



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus Araraquara



**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COM PROPRIEDADES
MUCOADESIVAS PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE ZIDOVUDINA**

Bruna Mota Reginato

Araraquara

2014

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

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS COM PROPRIEDADES MUCOADESIVAS PARA
ADMINISTRAÇÃO ORAL DE ZIDOVUDINA**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO

COORIENTADORA: MSC LILIANE NEVES PEDREIRO

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

Araraquara

2014

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Maria Dulce e Lourenço que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu concluísse essa etapa da minha vida. Ao meu namorado André por todo amor e pela longa espera.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e força para superar todas as dificuldades.

Aos pais, Maria Dulce e Lourenço, e meus irmãos, Fernanda, Marcelo e Fábio, pelo apoio incondicional nessa jornada, pela paciência, carinho e momentos de desabafo.

Ao meu namorado André por toda paciência ao longo desses anos, por me apoiar nas minhas escolhas, pela longa espera, por todo amor e companheirismo.

À minha querida orientadora Dra. Maria Palmira Daflon Gremião, por ter me acolhido na sua equipe e acreditado no meu potencial, por todo aprendizado e amizade ao longo desses anos, se tornando um exemplo pessoal e profissional.

À minha querida coorientadora Liliane Neves Pedreiro, companheira nesse trabalho. Posso dizer que minha formação, inclusive pessoal, não teria sido a mesma sem sua pessoa.

Aos amigos do laboratório de farmacotécnica, Fabiola Garavello Prezotti, Jéssica Bernegossi, Fernanda Kolenyak, Natalia Noronha Ferreira, Roberta B. Rigon e Maíra Lima Gonzalez pelo incentivo, ajuda nos experimentos e pela amizade.

As técnicas de laboratório da farmacotécnica Margareth e Natalia por toda ajuda durante todo trabalho.

Aos professores do laboratório de farmacotécnica por toda ajuda.

À minha querida amiga Lívia pela companhia, apoio e conselhos ao longo de toda graduação. E a Mariana Naomi pela surpresa dessa nova amizade.

As minhas queridas amigas Aline e Cláudia por todo apoio ao longo da nossa amizade, mesmo longe sempre estiveram ao meu lado.

Ao CNPq por ter acreditado nesse trabalho.

*“Julgue seu sucesso pelas coisas que
você teve que renunciar para conseguir.”*

Dalai Lama

*“Só se pode alcançar um grande êxito
quando nos mantemos fiéis a nós mesmos”*

Friedrich Nietzsche

SUMÁRIO

RESUMO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1. AIDS	16
2.1.1. ZIDOVULDINA	18
2.2. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....	20
2.3. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS MUCOADESIVAS	21
2.4. POLÍMEROS COM PROPRIEDADES MUCOADESIVAS	24
3. OBJETIVOS.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. MATERIAL	28
4.2. MÉTODOS	29
4.2.1. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA	29
4.2.2. OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	30
4.2.3. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	31
4.2.3.1. Análise do tamanho de partícula, potencial zeta e PDI.....	31
4.2.3.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)	31
4.2.3.3. Microscopia Eletrônica de varredura (MEV).....	31

4.2.4. AVALIAÇÃO DO TEOR DE FÁRMACO INCORPORADO AO SISTEMA.....	31
4.2.5. AVALIAÇÃO DA MUCOADESÃO “ <i>IN VITRO</i> ”	32
4.2.6. AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO “ <i>IN VITRO</i> ” DO AZT	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA	35
5.2. OBTENÇÃO DAS NPs POLIMÉRICAS.....	36
5.3. CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS.....	38
5.3.1. Tamanho de partícula, potencial zeta e PdI	38
5.3.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)	42
5.3.3. Microscopia eletrônica de varredura.....	46
5.4. AVALIAÇÃO DO TEOR DE FÁRMACO INCORPORADO AO SISTEMA	49
5.5. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MUCOADESIVAS	50
5.6. AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO “ <i>IN VITRO</i> ” DO AZT	52
6. CONCLUSÃO.....	54
7. REFERÊNCIAS	55
8. DADOS FINAIS	61

RESUMO

A zidovudina, azidotimidina (AZT), é o fármaco mais utilizado isoladamente ou em associação com outros agentes antirretrovirais para o tratamento da AIDS, que é causada pelo vírus HIV. A baixa biodisponibilidade do AZT é o grande desafio a ser vencido para aperfeiçoar seu desempenho na terapêutica por via oral, já que sua elevada taxa de metabolização pré-sistêmica e baixa permeabilidade resultam na necessidade de administração de elevadas doses do fármaco, as quais frequentemente alcançam níveis plasmáticos tóxicos, causando efeitos adversos graves. As nanopartículas poliméricas (NPs) são pequenas partículas sólidas que visam controlar a liberação de fármacos, promover direcionamento do fármaco para sítios específicos podendo, com isto, reduzir sua concentração em outros locais que não os órgãos ou tecidos alvo e proteção dos compostos lábeis. Na administração oral, o tamanho reduzido das NPs favorece a absorção gastrointestinal do fármaco, melhorando sua biodisponibilidade. Dependendo do polímero utilizado no preparo das NPs, elas podem também apresentar propriedades mucoadesivas. Sistemas de liberação de fármacos com propriedades mucoadesivas permitem o contato íntimo do fármaco com a mucosa e o aumento do seu tempo de permanência em um sítio específico podendo também melhorar a biodisponibilidade de fármacos através do aumento do gradiente de concentração do fármaco, possibilitando o aumento da permeação do fármaco pela mucosa intestinal.

Este projeto propõe o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas para administração oral de zidovudina e avaliação das propriedades mucoadesivas destes sistemas. As NPs poliméricas desenvolvidas foram compostas por quitosana (QS) e ftalato de hidróxi propilmetilcelulose (HPMCP) e obtidas através do método da complexação polieletrólítica. As NPs foram caracterizadas pelo tamanho, PDI, potencial zeta, espectroscopia de absorção na

região do infravermelho (IV) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), teor de fármaco incorporado (TI), propriedades mucoadesivas e liberação “*in vitro*” do AZT. Foi avaliado também o efeito da concentração e a ordem de mistura dos polímeros na obtenção das partículas. As amostras em que o HPMCP foi adicionado às dispersões de QS (amostras denominadas HP) apresentaram melhor combinação dos parâmetros e, deste modo, foram selecionadas para continuar o desenvolvimento do projeto.

As amostras HP sem a incorporação do AZT exibiram tamanho de partícula reduzido na faixa de 205,9-348,7 nm, valores de PDI ficaram na faixa de 0,18-0,96 e potencial zeta de +23,9-+30,0. Após a adição do AZT observamos um aumento no tamanho de partícula 308-449,5 nm, já os valores de PDI reduziram e ficaram na faixa de 0,15-0,24, indicando que o fármaco participa da estruturação do sistema. O potencial zeta das amostras com o fármaco aumentou, a faixa foi de +25,4-+34,3 indicando uma boa estabilidade físico-química do sistema. A análise do IV revelou que ocorreu formação de NPs através da interação dos grupamentos NH_3^+ e o grupamento COOH^- do HPMCP. As propriedades mucoadesivas das NPs foram avaliadas. A presença do HPMCP não influenciou nesse parâmetro, mas sim a quantidade de polímeros usada. O teor de incorporação do AZT ao sistema foi alto e a liberação “*in vitro*” sugere que o HPMCP reduziu a liberação do fármaco em meio ácido e o controle de sua liberação em meio intestinal.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as NPs desenvolvidas podem ser uma estratégia promissora, inovadora e tecnologicamente viável para a otimização do desempenho terapêutico do AZT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do AZT	19
Figura 2 - Fórmula estrutural da QS.	24
Figura 3 - Ilustração da QS em diferentes pHs, em meio ácido (a) e básico (b) adaptado de (SILVA <i>et al.</i> , 2012).....	25
Figura 4 - Fórmula estrutural do HPMCP.	26
Figura 5 - Analisador de textura TA.XT <i>plus</i> usado para avaliar a força adesiva dos polímeros e NPs.....	33
Figura 6 - (a) Disco de mucina aderido à mesa do texturômetro, com tampão fosfato na superfície; (b) amostra aderida a probe através de uma fita dupla-face; (c) contato da probe com o disco de mucina.	34
Figura 7 - Curva de titulação potenciométrica e primeira derivada, os valores destacados correspondem ao V1 e V2 para determinação do grau de acetilação da QS.	35
Figura 8 - Distribuição de tamanho e PDI das amostras HPs e Qs em relação à fração de HPMCP.....	41
Figura 9 - Espectroscopia de absorção na região do IV.	44
Figura 10 - Espectro na região do IV da amostra NP2 com e sem AZT.....	45
Figura 11 - Espectro na região do IV da amostra NP3 com e sem AZT.....	45
Figura 12 - Espectro na região do IV da amostra NP4 com e sem AZT.....	46
Figura 13 - Fotomicrografia do AZT, obtida por MEV com aumento de 500x.....	47
Figura 14 - Fotomicrografia do HPMCP, obtida por MEV com aumento de 500x	47
Figura 15 - Fotomicrografia da QS obtidas por MEV, (a) com aumento de 370x e (b) com aumento de 1000x.....	48
Figura 16 - Fotomicrografia da NP4, obtida por MEV com aumento de 200.000x.....	49

Figura 17 - Perfil de liberação *in vitro* do AZT em NP, (a) em pH 1,2 e (b) em pH 7,4.53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições da desacetilação da QS.	36
Tabela 2 - Massas dos polímeros das NPs obtidas por complexação polietrolítica do HPMCP sobre a QS.....	37
Tabela 3 - Massas dos polímeros das NPs obtidas por complexação polietrolítica da QS sobre o HPMCP.....	37
Tabela 4 – Efeito da concentração de HPMCP no tamanho, potencial zeta e PDI das partículas obtidas pela complexação polieletrolítica do HPMCP sobre a QS.	39
Tabela 5 - Efeito da concentração da QS no tamanho, potencial zeta e PDI das partículas obtidas pela complexação polieletrolítica do QS sobre o HPMCP.	40
Tabela 6 - Tamanho de partícula, potencial zeta e PDI das NPs após incorporação do fármaco.	42
Tabela 7 - Teor de AZT incorporado ao sistema.....	49
Tabela 8 - Força de adesão dos polímeros e NPs.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIDS..... Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, sigla derivada do inglês: *Acquired Immunodeficiency Syndrome*
- ARV..... Antirretroviral
- AZT..... Zidovuldina
- BCS..... Sistema de Classificação Biofarmacêutica, sigla derivada do Inglês: *Biopharmaceutics Classification System*
- CDC..... Centro de Controle e Prevenção de Doenças, sigla derivada do Inglês: *Centers Disease Control*
- CV..... Coeficiente de variação
- DP..... Desvio Padrão
- FDA..... Sigla derivada do Inglês: *US Food and Drug Administration*
- Fq..... Fármaco quantificado
- Ft..... Fármaco total adicionado
- GD..... Grau de desacetilação da quitosana
- HIV..... Vírus da Imunodeficiência humana, sigla derivada do Inglês: *Human Immunodeficiency Vírus*
- HPMCP..... Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose
- HTLV-III Vírus T-Limfotrópico Humano, sigla derivada do Inglês: *Human T-Lymphotropic Vírus*
- IV..... Infravermelho
- MEV..... Microscopia eletrônica de varredura

NNRTI Não nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa, sigla derivada do Inglês: *Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors*

NPs..... Nanopartículas

NRTIs..... Nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa, sigla derivada do Inglês: *Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors*

PdI..... Índice de polidispersividade, sigla derivada do Inglês: *Polydispersity Index*

PEC..... Complexação polieletrólítica

PLA..... Ácido polilático, sigla derivada do Inglês: *Poly lactide*

PLC..... Ácido poli caprolactona, sigla derivada do Inglês: *A poli(ϵ -caprolactona*

PLGA..... Ácido láctico-co-ácido glicólico, sigla derivada do Inglês: *poly(lactic-co-glycolic acid)*

QS..... Quitosana

TI Teor de incorporação de fármaco

TPP Tripolisfosfato, sigla derivada do Inglês: *Triphosphate*

UV..... Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma síndrome infecciosa causada pelo vírus HIV (vírus da imunodeficiência humana), que possui tropismo viral por células linfocitárias, ocasionando alterações imunológicas (LACAZ et al., 1990). O tratamento da infecção pelo HIV tem evoluído constantemente e mudado o histórico dos casos da AIDS. Com o avanço da terapia antirretroviral (ARV), as manifestações clínicas decorrentes da infecção tornaram-se menos frequentes e houve melhora do prognóstico dos pacientes portadores desta síndrome. Além disso, o acesso dos pacientes aos diferentes fármacos antirretrovirais ampliou as possibilidades de tratamentos, melhorando o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes (PEÇANHA et al., 2002; FOCACCIA e VERONESI, 2007; MELO, 2007).

No final de 2011, 34 milhões de pessoas (31.4 a 35.9 milhões) viviam com o HIV no mundo (BRASIL, 2013). Apesar de ser uma doença que atinge grande parte da população mundial, ainda não há um tratamento efetivo na eliminação total do vírus. Atualmente, a terapia utilizada no tratamento da AIDS compreende em complexas dosagens de diferentes fármacos que causam grandes efeitos adversos aos pacientes. Além disso, o tratamento se estende por um longo período de tempo, o que pode diminuir a adesão do paciente. Novos sistemas de liberação podem melhorar a eficácia e biodisponibilidade de fármacos já existentes ou explorar novas vias de administração (OJEWOLE et al., 2008).

A zidovudina (AZT) foi o primeiro fármaco autorizado para o tratamento da AIDS pelo US Food and Drug Administration (FDA). Por possuir baixa biodisponibilidade e sofrer metabolismo pré-sistêmico, é necessário que altas doses sejam administradas, o que pode causar granulocitopenia e alcançar tóxicos níveis plasmáticos (BISWAS, 2012).

Para melhorar a biodisponibilidade do AZT, alguns sistemas de liberação têm sido propostos, como lipossomas (KAUR et al., 2008), microemulsão (TYAGI e SATHEESH

MADHAV, 2012), nanopartícula polimérica (MAINARDES *et al.*, 2010), nanopartícula lipídica sólida (HEIATI *et al.*, 1997), micelas (SHAIK *et al.*, 2008), cristal líquido (CARVALHO *et al.*, 2013), microesferas (JAIN *et al.*, 2011) e dispersão sólida (PEDREIRO, 2012)

Neste trabalho, as nanopartículas poliméricas (NPs) foram obtidas com polímeros com propriedades mucoadesivas como quitosana (QS) e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCP). A QS é um polímero com propriedades mucoadesivas que interage com o muco que reveste a mucosa. Dentre as várias propriedades, a quitosana pode controlar a liberação de agentes ativos, prolongar o tempo de residência no trato gastrointestinal, devido à propriedade mucoadesiva, além de aumentar a permeabilidade do fármaco por promover a abertura das junções celulares (DASH *et al.*, 2011). Em meio ácido, a quitosana sofre protonação dos grupos aminos, podendo liberar prematuramente o fármaco contido no sistema de liberação. Assim, o uso de polímeros com propriedades gastroresistentes como o HPMCP foi empregado para evitar que o fármaco seja liberado no meio ácido (MAKHLOF *et al.*, 2011a).

A combinação da QS com o HPMCP para obtenção de nanopartículas pode ser uma estratégia interessante para melhorar as propriedades biofarmacêuticas do AZT devido as propriedades mucoadesivas dos polímeros e a gastroresistência proporcionada pelo HPMCP.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. AIDS

A AIDS é uma doença caracterizada pela diminuição do número de células linfocitárias T CD4+, tornando o paciente mais susceptível a diversos tipos de infecções. Foi inicialmente detectada pelo Centro de Controle de Doenças dos EUA (*Centers Disease Control*) no início dos anos 80. É uma síndrome provocada por um vírus linfoneurotrópico da família Retroviridae, subfamília Lentivirinae, denominado HTLV-III (*human T-lymphotropic virus*), também conhecido como LAV (vírus associado à linfadenopatia) ou simplesmente HIV (vírus da imunodeficiência humana) (LACAZ et al., 1990).

A primeira indicação de que a AIDS era causada por um retrovírus de foi feita por Luc Montagneir e seus colaboradores no Instituto Pasteur em 1983. Estes pesquisadores observaram que havia uma alta concentração de anticorpos contra o vírus em pacientes com linfadenopatia e um tropismo deste vírus por células linfocitárias T CD4+. Nos Estados Unidos, Robert Gallo e colaboradores fizeram uma descoberta semelhante e publicaram que a AIDS era causada pelo vírus HIV (MONTAGNEIR, 2002).

O vírus HIV pode ser encontrado sob duas formas, HIV-1 e HIV-2. A infecção pelo HIV-1 induz a uma progressão mais rápida para AIDS do que o HIV-2, a forma HIV-2 é endêmica na África Ocidental (NOWROOZALIZADEH et al., 2009). É um retrovírus que, após penetrar na célula, é capaz de replicar seu material genético com auxílio da enzima transcriptase reversa para formar o DNA viral que pode agregar-se ao cromossomo do hospedeiro permanecendo na forma latente. Para que possa voltar ao seu estado ativo, é necessário ocorrer à transcrição do DNA para RNA viral (LACAZ et al., 1990).

O HIV possui tropismo por células de defesa T CD4+, importantes para o processo de obtenção de imunidade específica contra patógenos. A depleção de células T CD4+ é o principal problema dos pacientes afetados pela AIDS, pois essas células estão envolvidas em

praticamente todas as respostas imunológicas, tornando-os susceptíveis a infecções oportunistas. Após a infecção pelo vírus, ocorre o aparecimento de anticorpos específicos anti-HIV no soro devido aos altos níveis do vírus HIV e, assim, surgem os primeiros sintomas como febre, mal estar, erupção maculopapular, mialgia, úlceras orais e faringite. Sem tratamento, os níveis de células T CD4+ diminuem, tornando os indivíduos susceptíveis a várias infecções (O'COFAIGH e LEWTHWAITE, 2013). O sistema imunológico como forma de reação ao vírus promove um aumento da multiplicação das células T CD4+, mas como o vírus já está instalado dentro de grande parte destas células a multiplicação acaba favorecendo a propagação do HIV (BISWAS, 2012)

A epidemiologia durante os anos 80 indicava que a maior via de transmissão da AIDS era através do contato sexual e sangue contaminado principalmente entre homens homossexuais, bissexuais e também usuários de drogas intravenosas. Mais tarde, observou-se que a transmissão também ocorria entre heterossexuais e começou a perceber o risco de contaminação em transfusões sanguíneas e a transmissão entre mãe e recém-nascido (LEVY, 1998). No Brasil, foram notificados 686.478 casos de AIDS de 1980 a junho de 2013, sendo que, em 2012, a taxa de detecção de AIDS foi maior na faixa etária de 35-39 anos. Após a introdução da terapia ARV, a AIDS passou a ser considerada uma doença crônica, porém, se tratada de maneira correta, diminui a morte pela doença e melhora a qualidade de vida de pessoas contaminadas pelo HIV (BRASIL, 2013).

O uso de fármacos antirretrovirais é utilizado por pacientes portadores do HIV para diminuir a multiplicação do vírus (LEVY, 1993). Apesar de ser uma doença que atinge grande parcela da população mundial, ainda não há um tratamento eficaz que elimine o vírus por completo. O primeiro fármaco autorizado pelo FDA foi a zidovudina, em 1987, e, desde então, mais de 30 outros fármacos surgiram para complementar o tratamento (BISWAS, 2012). Existem 6 principais classes de fármacos antirretroviral (ARV): nucleosídeos

inibidores da transcriptase reversa (NRTIs), inibidores de protease, inibidores de fusão, inibidores da integrase, inibidor de co-receptor (CCR5) e os não nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa (NNRTI) (BISWAS, 2012; O'COFAIGH e LEWTHWAITE, 2013).

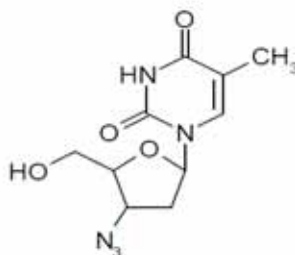
Atualmente, a terapia utilizada no tratamento da AIDS compreende complexas dosagens de diferentes fármacos que causam grandes efeitos adversos aos pacientes. Além disso, o tratamento se estende por um longo período de tempo diminuindo a adesão do paciente.

O desenvolvimento novos sistemas de liberação de fármacos, que pode resultar na melhora da eficácia e biodisponibilidade de fármacos já existentes, explorar novas vias de administração, ou ainda diminuir a frequência de administração, o que é exatamente atraente no caso de uma terapia contínua, aumentando a adesão do paciente (OJEWOLE et al., 2008).

2.1.1. ZIDOVULDINA

Zidovudina (AZT) ou azidotimidina (Figura 1) é um pró-fármaco análogo de nucleosídeo (3'-azido-3'-desoxitimidina) utilizada no tratamento da AIDS. Por ser um pró-fármaco, precisa estar ativo para exercer sua atividade, o que ocorre através da fosforilação pela enzima timidina quinase intracelular (VEAL e BACK, 1995). É rapidamente absorvido após administração por via oral; entretanto, sua biodisponibilidade é baixa (em torno de 60%), devido ao metabolismo pré-sistêmico e à rápida conversão no seu metabólito inativo o 5'-O-glicuronídeo (RACHLIS, 1990).

Figura 1 - Estrutura química do AZT



Após administração oral do AZT, os picos de concentração são atingidos dentro 0,5 a 1,5 horas e, para manter o nível terapêutico, altas doses devem ser administradas frequentemente, o que pode causar efeitos adversos graves como granulocitopenia (OH *et al.*, 1998; NASCIMENTO *et al.*, 2004). Outros efeitos adversos como dor de cabeça, miopatia, náusea, vômito, leucopenia e hiperlipidemia podem ocorrer (WARNKE *et al.*, 2007).

As formas farmacêuticas disponíveis para o AZT são xarope, solução e cápsulas e, quando usado em associação com outro fármaco, também se encontra na forma de comprimido. A via de administração mais comum para o AZT é a oral e possui algumas vantagens como fácil adesão do paciente, facilidade na hora da administração, além de ser uma via segura.

O desenvolvimento de novas moléculas de fármacos é um processo caro e pode levar vários anos até que esteja disponível no mercado. Após sua descoberta, é necessário que o fármaco seja submetido a diversos estudos: fase I (indivíduos saudáveis para avaliar a dose mais adequada e também informações sobre absorção, distribuição e efeitos metabólicos e toxicidade), fase II (indivíduos apresentam a doença para qual o fármaco está sendo analisado, a fim de verificar dados sobre eficácia e segurança) e fase III (os estudos são realizados com um número maior de pacientes, com o objetivo de determinar risco/benefício a curto e longo prazos das formulações do princípio ativo). Todos esses estudos geram um alto custo e, muitas vezes, o fármaco não apresenta seletividade. O uso de sistemas de liberação de

fármacos é uma alternativa não só para novos fármacos, mas também para aqueles fármacos já utilizados, mas que apresentam propriedades farmacológicas, toxicológicas ou biofarmacêuticas inadequadas (DIMASI et al., 2003).

De acordo com a Biopharmaceutics Classification System (BCS), o AZT pertence à classe III, por possuir alta solubilidade em fluídos biológicos e baixa permeabilidade (AMIDON et al., 1995). Para melhorar as propriedades biofarmacêuticas do AZT, novos sistemas de liberação têm sido propostos como: como lipossomas (KAUR et al., 2008), microemulsão (TYAGI e SATHEESH MADHAV, 2012), nanopartícula polimérica (MAINARDES *et al.*, 2010), nanopartícula lipídica sólida (HEIATI et al., 1997), micelas (SHAIK *et al.*, 2008), precursores de cristal líquido (CARVALHO et al., 2013), microesferas (JAIN et al., 2011) e dispersão sólida (PEDREIRO, 2012).

2.2. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Os sistemas de liberação de fármacos têm como objetivo direcionar os fármacos para locais desejados, de modo a evitar possíveis efeitos colaterais e permitir o controle da liberação do fármaco. Dentre os sistemas de liberação estão incluídos os cristais líquidos, nanopartículas, sistemas transdérmico e dendrímeros (OLIVEIRA *et al.*, 2004; CHORILLI *et al.*, 2007; PEZZINI *et al.*, 2007; STELLA *et al.*, 2007; SAULNIER *et al.*, 2008; NANJWADE *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2010; MAKHLOF *et al.*, 2011b; BONCEL *et al.*, 2013; ASHARA *et al.*, 2014; SAFARI e ZARNEGAR, 2014). Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao desenvolvidos de sistemas de liberação, dentre eles estão incluído os cristais líquidos, hidrogéis, dispersões sólidas, nanoparticulas, dispersões lipídicas (MAINARDES, 2007; CARVALHO *et al.*, 2008; SOUZA, 2008; CAMPOS, 2009; BARBI, 2011; PEDREIRO, 2012; CARVALHO *et al.*, 2013)

A liberação modificada de fármacos tem como finalidade promover o controle temporal e espacial da concentração do fármaco para que a eficácia clínica seja maximizada e os efeitos adversos possam ser os menores possíveis (VILLANOVA et al., 2010).

Os avanços na pesquisa de novos sistemas de liberação foram primeiramente baseados na síntese de polímeros funcionais, mas hoje em dia o desenvolvimento desses sistemas é induzido pela compreensão detalhada dos princípios biológicos e moleculares que definirão as estratégias para o seu desenvolvimento. O desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos mais refinados requer que seu delineamento propicie melhora na farmacocinética, diminuição da toxicidade, direcionamento do fármaco para um sítio específico e a liberação modificada do fármaco (GRUND et al., 2011).

O uso da nanotecnologia pode proporcionar a melhora na entrega de fármacos ou de grandes macromoléculas, o direcionamento fármaco a um sítio alvo, a promoção de transcitose através de barreiras endoteliais, liberação controlada, administração de dois ou mais fármacos em terapia combinada, aumento da biodisponibilidade do fármaco e diminuição dos efeitos tóxicos ou colaterais do fármaco (LIU et al., 2008; FAROKHZAD e LANGER, 2009). Outra grande contribuição destes sistemas é a compreensão dos mecanismos envolvidos no transporte de fármacos através das membranas biológicas e os meios para atingi-las ou ainda evitá-las. A utilização de vias alternativa para a administração de fármacos empregando estes sistemas pode melhorar eficiência e a adesão do paciente ao tratamento, principalmente daquelas patologias com maior complexidade ou severidade, como câncer, infecções por parasitas, bactérias, fungos ou vírus.

2.3. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS MUCOADESIVAS

Nanopartículas (NPs) são carreadores de fármacos capazes de compartimentar a substância ativa e direcionar para os alvos específicos. São utilizadas como sistema de

liberação e tem como objetivo promover melhora da estabilidade, a absorção, o controle da liberação e a proteção do fármaco, possibilitando melhorar a eficácia do fármaco. O reduzido tamanho de partícula favorece a interação do fármaco com os sistemas biológicos, além de beneficiar sua absorção (SANTOS-MAGALHAES et al., 2000). Atualmente o foco das pesquisas com nanopartículas é promover a combinação de diferentes materiais que permitam modificar a velocidade de liberação do fármaco, alterar a superfície das NPs para que ela atinja locais específicos, avaliar a interação dela com a interface biológica (biointerface) como sangue e órgãos, e desenvolver métodos que permitam a transposição de escala para a indústria (LIU et al., 2008).

O desenvolvimento de sistemas de liberação que prolonguem o tempo de residência intestinal e ainda permitam um contato maior com a mucosa intestinal representa uma estratégia para aumentar o gradiente de concentração no local de ação ou absorção do fármaco (HÄGERSTRÖM, 2003).

Polímeros com propriedades mucoadesivas, como a QS, gelatina, PLA, PLGA e PCL, podem ser utilizados no preparo de nanopartículas poliméricas. As nanopartículas poliméricas podem ser classificadas quanto a sua composição e organização estrutural divididos em nanocápsulas e nanoesferas, em ambas as estruturas o fármaco pode estar aprisionado no seu interior ou adsorvido na superfície (GUPTA e JAIN, 2010; KUMARI *et al.*, 2010; SAFARI e ZARNEGAR, 2014).

As NPs podem se formar por diferentes mecanismos como ligação covalente, ligação iônica cruzada, complexação polieletrólítica ou emulsificação. Para NPs preparadas por reticulação covalente, geralmente, se utiliza o glutaldeído como agente de ligação cruzada, já na reticulação iônica, o tripolifosfato (TPP) é o mais usado. A complexação polieletrólítica é um método usado apenas para polímeros capazes de reticular através de cargas iônicas opostas. A QS e seus derivados são os polímeros de carga positiva mais utilizados, sendo a

carboximetilcelulose, alginato, HPMCP, ácido poliacrilato, ácido polimetil acrilato e sulfato de dextrano os polímeros de carga negativa mais comumente empregados na complexação da QS (CUI e MUMPER, 2001; CHEN et al., 2005; TIYABOONCHAI e LIMPEANCHOB, 2007; LIU et al., 2008; MAKHLOF et al., 2011a).

Os sistemas de liberação particulados, quando em contato com o muco que reveste a mucosas, podem ficar aderidos até serem eliminados pelo *clearance* fisiológico. Esta estratégia pode ser interessante para aumentar o gradiente de concentração no local de ação ou absorção (HARDING, 2003). Neste sentido, sistemas de liberação mucoadesivos podem ser uma alternativa para melhorar a biodisponibilidade de fármacos através do aumento do tempo de residência intestinal do sistema de liberação que permite maior contato do fármaco com a mucosa intestinal e, conseqüentemente, aumento da absorção do fármaco (VARUM et al., 2008).

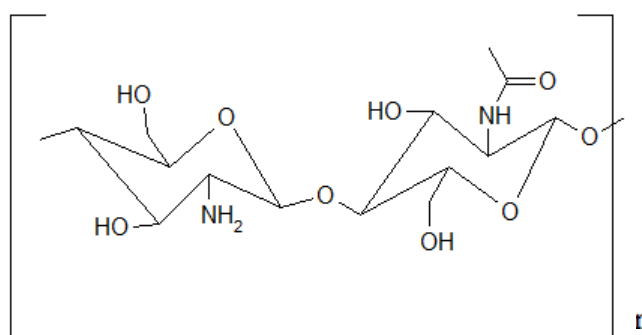
A mucoadesão ocorre através da adesão de um polímero à superfície do muco. Não há uma única teoria que descreva os mecanismos da mucoadesão, mas sim várias que, em conjunto, ajudam na sua compreensão. Algumas das teorias descritas na literatura são a teoria eletrônica (que está relacionada com a interação eletrostática entre a carga positiva do sistema de liberação e carga negativa da mucina), a teoria da adsorção (a interação ocorre por ligação de hidrogênio e van der Waals), a teoria da molhabilidade (capacidade do polímero de intumescer e se fixar na superfície da mucosa), a teoria da difusão (é dependente do tempo e está relacionada com as cadeias dos polímeros e a quantidade de glicoproteína no muco), a teoria da fratura (a força de separação entre duas superfícies está relacionada com a força de adesão entre elas) e a teoria mecânica (depende da irregularidade da superfície e a área disponível para interação) (SOSNIK et al., 2014).

2.4. POLÍMEROS COM PROPRIEDADES MUCOADESIVAS

Os polímeros se destacam no avanço da tecnologia dos sistemas de liberação por proporcionarem a liberação modificada / controlada de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos. As inovações nesta área estão, atualmente, baseadas na aplicação de polímeros adaptados e específicos para cada finalidade para exercer funções distintas (GRUND et al., 2011).

A QS (Figura 2) é um polímero biodegradável derivado da desacetilação da quitina, apresenta diversas massas moleculares, viscosidades e grau de desacetilação. É um polímero catiônico e em meio ácido seus grupamentos aminos sofrem protonação, tornando-se solúveis em meio aquosos. Sua degradação *in vivo* ocorre através da catálise enzimática e sua eliminação é renal, é um polímero não tóxico aprovado pelo FDA. Apresenta inúmeras propriedades que justificam o seu uso, como: formação de filme que permite a liberação controlada de fármacos, mucoadesividade, geleificação, aumento da permeação do fármaco na mucosa, atividade antifúngica, biodegradável e baixa toxicidade (WANG et al., 2011). Alguns estudos tem demonstrado a QS apresenta efeito promotor na absorção através da abertura das *tight junctions* (junções celulares) na membrana das células da mucosa (ARTURSSON et al., 1994; SCHIPPER et al., 1997).

Figura 2 - Fórmula estrutural da QS.

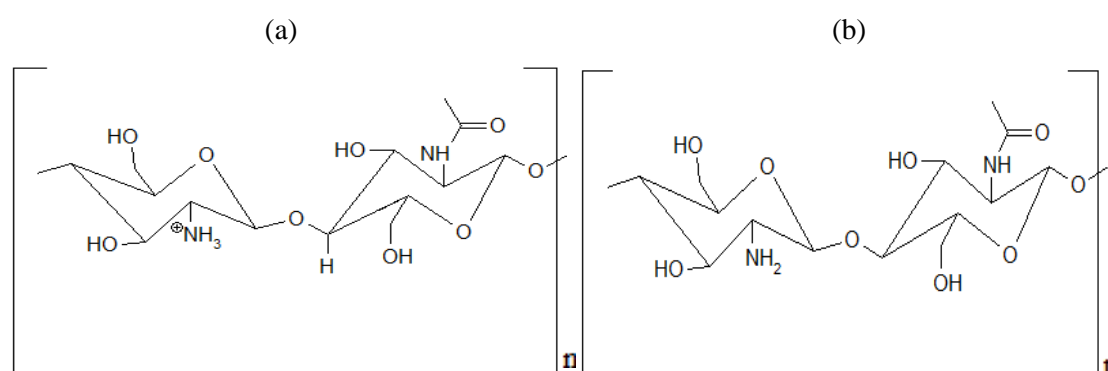


No desenvolvimento de NPs, a QS apresentam diversas vantagens já que não necessita de solventes orgânicos para a obtenção de sistemas de liberação, promove reticulação iônica

com ânions multivalente, tem propriedades mucoadesivas e possui baixa toxicidade. Pode interagir através da ligação dos seus grupamentos carboxílico e aminos com a mucina formando ligação de hidrogênio proporcionando efeito mucoadesivo. Quanto maior for a massa molecular e o grau de desacetilação mais mucoadesiva a QS será (AGNIHOTRI et al., 2004; WANG et al., 2011).

Em meio ácido, a QS sofre protonação dos grupos aminos representado na Figura 3, podendo liberar prematuramente o fármaco contido no sistema de liberação. Assim, o uso de polímeros com propriedades gastrorresistentes como HPMCP é adequado para evitar que o fármaco seja liberado no meio ácido (MAKHLOF et al., 2011a).

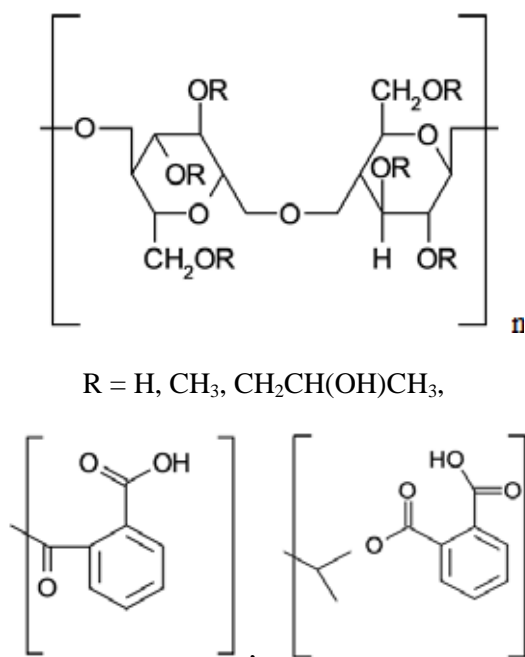
Figura 3 - Ilustração da QS em diferentes pHs, em meio ácido (a) e básico (b) adaptado de (SILVA et al., 2012).



O HPMCP (Figura 4) é um polímero praticamente insolúvel em água preparado a partir da hidroxipropilmetilcelulose através da esterificação com o anidrido ftálico. É insolúvel em meio ácido justificando seu uso como revestimento entérico evitando, desse modo, a degradação de fármacos instáveis nesse pH. Em pH acima de 5,5 (intestino) ele se dissolve e libera o fármaco. Além dessas aplicações, o HPMCP é também usado como agente de geleificação e estabilizante na indústria alimentícia. É aprovado pelo FDA para uso farmacêutico. Também é considerado um polímero mucoadesivo, os grupamentos hidroxilas presentes na sua estrutura interagem com a mucina por ligações secundárias não covalentes,

formando pontes de hidrogênio com o muco, proporcionando a adesão (KIM et al., 2003; MEEHAN, 2006; MAKHLOF et al., 2011a).

Figura 4 - Fórmula estrutural do HPMCP.



A combinação da quitosana com o HPMCP para obtenção de nanopartículas pode ser uma estratégia interessante para melhorar as propriedades biofarmacêuticas do AZT unindo as propriedades mucoadesivas dos polímeros e a gastrorresistência proporcionada pelo HPMCP.

3. OBJETIVOS

Desenvolver e caracterizar nanopartículas poliméricas com propriedades mucoadesivas para a administração oral de zidovudina.

Desta forma, para alcançar os objetivos propostos, foram realizadas as seguintes etapas:

- Obtenção das NPs;
- Caracterização físico-química das NPs: tamanho de partícula, potencial zeta, PDI, morfologia e espectroscopia de absorção na região do infravermelho;
- Avaliação do teor de incorporação de fármaco nas nanopartículas poliméricas por espectroscopia de absorção na região do UV;
- Avaliação da mucoadesão “*in vitro*”;
- Avaliação do perfil de liberação “*in vitro*” do AZT contido nas NPs.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Matérias-primas:

- Ácido clorídrico (Quimis[®]);
- Água destilada;
- Brometo de potássio (Vetec[®]);
- Etanol 99,3% (Quimis[®]);
- Fosfato de potássio monobásico (Quimis[®]);
- Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (Shin-Etsu[®]);
- Hidróxido de sódio (Grupo Química[®]);
- Membrana de acetato de celulose - tamanho de poro de 14 kDa (Sigma Aldrich[®]);
- Mucina tipo II (Sigma Aldrich[®]);
- Quitosana de baixo peso molecular (Sigma Aldrich[®]);
- Zidovudina (doada pela Fundação para o Remédio Popular, FURP).

Equipamentos :

- Agitador magnético (Fanem[®] 258);
- Agitador mecânico ultraturrax Turratec TE-102 (Tecnal[®]);
- Analisador de espalhamento de luz dinâmica (DLS, Zetasizer Nano NS, Malvern Instruments, Malvern, UK);
- Analisador de textura TA.XT *plus*[®] (Stable Micro Systems, UK);
- Balança analítica (Mettler Toledo[®] AB 265 - S/Fact);
- Balança semi-analítica (Ohaus[®]);

- Célula de difusão do tipo Franz (Hanson Research - Flowscience[®]);
- Espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier (Shimadzu[®] 8300);
- Espectrofotômetro de UV-VIS, com HP UV-Visible ChemStation Software (Hewlett Packard[®] 8453);
- Estufa de secagem e esterilização (Fanem[®] 3515 SE);
- HPLC Varian, com detector espectrofotométrico ProStar[®] 330 UV-VIS PDA e Rheodine VS 125, auto-amostrador Varian ProSar[®] modelo 410;
- Máquina de comprimir, modelo excêntrico (Fabbe[®]);
- Peagometro (Gehaka[®] PG 1800);
- Sistema de purificação de água Millipore (Milli-Q Plus[®]).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

4.2.1.1. Desacetilação da quitosana

O grau de desacetilação (GD) da QS foi determinado por titulação potenciométrica ácido – base (ASSAAD et al., 2011). Uma massa de 150 mg de quitosana foi solubilizada em 20 ml de HCl (0,1 M), em constante agitação para que ocorresse protonação dos grupos aminos disponíveis. Posteriormente, o volume foi completado para 200 ml com água destilada. A solução obtida foi titulada com NaOH (0,1 M), sendo os valores de pH utilizados para obtenção da curva de titulação. O grau de desacetilação foi determinado de acordo com:

$$\% DDA = \frac{203 \times (V_2 - V_1) \times M \times 100}{m + 42 \times (V_2 - V_1) \times M} \quad \text{Eq. 1}$$

Em que, v_1 e v_2 são, respectivamente, os volumes de NaOH correspondentes aos dois pontos de inflexões da curva; M é a concentração de NaOH (mol/L); m é a massa de QS (g); 203 (g/mol) é a massa molar de unidade acetiladas; 42 (g/mol) é a diferença entre a massa molar da unidade acetilada e a unidade desacetilada.

4.2.2. OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

A obtenção das NPs poliméricas foi realizada segundo o método proposto por MAKHLOF et al. (2011a), através da complexação polieletrólítica do polímero catiônico (QS) com o polímero aniônico (HPMCP).

Foram preparadas soluções de HPMCP (2mg/ ml) em NaOH 0,1M e soluções de QS (4mg/ml) em ácido acético 0,1M, ambas com ajuste de pH 5,5. O efeito da concentração e a ordem de mistura dos polímeros foram avaliados. As amostras em que o HPMCP foi adicionado às dispersões de QS foram denominadas HP e as amostras as quais foram preparadas adicionando a QS nas dispersões de HP foram nomeadas com QS. As amostras denominadas HP foram preparadas com 10 mg de QS e quantidades de HPMCP que variaram de 1-15 mg. As amostras denominadas QS a quantidade de HPMCP foi fixada (10 mg) e de QS variada (5-30mg). Estas amostras foram avaliadas quanto ao tamanho, polidispersibilidade e força mucoadesiva.

Em seguida, o fármaco foi adicionado à solução polimérica aniônica e homogeneizado por 10 minutos. Lentamente, a solução de HPMCP contendo AZT foi adicionada à solução de QS, sob agitação magnética por 30 minutos.

Nanopartículas poliméricas sem fármaco foram obtidas pela mesma metodologia nas mesmas proporções.

4.2.3. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

4.2.3.1. Análise do tamanho de partícula, potencial zeta e PDI

A avaliação do tamanho de partícula, potencial zeta e PDI (índice de polidispersividade) das NPs poliméricas foram realizadas utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering*), sob ângulo de 173°.

4.2.3.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

A caracterização por espectroscopia de absorção na região do infravermelho foi realizada para os polímeros livres, AZT, NPs com e sem fármaco. A obtenção das pastilhas das amostras foi realizada em uma prensa hidráulica sob força de 8 toneladas por 10 minutos, pela mistura com KBr.

O ensaio foi realizado em um espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu® 8300, abrangendo uma região de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.2.3.3. Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)

A análise morfológica das NPs foi realizada utilizando o microscópio eletrônico de varredura, Jeol® JSM-7500F. As amostras liofilizadas foram fixadas sobre uma fita de carbono para análise do material. Também foi analisada a morfologia do AZT e dos polímeros livres.

4.2.4. AVALIAÇÃO DO TEOR DE FÁRMACO INCORPORADO AO SISTEMA

Para determinar o teor de AZT incorporado, uma massa das NPs liofilizadas (equivalente a 10 mg de AZT) foi dispersa em água e agitada por 1 minuto para

homogeneização. Posteriormente, foram centrifugadas a 15000 rpm por 40 min e o fármaco presente no sobrenadante foi quantificado por espectrofotometria UV em 267 nm empregando método validado por PEDREIRO (2012). O teor de incorporação de fármaco foi calculado segundo a equação:

$$TI \% = \frac{F_q}{F_t} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

Em que TI % é o teor de incorporação de fármaco (%); F_q é o fármaco quantificado e F_t é a fármaco total adicionado.

4.2.5. AVALIAÇÃO DA MUCOADESÃO “*IN VITRO*”

As propriedades mucoadesivas dos polímeros livres e das NPs com fármaco amostras foram determinadas em analisador de textura *TA.XT plus* (*Stable Micro Systems, UK*) (Figura 5) com carga de 50 N e equipado com um suporte mucoadesivo (disco de mucina), previamente hidratado com tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,4), simulando o meio entérico, durante 60 segundos.

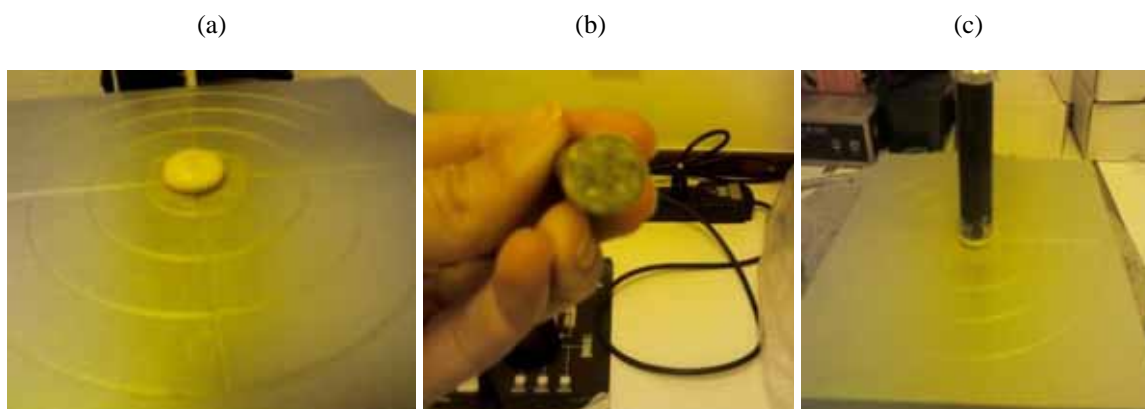
Figura 5 - Analisador de textura TA.XT *plus* usado para avaliar a força adesiva dos polímeros e NPs.



As amostras em pó foram fixadas, com o auxílio da fita dupla face, na sonda cilíndrica de 10 mm de diâmetro (Figura 6). Os discos de mucina foram hidratados com tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,4), simulando o meio entérico, durante 60 segundos. Durante todo o ensaio, foi mantida constante uma temperatura de 37° C.

A metodologia aplicada neste ensaio foi adaptada de FRANSÉN e colaboradores (2008) e realizada no modo “*compression*” com uma velocidade teste de 0,5 mm/s, sob uma força de gatilho de 2 mN (FRANSEN et al., 2008). A sonda com a amostra foi movida para baixo a uma velocidade de 2,0 mm/s até o contato com o disco de mucina e mantida por 600 segundos. Após o tempo de contato a velocidade de volta foi de 2,0 mm/s. A força máxima necessária para separar a sonda com a amostra do disco de mucina foi detectada através do *software Texture Exponent Lite* e a força total envolvida (Wad) foi calculada a partir da área do gráfico de força *versus* distância.

Figura 6 - (a) Disco de mucina aderido à mesa do texturômetro, com tampão fosfato na superfície; (b) amostra aderida a probe através de uma fita dupla-face; (c) contato da probe com o disco de mucina.



4.2.6. AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO “*IN VITRO*” DO AZT

O aparato células de Franz foi utilizado para avaliar a liberação do fármaco a partir das NPs, segundo procedimento proposto por MCCARRON *et al.* (2000) Foram utilizados como meios receptores HCl 0,1 N (pH 1,2) durante 2 horas e tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,4) durante 12 horas, a 37°C. Uma membrana de acetato de celulose (tamanho de poro de 14 kDa) foi utilizada para a separação dos meios e a dispersão de NPs (540 µg/ml de AZT) foi introduzida no compartimento doador. Alíquotas foram coletadas do meio receptor em intervalos pré-determinados, com reposição imediata, mantendo as condições *sink* (n=6). A quantificação do fármaco liberado foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (267 nm), de acordo com metodologia previamente validada por (CARVALHO *et al.*, 2009).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

5.1.1. Desacetilação da quitosana

A determinação do grau de desacetilação (GD) da quitosana permitiu conhecer a quantidade de grupos aminos livres no polímero, portanto possibilita diferenciar a quitosana da quitina (CANELLA e GARCIA, 2001).

O GD é uma propriedade muito importante da QS e pode influenciar as propriedades física, química e biológica e o seu uso industrial. Muitos métodos têm sido utilizados para determinação do grau de desacetilação da QS como: espectroscopia de infravermelho, espectrofotometria do UV, ressonância magnética nuclear, titulação coloidal e titulação potenciométrica (RAYMOND et al., 1993; JIANG et al., 2003). Quanto maior o grau de desacetilação da QS e seu peso molecular maior será sua capacidade adesiva (WANG et al., 2011).

O GD da QS foi determinado através da titulação potenciométrica ácido-base. A curva da titulação e sua primeira derivada estão representadas na Figura 7. Os pontos de inflexão obtidos foram substituídos na Eq. 1 para a obtenção do GD. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Figura 7 - Curva de titulação potenciométrica e primeira derivada, os valores destacados correspondem ao V1 e V2 para determinação do grau de acetilação da QS.

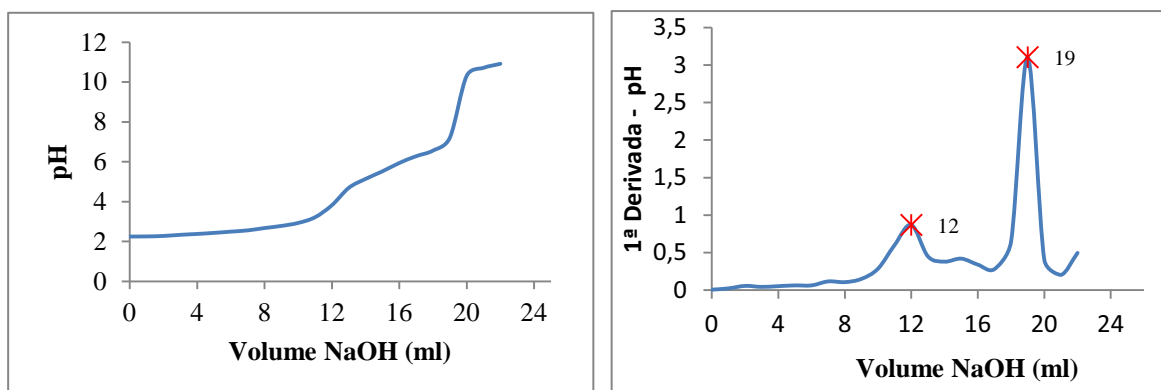


Tabela 1 - Condições da desacetilação da QS.

Massa de Quitosana (mg)	Δ (V2-V1) (ml)	% GD
151,80	0,07	92,80
151,90	0,07	92,80
150,04	0,07	92,89
Média		92,83
Desvio Padrão		$\pm 0,06$

A QS utilizada apresentou um alto grau de desacetilação (92,83%), ou seja, ela possui grande quantidade de grupamentos aminos livres que pode favorecer a sua reticulação com o polímero aniônico e também indica sua capacidade adesiva, pois esses grupamentos aminos podem interagir com o ácido sálico presente na mucina.

5.2. OBTENÇÃO DAS NPs POLIMÉRICAS

A formação das NPs ocorre pela complexação polieletrólítica da solução catiônica de QS com a solução aniônica de HPMCP, resultando em uma interação intra e intermolecular do grupamento amino da QS e o grupamento carregado negativamente do HPMCP (MAKHLOF et al., 2011a).

Para a obtenção dos complexos polieletrólíticos avaliou-se a influência da ordem de adição dos polímeros na formação das partículas. Primeiramente, a massa de HPMCP foi variada e vertida sobre uma massa fixa de QS em dispersão, sob agitação por 30 min (Tabela 2).

Tabela 2 - Massas dos polímeros das NPs obtidas por complexação polietrolítica do HPMCP sobre a QS.

Amostra	Massa polímero (mg)			Proporção QS:HPMCP
	QS	HPMCP	Quantidade total	
HP 1	10	1	11	1:0,1
HP 2	10	2	12	1:0,2
HP 3	10	3	13	1:0,3
HP 4	10	4	14	1:0,4
HP 5	10	5	15	1:0,5
HP 7,5	10	7,5	17,5	1:0,75
HP 10	10	10	20	1:1
HP 12,5	10	12,5	22,5	1:0,125
HP 15	10	15	25	1:1,5

Em seguida, a massa de QS foi variada e vertida sobre uma massa fixa de HPMCP em dispersão, agitação por 30 min, conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Massas dos polímeros das NPs obtidas por complexação polietrolítica da QS sobre o HPMCP.

Amostra	Massa polímero (mg)			Proporção QS:HPMCP
	HPMCP	QS	Quantidade total	
QS 5	10	5	15	0,5:1
QS 7,5	10	7,5	17,5	0,75:1
QS 10	10	10	20	1:1
QS 12,5	10	12	22,5	1,25:1

Amostra	Massa polímero (mg)			Proporção QS:HPMCP
	HPMCP	QS	Quantidade total	
QS 15	10	15	25	1,5:1
QS 20	10	20	30	2:1
QS 30	10	30	40	3:1

Em ambos os casos ao misturar os polímeros verificamos que a solução inicialmente ficava translúcida e posteriormente se tornava opalescente, o que indicou a formação de NPs (MAKHLOF et al., 2011a).

5.3. CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

5.3.1. Tamanho de partícula, potencial zeta e PDI

O tamanho das NPs é um importante atributo de qualidade, pois pode influenciar vários mecanismos biológicos, como endocitose, estabilidade física e *uptake* celular, e será dependente da biointerface alvo. Geralmente, os fatores que determinam o tamanho de partícula são a concentração de polieletrólitos e o grau de complexação, sendo este dependente do pH do meio e do grau de ionização dos polieletrólitos. Partículas menores e mais compactas pode ser o resultado de um maior entrelaçamento das cadeias dos polieletrólitos, causado por uma maior interação eletrostática entre os polímeros (AVADI et al., 2010)

O potencial zeta representa a carga de superfície das partículas, podendo ser influenciado por alterações na interface com o meio dispersante, por conta da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas no meio de dispersão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; AULTON, 2005)

O emprego de QS nas NPs pode facilitar a interação com membranas biológicas, pois seus grupamentos aminos livres carregados positivamente podem resultar em interações eletrostáticas com os grupamentos aniônicos da mucina presente no muco (BRAVO-OSUNA *et al.*, 2007)

O AZT possui pKa de 9,8, deste modo, em pH 5,5 ele adquire carga positiva, a sua interação com a NP pode ter ocorrido por meio da interação iônica com os grupamentos carregados negativamente proporcionados pelo HPMCP (MA *et al.*, 2002).

A Tabela 4 apresenta os resultados das determinações de tamanho, potencial zeta e PDI para as NPs obtidas pela complexação polieletrólítica do polímero aniônico (HPMCP) sobre o catiônico (QS). Observou-se que o aumento da massa de HPMCP contribuiu para o aumento do PDI que ficou acima de 0,7 para a amostra HP5, o que indica a formação de populações de partículas com diferentes tamanhos. Nesta condição, a quantidade total de polímeros é 15. Os valores do potencial zeta são reduzidos, mas continuam positivos.

Tabela 4 – Efeito da concentração de HPMCP no tamanho, potencial zeta e PDI das partículas obtidas pela complexação polieletrólítica do HPMCP sobre a QS.

Amostra	Tamanho (nm)	Potencial Zeta ζ (mV)	PDI
HP 1	248,4	+ 29,8	0,37
HP 2	270,6	+ 30,0	0,24
HP 3	285,5	+ 29,0	0,15
HP 4	276,9	+ 28,6	0,18
HP 5	240,3	+ 29,3	0,77
HP 7,5	205,9	+ 24,0	0,96
HP 10	348,7	+ 23,9	0,78
HP 12,5	Aglomerado	-	-

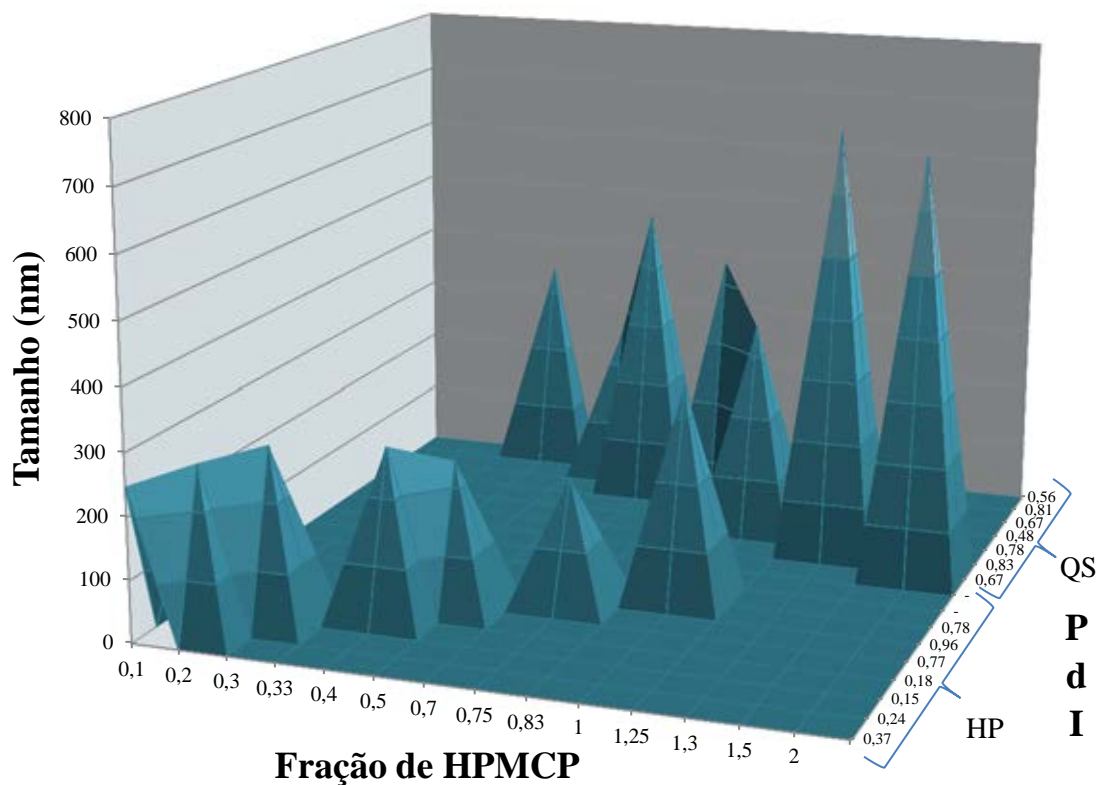
Amostra	Tamanho (nm)	Potencial Zeta ζ (mV)	PdI
HP 15	Aglomerado	-	-

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados da influência da complexação do polímero catiônico (QS) sobre o aniônico (HPMCP). Pode-se observar que o aumento da proporção de QS favoreceu a obtenção de partículas menores, porém com valores de PdI maiores que os observados com as amostras anteriores.

Tabela 5 - Efeito da concentração da QS no tamanho, potencial zeta e PdI das partículas obtidas pela complexação polieletrólítica do QS sobre o HPMCP.

Amostra	Tamanho (nm)	Potencial Zeta ζ (mV)	PdI
QS 5	686,7	+ 23,6	0,67
QS 7,5	700,2	+ 23,2	0,83
QS 10	348,7	+ 23,9	0,78
QS 12,5	436,5	+ 28,2	0,48
QS 15	490,1	+ 29,5	0,67
QS 20	258,4	+ 26,5	0,81
QS 30	343,2	+ 25,4	0,56

Figura 8 - Distribuição de tamanho e PDI das amostras HPs e Qs em relação à fração de HPMCP.



Observamos através da Figura 8 que ao aumentarmos a fração de HPMCP na complexação polieletrólítica do polímero catiônico (QS) sobre o aniônico (HPMCP) ocorreu um aumento do tamanho de partícula. Na condição em que a complexação polieletrólítica foi realizada adicionando o polímero aniônico (HPMCP) sobre o catiônico (QS), observa-se que o aumento da massa de QS contribuiu para a diminuição do tamanho das partículas (Tabela 4). Entretanto, comparando os resultados de ambas as condições, os melhores resultados em relação ao PDI, tamanho e potencial zeta das partículas foram para as amostras em que o polímero aniônico foi adicionado sobre o catiônico.

As NPs com tamanho de até 300 nm e massa variando de 1 a 5 mg de HPMCP foram escolhidas para incorporação do fármaco.

A incorporação do fármaco foi realizada com a sua solubilização na solução de HPMCP antes da adição à QS. Os resultados do tamanho de partícula, PDI e potencial zeta dessas amostras encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Tamanho de partícula, potencial zeta e PDI das NPs após incorporação do fármaco.

Amostra	Massa de polímero (mg)		AZT (mg)	Tamanho (nm)	Potencial Zeta ζ (mV)	PDI
	QS	HPMCP				
HP ₁	10	1	20	449,5	+ 34,3	0,24
HP ₂	10	2	20	377,3	+ 25,9	0,22
HP ₃	10	3	20	355,8	+ 30,5	0,22
HP ₄	10	4	20	317,9	+ 25,7	0,15
HP ₅	10	5	20	308,5	+ 25,4	0,16

Após a incorporação do fármaco ocorreu um aumento no tamanho de partícula, possivelmente devido o fármaco penetrar na estrutura da NPs. Os valores de PDI foram menores, o que pode sugerir que o fármaco participa da estruturação das partículas. Os valores do potencial zeta são maiores para as formulações HP3 e HP1, todos os valores de PDI são adequados. As amostras selecionadas para os experimentos seguintes foram: HP2, HP3 e HP4, renomeadas por NP2, NP3 e NP4, respectivamente. Estas amostras foram escolhidas por apresentarem melhor combinação dos resultados.

5.3.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

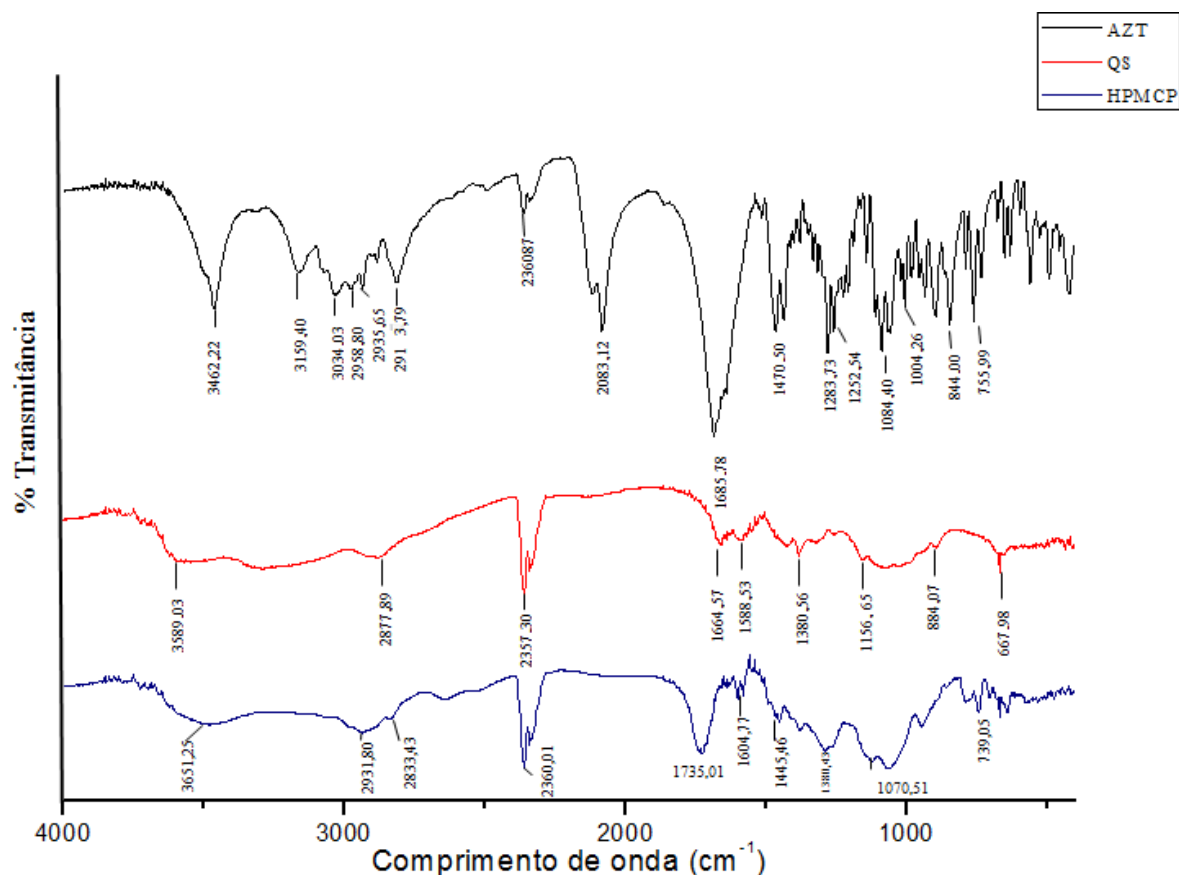
A espectroscopia de absorção na região do IV baseia-se no fato das ligações químicas das substâncias apresentam frequência de vibração específica. A região vibracional do IV que inclui radiação com comprimento de onda (λ) entre 2,5 e 25 μm ou em termos de número de

ondas de 4000 a 400 cm^{-1} , fornece informações importantes sobre a estrutura da molécula analisada, apenas moléculas que tenham ligação de momento dipolo que altera em função do tempo são capazes de absorver radiação IV. Cada tipo de ligação vibra em uma frequência característica, mesmo sendo iguais em dois compostos diferentes elas terão um espectro de absorção distintas por estarem em ambientes diferentes, deste modo nos permite distingui-las (PAVIA et al., 2012).

O espectro de absorção na região do infravermelho da QS pode ser observado na Figura 9 em que as bandas na região de 1650 a 1665 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento de C=O da amina do grupo acetamido, as bandas entre 1560 a 1610 cm^{-1} à deformação axial do grupo NH_2 no plano, as bandas de 1300 a 1000 cm^{-1} atribuídas ao estiramento C-O e bandas de 3350 a 3180 cm^{-1} ao estiramento do grupo NH_2 (SILVERSTEIN et al., 2000).

Através do espectro de absorção na região do infravermelho do HPMCP também representado na Figura 9 observamos que as bandas na região de 3400 a 2400 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento do grupo O-H, banda em 2829 cm^{-1} ao grupo metoxi, em 1735 cm^{-1} relacionada ao estiramento do grupo C=O do grupo éster, bandas de 1600 a 1500 cm^{-1} atribuídas ao anel aromático, banda em 1276 cm^{-1} atribuída ao grupo éster, bandas de 1200 a 1000 cm^{-1} conferidas ao grupo éter e em 744 cm^{-1} atribuída ao anel aromático monosubstituído (SILVERSTEIN et al., 2000).

Figura 9 - Espectroscopia de absorção na região do IV.



A Figura 9 apresenta o espectro de absorção na região do infravermelho do AZT com picos característicos, como: bandas entre 3550 a 3200 cm^{-1} representando o estiramento de bandas OH, banda em 1089 cm^{-1} para ligação C-O de grupos OH, banda em 2083 cm^{-1} atribuído ao C=N=N=N (ARAÚJO et al., 2003).

As Figura 10, 11 e 12 representam os espectros de absorção na região do IV das NPs 2, 3 e 4, respectivamente. A formação das NPs foi evidenciada através da interação de grupamentos aminas protonadas da QS e de grupamentos carboxílicos do HPMCP (região de bandas entre 1641 e 1525 cm^{-1}). Também se observou o alargamento da banda de 3500 – 3100 cm^{-1} , indicando um possível aumento nas ligações de hidrogênio. (SANKALIA et al., 2007). Não foram observados picos característicos do AZT nas NPs, indicando que o fármaco interagiu com o sistema criado.

Figura 10 - Espectro na região do IV da amostra NP2 com e sem AZT.

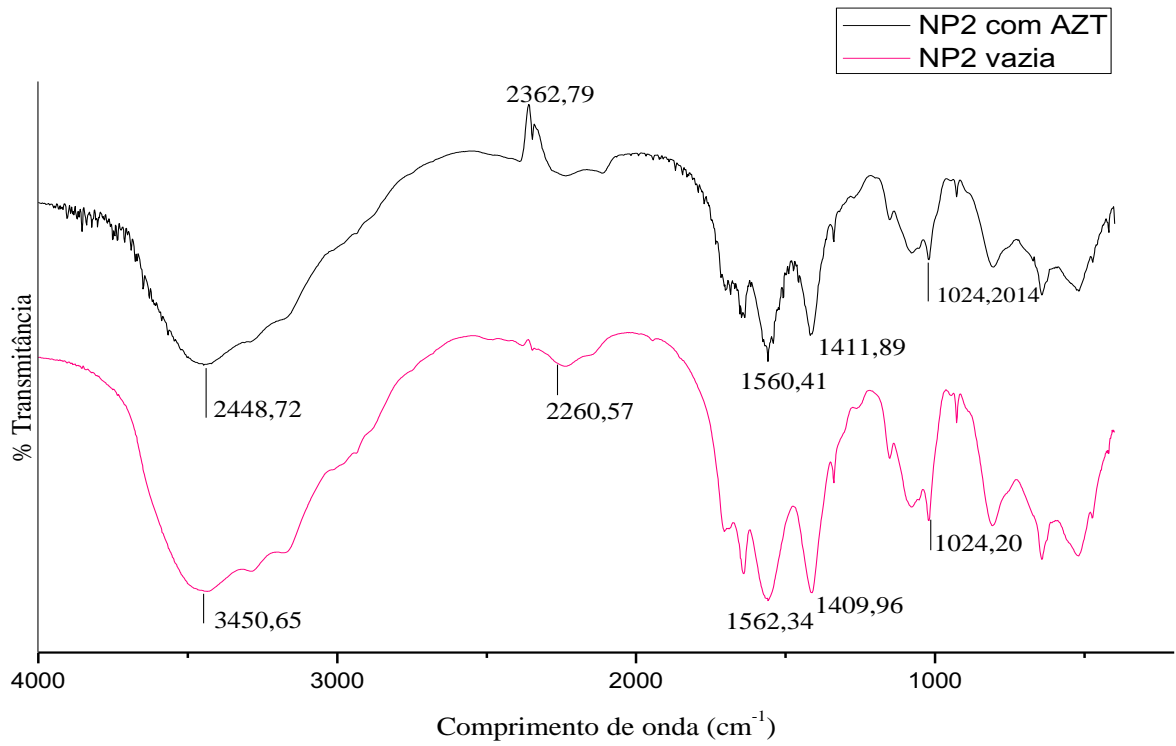


Figura 11 - Espectro na região do IV da amostra NP3 com e sem AZT.

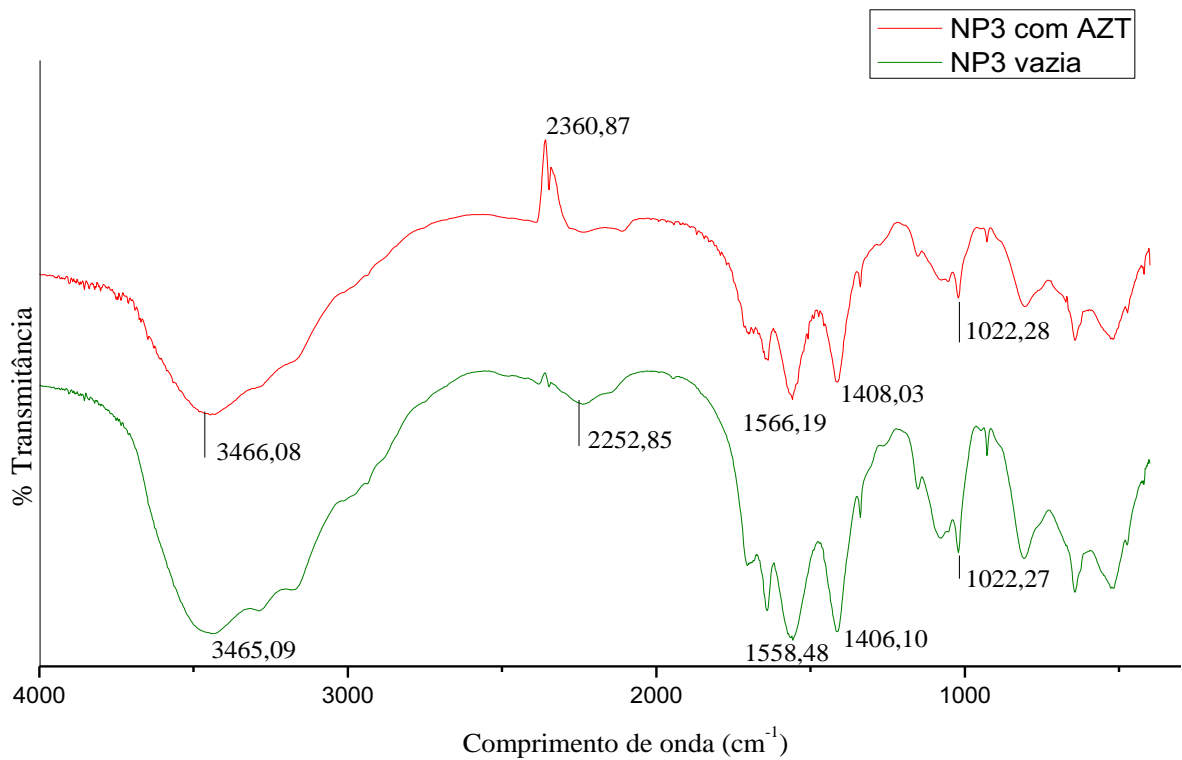
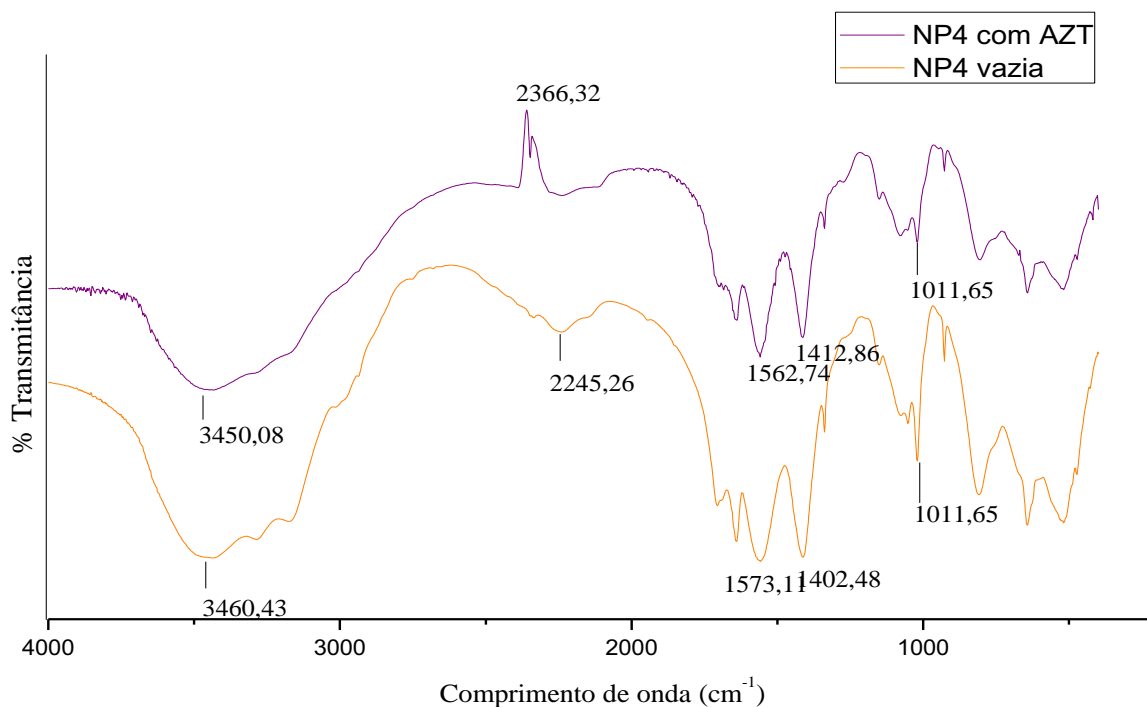


Figura 12 - Espectro na região do IV da amostra NP4 com e sem AZT.



5.3.3. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura é utilizada para verificar detalhes morfológicos das nanopartículas. Uma sonda varre com um feixe de elétrons a superfície da amostra e a interação entre os elétrons e amostra gera diversos tipos de emissão de elétrons secundários retroespalhados, *auger* e absorvidos, assim como de raios X característicos e de catodoluminescência. A imagem é gerada em tons de cinza representa o mapeamento e a contagem de elétrons secundários e retroespalhados emitidos pelo material analisado (DUARTE et al., 2003; SUGA et al., 2014).

A Figura 13 representa a fotomicrografia do AZT, na qual foram observados forma e tamanho mais irregulares e superfície lisa. Para a QS (Figura 15) as partículas apresentaram forma de flocos irregulares, porém de superfície lisa e com pequenas fissuras (MARTINS,

2008). A fotomicrografia do HPMCP (Figura 14) mostra que este polímero apresenta forma mais esférica com superfície irregular e presença de poros.

Figura 13 - Fotomicrografia do AZT, obtida por MEV com aumento de 500x.

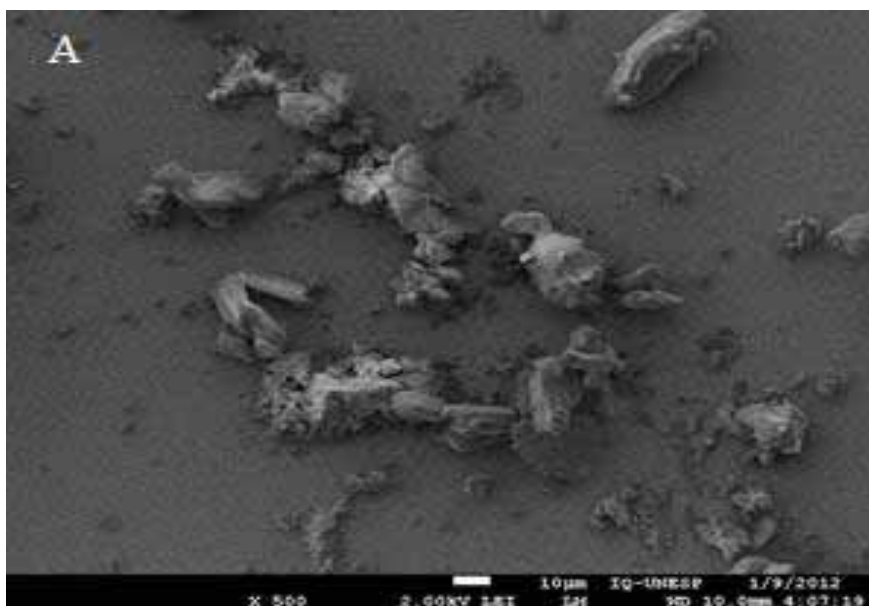


Figura 14 - Fotomicrografia do HPMCP, obtida por MEV com aumento de 500x

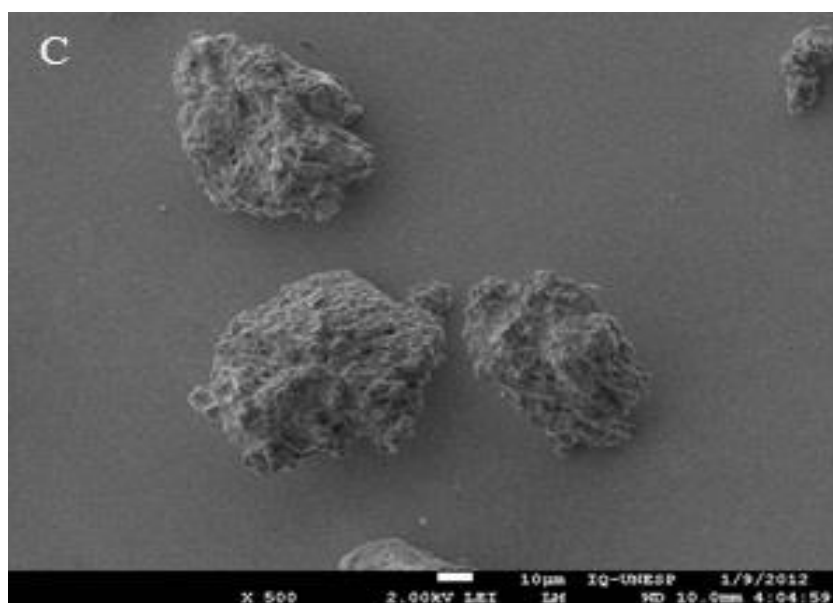
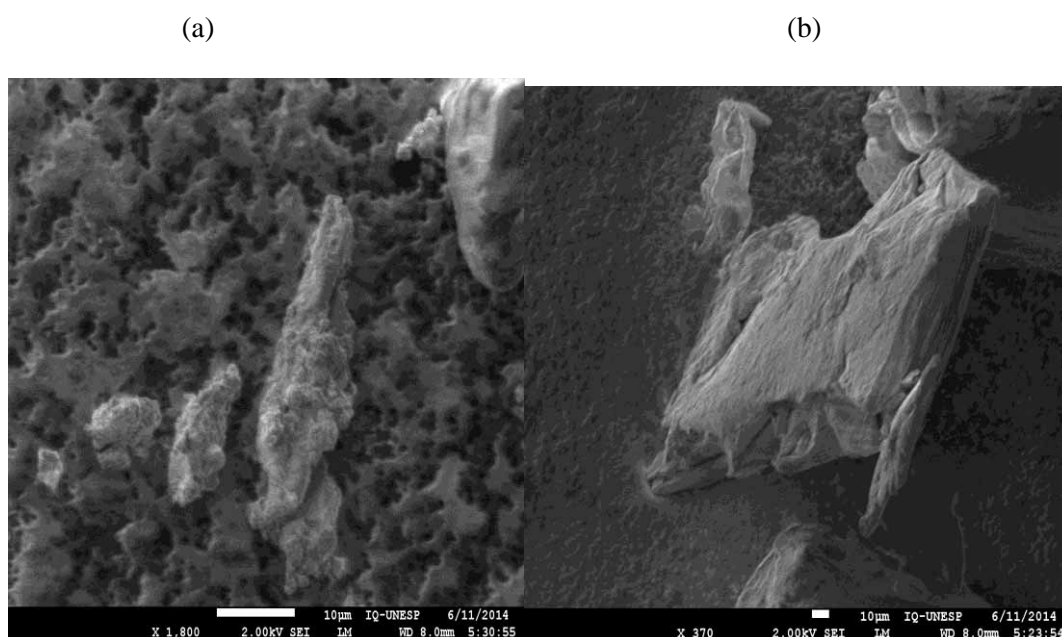
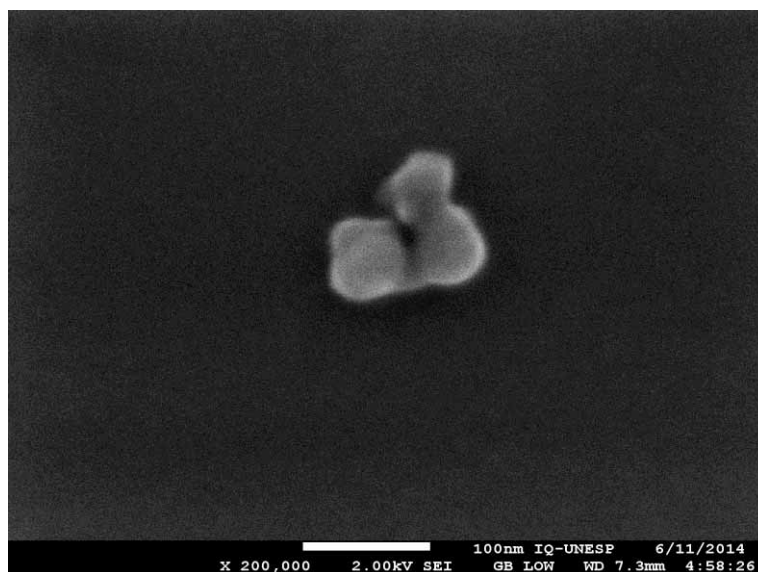


Figura 15 - Fotomicrografia da QS obtidas por MEV, (a) com aumento de 370x e (b) com aumento de 1000x.



A fotomicrografia da NP4 é apresentada na Figura 16, durante a realização do experimento não foi possível recobrir a amostra com carbono. Mesmo as nanopartículas estando aglomeradas, observou-se uma superfície lisa e com formato esférico. A NP 4 apresentou um tamanho de partícula entre 100 e 200 nm, confirmando os valores obtidos na Tabela 6.

Figura 16 - Fotomicrografia da NP4, obtida por MEV com aumento de 200.000x.



5.4. AVALIAÇÃO DO TEOR DE FÁRMACO INCORPORADO AO SISTEMA

O teor de incorporação de fármaco é um parâmetro importante na caracterização físico-química de nanopartículas poliméricas e está diretamente relacionado à efetividade do sistema de liberação (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Os resultados da avaliação do teor de fármaco incorporado ao sistema estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Teor de AZT incorporado ao sistema.

Amostra	%Ti	CV %
NP2	95,82 ± 0,02	0,17
NP3	96,00 ± 0,07	0,07
NP4	96,43 ± 0,08	0,08

Os resultados demonstram que o sistema incorporou grande porcentagem de fármaco (mais de 95%). De acordo com MAKHLOF *et al.* (2011a), o HPMCP possui uma estrutura

capaz de interagir com a QS entrelaçando-a de forma eficiente, por interações iônicas, hidrofóbicas e por ligação de hidrogênio e, com isso, possibilitou que o fármaco ficasse aprisionado na estrutura.

5.5. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MUCOADESIVAS

A mucoadesão é uma propriedade importante de alguns polímeros, como a QS e o HPMCP, pois podem aumentar o tempo de residência de fármacos no local de ação ou absorção (THIRAWONG et al., 2008). Várias teorias descrevem o mecanismo da mucoadesão, como a teoria eletrônica, a teoria da adsorção, a teoria do intumescimento, a teoria da ruptura, a teoria da difusão e teoria mecânica. É um fenômeno complexo e pode envolver mais de uma teoria pra explicar o comportamento da mucoadesão de um determinado material (VARUM *et al.*, 2008). A forma com que o polímero ou matriz polimérica irá interagir com o meio de contato, no caso a mucosa, pode interferir nas propriedades mucoadesivas. O intumescimento do polímero favorece a interpenetração das cadeias poliméricas do sistema com a mucina (CARVALHO, 2009; JONES et al., 2009).

A força de mucoadesão foi avaliada empregando o analisador de textura. A força necessária para separar a amostra do disco de mucina (Trabalho de adesão - Wad) foi calculada a partir da área do gráfico de força (N) versus distância (mm) empregando o *software Texture Exponent Lite*.

A Tabela 8 representa os resultados do trabalho de adesão para as NPs, e polímeros QS e HPMCP.

Tabela 8 - Força de adesão dos polímeros e NPs.

Amostra	Média Área (μJ)	DP	CV%
QS	2.031	±0,68	33,31
HPMCP	3.14	±0,50	16,59
NP2	2.24	±0,79	35,21
NP3	2.08	±0,80	38,62
NP4	2.34	±0,75	32,25

De acordo com os resultados da Tabela 8, o HPMCP mostrou ser mais mucoadesivo que a QS, uma vez que possui grupamentos carboxílicos que podem interagir com a mucina via ligações de hidrogênio e / ou van der Waals, seguindo a teoria da adsorção. Já a QS, que é carregada positivamente, interage por ligações eletrostáticas com os grupamentos siálicos da mucina, seguindo a teoria eletrônica.

A atração entre a mucina e o polímero mucoadesivo via ligações de hidrogênio e / ou van der Waals resulta em forças atrativas consideravelmente maiores do que as forças descritas pela teoria eletrônica (DA SILVA et al., 2007). As ligações de hidrogênio têm sido consideradas como as mais importantes no fenômeno de interação e prevalecem como forças interfaciais em polímeros contendo grupamentos carboxilas. Apesar de serem individualmente fracas, estas forças interfaciais podem ter um efeito sinérgico e resultarem em uma intensa adesão devido ao grande número de interações (VINOD et al., 2012).

Além disso, ambos os polímeros também podem intumescer em contato com o muco, para que ocorra a transferência de água do muco para o polímero, desta forma as cadeias dos polímeros adquirem maior flexibilidade para poder interagir com as cadeias de glicoproteína do muco, deste modo favorece a interação por ligações químicas entre ambos (ANDREWS et al., 2009).

As NPs avaliadas apresentaram trabalho de adesão similar ao da QS, o que indica que a variação na massa de HPMCP não contribuiu para o aumento da mucoadesão destas amostras.

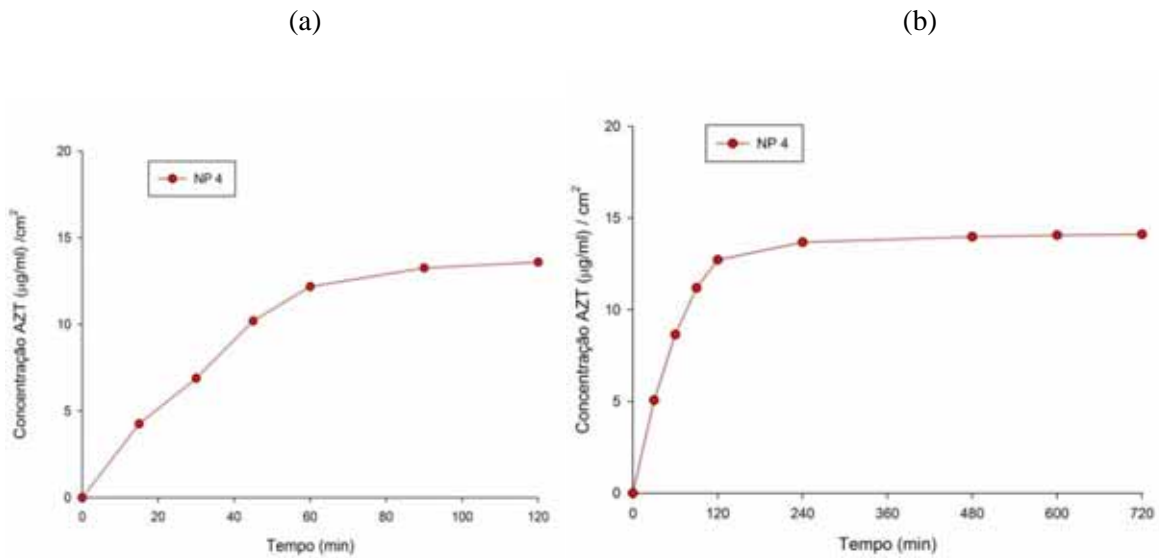
5.6. AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO “*IN VITRO*” DO AZT

O ensaio de dissolução é um método *in vitro* que caracteriza como o fármaco é liberado da matriz polimérica. Ele pode indicar a liberação do fármaco da matriz farmacêutica, mas não fornece maiores informações sobre a absorção do fármaco (AZARMI *et al.*, 2007). Porém, este estudo permite a seleção das formulações mais adequadas (WILLMANN *et al.*, 2010).

Para que o fármaco seja liberado de sistemas nanoparticulados poliméricos alguns fatores podem influenciar como: desorção da superfície da partícula, difusão do fármaco pela parede polimérica das nanocápsulas, erosão da matriz ou da combinação dos processos de difusão e erosão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O perfil de liberação *in vitro* do AZT na NP 4, em pH 1,2 e pH 7,4, estão apresentados na Figura 17. Em pH 1,2, durante os primeiros 45 minutos de ensaio, a liberação do AZT foi em torno de 11 $\mu\text{g/ml} / \text{cm}^2$ e, ao final dos 120 minutos, atingiu uma concentração liberada de 14 $\mu\text{g/ml} / \text{cm}^2$. Já em pH 7,4, a liberação foi crescente até aos 120 minutos, alcançando a concentração liberada de 12,7 $\mu\text{g/ml} / \text{cm}^2$.

Figura 17 - Perfil de liberação *in vitro* do AZT em NP, (a) em pH 1,2 e (b) em pH 7,4.



Podemos observar que em pH ácido, a NP4 conseguiu manter o AZT em sua estrutura, deste modo, evitando sua liberação precoce, porém por um curto período de tempo. Assim uma solução para evitar que o fármaco seja liberado em meio ácido seria a indicação da administração das NPs em jejum, a administração de fármacos com o estômago vazio permite que a sua passagem para o intestino seja mais rápida, em torno de 2 horas (CRISON, 1999). Já em pH 7,4 evidenciamos que a liberação do AZT ocorreu de modo controlada.

A presença da QS nas NPs pode ter favorecido o aprisionamento do fármaco na matriz polimérica, enquanto que o HPMCP pode ter influenciado na liberação gradual do AZT. Através do perfil de liberação mostrado acima concluímos que o sistema foi eficaz na proteção do fármaco em meio ácido e em meio intestinal sua liberação foi controlada.

6. CONCLUSÃO

A metodologia de obtenção das nanopartículas por complexação polieletrólítica foi eficaz na produção de nanopartículas poliméricas de QS com HPMCP, com tamanho de partícula, PDI e potencial zeta adequados para a aplicação em sistemas de liberação e com teor de incorporação de fármaco de mais de 95%.

A caracterização por espectroscopia de absorção na região do infravermelho demonstrou a formação de um material com propriedades distintas, através da interação entre o grupamento NH_3^+ da quitosana e o grupamento COOH^- do ftalato de HPMC, no entanto sem alterar a estrutura do fármaco.

A análise da morfologia através da microscopia eletrônica de varredura evidenciou a estrutura esférica das nanopartículas e confirmou o tamanho de partícula obtido.

Os ensaios de mucoadesão demonstraram as propriedades mucoadesivas das NPs, sendo a capacidade mucoadesiva das partículas semelhante à da QS e atribuída à maior concentração deste polímero nestas amostras.

Os ensaios de liberação in vitro sugerem que HPMCP reduziu a liberação do fármaco em meio ácido e promoveram o controle da liberação do AZT em meio intestinal simulado.

7. REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, n. 1, p. 5-28, May. 2004.
- AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical research**, v. 12, n. 3, p. 413-20, Mar. 1995.
- ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 505-518, Mar. 2009.
- ARAÚJO, A. A. S.; STORPIRTIS, S.; AMP; X; LVIA; MERCURI, L. P.; CARVALHO, F. M. S.; FILHO, M. D. S.; MATOS, J. R. Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **International journal of pharmaceutics**, v. 260, n. 2, p. 303-314, July. 2003.
- ARTURSSON, P.; LINDMARK, T.; DAVIS, S.; ILLUM, L. Effect of Chitosan on the Permeability of Monolayers of Intestinal Epithelial Cells (Caco-2). **Pharmaceutical research**, v. 11, n. 9, p. 1358-1361, Sept. 1994.
- ASHARA, K. C.; PAUN, J. S.; SONIWALA, M. M.; CHAVADA, J. R.; MORI, N. M. Micro-emulsion based emulgel: a novel topical drug delivery system. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 1, p. 27-32, Jan. 2014.
- ASSAAD, E.; WANG, Y. J.; ZHU, X. X.; MATEESCU, M. A. Polyelectrolyte complex of carboxymethyl starch and chitosan as drug carrier for oral administration. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 4, p. 1399-1407, Feb. 2011.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 678 p.
- AVADI, M. R.; SADEGHI, A. M. M.; MOHAMMADPOUR, N.; ABEDIN, S.; ATYABI, F.; DINARVAND, R.; RAFIEE-TEHRANI, M. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 58-63, Feb. 2010.
- AZARMI, S.; ROA, W.; LÖBENBERG, R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. **International journal of pharmaceutics**, v. 328, n. 1, p. 12-21, Jan. 2007.
- BARBI, M. D. S. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana para administração nasal de zidovudina**. 2011. 112 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmacêutica Bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2011.
- BISWAS, M. H. A. AIDS epidemic worldwide and the millennium development strategies: A light for lives. **HIV & AIDS Review**, v. 11, n. 4, p. 87-94, Dec. 2012.
- BONCEL, S.; ZAJAÇ, P.; KOZIOL, K. K. K. Liberation of drugs from multi-wall carbon nanotube carriers. **Journal of Controlled Release**, v. 169, n. 1-2, p. 126-140, July. 2013.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico - AIDS e DST**, 2013. Disponível em: < http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55559/_p_boletim_2013_internet_pdf_p__51315.pdf >. Acesso em: 25 Fev. 2014.
- BRAVO-OSUNA, I.; VAUTHIER, C.; FARABOLLINI, A.; PALMIERI, G. F.; PONCHEL, G. Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. **Biomaterials**, v. 28, n. 13, p. 2233-2243, May. 2007.

CAMPOS, F. S. **Desenvolvimento de hidrogéis de dextrano contendo praziquantel**. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2009.

CANELLA, K. M. N. D. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por Cromatografia de Permeação em Gel - Influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v. 24, p. 13-17, Feb. 2001.

CARVALHO, F. C.; SARMENTO, V. H. V.; BARBI, M. S.; GREMIÃO, M. P. D. **Rheology Evaluation of Mucoadhesive Drug Delivery Systems**. In: **IV Brazilian Conference on Rheology**. ed. Rio de Janeiro - RJ: 2008. 11-12 p.

CARVALHO, F. C. **Desenvolvimento e Caracterização de Sistemas Nanoestruturados para Potencial Administração Nasal de Zidovudina**. 2009. 176 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2009.

CARVALHO, F. C.; BARBI, M. D. S.; GREMIÃO, M. P. D. LC Evaluation of In Vitro Release of AZT from Microemulsions. **Chromatographia**, v. 69, n. 2, p. 207-211, 2009.

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

CARVALHO, F. C.; CAMPOS, M. L.; PECCININI, R. G.; GREMIÃO, M. P. D. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 1, p. 219-227, 2013.

CHEN, M. C.; SONAJE, K.; CHEN, K. J.; SUNG, H. W. A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery. **Biomaterials**, v. 32, n. 36, p. 9826-9838, Sept. 2011.

CHEN, Q.; HU, Y.; CHEN, Y.; JIANG, X.; YANG, Y. Microstructure formation and property of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles prepared by macromolecular complex. **Macromolecular bioscience**, v. 5, n. 10, p. 993-1000, Oct. 2005.

CHORILLI, M.; BRIZANTE, A. C.; RODRIGUES, C. A.; SALGADO, H. R. N. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Rev. Bras. Farm.**, v. 88, n. 1, p. 7-13, Out. 2007.

CRISON, J. R. **Developing Dissolution Tests for Modified Release Dosage Forms: General Considerations**. Dissol. Tech. Disponível em: < <http://www.dissolutiontech.com/DTresour/299articles/299Crison.htm>. 6 1999>. Acesso em: 20 Dez. 2014.

CUI, Z.; MUMPER, R. J. Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 75, n. 3, p. 409-19, Aug. 2001.

DA SILVA, C.; MARTINS, F.; SANTANA, M. H. Adsorption Isotherms of Mucin on Granules Containing Chitosan Microspheres. **Adsorption Science & Technology**, v. 25, n. 10, p. 781-789, Jan. 2007.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 8, p. 981-1014, Aug. 2011.

DIMASI, J. A.; HANSEN, R. W.; GRABOWSKI, H. G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. **Journal of Health Economics**, v. 22, n. 2, p. 151-185, Mar. 2003.

DUARTE, L. C.; JUCHEN, P. L.; PULZ, G. M.; BRUM, T. M.; CHODUR, N.; LICCARDO, A.; FISCHER, D. C.; ACAUAN, R. B. Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros. **Pesquisas em Geociência**, v. 2, n. 30, p. 3-15, 2003.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. **ACS nano**, v. 3, n. 1, p. 16-20, Jan. 2009.

FOCACCIA, R.; VERONESI, R. **Tratado de infectologia**. 3 ed. ed. São Paulo: Atheneu: 2007. 2167 p.

FRANSEN, N.; BJORK, E.; EDSMAN, K. Changes in the mucoadhesion of powder formulations after drug application investigated with a simplified method. **J Pharm Sci**, v. 97, n. 9, p. 3855-64, Sep. 2008.

GRUND, S.; BAUER, M.; FISCHER, D. Polymers in Drug Delivery—State of the Art and Future Trends. **Advanced Engineering Materials**, v. 13, n. 3, p. B61-B87, Mar. 2011.

GUO, C.; WANG, J.; CAO, F.; LEE, R. J.; ZHAI, G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug discovery today**, v. 15, n. 23-24, p. 1032-40, Dec. 2010.

GUPTA, U.; JAIN, N. K. Non-polymeric nano-carriers in HIV/AIDS drug delivery and targeting. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 4-5, p. 478-90, Mar. 2010.

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**. 2003. 76 f. (Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in Pharmaceutics) - University Uppsala, Sweden, 2003.

HARDING, S. Mucoadhesive interactions. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. 5, p. 1036-1041, 2003.

HEIATI, H.; TAWASHI, R.; SHIVERS, R. R.; PHILLIPS, N. C. Solid lipid nanoparticles as drug carriers. I. Incorporation and retention of the lipophilic prodrug 3'-azido-3'-deoxythymidine palmitate. **International journal of pharmaceutics**, v. 146, n. 1, p. 123-131, 1997.

ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. **Pharmaceutical research**, v. 15, n. 9, p. 1326-31, Sep. 1998.

JAIN, S.; BISWAL, I.; DINDA, A.; MOITRA, S.; KOHLI, S. Modified sustained release chitosan-coated zidovudine microspheres. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. Suppl 4, p. 95-97, 2011.

JIANG, X.; CHEN, L.; ZHONG, W. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 457-463, Jan. 2003.

JONES, D. S.; BRUSCHI, M. L.; DE FREITAS, O.; GREMIÃO, M. P. D.; LARA, E. H. G.; 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. **International journal of pharmaceutics**, v. 372, n. 1-2, p. 49-58, Aug. 2009.

KAUR, C. D.; NAHAR, M.; JAIN, N. K. Lymphatic targeting of zidovudine using surface-engineered liposomes. **Journal of drug targeting**, v. 16, n. 10, p. 798-805, 2008.

KIM, I. H.; PARK, J. H.; CHEONG, I. W.; KIM, J. H. Swelling and drug release behavior of tablets coated with aqueous hydroxypropyl methylcellulose phthalate (HPMCP) nanoparticles. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 89, n. 2, p. 225-33, Apr. 2003.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 1/1/. 2010.

LACAZ, C. D. S.; MARTINS, J. E. C.; MARTINS, E. L. **AIDS/SIDA**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1990. 302 p.

LEVY, J. A. The transmission of HIV and factors influencing progression to AIDS. **The American journal of medicine**, v. 95, n. 1, p. 86-100, Jul. 1993.

LEVY, J. A. **HIV and the Pathogenesis of AIDS**. 2. ed. Washington, D. C.: ASM Press, 1998. 588 p.

LIU, Z.; JIAO, Y.; WANG, Y.; ZHOU, C.; ZHANG, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 15, p. 1650-1662, Dec. 2008.

MA, Z.; YEOH, H. H.; LIM, L.-Y. Formulation pH modulates the interaction of insulin with chitosan nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 6, p. 1396-1404, June. 2002.

MAINARDES, R. M. **Desenvolvimento de nanopartículas de pla e pla-peg para administração intranasal de zidovudina**. 2007. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas., Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho"., Araraquara, 2007.

MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M.; GREMIAO, M. P. Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA-PEG blend nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 395, n. 1-2, p. 266-71, Aug. 2010.

MAKHLOF, A.; TOZUKA, Y.; TAKEUCHI, H. Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 5, p. 445-51, Apr. 2011a.

MAKHLOF, A.; WERLE, M.; TOZUKA, Y.; TAKEUCHI, H. A mucoadhesive nanoparticulate system for the simultaneous delivery of macromolecules and permeation enhancers to the intestinal mucosa. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 149, n. 1, p. 81-8, Jan. 2011b.

MARTINS, P. C. **Quitosana como catalisador na transesterificação do óleo de soja para produção de biodiesel**. 2008. 48 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

MCCARRON, P. A.; WOOLFSON, A. D.; KEATING, S. M. Sustained Release of 5-Fluorouracil from Polymeric Nanoparticles. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, n. 12, p. 1451-1459, 2000.

MEEHAN, E. Characterisation of hydroxypropylmethylcellulose phthalate (HPMCP) by GPC using a modified organic solvent. **Analytica Chimica Acta**, v. 557, n. 1-2, p. 2-6, Jan. 2006.

MELO, L. S. W. **Características dos pacientes que evoluíram para óbito, em oito anos de terapia antirretroviral potente, no Recife – Brasil**. 2007. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

MONTAGNEIR, L. Historical essay:A History of HIV Discovery **Science**, v. 298, n. 1727, 2002.

NANJWADE, B. K.; BECHRA, H. M.; DERKAR, G. K.; MANVI, F. V.; NANJWADE, V. K. Dendrimers: Emerging polymers for drug-delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 3, p. 185-196, Nov. 2009.

NASCIMENTO, J. E. D.; MAGALHÃES, N. S. S.; RIBEIRO, R. M.; PONTES, A.; ALVES, A. J. Avaliação farmacocinética de comprimidos contendo lamivudina e zidovudina em plasma humano. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p. 59-66, Apr. 2004.

NOWROOZALIZADEH, S.; MÅNSSON, F.; SILVA, Z. D.; REPITS, J.; DABO, B.; PEREIRA, C.; BIAGUE, A.; ALBERT, J.; NIELSEN, J.; AABY, P.; FENYÖ, E. M.; NORRGREN, H.; HOLMGREN, B.; JANSSON, M. Studies on toll-like receptor stimuli responsiveness in HIV-1 and HIV-2 infections. **Cytokine**, v. 46, n. 3, p. 325-331, June. 2009.

O'COFAIGH, E.; LEWTHWAITE, P. Natural history of HIV and AIDS. **Medicine**, v. 41, n. 8, p. 411-416, Nov. 2013.

OH, S. Y.; JEONG, S. Y.; PARK, T. G.; LEE, J. H. Enhanced transdermal delivery of AZT (Zidovudine) using iontophoresis and penetration enhancer. **Journal of Controlled Release**, v. 51, n. 2-3, p. 161-168, Fev. 1998.

OJEWOLE, E.; MACKRAJ, I.; NAIDOO, P.; GOVENDER, T. Exploring the use of novel drug delivery systems for antiretroviral drugs. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.**, v. 70, n. 3, p. 697-710, Nov. 2008.

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

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012. 700 p.

PEÇANHA, E. P.; ANTUNES, O. A. C.; TANURI, A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. **Química Nova**, v. 25, p. 1108-1116, Feb. 2002.

PEDREIRO, L. N. **Desenvolvimento e caracterização de dispersão sólida com propriedade mucoadesiva para liberação de zidovudina**. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2012.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 491-502, 2007.

RACHLIS, A. R. Zidovudine (Retrovir) update. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 143, n. 11, p. 1177-85, Dec. 1990.

RAYMOND, L.; MORIN, F. G.; MARCHESSAULT, R. H. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. **Carbohydrate Research**, v. 246, n. 1, p. 331-336, Aug. 1993.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 85-99, Apr. 2014.

SANKALIA, M. G.; MASHRU, R. C.; SANKALIA, J. M.; SUTARIYA, V. B. Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 2, p. 215-232, Fev. 2007.

SANTOS-MAGALHAES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M.; CAETANO, M. N. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **International journal of pharmaceutics**, v. 208, n. 1-2, p. 71-80, Nov. 2000.

SAULNIER, P.; ANTON, N.; HEURTAULT, B.; BENOIT, J.-P. Liquid crystals and emulsions in the formulation of drug carriers. **Comptes Rendus Chimie**, v. 11, n. 3, p. 221-228, Mar. 2008.

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

SCHIPPER, N. G.; OLSSON, S.; HOOGSTRAATE, J. A.; DEBOER, A. G.; VARUM, K. M.; ARTURSSON, P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. **Pharmaceutical research**, v. 14, n. 7, p. 923-9, July. 1997.

SHAIK, N.; PAN, G.; ELMQUIST, W. F. Interactions of pluronic block copolymers on P-gp efflux activity: experience with HIV-1 protease inhibitors. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 12, p. 5421-33, Dec. 2008.

SILVA, S. M. L.; BRAGA, C. R. C.; FOOK, M. V. L.; RAPOSO, C. M. O.; CARVALHO, L. H.; CANEDO, E. L. **Application of Infrared Spectroscopy to Analysis of Chitosan/Clay Nanocomposites**. *Infrared Spectroscopy – Materials Science, Engineering and Technology*. THEOPHILE, T. 2012.

SILVERSTEIN, R.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6.ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000. 506 p.

SOSNIK, A.; DAS NEVES, J.; SARMENTO, B. Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review. **Progress in Polymer Science**, n. 0, Aug. 2014.

SOUZA, A. L. R. **Avaliação do efeito do praziquantel veiculado em dispersões lipídicas no tratamento de camundongos infectados com schistosoma mansoni**. 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2008.

STELLA, B.; ARPICCO, S.; ROCCO, F.; MARSAUD, V.; RENOIR, J.-M.; CATTEL, L.; COUVREUR, P. Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. **International journal of pharmaceutics**, v. 344, n. 1–2, p. 71-77, Nov. 2007.

SUGA, M.; ASAHINA, S.; SAKUDA, Y.; KAZUMORI, H.; NISHIYAMA, H.; NOKUO, T.; ALFREDSSON, V.; KJELLMAN, T.; STEVENS, S. M.; CHO, H. S.; CHO, M.; HAN, L.; CHE, S.; ANDERSON, M. W.; SCHÜTH, F.; DENG, H.; YAGHI, O. M.; LIU, Z.; JEONG, H. Y.; STEIN, A.; SAKAMOTO, K.; RYOO, R.; TERASAKI, O. Recent progress in scanning electron microscopy for the characterization of fine structural details of nano materials. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 42, n. 1–2, p. 1-21, May. 2014.

THIRAWONG, N.; THONGBORISUTE, J.; TAKEUCHI, H.; SRIAMORNSAK, P. Improved intestinal absorption of calcitonin by mucoadhesive delivery of novel pectin–liposome nanocomplexes. **Journal of Controlled Release**, v. 125, n. 3, p. 236-245, Fev. 2008.

TIYABOONCHAI, W.; LIMPEANCHOB, N. Formulation and characterization of amphotericin B–chitosan–dextran sulfate nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 329, n. 1–2, p. 142-149, Fev. 2007.

TYAGI, N.; SATHEESH MADHAV, N. V. Formulation and evaluation of zidovudine micro emulsion using a novel bio polymer from the seeds of burchanania lanzan. **International Journal of Biopharmaceutics**, v. 3, n. 1, p. 40-43, Jan. 2012.

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

VEAL, G. J.; BACK, D. J. Metabolism of Zidovudine. **General pharmacology**, v. 26, n. 7, p. 1469-75, Nov. 1995.

VILLANOVA, J. C.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Pharmaceutical applications of polymers. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

VINOD, K. R.; ROHIT, R. T.; SANDHYA, S.; BANJI, D.; VENKATRAM, R. B. Critical Review on Mucoadhesive Drug Delivery **Journal for drugs and medicines**, v. 4, n. 1, p. 7-28, 2012.

WANG, J. J.; ZENG, Z. W.; XIAO, R. Z.; XIE, T.; ZHOU, G. L.; ZHAN, X. R.; WANG, S. L. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 765-74, 2011.

WARNKE, D.; BARRETO, J.; TEMESGEN, Z. Antiretroviral Drugs. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 47, n. 1570, 2007.

WILLMANN, S.; THELEN, K.; BECKER, C.; DRESSMAN, J. B.; LIPPERT, J. Mechanism-based prediction of particle size-dependent dissolution and absorption: cilostazol pharmacokinetics in dogs. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 76, n. 1, p. 83-94, Sep. 2010.

8. DADOS FINAIS

De acordo,

Maria Palmira Daflon Gremião

Bruna Mota Reginato