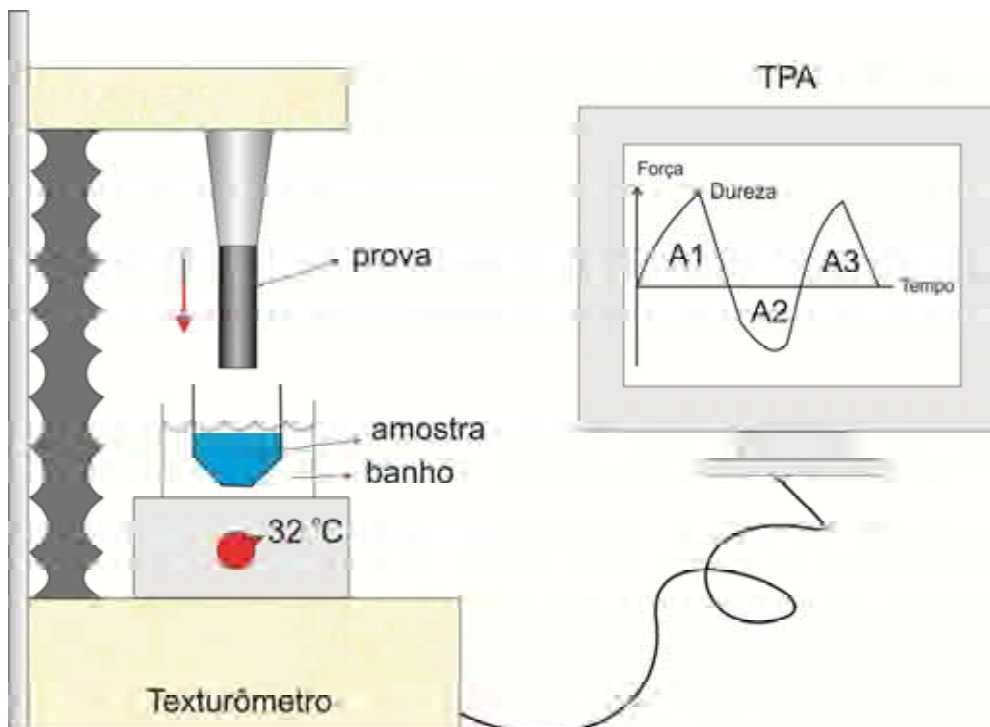
No modo TPA, a prova analítica (10 mm de diâmetro) desceu numa velocidade constante de 1 mm/s, penetrou 10 mm na amostra e voltou até a sua superfície numa velocidade de 0,5 mm/s. Após este primeiro ciclo, a prova permaneceu em repouso por 5 s, quanto então iniciou a segunda compressão. Durante os dois ciclos de compressão, o software *Texture Exponent Lite* do equipamento construiu a curva de força *versus* tempo com a qual é possível obter as características mecânicas ilustradas na Figura 6 e definidas a seguir:

- Dureza: é o pico de força máxima obtido durante o primeiro ciclo de compressão (EXPONENT LITE, 2009). É a força máxima requerida para completar uma deformação, ou seja, para a prova penetrar na amostra (JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997).
- Resistência à compressão: é o trabalho total requerido para deformar a amostra durante o primeiro ciclo de compressão da prova analítica,

obtido pela área do primeiro ciclo de compressão (A1 da Figura 6) (EXPONENT LITE, 2009; JONES; WOOLFSOON; BROWN, 1997).

- Adesão: é a primeira área negativa obtida na curva força *versus* tempo (A2 da Figura 6) e representa o trabalho requerido para vencer as forças atrativas entre a prova analítica e a amostra sendo analisada (EXPONENT LITE, 2009).
- Coesão: é a razão entre a área positiva obtida durante a segunda compressão (A3 da Figura 6) e a obtida durante a primeira compressão (A1 da Figura 6). Ela mede a taxa que um material se rompe sob uma ação mecânica (EXPONENT LITE, 2009).

Figura 6 - Representação ilustrativa do texturômetro e as adaptações realizadas para o teste TPA (*Texture Profile Analysis*). A1: resistência à compressão; A2: adesão; A3: segundo ciclo de compressão.



Como não existe um valor padronizado dos parâmetros de textura, os sistemas em estudo foram comparados com amostras de hidrogéis de poliacarbofil (PF), polímero muito conhecido por suas propriedades mucoadesivas e foi, portanto, utilizado neste trabalho como um padrão para comparação. Para sua preparação, o polímero foi previamente tamisado e disperso em água nas concentrações 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 e 5 % (p/V), seguido por agitação a 4000 RPM em ultraturrax durante tempo suficiente para eliminar qualquer presença de agregados. O pH foi ajustado para 6,5 com trietanolamina. Estas dispersões resultaram em hidrogéis transparentes e homogêneos, nomeados de acordo com a concentração do polímero empregada (PF0,5, PF1, PF1,5, PF2, PF3 e PF5).

4.2.8.2. Teste de avaliação da força mucoadesiva

A força mucoadesiva foi avaliada através da medida da força necessária para destacar as amostras mantidas em contato com uma membrana modelo utilizando o analisador de textura TAXT *plus*.

Foram utilizadas duas membranas modelo: mucosas nasais suínas e discos produzidos com a compressão direta de 250 mg de mucina em pó (BRUSCHI et al., 2007; JONES et al., 2000; 2009). Estes discos foram aderidos à prova analítica do equipamento com fita adesiva dupla face.

O isolamento da mucosa suína foi realizado a partir de animais provenientes de abatedouro, segundo a metodologia adaptada de Hägerström e Edsman (2001). As cavidades nasais foram separadas com uma incisão ao longo do septo nasal como indicado na Figura 7. A mucosa foi removida com auxílio de uma pinça e tesoura cirúrgica e mantida em banho de gelo imersa em FNS até o momento da análise. A mucosa nasal suína foi aderida à prova analítica com adesivo instantâneo cianoacrilato e suas bordas foram presas com elástico de borracha. Para o adesivo cianoacrilato não danificar a prova analítica, esta foi protegida com fita adesiva comum antes do seu gotejamento.

Imediatamente antes do teste, as membranas modelo já aderidas à prova analítica foram imersas em FNS mantido a 32 °C e o excesso retirado com papel absorvente macio.

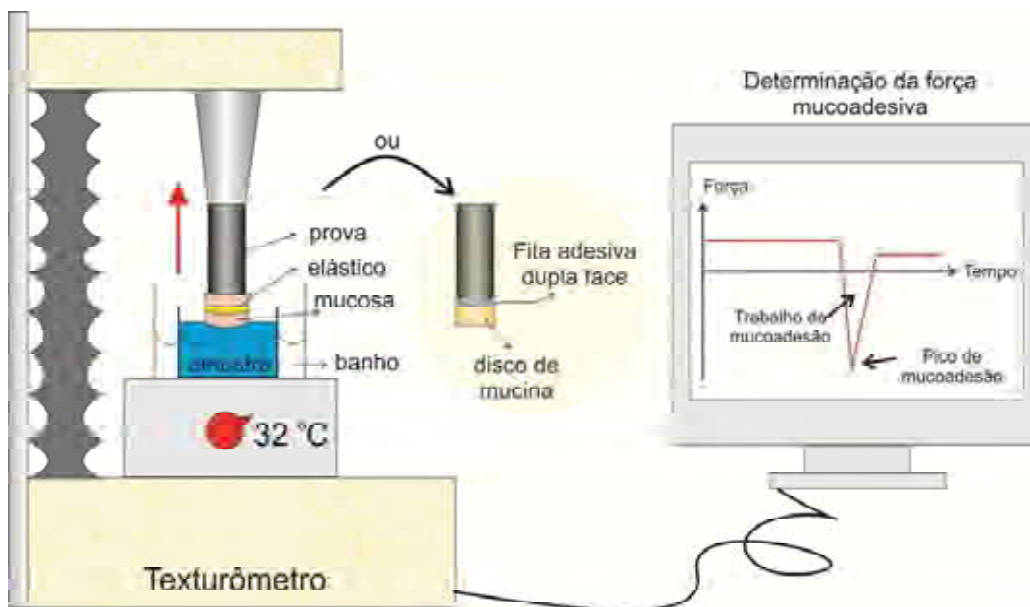
Figura 7 – Fotografia ilustrando a incisão ao longo do septo nasal suíno.



Para realização do teste, os sistemas foram centrifugados (3500 RPM, 1 min.) e dispostos logo abaixo da prova analítica dentro de um banho a 32 °C, como ilustrado no esquema da Figura 8. Para garantir o contato com a amostra, a membrana foi introduzida 1 mm de profundidade a partir da superfície da amostra e mantida por 60 s sem nenhuma força ser aplicada durante a fase de contato. Depois, a prova foi removida a uma velocidade constante de 0,5 mm/s até a total separação das duas superfícies. O software do equipamento *Texture Exponent Lite* registrou a força necessária para a remoção, obtendo-se um gráfico de força *versus* tempo, como ilustrado na Figura 8. Com este gráfico, o software calculou a ASC obtida durante a fase de destaque da amostra e a membrana, sendo reportada como trabalho de mucoadesão (T_{MA}); determinou também o pico de mucoadesão (P_{MA}), que é a força máxima obtida durante a retirada da prova analítica.

Neste teste foram analisados os sistemas selecionados e os mesmos misturados com FNS na proporção 1:1 (p/p), para avaliar o efeito da mudança de fase provocada pelo muco na força mucoadesiva dos sistemas.

Figura 8 - Esquema ilustrativo das adaptações feitas no texturômetro para o teste de obtenção da força mucoadesiva.



4.2.9. Análise estatística

Os resultados obtidos pelas caracterizações físico-químicas foram apresentados pelas médias e desvios-padrão (DP). A comparação entre os resultados foi determinada por análise de variância e teste post-hoc de Tukey. O nível de significância (P valor) adotado foi 0,05.

4.2.10. Avaliação da permeação *ex vivo*

4.2.10.1. Validação de método analítico para quantificar o AZT no ensaio de permeação *ex vivo*

Para quantificação do AZT no meio receptor resultante do ensaio de permeação *ex vivo* foi desenvolvida e validada uma metodologia analítica por

cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo normas estabelecidas pela ANVISA (BRASIL, 2003b).

O sistema de CLAE utilizado foi o Varian, composto por módulo de distribuição de solvente ProStar/Dynamax 210/215, detector espectrofotométrico ProStar 330 UV-VIS PDA (a 265nm) e Rheodine VS 7125, coluna RP C18 Luna 250 mm x 4.6mm I.D. 5 μ m e pré-coluna RP18 3 cm x 4 cm I.D. com injetor automático. A fase móvel utilizada foi uma mistura de metanol e água 60:40 (V/V), fluxo de 0,7 mL/min. no modo isocrático e volume de injeção de 30 μ L.

Foi preparada uma solução estoque de AZT em metanol a 1 mg/mL. As soluções de trabalho para construção da curva analítica foram preparadas pela diluição da solução estoque em tampão fosfato monobásico 20 mM pH 6,8, meio escolhido como solução receptora no teste de permeação.

A curva analítica foi obtida pela análise de sete concentrações diferentes em triplicata dentro da faixa de concentração de 0,1 a 20 μ g/mL.

A linearidade foi calculada pela regressão linear da média de três curvas analítica, obtendo-se a inclinação, y-intercepto e r^2 . Os critérios de aceitação foram apresentar $r^2 \geq 0,99$, inclinação e y-intercepto com desvio padrão relativo (DPR) $\leq 20\%$ (BRASIL, 2003b).

A especificidade e seletividade expressa a capacidade do método em mensurar o AZT no ambiente real de ensaio, especialmente na presença do meio receptor e dos componentes das formulações. Ela foi verificada pela comparação de cromatogramas de soluções de trabalho de AZT com cromatogramas do meio receptor contendo e não contendo o AZT.

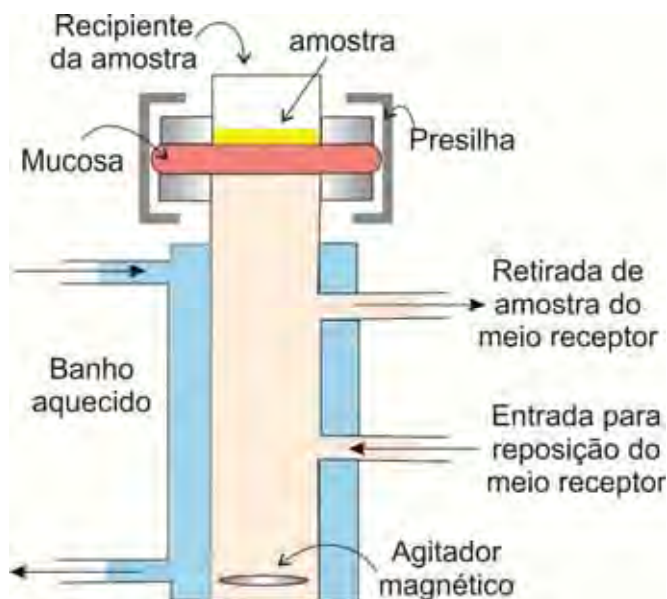
Para a análise da precisão e exatidão, foram escolhidos três pontos representando concentrações baixa (0,5 μ g/mL), média (4 μ g/mL) e alta (10 μ g/mL) dentro da faixa da curva analítica, preparados em triplicata no mesmo dia e também em dias diferentes, para analisar a precisão e exatidão intra e interdia. A precisão foi constatada pelo valor de DPR o qual deve ser menor que 5 %. A exatidão foi calculada pela razão percentual entre a concentração experimental obtida pelas soluções de trabalho e a concentração teórica. Os valores devem estar dentro da faixa de 80 a 120 %.

O LD e o LQ foram determinados a partir de três curvas analíticas, utilizando as Equações 1 e 2.

4.2.10.1.1. Teste de permeação *ex vivo* utilizando célula de difusão tipo Franz

O sistema de célula de difusão vertical utilizado foi o Microette Plus. O compartimento receptor foi preenchido com 7 mL de tampão fosfato monobásico 20 mM pH 6,8 e estabilizado a 32 °C, sob constante agitação a 300 RPM, por 30 min. As mucosas nasais foram colocadas nas câmaras de difusão com o lado apical voltado para a câmara doadora e o lado basolateral voltado para a câmara receptora, resultando num fluxo de permeação do lado apical para o basolateral. A área da membrana disponível para permeação foi de 1,77cm². A Figura 9 mostra um esquema da célula de difusão utilizada.

Figura 9 - Esquema da célula de difusão tipo Franz utilizada neste trabalho.



Os sistemas foram adicionados no compartimento doador num volume de 200 µL, garantindo as condições *sink*. Amostras de 2,8 mL foram retiradas a partir do compartimento receptor em intervalos pré-estabelecidos (10 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h e 12 h). Os volumes de amostras foram repostos com solução receptora fresca. A quantificação do

AZT no meio receptor foi realizada pela metodologia analítica previamente validada.

A membrana modelo utilizada foi uma mucosa nasal suína obtida de animais de abatedouro. Para retirada da mucosa, foi seguido o procedimento descrito por Osth, Grasno e Bjork (2002). Resumidamente, as cavidades nasais foram separadas através de uma incisão ao longo do septo nasal. A mucosa foi removida com auxílio de uma pinça e tesoura cirúrgica curva, mantida em solução de cloreto de sódio 0,9% (p/V) e congelada. No dia do experimento, as mucosas foram descongeladas e mantidas refrigeradas em gelo, mergulhadas em salina.

A formulação selecionada foi comparada com uma solução aquosa do fármaco como controle. A concentração do AZT em ambas as amostras foi de 10 mg/mL.

O perfil de permeação foi analisado de acordo a Equação 4 (THE UNITED STATES..., 2009).

$$Q = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c \quad \text{Equação (4)}$$

em que Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) é a quantidade permeada no tempo t , C_t ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{cm}^2$) é a concentração obtida no referido tempo t , V_r (mL) é o volume do meio receptor, C_c ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{cm}^2$) é a concentração da amostra coletada anteriormente e V_c (mL) é o volume de amostra coletado.

Com os resultados foi construído o gráfico do perfil cumulativo de permeação do AZT *versus* tempo. Alguns modelos matemáticos conhecidos na literatura farmacêutica foram aplicados para discutir os mecanismos de liberação, como os modelos de Korsmeyer-Peppas (KORSEMEYER et al., 1983), Weibull (PAPADOPOULOU et al., 2006) e Higushi (SIEPMANN; PEPPAS, 2011), usando o software Sigma Plot 10.

Parâmetros relacionados à permeação também foram calculados, como o fluxo no estado de equilíbrio (J , $\mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{cm}$) e o coeficiente de permeabilidade aparente (K_p , cm/min), derivados da lei de Fick, de acordo com a Equação 5 (WILLIAMS, 2003).

$$J = \frac{dQ}{dt} = C_v \times K_p \quad \text{Equação (5)}$$

em que dQ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) é a massa cumulativa de fármaco que passa pela membrana por unidade de área no tempo t , C_v é a concentração do fármaco no veículo (compartimento doador) em contato com a membrana. O fluxo J é obtido como o gradiente da porção linear do perfil de permeação. Se a concentração do fármaco no veículo é conhecida, então, o coeficiente de permeabilidade K_p pode ser determinado (WILLIAMS, 2003).

4.2.11. Avaliação pré-clínica dos sistemas precursores de cristais líquidos

4.2.11.1. Desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação do AZT em plasma de rato

4.2.11.1.1. Preparo das soluções estoque e soluções padrão

Na validação do método foi utilizado como padrão interno (PI) a 3-isobutil-1-metil-xantina (RAMACHANDRAN et al., 2006). Foram preparadas soluções estoques de AZT e PI a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em metanol.

A partir da solução estoque de AZT, foram feitas diluições em metanol que foram utilizadas para contaminar o plasma em sete concentrações diferentes (5000, 1000, 750, 500, 250, 100 e 50 ng/mL), incluindo o PI a 5000 ng/mL . O volume total das soluções de trabalho em metanol adicionadas para contaminar o plasma não ultrapassaram 10 % do volume total do mesmo. A homogeneização foi realizada por agitação em vortex durante 30 s.

4.2.11.1.2. Condições cromatográficas

O sistema de CLAE utilizado foi o Varian acoplado com injetor automático, composto por módulo de distribuição de solvente ProStar/Dynamax 210/215, detector espectrofotométrico ProStar 330 UV-VIS PDA (a 265 nm) e Rheodine VS 7125, coluna de fase reversa C18 Luna de 250 mm x 4.6 mm, 5 μm , e pré-coluna de fase reversa C18 de 3 cm x 4 cm. A fase móvel utilizada

foi uma mistura de acetonitrila, metanol e ácido fórmico 0,01 % (V/V) nas proporções 20, 20 e 60 % (V/V), respectivamente, e fluxo de 0,8 mL/min, no modo isocrático. O volume de injeção foi 50 μ L.

4.2.11.1.3. Determinação do método de extração do AZT a partir de plasma de rato para análise por CLAE

Foram testadas diferentes extrações tipo líquido-líquido (ELL) para purificação das amostras de plasma. O primeiro procedimento ELL incluiu uma etapa de concentração do analito. Em 500 μ L de solução padrão de AZT em plasma foi adicionado 60 μ L de metanol contendo o PI a 5000 ng/mL e mais 40 μ L de ácido tricloroacético 0,01 % (TCA). A mistura foi agitada em vortex por 30 s e nela foram adicionados 2 mL de acetato de etila, seguida de mais 30 s de agitação em vortex. Após 10 min de centrifugação a 3500 RPM (centrífuga Sorval TC 6), todo o volume do sobrenadante foi submetido à secagem sob fluxo de ar. O precipitado foi submetido a uma segunda extração. Ele foi misturado com mais 2 mL de acetato de etila seguido de 30 s de vortex e de uma segunda centrifugação. O segundo sobrenadante foi adicionado ao primeiro já sob secagem. Após a total secagem, os resíduos restantes no fundo do tubo foram reconstituídos em fase móvel e injetados no sistema CLAE.

Além do procedimento acima, foram testadas ELL mais simples utilizando os diferentes solventes listados abaixo:

- Acetonitrila contendo o PI a 5000 ng/mL;
- Metanol contendo o PI a 5000 ng/mL;
- Acetonitrila contendo o PI a 5000 ng/mL e TCA na proporção 9:1 (V/V);
- Metanol contendo o PI a 5000 ng/mL e TCA na proporção 9:1 (V/V).

Estas ELLs foram realizadas com a adição de 100 μ L do solvente em 100 μ L de solução padrão de AZT em plasma, seguida de agitação em vortex durante 30 s e centrifugação a 13000 RPM durante 10 min (centrífuga Eppendorf). Os sobrenadantes foram retirados e injetados diretamente no sistema CLAE para quantificação do AZT.

4.2.11.1.4. Validação do método bioanalítico

Este processo foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA (BRASIL, 2003b).

A curva analítica em plasma foi obtida em triplicata, calculada usando o método dos mínimos quadrados. As concentrações de AZT utilizadas foram 5000, 1000, 750, 500, 250, 100 e 50 ng/mL. A curva foi construída projetando-se no eixo das ordenadas a ASC (UA.min) e no eixo das abscissas as concentrações de AZT. A concentração do PI foi de 5000 ng/mL.

A linearidade foi verificada pelo cálculo da regressão linear da média de três curvas analíticas, obtendo-se a inclinação, y-intercepto e r^2 . Os critérios de aceitação foram: $r^2 \geq 0,98$, $DPR \leq 20\%$ em relação a menor concentração e $DPR \leq 15\%$ em relação às outras concentrações da curva analítica.

A especificidade e seletividade confirma a interferência de componentes endógenos do plasma no tempo de retenção do AZT. A seletividade foi investigada pela comparação de amostras de solução de trabalho em plasma contendo AZT com uma solução de trabalho em plasma sem AZT, denominada branco. Além disso, amostras de plasma foram contaminadas por alguns antirretrovirais disponíveis como lamivudina, efavirenz e indinavir, comumente utilizados no coquetel da AIDS, para avaliar a especificidade do método analítico em detectar o AZT.

Para avaliar a precisão e exatidão do método analítico, foram escolhidos três pontos dentro da faixa de concentração da curva analítica, representando concentrações baixa (150 ng/mL), média (2500 ng/mL) e alta (4000 ng/mL), as quais foram preparadas em quintuplicata no mesmo dia e também em dias diferentes, para analisar a precisão e exatidão intra e interdia. A precisão foi constatada pelo valor de DPR o qual deve ser menor que 5 % e a exatidão foi calculada pela razão percentual entre a concentração experimental obtida pelas soluções de trabalho em plasma e a concentração teórica. Os valores devem estar dentro da faixa de 85 a 115%.

Para determinar a recuperação, amostras de solução de trabalho em plasma foram contaminadas com soluções padrão de AZT após o processo de extração. As ASC obtidas foram comparadas com as ASC dos extratos de soluções de trabalho em plasma preparadas normalmente. O teste foi realizado

em quintuplicata para as concentrações de 4000, 2500 e 50 ng/mL. A recuperação do PI foi determinada na mesma concentração em que foi testado na curva analítica. A porcentagem de recuperação foi calculada pela relação entre a média experimental e o valor teórico, cujo valor deve estar dentro da faixa de 85 a 115 %.

O *LQ* e o *LD* foram investigados a partir de cinco soluções de trabalho em plasma, preparadas em concentrações decrescentes de AZT. Para uma concentração ser aceita como *LQ*, a exatidão e a precisão devem ser menores que 20 %. O *LD* deve apresentar ASC duas ou três vezes maior que o ruído da linha base localizada no tempo de retenção do AZT.

A estabilidade do AZT em plasma de rato foi avaliada através do preparo de seis soluções de trabalho em plasma com AZT na concentração de 2500 ng/mL. A leitura destas amostras foi realizada logo após o preparo (extemporaneamente) e também depois de serem mantidas 24hs em temperatura ambiente, para assim checar a estabilidade do AZT pós-processamento.

4.2.11.2. Protocolo experimental

O procedimento experimental foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (FCFar/UNESP) e aprovado com número de protocolo 36/2009.

Os animais foram divididos em três grupos contendo 6 ratos que foram tratados conforme especificado abaixo:

- I. Administração intravenosa de solução injetável de AZT 10 mg/mL (Zidovir, Cristália, Itapira, Brasil) na dose de 8 mg/kg.
- II. Administração oral por gavagem de xarope constituído de uma solução concentrada de açúcar e AZT a 10 mg/mL (LAFEPE, Dois Irmãos, Brasil) na dose de 8 mg/kg.
- III. Administração intranasal da formulação precursora de cristal líquido selecionada contendo AZT a 35 mg/mL, na dose de 8 mg/kg.

A dose máxima de AZT que pode ser administrada foi calculada por extrapolação alométrica, dando um valor de 55 mg/kg, considerando a dose usual em humanos de 8,6 mg/kg (600 mg/dia) (MAHMOOD, 2007). Portanto, as doses administradas estão abaixo deste limite.

O desenho experimental foi construído com 12 tempos de coleta, estendendo-se por 6 horas. Um protocolo satisfatório para estudo de farmacocinética deve contemplar o acompanhamento das concentrações plasmáticas no período de pelo menos 5 meias vidas do composto (CHOW; LIU, 2000). Como a meia vida do AZT é de aproximadamente 1 h, o período estudado foi satisfatório e está de acordo com a regulamentação da ANVISA (BRASIL, 2003a).

4.2.11.3. Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar (Biotério Central da UNESP) pesando entre 250 e 300 g. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$), umidade ($55\% \pm 5$) e luz (ciclo 12/12 h, luzes acesas às 7 h), em caixas com alimentação e água *ad libitum*.

Os animais foram previamente submetidos a procedimento cirúrgico para implantação de cateter na veia arterial e femoral, utilizando anestésico cetamina e xilasina na proporção 8:3 (V/V), respectivamente, na dose de 100 mg/kg, por injeção intraperitoneal. O procedimento cirúrgico foi realizado 24 horas antes do estudo farmacocinético para o animal ter um período de recuperação. Para o grupo I (tratamento intravenoso), a veia e artéria femoral foram canuladas para administração e coleta das amostras. Para os outros grupos (II e III), apenas a artéria femoral foi canulada para coleta do sangue.

Após os experimentos, os animais foram sacrificados por inalação de CO_2 , método de morte mais recomendado para pequenos roedores de laboratório, principalmente para grande quantidade de animais, pois é barato, não inflamável, não explosivo e seguro (PAIVA; MAFFILI; SANTOS, 2005).

4.2.11.4. Procedimento de administração intravenosa, oral e intranasal

Antes da administração, os animais dos três grupos foram anestesiados com cetamina e xilasina 8:3 (V/V), dose de 100 mg/kg, por injeção intraperitoneal.

A administração da solução injetável foi realizada com uma seringa de 1 mL através da via femoral previamente canulada.

Na administração oral, o xarope de AZT foi administrado por gavagem, utilizando uma seringa de 1 mL.

A administração nasal foi realizada usando uma micropipeta para instilar um volume total de 60 μ L, dividido em aplicações de 20 μ L introduzidas alternadamente em cada narina. A instilação alternada foi realizada para evitar um extravasamento ou o escoamento da formulação para a via gastrointestinal

4.2.11.5. Coleta, preparo das amostras e análise por CLAE

O volume de sangue coletado foi de 250 μ L, considerando que o volume máximo permitido para ratos é de 3 mL para que não ocorram alterações hemodinâmicas.

As amostras de sangue foram coletadas pela cânula da artéria femoral (250 μ L) nos tempos 5 min; 15 min; 30 min; 45 min; 1 h; 1,5 h; 2 h; 2,5 h; 3 h; 4 h; 5 h e 6 h após a administração. O volume de sangue foi repostado com solução salina estéril. As amostras de sangue foram colocadas em tubos contendo heparina 2 %, centrifugadas a 3500 RPM por 15 min (centrífuga Eppendorf) para separar o plasma e depois armazenadas a -20 °C até serem analisadas.

No momento da análise, as amostras de plasma foram preparadas de acordo com o método de extração selecionado e quantificadas por CLAE segundo o método analítico validado neste trabalho.

4.2.11.6. Análise farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo, utilizando o *software* Winonlin. Foi determinado o pico de concentração plasmática máxima (C_{max}), o tempo

para alcançar a C_{max} (T_{max}), o volume aparente de distribuição (V_d), a constante de velocidade de eliminação (K_{el}), a meia vida ($t_{1/2}$), a ASC_{0-T} e $ASC_{0-\infty}$, o *clearance* total aparente (Cl) e o fator de biodisponibilidade (F).

Os resultados foram apresentados pelas médias e desvios-padrão. A comparação entre os resultados foi determinada por teste t não paramétrico (Mann Whitney) com nível de significância de 0,05. O *software* utilizado foi o GraphPad Prism 5.01.

5. RESULTADOS

5.1. Comportamento de fases dos tensoativos fosfatidilcolina e PPG-5-CETETH-20 em água

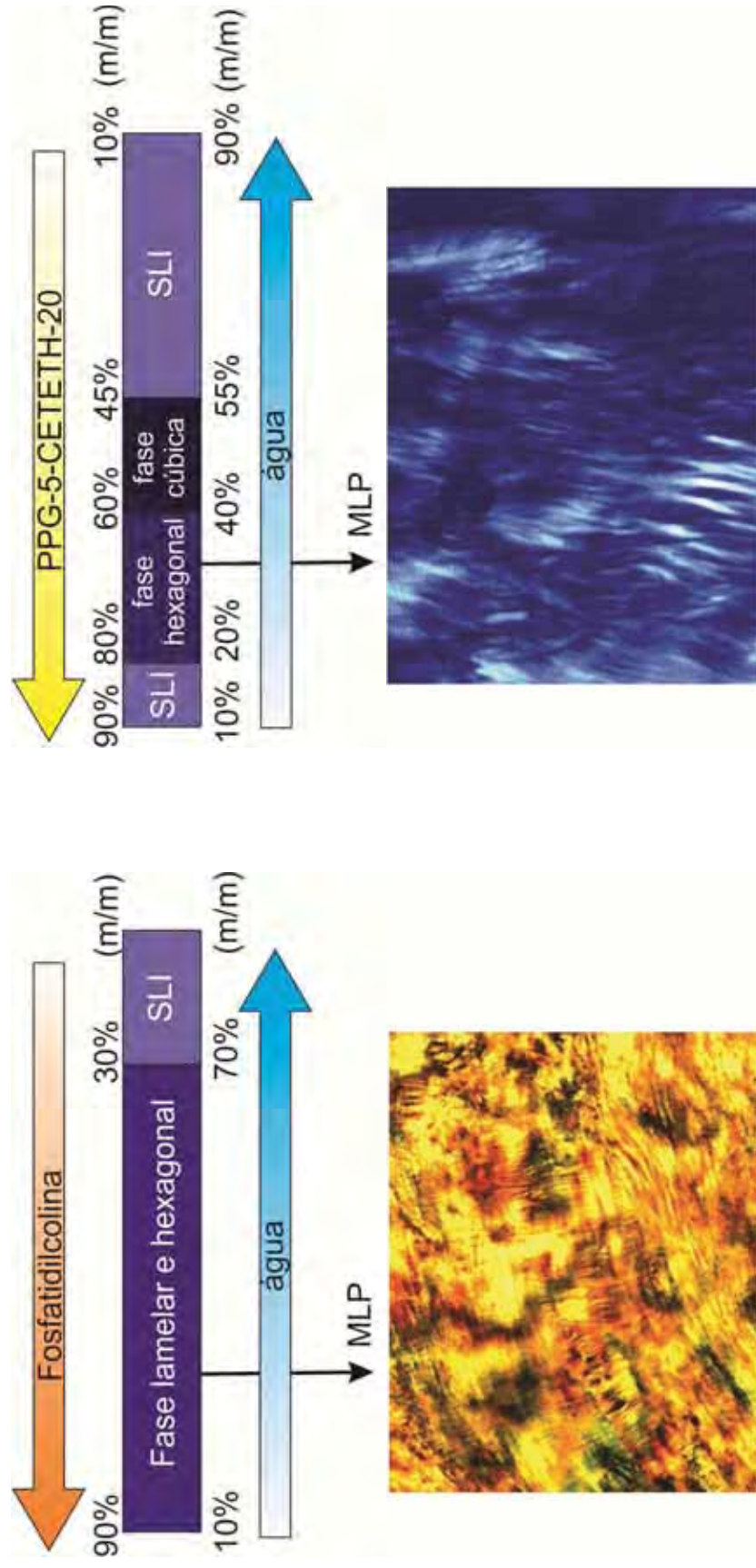
A estratégia utilizada neste estudo para obter sistemas mucoadesivos foi explorar a capacidade do tensoativo PPG-5-CETETH-20 em formar mesofases mais estruturadas com o contato com fluidos aquosos. Por isso foi investigado o comportamento de fases deste tensoativo em presença de água. A Figura 10 mostra um esquema ilustrativo do diagrama de fases binário obtido.

Além da água, o tensoativo PPG-5-CETETH-20 foi combinado com fosfatidilcolina e ácido oleico para a construção de diagramas de fases ternários. Por isso, é interessante saber também o comportamento destes outros compostos primeiramente na presença da água. O diagrama de fases binário obtido para fosfatidilcolina/ água está disposto na Figura 10. Como o ácido oleico é insolúvel em água, não foi possível realizar este estudo.

A mistura de fosfatidilcolina com até 70 % (p/p) de água formou predominantemente fases lamelares e hexagonais, pois na MLP foi identificado tanto cruces de malta como estrias, como pode ser observado na Figura 10. Acima desta concentração, os sistemas tornaram-se líquidos e isotrópicos. Com estes resultados pode-se observar que a fosfatidilcolina, apesar de formar cristais líquidos em contato com uma ampla faixa de concentração de água, ela não exibe uma evolução das estruturas com a diluição aquosa.

Pode ser observado que o PPG-5-CETETH-20 em contato com até 20 % (m/m) de água forma sistemas opticamente transparentes, líquidos e isotrópicos classificados como SLI. Acima de 20 % de água, os sistemas se transformaram na fase hexagonal, constatada pela observação de estrias na MLP, indicadas na Figura 10. Esta fase possui alta viscosidade, é transparente e tem a aparência de um gel. Ela foi mantida com a adição de até 40 % de água. Acima desta quantidade, o sistema mudou para a fase cúbica, que apesar de ser isotrópica, foi identificada pela sua alta viscosidade, maior que da fase hexagonal. Enfim, com adição de concentrações de água maiores que 55 %, os sistemas voltaram a ser SLI até a diluição infinita.

Figura 10 – Esquema ilustrativo dos diagramas de fases binários resultantes das misturas de fosfatidilcolina/ água e PPG-5-CETETH-20/ água, além de imagens representativas obtidas por MLP exemplificando os sistemas anisotrópicos obtidos. (SLI) Sistema líquido isotrópico.



Com este estudo foi possível observar que o tensoativo PPG-5-CETETH-20 em contato com concentrações crescentes de água promove a formação de estruturas cada vez mais organizadas. A diluição aquosa deste tensoativo promoveu a transição de SLI para a fase hexagonal, seguida pela fase cúbica, até que uma maior concentração de água dispersou o sistema que voltou a ser um SLI. Já com a diluição da fosfatidilcolina não houve aumento da organização dos sistemas. Independente da quantidade de água há sempre a formação de uma mistura de fase lamelar e hexagonal, até que uma diluição maior dispersa o sistema.

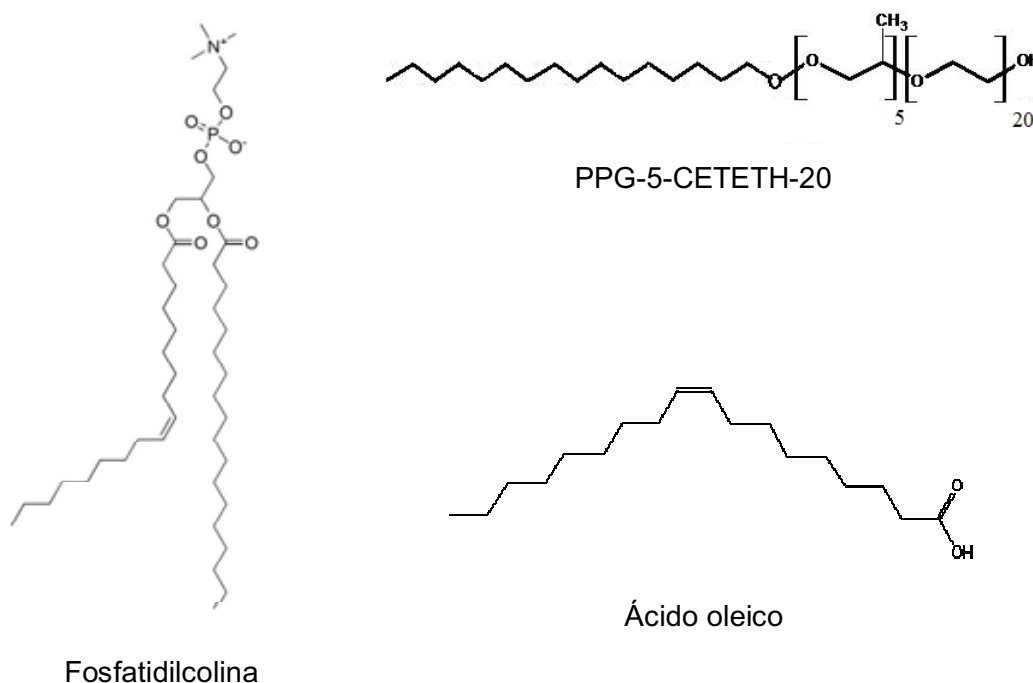
O comportamento de fases de tensoativos está relacionado com as proporções em que são utilizados e também com a geometria de suas moléculas. Além da distinção entre tensoativos iônicos, catiônicos, não iônicos, e zwitteriônicos, o mais importante é a presença e a dimensão das cadeias carbônicas e cabeças polares, já que a transição de fases é essencialmente governada pelo preenchimento do espaço confinado entre as interconexões destas estruturas (GRASSI et al., 2007b).

A fosfatidilcolina possui duas cadeias carbônicas ligadas a um grupo fosfórico (Figura 11), conformação que favorece a formação de bicamadas. Estes resultados estão de acordo com a teoria que relaciona a geometria do tensoativo com a capacidade de formar determinados agregados (LAWRENCE, REES, 2000). Moléculas que possuem o volume da cabeça hidrofílica menor que o volume ocupado pelas cadeias hidrofóbicas, como é o caso de tensoativos de cadeia dupla como a fosfatidilcolina, favorecem a formação de fases lamelares e vesiculares (LAWRENCE, REES, 2000).

Para tensoativos não iônicos com uma única cadeia carbônica, como o PPG-5-CETETH-20 (Figura 11), a adição de água provoca a aglomeração das moléculas do tensoativo, cujas cabeças polares ficam voltadas para o meio interno aquoso, a fim de obter um estado mínimo de energia livre, formando assim micelas reversas. Com o aumento da água interna, a estrutura micelar antes esférica passa a ser mais alongada, até que uma quantidade de água acima de 20 % promove o empacotamento destas estruturas, formando a fase hexagonal. Com adicionais aumentos de água, o tensoativo não consegue estabilizar a água como fase interna, resultando numa fase mais ordenada como a fase cúbica, cuja interface tem curvatura ao redor tanto da cadeia

hidrofóbica como da cabeça polar do tensoativo. Quando a quantidade de água excede a de tensoativo, a primeira passa a ser o meio externo e a parte hidrofóbica do tensoativo passa a se proteger contra o ambiente aquoso, formando micelas normais.

Figura 11: Estruturas moleculares da fosfatidilcolina, PPG-5-CETETH-20 e ácido oleico.



Visando o desenvolvimento de sistemas precursores de cristais líquidos para aplicação nasal, a fosfatidilcolina não exibiu um aumento gradual da organização das mesofases em contato com a água. O tensoativo PPG-5-CETETH-20 mostrou formar sistemas líquidos que aumentam a viscosidade com a diluição aquosa, porém, a transformação dos SLI em fase hexagonal seguida da fase cúbica pode provocar a obstrução das vias aéreas, devido à grande rigidez destas fases. Logo, sistemas compostos por misturas binárias de fosfatidilcolina/ água e PPG-5-CETETH-20/ água podem não ser adequados para via nasal.

Tendo isto em vista, este trabalho testou a adição de um terceiro componente nestas misturas binárias a fim de alterar o comportamento de fases dos sistemas. Foi testado a adição de fosfatidilcolina e ácido oleico nas

misturas binárias contendo PPG-5-CETETH-20 e água. A fosfatidilcolina pode promover a formação de sistemas lamelares, os quais são menos rígidos que as fases hexagonais e cúbicas, e o ácido oleico, por ter caráter hidrofóbico, pode também alterar o comportamento de fases das misturas PPG-5-CETETH-20 e água.

5.2. Construção do diagrama de fases ternário com a combinação de PPG-5-CETETH-20, fosfatidilcolina e água.

O diagrama de fases ternário obtido para as misturas contendo PPG-5-CETETH-20, fosfatidilcolina e água está apresentado na Figura 12. Algumas imagens representativas obtidas por MLP estão na Figura 13. O ponto F1 foi a amostra selecionada para caracterização físico-química e F1d é onde o sistema se localiza após a diluição aquosa de F1 na proporção 1:1 (p/p).

Observa-se que a maior parte do diagrama é composta por SAVTs (Sistemas de alta viscosidade transparentes). A MLP mostra que a fase lamelar predomina à direita do diagrama, onde as concentrações de água são menores que 20 %. Acima desta concentração, as fases lamelares passam a existir em conjunto com a fase hexagonal. Apesar da identificação de anisotropia na região SAVT, característica de cristais líquidos, visualmente estes sistemas não são totalmente transparentes, e sim translúcidos. Os sistemas líquido-cristalinos são identificados também pela transparência, indicativos de estabilidade termodinâmica. O aspecto visual dos sistemas SAVTs pode ser resultado do tamanho das estruturas formadas.

Os SLIs no vértice superior do diagrama são formados quando as concentrações de fosfatidilcolina são menores que 20 % e as concentrações do PPG-5-CETETH-20 são maiores que 70-80 %, permitindo a formação de SLIs com pouca quantidade de água, o que não seria possível se houvesse apenas a fosfatidilcolina e água.

Os SLIs no vértice esquerdo do diagrama foram formados quando a concentração de água foi maior que 70 %. Esta alta diluição aquosa promoveu uma maior dispersão dos sistemas e o rompimento da estrutura líquido-cristalina. Este mesmo comportamento foi observado na mistura binária de fosfatidilcolina e água.

Figura 12 – Diagrama de fases ternário obtido com a combinação de PPG-5-CETETH-20, fosfatidilcolina e água. (SLI): Sistemas líquidos isotrópicos; (SAVT): Sistemas de alta viscosidade transparentes; (F1), (F1d): amostras caracterizadas.

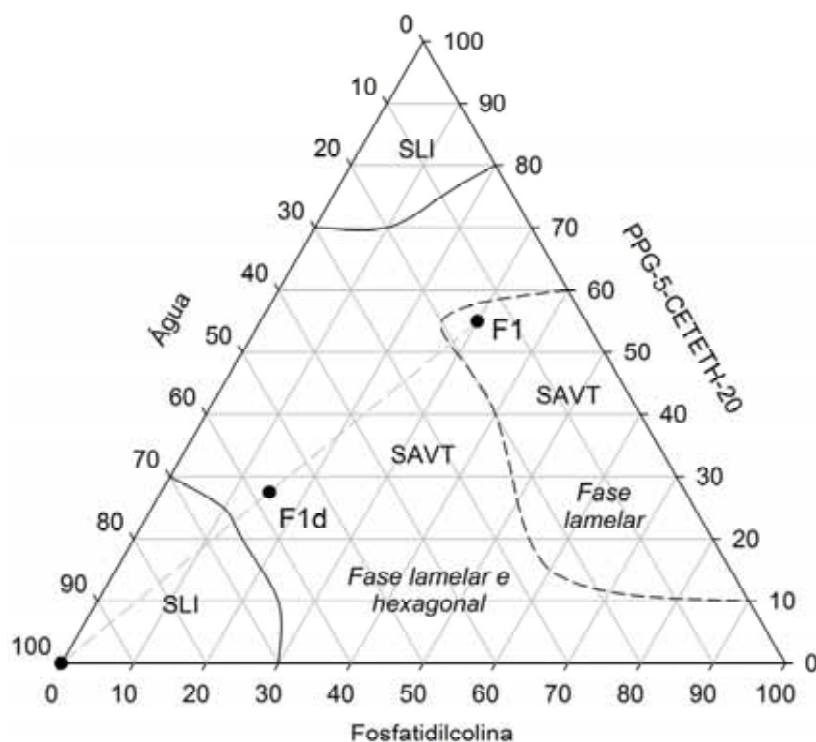
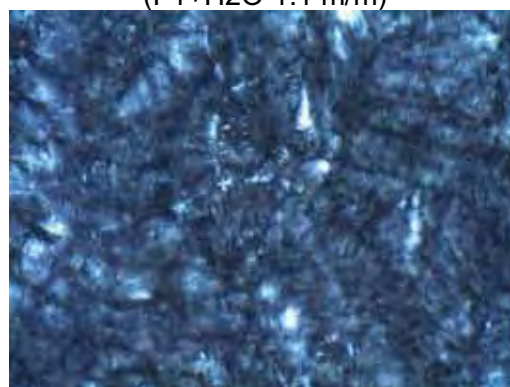


Figura 13 – Imagens obtidas por MLP da amostra F1, indicando as cruze de Malta característico da fase lamelar, e da amostra F1d (F1+H₂O 1:1 p/p), indicando a presença de cruze de Malta juntamente com estrias, característico da fase hexagonal.

F1

F1d
(F1+H₂O 1:1 m/m)

Portanto, em misturas ternárias contendo PPG-5-CETETH-20, fosfatidilcolina e água, não é possível observar uma influência do PPG-5-CETETH-20 na formação dos sistemas, a não ser quando sua concentração é extremamente elevada. Em quase todo o diagrama ternário de fases, a fosfatidilcolina governa a formação das estruturas, que foram as mesmas observadas para a mistura binária de fosfatidilcolina e água.

5.3. Construção do diagrama de fases ternário com a combinação de PPG-5-CETETH-20, ácido oleico e água.

O diagrama de fases ternário das misturas contendo PPG-5-CETETH-20, ácido oleico e água está disponível na Figura 14. Figuras representativas da MLP estão ilustradas na Figura 15. O ponto F2 foi a amostra selecionada para caracterização físico-química e F2d é onde o sistema se localiza após a diluição aquosa de F2 na proporção 1:1 (m/m).

Este diagrama mostra que os SLIs foram formados não somente no vértice superior do diagrama, como ocorreu para a combinação de PPG-5-CETETH-20, fosfatidilcolina e água, mas numa longa faixa englobando desde baixas concentrações até cerca de 80 % de ácido oleico. Estes sistemas foram mantidos até o acréscimo de 20 % de água. Acima desta concentração, eles mudaram para SAVT.

Os SLI também foram formados no vértice esquerdo do diagrama, numa região bem estreita, quando a diluição aquosa dos SAVTs ultrapassa 70 % de água e quando a concentração de ácido oleico está abaixo de 5 %. Acima desta concentração, são formados sistemas opacos, devido à baixa quantidade de tensoativo que não é suficiente para estabilizar o óleo no sistema.

Os sistemas obtidos nas regiões classificadas como SLI são isotrópicos, líquidos, opticamente transparentes e termodinamicamente estáveis. Com estas características, muitos autores classificariam estas regiões como microemulsões. Porém, fases micelares também possuem estas características e a diferença é que as micelas são estruturas esféricas formadas apenas por agregados do tensoativo. Já nas microemulsões o filme interfacial vai estabilizar gotículas de uma fase oleosa que se protege de um meio externo aquoso, ou gotículas de água que se protegem de um meio externo oleoso.

Figura 14 – Diagrama de fases ternário obtido com a combinação de PPG-5-CETETH-20, ácido oleico e água. (SAVT): Sistemas de alta viscosidade transparentes; (SLI): Sistemas líquidos transparentes; (i), (F2) e (F2d): amostras caracterizadas.

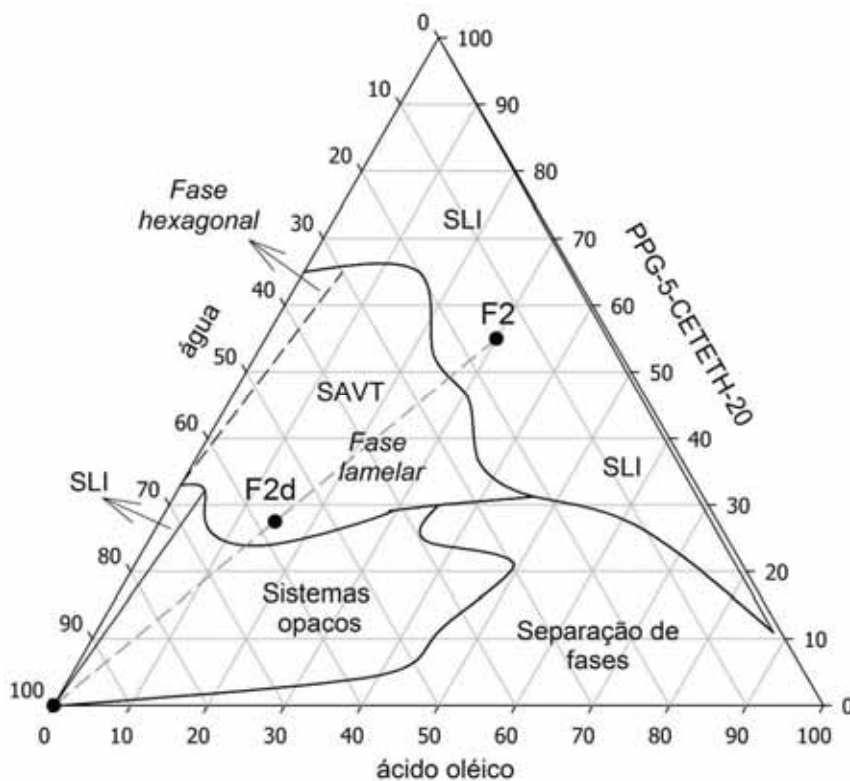
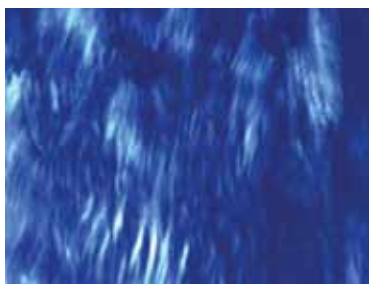


Figura 15 – Imagens obtidas por MLP representando (a) região do diagrama ternário de fases da Figura 14 classificada como fase hexagonal, em que é possível observar as estrias características desta fase; (b) imagem obtida para a amostra F2d (F2+H₂O 1:1 p/p), em que é possível observar as cruces de Malta, característico da fase lamelar.

(a) Fase hexagonal



(b) F2d
(F2+H₂O 1:1 m/m)



Analisando os SLIs localizados à direita do diagrama, quando a água é fixada em 10 % no vértice superior, a concentração do tensoativo é extremamente elevada e tanto a água como o óleo devem estar dispersos na forma de monômeros. A diminuição do tensoativo e o aumento do ácido oleico devem provocar a formação de um sistema inverso, em que o óleo passa a ser o meio externo e as moléculas do tensoativo voltam suas cabeças polares para o interior da gotícula que protege a água que está em menor quantidade. Porém, para saber em que proporções isso ocorre e se a estruturação formada pode ser classificada como microemulsão, são necessários mais ensaios de caracterizações físico-químicas. A micela reversa é capaz de conter uma quantidade de água limitada à capacidade de hidratação da cabeça polar do tensoativo. Esta quantidade de água solvata e fica ligada ao tensoativo por interações fracas e, por não ser livre, suas propriedades são diferentes da água normal. Se a quantidade de água excede a capacidade de hidratação que a cabeça hidrofílica do tensoativo suporta, então haverá tanto água ligada como água livre no interior da gotícula, e é nesta conformação que o sistema é classificado como uma microemulsão inversa (FANUN, 2009).

A região SAVT é formada a partir da diluição dos SLIs com 20 % de água. Ela é composta basicamente por fases lamelares, identificadas pelas cruzes de Malta visualizadas na MLP, como pode ser observado na Figura 15. A fase hexagonal foi obtida apenas numa região limitada do diagrama, identificada pela observação de estrias na MLP (Figura 15), em que o ácido oleico está abaixo de 5 %, tensoativo entre 65 e 40 % e água entre 35 e 60 %.

As fases lamelares foram formadas quando a capacidade dos agregados de tensoativos que isolavam a água internamente nos SLIs foi superada, e o filme interfacial antes esférico se abriu, formando a fase lamelar, em que a água e o ácido oleico são separados por bicamadas do tensoativo. As fases lamelares obtidas foram formadas quando a água ultrapassou cerca de 20 % na composição dos SLIs. Visualmente os sistemas possuem viscosidade intermediária, são extremamente transparentes e homogêneos. A caracterização por MLP mostra cruzes de Malta nítidas, diferentes das fases lamelares obtidas com a mistura ternária PPG-5-CETETH-20/ fosfatidilcolina/ água, cuja birrefringência nem sempre era fácil de ser identificada, assim como

para todos os outros SAVTs obtidos para esta combinação, que resultava sempre em sistemas translúcidos.

As fases hexagonais obtidas no diagrama da Figura 16 são também sistemas de alta transparência e com viscosidade maior que as fases lamelares. Elas são formadas quando a quantidade de ácido oleico no sistema é muito baixa. Os SLIs localizados imediatamente antes da região onde se encontra a fase hexagonal provavelmente estão estruturados na forma de micelas reversas em que as cabeças polares das moléculas do tensoativo ficam voltadas para o meio interno aquoso. Com a diluição, há um aumento da água interna, e a estrutura micelar vai se alongando, até que uma quantidade de água acima de 30 % promove o empacotamento destas estruturas, formando a fase hexagonal. Este mesmo comportamento foi observado para a mistura binária PPG-5-CETETH-20/ água. Como a quantidade de ácido oleico nesta região é insignificante, o comportamento de fases do tensoativo predomina. Portanto, a região de fase hexagonal obtida é resultado das propriedades do tensoativo e não foi uma influência do ácido oleico.

Pode ser observado que com a adição do ácido oleico não houve a formação da fase cúbica, mas ele contribuiu para formação de mesofases lamelares bem definidas, as quais não eram formadas com a mistura binária PPG-5-CETETH-20/ água. Portanto, o ácido oleico alterou o comportamento de fases do PPG-5-CETETH-20, já que promoveu a formação de fases diferentes das obtidas com mistura binária do tensoativo em água. Já os sistemas obtidos com a combinação ternária de PPG-5-CETETH-20/ fosfatidilcolina/ água foram os mesmos observados na a mistura binária fosfatidilcolina/ água. Portanto, a fosfatidilcolina não promoveu nenhuma vantagem ao ser combinada com o PPG-5-CETETH-20 em relação ao seu comportamento de fases.

O ácido oleico é formado por uma cadeia carbônica de 18 carbonos contendo uma insaturação e um grupamento carboxílico terminal (Figura 11). Pode ser sugerido que este grupamento pode conferir certa hidrofiliabilidade à molécula e uma pequena fração molar presente no sistema pode interagir na interface óleo/água como um cotensoativo. Isto explicaria porque o ácido oleico, mesmo tendo uma alta lipofiliabilidade (EHL=1), permitiu a formação de várias estruturas em associação com o PPG-5-CETETH-20 e água. Outra evidência que vai de encontro com esta propriedade do ácido oleico é a

comparação dos seus resultados com outro diagrama de fases ternário obtido por nosso grupo de pesquisa, que combinou PPG-5-CETETH-20 com o óleo mineral (CARVALHO et al., 2012). Como o óleo mineral é composto apenas por cadeias carbônicas alifáticas saturadas e também por hidrocarbonetos cíclicos (ROWE; SHESKEY, OWEN, 2006), sua conformação não favorece uma interação com a água, havendo maior separação de fases. A capacidade do ácido oleico de atuar como um cotensoativo também foi reportada por Ekwall (1975), um dos pesquisadores pioneiros no estudo de sistemas ternários compostos por tensoativos.

Uma característica importante dos SLIs e SAVTs obtidos para as misturas ternárias de PPG-5-CETETH-20/ ácido oleico/ água é a estabilidade termodinâmica. Os sistemas foram formados pela simples mistura dos componentes e permanecem estáveis, sem separação de fases ou mudanças de cor por longos períodos. Visualmente, amostras mantidas protegidas da luz em temperatura ambiente por dois anos não sofreram nenhuma alteração.

A estabilidade termodinâmica também facilita muito o escalonamento do produto. Um dos grandes desafios da pesquisa de novos sistemas de liberação nanoestruturados é a possibilidade de se reproduzir em escala industrial o que é obtido nas bancadas de laboratório. Para a produção dos sistemas obtidos neste trabalho não é necessária a utilização de equipamentos e nem de insumos farmacêuticos onerosos, logo, é extremamente viável sua produção em escala industrial.

5.4. Seleção dos sistemas para caracterização físico-química

Foram escolhidos dois sistemas provenientes da construção dos diagramas de fases ternários das Figuras 12 e 14, para avaliar sua capacidade de agir como sistemas precursores de cristais líquidos e promover a mucoadesão. Para seleção, foi levada em consideração a capacidade do sistema ter escoamento e se transformar em cristal líquido com a diluição aquosa. Além disso, sistemas contendo alta concentração de PPG-5-CETETH-20 foram evitados, pois o tensoativo numa quantidade muito elevada pode ser irritante para a mucosa.

Como os sistemas líquidos (SLIs) obtidos com a mistura ternária de PPG-5-CETETH-20/ fosfatidilcolina/ água foram formados em concentrações muito altas de PPG-5-CETETH-20, foi escolhida uma fase lamelar (ponto F1 da Figura 13), que apesar de ter viscosidade intermediária, exibe certo escoamento ao verter o frasco. A linha de diluição desta formulação mostra que a água promove a formação de uma mistura de fase hexagonal e lamelar, logo, o ponto F1 é um sistema precursor de cristal líquido mais rígido, devido à presença da fase hexagonal em F1d.

Já as misturas contendo PPG-5-CETETH-20/ ácido oleico/ água formaram uma ampla região de SLIs. Para a escolha do ponto F2 (Figura 14), considerou-se a mínima concentração do PPG-5-CETETH-20 que não fosse perto das regiões de sistemas opacos ou separação de fases. Além disso, considerou-se a escolha de uma linha de diluição que abrangesse amplamente a região SAVT, para o sistema permanecer na estrutura líquido-cristalina numa faixa de diluição aquosa maior. A diluição aquosa de F2 (1:1 m/m) resultou na fase lamelar F2d, como pode ser observado na Figura 15.

5.5. Incorporação de polímeros mucoadesivos nos sistemas selecionados

Polímeros derivados do APA e quitosana são muito empregados no desenvolvimento de sistemas mucoadesivos de liberação. Por isto, foi testada a incorporação de alguns destes polímeros nos sistemas, a fim de avaliar se esta associação aumenta suas propriedades mucoadesivas.

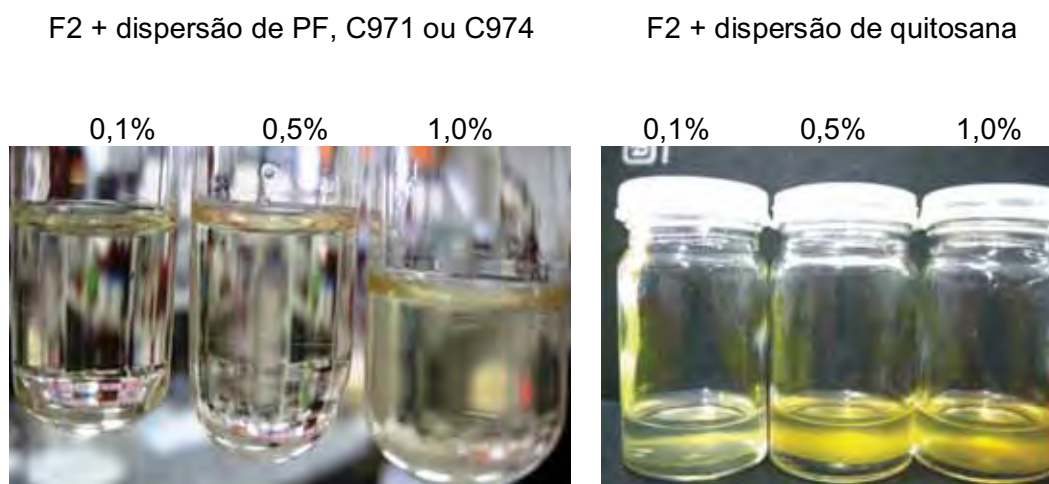
Alguns estudos já reportaram que a adição de polímeros mucoadesivos em sistemas baseados em tensoativos aumentou a extensão da absorção dos fármacos incorporados. Os autores atribuíram tal efeito à mucoadesão promovida pela adição de 0,5 % (p/p) de policarbofil em microemulsões compostas por glicerídeos do macrogol cáprico e caprílico, dietilenoglicol, poliglicerol e água (VYAS et al., 2006a; 2006b; VYAS, SHAHIWALA, AMIJI; 2008).

Neste trabalho, os polímeros utilizados foram o policarbofil, C971, C974 e quitosana. Eles foram dispersos em concentrações de 0,1 %, 0,5 % e 1,0 % (p/V) e foram incorporados em substituição à fase aquosa do sistema F2. Com

a adição dos polímeros, os sistemas foram nomeados como F2PF, F2C971, F2974 e F2QS. Este teste não foi realizado para F1 devido a sua maior viscosidade que dificultou o processo de homogeneização das amostras.

A Figura 16 mostra o aspecto visual dos sistemas após a incorporação dos polímeros. Os resultados mostram que as concentrações 0,5 % e 1 % provocaram turbidez no caso dos polímeros derivados do APA, e precipitação no caso da quitosana. Quando as dispersões foram adicionadas na concentração de 0,1 %, os sistemas permaneceram límpidos, transparentes e estáveis. Além disso, eles se mantiveram isotrópicos, pois as imagens obtidas por MLP mostram um campo escuro.

Figura 16 - Representação de F2 após substituição da sua fase aquosa por dispersões dos polímeros mucoadesivos PF, C971, C974 e quitosana nas concentrações 0,1 %, 0,5 % e 1% (p/V).



Portanto sistemas compostos por PPG-5-CETETH-20 ácido oleico/ água não favorecem a incorporação de polímeros derivados do APA nem da quitosana. Como a dispersão destes polímeros é dependente do intumescimento, a baixa quantidade de água presente nas formulações somada à presença de componentes anfífilicos e lipofílicos como a PPG-5-CETETH-20 e ácido oleico não ofereceu um ambiente propício para a incorporação destes polímeros.

5.6. Determinação da solubilidade do AZT nos sistemas selecionados

5.6.1. Método analítico para quantificar o AZT incorporado nos sistemas

Para quantificação do AZT nos sistemas em estudo, foram obtidas curvas analíticas em diferentes solventes, de acordo com a melhor seletividade do AZT em presença dos componentes dos sistemas. Os resultados obtidos na validação do método analítico estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados da validação do método analítico para quantificar o AZT incorporado nos sistemas.

Amostras	F2, F2PF, ácido oleico			F1			PPG-5-CETETH-20, PF0,1		
	Etanol			Metanol			Água		
Solvente com melhor seletividade									
Faixa de concentração da curva analítica	20 a 50 µg/mL,			10 a 40 µg/mL			2,5 a 50 µg/mL		
Regressão lineal	$y=0,0335x+0,0795$			$y=0,0411x-0,0313$			$y=0,0406x+0,0391$		
r^2	0,9978			0,9976			0,9974		
LD (µg/mL)	0,481			0,095			0,45		
LQ (µg/mL)	1,603			0,317			1,50		
Concentrações teóricas de AZT (µg/ml)	20	35	50	10	25	40	2,5	10	40
Concentrações experimentais de AZT (µg/ml)	19,91	31,62	47,67	10,17	26,50	41,75	2,9	9,82	40,75
DP	0,94	1,31	2,53	0,15	0,33	0,73	0,07	0,37	5,34
DPR (%)	4,71	4,16	5,30	1,47	1,25	1,75	2,44	3,75	5,34
Exatidão (%)	99,56	90,34	95,34	101,7	106,0	104,4	116,6	98,21	101,9

Os parâmetros foram validados utilizando espectrofotômetro UV HP 8453 a 266 nm e os critérios de aceitação foram os determinados pela ANVISA (BRASIL, 2003b).

A curva analítica em etanol foi obtida para quantificar o AZT nas amostras F2, F2PF e ácido oleico. A curva analítica em metanol foi construída para quantificar o AZT na amostra F1. A curva analítica em água foi construída para quantificar o AZT nas amostras PPG-5-CETETH-20 e na dispersão de policarbofil 0,1 % (p/V) (PF).

As regressões lineares calculadas para cada curva analítica, seus respectivos r^2 e os valores de *LD* e *LQ* estão dispostos na Tabela 4. A precisão foi constatada pelos valores de DPRs os quais foram menores que 5 %. Os valores de exatidão devem estar dentro da faixa de 80 a 120 % e os valores experimentais obtidos estão dentro dos limites aceitáveis (BRASIL, 2003a), como pode ser visualizado na Tabela 4.

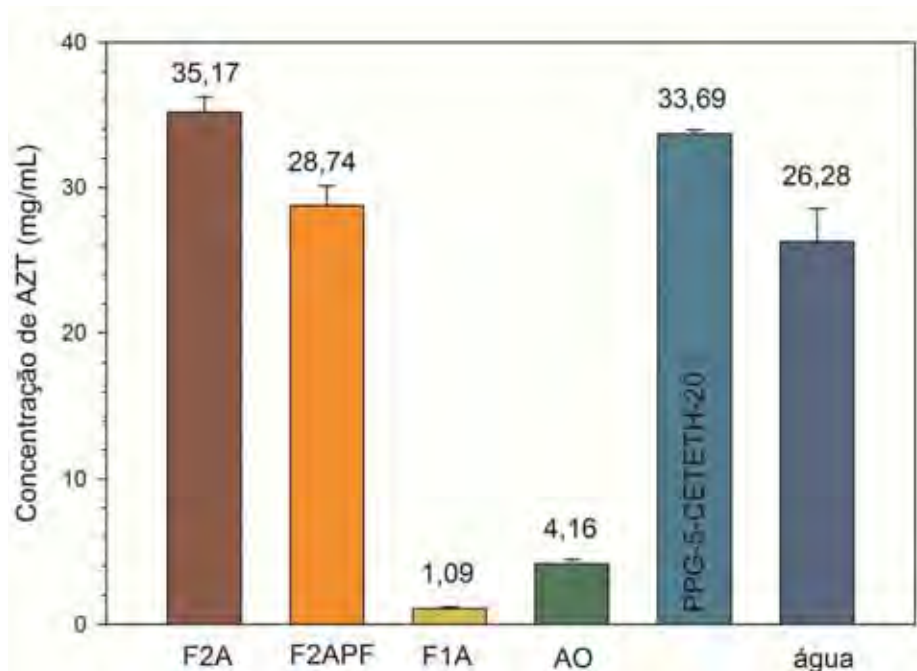
5.6.2. Avaliação da incorporação do AZT nos sistemas

A quantidade máxima de AZT que pode ser incorporada nos sistemas em estudo foi investigada adicionando-se nos mesmos 3 g do fármaco. Após a homogeneização, eles foram centrifugados e o AZT em excesso foi precipitado. O sobrenadante contendo o AZT solubilizado foi devidamente diluído no solvente determinado na validação do método analítico e quantificado por espectroscopia UV.

O AZT foi incorporado nas formulações F1, F2, F2PF e também nos componentes isolados (PPG-5-CETETH-20 e ácido oleico). A incorporação do AZT na fosfatidilcolina não foi realizada, pois o processo de homogeneização fica complicado devido a sua consistência pastosa. A solubilidade do AZT em água é 20 mg/mL (MERK, 1996) e experimentalmente, o valor obtido foi 26,28 mg/mL.

Os sistemas contendo AZT foram nomeados como F1A, F2A e F2APF. A Figura 17 mostra um gráfico comparativo das quantidades máximas de AZT incorporadas em cada amostra.

Figura 17 - Incorporação do AZT nas formulações F1A, F2A, F2APF e nos componentes isolados - ácido oleico (AO), PPG-5-CETETH-20 e água.



Os resultados mostram que a solubilidade do AZT no tensoativo PPG-5-CETETH-20 é maior que em água, já que incorporou em média 30 mg/mL do fármaco. O ácido oleico incorporou em média 4,16 mg/mL de AZT, resultado esperado, já que o AZT é hidrossolúvel e o ácido oleico é lipofílico.

Embora os sistemas F1A, F2A e F2APF contenham a mesma quantidade de PPG-5-CETETH-20 e água, a presença da fosfatidilcolina ou do ácido oleico influenciou diretamente nos resultados. O interessante é que mesmo o ácido oleico sendo mais lipofílico que a fosfatidilcolina, favoreceu a solubilização do AZT, que é um fármaco hidrofílico. Uma explicação para este fenômeno pode estar na estruturação dos sistemas. F1A é uma fase lamelar, cuja área de região interfacial é menor que F2A, já que o sistema fica dividido em camadas de polaridades diferentes. F2A, por ser um sistema de gotículas dispersas, a região interfacial é maior e a capacidade de solubilizar fármacos aumenta.

Portanto, a formulação F2A aumentou a solubilização do AZT e pode também favorecer a solubilização de outros antirretrovirais, os quais podem ser incorporados em associação dentro do mesmo sistema, já que a terapia da AIDS é realizada com a combinação de vários fármacos.

O volume máximo de formulação que é possível administrar via nasal é de 300 μ L. Assim, o sistema de liberação para ser administrado via nasal tem que apresentar uma boa capacidade de incorporação do fármaco. Isto permite a administração da dose num volume pequeno de formulação. Sob este aspecto, o sistema F2A oferece grande vantagem para administração nasal do AZT.

5.7. Avaliação do comportamento de fases dos sistemas em presença de muco por MLP

Para simular o comportamento de fases dos sistemas na cavidade nasal, eles foram diluídos com FNS na proporção 1:1 (p/p) e observados por MLP.

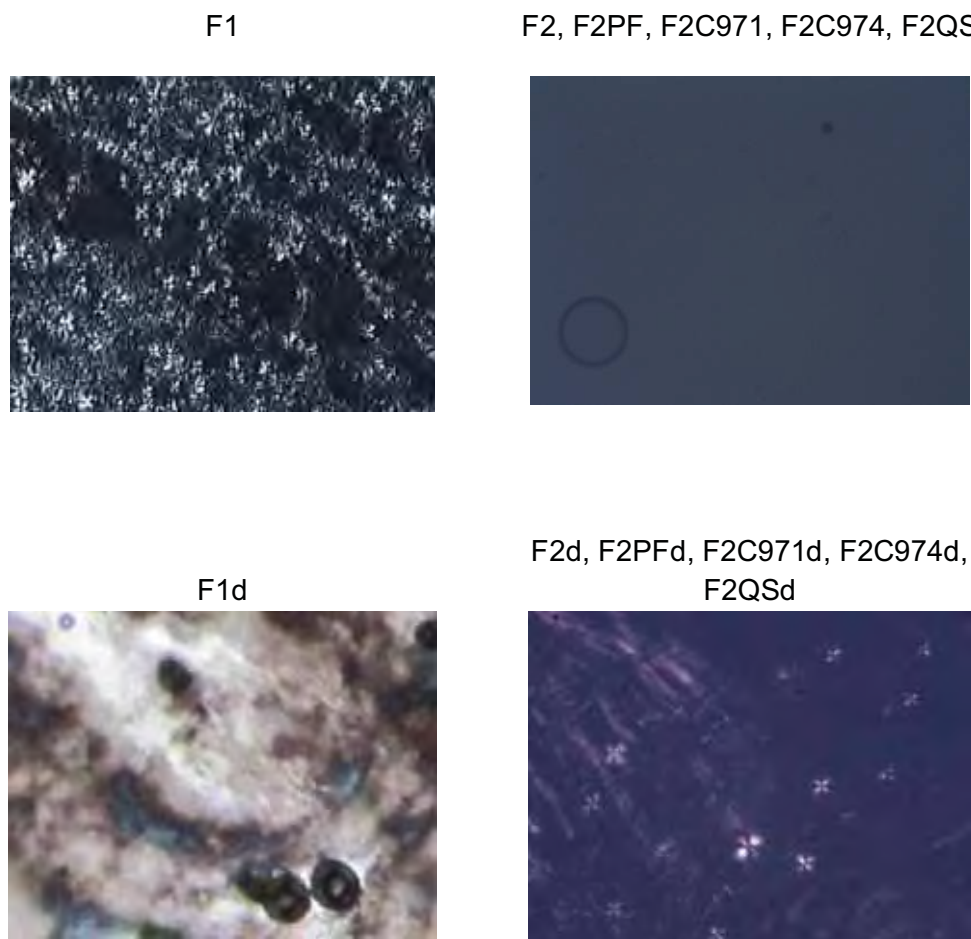
Os sistemas investigados foram F1, F2, F2PF, F2C971, F2C974 e F2QS e após a diluição em FNS foram nomeados como F1d, F2d, F2PFd, F2C971d, F2C974d e F2QSD, respectivamente. As imagens obtidas por MLP estão na Figura 18.

A formulação F1 é uma fase lamelar devido à visualização das cruzes de Malta por MLP. O contato com FNS a transforma numa mistura de fase lamelar e hexagonal (F1d), confirmado pela visualização de estrias em conjunto com as cruzes de Malta.

A formulação F2 exhibe campo escuro na MLP por ser um sistema líquido e isotrópico. A mistura com FNS a transforma numa fase lamelar, evidenciada pelo aparecimento das cruzes de Malta. A mesma transição de fase é observada para os sistemas adicionados com os polímeros mucoadesivos, logo, seu comportamento de fases não é alterado em relação à amostra F2 sem os polímeros.

Portanto, todos os sistemas aumentam a organização estrutural pelo contato com o FNS e podem, portanto, ser explorados como precursores de cristais líquidos.

Figura 18 - Imagens obtidas por MLP das formulações F1, F2, F2PF, F2C971, F2C974, F2QS e de suas diluições 1:1 (m/m) em FNS, resultando nas amostras F1d, F2d, F2PFd, F2C971d, F2C974d, F2QSd.



5.8. Caracterização reológica por ensaio de fluxo contínuo

Os sistemas precursores de cristais líquidos foram submetidos às medidas reológicas de fluxo para caracterizar seu escoamento, propriedade muito importante para possibilitar a aplicação nasal. Os reogramas de fluxo obtidos estão representados na Figura 19.

A forma da curva do reograma da amostra F1 é característica de um fluxo não Newtoniano, pois a tensão passa a não variar com o aumento da taxa de cisalhamento. Isto é um efeito da diminuição da viscosidade com o aumento

da taxa de cisalhamento, que define um fluxo pseudoplástico (BARNES, 1989). O sistema F1 também apresentou comportamento tixotrópico, ou seja, o sistema recupera sua estrutura com a diminuição da taxa de cisalhamento. Pode ser observada uma grande área de histerese, representando a quebra ou o rompimento da estrutura do sistema quando submetido a uma tensão de cisalhamento (LEE; MOTURI; LEE, 2009; SCHNAARE, 2005).

A formulação F2 é um sistema de comportamento Newtoniano, pois todos os pares de valores de tensão e taxa de cisalhamento da curva de fluxo é sempre constante, o que resulta numa reta (SCHRAMM, 2006), como observado na Figura 19. A viscosidade de sistemas Newtonianos é sempre constante e não varia com a taxa de cisalhamento (BARNES, 1989). Os resultados também mostram que a adição de polímeros mucoadesivos a 0,1 % (m/v) não alterou este comportamento.

Os parâmetros calculados com o ajuste da lei das potências aos reogramas de fluxo dos sistemas estão dispostos na Tabela 5. O valor de $n = 0,38$ para F1 confirma que o sistema possui fluxo pseudoplástico e o alto valor de k é resultado da estrutura lamelar.

Figura 19 - Reogramas de fluxo dos sistemas F1, F2, F2PF, F2C971, F2C974 e F2QS.

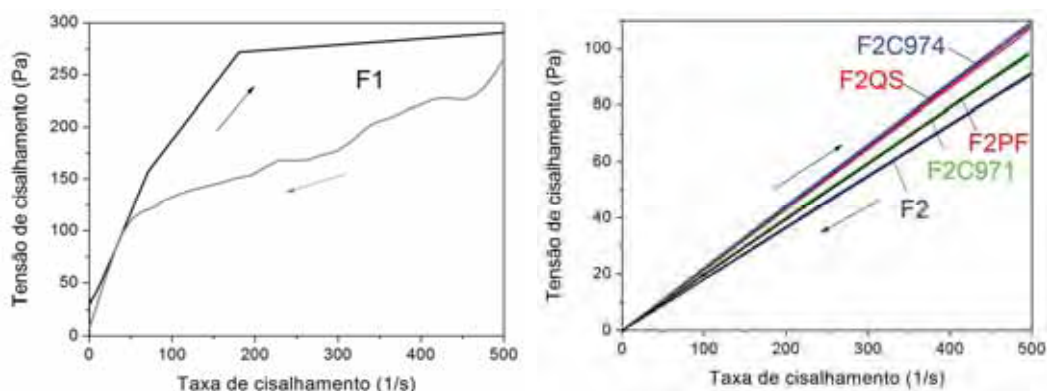


Tabela 5 - Parâmetros de fluxo dos sistemas precursores de cristais líquidos calculados pela lei das potências (Equação 3).

Amostras	Parâmetros de fluxo		
	n	K	r^2
F1	0,38	34,58	0,94
F2	0,99	0,19	1,00
F2PF	1,00	0,15	1,00
F2C971	0,99	0,21	1,00
F2C974	0,99	0,23	1,00
F2QS	0,99	0,22	0,99
F2A	0,95	0,13	0,99

k - índice de consistência; n - índice de escoamento (BARNES, 1989).

A formulação F2, F2A, F2PF, F2C971 e F2C974 exibiram baixos valores de k e valores de n próximos ou iguais a uma unidade, confirmando o comportamento de fluxo Newtoniano.

Portanto, os sistemas F2, F2A, F2PF, F2C971 e F2C974 possuem escoamento livre e podem ser facilmente administrados pela via nasal. F1 tem alto índice de consistência, porém, por exibir fluxo pseudoplástico, a viscosidade é diminuída com o cisalhamento. Materiais deste tipo têm sua estrutura reorientada na direção do fluxo e as interações intermoleculares que antes causavam resistência tornam-se menores, provocando afinamento do fluxo, conhecido como *shear thinning* (SCHRAMM, 2006). O afinamento do fluxo é uma vantagem na aplicação de sistemas de liberação semissólidos, pois facilita seu extravasamento através do frasco ou dispositivo que o contém, como tubos, conta-gotas e seringas, além de permitir o espalhamento da formulação no local de aplicação desejado. Logo, esta propriedade pode permitir a administração nasal de F1.

5.9. Caracterização da mucoadesão por reologia oscilatória de varredura de frequência

A reologia oscilatória é muito utilizada para caracterizar misturas de polímeros com mucina, a fim de medir as mudanças na viscoelasticidade do sistema de liberação *in situ*, e por isso é uma técnica também usada para caracterizar a mucoadesão (CEULEMANS; VINCKIER; LUDWIG, 2002; CALLENS et al., 2003). O aumento na resposta reológica dos sistemas quando misturados com os componentes do muco ou com a mucina é conhecido na literatura como sinergismo reológico (CARVALHO et al., 2010b; CEULEMANS; VINCKIER; LUDWIG, 2002; HASSAN; GALLO, 1990). Para um sistema ser considerado mucoadesivo, a resposta reológica da mistura do sistema de liberação com o muco/componentes deve ser maior que a resposta do sistema ou do muco isolados (HASSAN; GALLO, 1990).

Nos ensaios oscilatórios, a magnitude do módulo elástico G' é uma indicação qualitativa da estrutura do sistema (CEULEMANS; VINCKIER; LUDWIG, 2002). Três situações podem ser encontradas para uma dispersão polimérica: $G' \gg G''$ para um sistema interligado quimicamente, $G' > G''$ para cadeias mantidas por ligações secundárias, e $G' \leq G''$ para dispersões cujas moléculas estão apenas ligadas fisicamente. Sob uma tensão constante e em baixas frequências, sistemas mais empacotados apresentam o módulo elástico G' maiores que o viscoso G'' e ambos são independentes da frequência. Graficamente são representados por uma reta constante. Para sistemas mais fracamente estruturados, os módulos oscilatórios são dependentes da frequência e é observada nesse mesmo gráfico uma inclinação da curva (CALLENS et al., 2003; CEULEMANS; VINCKIER; LUDWIG, 2002).

A Figura 20 mostra os reogramas de varredura de frequência obtidos para os sistemas F1, F2, F2PF, F2C971, F2C974, F2QS e também das suas misturas com FNS (F1d, F2d, F2PFd, F2C971d, F2C974d, F2QSD), a fim de avaliar as mudanças na viscoelasticidade dos sistemas em contato com muco. As medidas foram obtidas a partir da região viscoelástica linear, em que a microestrutura da amostra é mantida intacta durante o ensaio, diferente das medidas de fluxo.

A formulação F1 exibe G' maior que o G'' , além de ser constante e independente da frequência, característicos de sistemas mais estruturados. A adição do FNS aumentou mais ainda esta estruturação, pois o valor de G' de F1 que era em torno de 100 Pa aumentou para em média 10.000 Pa em F1d. F1 é uma fase lamelar, já F1d é uma mistura de fase lamelar e hexagonal, o que conferiu o aumento da elasticidade desta amostra.

Diferente de F1, as formulações F2, F2PF, F2C971, F2C974 e F2QS apresentaram reogramas oscilatórios com módulos elásticos e viscosos crescentes, o que confere uma inclinação em suas curvas, exibindo o G' menor que G'' , característico de amostras mais líquidas. Este comportamento era esperado, já que se trata de amostras com fluídos de comportamento Newtoniano. A mistura destas amostras com FNS promoveu o aumento de G' , sendo este maior que o G'' e ambos os módulos mostraram ser independentes da frequência, característico de sistemas estruturalmente mais fortes. Como as amostras F2d, F2PFd, F2C971d, F2C974d e F2QSD apresentaram curvas oscilatórias semelhantes, para uma melhor comparação entre os dados, foram selecionados valores pontuais de G' na frequência de 1 Hz para comparar numericamente as diferenças deste módulo entre as amostras (Figura 21).

Os resultados mostram que F2PFd tem valor de G' cerca de três vezes maior que as amostras F2d, F2C971d, F2C974d e F2QSD. Isto significa que a adição da dispersão do polímero policarbofil 0,1 % (m/v) contribuiu para uma maior estruturação do sistema em contato com o FNS em relação à adição das outras dispersões de C971, C974 e quitosana.

Os resultados mostram que todos os sistemas precursores de cristais líquidos em estudo neste trabalho misturados com FNS exibem módulos elásticos maiores que as mesmas formulações antes da mistura. Portanto, pode ser concluído que o contato dos sistemas com o muco pode promover a formação de uma matriz líquido-cristalina com elasticidade superior à formulação precursora, logo, as misturas exibem sinergismo reológico, propriedade que pode contribuir para a mucoadesão do sistema de liberação.

Figura 20 – Reogramas obtidos com as medidas de reologia oscilatória de varredura de frequência das amostras F1, F2, F2PF, F2C971, F2C974, F2QS e também das suas misturas com FNS (F1d, F2d, F2PFd, F2C971d, F2C974d, F2QSd). (□ ou □) G'' ; (■ ou ■) G' .

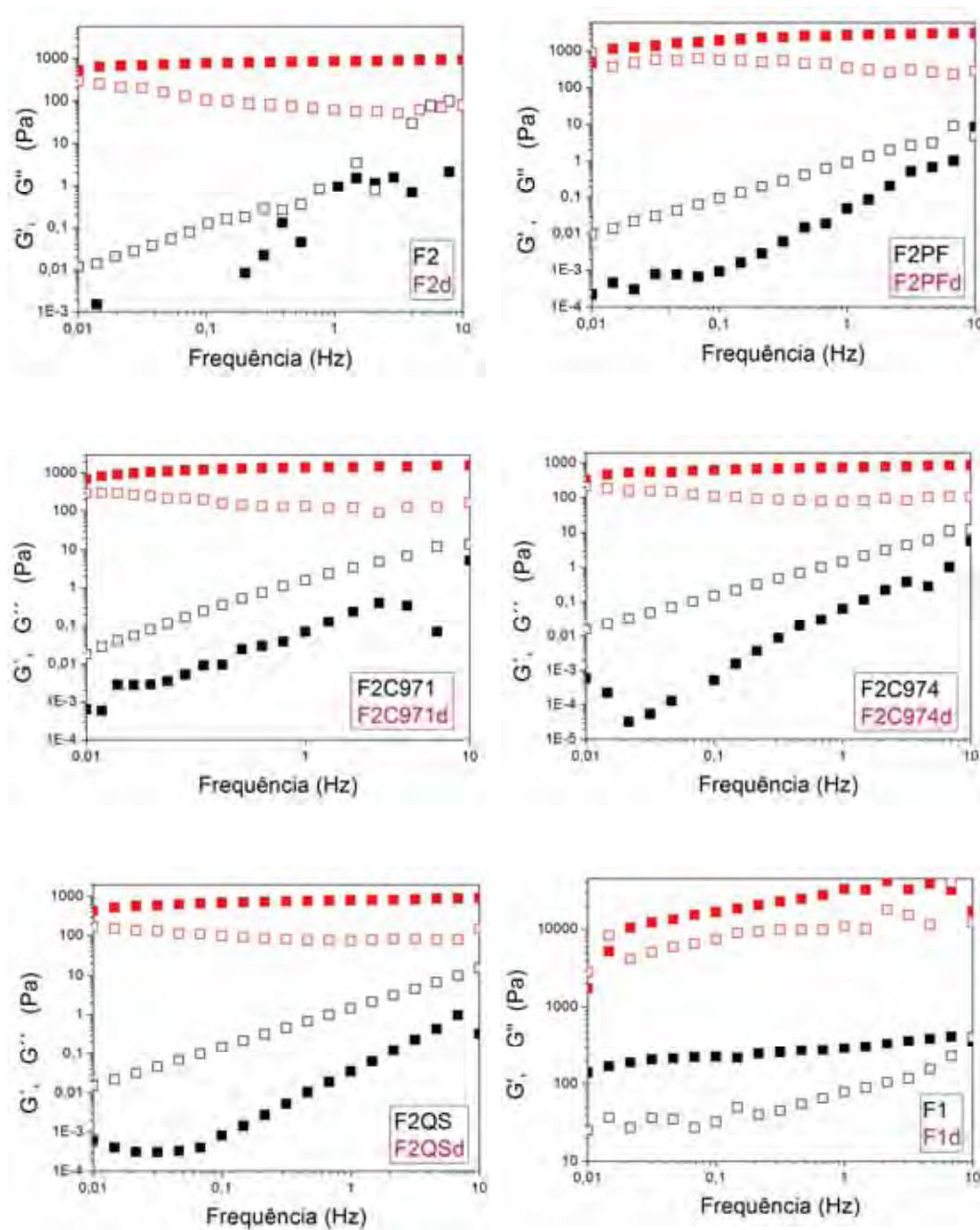
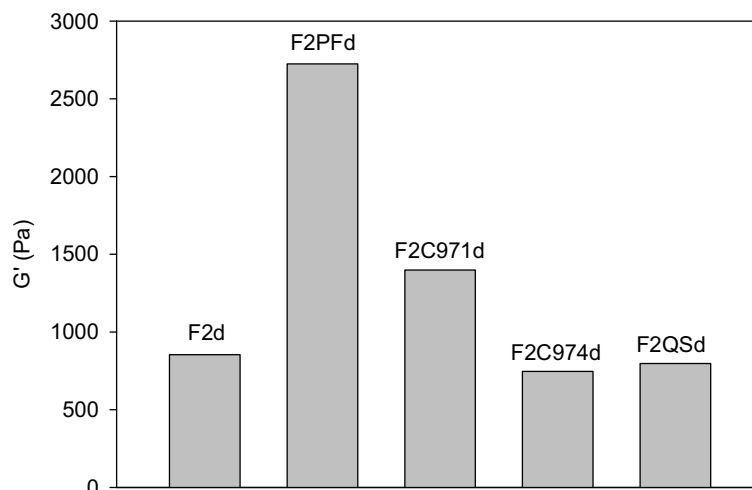


Figura 21 - Comparação dos módulos elásticos (G') na frequência de 1 Hz das amostras F2d, F2PFd, F2C971d, F2C974d e F2QSd.



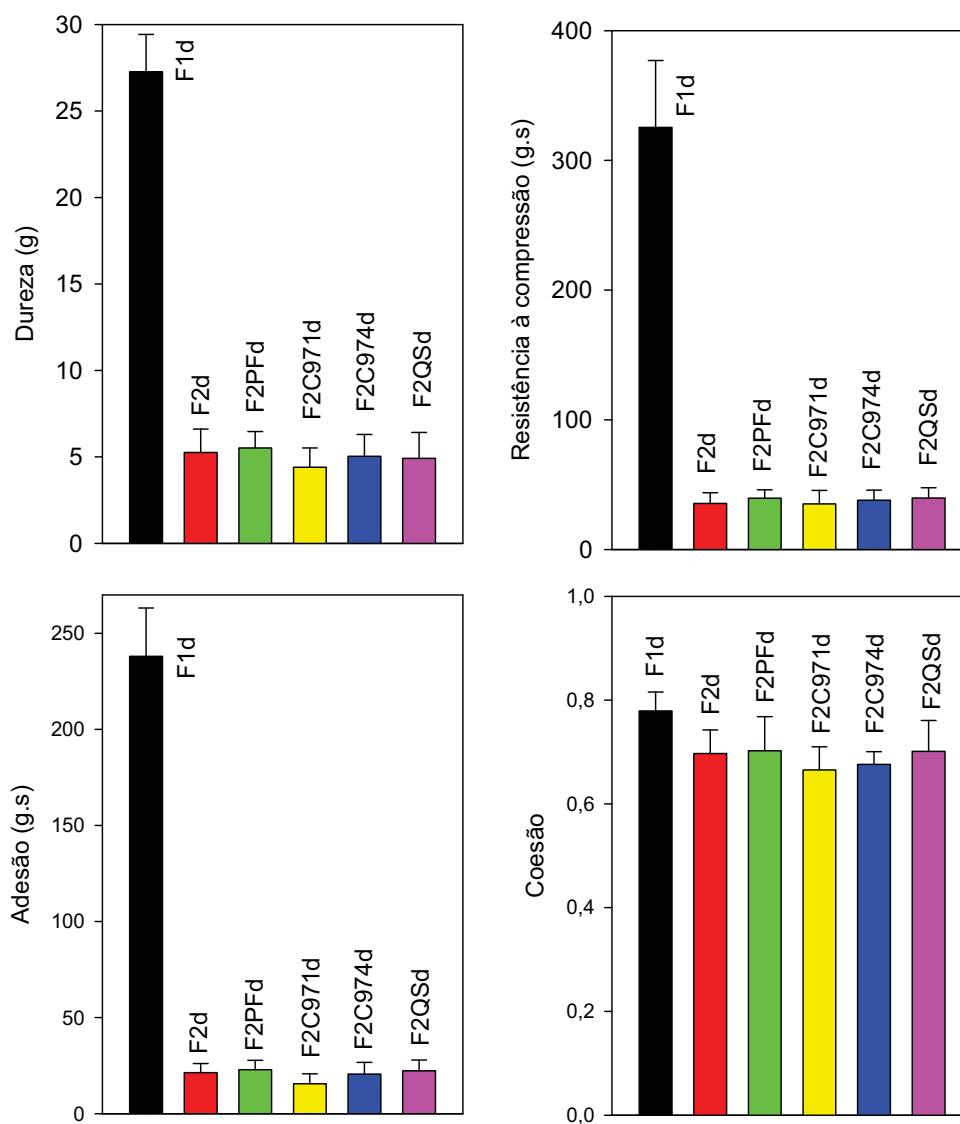
5.10. Caracterização das propriedades mecânicas

5.10.1. Avaliação do perfil de textura (TPA) dos sistemas em contato com FNS

Esta caracterização foi realizada para as formulações misturadas com o FNS, a fim de simular e investigar as mudanças que podem ocorrer na textura dos sistemas quando entram em contato com o muco na cavidade nasal.

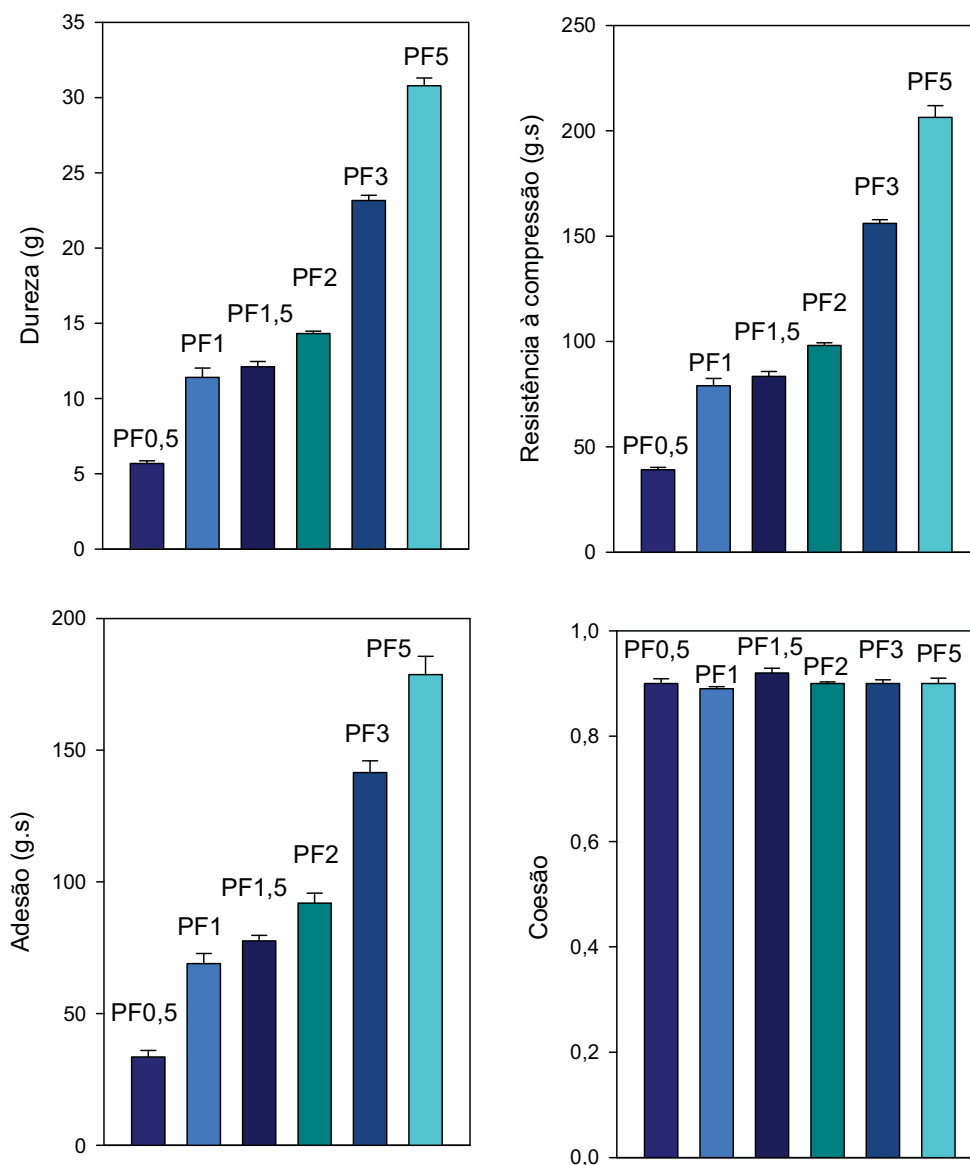
Não é possível realizar medidas de TPA quando as amostras são líquidas, como é o caso das formulações F2, F2PF, F2C971, F2C974, e F2QS. No teste TPA é necessário que a amostra imponha resistência à entrada da prova analítica, denominada como força de gatilho (*trigger force*), cujo valor estipulado foi de 2 mN. Para a detecção de amostras líquidas, seria necessária uma força de gatilho menor, porém, quando esta foi testada, a prova analítica encontrava resistência no ar, interferindo nas medidas. Portanto, apenas as misturas das formulações com FNS foram testadas, já que estas possuem maior viscosidade. Os valores médios obtidos para os parâmetros dureza, resistência à compressão, adesão e coesão estão graficamente dispostos na Figura 22.

Figura 22 – Gráficos das medidas feitas pelo teste TPA, obtendo os parâmetros de dureza, resistência à compressão, adesão e coesão das amostras diluídas em FNS.



Os resultados obtidos para as misturas foram comparados com hidrogéis de polycarbofil utilizados neste estudo como padrão. Os valores médios dos parâmetros de TPA obtidos para os hidrogéis estão apresentados na Figura 23.

Figura 23 – Gráficos das medidas feitas pelo teste TPA, obtendo os parâmetros de dureza, resistência à compressão, adesão e coesão para os hidrogéis de polycarbofil utilizados como padrão comparativo.



A amostra que apresentou a maior dureza foi F1d, cujo valor obtido foi estatisticamente semelhante ao padrão PF3 (valor de $P > 0,05$), mostrando que F1d tem uma dureza tão alta quanto um hidrogel mucoadesivo altamente reticulado. As amostras F2d, F2PFd, F2C971d, F2C974d e F2QSd possuem

dureza sem diferença estatisticamente significativa (valor de $P > 0,05$), com magnitude semelhante ao padrão PF0,5, que é um hidrogel menos concentrado.

A maior resistência à compressão foi encontrada para a amostra F1d, cujo valor foi maior que o padrão PF5 (valor de $P < 0,05$). As amostras F2d, F2PFd, F2C971d, F2C974d e F2QSd possuem valores de resistência à compressão semelhante ao padrão PF0,5 (valor de $P > 0,05$).

Quanto à adesão, a amostra F1d obteve um valor maior que o padrão PF5 (valor de $P < 0,05$). As misturas F2d, F2PFd, F2C971d, F2C974d e F2QSd exibiram valores de adesão semelhantes ao padrão PF0,5 (valor de $P > 0,05$).

A dureza e a resistência à compressão são parâmetros que podem ser relacionados à rigidez da amostra. A observação dos resultados obtidos para os hidrogéis mostra que seus valores crescem com o aumento da concentração do polímero, assim como a adesão. Logo, pode ser sugerido que quanto maior a rigidez dos sistemas, maior será sua adesão. Como a amostra F1d foi a que mostrou maior dureza e a resistência à compressão, sua adesão foi maior. Isto é resultado da presença da fase hexagonal em F1d, a qual não foi observada nas amostras F2d, F2PFd, F2C971d, F2C974d e F2QSd.

Portanto, pode ser sugerido que quanto maior a organização da mesofase líquido-cristalina, maior será sua adesão. Um maior valor de dureza e adesão pode ser um indicativo de uma maior mucoadesão, porque serão necessários maiores forças de cisalhamento e ação do sistema de depuração mucociliar para remover o sistema de liberação em contato com a mucosa. Esta correlação também foi encontrada por BROMBERG et al. (2004), que estudou hidrogéis de copolímeros formados por pluronic e derivados do APA. A força de mucoadesão obtida em mucosa intestinal de rato foi linearmente proporcional ao aumento da energia armazenada nas amostras, ou seja, ao seu aumento da elasticidade e rigidez.

Os valores de coesão das misturas de todos os sistemas precursores de cristais líquidos com o FNS são semelhantes (valor de $P > 0,05$) e menores que os valores obtidos pelos hidrogéis, independente da concentração de policarbofil. A maior coesão dos hidrogéis significa que o trabalho necessário para a prova analítica penetrar nestas amostras foi praticamente o mesmo nos dois ciclos de compressão, os quais não foram suficientes para quebrar a

reticulação das cadeias poliméricas. A menor coesão observada nos cristais líquidos é devido ao menor trabalho para comprimi-los no segundo ciclo de compressão. A primeira compressão pode ter provocado um desarranjo na estrutura líquido-cristalina da amostra, e a força necessária para penetrá-la pela segunda vez foi menor. Embora a mucoadesão seja desejada, o sistema não pode permanecer por tanto tempo na mucosa e inibir a função protetora deste mecanismo. Portanto, a baixa coesão dos cristais líquidos pode proporcionar um balanço entre mucoadesão e a depuração da formulação.

Apesar das estruturas líquido-cristalinas formarem uma rede com reologia semelhante a um gel polimérico, sua viscoelasticidade não é resultado de reticulação intermolecular das cadeias poliméricas, mas sim da organização interfacial das moléculas de tensoativo em contato com a água e os outros componentes. As estruturas formadas por tensoativos atuam segundo GRASSI et al. (2007b) como “polímeros vivos”, cuja dimensão e tamanho variam reversivelmente em consequência das condições de tensão. As estruturas líquido-cristalinas podem se quebrar sob uma determinada tensão e podem se rearranjar depois de cessada (GRASSI et al., 2007b). Devido à organização líquido-cristalina ser mais susceptível à tensão, a coesão das amostras F1d, F2d, F2PFd, F2C971d, F2C974d e F2QSd foi menor que dos hidrogéis. Essa propriedade pode ser interessante para aplicação nasal, já que uma alta coesão pode dificultar a remoção do sistema pelo mecanismo de depuração mucociliar. É interessante salientar que a coesão foi semelhante para os cristais líquidos independente de ser mesofase lamelar ou hexagonal.

Os valores de coesão obtidos para os cristais líquidos foram em média 0,8, o que significa que houve cerca de 20 % de deformação das amostras sob uma ação mecânica. Logo, movimentos em baixas velocidades como os estipulados no teste TPA realizado neste estudo não provocaram uma total desestruturação dos cristais líquidos. Esta característica pode ser uma vantagem para sistemas mucoadesivos de liberação nasal que não podem ser imediatamente removidos pelos mecanismos de depuração mucociliar. Por outro lado, os sistemas também não devem permanecer por muito tempo a ponto de inibir esta função, que é uma proteção do organismo contra a inalação de impurezas do ar e essencial para a respiração. Portanto, a coesão é um parâmetro importante para caracterizar a desintegração da amostra, que pode

ser correlacionada com os efeitos provocados pela depuração mucociliar das mucosas, e assim contribuir para caracterização da mucoadesão *in situ*.

Os resultados mostraram que a incorporação de polímeros mucoadesivos não alterou os parâmetros relacionados à rigidez e nem à adesão e coesão dos sistemas. Portanto, a adição dos polímeros mucoadesivos não promoveu nenhuma mudança na textura dos sistemas.

A avaliação do perfil de textura pode ser extremamente útil para caracterizar as mudanças nas propriedades mecânicas ocorridas nos sistemas misturados com o muco e, em conjunto com a reologia, pode ser uma importante ferramenta para caracterizar a mucoadesão *in situ*. Um sistema mucoadesivo de liberação nasal ideal não deve ser muito rígido e coeso a ponto de impedir totalmente a depuração mucociliar. Apesar das amostras F2d, F2PFd, F2C971d, F2C974d e F2QSd apresentarem menor adesão em relação à F1d, elas possuem menor dureza e resistência à compressão. O menor valor destes parâmetros pode contribuir para uma melhor espalhabilidade da formulação na cavidade nasal. Portanto, apesar de F1d apresentar a maior adesão, sua alta rigidez pode não ser favorável à administração nasal, pois pode obstruir as vias aéreas.

5.10.2. Teste de avaliação da força mucoadesiva

Os parâmetros estudados neste teste foram o P_{MA} e T_{MA} . Os resultados obtidos para os sistemas F1, F2, F2PF, F2C971, F2C974 e F2QS estão apresentados na Figura 24. Eles foram comparados com medidas da água realizadas nas mesmas condições de ensaio, utilizada como branco. Os resultados obtidos para os precursores de cristais líquidos misturados com o FNS (F1d, F2d, F2PFd, F2C971d, F2C974d e F2QSd) estão representados na Figura 25, e foram comparados com o hidrogel de polycarbofil a 5 % (m/v) (PF5) utilizado como padrão.

Figura 24 – Comparação entre as medidas da força mucoadesiva das amostras F1, F2, F2PF, F2C971, F2C974, F2QS e água, utilizando mucosa nasal suína e disco de mucina como mucosa modelo (n=6).

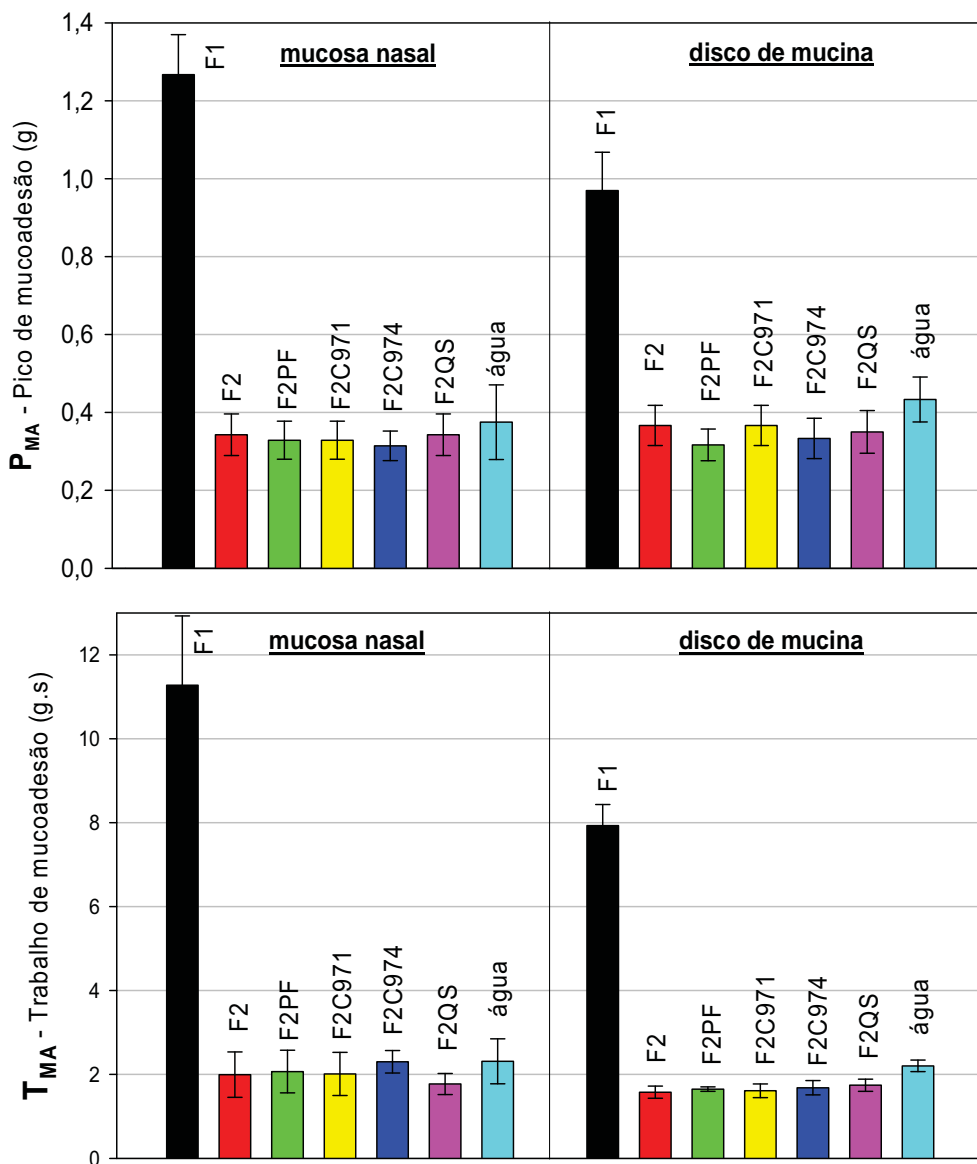
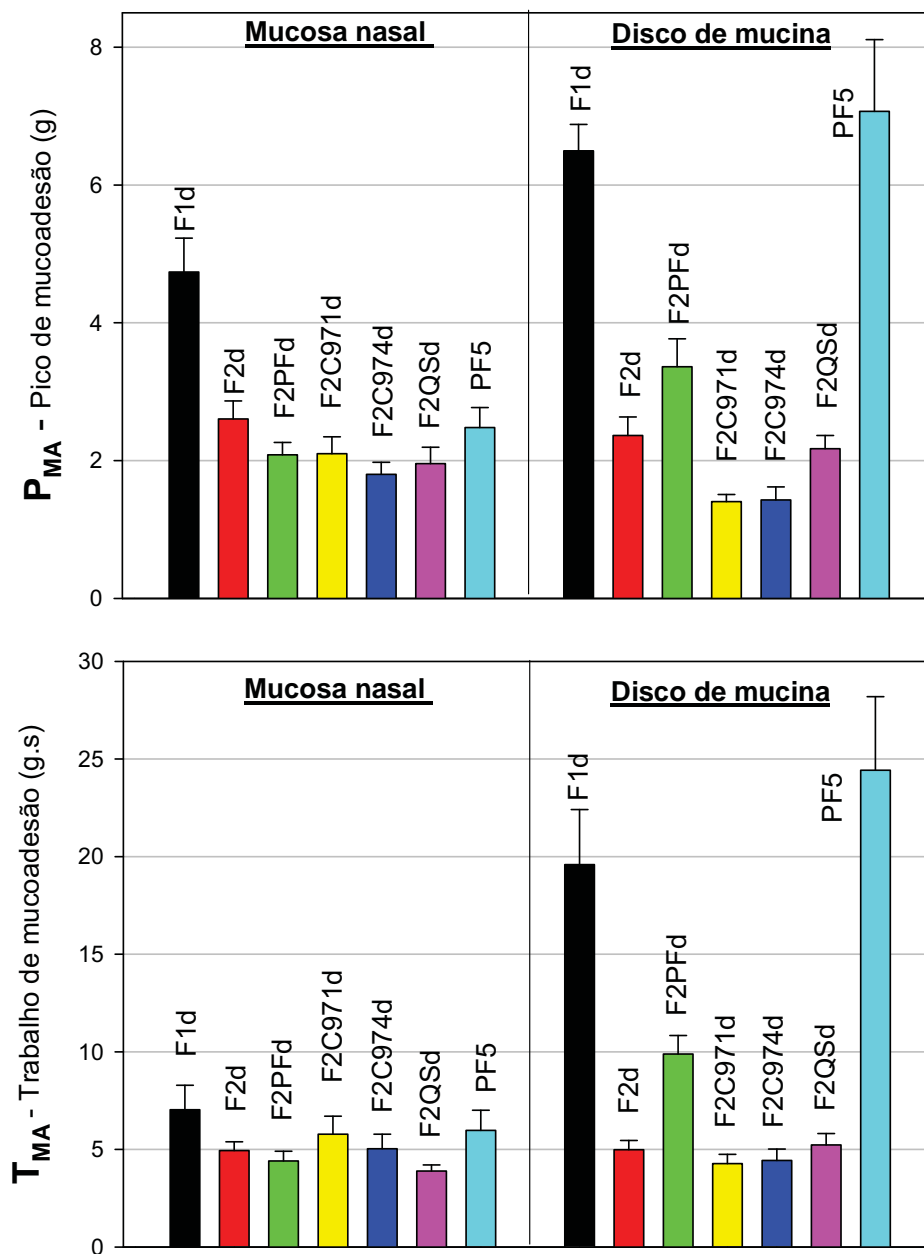


Figura 25 – Comparação entre as medidas da força mucoadesiva das misturas dos sistemas precursores de cristais líquidos com FNS e do padrão PF5, utilizando mucosa nasal suína e disco de mucina como mucosa modelo (n=6).



Os valores dos parâmetros de força mucoadesiva da formulação F1 foram muito maiores que os das formulações F2, F2PF, F2C971, F2C974 e F2QS, independente do modelo de mucosa utilizado. O sistema F1 é uma fase lamelar de alta viscosidade, enquanto as outras formulações são líquidas. Os sistemas líquidos não apresentaram diferença significativa (valor de $P > 0,05$), cujos valores de força foram semelhantes ao da água.

Experimentalmente, durante a fase de retirada da mucosa modelo em contato com a amostra, foi observado que as amostras líquidas se fragmentavam devido a uma falta de coesão interna e, com o destaque, a mucosa modelo sempre levava consigo parte da amostra aderida. Portanto, medidas de força interfacial não são adequadas para amostras líquidas. Estes resultados sugerem que a força de mucoadesão é amplamente influenciada pela viscoelasticidade do material.

A mucoadesão dos sistemas precursores de cristais líquidos diluídos em FNS mostrou ser muito maior em relação aos mesmos sistemas antes da diluição, independente da mucosa modelo utilizada. Este resultado indica que a mudança para uma mesofase com estrutura mais rígida proporciona um aumento na força mucoadesiva.

Os valores de T_{MA} e P_{MA} da amostra F1d foram os mais altos, com resultados semelhantes ao padrão PF5, que é um hidrogel extremamente elástico. Isto mostra como a fase hexagonal, por ser mais estruturada, aumenta a mucoadesão.

As diferenças de resultados encontradas entre as mucosas modelos podem ser explicadas pela porosidade do disco de mucina. Como o disco é formado pelo pó da mucina compactado, a água preenche as irregularidades de sua superfície interna, penetrando entre as cadeias de mucina, provocando seu intumescimento e a formação de uma camada desta glicoproteína hidratada. Neste caso, portanto, a maior mucoadesão obtida pela água foi devida à membrana modelo utilizada. Já a mucosa nasal suína não possui a porosidade interna de um pó compactado. A mucoadesão se dá pela adsorção do líquido em sua superfície, reduzindo a energia livre que se consolida pela formação de ligações fracas (SMART, 2005). Sob este aspecto, tanto a água como os sistemas líquidos F2, F2PF, F2C971, F2C974 e F2QS mostraram ter

a mesma capacidade de adsorção na mucosa nasal suína, já que seus valores de mucoadesão não se diferenciaram.

Os sistemas F2d, F2PFd, F2C971d, F2C974d e F2QSd testados em mucosa nasal suína não apresentaram diferença significativa (valor de $P > 0,05$). Já as análises utilizando disco de mucina mostraram que, dentre as estas amostras, F2PFd exibiu os maiores valores de T_{MA} e P_{MA} (valor de $P < 0,05$). Como esta mistura apresentou o maior sinergismo reológico, ou seja, maior G' em relação às outras misturas F2d, F2C971d, F2C974d e F2QSd, a maior elasticidade pode ter influenciado no aumento da mucoadesão de F2PFd. Porém, tal diferença ocorreu apenas utilizando o disco de mucina; em mucosa nasal suína a mucoadesão de F2PFd não se diferenciou.

Observando as diferenças obtidas entre as mucosas modelos, o disco de mucina não pode ser considerado um substituto da mucosa animal, mas sim um modelo auxiliar no entendimento dos mecanismos de mucoadesão dos sistemas.

Concluindo, com o teste de obtenção da força mucoadesiva pôde ser observado que sistemas líquidos não exibem uma força de retenção e o destaque interfacial causa ruptura da amostra. Porém, a mudança de fase promovida pela diluição dos sistemas em FNS aumentou acentuadamente os valores de T_{MA} e P_{MA} , mostrando que a transformação dos sistemas numa fase líquido-cristalina favorece a mucoadesão.

5.11. Seleção do sistema candidato à administração nasal

O sistema F1 foi o que apresentou maior força mucoadesiva; porém, os testes reológicos de fluxo contínuo e oscilatório de varredura de frequência mostraram que F1 possui uma organização líquido-cristalina com consistência e elasticidade que podem dificultar a administração nasal. O contato com muco artificial promoveu a formação de uma fase hexagonal com elasticidade, dureza e resistência à compressão extremamente elevados, que pode ser prejudicial para a fisiologia nasal. Além disso, F1 incorporou baixa quantidade de AZT.

A solubilidade do AZT no sistema F2 foi muito maior que F1. F2 mostrou fluxo Newtoniano, que facilita a aplicação da formulação pelo gotejamento e

permite sua chegada à cavidade nasal. O contato com o muco o transforma numa fase lamelar com elasticidade, dureza e resistência à compressão não tão elevados; logo, a formação de F2d pode ser menos invasivo contra os mecanismos de depuração mucociliar que a formação de F1d. Mesmo obtendo valor de força de mucoadesão menor que F1d, a formação de F2d promove o aumento da mucoadesão em relação à formulação precursora F2. Este aumento da força somado às características reológicas e mecânicas mais adequadas podem ser propriedades importantes para o delineamento de um sistema de administração nasal. Como a incorporação dos polímeros mucoadesivos policarbofil, C971, C974 e quitosana não promoveu nenhuma alteração nos parâmetros mencionados para F2, os sistemas F2PF, F2C971, F2C974 e F2QS foram descartados. Logo, F2 foi escolhido para os testes de permeação e avaliação pré-clínica.

Figura 26 – Esquema ilustrando o aspecto visual do sistema F2 antes da administração nasal e a formação do sistema F2d por meio do contato com o muco depois da administração. As fotografias de F2 e F2d estão acompanhadas de suas respectivas imagens obtidas por MLP, indicando campo escuro e cruzes de malta, respectivamente.



5.12. Avaliação da permeação *ex vivo*

5.12.1. Método analítico para quantificar o AZT em meio receptor

A curva analítica obtida em tampão fosfato monobásico 20 Mm pH 6,8 com o AZT diluído na faixa de concentração entre 0,1 a 20 µg/mL foi $y = 0,00174x - 0,00013$, com $r^2 = 0,9998$. Os DPRs da inclinação e y-intercepto foram 2,5 % e 7,7 %, respectivamente. Portanto, a curva analítica é linear na faixa de concentração utilizada.

A especificidade e seletividade foram confirmadas pela comparação dos cromatogramas ilustrados nas Figuras 27 a 29. O cromatograma utilizado como referência (Figura 27) foi obtido a partir de uma solução de trabalho de AZT a 10 µg/mL e exibe o pico do fármaco no tempo de retenção de 7 min. A Figura 28 mostra o cromatograma de uma amostra obtida a partir do meio receptor do ensaio de permeação da formulação F2 não carregada, coletada após 1 h de experimento. Neste cromatograma não foi observado nenhum pico perto de 7 min, ou seja, os componentes da formulação e nem o meio receptor interferem na detecção do fármaco. A Figura 29 mostra um cromatograma da amostra do meio receptor obtido a partir do ensaio de permeação da formulação F2A, coletada após 1 h de experimento. O pico do AZT não foi deslocado e nem sofreu a interferência de outras substâncias presentes. Portanto o método analítico validado tem especificidade e seletividade adequada para a detecção do AZT no ensaio de permeação.

O método analítico demonstrou ser preciso e exato, já que os DPR foram menores que 5% e os valores de recuperação obtidos estão dentro dos limites estipulados aceitáveis (BRASIL, 2003b), como pode ser visualizado na Tabela 6.

O LD e LQ, particularmente neste estudo, são muito importantes porque os sistemas de liberação podem liberar quantidades muito baixas de fármaco. As três curvas analíticas obtidas para o cálculo do LD e LQ foram: $y = 0,00176x - 0,00013$; $r^2 = 0,9995$; $y = 0,00177x - 0,00012$; $r^2 = 0,9997$; $y = 0,00169x - 0,00014$; $r^2 = 0,9993$. Com as três curvas analíticas calculou-se o $DP_{y-intercepto} = 0,00001$ e a $IC = 0,00174$. Substituindo-se estes valores nas Equações 1 e 2, o LD e LQ obtidos foram de 0,019 µg/ml e 0,057 µg/mL, respectivamente.

Figura 27 - Cromatograma da solução padrão de AZT a 10 µg/mL em tampão fosfato monobásico 20 mM pH 6,8 ($\lambda = 265$ nm).

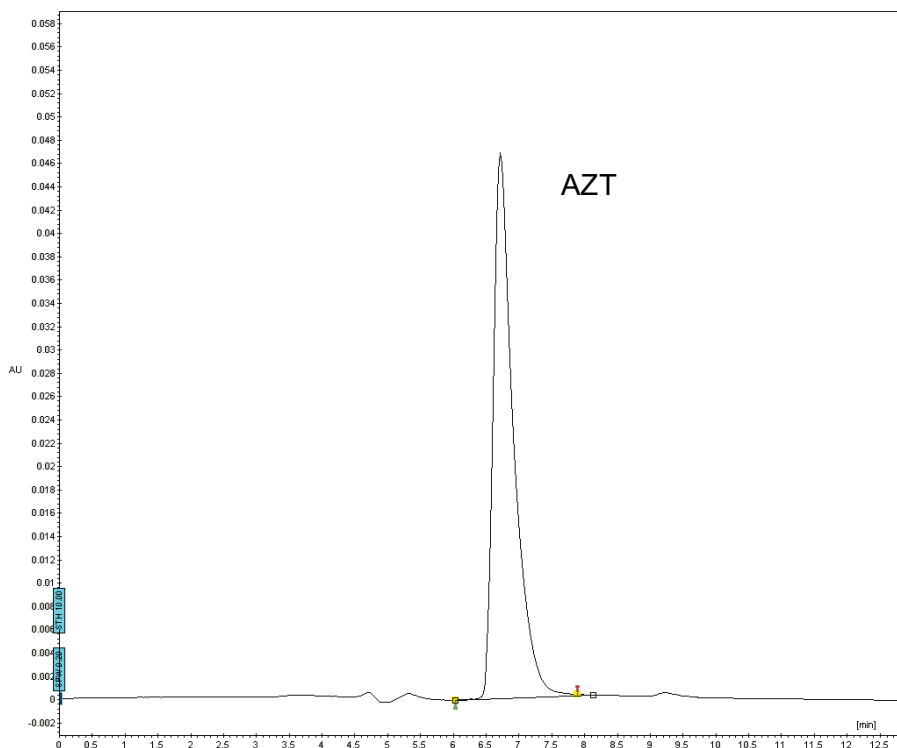


Figura 28 - Cromatograma do meio receptor da amostra F2 após 1h de ensaio de permeação ($\lambda = 265$ nm). O pico indicado por (i) corresponde aos componentes da amostra.

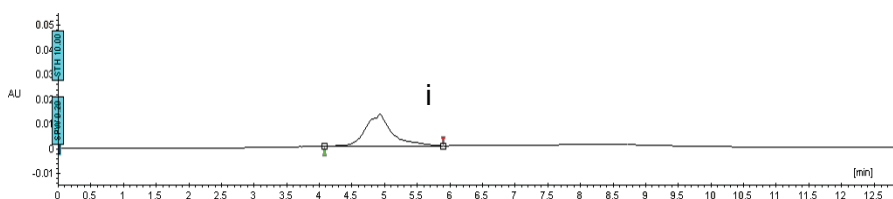


Figura 29 - Cromatograma do meio receptor da amostra F1A após 1h de ensaio de permeação ($\lambda = 265$ nm). O pico indicado por (i) corresponde aos componentes da amostra.

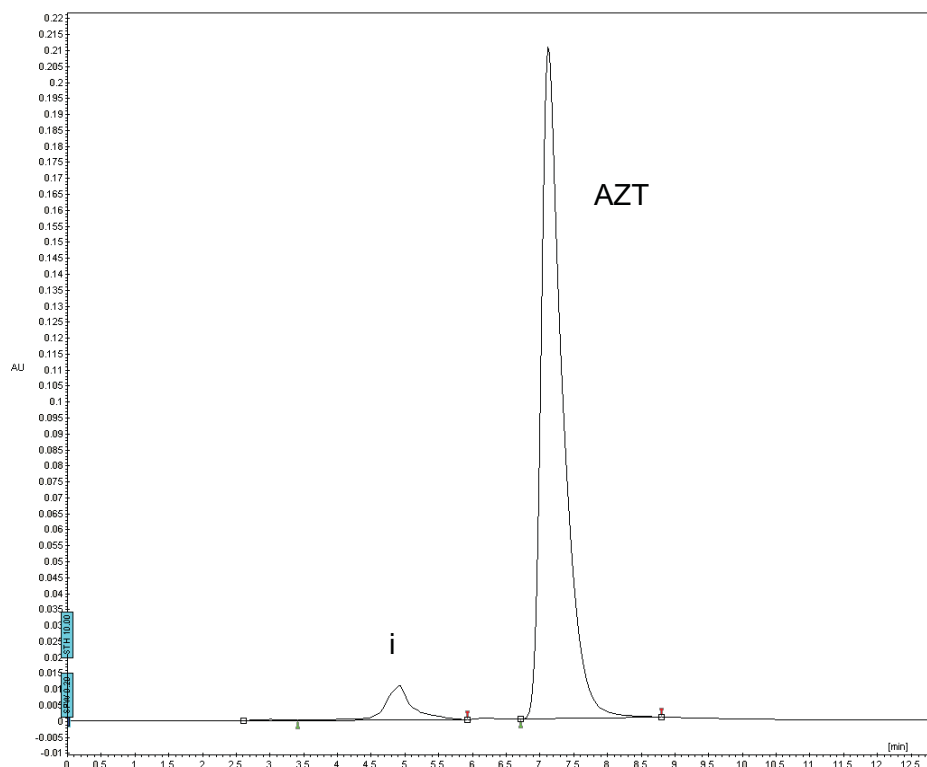


Tabela 6 - Cálculo da precisão e da exatidão (expressa como porcentagem de recuperação) do método analítico para quantificar o AZT no meio receptor.

Concentração teórica de AZT ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão e Exatidão			
	Média ($\mu\text{g/ml}$)	DP	DPR (%)	Exatidão (%)
0,5	0,47	0,02	3,62	94,64
4	3,98	0,09	2,18	99,47
10	9,89	0,45	4,51	98,88

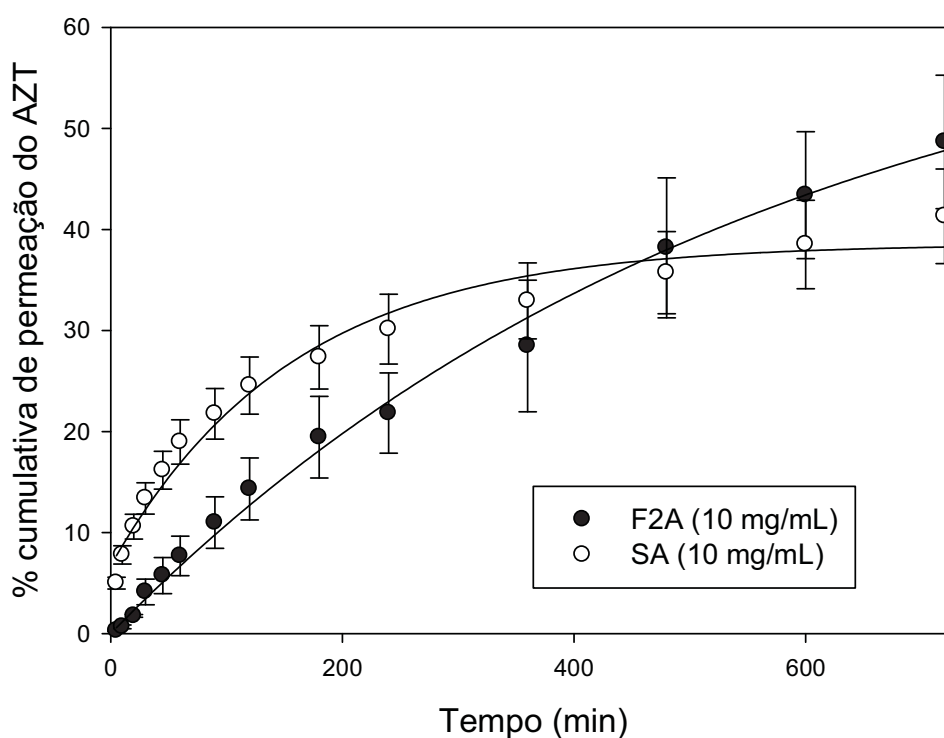
Método analítico validado por CLAE. As amostras foram preparadas pela diluição da solução estoque do AZT (1 mg/mL em metanol) em tampão fosfato monobásico 20 Mm pH 6,8. Os resultados foram obtidos em triplicata. Os limites de aceitação para validação da precisão e exatidão foram os estipulados pela ANVISA (BRASIL, 2003b).

5.12.2. Teste de permeação *ex vivo* utilizando célula de difusão tipo Franz.

A formulação selecionada para este ensaio foi F2A contendo AZT a 10 mg/mL. Além desta amostra, foi realizado o teste de permeação com uma solução aquosa de AZT (SA) contendo o fármaco na mesma concentração.

Os perfis de permeação foram representados graficamente em porcentagem cumulativa de permeação do AZT *versus* tempo e as curvas resultantes estão dispostas na Figura 30.

Figura 30 - Perfil de permeação cumulativa em porcentagem da formulação F2A e solução aquosa (SA).



A amostra SA exibiu um perfil cumulativo de permeação exponencial que durou até os primeiros 240 min de ensaio. Nos tempos seguintes foi atingido um platô em torno de 40 %, em que a concentração do AZT manteve-se constante.

O perfil cumulativo de permeação da formulação F2A foi sempre crescente até o final do ensaio. Embora este perfil tenha sido melhor ajustado ao modelo exponencial que linear, há certa proporcionalidade entre a quantidade de AZT permeada e o tempo, sugerindo que o mecanismo de liberação predominante da formulação F2A seja a difusão. Porém, para confirmar esta hipótese, foram utilizados modelos matemáticos aplicados a sistemas de liberação de fármacos.

Para melhor elucidar os mecanismos de liberação envolvidos, há na literatura vários modelos matemáticos que podem ajustar a curva de liberação experimental e sua adequação pode ser estatisticamente constatada pela observação do r^2 .

O modelamento matemático da liberação de fármacos a partir de sistemas compostos por tensoativos é muito difícil, pois normalmente o sistema é colocado em contato com o meio de liberação que leva a sua diluição e mudança estrutural. Os modelos matemáticos encontrados na literatura consideram apenas microemulsões tipo Winsor IV óleo em água, em que há a presença de meios distintos, como a gotícula oleosa contendo o fármaco, a interface contendo o tensoativo e o meio aquoso externo livre do fármaco (GRASSI et al., 2007a), organização a qual não foi caracterizada neste trabalho.

Apesar da falta de referências encontradas para modelos matemáticos aplicados a sistemas compostos por tensoativos, foram aplicadas neste trabalho algumas equações descritas na literatura que levam em consideração formas farmacêuticas poliméricas. Foram discutidos os modelos de Higuchi (SIEPMANN; PEPPAS, 2011), Korsmeyer-Peppas (KORSEMEYER et al., 1983) e Weibull (PAPADOPOULOU et al., 2006).

O modelo de Higuchi foi elucidado a partir de uma forma farmacêutica de um fino filme de unguento aplicado sobre a pele. Foi considerado que o fármaco estivesse homogeneamente distribuído no filme e que seu coeficiente de difusão não dependesse do tempo e nem da sua posição ao longo do filme.

Além disso, foi levado em conta o não intumescimento e nem sua dissolução durante a liberação, ou seja, a estrutura do veículo não poderia mudar (SIEPMANN; PEPPAS, 2011). Portanto, o modelo de Higuchi não se aplica para o sistema precursor de cristal líquido proposto neste trabalho, pois o mesmo é composto por substâncias polares, apolares e anfífilas, que em combinação formam microambientes distintos os quais o fármaco possui diferentes coeficientes de difusão. Além disso, os sistemas mudam de fase com o contato com o meio receptor, alterando sua estrutura.

Korsmeyer e colaboradores (1983) desenvolveram um modelo simples e semiempírico que relaciona exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo, conhecido como “*Power Law*” (Equação 6).

$$f_t = at^n \quad \text{Equação(6)}$$

em que a é uma constante que incorpora características estruturais e geométricas da forma farmacêutica, n é o expoente de liberação, indicativo do mecanismo de liberação do fármaco e a função de t é M_t / M_∞ (liberação fracional do fármaco). Peppas (1985) utilizou este valor n para caracterizar diferentes mecanismos de liberação, como difusão de Fick, transporte caso I, caso II, super caso II e transporte anômalo. Para usar esta equação é necessário que a liberação ocorra de modo unidimensional e que o sistema possua uma relação largura/espessura ou comprimento/espessura de pelo menos 10 (COSTA; LOBO, 2001), condição encontrada no ensaio de permeação realizado neste trabalho.

O modelo de Kosmeyer e Peppas é genericamente utilizado para analisar a liberação de formas farmacêuticas em que o fármaco inicialmente parte de uma matriz polimérica vítrea, em que o meio de liberação pode penetrar, causando o relaxamento, intumescimento do polímero e aumento do volume da matriz (BRAZEL; PEPPAS, 2000). No caso de sistemas precursores de cristais líquidos, a matriz de liberação parte de um sistema fluido e o meio de liberação provoca a mudança para um estado líquido-cristalino mais rígido. Portanto, o modelo matemático de Kosmeyer e Peppas considera mudanças estruturais que são opostas às que ocorrem com o sistema precursor de cristal líquido F2A, e o valor de n experimental não iria corresponder ao seu

significado real. Devido a estes fatores, o modelo de Kosmeyer e Peppas também não se aplica ao sistema de liberação desenvolvido neste trabalho.

Os modelos matemáticos são deduzidos por análises teóricas do processo de dissolução e liberação do fármaco em função do tempo, considerando a forma farmacêutica. Com o desenvolvimento de novos sistemas de liberação em que vários mecanismos de liberação podem estar presentes, fica difícil adequar fundamentos teóricos nas equações; por isso, modelos empíricos podem ser utilizados (COSTA, LOBO, 2001).

Dentre os modelos empíricos, o modelo de Weibull pode ser aplicado com sucesso em quase todos os tipos de curvas de liberação, apesar de não possuir nenhum fundamento cinético; logo, não caracteriza estes eventos e, por isso, sua aplicação é muito criticada (COSTA; LOBO, 2001). Porém, recentemente alguns autores acharam uma relação da equação de Weibull com alguns mecanismos de difusão (PAPADOPOULOU et al., 2006). A equação de Weibull exprime a fração cumulativa do fármaco em solução em função do tempo t (Equação 7).

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

Equação (7)

Em que a define a escala temporal do processo, T_i representa o intervalo de tempo antes do início do processo de liberação (na maioria das vezes é zero), b é o parâmetro de forma que caracteriza a curva como sendo exponencial ($b=1$; cinética de primeira ordem), sigmoide ($b>1$; cinética rápida) ou parabólica ($b<1$; cinética lenta) (PAPADOPOULOU et al., 2006). Neste modelo, o valor do expoente b é o indicador do mecanismo de transporte do fármaco através da matriz, os quais estão descritos na Tabela 7. O valor de b e r^2 obtidos experimentalmente com o ajuste do modelo de Weibull à curva do perfil de permeação cumulativa em função do tempo está disposto na Tabela 7.

Tabela 7 - Mecanismos de liberação correspondentes ao modelo matemático de Weibull para descrever perfis de dissolução de fármacos. Valor do ajuste (r^2) e do parâmetro b obtido com os dados experimentais da formulação F2A.

Parâmetro b (*)	Mecanismos de liberação	r^2	Valor experimental (F2A)
$b < 0,75$	Difusão de Fick		
$0,75 > b > 1$	Difusão de Fick e transporte anômalo ou caso II		
$b > 1$	Mecanismos complexos de liberação, em que vários mecanismos ocorrem simultaneamente.	0,99	0,719

(*) b é o indicador do mecanismo de transporte do fármaco através da matriz (COSTA; LOBO, 2001).

O ajuste matemático pelo modelo de Weibull mostra que a liberação do AZT é governada por difusão de Fick. Logo, a formação de uma matriz líquido-cristalina não controla a liberação do fármaco.

Além do perfil de liberação, a permeação através da membrana também pode ser matematicamente avaliada a partir da teoria do transporte de massas que envolve o uso das leis de Fick para achar o fluxo (J) e o coeficiente de permeabilidade K_p (TOPP, 2009). Os valores destes parâmetros calculados para F2A e SA estão dispostos na Tabela 8.

Pode ser observado que a formulação F2A aumentou cerca de 20 vezes o fluxo J em relação à solução aquosa SA. A mesma relação foi observada para o coeficiente de permeabilidade K_p . O AZT é um fármaco de classe III, ou seja, possui alta solubilidade e baixa permeabilidade, o que pode explicar a permeação limitada da solução aquosa SA. A maior permeação do fármaco observada para a formulação F2A pode ser devido a uma alteração do epitélio provocada pelo sistema de liberação.

Estes resultados evidenciam o potencial de sistemas compostos por PPG-5-CETETH-20, ácido oleico e água em promover a permeação de

antirretrovirais hidrofílicos como o AZT, que possuem maior dificuldade em permear as membranas biológicas de natureza lipídica. Pode ser sugerido que a presença de moléculas anfífilas e lipofílicas como o tensoativo e o ácido oleico, respectivamente, pode causar um distúrbio nas bicamadas das células, formando poros na superfície do epitélio. É reportado na literatura que aumentando a lipofilicidade, a permeação do princípio ativo através da mucosa nasal normalmente é maior (ARORA, 2002). Além disso, o ácido oleico é conhecido por reduzir o empacotamento dos lipídios presentes nas células epiteliais, favorecendo a permeabilidade de fármacos (NICOLAZZO et al., 2005). Estes efeitos podem ter aumentado a fluidez da camada lipídica e diminuído a resistência à difusão do AZT através da mucosa.

Tabela 8 - Fluxo de permeação (J) e coeficiente de permeabilidade (K_p) obtidos para 200 μ L das amostras F2A e SA (solução aquosa) contendo AZT a 10 mg/mL, dispostas numa área de 1,77cm² de mucosa em contato com o meio receptor mantidos nas condições *sink*.

Amostra	J (μ g/min.cm)	K_p (cm/min)
F2A	0,871 \pm 0,19	8710,3 \pm 1994,4
SA	0,046 \pm 0,011	460,0 \pm 112,4

J e K_p foram calculados pela Equação 5 (WILLIAMS, 2003).

5.13. Avaliação pré-clínica dos sistemas precursores de cristais líquidos

5.13.1. Determinação do método de extração do AZT a partir de plasma de rato para análise por CLAE

Dentre os cinco procedimentos ELL testados, o primeiro em que foi utilizada uma etapa de secagem do solvente resultou em amostras translúcidas em que o AZT não foi detectado. Dentre os outros processos, o que utilizou metanol e TCA na proporção 9:1 (V/V) produziu as amostras mais limpas, resultando em cromatogramas com os picos do AZT mais simétricos e sem interferência de componentes endógenos do plasma. Uma quantidade de 100

μL de plasma foi suficiente para fazer a extração utilizando apenas 100 μL de solvente orgânico, resultando numa recuperação satisfatória do analito. Maiores adições de metanol não aumentou a recuperação do AZT. Portanto, este foi o método de escolha no processo bioanalítico para quantificação do AZT em plasma de rato.

5.13.2. Método bioanalítico para quantificação do AZT em plasma de rato

A curva analítica resultou na regressão linear $y = 0,0002x + 0,0091$, com $r^2 = 0,9999$, cujos DPR da inclinação e y -intercepto foram 0,42 % e 17,58 %, respectivamente.

A seletividade do método analítico foi comprovada pela inexistência de picos dos componentes do plasma na região do tempo de retenção do AZT, que foi em torno de 7 min, e do PI, que saiu em torno de 12 min, como pode ser observado na Figura 31.

O método mostrou-se específico, pois os picos da lamivudina (Figura 31a), efavirenz (Figura 31b) e indinavir (Figura 31c) saíram em tempos de retenção diferentes do AZT e do PI.

A precisão representa a variabilidade dos resultados numa série de análises repetidas em condições experimentais idênticas. A Tabela 9 mostra os valores de DPR abaixo de 5 %, confirmando a precisão do método. A exatidão descreve o grau de veracidade da análise quantitativa e os valores de porcentagem de recuperação estão dentro dos limites aceitáveis (BRASIL, 2003b).

Os valores de recuperação obtidos estão dispostos na Tabela 10 e mostram que o método é eficiente em recuperar a concentração real de AZT existente nas amostras de plasma.

A menor concentração possível de se quantificar o AZT com exatidão e precisão (LQ) foi 50 ng/mL, cujo valor experimental obtido foi 47,32 ng/mL \pm 4,20, com DPR igual a 8,87 %. A concentração que mostrou ASC três vezes maior que o ruído da linha base foi 10 ng/mL com DPR igual a 19,71 %, sendo considerada, portanto, o LD .

Figura 31- Cromatogramas das soluções de trabalho em plasma contendo o AZT e o padrão interno (PI) a 5000 ng/mL. Além do AZT e o PI, o cromatograma (a) contém lamivudina, (b) indinavir e (c) efavirenz, todos na concentração de 5000 ng/mL.

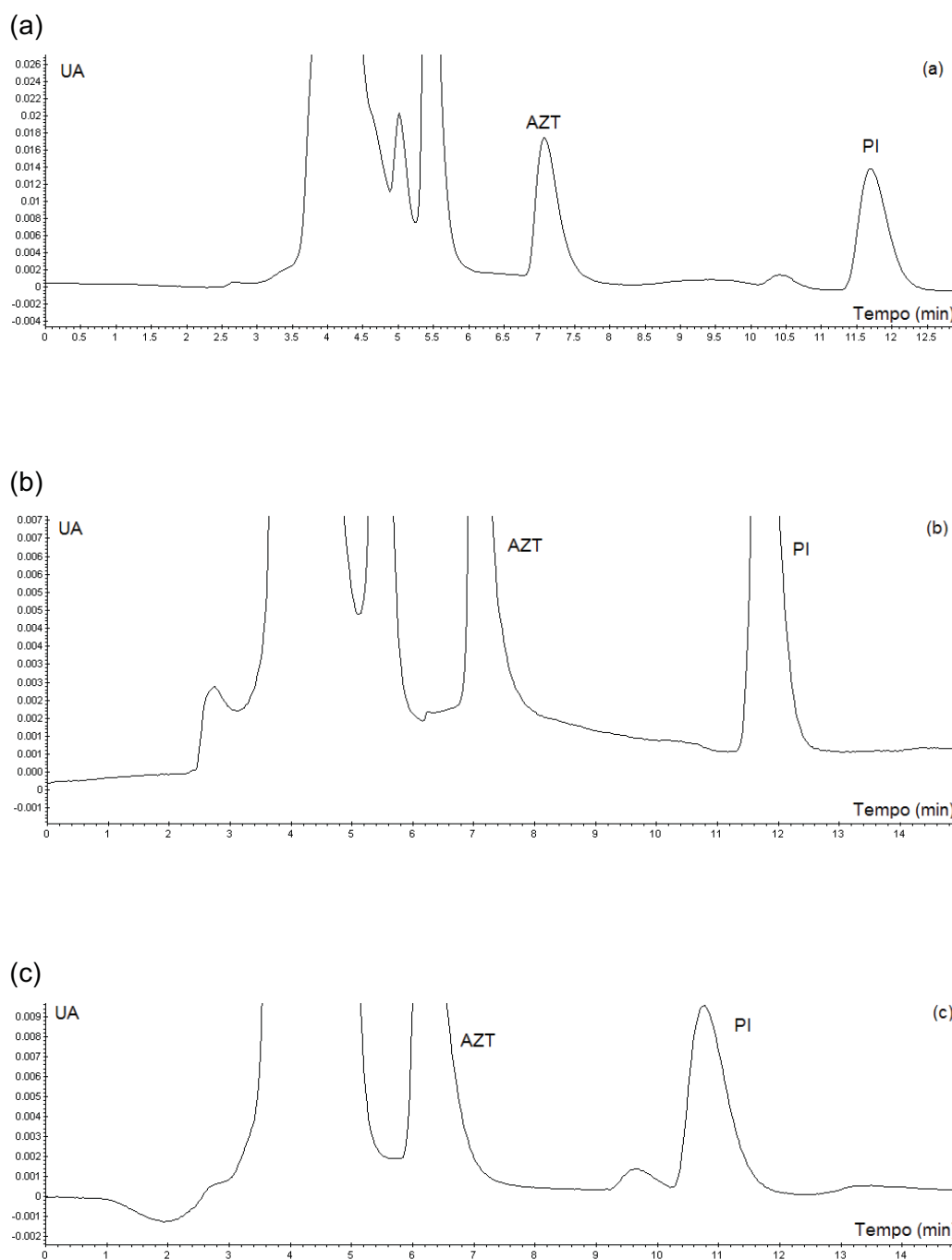


Tabela 9 – Precisão e exatidão intra e interdia obtidos a partir de soluções de trabalho de AZT em plasma analisadas em quintuplicata.

	Concentração teórica de AZT (mg/mL)	Concentração experimental de AZT (mg/mL)	DP	DPR (%)	Exatidão (%)
Intradia	150	138,65	9,53	6,87	92,44
	2500	2498,08	89,96	3,60	99,92
	4000	3582,63	115,36	3,22	89,57
Interdia	150	136,03	9,05	6,65	90,68
	2500	2454,80	73,26	2,98	98,19
	4000	3497,35	120,05	3,43	87,43

As amostras foram preparadas pela extração líquido-líquido segundo o item 4.3.10.1.3. O método analítico foi validado por CLAE e os limites de aceitação da precisão foi DPR < 5% e da exatidão 85-115 % (BRASIL, 2003a).

Tabela 10 - Resultados obtidos no ensaio de recuperação do AZT.

Concentração teórica de AZT (mg/mL)	Concentração experimental (mg/mL)	DP	DPR (%)	Recuperação (%)
150	158,72	3,40	2,14	105,81
2500	2214,03	63,22	2,86	88,56
4000	4018,61	190,53	4,74	100,47

As amostras foram preparadas pela contaminação do plasma com AZT após o processo de extração segundo o item 4.3.10.1.3. A porcentagem de recuperação foi calculada pela relação entre a média experimental e o valor teórico, cujo valor deve estar dentro da faixa de 85 a 115 % (BRASIL, 2003a).

A estabilidade pré-processamento do AZT neste trabalho não foi avaliada devido ao grande número de estudos que comprovaram que este fármaco em plasma é estável por mais de seis meses. No estudo de SOUZA et al. (2009), a estabilidade do AZT em plasma foi testada em intervalos de um, dois e seis meses e o fármaco mostrou ser estável após três ciclos de congelamento. Marchei et al. (2002) não encontrou diferenças significativas na concentração de AZT proveniente de extratos de soluções de trabalho em plasma mantidas durante uma semana a 4, 25 e 60 °C. Tarinas et al. (2007) observaram que a ASC do AZT não sofreu alteração após aquecimento a 57 °C por 40 min, processo utilizado na inativação do HIV.

A estabilidade pós-processamento foi investigada preparando-se cinco extratos a partir de soluções de trabalho de AZT em plasma a 2500 ng/mL que foram injetadas logo após o preparo. Os mesmos extratos foram reinjetados após 24h e a Tabela 11 mostra que os valores de ASC do AZT da segunda injeção estão dentro da faixa aceita para recuperação.

Tabela 11 - Análise da estabilidade dos extratos de soluções de trabalho em plasma contendo AZT a 2500 ng/mL.

	Concentração experimental de AZT (ng/mL)	DP	DPR (%)	Exatidão (%)
Amostras extemporâneas	2422,13	126,04	5,20	96,89
Reinjeção após 24 h	2579,48	117,32	4,55	103,18

As amostras foram preparadas pela extração líquido-líquido segundo o item 4.3.10.1.3.

Valores representam a média de seis replicatas

5.13.3. Animais e administração dos sistemas

O peso de cada animal utilizado e o volume do respectivo sistema de liberação administrado está disposto na Tabela 12.

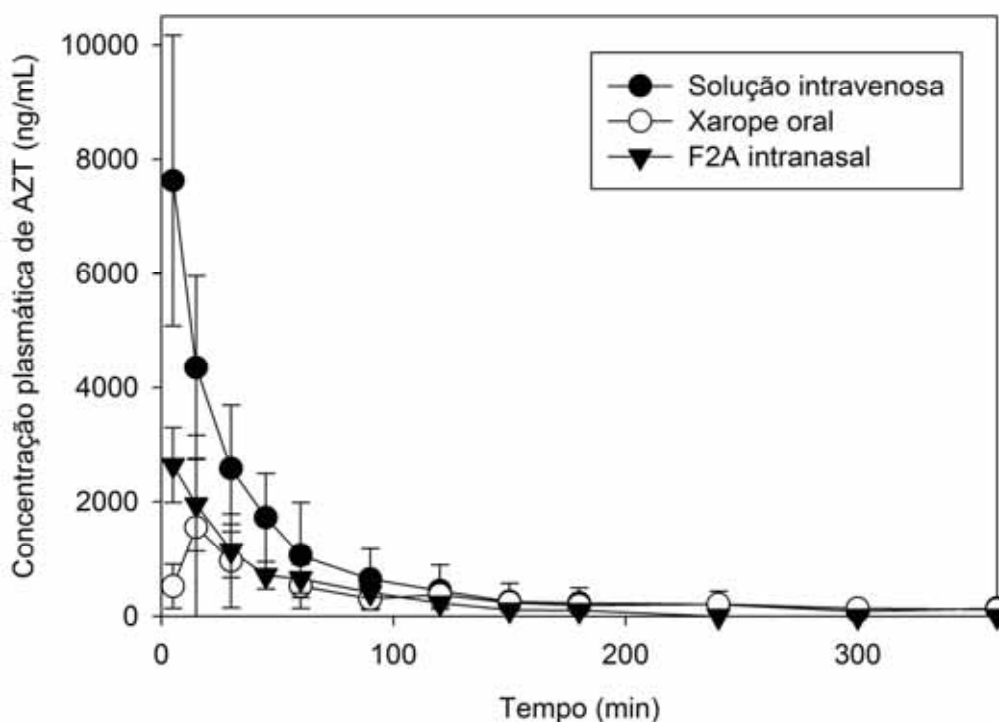
Tabela 12 - Cálculos dos volumes das formulações administradas em cada animal nos ensaios pré-clínicos.

Grupo	Animal	Peso (g)	Dose de AZT (mg/kg)	Massa de AZT a ser administrada em cada animal (mg)	Volume administrado (µL)
I (solução injetável de AZT a 10 mg/mL)	1	263	8	2,10	210
	2	260	8	2,08	208
	3	247	8	1,98	198
	4	249	8	1,99	200
	5	260	8	2,08	208
	6	255	8	2,04	204
II (xarope oral de AZT a 10 mg/mL)	1	266	8	2,13	213
	2	250	8	2,00	200
	3	267	8	2,14	214
	4	269	8	2,15	215
	5	262	8	2,10	210
III (F2A nasal contendo AZT a 35 mg/mL)	1	271	8	2,17	62
	2	275	8	2,20	63
	3	263	8	2,10	60
	4	265	8	2,12	61
	5	277	8	2,22	63
	6	262	8	2,10	60

5.13.4. Análise farmacocinética

Nos estudos *in vivo* foram determinados os parâmetros farmacocinéticos da formulação precursora de cristal líquido F2A administrada pela via nasal em ratos e comparados com os parâmetros obtidos pela administração oral e intravenosa de formulações convencionais (xarope oral e solução injetável). A Figura 32 mostra os perfis de concentração plasmática de AZT *versus* tempo obtido para os três grupos estudados e os parâmetros farmacocinéticos calculados estão na Tabela 13.

Figura 32 – Perfil de concentrações plasmáticas médias de AZT *versus* tempo obtidas com a administração intravenosa, oral e intranasal de 8 mg/kg de AZT em ratos, sendo cinco replicatas por grupo.



Para a via intravenosa o pico de concentração máxima de AZT ($C_{max} = 5446,6$ ng/mL) é obtido no primeiro tempo de coleta (5 min). Após este pico, os níveis plasmáticos decaem rapidamente com o tempo.

O perfil de concentração plasmática do AZT obtido com a administração nasal de F2A mostra uma fase de absorção imediata, resultando numa curva de concentração plasmática *versus* tempo comparável com a administração intravenosa da solução injetável. A concentração plasmática máxima de AZT obtida com a administração nasal de F2A foi de $C_{max} = 2445,1$ ng/mL, duas vezes maior que o valor obtido pelo xarope oral ($C_{max} = 1112,4$ ng/mL). O tempo para atingir a C_{max} levado pela formulação F2A intranasal foi $T_{max} = 6,67$ min, enquanto o grupo xarope oral levou 33,0 min. Ou seja, a formulação precursora de cristal líquido promoveu uma absorção do AZT maior e cinco vezes mais rápida que a via oral.

Tabela 13 - Parâmetros farmacocinéticos calculados a partir das curvas de concentrações plasmáticas de AZT *versus* tempo obtidas com a administração intravenosa, oral e intranasal de solução injetável, xarope e F2A, respectivamente, contendo AZT na dose de 8 mg/kg.

Parâmetros	Grupo I	Grupo II	Grupo III
	Solução injetável (AZT a 10 mg/mL)	Xarope (AZT a 10 mg/mL)	F2A (AZT a 35 mg/mL)
$ASC_{0-\infty}$ (ng.min/mL)	296247,8 ± 165752,2	124801,8 ± 46580,6	136155,5 ± 38354,7
C_{max} (ng/mL)	5446,6 ± 1533,8	1112,4 ± 610,7	2445,1 ± 596,5
T_{max} (min)	5,00 ± 0,00	33,00 ± 32,52	6,67 ± 4,08
V_d (mL/kg)	1573,1 ± 467,3	2569,4 ± 1368,6	1572,9 ± 344,9
K_{el} (1/min)	0,021 ± 0,008	0,014 ± 0,008	0,019 ± 0,005
$T_{1/2}$ (min)	37,89 ± 15,40	61,31 ± 26,87	40,02 ± 14,85
Cl (mL/min/kg)	31,89 ± 11,36	29,31 ± 7,86	29,13 ± 9,61
F (%)		42,13 ± 0,16	45,96 ± 0,13

C_{max} - pico de concentração plasmática máxima; T_{max} - tempo para alcançar a C_{max} ; V_d - volume aparente de distribuição; K_{el} - constante de velocidade de eliminação; $t_{1/2}$ - meia vida de eliminação; ASC_{0-T} e $ASC_{0-\infty}$ - área sob a curva de 0-t e de 0-∞; Cl - clearance total aparente; F - fator de biodisponibilidade.

Os resultados estão representados pela média de 5 a 6 animais; os dados foram comparados pelo teste t não paramétrico (Mann Whitney) com nível de significância de 0,05. As doses foram dadas por administração única e as amostras de sangue foram coletadas nos tempos 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 2,5 h, 3 h, 4 h, 5 h e 6 h.

A fase de distribuição do AZT foi semelhante para os três grupos, pois os valores de V_d não apresentaram diferença estatisticamente significativa (valor de $P > 0,05$). O mesmo ocorre com a fase de eliminação, já que os valores de $T_{1/2}$, K_{el} e Cl são semelhantes (valor de $P > 0,05$). Portanto, a alteração das vias de administração, independente do sistema de liberação administrado, não afetou a taxa de eliminação do AZT, e para os três grupos houve o rápido decaimento da concentração plasmática do fármaco com o tempo. A diferença entre os perfis de concentração plasmática entre os grupos I, II e III está apenas na fase de absorção.

Para obtenção da biodisponibilidade, o cálculo da $ASC_{0-\infty}$ mostra que o valor obtido para o grupo nasal (136155,5 ng/mL.min) não possui diferença estatisticamente significativa comparado com o grupo oral (124801,8 ng/mL.min) (valor de $P > 0,05$). Logo, os valores de biodisponibilidade obtidos para o grupo nasal (45,96 %) e para o grupo oral (42,12 %) são estatisticamente semelhantes (valor de $P > 0,05$).

Apesar da biodisponibilidade obtida pelo sistema de liberação administrado via nasal seja similar à observada pelo xarope administrado via oral, a via nasal apresentou uma variação individual muito menor que a via oral. Este resultado indica que a via nasal pode promover a mesma resposta em todos os sujeitos, já que esta rota impõe menos barreiras para absorção do fármaco, diferente da via oral que é conhecida pela alta variabilidade interindividual.

A literatura reporta que a baixa biodisponibilidade oral do AZT é devido ao seu efeito pré-sistêmico e instabilidade gastrointestinal. Logo, por evitar estes efeitos, era esperado que a via nasal aumentasse a biodisponibilidade do AZT. Contudo, isto não foi observado experimentalmente. Pode ser sugerido que o sistema tenha sido removido da cavidade nasal pelo mecanismo de depuração mucociliar e se direcionado para o trato gastrointestinal. Porém, os testes que caracterizaram a viscoelasticidade, perfil de textura e mucoadesão do sistema indicam que ele apresenta grande potencial para evitar esta remoção imediata. Por outro lado, outra possibilidade seria o fármaco não ter permeado a mucosa. Porém o ensaio de liberação *ex vivo* foi muito importante para provar que o sistema F2A promove a permeação do AZT sem reter sua liberação. Desta maneira, pode ser sugerido que o AZT tenha direcionado para

outros compartimentos do organismo diferentes do sangue, como o SNC, o que não levou a uma maior quantificação do AZT na corrente sanguínea.

Muitos estudos reportam que os fármacos podem ser transportados diretamente para o SNC quando administrados via nasal. O cérebro se comunica com o meio externo através da cavidade nasal pela rota olfatória (Figura 1), que pode ser uma potencial porta de entrada para liberação de fármacos que agem no SNC. O trabalho de VED e KIM (2011) comprovou que a administração nasal de um gel termossensível preparado com poloxamer 407 em tampão contendo o promotor de permeação n-tridecil- β -D-maltosídeo promoveu a absorção e distribuição do AZT em cérebro de coelhos. Esta propriedade é muito interessante como alternativa ao tratamento da AIDS, pois o SNC é um órgão de alojamento do HIV. O vírus da AIDS pode provocar várias anormalidades no SNC, desde dores e encefalites até demência. Como os resultados mostraram que a formulação F2A é um potencial sistema estímulo-sensitivo que promove a mucoadesão e permeação do AZT, pode ser sugerido que o fármaco tenha se direcionado para o SNC, o que explicaria o valor de biodisponibilidade obtido. Porém, para comprovar esta hipótese, são necessários mais estudos que visam à quantificação do AZT no cérebro dos animais. Logo, sistemas precursores de cristais líquidos pode ser uma opção terapêutica promissora no tratamento de desordens no SNC causadas pelo HIV.

Tendo em vista os parâmetros farmacocinéticos obtidos, o sistema desenvolvido mostrou promover um pico de absorção do AZT maior e muito mais rápido que a formulação convencional administrada via oral. Esta rápida resposta foi resultado do comportamento de fases do sistema composto por PPG-5-CETETH-20/ ácido oleico/ água que favoreceu a mucoadesão e a permeação do AZT, propriedades que podem ser estendidas para outros antirretrovirais. Portanto, esta nova plataforma tecnológica pode contribuir para a criação de alternativas ao tratamento da AIDS.

6. DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar a farmacocinética de sistemas mucoadesivos de liberação precursores de cristais líquidos para promover a mucoadesão e absorção nasal do AZT.

A estratégia utilizada foi o desenvolvimento de sistemas compostos pelo tensoativo PPG-5-CETETH-20 capazes de formarem diferentes mesofases devido ao seu comportamento liotrópico em presença de fase aquosa. Esta propriedade foi empregada no delineamento de sistemas de baixa viscosidade e de fácil administração nasal que mudam para uma fase líquido-cristalina com estrutura mais organizada através do contato com o muco nasal aquoso.

Foi mostrado em estudos prévios que o tensoativo PPG-5-CETETH-20 combinado com diferentes fases oleosas forma sistemas líquidos, isotrópicos e transparentes que mudam para fases líquido-cristalinas mais organizadas em contato com a água (CARVALHO et al., 2012). Este foi o mecanismo explorado neste trabalho no desenvolvimento de um novo sistema de geleificação sensível a estímulos fisiológicos. O estímulo neste caso é o contato com a água presente no muco nasal, e a geleificação, na verdade, foi representada pela formação da matriz líquido-cristalina. Desta maneira, os sistemas aqui desenvolvidos foram também denominados como precursores de cristais líquidos.

Para a determinação do comportamento de fases do tensoativo PPG-5-CETETH-20, foram construídos diagramas de fases binários e ternários em combinação com água, fosfatidilcolina e ácido oleico. Para escolha das formulações precursoras de cristais líquidos, a análise do comportamento de fases é essencial para entender que fatores podem levar às mudanças de fases, como a concentração de cada componente e suas estruturas químicas. A determinação do comportamento de fases é importante porque conhecendo as condições em que a formulação estará sujeita, as mudanças estruturais podem ser previstas, sendo, portanto, uma excelente ferramenta para caracterizar sistemas de liberação compostos por tensoativos.

Os resultados mostraram que o tensoativo PPG-5-CETETH-20 combinado com quantidades crescentes de água pode formar sistemas transparentes, isotrópicos e líquidos que transitam para a fase hexagonal e

depois para a fase cúbica. Estas duas fases líquido-cristalinas, apesar de serem muito exploradas na literatura como matrizes mucoadesivas, no caso da via nasal, podem provocar sua obstrução devido à alta organização estrutural do sistema. A combinação de um terceiro componente nas misturas PPG-5-CETETH-20/ água, como a fosfatidilcolina e o ácido oleico, em determinadas proporções, resultaram na formação da fase lamelar ou na sua mistura com a fase hexagonal, resultando em fases não tão rígidas como a fase hexagonal pura e a fase cúbica.

Foram escolhidos dois sistemas para caracterização físico-química, um contendo PPG-5-CETETH-20/ fosfatidilcolina/ água (F1) e outro contendo PPG-5-CETETH-20/ ácido oleico/ água (F2). A formulação F1 foi caracterizada como uma fase lamelar e F2 como um sistema líquido e isotrópico.

No sistema F2 foram adicionados polímeros mucoadesivos como o policarbofil, C971, C974 e quitosana, porém, o estudo das propriedades reológicas, mecânicas e mucoadesivas mostrou que nenhum polímero testado promoveu alterações significativas na formulação.

O estudo do comportamento de fases das formulações em presença de muco artificial mostrou que F1 transforma-se numa mistura de fases lamelar e hexagonal com a diluição em FNS e a formulação F2 muda para a fase lamelar. Portanto, foi possível obter sistemas precursores de cristais líquidos que mudam de fase através do contato com o muco e se transformam em sistemas com maior grau de organização estrutural que as formulações de origem.

A caracterização reológica de fluxo contínuo mostrou que a formulação F1, apesar de ter alto índice de consistência, possui fluxo pseudoplástico, ou seja, há o afinamento do fluxo com o cisalhamento, e esta capacidade pode permitir a administração da formulação na cavidade nasal. Já a formulação F2 não apresenta nenhuma dificuldade para a administração nasal, pois possui fluxo Newtoniano e seu escoamento é livre.

A utilização da reologia para caracterização de sistemas mucoadesivos foi proposta primeiramente por Hassan e Gallo (1990), utilizando ensaios viscosimétricos para analisar macroscopicamente a interação formulação-mucina. A partir deste teste, é possível caracterizar a mucoadesão através do monitoramento das mudanças viscosimétricas do sistema formado pela mistura

da mucina e da formulação. A maior desvantagem do método é a quebra das cadeias formadas pelo polímero e a mucina sob escoamento contínuo. Para evitar este problema, adaptou-se o método viscosimétrico utilizando a reologia oscilatória (CALLENS et al., 2003; HÄGERSTRÖM, 2003). Partindo do mesmo pressuposto de que a resposta reológica da mistura formulação-muco deve ser maior que as contribuições da formulação e do muco isolados, pode ser obtido o parâmetro denominado sinergismo reológico. Este método é mais vantajoso em relação ao de origem, pois a reologia oscilatória é uma técnica não destrutiva, que mede, simultaneamente, tanto a viscosidade como o comportamento elástico e pode ser usada para determinar mucoadesão entre polímeros e mucina (CALLENS et al., 2003).

Neste trabalho, o ensaio de reologia oscilatória mostrou que a viscoelasticidade das formulações após o contato com o muco nasal é alterada e os sistemas se tornam mais elásticos do que líquidos. A resposta reológica da mistura dos sistemas com FNS foi maior que as formulações isoladas, apresentando, portanto sinergismo reológico. Esta mudança reológica obtida pode ser o mecanismo que promove a mucoadesão dos sistemas *in vivo*.

As formulações designadas para aplicação tópica, como a administração nasal, devem apresentar características mecânicas aceitáveis, por exemplo, baixa dureza e boa retenção. Estas propriedades podem ser determinadas pelo teste TPA. Esta técnica pode ser muito relevante para o delineamento de novos sistemas de liberação de fármacos, já que a compressão e dureza estão relacionadas com a remoção do produto do frasco, facilidade de aplicação no substrato; a adesão pode estar relacionada com a mucoadesão. Esta técnica também dá informações sobre o efeito de repetidos cisalhamentos na estrutura da amostra (coesão), que podem ser complementadas com a reologia (JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997).

A análise por TPA neste trabalho mostrou que a adesão está intimamente relacionada com a maior rigidez da amostra. Este efeito foi observado na amostra F1d, que no ensaio oscilatório apresentou maior elasticidade e no teste TPA apresentou maior dureza e resistência à compressão; logo, obteve a maior adesão. Este resultado está relacionado com a presença da fase hexagonal, que é mais organizada e estruturada que a fase lamelar presente em F2d.

A caracterização da mucoadesão pode ser realizada pela associação de diversas técnicas, como os testes reológicos em associação ao texturômetro. As condições experimentais de ambos são diferentes e as técnicas podem ser complementares. A reologia e o teste TPA investigaram as mudanças do sistema na presença do muco. No entanto, estas técnicas não deram informações no que ocorre na interface sistema-mucosa, pois as duas fases – muco e formulação – foram misturadas previamente ao experimento. Desta maneira, o texturômetro foi adaptado para medir a força mucoadesiva criando-se artificialmente uma interface entre formulação e mucosa.

Com os resultados de medida da força mucoadesiva obtidos neste trabalho é possível constatar que no caso de sistemas líquidos, independente da composição, a força mucoadesiva é a mesma e semelhante à água pura. Porém, o aumento da elasticidade destes sistemas, devido à mudança para uma fase líquido-cristalina promovida pela diluição em FNS, aumentou acentuadamente a força de mucoadesão.

Portanto, pode-se sugerir que há uma correlação entre o sinergismo reológico, os parâmetros de textura e a força mucoadesiva, pois quando a mistura formulação-muco produz sinergismo reológico e aumento nos parâmetros de textura, é observado um correspondente aumento na força mucoadesiva. Trabalhos de JONES et al. (2000), (2001), (2009) também reportaram que as propriedades mecânicas e reológicas estão estritamente relacionadas com a retenção da formulação nas mucosas. Quanto maior a elasticidade, maior a resistência ao destacamento do sistema de liberação.

Apesar do sistema mais mucoadesivo ser F1, ele obteve elasticidade, dureza e compressibilidade muito elevados, o que pode levar à obstrução da via nasal e desconforto do paciente. Além disso, a solubilidade do AZT em F1 foi muito baixa. Desta maneira, a formulação selecionada para os estudos *ex vivo* e *in vivo* foi a F2. Embora os resultados sugiram que a formulação F1 não seja adequada para o objetivo deste trabalho, eles foram muito importantes para apresentar seu grande potencial na aplicação em outras vias de administração que exigem maior elasticidade e resistência à compressão, como a via vaginal, bucal e retal.

O comportamento de fases de F2 mostrou-se mais adequado para via nasal, pois sua diluição aquosa indicada no diagrama de fases ternário mostra

que F2 transita para a fase lamelar e com uma maior diluição aquosa há a separação de fases. Isto significa que o sistema parte de uma forma líquida facilmente administrada e o contato com a água presente no muco pode transformar o sistema numa fase lamelar mais viscosa que pode ficar retida por mais tempo na cavidade nasal. Com a renovação do muco e o contato com mais água, o sistema separa fases, sendo facilmente eliminado, pois ele não pode ficar retido a ponto de inibir a depuração mucociliar.

Pode-se atribuir a mucoadesão de F2 ao aumento da viscosidade do sistema, porém, mais mecanismos podem estar envolvidos. A absorção de água do muco devido à diferença de pressão osmótica pode promover uma maior interação e a mistura com o mesmo. Logo, a consolidação da ligação mucoadesiva pode ser resultado também de interações intermoleculares entre os componentes da formulação e o muco. O PPG-5-CETETH-20 pode interagir por ligações de hidrogênio, devido às 20 unidades de óxido de etileno em sua cadeia. O ácido oléico e a cadeia cetílica do tensoativo pode aumentar o contato por interações hidrofóbicas. O aumento dessas ligações fracas pode promover a interpenetração das cadeias poliméricas da mucina entre as moléculas do tensoativo e ácido oléico, consolidando o contato muco-sistema. Portanto, a mucoadesão de F2 pode ser resultado não só do sinergismo reológico, mas também de outros mecanismos de mucoadesão, como as teorias da desidratação e da interpenetração de cadeias poliméricas (SMART, 2005).

Para um maior entendimento da estrutura formada nos sistemas F2 e F2d, eles foram analisados em estudos posteriores por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) (CARVALHO, 2009; CARVALHO et al. 2010a). Neste ensaio, as estruturas líquido-cristalinas podem ser aferidas de acordo com a posição dos picos de difração no eixo do vetor de espalhamento q . Para estruturas lamelares, a posição relativa dos picos devem obedecer à relação 1:2:3. Esta relação foi encontrada para o sistema F2d a 32 °C, confirmando sua estrutura lamelar visualizada na MLP. Além disso, com este teste é possível obter o parâmetro espacial d , que mede a distância de correlação entre duas lamelas adjacentes ou entre o centro de duas gotículas. Os resultados mostraram que as distâncias obtidas para F2 e F2d foram de 5,76 nm e 11,1 nm, respectivamente. Logo, estes dados confirmam que estes sistemas apresentam uma organização nanoestruturada.

O perfil de permeação do AZT a partir do sistema F2A foi estudado por uma técnica *ex vivo* envolvendo o emprego de células de difusão tipo Franz e mucosa nasal suína. As técnicas *in vitro* e *ex vivo* são eficientes, econômicas e podem ser usadas nos estágios preliminares do desenvolvimento de novos sistemas de liberação, auxiliando na escolha do melhor insumo e da melhor forma farmacêutica. Além disso, o teste *ex vivo* realizado neste trabalho possui uma vantagem ética, pois a mucosa foi obtida de porcos de abatedouro, evitando o sacrifício de animais (OSTH; GRASJO; BJORK, 2002).

O ajuste da curva de permeação ao modelo matemático de Weibul sugere que a liberação do AZT segue a difusão de Fick. Embora muitas vezes a liberação controlada de fármacos seja desejada no delineamento de novos sistemas de liberação, a via nasal requer uma absorção rápida, levando-se em consideração o mecanismo de depuração mucociliar que remove o muco em aproximadamente 20 min e, conseqüentemente, a formulação. Como o objetivo da formação de uma matriz líquido-cristalina pelo sistema F2A é promover a mucoadesão, a avaliação do mecanismo de liberação do AZT foi importante para verificar que mesmo com a formação de um cristal líquido mais rígido e organizado estruturalmente, não houve o prolongamento da liberação do AZT. Além disso, a formulação aumentou o fluxo e o coeficiente de permeabilidade do fármaco através da mucosa nasal, o que é extremamente importante para promover a absorção rápida do AZT administrado via nasal.

Os testes pré-clínicos em ratos foram realizados para estudar a liberação nasal do AZT *in vivo*. Os resultados revelaram que a formulação F2A administrada pela via nasal alcançou um C_{max} duas vezes maior que o xarope oral, sendo que o tempo para atingir tal concentração foi cinco vezes mais rápido. Estes dados comprovam a hipótese proposta neste trabalho, ou seja, sistemas mucoadesivos administrados via nasal podem promover uma absorção do fármaco mais rápida que a via oral, principalmente devido à capacidade de aumentarem o contato da formulação com a mucosa.

O perfil de concentração plasmática do AZT do grupo intranasal mostrou menor variabilidade individual que o grupo via oral. Isto pode ser resultado do menor número de barreiras que a via nasal oferece e que promove o transporte direto do fármaco para a corrente sanguínea. Além da menor variação, estas características resultam num perfil de concentração plasmática do fármaco

semelhante à via intravenosa, como pode ser comprovado pela forma das curvas de concentrações plasmáticas do AZT *versus* tempo obtido para a via nasal e intravenosa visualizado na Figura 32. Portanto, a via nasal é uma excelente rota para atingir níveis plasmáticos de fármaco mais altos e de forma mais rápida.

Apesar do perfil de concentração plasmática do AZT ter sido modificado com a administração nasal de F2A em relação à via oral, a biodisponibilidade do AZT não foi aumentada. Este resultado foi importante para verificar que se um fármaco possui baixa meia vida, para seus níveis plasmáticos serem mantidos constantes e efetivos, as estratégias utilizadas neste trabalho em aumentar o tempo de residência da formulação em contato com a mucosa nasal e promover a permeação não são suficientes. Elas foram importantes para promover a mucoadesão e absorção do fármaco, porém, para a fase de distribuição e eliminação do AZT ser modificada, é necessário que o sistema controle sua liberação. Porém, este processo não pode ser dependente da matriz líquido-cristalina em contato com a mucosa, porque a depuração mucociliar é muito importante para a respiração e não poderia ser inibida por muito tempo.

Uma alternativa para prolongar a liberação do AZT seria sua encapsulação em nanocarreadores, embora a encapsulação de moléculas hidrofílicas como o AZT não seja uma tarefa fácil. Devido ao reduzido tamanho, o nanocarreador pode ser permeado através da mucosa e atingir a corrente sanguínea, onde irá liberar o fármaco de forma modificada. Porém, para estes nanocarreadores atingirem a cavidade nasal e ultrapassarem a mucosa, é necessária a utilização de um veículo mucoadesivo. Este veículo pode ser um sistema de geleificação estímulo-sensitivo, como o sistema precursor de cristal líquido aqui desenvolvido.

Portanto, para prolongar a liberação do AZT, é necessária a associação de mais estratégias. Desta maneira, este estudo foi muito importante para abrir novas perspectivas e ser um ponto de partida para o delineamento de sistemas de liberação nasais mucoadesivos que promovam a absorção e a manutenção de uma concentração plasmática do fármaco efetiva e controlada. Cristais líquidos compostos por PPG-5-CETETH-20, ácido oleico e água possuem comportamento de fases, propriedades reológicas e mecânicas que podem

facilitar a administração nasal e favorecer a mucoadesão. Foi comprovado que a formação da matriz líquido–cristalina não retém a liberação do AZT e pode aumentar a permeação do fármaco através da mucosa. Esta nova plataforma tecnológica representa uma promissora ferramenta para o desenvolvimento de sistemas mucoadesivos de liberação, que pode ser explorada tanto para a via nasal como para outras vias de administração. Além disso, torna possível considerar futuros locais de administração do AZT, assim como de outros antirretrovirais, abrindo portas para criação de alternativas para o tratamento da AIDS.

7. CONCLUSÕES

A construção de diagramas de fases permitiu verificar que é possível modular o comportamento de fases de sistemas compostos pelo tensoativo PPG-5-CETETH-20 de acordo com os requisitos exigidos pela via de administração. A associação deste tensoativo com componentes de diferentes características tensoativas, como a fosfatidilcolina e ácido oleico, ou também alterando suas proporções, permite projetar sistemas com diferentes propriedades reológicas e mecânicas, que podem ser exploradas para diversas vias de administração. No caso específico deste trabalho, esta plataforma tecnológica permitiu o delineamento de sistemas de baixa viscosidade adequados para administração nasal que se transformam em cristais líquidos mais organizados estruturalmente com a diluição em fluidos fisiológicos, que puderam promover a mucoadesão e absorção do AZT através da mucosa nasal.

Este trabalho mostrou que sistemas compostos por tensoativos, dependendo da sua organização estrutural, podem favorecer muito a solubilização de fármacos, o que é extremamente importante para a via nasal, já que ela permite apenas a administração de um pequeno volume de formulação, o qual deve conter a dose.

Além da solubilização de fármacos, os resultados mostraram que sistemas compostos por tensoativos podem promover uma alta permeação e aumentar o fluxo de fármacos, o que é fundamental para o bom desempenho de um sistema de liberação nasal, pois a absorção da dose deve ocorrer antes da depuração mucociliar eliminar o sistema em contato com a mucosa.

Foi muito interessante observar que apesar do sistema de liberação aqui caracterizado ser formador de uma matriz líquido cristalina mais rígida, ele não controla a liberação do AZT. Isto é uma grande vantagem para sistemas destinados à via nasal, pois a liberação do fármaco deve ocorrer em tempo suficiente para a depuração mucociliar não eliminar a formulação em contato com a mucosa. O controle da liberação de fármacos através da via nasal não deve ocorrer antes da etapa de absorção, pois isto exige uma longa permanência do sistema em contato com a mucosa, o que seria prejudicial à fisiologia da respiração.

Um sistema de liberação nasal ideal deve fazer com que a formulação alcance a cavidade nasal e promova sua interação com a mucosa, resultando numa rápida absorção do fármaco. A análise da farmacocinética demonstrou que o sistema desenvolvido neste trabalho atende a todas estas características, porém, elas não foram suficientes para aumentar a biodisponibilidade do AZT. Com isso, é possível concluir que além de promover a absorção, é necessário modificar a fase de distribuição e eliminação do fármaco.

Com os resultados obtidos foi possível atingir o objetivo proposto neste trabalho em criar alternativas para promoção da absorção nasal do AZT. Os sistemas precursores de cristais líquidos foram extremamente eficientes em favorecer a solubilização e o transporte do fármaco, propriedades que podem ser potencialmente aplicadas para outros antirretrovirais. Este estudo mostrou ser uma excelente plataforma tecnológica para o desenvolvimento de sistemas mucoadesivos, que torna possível considerar futuras aplicações de antirretrovirais para o tratamento da AIDS.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados indicam uma forte evidência que o fármaco tenha se direcionado para o cérebro. A comprovação desta hipótese pode trazer novas alternativas para o tratamento das desordens provocadas pelo HIV alojado no SNC, além de possibilitar também explorar a administração nasal de fármacos que agem no SNC.

A via nasal mostrou ser uma excelente via para se atingir uma concentração plasmática rápida e elevada, o que é uma vantagem para fármacos de ação instantânea como, por exemplo, no tratamento do pânico ou epilepsia.

Sistemas de geleificação estímulo-sensitivo como os sistemas precursores de cristais líquidos aqui desenvolvidos mostraram ser extremamente importantes para promover o alcance da formulação no local de absorção e sua retenção para que o fármaco seja absorvido. Esta estratégia pode ser explorada para a administração de sistemas não só nasais, como também oculares, retais e vaginais.

Há muitos trabalhos na literatura que reportam sistemas de geleificação *in situ* como uma estratégia para prolongar a liberação do fármaco. Porém, como visto neste trabalho, deve-se levar em consideração a fisiologia da via de administração a fim de avaliar se este objetivo é uma vantagem e se pode ser alcançado. Portanto, este trabalho foi muito importante para apontar novas alternativas no controle da liberação de fármacos.

Os resultados mostraram que nem sempre a mucoadesão pode resultar na modificação ou no controle da liberação de fármacos. O aumento da biodisponibilidade pode ser alcançado com a sua incorporação em sistemas reservatórios nanoparticulados. Nanocarreadores podem proteger o fármaco contra degradação e liberar o fármaco de forma mais prolongada e eficiente. Porém, o muco e o mecanismo de depuração mucociliar pode limitar significativamente seu desempenho. Logo, os nanocarreadores precisam ser veiculados em algum sistema que promova sua interação com a mucosa e sua absorção. A associação de sistemas de geleificação estímulo-sensitivo com nanocarreadores particulados que controlem a liberação de fármacos pode ser

uma excelente estratégia para aumentar a biodisponibilidade de fármacos administrados via nasal e também em outras mucosas.

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho abriram portas para a proposta de novas estratégias que estão sendo exploradas através da criação de novos projetos de pesquisa envolvendo a participação tanto de professores e de alunos do grupo como também projetos colaborativos com outras universidades e institutos de pesquisa.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJI ALEX, M.R.; CHACKO, A. J.; JOSE, S.; SOUTO, E. B. Lopinavir loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for intestinal lymphatic targeting. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 18, n. 42, p. 11-8, 2010, DOI:10.1016/j.ejps.2010.10.002

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 71, n. 3, p. 505-518, 2008.

ARORA, P.; SHARMA, S.; GARG, S. Permeability issues in nasal drug delivery. **Drug Discov. Today**, v. 7, p. 967-975, 2002.

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

BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WATER, K. **An introduction to rheology**. Amsterdam: Elsevier, 1989. 199 p.

BENDER, A.R.; VON BRIESEN, H.; KREUTER, J.; DUNCAN, B.; RÜBSAMEN-WAIGMANN, H. Efficiency of nanoparticles as a carrier system for antiviral agents in human immunodeficiency virus-infected human monocytes/macrophages in vitro. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 40, pp. 1467–1471.

BETAGERI G.V., BLACK S.D., SZEBENI J., WAHL L.M., WEINSTEIN J.N. Fc-receptor mediated targeting of antibody-bearing liposomes containing dideoxycytidine triphosphate to human monocyte/macrophages. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 45, p. 48–53, 1993.

BORGMANN, K; RAO, K. S.; LABHASETWAR, V.; GHORPADE, A. Efficacy of Tat-conjugated ritonavir-loaded nanoparticles in reducing hiv-1 replication in monocyte-derived macrophages and cytocompatibility with macrophages and human neurons, **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v. 27, n. 8, p. 853–862, 2011.

BOYD, B. J.; WHITTAKER, D. V.; KHOO, S. M.; DAVEY, G. Lyotropic liquid crystalline phases formed from glycerate surfactants as sustained release drug delivery systems. **Int. J. Pharm.**, v. 309, p. 218-226, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde: Programa Nacional de DST e Aids, **Recomendações para terapia antirretroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV**, Brasília, 2006.

BRASIL, Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003a. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: < <http://www.anvisa.org.br>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

BRAZEL, C. S.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from swellable polymers. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 49, p. 47-58, 2000.

BROMBERG, L.; TEMCHENKO, M.; ALAKHOV, V.; ALAN HATTON, T. Bioadhesive properties and rheology of polyether-modified poly(acrylic acid) hydrogels. **Int. J. Pharm.**, v. 282, p. 45-60, 2004. Doi:10.1016/j.ijpharm.2004.05.030.

BRUSCHI, M. L.; FREITAS, O. Oral bioadhesive drug delivery systems. **Drug Develop. Ind. Pharm.**, v. 31, p. 293-310, 2005.

BRUSCHI, M. L.; JONES, D. S.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M. P. D.; FREITAS, O.; LARA, E. H. G. Semisolid Systems Containing Propolis for the Treatment of Periodontal Disease: In Vitro Release Kinetics, Syringeability, Rheological, Textural, and Mucoadhesive Properties. **J. Pharm. Sci.**, v. 96, p. 2074-2089, 2007.

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

CARVALHO, F. C. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal da zidovudina**, Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2009, Dissertação (Mestrado em

Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

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

CARVALHO, F. C.; BRUSCHI, M. L.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.46, n.1, p. 1-17, 2010b.

CARVALHO, F. C.; MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. D., Exploring the Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for AIDS Treatment, In: KASENGA, F. H. (Org.). **Understanding HIV/AIDS Management and Care - Pandemic Approaches in the 21st Century.**, Rijeka: InTech, 2011. p. 367-384. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/articles/show/title/exploring-the-nanotechnology-based-drug-delivery-systems-for-aids-treatment>>. Acesso em: 13 jun. 2012.

CARVALHO, F. C.; SARMENTO, V. H. V.; CHIAVACCI, L. A.; BARBI, M. S.; GREMIÃO, M. P. D. Development and in vitro evaluation of surfactant systems for controlled release of zidovudine. **J. Pharm. Sci.**, v. 99, n. 5, p. 2367-74, 2009. DOI:10.1002/jps.

CARVALHO, F. C.; SILVA, H. R.; LUZ, G. M.; BARBI, M. S.; LANDGRAF, D. S.; CHIAVACCIA, L. A.; SARMENTO, V. H. V.; GREMIÃO, M. P. D. Rheological, mechanical and adhesive properties of surfactant-containing systems designed as a potential platform for topical drug delivery. **J. Biomedical Nanotechnology**, *In press*, 2012.

CEULEMANS, J.; VINCKIER, I.; LUDWIG, A. The use of xantan gum in an ophthalmic liquid dosage form: rheological characterization of the interaction with mucin. **J. Pharm. Sci.**, v. 91, p. 1117-1127, 2002.

CHENG, M. B.; WANG, J. C.; LIU, Y. H. LI. X. Y.; ZHANG, X.; CHEN, D. W.; ZHOU, S. F.; ZHANG, Q. Characterization of water-in-oil microemulsion for oral

delivery of earthworm fibrinolytic enzyme. **J. Control. Rel.**, v. 129, p. 41-48, 2008.

CHEREZOV, V.; CLOGSTON, J; MISQUITTA, Y.; ABDEL-GAWAD, W.; CAFFREY, M. Membrane protein crystallization in meso: lipid type-tailoring of the cubic phase. **Biophysic. J.**, v. 83, p. 3393–3407, 2002.

CHIAPPETTA, D.A.; ALVAREZ-LORENZO, C.; REY-RICO, A.; TABOADA, P.; CONCHEIRO, A.; SOSNIK, A. N-alkylation of poloxamines modulates micellar assembly and encapsulation and release of the antirretroviral efavirenz. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 76, p. 24–37, 2010. DOI:10.1016/j.ejpb.2010.05.007

CHOW, S. C.; LIU, J. P., **Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies**. Nova Yorque: Marcel Dekker, 2000.

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

CLAYTON, R.; OHAGEN, A.; NICOL, F.; DEL VECCHIO, A. M.; JONCKERS, T. H.; GOETHALS, O.; VAN LOOCK, M.; MICHIELS, L.; GRIGSBY, J.; XU, Z.; ZHANG, Y. P.; GUTSHALL, L. L.; CUNNINGHAM, M.; JIANG, H.; BOLA, S.; SARISKY, R. T.; HERTOOGS, K. Sustained and specific in vitro inhibition of HIV-1 replication by a protease inhibitor encapsulated in gp120-targeted liposomes. **Antiviral Research**, v. 84, p. 142-149, 2009. DOI:10.1016/j.antiviral.2009.08.003

COLLNOT, E. M.; ALI, H.; LEHR, C. M. Nano- and microparticulate drug carriers for targeting of the inflamed intestinal mucosa. **J. Control. Release**, p. 1-12, 2012. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.01.028

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

D'ANDREA, G.; BRISDELLI, F.; BOZZI, A. AZT: An old drug with new perspectives, **Curr. Clin. Pharmacol.**, 2008

DAVIES, J. M.; VINEY, C. Water-mucin phases: conditions for mucus liquid crystallinity. **Thermochim. Acta**, v. 315, p. 39-49, 1998

EKWALL, P. **Advances in Liquid Crystals**. In: Ed. BROWN, G. H. Nova Iorque: Academic Press, v.1, 1975.

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-XTPlus, Stable Micro Systems, 2009, 1 CD-ROM.

FAIRHURST, C. E.; FULLER, S.; GRAY, J.; HOLMES, M. C., TIDDY, G. J. T. Lyotropic surfactant liquid crystals. In: DEMUS, D.; GOODBY, J.; GRAY, G. W.; SPIESS, H. W. (Org.). **Handbook of Liquid Crystals**. v. 3, Nova Iorque: Wiley-VCH, 1998. p. 341-392.

FANUN, M. Microemulsion, properties and applications. Londres: CRC Press. 2009. 531p.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico químicos em farmácia**. São Paulo: Edusp, 2003. 732 p.

GAGNÉ, J.F.; DÉSORMEAUX, A.; PERRON, S.; TREMBLAY, W.J.; BERGERON, M.G. Targeted delivery of indinavir to HIV-1 primary reservoirs with immunoliposomes. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**, v. 1558, p. 198-210, 2002, DOI: 10.1016/S0005-2736(01)00432-1

GARG, M.; ASTHANA, A.; AGASHE, H.B.; AGRAWAL, G.P.; JAIN N.K. Stavudine-loaded mannosylated liposomes: in-vitro anti-HIV-I activity, tissue distribution and pharmacokinetics. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 58, p. 605–616, 2006, DOI: 10.1211/jpp.58.5.0005

GARTI, N.; ASERIN, A.; TIUNOVA, I.; FANUN, M. A DSC study of water behavior in water-in-oil microemulsions stabilized by sucrose esters and butanol. *Colloid. Surface A*, v. 170, p. 1–18, 2000.

GELBART, W. M.; BEN-SHAUL, A.; ROUX, D. **Micelles, membranes, microemulsions, and monolayers**. Nova Iorque: Springer, 1994.

GEOCZE, L.; MUCCI, S.; MARCO, M. A. D.; NOGUEIRA-MARTINS, L. A.; CITERO, V. A. Qualidade de vida e adesão ao tratamento anti-retroviral de pacientes portadores de HIV. **Rev. Saúde Pública**, v. 44, n. 4, p. 743-9, 2010. DOI: 10.1590/S0034-89102010000400019

GLAXOSMITHKLINE, Retrovir® (zidovudine), Tablets, Capsules, and Syrup. Aprovado em 1987, revisado em setembro de 2008.

GOODBY, J. W.; GRAY, G.; SPIESS, H. W.; VILL, V. **Handbook of Liquid Crystals**, v. 1. Berlim: Wiley-VCH, 1998. p. 17-23.

GOODMAN, L. S. Goodman & Gilman: **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. 1821p.

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

GRASSI, M.; GRASSI, G.; LAPASIN, R.; COLOMBO, I. Drug release from microemulsions. In: **Understanding Drug Release and Absorption Mechanisms**. Boca Raton: CRS Press, 2007a. p. 493-535.

GRASSI, M.; GRASSI, G.; LAPASIN, R.; COLOMBO, I. Rheology. In: **Understanding Drug Release and Absorption Mechanisms**. Boca Raton: CRS Press, 2007b. p. 123-145.

GUPTA, U.; JAIN, N. K. Non-polymeric nano-carriers in HIV/AIDS drug delivery and targeting. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 62, p. 478–490, 2010. DOI: 10.1016/j.addr.2009.11.018

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

HÄGERSTRÖM, H.; EDSMAN, K.; STRØMME, M. Low-frequency dielectric spectroscopy as a tool for studying the compatibility between pharmaceutical gels and mucous tissue. **J. Pharm. Sci.**, v. 92, n. 9, p. 1869-1881, 2003.

HASSAN, E. E.; GALLO, J. M. A simple rheological method for the *in vitro* assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength. **Pharm. Res.**, v. 7, p. 491-495, 1990.

HAWKINS, T. Understanding and managing the adverse effects of antiretroviral therapy. **Antiviral Research**, v. 85, p. 201–209, 2010. DOI:10.1016/j.antiviral.2009.10.016

HE, C.; KIM, S. W.; LEE, D. .S. In situ gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery. **J. Control. Rel.**, v. 127, p. 189–207, 2008. DOI:10.1016/j.jconrel.2008.01.005.

HILLAIREAU, H.; LE DOAN, T.; APPEL, M.; COUVREUR, P. Hybrid polymer nanocapsules enhance *in vitro* delivery of azidothymidine-triphosphate to macrophages. **J. Control. Rel.**, v. 116, p. 346–52, 2006, DOI:10.1016/j.jconrel.2006.09.016

HYDE, S. T.; HOLMBERG K. **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 2001.

ILLUM, L. Nanoparticulate Systems for Nasal Delivery of Drugs: A Real Improvement over Simple Systems? **J. Pharm. Sci.**, v. 96, n. 3, 2007.

ILLUM, L. Nasal drug delivery – possibilities, problems and solutions. **J. Control. Rel.**, v. 87, p. 187-198, 2003.

ILLUM, L. Nasal drug delivery – Recent developments and future prospects. **J. Control. Rel.**, 2012, *in press*.

JAIN, S.; TIWARY, A.K; JAIN, N.K. Sustained and targeted delivery of an anti-HIV agent using elastic liposomal formulation: mechanism of action. **Curr. Drug Deliv.**, v. 3, p. 157–166, 2006, DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.08.003

JASTI, B.; LI, X.; CLEARY, C. Recent Advances in mucoadhesive drug delivery systems. **Phamatech.**, p. 194-196, 2003.

JIN, Y.; AI, P.; XINA, R.; CHEN, D. Morphological transformation of self-assembled nanostructures prepared from cholesteryl acyl didanosine and the optimal formulation of nanoparticulate systems: Effects of solvents, acyl chain length and poloxamer 188. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 326, p. 275–282, 2008, DOI:10.1016/j.jcis.2008.07.014

JIN, Y.; QIA, N.; TONG, L.; CHEN, D. Self-assembled drug delivery systems. Part 5: Self assemblies of a bolaamphiphilic prodrug containing dual zidovudine. **Int. J. Pharm.**, v. 386, p. 268–274, 2010, DOI:10.1016/j.ijpharm.2009.11.018

JIN, Y.; XINGA, L.; TIAN, Y.; LI, M.; GAO, C.; DU, L.; DONG, J.; CHEN, H. Self-assembled drug delivery systems. Part 4. In vitro/in vivo studies of the self-assemblies of cholesteryl-phosphonyl zidovudine. **Int. J. Pharm.**, v. 381, p. 40–48, 2009. DOI:10.1016/j.ijpharm.2009.07.024

JONES, D. S.; LAWLOR, M. S.; WOOLFSON, A. D. Examination of the flow rheological and textural properties of polymer gels composed of poly(methylvinylether-co-maleic anhydride) and poly(vinylpyrrolidone): rheological and mathematical interpretation of textural parameters. **J. Pharma. Sci.**, v. 91, n. 9, 2002.

JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F. Textural analysis and flow rheometry of novel bioadhesive antimicrobial oral gels. **Pharma. Res.**, v. 14, n. 4, p. 450-57, 1997.

JONES, D.S.; BROWN, A.F.; WOOLFSON, A.D. Rheological characterization of bioadhesive, antimicrobial, semisolids designed for the treatment of periodontal diseases: transient and dynamic viscoelastic and continuous shear analysis. **J. Pharm. Sci.**, v. 90, p. 1978–1990, 2001.

JONES, D.S.; BRUSCHI, M. L.; FREITAS, O., GREMIÃO, M. P. D.; LARA, E. H.; ANDREWS, G. P. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **Int. J. Pharm.**, v. 372, p. 49-58, 2009. DOI:10.1016/j.ijpharm.2009.01.006

JONES, D.S.; WOOLFSON, A.D.; BROWN, A.F.; COULTER, W.A.; MCCLELLAND, C.; IRWIN, C.R. Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. **J. Control. Release**, v. 67, p. 357–368, 2000.

JUNGINGER, H. E.; THANOU, M.; VERHOEF, J. C. Drug Delivery: Mucoadhesive Hydrogels. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**, 2006. Disponível em: <<http://www.informaworld.com/10.1081/E-EPT-100000408>>. Acesso em: 06 nov. 2008.

KAPARISSIDES, C.; ALEXANDRIDOU, S.; KOTTI, K.; CHAITIDOU, S.; Recent advances in novel drug delivery systems. **J. Nanotechnology Online**, 2006. Disponível em: <<http://www.azonano.com/Details.asp?ArticleID=1538>>. Acesso em 13 jun. 2012. DOI: 10.2240/azojono0111

KASENGA, F. H. **Understanding HIV/AIDS Management and Care - Pandemic Approaches in the 21st Century.**, Rijeka: InTech, 2011.

KATRAGADDA, A.; BRIDGMAN, R.; BETAGERI, G. Effect of liposome composition and cholesterol on the cellular uptake of stavudine by human monocyte/macrophages. **Cell. Mol. Biol. Lett**, v. 5, p. 483–493, 2000.

KAUR, C.D.; NAHAR, M.; JAIN, N.K. Lymphatic targeting of zidovudine using surface engineered liposomes. **J. Drug Targ.**, v. 16, p. 798–805, 2008, DOI: 10.1080/10611860802475688

KAUR, P.; KIM, K. Pharmacokinetics and brain uptake of diazepam after intravenous and intranasal administration in rats and rabbits. **Int. J. Pharm.**, v. 364, p. 27-35, 2008.

KLEIN, T. **Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado contendo fluconazol potencialmente ativo contra esporotricose.** Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2007. 114f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

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

KUMAR, P.; MITTAL, K. L. **Handbook of Microemulsion Science and Technology.** New York: Marcel Dekker, 1999.

KUO, Y. C.; CHEN, H. H. Effect of nanoparticulate polybutylcyanoacrylate and methylmethacrylate-sulfopropylmethacrylate on the permeability of zidovudine and lamivudine across the in vitro blood-brain barrier. **Int. J. Pharm.**, v. 327, p. 160–69, 2006, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2006.07.044

KUO, Y. C.; CHEN, H. H. Entrapment and release of saquinavir using novel cationic solid lipid nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 365, p. 206–213, 2009 DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.08.050

LAGERWALL, J. P. F.; SCALIA, G. A new era for liquid crystal research: Applications of liquid crystals in soft matter nano-, bio- and microtechnology. **Curr. Applied Phys.**, v. 12, p. 1387-1412, 2012.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 45, p. 89-121, 2000.

LEE, C. H.; MOTURI, V.; LEE, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. **J Control. Rel.**, v. 136, p. 88–98, 2009.

LUBRIZOL. **Bioadhesion**. *Pharmaceutical Bulletin*, v. 23. 2008. 20 p.

MAHMOOD, I. Application of allometric principles for the prediction of pharmacokinetics in human and veterinary drug development. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 59, p. 1177–1192, 2007.

MAINARDES, M. M. **Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina**. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2007. 137f. Tese (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. P. D.; BRUNETTI, I. L.; FONSECA, L. M.; KHALIL, N. M. Zidovudine-loaded PLA and PLA–PEG blend nanoparticles: influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. **J. Pharm. Sci.**, v. 98, p. 257-67, 2009

MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M.; GREMIÃO, M. P. D., Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA-PEG blend nanoparticles. **Int. J. Pharm.**, v. 16, p. 266-271, 2010. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.05.020.

MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C. C.; CINTO, P. O.; CHAUD, M. V.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Liposomes and Micro/Nanoparticles as Colloidal Carriers for Nasal Drug Delivery. **Curr. Drug Delivery**, v. 3, p. 275-285, 2006.

MAKABI-PANZU, B.; GOURDE, P.; DESORMEAUX, A.; BERGERON, M.G. Intracellular and serum stability of liposomal 2', 3'-dideoxycytidine. Effect of lipid composition. **Cel. Molec. Bio.**, v. 44, p. 277–284.

MAKAI, M.; CSÁNYI, E.; NÉMENTH, Z.; PÁLINKÁS, J. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. **Int. J. Pharm.**, v. 256, p. 95-107, 2003.

- MALMSTEN, M. **Surfactants and polymers in drug delivery**. Drugs and the Pharmaceutical Sciences. New York: Marcel Dekker, 2002, 348p.
- MARCHEI, E.; VALVO, L.; PACIFICI, R.; PELLEGRINI, M.; TOSSINI, G.; ZUCCARO, P. Simultaneous determination of zidovudine and nevirapine in human plasma by RP-LC. **J. Pharm. Biomedical Analysis**, v. 29, p. 1081–1088, 2002.
- MARTTIN, E.; SCHIPPER, N. G. M.; VERHOEF, J. C.; MERKUS, F. W. H. M. Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 29, p. 13–38, 1998.
- MATHIOWITZ, E.; CHICKERING, D. E.; LEHR, C. M. **Bioadhesive drug delivery systems: fundamentals, novel approaches, and development**, Nova Iorque: Marcel Dekker, 1999. 670 p.
- MERK index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biological. 12th.ed. Withehouse Station, 1996.
- MISHRA, V.; MAHOR, S.; RAWAT, A.; GUPTA, P.N.; DUBEY, P.; KHATRI, K.; VYAS, S.P. Targeted brain delivery of AZT via transferrin anchored pegylated albumin nanoparticles. *J. Drug Targeting*, v. 14, p. 45–53, 2006, DOI: 10.1080/10611860600612953
- NEVES, J.; AMIJI, M. M.; BAHIA, M. F.; SARMENTO, B. Nanotechnology-based systems for the treatment and prevention of HIV/AIDS. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 62, p. 458–477, 2010. DOI: 10.1016/j.addr.2009.11.017
- NICOLAZZO, J. A.; REED, B. L.; FINNIN, B. C. Buccal penetration enhancers—How do they really work?, **J. Control. Rel.**, v. 105, p. 1 – 15, 2005. DOI:10.1016/j.jconrel.2005.01.024
- OJEWOLE, E.; MACKRAJ, I.; NAIDOOA, P.; GOVENDER, T. Exploring the use of novel drug delivery systems for antiretroviral drugs. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 70, n. 3, p. 697-710, 2008. DOI 10,1016/j.ejpb,2008,06,020

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

OSTH, K., GRASNO, J.; BJORK, E. A new method for drug transport studies on pig nasal mucosa using a horizontal Ussing Chamber. **J. Pharm. Sci.**, v. 91, p. 1259-1273, 2002.

PAIVA F. P.; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. **Curso de Manipulação de Animais de Laboratório**. Salvador: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz. 2005. Disponível em: <http://www.cpqgm.fiocruz.br/arquivos/bioterio/bioterio_apostilha.pdf>. Acesso em 02 out. 2009.

PAPADOPOULOU, V.; KOSMIDIS, K.; VLACHOU, M.; MACHERAS, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **Int. J. Pharm.**, v. 309, p. 44-50, 2006. DOI:10.1016/j.ijpharm.2005.10.044

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

PEPPAS, N. A. Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. **Pharm. Acta Helv.**, v. 60, n. 110-1, 1985.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. **Biomaterials**, v. 17, p. 1553-1561, 1996.

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

RAI, B. B.; GAJBHIYE, V.; RAI, K.; JAIN, A.; JADON, R. S.; NAYAK, S. Drug delivery via nasal route, Pharmacy Student Articles, In: **Pharmainfo**, 2008. Disponível em: <<http://www.pharmainfo.net/pharma-student-magazine/drug-delivery-nasal-route>>. Acesso em: 06 set. 2012.

RAMACHANDRAN, G.; HEMANTHKUMAR, A.K.; KUMARASWAMI, V.; SWAMINATHAN, S. A simple and rapid liquid chromatography method for simultaneous determination of zidovudine and nevirapine in plasma. **J. Chrom. B**, v. 843, p. 339–344, 2006

ROCHA, H.S. **Sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado contendo óleo de copaíba e fluconazol potencialmente ativo contra dermatomicoses**. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2011. Tese (Doutorado em Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

ROWE, R.C., SHESKEY, P.J., OWEN, S.C.. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. Londres: Pharmaceutical Press, 2006.

SCHÄFER, V.; VON BRIESEN, H.; ANDREESEN, R.; STEFFAN, A.M.; ROYER, C.; TRÖSTER, S.; KREUTER, J.; RÜBSAMEN-WAIGMANN, H. Phagocytosis of nanoparticles by human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophages: a possibility for antiviral drug targeting. **Pharm. Res.**, v. 9, p. 541–46, 1992, DOI: 10.1023/A:1015852732512

SCHNAARE, RL. **Rheology**. In: Remington: The science and practice of pharmacy, 21^a ed., Philadelphia: Paul Beringer, 2005, p. 345.

SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. São Paulo: Artliber, 2006.

SHAH, J. C.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D. M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Adv. Drug Del.**, v. 47, p. 229-250, 2001.

SHAH, L.K.; AMIJI, M.M. Intracellular delivery of saquinavir in biodegradable polymeric nanoparticles for HIV/AIDS. **Pharm. Res.**, v. 23, p. 2638-45, 2006, DOI: 10.1007/s11095-006-9101-7

SHEGOKARA, R.; SINGHA, K. K.; MÜLLER, R. H. Production & stability of stavudine solid lipid nanoparticles — From lab to industrial scale, **Int. J. Pharm.**, v. 416, n. 2, p. 461-70, 2010, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.08.014

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. **Int. J. Pharm.**, v. 418, p. 6-12, 2011. DOI:10.1016/j.ijpharm.2011.03.051

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 57, n. 11, p. 1556-1568, 2005.

SOSNIK A., CHIAPPETTA D. A., CARCABOSO A. M. Drug delivery systems in HIV pharmacotherapy: What has been done and the challenges standing ahead. **J. Control. Release**, v. 138, p. 2-15, 2009. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.05.007

SOUZA, J. D.; KANO, E. K.; KOONO, E. E. M.; SCHRAMM, S. G.; PORTA, V.; STORPIRTIS, S. LC-UV Methodology for simultaneous determination of lamivudine and zidovudine in plasma by liquid-liquid extraction. **Chromatographia Supp.**, v. 69, 2009. DOI: 10.1365/s10337-008-0913-y

TAMBURIC, S.; CRAIG, D. Q. M. A comparison of different in vitro methods mucoadhesive performance for measuring. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, p. 159-167, 1997.

TARINAS, A.; TÁPANES, R.D.; FERRER, G.; PÉREZ, J. Validation of high-performance liquid chromatography methods for determination of zidovudine, stavudine, lamivudine and indinavir in human plasma. **Farm. Hosp.**, v. 31, n. 4, p. 243-247, 2007.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIAL CONVENTION, v. 35, n. 3. Pharmaceutical forum. **Topical and transdermal drug products—product performance tests**. 2009. 28 p.

TOPP, E. M. Principles of Mass Transfer, In: AMIDON, G. L.; LEE, P. I.; TOPP, E. T. (Org.). **Transport Processes in Pharmaceutical Systems**. Londres: Informa, 2009. p.1-22.

UGWOKE, M. I.; AGU, R. U.; VERBEKE, N.; KINGET, R. Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 57, p. 1640-1665, 2005.

UNAIDS: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, WHO: World Health Organization, **AIDS epidemic update**, 2009. Disponível em: <http://www.unaids.org/en/HIV_data/2007EpiUpdate/default.asp>. Acesso em: 06 mai. 2010.

URBAN, M. C. C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nanoestruturados para administração cutânea do acetato de dexametasona**. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2004. 136f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

VED, P. M.; KIM, K. Poly(ethylene oxide/propylene oxide) copolymer thermo-reversible gelling system for the enhancement of intranasal zidovudine delivery to the brain. **Int. J. Pharm.**, v. 411, 1-9, 2011.

DOI:10.1016/j.ijpharm.2011.02.040

VYAS, T. K.; BABBAR, A. K.; SHARMA, R. K.; SINGH, S.; MISHA, A. Intranasal mucoadhesive microemulsions of clonazepam: preliminary studies on brain targeting. **J. Pharm. Sci.**, v. 95, n. 3, p. 570-580, 2006a.

VYAS, T. K.; BABBAR, A. K.; SHARMA, R. K.; SINGH, S.; MISRA, A. Preliminary brain-targeting studies on intranasal mucoadhesive microemulsion of sumatriptan. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v. 7, 2006b.

VYAS, T. K.; SHAHIWALA, A.; AMIJI, M. M. Improved oral bioavailability and brain transport of saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations. **Int. J. Pharm.**, v. 347, p. 93–101, 2008.

DOI:10.1016/j.ijpharm.2007.06.016

WILLIAMS, A. C. **Transdermal and topical drug delivery**, Londres: Pharmaceutical Press, 2003.

WONG, H. L.; CHATTOPADHYAY, N.; WU, X. Y.; BENDAYAN, R., Nanotechnology applications for improved delivery of antiretroviral drugs to the brain. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 62, p. 503–517, 2010.

DOI:10.1016/j.addr.2009.11.020

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

ZIDAN A.S., SPINK C., FORTUNAK J., HABIB M., KHAN M.A. Near-infrared investigations of novel anti-HIV tenofovir liposomes. **AAPS J.**, v. 12, p. 202-214, 2010, DOI: 10.1208/s12248-010-9177-1

10. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

- I. CARVALHO, F. C.; SARMENTO, V. H. V.; CHIAVACCI, L. A.; BARBI, M. S.; GREMIÃO, M. P. D. Development and *in vitro* evaluation of surfactant systems for controlled release of zidovudine. **J. Pharm. Sci.**, v. 99, n. 5, p. 2367-74, 2009. DOI:10.1002/jps.

Development and *In Vitro* Evaluation of Surfactant Systems for Controlled Release of Zidovudine

FLÁVIA C. CARVALHO,¹ VICTOR H.V. SARMENTO,² LEILA A. CHIAVACCI,¹ MARIANA S. BARBI,¹ MARIA P.D. GREMIÃO¹

¹Pharmaceutical Sciences School of São Paulo State University—UNESP, Araraquara-Jaú Interstate Highway, Km 1, Araraquara, SP, Brazil

²Federal University of Sergipe—UFS, Vereador Olímpio Grande Avenue, Itabaiana, SE, Brazil

Received 24 August 2009; revised 5 October 2009; accepted 6 October 2009

Published online 4 December 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/jps.22005

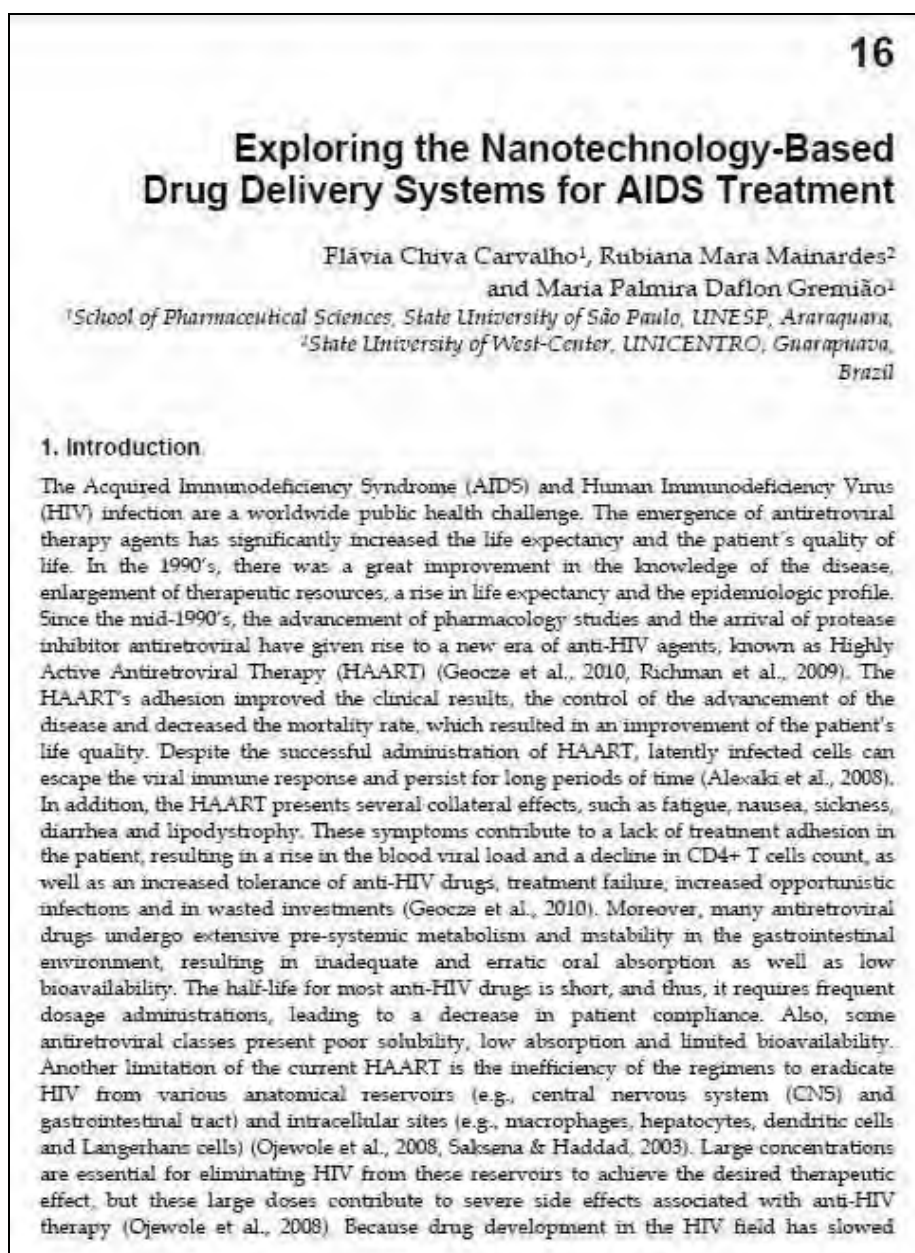
ABSTRACT: The development of a controlled-release dosage form of zidovudine (AZT) is of crucial importance, in view of the pharmacokinetics of its toxic activity. A suitable drug delivery system could increase AZT bioavailability, reducing its dose-dependent side effects. In this study, systems composed of polyoxypropylene (5) polyoxyethylene (20) cetyl alcohol as surfactant (S), oleic acid as oil phase (O), and water (W) were developed, as possible AZT control release systems. They were characterized by polarized light microscopy (PLM), SAXS, and rheological analysis, followed by *in vitro* release assay. PLM and SAXS results indicated that the mixtures of S/O/W in the proportions 55/35/10 and 55/25/20 formed microemulsion (ME) systems, while 55/20/25 formed lamellar phase. The incorporation of AZT in these systems was greater than in water or oil; moreover, AZT incorporation did not significantly change the phase behavior of the mixtures. MEs behave as Newtonian fluids in flow rheological analysis and the lamellar phase as a pseudoplastic fluid. The release profile indicated that AZT could be released in a controlled manner, since an exponential pattern governs AZT diffusion, as demonstrated by the Weibull mathematical model. These systems are potential carriers for AZT and could have advantages over conventional pharmaceutical forms. © 2009 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association *J Pharm Sci* 99:2367–2374, 2010

Keywords: surfactants; microemulsion; controlled release; dissolution; formulation vehicle; mathematical model

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

<p>JPP <i>Journal of</i> Pharmacy and Pharmacology</p> <p>JPP 2010, 62: 430-439 © 2010 The Authors Journal compilation © 2010 Royal Pharmaceutical Society of Great Britain Received August 05, 2009 Accepted Jan 07, 2010 DOI 10.1211/jpp/62.04.0004 ISSN 0022-3573</p>	<p style="text-align: right;">Research Paper</p> <p>Surfactant systems for nasal zidovudine delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties</p> <p>Flávia C. Carvalho^a, Mariana S. Barbi^a, Victor Hugo V. Sarmento^b, Leila A. Chiavacci^a, Flávia M. Netto^c and Maria P.D. Gremião^a</p> <p>^aSchool of Pharmaceutical Sciences, State University of São Paulo, UNESP, Araraquara, ^bFederal University of Sergipe, UFS, Itabaiana, SE and ^cState University of Campinas UNICAMP, Campinas, SP, Brazil</p> <p>Abstract</p> <p>Objectives Zidovudine is the antiretroviral drug most frequently used for the treatment of AIDS. Although its effectiveness is recognized, it undergoes extensive first-pass metabolism and exhibits poor oral bioavailability. The nasal route is an option for enhanced therapeutic efficacy and to reduce the extent of the first-pass effect. There are some mechanisms that limit intranasal absorption, such as mucociliary clearance, which rapidly removes the formulation from the nasal cavity. To improve the nasal residence time of zidovudine on the nasal mucosa, we aimed to develop a mucoadhesive surfactant system for zidovudine nasal administration.</p> <p>Methods Systems composed of PPG-5-CETETH-20 as surfactant, oleic acid and water were characterized by polarized light microscopy, small-angle X-ray scattering and rheological measurements. Mucoadhesion was investigated by phase behaviour studies, rheological synergism and mucoadhesive strength determination.</p> <p>Key findings Results indicate that the original formulations were microemulsions that displayed phase transition to a lamellar phase when brought into contact with aqueous nasal simulated mucus. The phase transition was accompanied by an increase in system elasticity and, irrespective of phase behaviour, all the systems showed a good mucoadhesive force. Thus, a viscous and mucoadhesive liquid crystalline matrix could be formed when the formulations were in contact with simulated mucus, which may prolong the residence time of zidovudine in the nasal cavity.</p> <p>Conclusions These findings indicate a potentially useful system for nasal administration of zidovudine.</p> <p>Keywords liquid crystal; microemulsion; mucoadhesion; oscillatory rheology; phase behaviour</p>
--	--

- III. CARVALHO, F. C.; MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. D., Exploring the Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for AIDS Treatment, In: KASENGA, F. H. (Org.). **Understanding HIV/AIDS Management and Care - Pandemic Approaches in the 21st Century.**, Rijeka: InTech, 2011. p. 367-384. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/articles/show/title/exploring-the-nanotechnology-based-drug-delivery-systems-for-aids-treatment>>. Acesso em: 13 jun. 2012.



- IV. CARVALHO, F. C.; BRUSCHI, M. L.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.46, n.1, p. 1-17, 2010.



- V. CARVALHO, F. C.; SILVA, H. R.; LUZ, G. M.; BARBI, M. S.; LANDGRAF, D. S.; CHIAVACCIA, L. A.; SARMENTO, V. H. V.; GREMIÃO, M. P. D. Rheological, mechanical and adhesive properties of surfactant-containing systems designed as a potential platform for topical drug delivery. **J. Biomedical. Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 280-289, 2012.



Copyright © 2011 American Scientific Publishers
All rights reserved
Printed in the United States of America

Journal of
Biomedical Nanotechnology
Vol. 8, 1-10, 2011

Rheological, Mechanical and Adhesive Properties of Surfactant-Containing Systems Designed as a Potential Platform for Topical Drug Delivery

Flávia Chiva Carvalho¹, Hilris Rocha e Silva¹, Gabriela Marielli da Luz¹,
Mariana da Silva Barbi¹, Daniele Silveira Landgraf¹, Leila Aparecida Chiavacci¹,
Victor Hugo Vitorino Sarmiento², and Maria Palmira Daflon Gremião^{1,*}

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista- UNESP Rodovia Araraquara-Jaú Km1,
14801-902, Araraquara, SP, Brazil

² Universidade Federal de Sergipe - UFS, Avenida Vereador Olímpio Grande s/n, 49500-000, Itabaiana, SE, Brazil

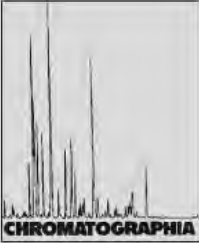
In the last few decades, nanotechnology has led to an advance in the development of topical drug delivery. Nanostructured drug delivery systems enable the compartmentalization of drugs in restricted environments, modifying the release profile and maintaining the required drug concentration for prolonged periods at the site of action and/or absorption. The development of nanostructured systems containing surfactants has evolved rapidly. Mixtures of surfactant, oil and water can self-associate to form structures, such as microemulsions and liquid crystal phases, which can be exploited as drug delivery systems because their nanostructured organization can control drug release. Therefore, the purpose of this study was to assess the potential of systems containing polyoxypropylene (5) polyoxyethylene (20) cetyl ether as surfactant, oleic acid or mineral oil as the oily phase, and water to be used as a platform in the development of topical drug delivery systems. Physicochemical characterization of the systems was performed by polarized light microscopy (PLM), small-angle X-ray scattering (SAXS), rheological tests and texture profile analysis. The ternary phase diagrams showed that combinations of surfactant/mineral oil/water and surfactant/oleic acid/water could form various thermodynamically stable structures, such as microemulsions and liquid crystals. The oily phases, oleic acid and mineral oil, changed the rheological, mechanical and adhesive properties of systems containing polyoxypropylene (5) polyoxyethylene (20) cetyl ether.

Keywords: Nanotechnology, Topical Drug Delivery, Surfactant, Microemulsion, Liquid Crystal, Mineral Oil, Oleic Acid.

RESEARCH ARTICLE

- VI. CARVALHO F.C., BARBI M.S., GREMIÃO M.P.D. Evaluation of the in vitro Release of AZT-Microemulsions by LC. **Chromatographia**, 2009. DOI 10.13665/s10337-009- 1015-1.

LC Evaluation of In Vitro Release of AZT from Microemulsions



Flávia Chiva Carvalho[✉], Mariana da Silva Barbi, Maria Palmira Daflon Gremião
College of Pharmaceutical Sciences of São Paulo State University, UNESP, Araraquara, Brazil; E-Mail: flavia_chiva@yahoo.com.br

Received: 1 September 2008 / Revised: 12 December 2008 / Accepted: 14 January 2009

Abstract

A reversed phase LC method was developed and validated to analyze the in vitro release of AZT from microemulsions. A mobile phase of acetonitrile:water (15:85) was used. The method validation showed good selectivity and linearity ($r = 0.9993$) for sample concentrations ranging from 0.6 to 100.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The RSD values (0.7–4.3%) and percentage recovery (88.1–109.8%) were within acceptable limits. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were found to be 0.012 and 0.041 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Quantitative analysis of the values obtained in the drug release assay indicates that the microemulsions used promote sustained release of AZT, which follows a Fickian diffusion mechanism.

can be used to design oral, parenteral, pulmonary, ocular, transdermal and topical drug delivery [3].

Topical delivery, such as transdermal and mucosal, is an alternative route for drugs that suffer first-pass metabolism by the oral route [4]. Zidovudine or AZT is currently the most widely used drug in the treatment of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), by itself or in combination with other antiretroviral drugs [5]. Nevertheless, this drug shows low oral bioavailability (60–65%) because it suffers extensive first-pass

- VII. CAZEDEY E. C. L., CARVALHO F. C., FIORENTINO F. A. M., SALGADO H. R. N. Corrositex®, BCOP and HET-CAM as alternative methods of animal's experimentation. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 45, n. 4, p. 759 - 766, 2009.

- VIII. CARVALHO, F. C.; CAMPOS, M. L.; PECCININI, R. G., GREMIÃO, M. P. D. An HPLC-UV method for the quantification of zidovudine in rat plasma. **Curr. Pharm. Anal.**, *In press*, 2012.
- IX. CARVALHO, F. C.; CALIXTO, G.; HATAKEYAMA, I. N.; LUZ, G. M.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Rheological, mechanical and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. **Drug Develop. Ind. Pharm.**, *In press*, 2012.
- X. BALCÁRKOVÁA, J.; CARVALHO, F. C.; FERRARI, P. C.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D.; CASTRO, A. D. Chitosan/carbomer-based tablets containing metronidazole for potential treatment of periodontal diseases. **Journal of Pharmacy Research**, v..5, n. 6, 2012. *In Press*

10. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

- I. CARVALHO, F. C.; SARMENTO, V. H. V.; CHIAVACCI, L. A.; BARBI, M. S.; GREMIÃO, M. P. D. Development and *in vitro* evaluation of surfactant systems for controlled release of zidovudine. **J. Pharm. Sci.**, v. 99, n. 5, p. 2367-74, 2009. DOI:10.1002/jps.

Development and *In Vitro* Evaluation of Surfactant Systems for Controlled Release of Zidovudine

FLÁVIA C. CARVALHO,¹ VICTOR H.V. SARMENTO,² LEILA A. CHIAVACCI,¹ MARIANA S. BARBI,¹ MARIA P.D. GREMIÃO¹

¹Pharmaceutical Sciences School of São Paulo State University—UNESP, Araraquara-Jaú Interstate Highway, Km 1, Araraquara, SP, Brazil

²Federal University of Sergipe—UFS, Vereador Olímpio Grande Avenue, Itabaiana, SE, Brazil

Received 24 August 2009; revised 5 October 2009; accepted 6 October 2009

Published online 4 December 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/jps.22005

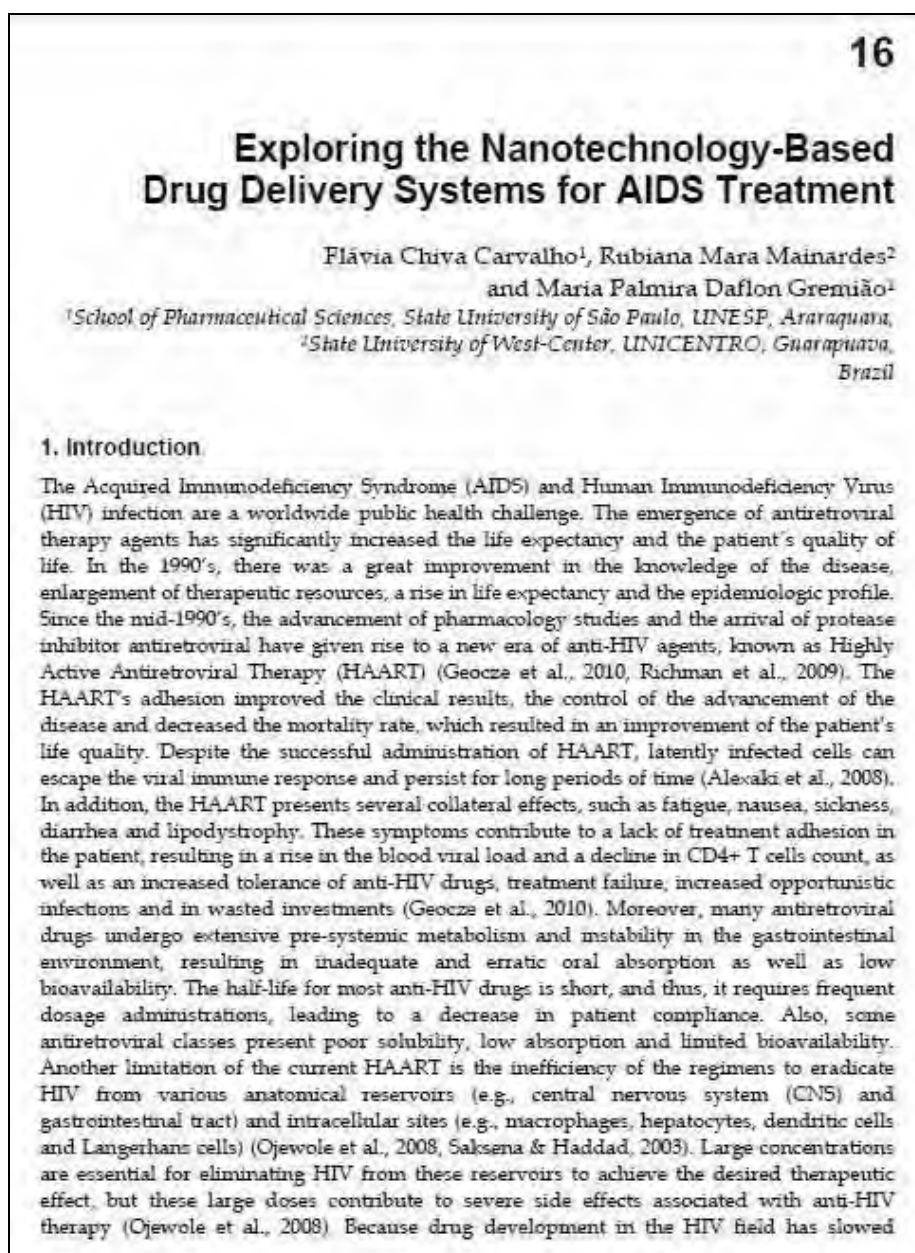
ABSTRACT: The development of a controlled-release dosage form of zidovudine (AZT) is of crucial importance, in view of the pharmacokinetics of its toxic activity. A suitable drug delivery system could increase AZT bioavailability, reducing its dose-dependent side effects. In this study, systems composed of polyoxypropylene (5) polyoxyethylene (20) cetyl alcohol as surfactant (S), oleic acid as oil phase (O), and water (W) were developed, as possible AZT control release systems. They were characterized by polarized light microscopy (PLM), SAXS, and rheological analysis, followed by *in vitro* release assay. PLM and SAXS results indicated that the mixtures of S/O/W in the proportions 55/35/10 and 55/25/20 formed microemulsion (ME) systems, while 55/20/25 formed lamellar phase. The incorporation of AZT in these systems was greater than in water or oil; moreover, AZT incorporation did not significantly change the phase behavior of the mixtures. MEs behave as Newtonian fluids in flow rheological analysis and the lamellar phase as a pseudoplastic fluid. The release profile indicated that AZT could be released in a controlled manner, since an exponential pattern governs AZT diffusion, as demonstrated by the Weibull mathematical model. These systems are potential carriers for AZT and could have advantages over conventional pharmaceutical forms. © 2009 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association *J Pharm Sci* 99:2367–2374, 2010

Keywords: surfactants; microemulsion; controlled release; dissolution; formulation vehicle; mathematical model

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

<p>JPP Journal of Pharmacy and Pharmacology</p> <p>JPP 2010, 62: 430-439 © 2010 The Authors Journal compilation © 2010 Royal Pharmaceutical Society of Great Britain Received August 05, 2009 Accepted Jan 07, 2010 DOI 10.1211/jpp/62.04.0004 ISSN 0022-3573</p>	<p style="text-align: right;">Research Paper</p> <p>Surfactant systems for nasal zidovudine delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties</p> <p>Flávia C. Carvalho^a, Mariana S. Barbi^a, Victor Hugo V. Sarmento^b, Leila A. Chiavacci^a, Flávia M. Netto^c and Maria P.D. Gremião^a</p> <p>^aSchool of Pharmaceutical Sciences, State University of São Paulo, UNESP, Araraquara, ^bFederal University of Sergipe, UFS, Itabaiana, SE and ^cState University of Campinas UNICAMP, Campinas, SP, Brazil</p> <p>Abstract</p> <p>Objectives Zidovudine is the antiretroviral drug most frequently used for the treatment of AIDS. Although its effectiveness is recognized, it undergoes extensive first-pass metabolism and exhibits poor oral bioavailability. The nasal route is an option for enhanced therapeutic efficacy and to reduce the extent of the first-pass effect. There are some mechanisms that limit intranasal absorption, such as mucociliary clearance, which rapidly removes the formulation from the nasal cavity. To improve the nasal residence time of zidovudine on the nasal mucosa, we aimed to develop a mucoadhesive surfactant system for zidovudine nasal administration.</p> <p>Methods Systems composed of PPG-5-CETETH-20 as surfactant, oleic acid and water were characterized by polarized light microscopy, small-angle X-ray scattering and rheological measurements. Mucoadhesion was investigated by phase behaviour studies, rheological synergism and mucoadhesive strength determination.</p> <p>Key findings Results indicate that the original formulations were microemulsions that displayed phase transition to a lamellar phase when brought into contact with aqueous nasal simulated mucus. The phase transition was accompanied by an increase in system elasticity and, irrespective of phase behaviour, all the systems showed a good mucoadhesive force. Thus, a viscous and mucoadhesive liquid crystalline matrix could be formed when the formulations were in contact with simulated mucus, which may prolong the residence time of zidovudine in the nasal cavity.</p> <p>Conclusions These findings indicate a potentially useful system for nasal administration of zidovudine.</p> <p>Keywords liquid crystal; microemulsion; mucoadhesion; oscillatory rheology; phase behaviour</p>
--	--

- III. CARVALHO, F. C.; MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. D., Exploring the Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for AIDS Treatment, In: KASENGA, F. H. (Org.). **Understanding HIV/AIDS Management and Care - Pandemic Approaches in the 21st Century.**, Rijeka: InTech, 2011. p. 367-384. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/articles/show/title/exploring-the-nanotechnology-based-drug-delivery-systems-for-aids-treatment>>. Acesso em: 13 jun. 2012.



- IV. CARVALHO, F. C.; BRUSCHI, M. L.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.46, n.1, p. 1-17, 2010.



- V. CARVALHO, F. C.; SILVA, H. R.; LUZ, G. M.; BARBI, M. S.; LANDGRAF, D. S.; CHIAVACCIA, L. A.; SARMENTO, V. H. V.; GREMIÃO, M. P. D. Rheological, mechanical and adhesive properties of surfactant-containing systems designed as a potential platform for topical drug delivery. **J. Biomedical. Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 280-289, 2012.



Copyright © 2011 American Scientific Publishers
All rights reserved
Printed in the United States of America

Journal of
Biomedical Nanotechnology
Vol. 8, 1-10, 2011

Rheological, Mechanical and Adhesive Properties of Surfactant-Containing Systems Designed as a Potential Platform for Topical Drug Delivery

Flávia Chiva Carvalho¹, Hiliris Rocha e Silva¹, Gabriela Marielli da Luz¹,
Mariana da Silva Barbi¹, Daniele Silveira Landgraf¹, Leila Aparecida Chiavacci¹,
Victor Hugo Vitorino Sarmiento², and Maria Palmira Daflon Gremião^{1,*}

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista- UNESP Rodovia Araraquara-Jaú Km1,
14801-902, Araraquara, SP, Brazil

² Universidade Federal de Sergipe - UFS, Avenida Vereador Olímpio Grande s/n, 49500-000, Itabaiana, SE, Brazil

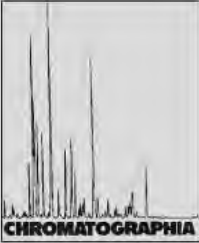
In the last few decades, nanotechnology has led to an advance in the development of topical drug delivery. Nanostructured drug delivery systems enable the compartmentalization of drugs in restricted environments, modifying the release profile and maintaining the required drug concentration for prolonged periods at the site of action and/or absorption. The development of nanostructured systems containing surfactants has evolved rapidly. Mixtures of surfactant, oil and water can self-associate to form structures, such as microemulsions and liquid crystal phases, which can be exploited as drug delivery systems because their nanostructured organization can control drug release. Therefore, the purpose of this study was to assess the potential of systems containing polyoxypropylene (5) polyoxyethylene (20) cetyl ether as surfactant, oleic acid or mineral oil as the oily phase, and water to be used as a platform in the development of topical drug delivery systems. Physicochemical characterization of the systems was performed by polarized light microscopy (PLM), small-angle X-ray scattering (SAXS), rheological tests and texture profile analysis. The ternary phase diagrams showed that combinations of surfactant/mineral oil/water and surfactant/oleic acid/water could form various thermodynamically stable structures, such as microemulsions and liquid crystals. The oily phases, oleic acid and mineral oil, changed the rheological, mechanical and adhesive properties of systems containing polyoxypropylene (5) polyoxyethylene (20) cetyl ether.

Keywords: Nanotechnology, Topical Drug Delivery, Surfactant, Microemulsion, Liquid Crystal, Mineral Oil, Oleic Acid

RESEARCH ARTICLE

- VI. CARVALHO F.C., BARBI M.S., GREMIÃO M.P.D. Evaluation of the in vitro Release of AZT-Microemulsions by LC. **Chromatographia**, 2009. DOI 10.13665/s10337-009- 1015-1.

LC Evaluation of In Vitro Release of AZT from Microemulsions



Flávia Chiva Carvalho[✉], Mariana da Silva Barbi, Maria Palmira Daflon Gremião
College of Pharmaceutical Sciences of São Paulo State University, UNESP, Araraquara, Brazil; E-Mail: flavia_chiva@yahoo.com.br

Received: 1 September 2008 / Revised: 12 December 2008 / Accepted: 14 January 2009

Abstract

A reversed phase LC method was developed and validated to analyze the in vitro release of AZT from microemulsions. A mobile phase of acetonitrile:water (15:85) was used. The method validation showed good selectivity and linearity ($r = 0.9993$) for sample concentrations ranging from 0.6 to 100.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The RSD values (0.7–4.3%) and percentage recovery (88.1–109.8%) were within acceptable limits. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were found to be 0.012 and 0.041 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Quantitative analysis of the values obtained in the drug release assay indicates that the microemulsions used promote sustained release of AZT, which follows a Fickian diffusion mechanism.

can be used to design oral, parenteral, pulmonary, ocular, transdermal and topical drug delivery [3].

Topical delivery, such as transdermal and mucosal, is an alternative route for drugs that suffer first-pass metabolism by the oral route [4]. Zidovudine or AZT is currently the most widely used drug in the treatment of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), by itself or in combination with other antiretroviral drugs [5]. Nevertheless, this drug shows low oral bioavailability (60–65%) because it suffers extensive first-pass

- VII. CAZEDEY E. C. L., CARVALHO F. C., FIORENTINO F. A. M., SALGADO H. R. N. Corrositex®, BCOP and HET-CAM as alternative methods of animal's experimentation. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 45, n. 4, p. 759 - 766, 2009.

- VIII. CARVALHO, F. C.; CAMPOS, M. L.; PECCININI, R. G., GREMIÃO, M. P. D. An HPLC-UV method for the quantification of zidovudine in rat plasma. **Curr. Pharm. Anal.**, *In press*, 2012.
- IX. CARVALHO, F. C.; CALIXTO, G.; HATAKEYAMA, I. N.; LUZ, G. M.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Rheological, mechanical and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. **Drug Develop. Ind. Pharm.**, *In press*, 2012.
- X. BALCÁRKOVÁA, J.; CARVALHO, F. C.; FERRARI, P. C.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D.; CASTRO, A. D. Chitosan/carbomer-based tablets containing metronidazole for potential treatment of periodontal diseases. **Journal of Pharmacy Research**, v..5, n. 6, 2012. *In Press*

11. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 36/2009


Interessado: FLÁVIA CHIVA DE CARVALHO
Orientador: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião
Projeto: Avaliação da Farmacocinética pré-clínica em ratos:
administração nasal da zidovudina

Parecer nº 12/2010 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Avaliação da Farmacocinética pré-clínica em ratos: administração nasal da zidovudina", apresentado pela Pós-Graduanda Flávia Chiva de Carvalho, orientada pela Professora Doutora Maria Palmira Daflon Gremião, do Departamento de Fármacos e Medicamentos, desta faculdade, estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em maio de 2011.

Araraquara, 27 de abril de 2010.


Prof.ª Dr.ª AURELUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP