

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

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLA E  
PLA-PEG PARA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE  
ZIDOVUDINA**

**RUBIANA MARA MAINARDES**

**ORIENTADOR: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Palmira Daflon Gremião**

**ARARAQUARA - SP**

**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLA E  
PLA-PEG PARA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE  
ZIDOVUDINA**

RUBIANA MARA MAINARDES

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.

ORIENTADOR: Prof.<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup>. Maria Palmira Daflon Gremião

ARARAQUARA - SP

2007

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNESP – Campus de Araraquara

**Mainardes, Rubiana Mara**

M224d      Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina. / Rubiana Mara Mainardes. – Araraquara, 2007.  
133 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

1.Zidovudina. 2.Via intranasal. 3.PLA (Nanopartículas). 4.PLA-PEG (Nanopartículas). I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. .II. Título.

**CDD: 615.19**

**CAPES:40300005**

*Dedico este trabalho à minha mãe, Derci,  
pelo apoio e amor incondicional.*

***Luz e Vida***

*Trabalho cria a luz*

*A vida é sempre amor*

*De pedras em atrito*

*Nasce a luz em faíscas*

*Lodo é vida latente*

*Do charco surgem os lírios*

*O trabalho, no entanto,*

*È que orienta a vida*

*Deus irradia a vida,*

*O trabalho lhe dá forma*

*Trabalho é, pois, do homem,*

*Mas a vida é de Deus*

Emmanuel

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À Deus, Clemente e Misericordioso, por me manter sempre no caminho da luz.

À minha querida e amada mãe, por todos os valiosos ensinamentos que me foram passados, por toda a base e força para enfrentar os desafios da vida e sair vitoriosa.

Ao meu pai e minha avó, por estarem presentes na minha vida, sempre apoiarem meus passos e pelas orações.

Ao meu grande amor, Najeh, por preencher a minha vida com alegrias, paz e amor.

***“É só o amor, é só o amor que conhece o que é verdade.....”*** (Renato Russo)

Obrigada à todos, sem vocês nada faria sentido.....

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Palmira Daflon Gremião pela orientação neste trabalho, pela sua disponibilidade, por ter compartilhado comigo da sua experiência e conhecimentos científicos e pela sua amizade.

Ao Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista, por me introduzir no mundo encantado das nanopartículas, pelos seus ensinamentos, confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira pelos momentos de discussão no exame geral de qualificação, por estar sempre disponível para me esclarecer dúvidas, e também por nunca ter me deixado ficar sem material ou reagentes para trabalhar.

Ao Prof. Dr. Celso Valentim Santili do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da UNESP pela colaboração nas análises de espalhamento de luz e de potencial Zeta.

Ao Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da UNESP pela colaboração nas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca pela colaboração nas análises de fagocitose.

À todos os amigos do laboratório, com quem partilhei momentos de alegrias e descontração nos últimos tempos: à Karen, por ser a melhor amiga que se pode ter, sincera, companheira e sempre presente. À Carol, pela sua eterna amizade, mas acima de tudo por me compreender, e por me fazer sentir que sempre poderei confiar em ti. À Traudi, por sua amizade e por ter sempre uma palavra de confiança, apoio e alegria. À Cris e Luana, pela bela amizade, enorme boa disposição, pelas discussões científicas e por contribuírem para um ótimo ambiente de trabalho. E à todos os outros colegas a

## *Agradecimentos*

---

quem não me referi, mas que sempre estiveram presentes com um sorriso e uma palavra amiga.

Às minhas estagiárias, Flávia e Fernanda, pela colaboração com os “ratinhos”.

Às funcionárias da Seção de Pós Graduação, Cláudia, Laura e Sonia pelo auxílio e atenção em todos os momentos.

À todos os funcionários da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP pelo auxílio e atenção.

À Fundação para o Remédio Popular – FURP, pela concessão da zidovudina.

À CAPES e FAPESP pela bolsa concedida e apoio financeiro.

À todos que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho fosse realizado, deixo os meus mais sinceros agradecimentos.

***“Sobe mais alto  
aquele que ajuda o outro a subir”***  
George Adams

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	5
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	6
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
4.1. Materiais .....	24
4.2. Métodos .....	26
4.2.1. Preparação das nanopartículas contendo zidovudina .....	26
4.2.1.1. Nanopartículas de PLA.....	26
4.2.1.2. Nanopartículas de blendas de PLA com PEG .....	26
4.2.2. Separação entre o fármaco livre e o incorporado às nanopartículas.....	27
4.2.3. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de AZT por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	28
4.2.3.1. Condições cromatográficas.....	28
4.2.3.2. Curvas analíticas do AZT.....	29
4.2.3.3. Validação da metodologia analítica por CLAE para análise de AZT em plasma.....	30
4.2.3.4. Quantificação do fármaco presente nas nanopartículas.....	32
4.2.4. Caracterização físico-química das nanopartículas.....	32

4.2.4.1. Análise microscópica.....	32
4.2.4.2. Determinação do diâmetro médio.....	33
4.2.4.3. Determinação do potencial Zeta.....	34
4.2.4.4. Análise térmica.....	35
4.2.4.5. Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho .....	35
4.2.5. Ensaio <i>in vitro</i> .....	35
4.2.5.1. Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do AZT a partir das nanopartículas .....	35
4.2.6. Ensaio de fagocitose <i>ex vivo</i> por leucócitos polimorfonucleares.....	37
4.2.6.1. Avaliação da fagocitose por LPMN através de quimiluminescência .....	37
4.2.6.2. Avaliação da fagocitose por LPMN através de microscopia .....	40
4.2.7. Ensaio <i>in vivo</i> .....	40
4.2.7.1. Preparo dos animais.....	40
4.2.7.2. Avaliação da biodisponibilidade das nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo AZT após administração intranasal.....	41
4.2.7.3. Análise estatística.....	42
<b>5. RESULTADOS</b> .....	43
5.1. Preparação das nanopartículas contendo zidovudina.....	43
5.2. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de zidovudina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	43
5.2.1. Condições cromatográficas.....	43
5.2.2. Curvas analíticas do AZT.....	46
5.2.3. Validação da metodologia analítica por CLAE para determinação de AZT em plasma.....	51

5.2.3.1. Especificidade e seletividade.....	51
5.2.3.2. Precisão.....	54
5.2.3.3. Exatidão.....	54
5.2.3.4. Limites de quantificação e detecção.....	55
5.2.4. Quantificação do fármaco presente nas nanopartículas.....	56
5.3. Caracterização físico-química das nanopartículas.....	58
5.3.1. Análise microscópica.....	58
5.3.2. Determinação do diâmetro das nanopartículas.....	62
5.3.3. Determinação do potencial Zeta.....	63
5.3.4. Análise térmica.....	67
5.3.5. Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho .....	71
5.4. Ensaio <i>in vitro</i> .....	74
5.4.1. Determinação do perfil de liberação do AZT <i>in vitro</i> .....	74
5.5. Ensaio de fagocitose <i>ex vivo</i> por LPMN.....	80
5.5.1. Avaliação da fagocitose por LPMN através de quimiluminescência.....	80
5.5.2. Avaliação da fagocitose por LPMN através de microscopia.....	84
5.6. Ensaio <i>in vivo</i> .....	87
5.6.1. Estudo da biodisponibilidade intranasal do AZT contido nas nanopartículas.....	88
<b>6. DICUSSÃO.....</b>	<b>94</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>113</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>115</b>

## RESUMO

A zidovudina (AZT) é um fármaco amplamente usado no tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida. O AZT apresenta baixa biodisponibilidade oral pois sofre rápido e extenso metabolismo de primeira passagem hepática, além de curto  $t_{1/2}$ . Sendo assim, altas e freqüentes doses são requeridas para se manter concentrações plasmáticas efetivas e, dessa maneira, apresenta graves efeitos colaterais, dose-dependentes, que limitam o seu uso em determinados tipos de pacientes. As nanopartículas são eficientes sistemas poliméricos que contribuem para a redução da toxicidade de fármacos, pois são capazes de liberá-los de maneira prolongada, proporcionando maior tempo de contato do fármaco com o plasma e tecidos. A via de administração intranasal é uma rota interessante, quando se deseja evitar o metabolismo de primeira passagem e, também, pode oferecer um ótimo perfil de absorção para nanopartículas. Neste trabalho, estudou-se a incorporação de AZT em nanopartículas de PLA e de blendas de PLA-PEG com diferentes razões molares. A caracterização físico-química demonstrou que a presença do PEG influenciou a forma, o diâmetro médio, a eficiência de encapsulação, assim como o potencial de superfície das partículas. O diâmetro médio e a eficiência de encapsulação das nanopartículas aumentaram com o aumento crescente da razão molar de PEG na blenda. A forma geral e a apresentação das partículas variaram em função da concentração de PEG, sendo que os melhores resultados foram obtidos com as menores razões molares deste na blenda. Os experimentos de liberação *in vitro* mostraram que a liberação do AZT a partir das nanopartículas foi mais lenta em relação ao AZT em solução. A presença do PEG nas nanopartículas alterou o perfil de liberação do AZT, tornando a sua liberação mais rápida do que a partir das nanopartículas de PLA. O ensaio de fagocitose *ex vivo* demonstrou que as nanopartículas compostas pelas blendas

de PLA-PEG foram mais eficientes em evitar a ativação de células fagocíticas. O estudo de biodisponibilidade intranasal em ratos demonstrou que as nanopartículas compostas por blendas de PLA-PEG apresentaram maior tempo de circulação sanguínea, quando comparada com as nanopartículas sem PEG. Os estudos demonstram que as nanopartículas de PLA e de blendas de PLA-PEG podem ser utilizadas como eficientes sistemas de liberação intranasal de fármacos.

---

**ABSTRACT**

Zidovudine (AZT) is a drug widely used in the treatment of acquired immunodeficiency syndrome. AZT shows low bioavailability because it suffers fast and extensive by pass hepatic metabolism, besides of low  $t_{1/2}$ . High and frequent doses are requested to achieve effective plasmatic concentrations, and thus, it shows serious and dose-dependents side effects that limit its use in certain kind of patients. Nanoparticles are efficient polymeric systems that contributes to reduce the drug toxicity, because maintain prolonged drug release, making longer the contact between drug and plasma/tissues. The intranasal way is a very interesting route to avoid the by pass metabolism, and also offers a great absorption profile to nanoparticles. In the present work, the AZT encapsulation in PLA e PLA-PEG blends nanoparticles was studied. The physico-chemical characterization showed that the presence of PEG influences the nanoparticles shape, mean diameter, encapsulation efficiency and superficial charge. The mean diameter and encapsulation efficiency increase with increasing PEG proportion in the blend. The nanoparticles shape varied in function of PEG concentration, the better results being obtained with the lowest PEG concentration. In vitro experiments showed that AZT release from nanoparticles was slower than that of AZT solution. The presence of PEG in nanoparticles altered the AZT release profile, making it faster than that from PLA nanoparticles. The *ex vivo* phagocytosis experiments demonstrated that PLA-PEG blends nanoparticles were more efficient in avoiding the activation of phagocytic cells. The intranasal bioavailability in rats shows that blend PLA-PEG nanoparticles demonstrated longer plasmatic circulating times than that those make of PLA alone. These results demonstrate that PLA and PLA-PEG blends nanoparticles can be used as an efficient intranasal drug delivery system.

## **ABREVIATURAS**

<b>AIDS</b>	Síndrome da imunodeficiência humana
<b>AUC</b>	Área sob a curva
<b>AZT</b>	Zidovudina
<b>BHE</b>	Barreira hemato-encefálica
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>PLA</b>	Ácido poli-láctico
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>SFM</b>	Sistema fagocitário mononuclear
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>T<sub>g</sub></b>	Temperatura de transição vítrea

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema ilustrativo do vírus HIV.....	8
<b>Figura 2.</b> Estrutura química do AZT.....	13
<b>Figura 3.</b> Esquema do mecanismo de ação do AZT.....	13
<b>Figura 4.</b> Estrutura química do:A)PLA e B)PEG.....	20
<b>Figura 5.</b> Esquema da célula de difusão do tipo <i>Franz</i> utilizada para ensaio de liberação <i>in vitro</i> do AZT.....	36
<b>Figura 6.</b> Cromatograma da solução aquosa de AZT (750ng/mL) em metanol:água (1:4). Fase móvel: metanol:água (1:4) em 265nm.....	44
<b>Figura 7.</b> Cromatograma da solução de metanol:água (1:4). Fase móvel: metanol:água (1:4) em 265nm.....	44
<b>Figura 8.</b> Cromatograma da solução padrão de AZT (100ng/mL) em água. (Fase móvel: metanol:água (1:4) em 265nm).....	45
<b>Figura 9.</b> Cromatograma do AZT presente no meio de liberação após 10h de incubação. (Fase móvel: metanol:água (1:4) em 265nm).....	45
<b>Figura 10.</b> Cromatograma da água. (Fase móvel: metanol:água (1:4) em 265nm).....	46
<b>Figura 11.</b> Curva analítica do AZT em metanol:água (1:4), n=3. (Fase móvel: metanol:água em 265nm).....	48
<b>Figura 12.</b> Curva analítica do AZT em plasma de rato, n=3. (fase móvel: tampão acetato de sódio (55mM-pH 7,0):acetonitrila (9%) em 265nm.....	49
<b>Figura 13.</b> Curva analítica do AZT em água, n=3. (fase móvel: metanol:água (1:4) em 265nm.....	51

<b>Figura 14.</b> Cromatograma da solução padrão de AZT (500ng/mL) em plasma. (Fase móvel: tampão acetato de sódio (55mM-pH 7,0):acetonitrila (9%) em 265nm).....	52
<b>Figura 15.</b> Cromatograma do AZT em plasma (coleta após 8h da administração). (Fase móvel: tampão acetato de sódio (55mM-pH 7,0):acetonitrila (9%) em 265nm).....	52
<b>Figure 16.</b> Cromatograma do plasma puro. (Fase móvel: tampão acetato de sódio (55mM-pH 7,0):acetonitrila (9%) em 265nm).....	53
<b>Figura 17.</b> Fotomicrografias das nanopartículas de PLA: A) sem AZT e B) com AZT.....	59
<b>Figura 18.</b> Fotomicrografias das nanopartículas de PLA-PEG: A e B) 1:0,1 e C e D) 1:0,25.....	59
<b>Figura 19.</b> Fotomicrografias das nanopartículas de PLA-PEG: A, B e C) 1:0,5 e D, E e F) 1:1.....	60
<b>Figura 20.</b> Esquema da dupla camada elétrica que envolve a partícula.....	64
<b>Figura 21.</b> Curvas de DSC das amostras.....	68
<b>Figura 22.</b> Espectro e IV das amostras.....	72
<b>Figura 23.</b> Perfil de liberação <i>in vitro</i> do AZT em diferentes formulações.....	75
<b>Figura 24.</b> Ilustração da análise de comparação múltipla (teste de Tukey-Kramer) aplicada aos resultados de AUC obtido a partir dos experimentos de liberação de liberação <i>in vitro</i> do AZT a partir das seguintes amostras: solução aquosa, nanopartículas de PLA e nanopartículas de PLA-PEG (1:0,25).....	78

<b>Figura 25.</b> Fagocitose das nanopartículas por LPMN monitorada por quimiluminescência.....	80
<b>Figura 26.</b> Diagrama esquemático da configuração do PEG na superfície da partícula: a) configuração <i>mushroom</i> e b) configuração <i>brush</i> .....	83
<b>Figura 27.</b> Imagens microscópicas dos LPMN: A) incubados sem nanopartículas; B) incubados com nanopartículas de PLA-PEG; C) incubados com nanopartículas de PLA.....	85
<b>Figura 28.</b> Curva concentração-tempo do AZT nas diferentes formulações após administração intranasal.....	88
<b>Figura 29.</b> Curva concentração <i>versus</i> tempo do AZT nas formulações de nanopartículas após administração intranasal.....	90
<b>Figura 30.</b> Ilustração da análise de comparação múltipla (teste de Tukey-Kramer) aplicada aos resultados de AUC obtido a partir dos experimentos de biodisponibilidade do AZT a partir das seguintes amostras: fármaco em solução, nanopartículas de PLA e nanopartículas de PLA-PEG (1:0,25).....	92
<b>Figura 31.</b> Ilustração da análise de comparação múltipla (teste de Tukey-Kramer) aplicada aos resultados de $C_{MAX}$ obtido a partir dos experimentos de biodisponibilidade do AZT a partir das seguintes amostras: fármaco em solução, nanopartículas de PLA e nanopartículas de PLA-PEG (1:0,25).....	92

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva analítica do AZT em metanol:água (1:4) (fase móvel: metanol:água (1:4)).....	47
<b>Tabela 2.</b> Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva analítica do AZT em plasma (fase móvel: tampão acetato de sódio (55mM-pH 7,0):acetonitrila (9%)).....	49
<b>Tabela 3.</b> Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva analítica do AZT em água (fase móvel: metanol:água (1:4)).....	50
<b>Tabela 4.</b> Cálculo da precisão do método por CLAE.....	54
<b>Tabela 5.</b> Cálculo da exatidão do método por CLAE.....	54
<b>Tabela 6.</b> Valores obtidos no limite de detecção e quantificação do AZT em plasma.....	56
<b>Tabela 7.</b> Eficiência de encapsulação do AZT nas diferentes formulações de nanopartículas.....	58
<b>Tabela 8.</b> Diâmetro médio das nanopartículas.....	62
<b>Tabela 9.</b> Potencial Zeta das nanopartículas.....	65
<b>Tabela 10.</b> Determinação da AUC do AZT a partir das diferentes amostras submetidas ao ensaio de liberação <i>in vitro</i> .....	77
<b>Tabela 11.</b> Intensidade de luz obtida por quimiluminescência das amostras ensaiadas.....	81
<b>Tabela 12.</b> Valores resultantes da análise quantitativa da fagocitose monitorada por microscopia.....	86
<b>Tabela 13.</b> Parâmetros farmacocinéticos do AZT nas diferentes formulações após administração intranasal.....	90

## **1. INTRODUÇÃO**

A pesquisa em tecnologia farmacêutica, na atualidade, tem focado muito o desenvolvimento de nanotecnologias para o aprimoramento de fármacos consagrados clinicamente. Em geral, as pesquisas nesta área estão direcionadas à melhora no tratamento de patologias que apresentem grande incidência e complexidade, tais como o câncer (LU et al., 2004; CEGNAR et al., 2004), infecções parasitárias como a esquistossomose e leishmaniose (MAINARDES e EVANGELISTA, 2005; MOURÃO et al., 2005) e infecções por vírus (BOZKIR et al., 2004; CHONG et al., 2005). Grandes avanços já foram conseguidos, pois a nanotecnologia farmacêutica apresenta um enfoque molecular bem estabelecido, mas ainda há muito a ser compreendido, principalmente no que diz respeito ao comportamento desses nanosistemas no meio biológico.

Dentro do contexto da nanotecnologia farmacêutica, as nanopartículas poliméricas se mostram como eficientes dispositivos para promover liberação controlada de fármacos, em que a velocidade da liberação do mesmo depende de fatores tais como, tamanho das partículas, método de preparação, tipo de polímero utilizado, entre outros. Diversos polímeros, naturais e sintéticos, são pesquisados para uso em microencapsulação e as propriedades físico-químicas dos mesmos influenciam o perfil de liberação do fármaco a partir da matriz polimérica. Dentre os polímeros sintéticos, os poliésteres como o ácido poli-láctico (PLA), ácido glicólico (PGA) e os copolímeros por eles formados (PLGA), são bastante utilizados devido às suas características biocompatíveis e biodegradáveis (ANDERSON e SHIVE, 1997).

As nanopartículas podem ser administradas por diferentes vias, dentre elas a intranasal, que nos últimos cinco anos, tem despertado bastante interesse. A via

intranasal oferece uma série de vantagens quando comparada a outras vias não-parentais, como a oral por exemplo, pois é de fácil acesso, o volume de fluidos na cavidade nasal é relativamente baixo, o epitélio nasal apresenta fenestrações, fazendo com que as substâncias instiladas tenham acesso direto à circulação sanguínea, evitando dessa maneira o efeito pré-sistêmico (TOBIO et al., 1998).

A partir do momento que as nanopartículas atingem a circulação sanguínea, a sua distribuição depende, dentre vários fatores, das suas propriedades físico-químicas, onde características de tamanho e superfície desempenham importante papel na interação com componentes biológicos. As nanopartículas cuja superfície não foi modificada com determinadas substâncias, como polímeros e tensoativos, são denominadas “nanopartículas convencionais”, e apresentam a propriedade de serem rapidamente removidas da circulação sanguínea por células do sistema fagocitário mononuclear (SFM), ficando retidas nos órgãos desse sistema, como fígado, baço e linfonodos. Assim, apresentam curto tempo de meia-vida plasmática e não estão mais disponíveis para alcançarem outros alvos. Nos casos em que se necessite que a liberação do fármaco ocorra em outros órgãos, que não pertençam ao SFM, há a necessidade de se dispor de determinadas estratégias para fazer com que as partículas não sejam reconhecidas pelas células do SFM. Dentre as estratégias, a mais eficaz consiste em alterar a composição e/ou carga da superfície das partículas. Neste contexto, o uso de um tensoativo aniônico, o polietilenoglicol (PEG) é bastante difundido, pois por suas propriedades físico-químicas é capaz de formar uma barreira estérica na superfície das nanopartículas, diminuindo a sua interação com as células fagocíticas. Essas partículas modificadas, então denominadas de “estericamente estabilizadas” ou “nanopartículas de longa circulação” apresentam a capacidade de permanecer por tempo prolongado na

circulação sanguínea, tendo, dessa maneira, a sua biodistribuição diferenciada das nanopartículas convencionais (AVGOUSTAKIS, 2004).

Neste trabalho, propõe-se o desenvolvimento de nanopartículas de PLA e de blendas de PLA-PEG para encapsulação de zidovudina (AZT) e promover sua liberação prolongada após administração pela via intranasal. Escolheu-se o AZT, em virtude de ser um fármaco amplamente utilizado no tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), mas que apresenta graves efeitos colaterais com a terapia em longo prazo. Dentre esses efeitos, o mais pronunciado é a toxicidade hematológica dose-dependente, caracterizada pela supressão da medula óssea. Esse efeito ocorre porque o AZT apresenta baixa biodisponibilidade oral, pois sofre extenso metabolismo de primeira passagem hepática, o que diminui muito o seu tempo de meia-vida plasmática. Assim, doses maiores são administradas para alcançar efetividade terapêutica, mas que geram também toxicidade (OH et al., 1998; THOMAS e PANCHAGNULA, 2003). Como a biodistribuição do AZT torna-se prejudicada devido ao seu curto tempo de meia-vida, outros locais que são reservatórios do vírus da imunodeficiência humana (HIV), como o sistema nervoso central (SNC), não são atingidos pelo fármaco, o que torna a terapia ineficaz na erradicação do HIV (FINZI et al., 1997; GIAMMONA et al., 1999).

O uso de um sistema de liberação prolongada para o AZT representa uma estratégia interessante para vencer os efeitos colaterais advindos das altas e freqüentes doses. Por manter um perfil de liberação lenta do fármaco, as nanopartículas são sistemas potenciais para a veiculação de AZT, pois evitam as flutuações plasmáticas decorrentes de formas farmacêuticas convencionais, diminuindo os regimes posológicos. Além do mais, evitando-se a via entérica, pode-se diminuir o efeito de primeira passagem hepática, o qual é bastante relevante para o AZT. O uso de

nanopartículas de longa circulação também são interessantes para a veiculação do AZT, pois evitando o SFM as partículas poderiam alcançar outros órgãos que são potenciais reservatórios do vírus HIV.

Dessa maneira, nanopartículas de PLA contendo AZT foram desenvolvidas e caracterizadas. Desenvolveu-se também nanopartículas formadas por blendas de PLA e PEG, com o objetivo de verificar a influencia do PEG nas propriedades físico-químicas e biológicas das nanopartículas. As nanopartículas foram administradas em ratos pela via intranasal e determinou-se o perfil de biodisponibilidade do fármaco veiculado por esses sistemas.

## 2. OBJETIVOS

### **Objetivo geral:**

Desenvolver e caracterizar um sistema nanoparticulado que promova liberação prolongada da zidovudina, utilizando o PLA e blendas de PLA com PEG como polímeros, e avaliar a biodisponibilidade do fármaco contido nas nanopartículas após administração intranasal em ratos.

### **Objetivos específicos:**

- Preparar e caracterizar nanopartículas de PLA e de blendas de PLA com PEG contendo AZT.
- Avaliar a eficiência de encapsulação do fármaco nas nanopartículas.
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir das nanopartículas.
- Avaliar a capacidade das nanopartículas em ativar células fagocíticas.
- Avaliar a biodisponibilidade do fármaco presente nas nanopartículas após administração intranasal em ratos.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida**

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é uma doença infecto-contagiosa, causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), responsável pela pandemia de maior impacto em curso atualmente (AMATO et al., 1996).

O número de casos de AIDS tem crescido assustadoramente e o mais perverso e evidente crescimento está atualmente no continente africano. Mais de 22 milhões de pessoas já morreram de infecção pelo HIV, e acredita-se que 40 milhões estejam infectados no mundo inteiro. A epidemia ameaça populações na África subsaariana, sudeste da Ásia, América Central, América do Sul e Rússia. Embora o desenvolvimento de novos fármacos anti-retrovirais, do complexo esquema terapêutico com múltiplos fármacos e a modificação comportamental humana tenham contribuído sobremaneira para o controle da disseminação da infecção pelo HIV, a AIDS continua representando uma séria ameaça, devido ao elevado custo dos agentes anti-retrovirais e à falta de acesso à estes nos países em desenvolvimento, onde o problema é mais prevalente. Além disso, a eficácia dos agentes anti-retrovirais tem diminuído com o aparecimento de vírus resistentes a múltiplos fármacos (CLERCQ, 2001; DYKE e WOODFORK, 2005).

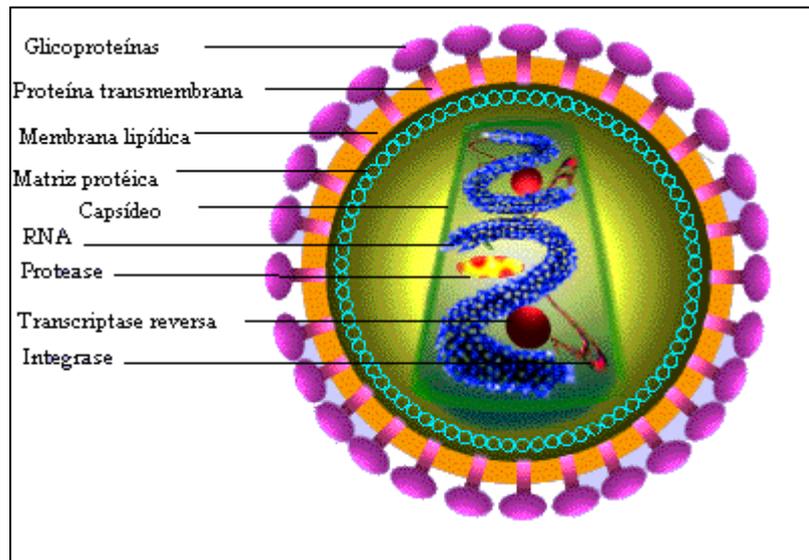
##### **3.1.1.O vírus HIV**

O HIV é classificado como um retrovírus de RNA, que através da enzima DNA-polimerase RNA-dependente, também denominada transcriptase reversa, é capaz de

copiar seu genoma de RNA em uma dupla fita de DNA e integrar-se ao genoma da célula hospedeira. Os retrovírus de RNA possuem em comum o fato de infectarem primariamente células do sistema mononuclear fagocitário (linfócitos T e macrófagos) e de comprometerem, preferencialmente, os sistemas nervoso central (SNC) e imunológico. Classifica-se o HIV em duas formas principais: o HIV-1, que é a forma mais prevalente no mundo, e o HIV-2, a forma mais comum na África Ocidental (DYKE e WOODFORK, 2005).

O HIV (Fig. 1) é um vírus esférico, de aproximadamente 100nm de diâmetro, envelopado, apresentando na superfície uma membrana lipídica oriunda da membrana externa da célula do hospedeiro e duas glicoproteínas (gp41 e gp120). Internamente à essa membrana, encontra-se a matriz protéica, formada pela proteína p17 e o capsídeo viral de forma cônica composto pela proteína p24. O material genético, assim como o tRNA e as enzimas necessárias para os primeiros eventos da replicação viral, encontram-se dentro do capsídeo viral. O genoma do HIV contém nove genes e duas regiões denominadas LTR (*Long Terminal Repeats*), onde estão presentes elementos de controle para integração, transcrição e poliadenilação dos RNA mensageiros (CULLEN, 1991; POLI et al., 1993). Os genes podem ser divididos em dois grupos: os que codificam as proteínas estruturais (*gag*, *pol* e *env*), e os que codificam proteínas não estruturais (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* e *vpx*). O gene *gag* (antígeno de grupo) codifica a matriz protéica (MA ou p17), o capsídeo viral (CA ou p24) e as proteínas nucleares (NC ou p6 e p9). O gene *pol* (polimerase) codifica as enzimas virais: transcriptase reversa, que também possui atividade de RNase H, protease (PR ou p10) e integrase (IN ou p32). O gene *env* (envelope) codifica uma proteína que é clivada dando origem a glicoproteína de membrana (TM ou gp41) e a glicoproteína de superfície (SU ou gp120) (HO et al., 1987; CULLEN, 1991). Os genes não-estruturais são divididos em

regulatórios, que são necessários para a replicação viral *in vitro* e em genes acessórios, que não são essenciais.



**Figura 1.** Esquema ilustrativo do vírus HIV (adaptado de: [www.aidsactioncoalition.org/images/hiv\\_virus.gif](http://www.aidsactioncoalition.org/images/hiv_virus.gif))

O HIV infecta os linfócitos T CD4+, os macrófagos e as células dendríticas. A infecção do HIV dá-se pela ligação de alta afinidade da gp120 do vírus com o receptor presente na superfície da célula-alvo (molécula CD4). A entrada ocorre através da fusão do vírus com a membrana da célula, mediada pela gp41. Porém, a molécula de CD4 não é o único receptor do HIV, sendo seus co-receptores, as moléculas CXCR4, quando em linfócitos, e CCR5 quando em macrófagos (OH et al., 1987; GOODMAN e GILMAN, 2006).

Após a entrada na célula, o RNA viral é convertido a DNA pelas enzimas transcriptase reversa e ribonuclease H. Essa reação ocorre no citoplasma nas primeiras seis horas de infecção. A dupla fita de DNA, assim formada, é integrada de forma randômica ao genoma do hospedeiro por outra enzima viral, a integrase. A seguir, a célula do hospedeiro transcreve os genes virais e produz proteínas virais e RNA viral da

progênie. Os novos víriões organizam-se, brotam a partir da membrana celular e sofrem um processo de maturação mediado pela enzima protease (clivagem da poliproteína gag-pol), tornando, então, a partícula viral madura e capaz de infectar novas células (OH et al., 1987; GOODMAN e GILMAN, 2006).

A maior parte da replicação do vírus ocorre em linfócitos CD4+ recém-infectados, levando à sua depleção durante os primeiros anos de infecção. Ocorre também, depleção da população de macrófagos, cuja função cessa dentro de 3 a 10 anos ou mais. Durante esse tempo, o indivíduo infectado por HIV torna-se imunodeficiente, podendo falecer por infecções que não seriam potencialmente fatais em condições normais. Por fim, os macrófagos do cérebro (micróglia) podem tornar-se infectados, podendo ocorrer demência induzida por inflamação (GOODMAN e GILMAN, 2006).

### **3.1.2. Terapia anti-retroviral atual**

No combate à AIDS e complexidades relacionadas à essa doença, a busca por agentes terapêuticos possuindo atividade contra o HIV tem rendido um número de compostos demonstrando potente e seletiva atividade antiviral *in vitro*. Atualmente existem três classes de anti-retrovirais no mercado: os inibidores da protease; os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e os inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos (CLERCQ, 2001).

Todos estes fármacos previnem a reprodução do vírus deixando o progresso da doença mais lento. O vírus HIV freqüentemente desenvolve resistência a todos estes fármacos, quando empregados isoladamente, após um período que varia de poucos dias a anos, dependendo do fármaco e do paciente (MARKOWITZ, 1996). Dessa forma, a quimioterapia combinada é realizada, associando-se fármacos inibidores da protease

com inibidores da transcriptase reversa, sendo esse “coquetel” multi-fármacos muito mais eficaz, pois age em vários estágios do ciclo replicativo do HIV.

Além dessa estratégia citada, os pesquisadores têm buscado novas estratégias de tratamento para a AIDS, pois as terapias atuais falham em algumas populações de pacientes, em que os efeitos colaterais limitam o tratamento e também devido ao surgimento de novas cepas de vírus resistentes aos fármacos. O desenvolvimento de uma vacina, a qual aumente a resposta imune contra o vírus; ou a manutenção de concentrações de fármaco inibitórias para o HIV em órgãos alvo com mínimos efeitos colaterais, são exemplos de estratégias interessantes (LEE e SINKO, 1999).

### 3.1.2.1. Inibidores da Protease

A HIV protease é classificada como uma protease aspártica e é essencial para a produção de vírions infecciosos. Durante o último estágio do ciclo replicativo do HIV, os polipeptídeos virais *gag* e *gag-pol* se combinam com duas moléculas de RNA viral e proteínas do envelope, para formar partículas virais imaturas. A protease viral, então, cliva os polipeptídeos *gag* e *gag-pol* para formar partículas virais maduras que são capazes de reconhecer e infectar outras células alvo. A inibição da protease viral leva à liberação de vírions imaturos não-infecciosos, que detêm a expansão do vírus para células não-infectadas (LIN, 1997; KAKUDA et al., 1998).

Os inibidores da protease incluem o saquinavir, o ritonavir, o indinavir, e o nelfinavir (MERCK, 1996, GOODMAN e GILMAN, 2006).

Embora a terapia com inibidores da protease seja bastante efetiva, os fármacos são caracterizados por baixa ou variável biodisponibilidade, com limitada penetração no SNC (WILLIAMS e SINKO, 1999). A recuperação de vírus em células CD4 T após

longo prazo de redução do vírus no plasma suporta o conceito de “santuários virais” que resistem à terapia antiviral devido às concentrações sub-terapêuticas do fármaco (FINZI et al., 1997).

### 3.1.2.2. Inibidores da transcriptase reversa

A transcriptase reversa permanece como alvo primário no tratamento da infecção pelo HIV. Apesar de exercerem ação parcial, os inibidores da transcriptase reversa são capazes de diminuir a carga viral, melhorar sintomas clínicos, retardar a progressão da doença e prolongar a sobrevivência de pacientes com AIDS.

Esses fármacos são divididos em dois grupos: os análogos de nucleosídeos e os não-análogos de nucleosídeos.

Entre os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos, encontram-se cinco fármacos anti-HIV que são aprovados pelo FDA e que são atualmente usados na clínica, que são a zidovudina, didanosina, abacavir, zalcitabina, estavudina e a lamivudina (TAN et al., 1999). Esses fármacos atuam colocando-se como “falsos nucleosídeos” na formação da molécula de DNA pela transcriptase reversa. Quando ocupam o lugar de um verdadeiro nucleosídeo na formação da molécula do DNA viral, impedem que um novo nucleosídeo se ligue, interrompendo o processo. Portanto, têm a característica de serem inibidores competitivos (GOODMAN e GILMAN, 2006).

Ao contrário dos nucleosídeos naturais, que entram nas células por transporte facilitado, os anti-HIV análogos de nucleosídeos permeiam as células por difusão simples ou por uma combinação de difusão simples e transporte mediado por carreador (DOMIN et al., 1993). Geralmente, *in vivo* os análogos de nucleosídeos são

extensivamente distribuídos pelo organismo, mas apresentam limitada penetração no SNC; são rapidamente retirados da circulação sistêmica com  $T_{1/2}$  de menos de 3h. Vários efeitos adversos e resistência são frequentemente observados na clínica. Diversos esforços têm sido realizados para desenvolver e aperfeiçoar análogos de nucleosídeos (TAN et al., 1993).

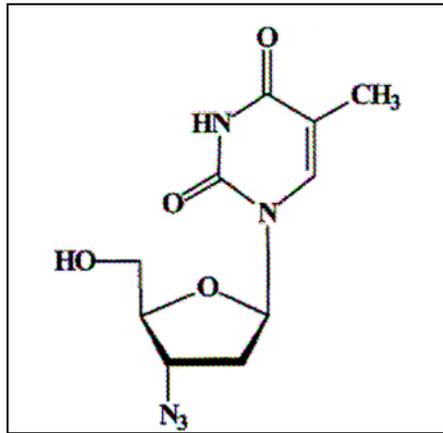
Os fármacos não-análogos de nucleosídeos diferem dos análogos por inibirem a transcriptase reversa não competitivamente, bloqueando a reação química de duplicação da molécula de RNA viral pela transcriptase reversa sem interferir na ligação dos nucleosídeos (SPENCE et al., 1995). Os inibidores da transcriptase reversa, não análogos de nucleosídeos incluem a nevirapina, a delavirdina, o lovirida e o efavirenz (MERCK, 1996; GOODMAN e GILMANN, 2006).

#### 3.1.2.2.1. Zidovudina

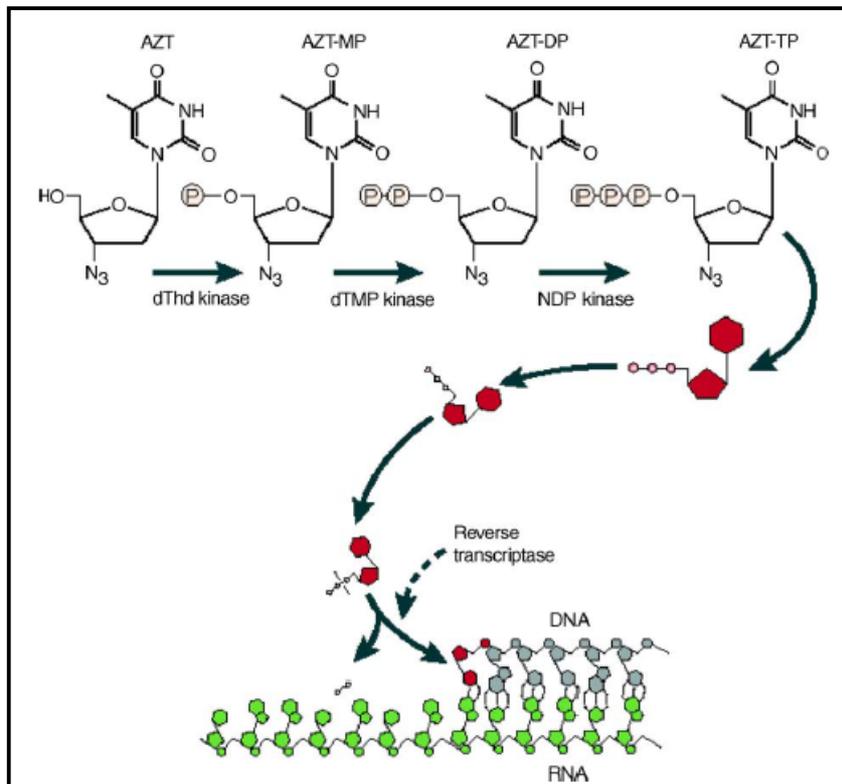
A zidovudina (AZT) foi o primeiro fármaco empregado no tratamento da AIDS, que comprovadamente proporcionou benefícios clínicos importantes, estando disponível deste 1987 (GOODMAN e GILMAN, 2006), logo após a observação de sua atividade anti-retroviral *in vitro* (YARCHOAN et al., 1989). No entanto, o AZT só começou a ser produzida no Brasil em 1993. A Figura 2 ilustra a estrutura química do AZT.

Em relação ao seu mecanismo de ação, o AZT é inativo em sua forma natural contra o HIV, devendo ser fosforilado no interior das células afetadas e não afetadas pela enzima timidina-quinase em AZT monofosfato. Esta se converte em difosfato, por ação da timidilato-quinase celular e então é convertida em trifosfato por outras enzimas celulares não específicas. O trifosfato de AZT age como um inibidor da transcriptase reversa viral e como seu substrato. A formação do DNA pró-viral adicional é bloqueada

pela incorporação do trifosfato de AZT na cadeia e no término subsequente da cadeia. A competição do AZT pela transcriptase reversa do HIV é aproximadamente 100 vezes maior do que para a DNA alfa-polimerase celular. A dose necessária para causar 95% de inibição viral é abaixo de 1 mmol/L (GOODMAN e GILMAN, 2006). A Figura 3 ilustra o mecanismo de ação do AZT.



**Figura 2.** Estrutura química do AZT.



**Figura 3.** Esquema do mecanismo de ação do AZT (adaptado de Clerq, 2004).

O AZT é o fármaco mais amplamente usado, sozinho ou em combinação com outros agentes anti-virais. Entretanto, o fator que limita a sua efetividade terapêutica é sua toxicidade hematológica dose-dependente (toxicidade e supressão da medula óssea) (OH et al., 1998; THOMAS e PANCHAGNULA, 2003). Após administração oral, o AZT é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal (TGI) com picos de concentrações séricas de 1,2µg/mL ocorrendo em aproximadamente 1h. A biodisponibilidade após administração oral é de somente 60% devido ao metabolismo de primeira passagem hepática, eliminado como glicuronídeo inativo, com meia-vida de aproximadamente 1h (MANDAL e TENJARLA, 1996). Para manter níveis terapêuticos efetivos (>1µM), altas doses devem ser administradas frequentemente (200mg/cada 4h). Esta dose frequentemente alcança níveis plasmáticos tóxicos, causando uma série de efeitos adversos graves tais como granulocitopenia e anemia (BLUM et al., 1988; KLECKER et al., 1987). Esses efeitos são dose-dependentes e uma redução da dose total administrada reduziria a severidade desta toxicidade (MANDAL e TENJARLA, 1996).

Adicionalmente, o AZT apresenta limitada penetração no SNC, pois é rapidamente removido da circulação sanguínea e apresenta relativa polaridade, o que dificulta a sua passagem através da barreira hematoencefálica (BHE). Vários efeitos adversos e resistência ao fármaco são frequentemente observados na clínica (GIAMMONA et al., 1999).

Estudos de farmacocinética indicam que 4h após a última dose, a concentração de fármaco encontra-se aproximadamente em torno de 0,16µg/mL, ou seja, muito abaixo da concentração mínima necessária para níveis efetivos, e que 1,5h depois da dose a concentração plasmática do fármaco encontra-se em torno de 0,62µg/mL, ou seja, dose altamente tóxica para as células hematopoiéticas (THOMAS e

PANCHAGNULA, 2003). Essas flutuações nas concentrações plasmáticas também contribuem para reduzir a efetividade terapêutica do AZT e aumentar a sua toxicidade.

Alguns dos maiores problemas associados com a quimioterapia com AZT incluem toxicidade e supressão da medula óssea, e um curto tempo de meia-vida plasmática. Para manter efetivas concentrações de AZT e evitar concentrações sub-terapêuticas e tóxicas, uma liberação contínua do fármaco é requerida. Dessa maneira, seria interessante o uso de uma formulação de liberação prolongada para o AZT, liberando o fármaco a uma velocidade contínua, evitando o metabolismo de primeira passagem e podendo reduzir a toxicidade dose-dependente por minimizar as flutuações nas concentrações plasmáticas.

Estudos realizados por Philips e colaboradores (1991 e 1992), mostraram que a incorporação de AZT em lipossomas resultou em decréscimo na toxicidade da medula óssea, aumento da biodisponibilidade e da efetividade na atividade anti-viral.

Nanopartículas sólido-lipídicas (HEIATI et al., 1998) e microesferas (MANDAL e TERJALA, 1996) também têm sido investigadas como carreadores para o AZT, e resultados mostram aumento na biodisponibilidade deste fármaco quando carregado por esses sistemas coloidais.

### **3.1.3. Desordens neurológicas associadas à AIDS**

Desordens neurológicas são comuns em pacientes com HIV. Aproximadamente 7-20% dos pacientes exibem déficits neurológicos como a primeira manifestação sintomática da infecção pelo HIV, e este número aumenta para 30-70% no estado avançado da doença. Essas disfunções neurológicas envolvem todos os níveis neuroaxiais, incluindo o cérebro, as meninges, medula espinhal, nervos e músculos.

Entre estas, a demência afeta 60% dos indivíduos nos estados mais tardios da infecção por HIV. Essa demência é incomum durante as fases iniciais e assintomáticas da infecção e tende a se desenvolver somente após severa imunossupressão (BREW et al., 1988).

Em adultos, as manifestações clínicas da demência foram reportadas como sendo uma demência sub-cortical. Ela é caracterizada por uma deterioração cognitiva, disfunção motora e mudanças comportamentais. Na ausência de tratamento, o tempo médio de sobrevivência é de aproximadamente de seis meses, menos da metade da média de sobrevivência de pacientes com HIV sem demência (ROTHENBERG et al., 1987).

Estudos de neuro-imagem mostram que atrofia cerebral com concomitante alargamento dos ventrículos e espaços sub-aracnóides é a mais significativa mudança anatômica no cérebro de paciente com demência associada ao HIV. A extensão da redução no volume cerebral geralmente aumenta com a severidade da doença. Adicionalmente, aumento no conteúdo de água e atividades metabólicas alteradas foram detectadas em várias regiões do cérebro (PRICE, 1993).

Foi mostrado também, que a infecção pelo HIV dentro do SNC envolve células derivadas da medula óssea, tais como macrófagos e micróglia, e não as células funcionais do cérebro, como neurônios e oligodentrócitos

#### **3.1.4. Importância da liberação de fármacos anti-retrovirais no SNC**

Com o desenvolvimento de demência e de outras desordens neurológicas associadas ao HIV, requiere-se uma entrada direta de fármacos anti-HIV no SNC. O HIV entra no SNC no período inicial de contaminação, concomitante com a infecção

sistêmica inicial, e tem sido encontrado no SNC de pessoas em todos os estágios da doença viral (RESNICK et al., 1988; SAWCHUCK e YANG, 1999). Particularmente, como a carga viral sistêmica é bastante reduzida pela terapia combinada, o tratamento da infecção pelo HIV no SNC torna-se muito importante para prolongar a sobrevivência do paciente.

O interesse na importância da liberação de agentes anti-HIV no SNC foi despertado por Lipton (1997) e por Pialoux e colaboradores (1997). Estes pesquisadores sugeriram que o SNC pode atuar como um reservatório para o HIV, tornando o vírus menos vulnerável aos atuais tratamentos anti-virais. Pialoux et al (1997) tratou um paciente com uma terapia combinada de zidovudina, lamivudina e indinavir, e descobriu que apesar da carga viral plasmática estar abaixo do limite de detecção (200 cópias/mL), o paciente ainda desenvolvia desordens neurológicas relacionadas ao HIV. Estes resultados indicam que um tratamento sistêmico executado com sucesso pode não reduzir a carga viral no SNC, e isso provavelmente resulta da inadequada distribuição dos fármacos anti-HIV no SNC.

Dessa maneira, um aumento da distribuição no SNC dos fármacos atualmente disponíveis bem como o desenvolvimento de novos agentes com maior penetração no SNC são estratégias para o sucesso da erradicação do vírus nesta região.

Biomateriais coloidais podem ampliar a permeabilidade de fármacos através da BHE. Estudos mostram que os sistemas nanoparticulados não somente mantiveram total atividade anti-viral do AZT (BENDER et al., 1994), mas também reduziram a citotoxicidade do AZT (LOBENDERG et al., 1997) em uma cultura de macrófagos humanos. Além do mais, a atividade antiviral do saquinavir, um anti-retroviral com baixa biodisponibilidade, foi ampliada 10 vezes pela sua incorporação em nanopartículas (BENDER et al., 1996). A partir de estudos *in vitro*, Kuo e Chen (2006)

também mostram a capacidade de nanopartículas de poliaquilcianoacrilatos contendo AZT e lamivudina em permear células endoteliais da BHE.

### **3.1.5. Importância da pesquisa em tecnologia farmacêutica no aprimoramento dos fármacos anti-retrovirais**

Embora a morbidade e a mortalidade de pacientes com AIDS têm sido reduzidas e o tempo de sobrevivência tem se prolongado, os tratamentos atuais não erradicam o HIV e não promovem a cura da AIDS. Esforços na busca de novos agentes anti-HIV são realizados desde a descoberta do vírus em 1981. Desde a descoberta por difração de raios X da estrutura do complexo anticorpo gp120/CD4 (KWONG et al., 1998), tem-se um melhor entendimento molecular de como o HIV entra na célula hospedeira. Esses achados, sem dúvida promovem uma melhor habilidade no desenvolvimento de novos fármacos ou vacinas que talvez possam inibir a entrada do HIV nas células do hospedeiro (LI e CHAN, 1999).

A maioria dos produtos disponíveis de agentes anti-HIV são formulados como formas farmacêuticas sólidas para administração oral. Obviamente, como toda formulação oral, a duração da ação é limitada. Além disso, após o fármaco ser absorvido, o metabolismo/eliminação e barreiras de transporte reduzem substancialmente a efetiva concentração de fármaco que alcançaria o sítio de ação. Então, o uso de novos sistemas de liberação de fármacos e de novas vias de administração para os mesmos representam uma estratégia lógica para vencer esses problemas e tratar efetivamente a infecção pelo HIV.

Muitos agentes anti-HIV presentes no mercado apresentam um tempo de meia-vida relativamente curto, o qual resulta em uma maior frequência no regime de doses e

flutuações nos níveis plasmáticos. Assim, desde que os agentes anti-HIV são incapazes de remover os pró-vírus, um tratamento a longo prazo é requerido. Então, é desejável ter um sistema de liberação controlada ou sustentada do fármaco para aumentar a adesão do paciente, minimizar efeitos colaterais e maximizar a eficácia terapêutica.

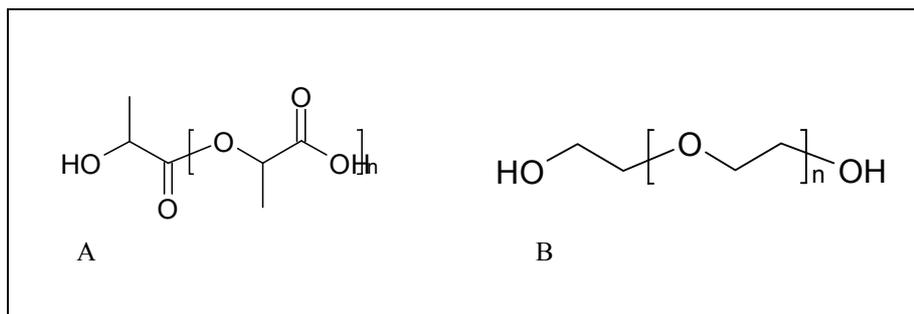
### 3.2. Nanopartículas poliméricas e a via de administração intranasal

O controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos, através da utilização de vetores capazes de permitir a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias, é uma área de intensa pesquisa nos últimos dez anos. Dentre os principais vetores, incluem-se os sistemas micro- e nano-estruturados, dentre eles, os lipossomas e micro-nanopartículas. As nanopartículas constituídas por polímeros biodegradáveis, têm atraído maior atenção dos pesquisadores em relação aos lipossomas, devido às suas potencialidades terapêuticas, à maior estabilidade nos fluidos biológicos e durante o armazenamento (SOPPIMATH et al., 2001).

Embora seja possível o uso de vários polímeros para o preparo de nanopartículas, os materiais poliméricos são limitados a poucos tipos de polímeros aceitáveis. Entre estes, o ácido poli-láctico (PLA), o ácido poli-glicólico (PGA) e seus copolímeros, como o ácido poli(láctico-*co*-glicólico) (PLGA) são dos mais amplamente polímeros sintéticos usados para a preparação de nanopartículas (KAWASHIMA, 2001; KWON et al., 2001), pois são biocompatíveis e degradados *in vivo* em ácido láctico e glicólico, os quais são subsequentelemente eliminados como dióxido de carbono e água, via ciclo de Krebs (ANDERSON e SHIVE, 1997; JAIN, 2000).

Nanopartículas poliméricas convencionais são rapidamente removidas da circulação sanguínea após administração intravenosa, pelos macrófagos do SFM,

principalmente células de Kupffer no fígado e os macrófagos do baço (GREF et al., 1994; AVGOUSTAKIS et al., 2003). Esse efeito é devido principalmente à característica de superfície das partículas, no que diz respeito à polaridade da superfície e da presença de longas cadeias. O PLA (Fig 4-A) devido à sua característica hidrofóbica torna a superfície da nanopartícula bastante acessível à opsonização e posterior fagocitose. Devido a isso, tem havido um crescente interesse no desenvolvimento de carreadores coloidais de fármacos que permaneçam por tempo prolongado na circulação sanguínea. Entre esses, nanopartículas apresentando na sua superfície cadeias de polímero hidrofílico tem mostrado ser um sistema particularmente promissor (GREF et al., 1994; VERRECHIA et al., 1995; BAZILE et al., 1995). A presença da cobertura hidrofílica na superfície das partículas promove uma estabilização estérica evitando a opsonização e fagocitose. Entre os polímeros hidrofílicos, o polietilenoglicol (PEG) (Fig 4-B) tem mostrado ser particularmente efetivo como estabilizador estérico, provavelmente devido a sua alta hidrofília, flexibilidade das cadeias, neutralidade elétrica e ausência de grupos funcionais, os quais previnem interações com componentes biológicos *in vivo* (GREF et al., 1995).



**Figura 4.** Estrutura química do: A) PLA e B) PEG

Os resultados de Tobio e colaboradores (1998) sugerem que a presença da cobertura de PEG em nanopartículas de PLA além de promover maior tempo de circulação, poderia afetar sua interação com superfícies biológicas, tais como a mucosa nasal e a intestinal, e conseqüentemente, melhorar a habilidade desses sistemas em agir como carreadores transmucosal de fármacos. Características interessantes do PEG com respeito à sua aplicação para administração mucosal de fármacos estão relacionadas à sua mucoadesão e habilidade de aumentar a estabilidade de fármacos na mucosa nasal (VILA et al., 2005).

Além da capacidade de escape da opsonização e posterior fagocitose, as nanopartículas estericamente estabilizadas tem sido usadas como estratégia para a liberação de fármacos no cérebro (KREUTER, 2001). Fármacos que com sucesso foram transportados para o cérebro usando esse carreador incluem loperamida (ALYAUTDIN et al., 1997), tubocurarina (ALYAUTDIN et al., 1998), doxorubicina (GULYAEV et al., 1999), etc. O mecanismo de transporte de fármacos mediado por nanopartículas através da BHE no momento não está inteiramente elucidado. O mecanismo mais aceito é a endocitose das nanopartículas pelas células endoteliais dos capilares do cérebro, que compõem a maior interface entre o cérebro e o sangue. Essas células endoteliais são caracterizadas pela presença de junções contínuas (*tight junctions*) entre elas, evitando dessa maneira qualquer tipo de transporte paracelular entre essas células. A presença dessas junções restringe o movimento de solutos polares através do endotélio cerebral. Estudos têm mostrado que as nanopartículas promovem uma abertura das junções entre as células epiteliais (KREUTER, 2001). Lobenberg et al (1997) salientaram a importância de se atingir concentrações efetivas de AZT no cérebro e realizaram experimentos com nanopartículas, as quais mostraram aumentar em 33% as concentrações de AZT no cérebro quando comparada com a solução de AZT.

São várias as vantagens que a via de administração oral oferece, mas para fármacos que sofrem metabolismo no trato gastrintestinal (TGI) e metabolismo hepático, outras rotas de administração devem ser exploradas. A rota transdérmica tem sido amplamente sugerida, pois garante níveis plasmáticos contínuos e evita o metabolismo de primeira passagem (OH et al., 1998; THOMAS e PANCHAGNULA, 2003; NARISHETTY e PANCHAGNULA, 2004). Entretanto, tratando-se do AZT, um problema que limita o uso dessa via é a relativa hidrossolubilidade desse fármaco ( $\log P = 0,09$ ) (KUMAR et al., 1999) e a baixa permeabilidade transdérmica, necessitando assim do uso de técnicas físicas que melhorem a permeação, tais como iontoforese, micro-agulhas, etc.

A via nasal tem recebido especial atenção como via promissora para liberação sistêmica de fármacos (KRISHNAMOORTHY e MITRA, 1998) e apresenta uma série de vantagens, tais como: presença de uma camada sub-epitelial altamente vascularizada permitindo rápida e direta absorção na circulação sistêmica, evitando dessa maneira o metabolismo de primeira passagem; é um meio menos hostil que o TGI, pois as condições na mucosa nasal são menos agressivas devido à menor atividade enzimática; e aumento da adesão e conforto do paciente quando comparado com a via intravenosa por ser uma via menos invasiva (HILLERY, 1998).

Além do mais, a via intranasal é bastante interessante para a administração de fármacos em sistemas coloidais como lipossomas e micro-nanopartículas (MAINARDES et al., 2006). Pesquisas realizadas nos últimos anos envolvendo o desenvolvimento de carreadores transmucosais de fármacos têm levado à conclusão que as nanopartículas podem, realmente, atravessar seu epitélio e, que a composição da superfície das nanopartículas afeta a intensidade deste transporte, onde partículas que apresentam cobertura hidrofílica na superfície atravessam mais facilmente o epitélio

nasal (ALONSO, 2004). Outro parâmetro que tem sido identificado como crítico para o transporte através da mucosa nasal é o tamanho da partícula, onde o transporte de partículas menores é facilitado (TOBIO et al., 1998). Exemplos disso são os experimentos de Brooking e colaboradores (2001) que estudaram o transporte de nanopartículas radiomarcadas através da mucosa nasal de ratos usando partículas de vários tamanhos (20, 100, 500 e 1000nm). Ele encontrou uma grande relação entre a intensidade de transporte e o tamanho das partículas. Outros autores observaram que o tamanho das partículas de PLA influenciava a resposta imune de antígenos nanoencapsulados após administração intranasal, onde a resposta imune foi significativamente maior para nanopartículas do que para micropartículas (SOMAVARAPU et al., 1998, JUNG et al., 2001).

Os sistemas nanoparticulados estão ganhando bastante destaque na busca de melhores tratamentos para a AIDS. Seja como uma tecnologia interessante para ampliar propriedades terapêuticas de fármacos antivirais já consagrados, como também na pesquisa de vacinas. Sabe-se que proteínas, peptídeos e antígenos de DNA são bastantes instáveis para ser administrados sem a presença de determinados adjuvantes que ofereçam proteção à molécula além de apresentarem pobre ação imunogênica. Sistemas de liberação controlada como lipossomas, nano- e micropartículas poliméricas estão sendo estudados na tentativa de ampliar as propriedades imunogênicas de várias proteínas. Estudos de Ataman-Otal e colaboradores (2006) mostram a potencialidade terapêutica, em vários modelos animais, do uso de nanopartículas de PLA como carreadoras de vacina contra o HIV. A adsorção da proteína HIV-1 p24 na superfície das nanopartículas induziu alta resposta imune celular e humoral, incluindo aumento na produção de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

#### Substancias e reagentes

- Álcool polivinílico (PVA) (Sigma Chemical Co., USA)
- Diclorometano (Labsynth Ltda, Brasil)
- Zidovudina (FURP, Brasil)
- Metanol (Mallinkrodt grau HPLC)
- Ácido poli-láctico (PLA) (Sigma Chemical Co, USA)
- Heparina sódica (Organon do Brasil Ltda, Brasil)
- Tiopental – (Cellofarm Ltda, Brasil)
- Polietilenoglicol (PEG 6000Da) - (Sigma Chemical Co, USA)
- Luminol (Sigma Chemical Co, USA)
- Zymozan (Sigma Chemical Co, USA)
- Glicogênio de ostra (Sigma Chemical Co, USA)

#### Equipamentos analíticos e acessórios

- Aparelho para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência VARIAN – Mod. Pro-Star
  - Detector espectrofotométrico UV-VIS VARIAN – Mod. Pro-Star 330
  - Coluna fase reversa C18 (25cm X 4mm) MERCK, LichroCART® para CLAE, preenchida com LiChrospher® 100 RP-18 (5µm)

- Sistema de injeção Rheodyne com alça de 100 $\mu$ L
- Bombas de injeção do solvente VARIAN – Mod. Pro-Star 210/215
- Aparelho de DSC -Schimadzu
- Aparelho de sonicação - SONICS
- Aparelho de termogravimetria - Schimadzu
- Balança analítica METTLER – Mod. H51
- Equipamento de espalhamento dinâmico de radiação laser – Light Scattering – BROOKHAVEN – fonte de laser He-Ne 10nW, 632nm – HUGHES; auto correlator 64 canais
- Equipamento para ensaio de dissolução Hanson Dissolution Test STATION SR8-PLUS
- Evaporador rotatório TECNAL – Mod. TE 120
- Espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier – Shimadzu – Mod. FTIR – 8300
- Liofilizador EDWARDS – Mod. Modulyo
- Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL – Mod. JSM T330T
- Ultracentrífuga HITACHI – Mod. CP 80 $\beta$
- Sistema de filtração por membranas MILLIPORE
- Equipamento de potencial Zeta - BROOKHAVEN
- Luminômetro BioOrbit, Modelo 1251, dotado de dispensadores automatizados, acoplado a uma *workstation* com o *software Multiuse v 2.0 for 1251 luminometer* by BioOrbit,

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. Preparação das nanopartículas contendo zidovudina

#### 4.2.1.1. Nanopartículas de PLA

As nanopartículas de PLA foram preparadas pela técnica da dupla emulsão (A/O/A) evaporação do solvente. Por essa técnica, 50mg de PLA foram dissolvidos em 2mL de diclorometano e emulsionados em 200µL de solução aquosa de PVA (0,1%) contendo AZT (4mg) por meio de sonicação (30s). Essa primeira emulsão A/O obtida, foi re-emulsionada em 4mL de uma solução aquosa de PVA (0,7%), resultando na emulsão múltipla (A/O/A) formada por sonicação (1 min). Durante todo o processo de sonicação foi utilizado banho de gelo para evitar o aquecimento provocado pelo processo, evitando dessa maneira, a evaporação antecipada do solvente.

Em seguida, a emulsão foi submetida à evaporação do solvente orgânico por meio de evaporador rotatório à pressão negativa (20 min, 37°C), a fim de promover a solidificação das nanopartículas à medida que o solvente evaporasse.

Finalmente, as nanopartículas foram isoladas do fármaco não-encapsulado por ultracentrifugação a 21.000 rpm por 30 min (25°C). As nanopartículas resultantes foram congeladas e liofilizadas por 48h.

#### 4.2.1.2. Nanopartículas de blendas de PLA com PEG

Foram preparadas nanopartículas constituídas por blendas de PLA-PEG com o objetivo de verificar a influência do PEG nas diversas propriedades das nanopartículas.

Utilizou-se o PEG de peso molecular de 6000Da na fase orgânica da emulsão em diferentes proporções em relação ao PLA, que manteve-se sempre em constante concentração (PLA:PEG 1:0,1, 1:0,25, 1:0,5 e 1:1).

Primeiramente, o PLA e o PEG, nas diferentes proporções, foram dissolvidos em 2mL de diclorometano e emulsionados com 200µL de solução aquosa de PVA (0,1%) contendo AZT (4mg) por sonicação (30s) com banho de gelo. Então essa primeira emulsão A/O foi re-emulsionada em 4mL de uma solução aquosa de PVA (0,7%), resultando na emulsão múltipla (A/O/A) formada por sonicação (1 min). Em seguida, a emulsão foi submetida ao evaporador rotatório à pressão negativa (20 min, 37 °C) e por final submetida à ultracentrifugação a 21.000 rpm por 30 min. As nanopartículas resultantes foram congeladas e liofilizadas por 24h.

#### **4.2.2. Separação entre o fármaco livre e o incorporado às nanopartículas**

Esta etapa é de grande importância, pois é fator determinante para a quantificação do fármaco incorporado ou não às nanopartículas. Uma técnica bastante utilizada para a separação do fármaco livre do encapsulado é a ultracentrifugação. Imediatamente após a etapa de evaporação do solvente, a dispersão de nanopartículas foi submetida à ultracentrifugação a 21.000 rpm por 30 min a 25°C. Após a primeira centrifugação isolou-se o sobrenadante para posterior análise e procedeu-se à lavagem do precipitado resultante. Uma segunda ultracentrifugação foi realizada nas mesmas condições, e o sobrenadante obtido foi adicionado àquele obtido anteriormente. O precipitado foi congelado e liofilizado.

### 4.2.3. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de AZT por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O desenvolvimento da metodologia analítica por CLAE foi realizado com o objetivo de padronizar um método de quantificação do AZT presente no sobrenadante, no meio de dissolução do ensaio de liberação *in vitro* e para quantificação do AZT em plasma de rato.

#### 4.2.3.1. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas foram as pré-estabelecidas pela Farmacopéia Americana (USP XXVI):

- Coluna cromatográfica de fase reversa MERCK, LiChroCart ® 250-4 HPLC-Cartridge preenchida com LiChrospher ® 100 RP-18 (5 µm);

- Eluição isocrática;
- Vazão da fase móvel: 1 mL/min;
- Comprimento de onda: 265nm;
- Volume de injeção: 100µL;
- Detector espectrofotométrico UV-VIS;
- Composição da fase móvel:

- Metanol:água (1:4) → quantificação do AZT no sobrenadante e no meio de liberação para o ensaio *in vitro*.

- Tampão acetato de sódio (55mM - pH 7,0):acetonitrila (91:9) → quantificação do AZT no plasma (metodologia não-descrita na farmacopéia).

A fase móvel foi previamente filtrada por membrana de poro 0,45  $\mu\text{m}$  e em seguida degaseificada através de sonicação por banho por 30min.

#### 4.2.3.2. Curvas analíticas do AZT

As curvas analíticas foram construídas a partir de uma solução padrão de AZT em uma concentração média de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Construiu-se uma curva analítica em metanol:água (1:4) com diferentes concentrações de AZT (100-1000ng/mL), com o objetivo de padronizar o método de quantificação do AZT presente nas nanopartículas. Outra curva analítica foi construída em água destilada com diferentes concentrações de AZT (15-500ng/mL), com o objetivo de padronizar o método de quantificação do AZT presente no meio de liberação *in vitro*. E por fim, a curva analítica do AZT em plasma (0,1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi construída para a padronização da quantificação do AZT nesta matriz biológica.

Cada concentração foi analisada em triplicata e as curvas foram construídas relacionando-se a média dos valores da área sob a curva obtidos com as concentrações de AZT utilizadas. Os valores foram lançados em gráfico de dispersão linear, sendo calculada a equação da reta, desvios padrão e coeficientes de variação para cada concentração.

#### **4.2.3.3. Validação da metodologia analítica por CLAE para análise de AZT em plasma**

Uma vez que as farmacopéias não descrevem uma metodologia por CLAE para determinação de AZT em plasma, foi necessário realizar a validação da metodologia analítica utilizada para análise do AZT nesta matriz biológica.

##### **4.2.3.3.1. Seletividade e especificidade**

Com o objetivo de se averiguar se houve interferência dos componentes do plasma no tempo de retenção do AZT, uma mistura de AZT e plasma foi submetida às mesmas condições analíticas que as amostras (plasma obtido após administração intranasal de AZT). Os resultados foram expressos pela análise dos cromatogramas obtidos.

##### **4.2.3.3.2. Precisão**

A precisão foi determinada através do ensaio de repetibilidade, analisando-se o coeficiente de variação das determinações de três amostras de concentração conhecida, sendo uma baixa, uma média e uma alta, avaliando o intervalo linear da curva analítica.

##### **4.2.3.3.3. Exatidão**

Avaliou-se a exatidão por análise da amostra de concentração conhecida comparando-se o valor mensurado com o valor teórico. Realizou-se determinações de três amostras de concentração conhecida, sendo uma baixa, uma média e uma alta,

avaliando o intervalo linear da curva analítica. Os resultados foram expressos como percentagem de recuperação.

#### 4.2.3.3.4. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) foi calculado através da análise em triplicata de três amostras conhecidas (100, 150 e 200ng.mL<sup>-1</sup>), utilizando a equação 1 que se baseia no desvio padrão e na inclinação da curva analítica, de acordo com a ANVISA e ICH (1996):

$$LD = \sigma/b \times 3,3 \quad \text{eq. 1}$$

Em que:

$\sigma$  = desvio padrão médio das respostas

b= inclinação da curva analítica

O limite de quantificação (LQ) foi calculado através da análise em triplicata de 3 amostras nas mesmas concentrações (100, 150 e 200ng.mL<sup>-1</sup>) utilizando a equação abaixo (2), de acordo com a ANVISA e ICH (1996):

$$LQ = \sigma/b \times 10 \quad \text{eq. 2}$$

Em que:

$\sigma$  = desvio padrão médio das respostas

b= inclinação da curva analítica

#### 4.2.3.4. Quantificação do fármaco presente nas nanopartículas

Foram realizadas análises indiretas para determinar a concentração de AZT incorporado às nanopartículas.

Por esse método, analisou-se o sobrenadante resultante do processo de ultracentrifugação. Este foi convenientemente diluído em fase móvel (1:1000), filtrado em membrana de poro 0,22µm e analisado por CLAE. As análises foram realizadas em triplicata. Por este método determinou-se a concentração de fármaco não-associado às nanopartículas.

A concentração de AZT foi calculada, aplicando-se a média dos valores das áreas sob a curva do AZT na equação da reta obtida pela curva analítica em metanol:água (1:4). Determinou-se, então a eficiência de encapsulação (EE%) de acordo com a seguinte equação (3):

eq. 3

$$EE\% = \frac{\text{quantidade inicial} - \text{concentração analítica}}{\text{quantidade inicial}} \times 100$$

#### 4.2.4. Caracterização físico-química das nanopartículas

##### 4.2.4.1. Análise microscópica

A determinação da forma geral das nanopartículas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura. Uma gota da dispersão de nanopartículas foi distribuída sob o suporte de amostra. Após a secagem, a amostra foi revestida com ouro coloidal sob

vácuo. A amostra, então, foi colocada na câmara de microscopia, obtendo-se fotomicrografias utilizando feixe de elétrons de 10 e 20 kV.

#### 4.2.4.2. Determinação do diâmetro médio

A determinação do diâmetro médio das nanopartículas foi realizada pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons também conhecida com *quase-elastic light scattering*. Este é particularmente sensível para determinar pequenas mudanças no diâmetro médio, tais como aquelas devido às camadas adsorvidas na superfície da partícula ou pequenas variações no processo de manufatura. Quando um feixe de luz passa através de uma dispersão coloidal, as partículas ou gotas espalham a luz em todas as direções. É possível, então, observar flutuações tempo-dependentes na intensidade do espalhamento através de um detector que processa os dados e envia a um computador (BROOKHAVEN, 2005). A partir dessa técnica, calcula-se o raio hidrodinâmico das partículas coloidais através da equação de Einstein-Stokes (eq. 4):

$$D = \frac{KT}{6\pi\eta R_h} \quad \text{eq. 4}$$

Sendo:

D = coeficiente de difusão das partículas

K = constante de Boltzmann ( $1,3807 \times 10^{-23} \text{ NmK}^{-1}$ );

T = temperatura absoluta (293,15 K);

$\pi = 3,141592$ ;

$\eta =$  viscosidade ( $1,002 \times 10^{-3} \text{ Nm}^{-2\text{s}}$ );

$R_h =$  raio hidrodinâmico

Para as análises, as dispersões de nanopartículas foram diluídas em água destilada (1:4) e mantidas em frascos de cintilação isentos de poeira. Os frascos foram colocados na câmara de análise, de modo que feixe atravessasse a dispersão em toda a sua extensão. As condições de ensaio foram:

- Ângulo de espalhamento: 90°
- Temperatura: 25 ° C
- Comprimento de onda do laser: 532 nm
- Índice de refração: 1,311

Foram realizadas 10 determinações do diâmetro médio e índice de polidispersidade, calculando-se a média e o desvio padrão.

#### **4.2.4.3. Determinação do potencial Zeta**

A análise do potencial Zeta foi realizada por determinação da mobilidade eletroforética das nanopartículas. Previamente as amostras foram diluídas (1:4) com solução aquosa de KCL 1mM para manter uma constante força iônica durante a medida e colocadas na célula eletroforética onde um potencial de  $\pm 150$  mV foi estabelecido.

Foram realizadas, para cada amostra, 10 determinações do potencial de superfície, calculando-se a média e o desvio padrão.

#### 4.2.4.4. Análise térmica

Realizou-se ensaio de calorimetria exploratória diferencial (DSC), em que as amostras (2g) foram pesadas em cadinho de alumínio e aquecidas em atmosfera de nitrogênio, de 30 a 450°C, numa razão de aquecimento de 10°C/min e com vazão de 100mL/min. A célula de DSC foi calibrada e/ou verificada antes dos ensaios no eixo de temperatura utilizando padrões de índio ( $T_{\text{fusão}}=156,6^{\circ}\text{C}$ ) e zinco ( $T_{\text{fusão}}=419,5^{\circ}\text{C}$ ).

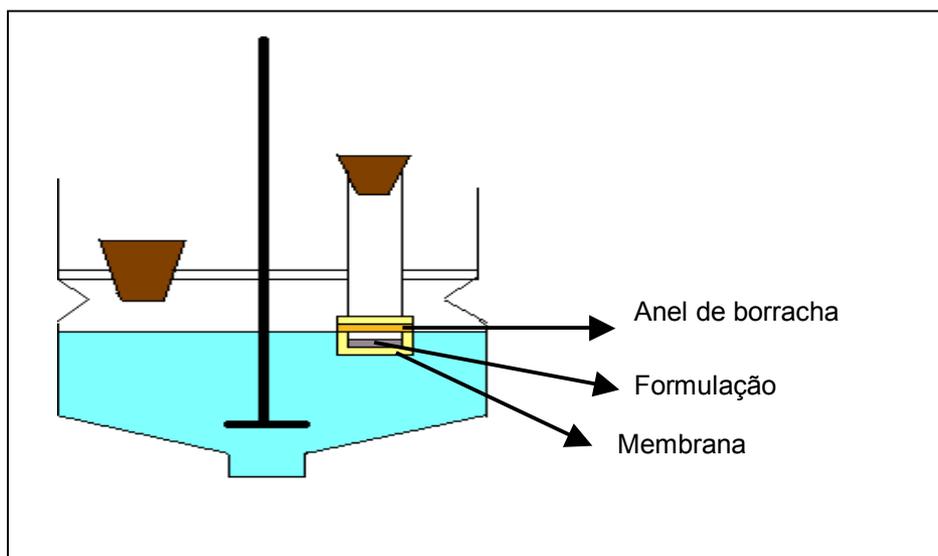
#### 4.2.4.5. Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho

Para esse ensaio as amostras foram preparadas em pastilhas de KBr e analisadas na faixa de 400 a 4000 $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2.5. Ensaio *in vitro*

##### 4.2.5.1. Determinação do perfil de liberação *in vitro* do AZT a partir das nanopartículas

O perfil de liberação *in vitro* do AZT a partir das nanopartículas de PLA e PLA-PEG foi avaliado utilizando-se o modelo de célula de difusão em sistema estático do tipo *Franz* adaptado ao equipamento de dissolução (Urban, 2004). Um esquema ilustrativo da célula de difusão utilizada no ensaio pode ser observado na Figura 5.



**Figura 5.** Esquema da célula de difusão do tipo *Franz* utilizada para ensaio de liberação *in vitro* do AZT.

A célula de difusão do sistema adaptado possui uma tampa com três aberturas, sendo uma para a coleta da amostra e reposição do meio, uma abertura central para a entrada do dispositivo de agitação e uma outra abertura para a colocação do tubo de ensaio com a membrana. A membrana ( $0,22\mu\text{m}$ ) é fixada no tubo de ensaio de 1,24cm de diâmetro através de um anel de borracha. A área de exposição calculada é de  $1,21\text{cm}^2$ .

Os experimentos foram conduzidos a  $37^\circ\text{C}$ , empregando como meio receptor água destilada (meio preconizado pela farmacopéia americana como meio de dissolução para ensaios com AZT) no volume de 15mL, mantendo-se agitação constante (200 rpm). A membrana utilizada foi a de diálise de acetato de celulose previamente hidratada. O ensaio foi realizado sob condições *sink*, utilizando-se um grande volume de meio de dissolução, de modo que a concentração do soluto não alcançasse mais do que 10-15% da sua solubilidade máxima.

Os ensaios foram realizados com amostras de nanopartículas de PLA contendo AZT e com nanopartículas de blendas PLA-PEG (1:0,25) contendo o fármaco. O perfil de dissolução de uma solução aquosa de AZT também foi realizado. Foram colocados 200µL (referente a 8,5mg de AZT) de cada formulação sobre a área de exposição da membrana.

Em intervalos de tempo pré-determinados foram coletadas alíquotas de 200µL do meio, sendo estas filtradas por membrana de acetato de celulose de poro 0,22µm e analisadas por CLAE, determinando-se a concentração de fármaco no meio. Após a coleta, foi realizada a imediata reposição do meio com 200µL de água destilada. O ensaio foi monitorado por 12h.

#### **4.2.6. Ensaios de fagocitose *ex vivo* por leucócitos polimorfonucleares**

Com o objetivo de avaliar se a presença do PEG nas nanopartículas poderia influenciar o perfil de captação celular das mesmas, realizaram-se ensaios *ex vivo* de fagocitose por leucócitos polimorfonucleares (LPMN) de ratos.

##### **4.2.6.1. Avaliação da fagocitose por LPMN através de quimiluminescência**

Realizou-se ensaio *ex vivo* de fagocitose analisado através da quimiluminescência dependente do luminol, utilizando LPMN de ratos.

#### **4.2.6.1.1. Obtenção dos LPMN**

Os LPMN foram obtidos a partir de exsudato peritoneal de ratos. Em cada animal (machos com peso entre 100-160g) foram injetados intraperitonealmente 10mL de solução de glicogênio de ostra a 0,5% em NaCl a 0,85%. Após 12 h o animal foi sacrificado e a cavidade abdominal foi lavada injetando-se 20mL de tampão fosfato-Dubecco (PBS-D), contendo 10 UI de heparina/mL. O lavado peritoneal foi colhido em tampão PBS-D sem cálcio, através de sucção com seringa e agulha. Posteriormente, foi transferido para um tubo cônico siliconizado e centrifugado a 200xg, por 3min. As células sedimentadas foram lavadas por duas vezes com PBS-D sem cálcio (FONSECA, 1991). A seguir, as células foram centrifugadas em um gradiente de densidade de 1077 por 25min a 1000xg. As células foram novamente lavadas em PBS-D sem cálcio e contadas em câmara de Neubauer. Durante os experimentos essas células permaneceram em banho de gelo.

#### **4.2.6.1.2. Avaliação da viabilidade celular**

Para essa avaliação utilizou-se o método do corante Azul de Trypan. O princípio desse teste é a não incorporação do corante pelas células viáveis. Adicionaram-se volumes iguais de corante e de suspensão celular e incubou-se por 5min. Após esse tempo contou-se 500 células em câmara de Neubauer. Esse teste foi realizado a cada 30 min até a terceira hora, e depois na quarta e sexta hora, onde sempre observou-se uma viabilidade superior a 95%.

#### 4.2.6.1.3. Preparo das soluções

A solução estoque de luminol foi preparada em água purificada (MiliQ) e a concentração final foi determinada, espectrofotometricamente, utilizando o coeficiente de extinção molar :

$$\text{Luminol: } \epsilon_{347 \text{ nm}} = 7636 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ (Allen e Loose, 1976);}$$

A solução de azul de Tripán 0,5% foi preparada em solução de NaCl 0,85%. Para a preparação do Zymosan, 100mg foram adicionados em 10mL de água purificada, ferveu-se por 10min, aproximadamente, até ficar com consistência pastosa, centrifugou-se a 200xg por 5min e lavou-se uma vez com PBS – D sem cálcio. Ressuspendeu-se em 10mL de PBS-D, os quais foram divididos em alíquotas de 1mL e conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.6.1.4. Cinéticas de quimiluminescência

Os LPMN ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram incubados em tampão PBS-D 10mM, pH 7,4 à  $37^{\circ}\text{C}$  contendo luminol (0,1mM), constituindo o meio reacional (990 $\mu\text{L}$ ).

As reações (n=3) foram iniciadas após a adição das nanopartículas (0,25mg/mL, 10 $\mu\text{L}$ ) ao meio reacional, sendo a quimiluminescência (proporcional a capacidade das partículas serem fagocitadas) monitorada por 90min. Analisou-se a integral da intensidade de emissão de luz de cada ensaio. Foi realizado controle positivo de fagocitose com zymosan.

#### 4.2.6.2. Avaliação da fagocitose por LPMN através de microscopia

Os LPMN foram obtidos de acordo com o item 4.2.6.1.1. e avaliados quanto à viabilidade celular de acordo com o item 4.2.6.1.2. Os LPMN ( $1 \times 10^6 / 0,2$  ml) foram incubados em tampão PBS-D a  $37^\circ\text{C}$  por 15min, constituindo então o meio reacional. A esse meio foram adicionados  $10\mu\text{L}$  de nanopartículas ( $250\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ), onde permaneceram incubadas por 30min em estufa a  $37^\circ\text{C}$  sob agitação constante. Após a incubação, as células foram lavadas com tampão PBS-D e foram transferidos  $50\mu\text{l}$  do meio reacional contendo as partículas + 1 gota de albumina 22% para uma lâmina onde procedeu-se a fixação das células por intermédio da cito-centrífuga. Por fim as laminae foram coradas pelo corante de Leishmman e levadas à microscopia (aumento de 400x) para avaliação da fagocitose das nanopartículas pelos LPMN. Os ensaios foram realizados em triplicata. Foram avaliadas 200 células por experimento e observados e contados os vacúolos intracelulares dos LPMN, os quais correspondiam às nanopartículas fagocitadas.

#### 4.2.7. Ensaio *in vivo*

Os estudos *in vivo* foram realizados em ratos, considerados por Hussain (1998) excelentes animais para estudos de absorção de fármacos pela via intranasal.

##### 4.2.7.1. Preparo dos animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (Biotério UNESP-Botucatu/SP) pesando entre 180 e 200g no início do experimento. Os animais (n=6) foram mantidos separados

com livre acesso a água e alimentação, com ciclos de 12h claro/escuro. Após os experimentos os animais foram mortos em câmara de CO<sub>2</sub>. Todos os protocolos experimentais com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (FCFAR-UNESP).

Os ratos foram anestesiados pela via intraperitoneal com tiopental (50mg/kg), para facilitar a administração da formulação pela via intranasal.

#### **4.2.7.2. Avaliação da biodisponibilidade das nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo AZT após administração intranasal**

Este ensaio foi realizado com o objetivo de estudar a biodisponibilidade intranasal do AZT contido nas nanopartículas de PLA e de PLA-PEG. Comparou-se o perfil de absorção intranasal do AZT nas nanopartículas com o do fármaco em solução.

##### **4.2.7.2.1. Administração intranasal**

Para administração intranasal, o animal foi mantido fixo em uma posição e a formulação (100µL) foi administrada em cada uma das narinas do animal, por meio de um tubo de polietileno (nº 10) conectado a uma microseringa (100µL). A formulação foi administrada na dose de 80µg/kg. Amostras de sangue foram coletadas (300µL), por meio de uma incisão feita na cauda, em intervalos de tempo pré-determinados (0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 24h). As amostras foram acondicionadas em tubo heparinizados e centrifugadas a 2500 rpm por 15min. O plasma obtido foi estocado a - 20°C.

#### 4.2.7.2.2. Procedimento analítico

O plasma obtido (100 $\mu$ L) foi diluído em 200 $\mu$ L de acetonitrila e submetido à centrifugação a 3500 rpm por 15min, com o objetivo de precipitar as proteínas plasmáticas. O sobrenadante obtido foi acondicionado em tubo eppendorf e mantido refrigerado a -20°C até o uso. As amostras foram filtradas em membrana de poro de 22 $\mu$ m e injetadas no aparelho de CLAE.

#### 4.2.7.2.3. Análise dos dados

A área sob a curva (AUC) da curva concentração-tempo foi calculada usando o método trapezoidal entre 0 e 24h para o ensaio *in vivo* e entre 0 e 12h para o ensaio de liberação *in vitro*.

#### 4.2.7.3. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Comparações estatísticas foram feitas pela ANOVA com 95% de confiança. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Preparação das nanopartículas contendo zidovudina

A partir do método da dupla emulsão-evaporação do solvente (A/O/A), obteve-se nanopartículas contendo AZT. Esse método é particularmente interessante para a encapsulação de moléculas hidrofílicas, como é o caso do AZT. Preparou-se nanopartículas, cuja composição polimérica foi exclusivamente o PLA, como também nanopartículas compostas por blendas de PLA-PEG em diferentes proporções destes polímeros.

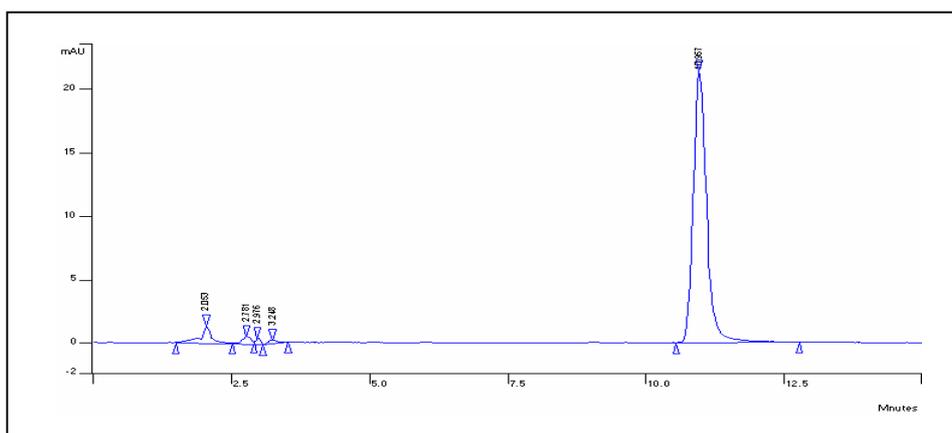
O PEG é um polímero hidrofílico e bastante biocompatível, e sua adição à formulação foi realizada com o objetivo de verificar a sua influência nas propriedades físico-químicas e biológicas das nanopartículas de PLA contendo AZT. O PEG foi adicionado na fase orgânica da emulsão em diferentes razões de massas em relação ao PLA. As formulações obtidas foram baseadas nas seguintes razões de massa PLA:PEG 1:0,1, 1:0,25, 1:0,5 e 1:1.

### 5.2. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de zidovudina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

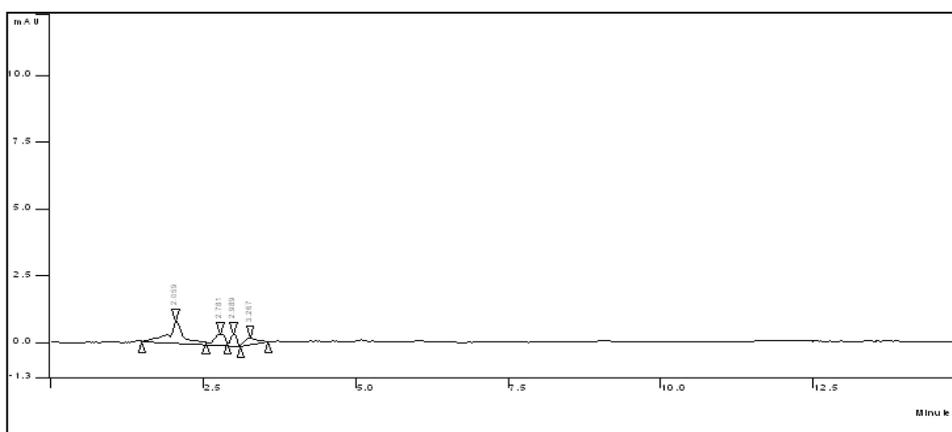
#### 5.2.1. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas foram adequadas para a análise do AZT no sobrenadante (proveniente da separação do fármaco livre das nanopartículas), no meio de dissolução utilizado no ensaio de liberação *in vitro* e em plasma de rato.

A seguir são mostrados os cromatogramas com os respectivos tempos de retenção e áreas dos picos para as metodologias analíticas desenvolvidas para quantificação do AZT presente no sobrenadante (fig. 6 e 7) e no meio de liberação para o ensaio de dissolução *in vitro* (8, 9 e 10).



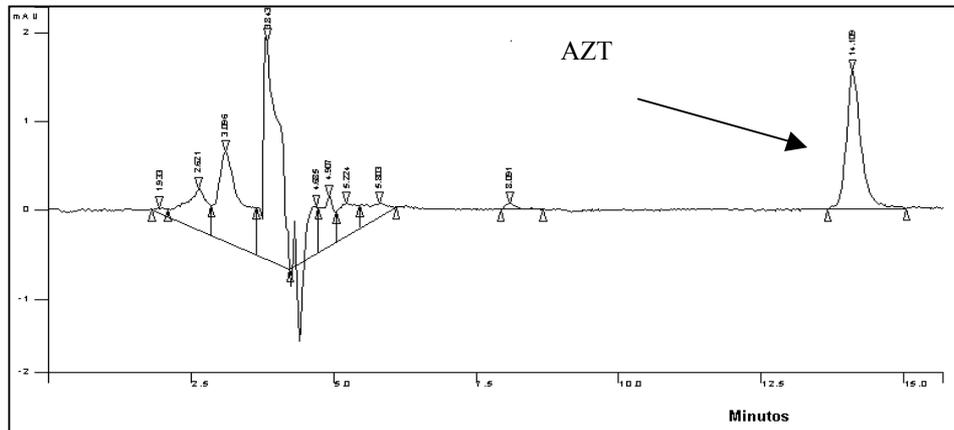
**Figura 6.** Cromatograma da solução aquosa de AZT (750ng/mL) em metanol:água (1:4). Fase móvel: metanol:água (1:4) em 265nm.



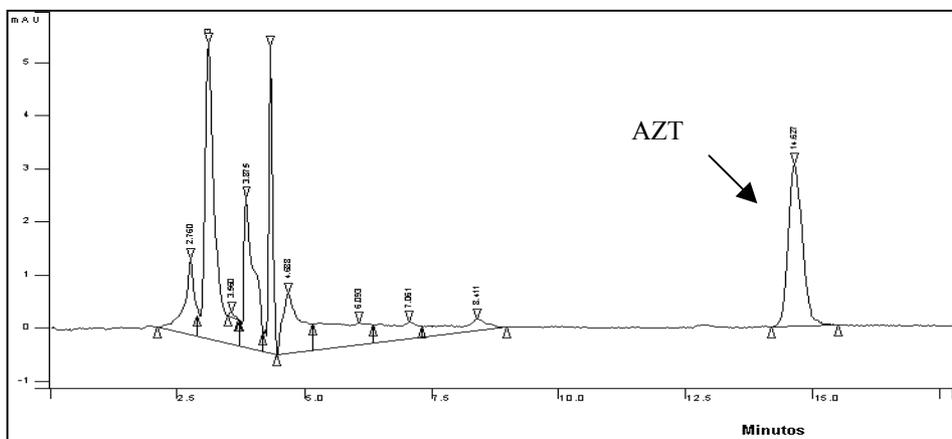
**Figure 7.** Cromatograma da solução de metanol:água (1:4). Fase móvel: metanol:água (1:4) em 265nm.

De acordo com os cromatogramas, pode-se observar que a fase móvel composta pela mistura de metanol:água (1:4) foi eficiente na determinação do AZT em 265nm, verificando-se para este um tempo de retenção de ~11 minutos.

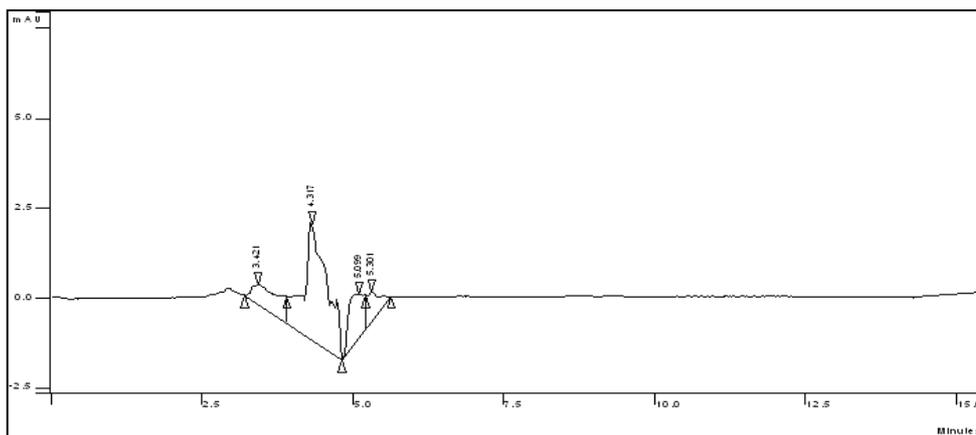
As figuras 8, 9 e 10 ilustram os cromatogramas da solução padrão de AZT (100ng/mL) em água, do AZT presente no meio de liberação após 10h de incubação e cromatograma da água, respectivamente.



**Figura 8.** Cromatograma da solução padrão de AZT (100ng/mL) em água. (Fase móvel: metanol:água (1:4) em 265nm).



**Figura 9.** Cromatograma do AZT presente no meio de liberação após 10h de incubação. (Fase móvel: metanol:água (1:4) em 265nm).



**Figure 10.** Cromatograma da água. (Fase móvel: metanol:água (1:4) em 265nm).

De acordo com os cromatogramas, observou-se que a fase móvel composta de metanol:água (1:4) também foi eficaz na determinação do AZT em água no comprimento de onda de 265nm, verificando-se para este um tempo de retenção de 14,3 minutos.

### 5.2.2. Curvas analíticas do AZT

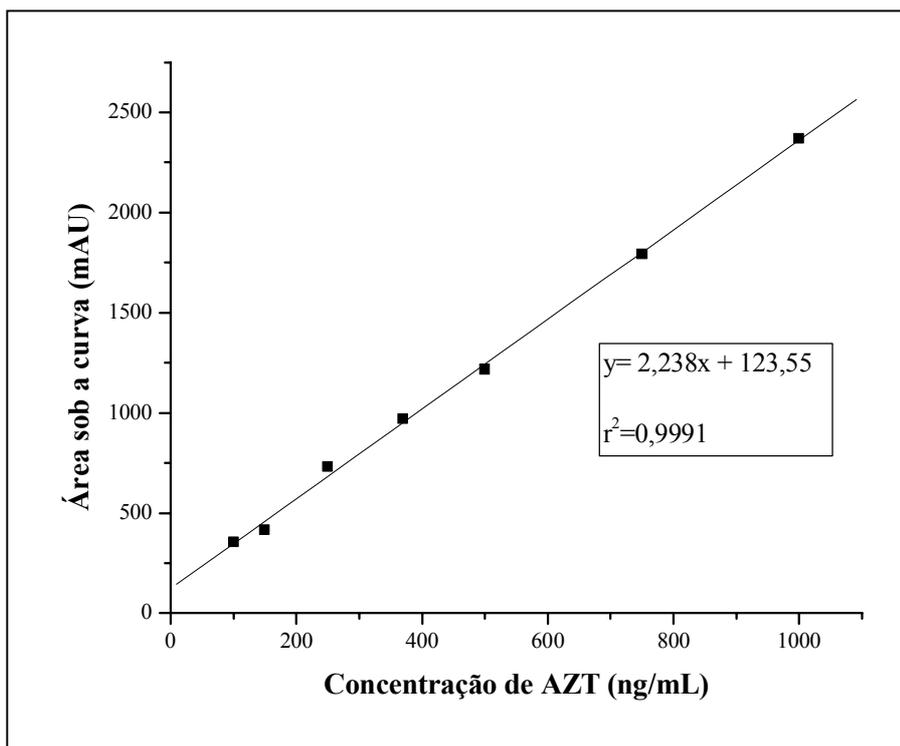
Foram preparadas três curvas analíticas com objetivos distintos. A curva obtida em metanol:água (1:4) teve como objetivo a determinação da concentração de AZT encapsulado nas nanopartículas. A curva analítica em plasma de rato foi obtida com o objetivo de determinar a concentração de AZT no plasma provindo das amostras do ensaio *in vivo*. Por sua vez, a curva analítica em água teve como objetivo determinar a concentração de AZT no meio de dissolução, onde foi realizado o teste para a determinação do perfil de liberação *in vitro*. As curvas analíticas foram construídas com base na variação da área sob a curva do pico característico do fármaco pela sua concentração.

Na padronização do método para quantificação do AZT presente nas nanopartículas, construiu-se a curva analítica em mistura de metanol:água (1:4), observando que o tempo de retenção do AZT foi de aproximadamente 11 min, utilizando-se como fase móvel também uma mistura de metanol:água (1:4) A tabela 1 mostra os resultados estatísticos obtidos na determinação da curva analítica do AZT em metanol:água (1:4), e figura 11 a curva analítica do AZT.

**Tabela 1.** Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva analítica do AZT em metanol:água (1:4) (fase móvel: metanol:água (1:4)).

<b>Concentração de AZT (ng/mL)</b>	<b>Média da área sob a curva (mAU)</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Coefficiente de variação (%)</b>
100	353,517	± 35,25	9,97
150	414,171	± 28,24	6,82
250	731,955	± 18,44	2,52
370	969,921	± 14,51	1,49
500	1216,745	± 101,08	8,30
750	1792,037	± 82,85	4,62
1000	2369,162	± 117,06	4,94

n=3



**Figura 11.** Curva analítica do AZT em metanol:água (1:4), n=3. (Fase móvel: metanol:água em 265nm).

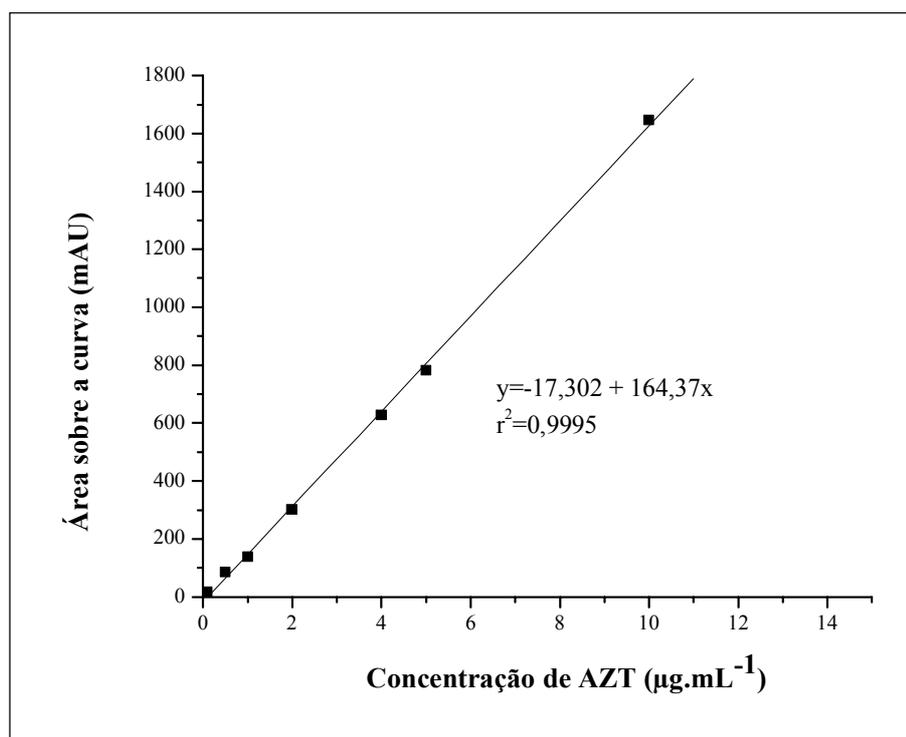
Os resultados indicam linearidade no intervalo de concentração utilizado (100-1000ng.mL<sup>-1</sup>), garantindo confiança no uso da equação da reta obtida por essa curva analítica.

Na padronização do método para quantificação do AZT presente no plasma de ratos, construiu-se a curva analítica em plasma, utilizando-se como fase móvel mistura de tampão acetato de sódio (55mM-pH 7,0):acetonitrila (9%), onde o tempo de retenção do AZT foi de aproximadamente 13,2min. A tabela 2 mostra os resultados estatísticos obtidos na determinação da curva analítica e a figura 12 mostra a curva analítica do AZT em plasma.

**Tabela 2.** Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva analítica do AZT em plasma (fase móvel: tampão acetato de sódio (55mM-pH 7,0):acetonitrila (9%)).

Concentração de AZT ( $\mu\text{g/mL}$ )	Média da área sob a curva (mAU)	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
0,1	16,889	$\pm 1,41$	8,34
0,5	85,098	$\pm 2,42$	2,84
1	137,373	$\pm 13,10$	9,53
2	301,567	$\pm 11,70$	3,87
4	626,748	$\pm 17,08$	2,70
5	780,4925	$\pm 67,80$	8,68
10	1645,687	$\pm 111,96$	6,80

n=3



**Figura 12.** Curva analítica do AZT em plasma de rato, n=3. (fase móvel: tampão acetato de sódio (55mM-pH 7,0):acetonitrila (9%) em 265nm.

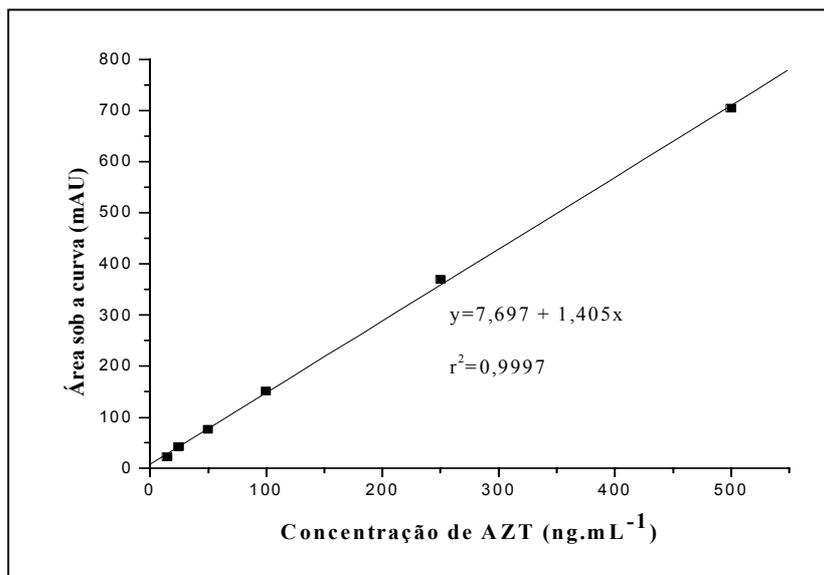
De acordo com a curva analítica pode-se observar linearidade no intervalo de concentração utilizado (0,1 e 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), indicando confiança no uso da equação da reta obtida pela regressão linear dessa curva.

Na padronização do método para quantificação do AZT presente no meio de dissolução do ensaio de liberação *in vitro*, construiu-se a curva analítica em água, onde o tempo de retenção do AZT foi de aproximadamente 14,3min, utilizando-se como fase móvel mistura de metanol:água (1:4). A tabela 3 mostra os resultados estatísticos obtidos na determinação da curva analítica e a figura 13 mostra a curva analítica do AZT.

**Tabela 3.** Resultados estatísticos obtidos na determinação da curva analítica do AZT em água (fase móvel: metanol:água (1:4)).

Concentração de AZT (ng/mL)	Média da área sob a curva (mAU)	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
15	22,916	$\pm 0,24$	1,04
25	42,804	$\pm 1,25$	2,94
50	75,941	$\pm 2,82$	3,71
100	151,173	$\pm 13,42$	8,88
150	260,212	$\pm 9,82$	3,77
250	369,400	$\pm 17,67$	4,78
500	704,989	$\pm 10,94$	1,55

n=3



**Figura 13.** Curva analítica do AZT em água, n=3. (fase móvel: metanol:água (1:4) em 265nm.

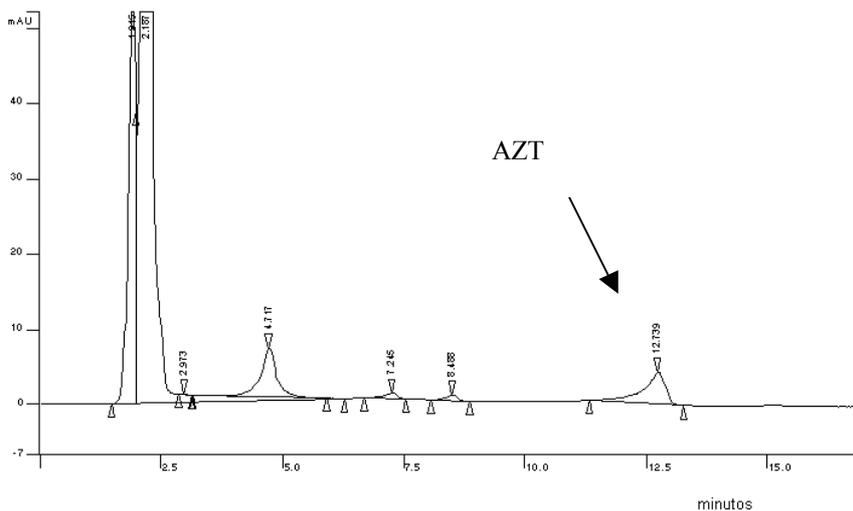
Os resultados indicam linearidade no intervalo de concentração utilizado (15-500 ng.mL<sup>-1</sup>), indicando confiança no uso da equação da reta obtida por essa curva.

### 5.2.3. Validação da metodologia analítica por CLAE para determinação de AZT em plasma

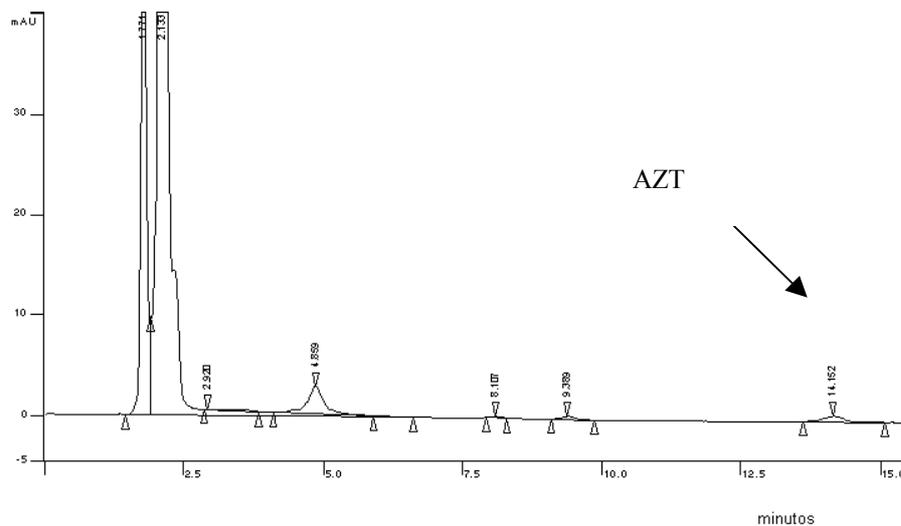
#### 5.2.3.1. Especificidade e seletividade

A especificidade e a seletividade consistem na capacidade do método em medir exatamente a concentração de um composto na presença de outros componentes, tais como impurezas e produtos de degradação (ANVISA 2003, ICH 1996). Neste trabalho, procurou-se avaliar se os componentes do plasma poderiam interferir no pico do AZT.

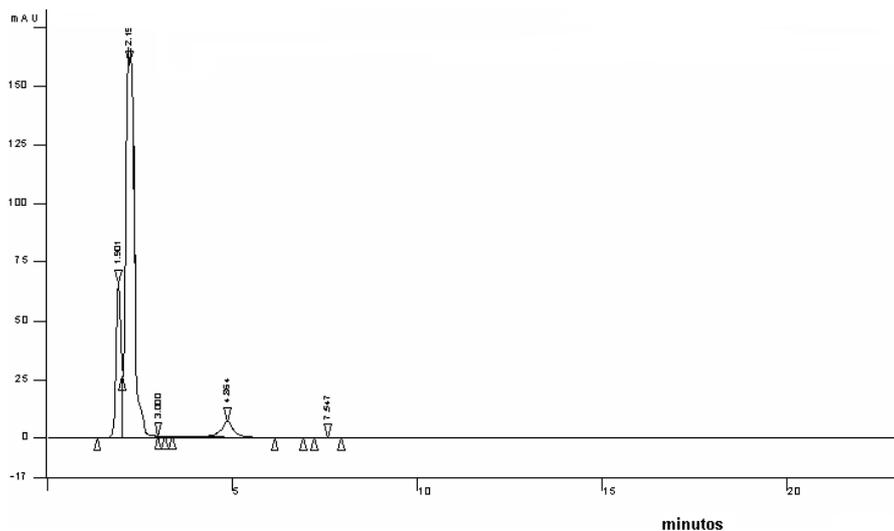
As figuras 14, 15 e 16 ilustram os cromatogramas da solução padrão de AZT (500ng/mL) em plasma de rato, do AZT em plasma após 8h da administração intranasal e cromatograma do plasma puro, respectivamente.



**Figura 14.** Cromatograma da solução padrão de AZT (500ng/mL) em plasma. (Fase móvel: tampão acetato de sódio (55mM-pH 7,0):acetonitrila (9%) em 265nm).



**Figura 15.** Cromatograma do AZT em plasma (coleta após 8h da administração). (Fase móvel: tampão acetato de sódio (55mM-pH 7,0):acetonitrila (9%) em 265nm).



**Figure 16.** Cromatograma do plasma puro. (Fase móvel: tampão acetato de sódio (55mM-pH 7,0):acetonitrila (9%) em 265nm).

De acordo com os cromatogramas, pode-se observar que a fase móvel (tampão acetato de sódio (55mM-pH 7,0):acetonitrila (9%) em 265nm) foi eficiente na separação dos componentes do plasma do pico do AZT, verificando-se ausência de interferentes do plasma no tempo de retenção do AZT (~13min).

#### 5.2.3.2. Precisão

A precisão de um método é o grau de concordância entre os resultados dos testes individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra e em condições idênticas de análise. Determinou-se a precisão por repetibilidade, onde analisou-se em triplicata a área sob a curva de três diferentes concentrações de AZT em plasma. Os resultados estão expressos na tabela 4.

**Tabela 4.** Cálculo da precisão do método por CLAE

Amostra	Valores da área sob a curva		
	150ng.mL <sup>-1</sup>	500ng.mL <sup>-1</sup>	1000ng.mL <sup>-1</sup>
1	8,938	79,567	136,89
2	9,156	80,236	139,032
3	9,268	77,967	134,107
<b>Média</b>	9,12	79,256	136,676
<b>Desvio padrão</b>	0,167	1,164	2.469
<b>CV%</b>	2,24	1,47	2,31

Os resultados indicam que o método é preciso, pois um valor de CV% inferior a 4 é preconizado pelos órgãos oficiais para esse teste (ANVISA 2003, ICH 1996).

### 5.2.3.3. Exatidão

A exatidão de um método é definida como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro (ICH 1996, ANVISA 2003).

As mesmas amostras utilizadas para o teste de precisão foram usadas para o teste de exatidão. Analisou-se em triplicata três diferentes amostras e os resultados estão expressos na tabela 5.

**Tabela 5.** Cálculo da exatidão do método por CLAE

Concentração teórica (ng.mL <sup>-1</sup> )	Concentração determinada (ng.mL <sup>-1</sup> )*	Recuperação (%)
150	163,46	107,15
500	465,78	93,15
1000	936,72	93,67

\* média de três determinações

Os resultados obtidos mostram que o método proposto para análise de AZT em plasma apresenta exatidão, uma vez que os limites de recuperação não foram inferiores a 80% e nem superiores a 120%.

A ANVISA estabelece que para a determinação quantitativa do analito em formas farmacêuticas ou matérias primas, os limites percentuais do teor do analito devem estar contidos no intervalo de linearidade compreendido entre 80 e 120% da concentração teórica do teste.

#### **5.2.3.4. Limites de quantificação e detecção**

O limite de quantificação representa a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Essa determinação é realizada pelo método que se baseia no desvio padrão da amostra e na inclinação da curva analítica (ANVISA 2003, ICH 1996).

O limite de detecção é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, no método de análise empregado sob as condições experimentais estabelecidas. Pode ser calculado com base no desvio padrão de respostas de diferentes concentrações próximas ao suposto limite de detecção e na inclinação da curva analítica (ANVISA 2003; ICH 1996).

A tabela 6 ilustra os resultados dos limites de quantificação e detecção do AZT em plasma de rato.

**Tabela 6.** Valores obtidos no limite de detecção e quantificação do AZT em plasma.

Parâmetro	AZT
Limite de detecção	30,013ng.mL <sup>-1</sup>
Limite de quantificação	90,9ng.mL <sup>-1</sup>

A validação do método de análise de AZT em plasma por CLAE foi avaliada em termos da seletividade/especificidade, precisão, exatidão e limites de quantificação e detecção. O método mostrou-se específico, uma vez que não houve nenhum componente do plasma que pudesse interferir no tempo de retenção do AZT. Os cromatogramas mostraram a total separação do AZT dos outros compostos do plasma. A linearidade também foi avaliada e as curvas analíticas obtidas podem seguramente ser utilizadas na quantificação do AZT nos diferentes fluidos devido a uma boa correlação entre área sob a curva e a concentração de AZT, no intervalo de concentração utilizado. Os resultados dos cálculos dos limites de detecção e quantificação do AZT em plasma denotam a sensibilidade do método e indicam que se pode trabalhar com segurança na faixa de concentração da curva analítica. A precisão e a exatidão foram avaliadas e geraram resultados que estão de acordo com resoluções vigentes. A partir desses parâmetros de validação avaliados pode-se afirmar que a metodologia para análise de AZT em plasma por CLAE utilizando fase como fase móvel mistura de tampão acetato de sódio 55mM:ACN (9%) é segura e apresenta resultados condizentes e verdadeiros.

#### 5.2.4. Quantificação do fármaco presente nas nanopartículas

A determinação da quantidade de fármaco associada às nanopartículas é especialmente complexa devido ao tamanho reduzido destas, que dificulta a separação

da fração de fármaco livre da fração incorporada. Uma técnica de separação bastante utilizada é a ultracentrifugação, na qual a concentração de fármaco livre, presente na suspensão, é determinada no sobrenadante, após a centrifugação (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A eficiência de encapsulação foi determinada por CLAE após a separação do fármaco livre das nanopartículas empregando a ultracentrifugação a 21.000 rpm por 30 min a 25°C.

Determinou-se a quantidade de fármaco indiretamente, por meio da leitura por CLAE do sobrenadante, aplicando-se o valor da área sob a curva na equação da reta da curva padrão em metanol:água (1:4). Essa quantidade foi subtraída da quantidade de AZT utilizada para o preparo das nanopartículas. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados estão presentes na tabela 7.

**Tabela 7.** Eficiência de encapsulação do AZT nas diferentes formulações de nanopartículas.

Nanopartículas	Eficiência de encapsulação (EE%)
PLA	42±6
Blenda PLA:PEG (1:0,1)	47±3
Blenda PLA:PEG (1:0,25)	52±4
Blenda PLA:PEG (1:0,5)	52±5
Blenda PLA:PEG (1:1)	55±5

Os valores de eficiência de encapsulação do AZT foram distintos entre as nanopartículas de PLA e as formadas por blendas de PLA:PEG. De acordo com os

resultados obtidos, pode-se observar que o PEG exerce influencia na capacidade das partículas em encapsular o AZT. Verificou-se que as nanopartículas compostas apenas de PLA mostraram a menor eficiência de encapsulação. Já as partículas contendo PEG em sua formulação tiveram maior potencial em encapsular o AZT. Percebe-se que o aumento da proporção de PEG na formulação leva a um aumento da eficiência de encapsulação do AZT, observando-se que as nanopartículas contendo a maior razão molar de PEG (1:1) apresentaram o maior valor de eficiência de encapsulação.

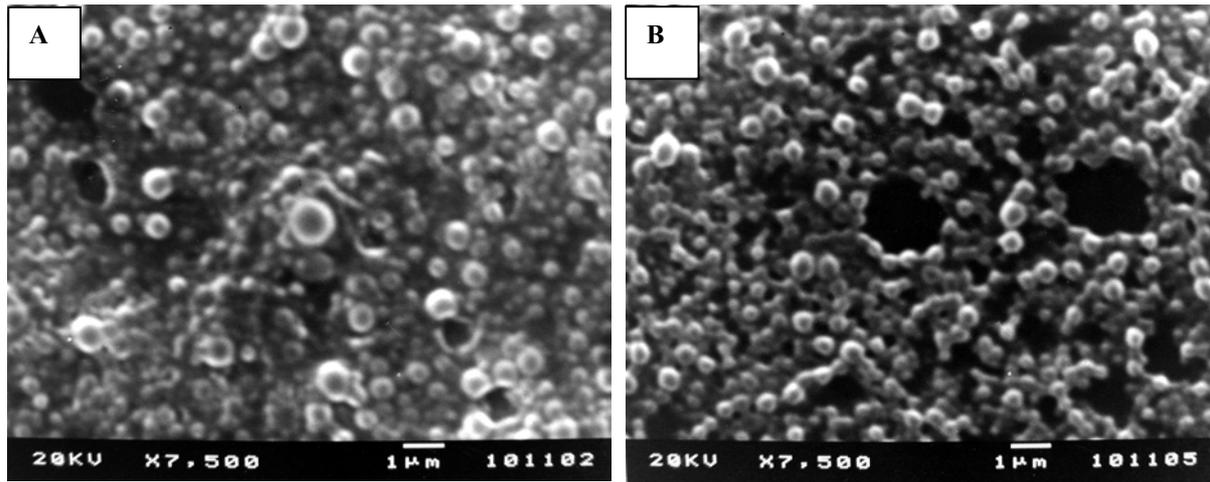
Modificando-se as características de superfície das partículas, é possível obter diferentes taxas de associação do fármaco por adsorção, para uma mesma concentração inicial. (SCHAFFAZICK et al., 2003). Devido ao fato do AZT apresentar características hidrofílicas, ocorre maior afinidade do fármaco com as nanopartículas que apresentam PEG. O PLA por sua característica hidrofóbica mostra menor interação com AZT. Além disso, a natureza anfifílica do copolímero PLA-PEG permite uma melhor dispersão do fármaco contido na fase aquosa com a fase orgânica envolvida no processo da dupla emulsão, dessa maneira melhorando as propriedades de encapsulação.

### **5.3. Caracterização físico-química das nanopartículas**

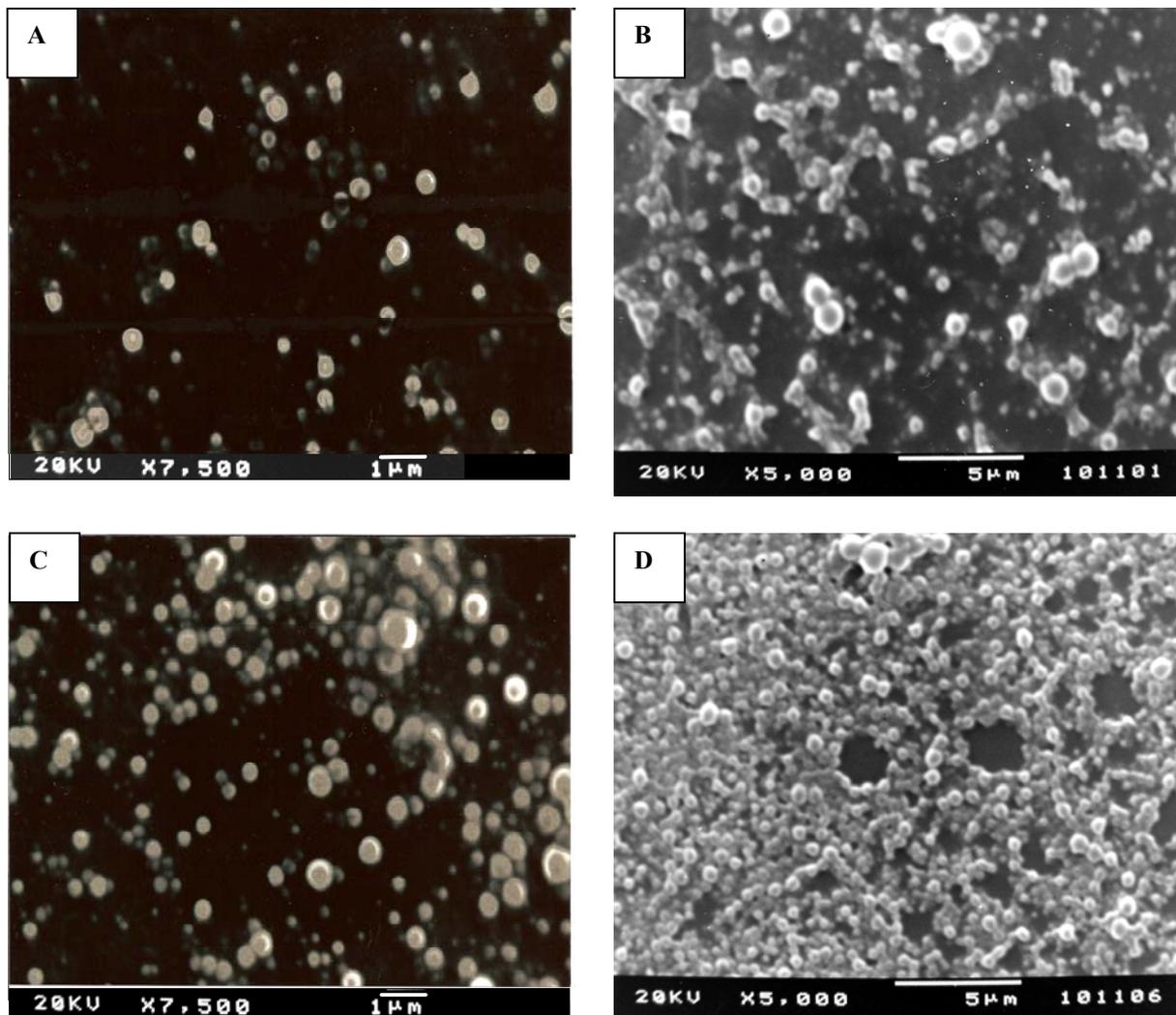
#### **5.3.1. Análise microscópica**

A análise da forma geral das partículas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura. Essa técnica mostrou-se bastante adequada para verificar a forma geral das nanopartículas obtidas, presença ou ausência de aglomerações.

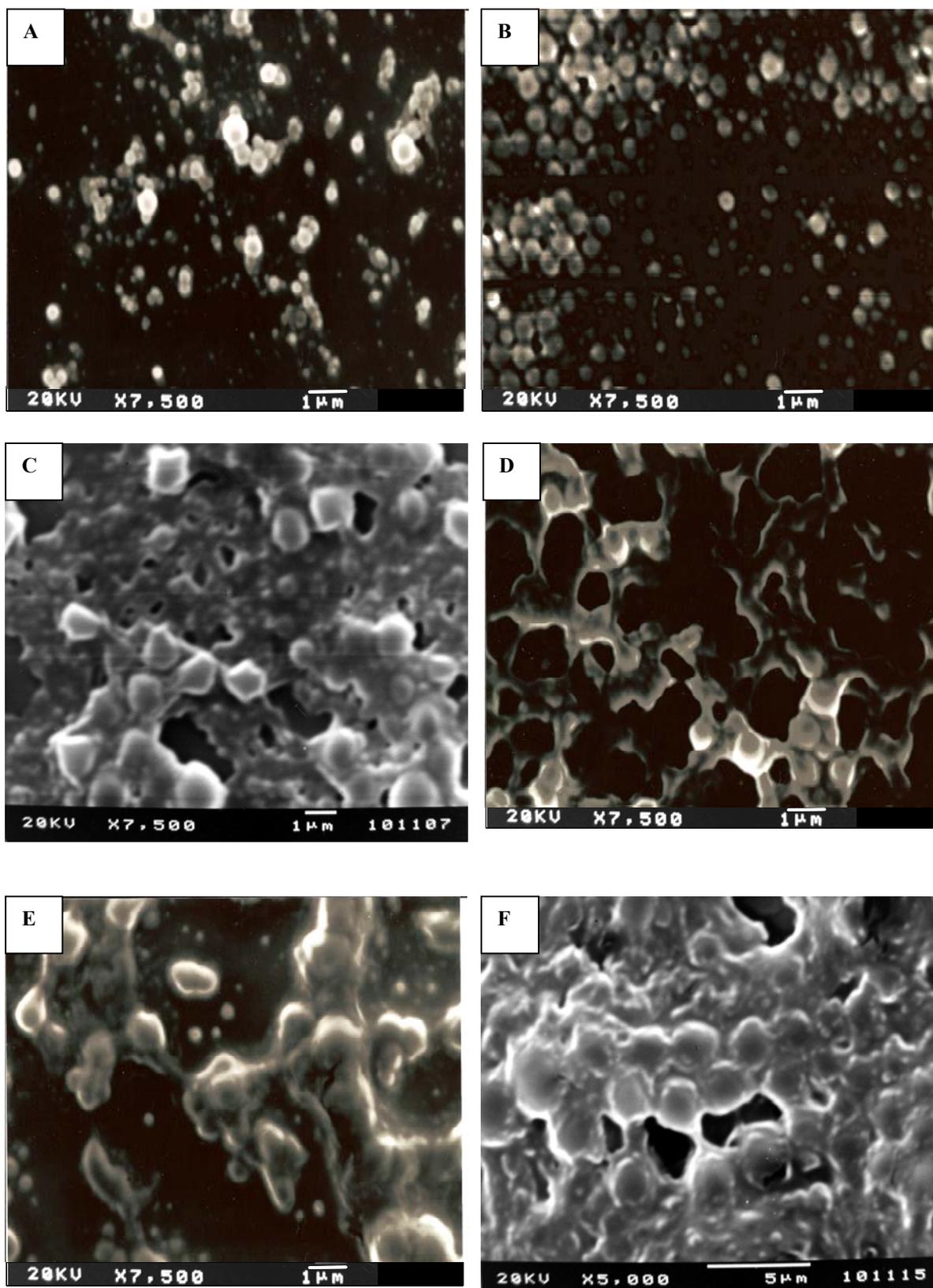
As figuras a seguir mostram as fotomicrografias das nanopartículas de PLA e PLA-PEG.



**Figura 17.** Fotomicrografias das nanopartículas de PLA: A) sem AZT e B) com AZT.



**Figura 18.** Fotomicrografias das nanopartículas de PLA-PEG: A e B) 1:0,1 e C e D) 1:0,25.



**Figura 19.** Fotomicrografias das nanopartículas de PLA-PEG: A, B e C) 1:0,5 e D, E e F) 1:1.

As fotomicrografias mostram que as nanopartículas obtidas apresentam a forma praticamente esférica. Na figura 17 observamos as partículas contendo AZT e as partículas na ausência desse fármaco, e pode ser observada nenhuma diferença na forma geral entre os dois lotes, ou seja, a adição do fármaco no sistema não alterou a forma esférica das partículas.

A figura 18 ilustra as partículas compostas de blendas de PLA:PEG em diferentes concentrações de PEG. Pode ser observado que as partículas contendo 10 e 25% de PEG (em relação à concentração de PLA) apresentaram aspecto bastante semelhante às partículas de PLA, forma esférica e ausência de aglomerados. Já na figura 19, observa-se que as partículas contendo quantidades crescentes de PEG, (1:0,5 e 1:1) apresentaram-se mais aglomeradas que as anteriores, indicando o excesso de PEG na sua superfície. Principalmente nas partículas compostas pelas blendas PLA-PEG 1:1, observa-se a presença de vários aglomerados, em que as partículas aparecem bastante unidas umas às outras, tornando-se disformes.

A partir das fotomicrografias verifica-se a grande influência da concentração de PEG na forma geral e apresentação das nanopartículas. As partículas contendo as menores concentrações PEG (1:0,1 e 1:0,25) apresentaram as melhores características relacionadas à apresentação e forma geral das mesmas. As partículas compostas pelas blendas 1:0,5 e 1:1, logicamente, não são de escolha para o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada de fármacos, devido à falta de homogeneidade de tamanho e forma das partículas e extrema formação de agregados.

### 5.3.2. Determinação do diâmetro das nanopartículas

O diâmetro médio e o índice de polidispersidade das nanopartículas foram determinados pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons. Essa técnica utiliza o espalhamento dinâmico da luz para determinar o tamanho das partículas. Como as partículas em suspensão apresentam um movimento Browniano, dependendo da velocidade de difusão das partículas ocorre uma variação do espalhamento da luz. Assim, o raio hidrodinâmico das partículas é calculado pela variação do espalhamento da luz, em que quanto menor o tamanho das partículas, maior é a velocidade de movimentação das partículas, ocorrendo alterações no espalhamento da luz.

A determinação do diâmetro das partículas foi realizada após diluição da amostra em água purificada. Essa diluição se faz necessária porque em dispersões concentradas as partículas desenvolvem um movimento Browniano mais lento, levando ao cálculo de um diâmetro maior que o real.

A partir das medidas, a média do tamanho das partículas de diferentes lotes de nanopartículas, compostas apenas por PLA ou por blendas de PLA:PEG, variou entre 265 e 374nm, conforme pode ser observado na tabela 8.

**Tabela 8.** Diâmetro médio das nanopartículas.

Nanopartículas	Diâmetro médio (nm)	Polidispersidade
PLA	265,8 ± 15,3	0,311
Blenda PLA:PEG (1:0,1)	293,4 ± 12,2	0,325
Blenda PLA:PEG (1:0,25)	328,1 ± 8,6	0,383
Blenda PLA:PEG (1:0,5)	314,8 ± 22,4	0,372
Blenda PLA:PEG (1:1)	374,3 ± 23,1	0,401

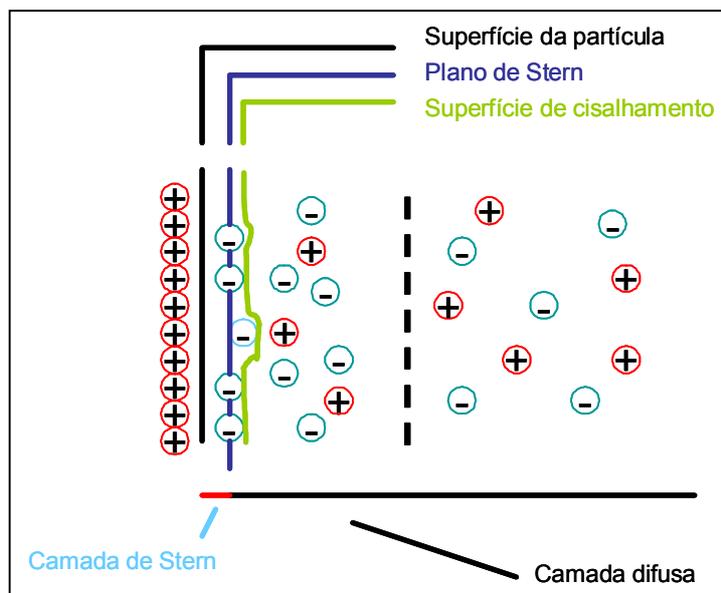
De acordo com os resultados, pode-se observar que as partículas constituídas por PLA apresentaram diâmetro médio menor. As nanopartículas formadas pelas blends de PLA com PEG apresentaram diâmetro maior, sendo o maior diâmetro obtido pela blenda com maior proporção de PEG (1:1). O índice de polidispersidade desta última formulação também demonstra que além de maiores, as nanopartículas não apresentam muita homogeneidade de tamanhos, resultado que corrobora com as fotomicrografias das partículas obtidas com essa blenda (fig. 19-D, E e F).

Esse resultado é perfeitamente justificável, uma vez que a adição do PEG torna a fase oleosa mais viscosa, agravando a dispersão da fase aquosa interna na fase orgânica, dificultando, dessa maneira, a formação da primeira emulsão. Essa primeira emulsão, subsequentemente, apresenta menor eficiência na redução no tamanho dos glóbulos durante a segunda fase da emulsificação. Foi observada, na prática, uma maior resistência à emulsificação para o sistema composto com razões molares 1:1 PLA:PEG, resultando em partículas maiores e com maior índice de polidispersidade.

### **5.3.3. Determinação do potencial Zeta**

A maioria dos materiais particulados em contato com um líquido adquire uma carga elétrica em sua superfície, tornando-a eletricamente carregada. Essa carga pode aparecer de várias maneiras, pela dissociação de grupos ionizáveis na superfície da partícula e a adsorção diferencial de íons da solução na superfície da partícula. A carga líquida na superfície da partícula afeta a distribuição de íons na sua vizinhança, aumentando a concentração de contra-íons junto à superfície. Assim, forma-se uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido. Essa dupla camada divide-se em duas regiões: uma região interna que inclui íons fortemente ligados à

superfície e uma região exterior onde a distribuição dos íons é determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e movimento térmico. Dessa forma, o potencial nessa região decai com o aumento da distância da superfície até, a uma distância suficientemente grande, atingir o potencial da solução. Esse potencial é convencionalmente chamado de potencial de carga nula. Em um campo elétrico, como em microeletroforese, cada partícula e os íons mais fortemente ligados à ela se movem como uma unidade, e o potencial no plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circundante é chamado potencial Zeta. A figura 20 ilustra a formação da dupla camada elétrica e a localização do plano de cisalhamento.



**Figura 20.** Esquema da dupla camada elétrica que envolve a partícula.

Quando uma camada de macromoléculas é adsorvida na superfície da partícula, ela move o plano de cisalhamento para longe da superfície, pois aumenta a espessura da dupla camada e, dessa maneira, altera o potencial Zeta. Dessa forma, o potencial Zeta é função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a circunda.

O potencial Zeta não pode ser medido diretamente. Assim, usa-se algum tipo de medida indireta, a partir da qual se calcula o potencial Zeta. A técnica mais usada e mais aceita é através da mobilidade eletroforética, em que se introduz uma suspensão coloidal diluída em uma cuba com dois eletrodos e aplica-se um potencial elétrico à suspensão. As partículas com carga elétrica líquida mover-se-ão na direção do eletrodo de carga contrária, tão mais rapidamente quanto maior a sua carga elétrica e maior o campo elétrico aplicado. O quociente da velocidade de deslocamento pelo campo elétrico chama-se mobilidade eletroforética. Esse valor entra numa equação (as mais usadas são as aproximações de Smoluchowski ou a de Debye) para calcular o potencial Zeta.

O valor do potencial Zeta das nanopartículas de PLA (isentas de AZT) foi avaliado e comparado com o das nanopartículas compostas por blendas de PLA:PEG (isentas de AZT). Os resultados podem ser observados na tabela 9.

**Tabela 9.** Potencial Zeta das nanopartículas.

<b>Nanopartículas</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
PLA	-20±1,2
Blenda PLA:PEG (1:0,1)	-8,5±2,0
Blenda PLA:PEG (1:0,25)	-6,5±2,1
Blenda PLA:PEG (1:0,5)	-6,2±1,5
Blenda PLA:PEG (1:1)	-6,3±1,1

De acordo com os resultados, a primeira característica que se pode observar é que houve alteração da superfície das partículas de PLA com a presença de PEG, pois observa-se alterações nos valores de potencial de superfície das mesmas.

O valor negativo mais alto ( $-20 \pm 1,2$ ) de potencial de superfície, apresentado pelas partículas compostas somente de PLA, provavelmente reflete a presença de grupos carboxila terminais do PLA na superfície das partículas. Um marcante decréscimo na carga superficial foi observado nas nanopartículas compostas por blendas de PLA-PEG, em todas as razões molares. Isso foi observado devido a uma possível cobertura dos grupos carboxila terminais do PLA pelas cadeias de PEG, mascarando, então a carga negativa das carboxilas.

Por esses resultados preliminares, pode-se concluir que com uso de blendas de PLA:PEG é possível obter nanopartículas com a superfície modificada pelo método da dupla-emulsificação seguida pela evaporação do solvente.

Os resultados do ensaio indicaram um decréscimo no valor de potencial para as partículas compostas por blendas de PLA:PEG quando comparado com as nanopartículas de PLA. A presença do PEG na superfície das nanopartículas forma uma espécie de barreira estérica, que leva a um deslocamento da fase hidrodinâmica do cisalhamento para distâncias maiores a partir da superfície das partículas, ou seja, deslocou o plano de cisalhamento para limites superiores da camada, resultando na redução do valor de potencial Zeta. Esses resultados sugerem a presença de PEG na superfície das nanopartículas, e que este afeta a carga superficial das mesmas.

Resultados semelhantes foram observados por vários autores, que observaram redução no potencial Zeta de nanopartículas compostas por copolímeros de PLA:PEG em relação ao potencial das partículas de PLA (RILEY et al, 1999, VILA et al, 2004, TOBYO et al, 1997).

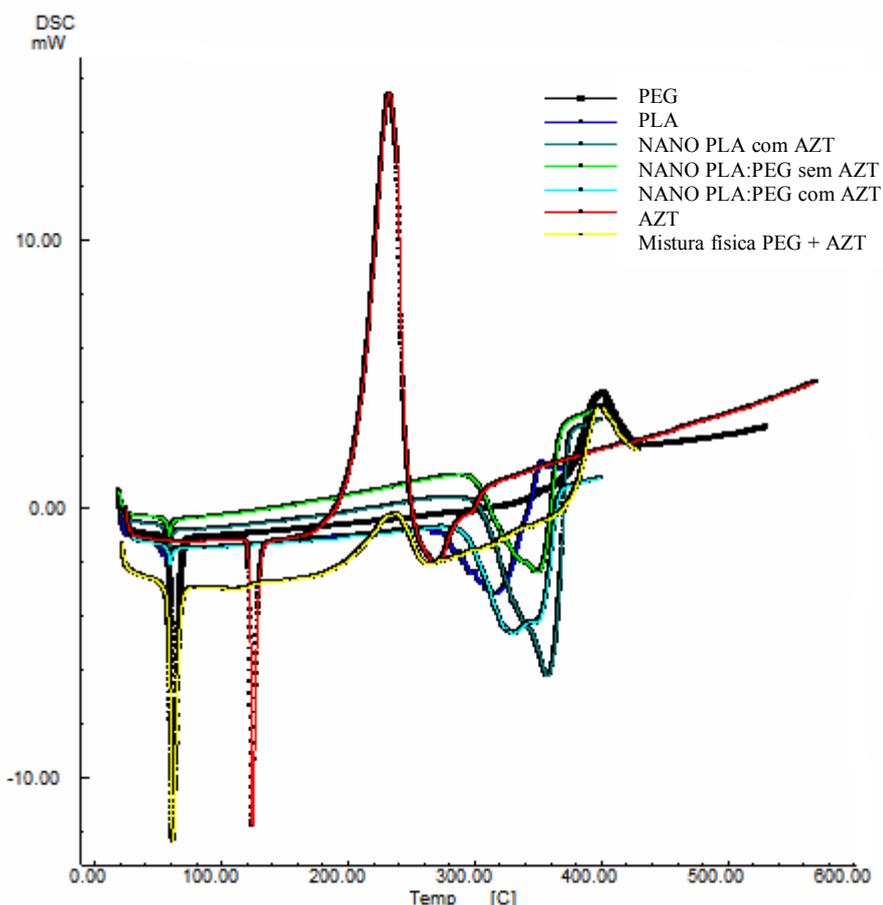
Os resultados obtidos neste trabalho são bastante interessantes, pois indicam que a presença do PEG na forma de blenda, ou seja, fisicamente misturado com o PLA, é capaz de modificar a superfície de partículas. O processo de obtenção por síntese de um copolímero de PLA:PEG é bastante complicado e oneroso e requer uma série de etapas sintéticas e processos de purificação.

Outro fator de extrema importância é o fato de que existe uma correlação entre carga superficial das partículas e sua capacidade de sofrer opsonização. Estudos *in vitro* demonstraram que partículas com carga mais próxima da neutralidade apresentam menor tendência à opsonização do que partículas carregadas (ROSER et al., 1998).

#### **5.3.4. Análise térmica**

A verificação do estado físico do AZT nas nanopartículas foi realizada por calorimetria exploratória diferencial (DSC). Esta técnica ajuda a compreender a forma de associação do fármaco às nanopartículas bem como a ocorrência de alguma incompatibilidade ou interação química entre fármaco e polímeros. Alterações nos perfis termoanalíticos das espécies, como deslocamentos, redução significativa ou desaparecimento de pico na curva de DSC, quando comparados aos perfis dos compostos individualmente, podem caracterizar incompatibilidade fármaco/polímero ou polímero/polímero ou que houve uma interação química entre eles em virtude do aquecimento (RODANTE et al., 2002, BOGDANOVA et al., 1996).

O estudo de DSC do PLA puro, do PEG e do AZT puro foi realizado. Compararam-se os perfis termoanalíticos dessas substâncias com os obtidos pela análise de DSC das nanopartículas de PLA, nanopartículas de PLA-PEG vazias e com as nanopartículas de PLA-PEG contendo AZT (fig. 21).



**Figura 21.** Curvas de DSC das amostras.

A curva de DSC do AZT puro mostra um primeiro evento endotérmico, na faixa de temperatura entre 118 e 138°C ( $\Delta H = -94,86 \text{ J/g}$ ), característico do processo de fusão do fármaco. A partir de 170°C, observou-se início do processo de decomposição térmica do AZT, sendo dividido em duas etapas. A primeira exotérmica e a segunda endotérmica. A etapa exotérmica ocorreu na faixa de temperatura entre 170 e 257°C, apresentando um valor de entalpia em torno de 891,70 J/g e temperatura do pico em 233°C. A etapa posterior, a endotérmica pode ser observada na faixa de temperatura

entre 258 e 330°C ( $\Delta H = -31,8 \text{ J/g}$ ), e é indicada por dois picos na curva de DSC nas temperaturas de 270 e 300°C.

A curva de DSC do PLA puro exibiu um pico endotérmico em 53,2°C, característico pico de relaxamento que é referente ao evento de transição vítrea do polímero. Posteriormente observou-se outro pico endotérmico referente a decomposição do polímero entre 252,6 e 349°C com máxima temperatura em 317,7°C ( $-417,7 \text{ J/g}$ ).

A curva de DSC do PEG puro exibiu um pico endotérmico correspondente a fusão do polímero na temperatura de 63°C ( $\Delta H = -181,7 \text{ J/g}$ ). Observou-se também um evento exotérmico, caracterizado pelo início da decomposição térmica do PEG, que teve início em 343°C e término em 431°C com máximo de decomposição na temperatura de 398°C ( $\Delta H = 225,25 \text{ J/g}$ ).

Na curva de DSC das nanopartículas de PLA observou-se a presença do pico de relaxamento em 55,25°C ( $\Delta H = -6,38 \text{ J/g}$ ), caracterizado pela mudança de linha base relacionada à transição vítrea do PLA, O evento endotérmico posterior que se iniciou em 290,4°C e terminou em 380,18°C com máximo em 357,8°C ( $-731,27 \text{ J/g}$ ), é relacionado à decomposição térmica do PLA.

Na curva de DSC das nanopartículas de blendas de PLA-PEG isentas de AZT observou-se pico de relaxamento endotérmico relacionado à transição vítrea do PLA em 55,23°C ( $\Delta H = -5,43 \text{ J/g}$ ). O posterior evento endotérmico iniciou-se em 294,3 °C e terminou em 380,18 °C com máxima temperatura em 377,08 °C e entalpia em torno de -461,49J/g. Não foram observados picos endotérmicos relativos à fusão do PEG.

A curva de DSC das nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo AZT mostra um primeiro evento endotérmico relacionado à transição vítrea do PLA em 56,18 °C ( $-6,38 \text{ J/g}$ ). Não foram observado picos endotérmicos relativos à fusão do AZT e do PEG. Os eventos endotérmicos seguintes começaram em torno de 281,15°C e

terminaram em 371,28 °C com máximo em 330,16°C e 347,68 °C são relacionados á decomposição térmica dos polímeros.

A curva de DSC da mistura física PEG e AZT exibiu um pico endotérmico correspondente a fusão do PEG na temperatura de 63°C. Não houve a presença de pico endotérmico relativo à fusão do fármaco. Um evento exotérmico na faixa de temperatura entre 170 e 257°C caracterizou a decomposição do AZT. Observou-se também um evento exotérmico, caracterizado pelo início da decomposição térmica do PEG, que teve início em 343°C e término em 431°C.

Em relação ao PLA, na curva de DSC observou-se um leve deslocamento do pico de relaxamento relacionado à eventos de transição vítrea (+ 2°C para a direita) quando o PLA estava na forma de nanopartículas. Dessa maneira, pode-se dizer que o processo de microencapsulação afetou de maneira bastante leve as propriedades termomecânicas do PLA. Em relação à decomposição do PLA, os resultados indicaram que o polímero puro apresentou início de decomposição térmica mais rápida (~252°C) do que as nanopartículas de PLA (~290°C) e de PLA-PEG contendo AZT (~281,15°C) e na ausência do fármaco (~294,3 °C). O evento exotérmico característico da decomposição térmica do PLA puro também foi menor do que o observado pelas nanopartículas, visualizado pelo menor valor de entalpia.

Em relação ao PEG, um fenômeno que foi observado refere-se ao desaparecimento da endoterma relacionada à fusão cristalina do mesmo quando este encontrava-se na formulação de nanopartículas. Esse desaparecimento é indicativo de forte interação entre os polímeros (PLA e PEG) em função do aquecimento, mas não necessariamente corresponde a incompatibilidade entre eles.

Em relação ao AZT, na formulação de nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo AZT, observou-se a ausência da endoterma relativa à fusão cristalina do

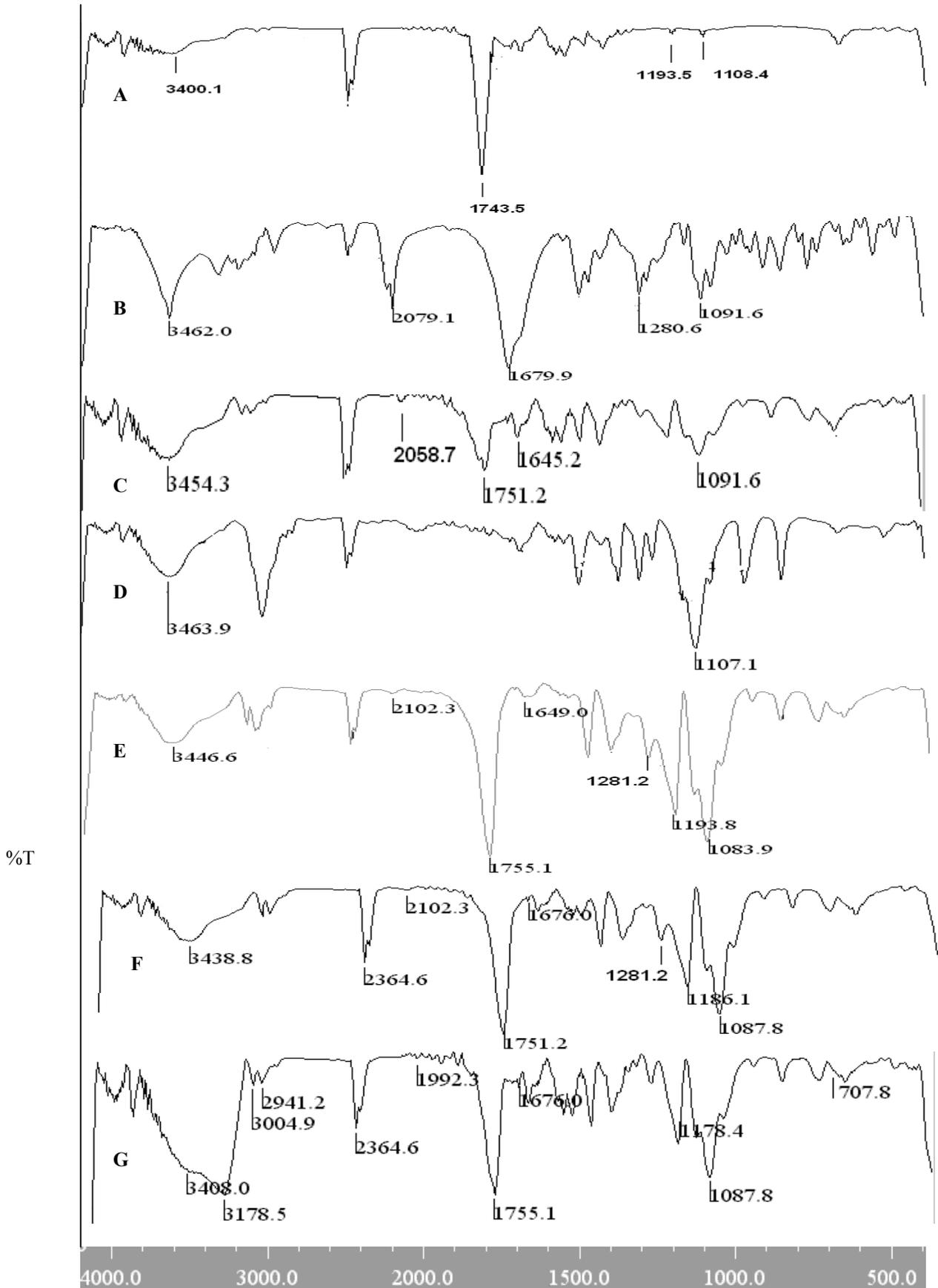
fármaco. Esse dado também não significa que houve incompatibilidade entre fármaco e polímero que desestruturasse o AZT, mas sim indica que o fármaco após o processo de microencapsulação apresenta-se em um estado amorfo de dispersão molecular na matriz polimérica. Outros autores, Venier-Julienne e Benoit (1996), Fitzgerald e Corrigan (1996), Mu e Feng (2002) também observaram a ausência do pico de fusão do fármaco quando este se encontrava microencapsulado em matrizes poliméricas.

A curva de DSC da mistura física PEG + AZT mostra um alargamento, redução e deslocamento do pico de fusão do AZT, onde este pico mostra-se quase imperceptível. Essa característica é atribuída à dissolução do fármaco no polímero fundido. Esse fato mostra a forte interação que ocorre entre o fármaco e o PEG em função do aquecimento. Fatos similares foram descritos por Mura et al., (1993) para o naproxeno, por Najib e Suleiman (1989) para o diflunisal, por Fernandez et al., (1992) para o piroxicam e por Araújo et al., (2003) com o AZT, em mistura física com PEGs de vários pesos moleculares.

### **5.3.5. Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho**

Este estudo é de extrema importância, pois visa verificar se após o processo de microencapsulação o polímero apresenta as mesmas características químicas de quando puro e principalmente para verificar a integridade da estrutura química do fármaco após o processo de obtenção das nanopartículas.

Realizou-se análise no IV dos polímeros puros (PLA e PEG), do fármaco puro, de nanopartículas de PLA contendo AZT e de nanopartículas de blendas de PLA:PEG contendo AZT. Na figura 22, são ilustrados os espectros dos padrões e das NP obtidas no IV.



**Figura 22.** Espectro de IV das amostras: A)PLA; B)AZT; C)nanopartículas de PLA com AZT; D)PEG; E)nanopartículas de PLA:PEG (1:0,25) com AZT; F) nanopartículas de PLA:PEG (1:1) com AZT ; G)mistura física PLA, PEG e AZT.

O espectro do AZT no IV mostra bandas em 3500-3200  $\text{cm}^{-1}$ , regiões de número de onda associados ao estiramento simétrico e assimétrico de O-H, uma banda em aproximadamente 2102  $\text{cm}^{-1}$  devido ao estiramento do C=N=N=N (grupo azido), outra banda em aproximadamente 1281  $\text{cm}^{-1}$  relativa ao estiramento C-O-C e C-OH.

As absorções características do PLA são três fortes bandas devidas a vibrações do C-CO-O-C. Ou seja, a banda devida ao estiramento do C=O em aproximadamente 1751  $\text{cm}^{-1}$ , a banda devido ao estiramento assimétrico do C-O em aproximadamente 1195  $\text{cm}^{-1}$  e em 1110  $\text{cm}^{-1}$  ao estiramento simétrico C-O-C.

Para o PEG, as absorções características são caracterizadas por uma banda larga e intensa devido aos grupos hidroxila terminais da cadeia do PEG associados por pontes de hidrogênio (3400  $\text{cm}^{-1}$ ), e uma banda intensa em 1110  $\text{cm}^{-1}$  devido ao estiramento assimétrico C-O-C.

Os espectros das substâncias isoladas apresentaram picos de absorção característicos de estiramentos de átomos das moléculas em questão. No espectro da mistura física PLA+PEG+AZT observou-se a sobreposição dos espectros das três substâncias isoladas. Da mesma maneira, os espectros das nanopartículas de PLA e das nanopartículas de PLA:PEG mostraram os mesmos picos de absorção característicos das moléculas isoladas.

A partir desses resultados pode-se admitir que o processo de microencapsulação não favorece nenhum tipo de interação química que descaracterize os polímeros utilizados. Da mesma maneira, o fármaco não sofreu nenhum processo de degradação ou interação química com os polímeros que levasse à modificação ou alteração da sua estrutura química. Esses dados comprovam o sugerido pelo estudo de DSC, de que a ausência da endoterma de fusão do AZT nas nanopartículas não está relacionada a

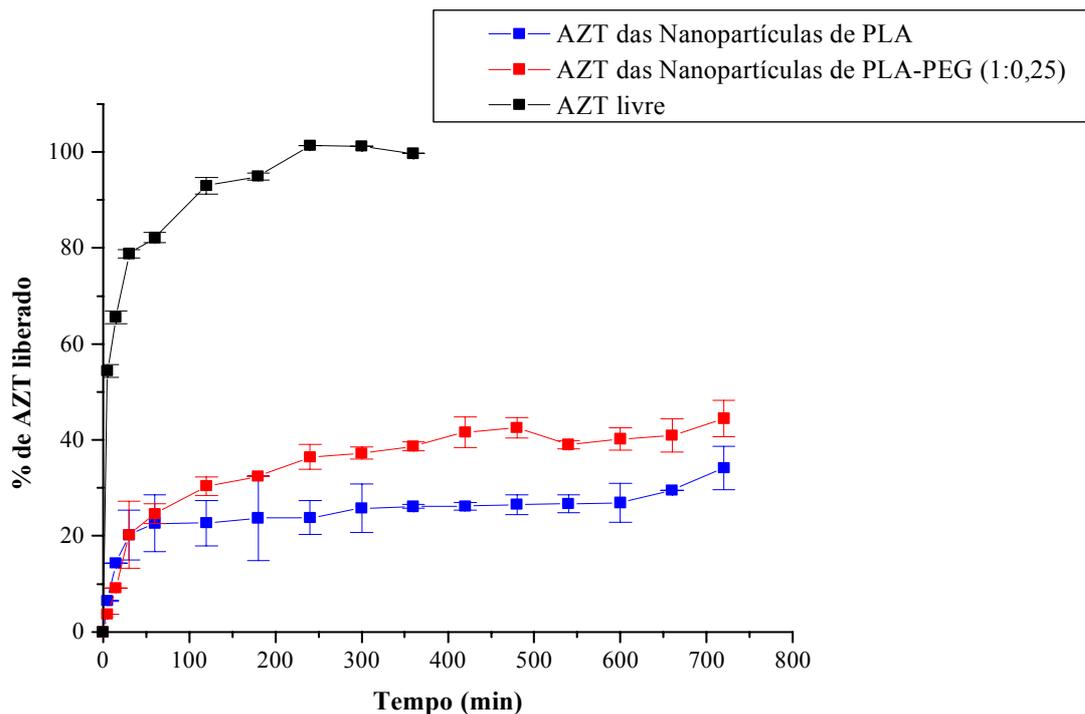
incompatibilidade química ou alterações que modificaram a estrutura química do fármaco.

#### 5.4. ENSAIOS *IN VITRO*

##### 5.4.1. Determinação do perfil de liberação do AZT *in vitro*

Para a realização do ensaio de liberação *in vitro* foi necessária a adaptação do sistema da célula de difusão tipo Franz ao aparelho de dissolução. A agitação constante foi mantida durante todo experimento, para evitar a formação de camada estagnante de fármaco próxima à membrana difusora. Em intervalos de tempos pré-determinados, 100µL de amostra foram coletados e aplicados em aparelho de CLAE. A média dos valores da área do pico obtida foi aplicada na equação da reta da curva padrão em água, a fim de obter-se a quantidade de AZT liberada. Os perfis de liberação das preparações foram determinados pela relação percentual das concentrações de AZT liberadas em função do tempo.

Avaliou-se o perfil de liberação *in vitro* do AZT a partir das diferentes formulações, solução aquosa, nanopartículas de PLA e nanopartículas de PLA-PEG, em que se escolheu a formulação de PLA-PEG que apresentou os melhores resultados farmacotécnicos (PLA:PEG - 1:0,25). Os resultados, após 12h de ensaio estão apresentados na figura 23.



**Figura 23.** Perfil de liberação *in vitro* do AZT a partir de diferentes formulações.

Os resultados do ensaio de liberação demonstraram que houve um pronunciado prolongamento do tempo de liberação do fármaco contido nas nanopartículas em relação ao fármaco livre.

De acordo com o gráfico, pode-se observar que após 1h de ensaio, significativa quantidade de AZT foi liberado das nanopartículas, sendo aproximadamente 22% do total de fármaco liberado das formulações de PLA, o que corresponde a 107,9ng/mL, e aproximadamente 34% de AZT liberado das formulações de PLA-PEG (1:0,25), o que corresponde a 142,7ng/mL. Esse efeito, em que ocorre uma liberação rápida de fármaco no início do experimento, é conhecido como efeito *burst*, está relacionado a uma rápida liberação de fármaco que se encontra na adsorvido na superfície das partículas. A partir do momento que as nanopartículas entram em contato com o meio de liberação, ocorre rapidamente a desorção do fármaco da superfície das partículas e este é liberado no

meio receptor. Após essa rápida liberação inicial, observou-se que a velocidade de liberação do AZT tornou-se mais lenta e prolongada, onde as partículas de PLA-PEG (1:0,25) liberaram uma quantidade maior do fármaco após as 12h de monitoração (~ 44% - 257,8ng/mL) do que as partículas de PLA (~ 34% - 162,8ng/mL). O controle, solução aquosa de AZT, ao final de 2h permeou totalmente a membrana, estando 100% presente no meio receptor.

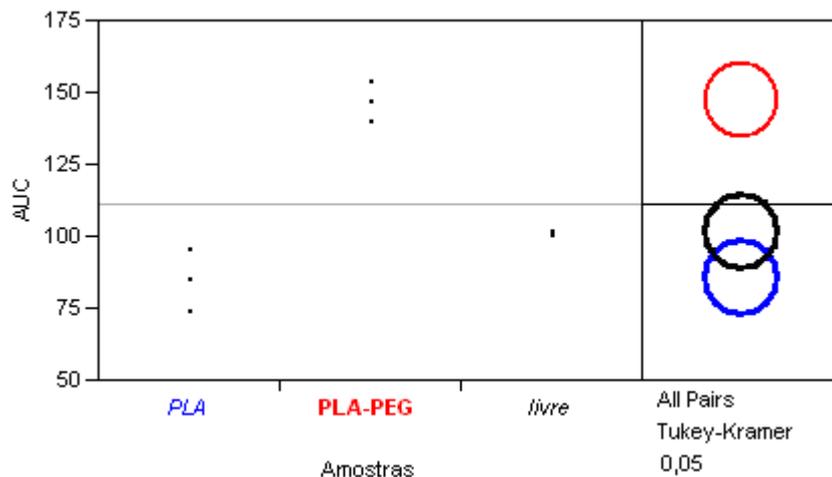
Para comparação dos valores obtidos no ensaio de liberação *in vitro* do AZT a partir das diferentes formulações, foram determinadas as áreas sob a curva (AUC) pelo método dos trapezóides a partir da curva de liberação de cada uma das replicatas das amostras (tabela 10). Essas determinações foram utilizadas no teste de variância ANOVA para comparação do perfil de liberação entre as três diferentes formulações, associada à comparação múltipla entre os resultados (“teste de Tukey-Kramer”) com significância de  $p < 0,05$  (figura 24).

**Tabela 10.** Determinação da AUC do AZT a partir das diferentes amostras submetidas ao ensaio de liberação *in vitro*.

Amostra de AZT	AUC ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}\backslash\text{mL}$ )
Solução	101,78 $\pm$ 0,8
Nanopartículas de PLA	85,51 $\pm$ 10,6
Nanopartículas de PLA-PEG (1:0,25)	147,60 $\pm$ 7,1

n=2

Analisando-se a figura 24 observam-se as AUC de cada uma das duplicatas das amostras de AZT, assim como seus círculos representativos indicando que quanto mais sobrepostos maior é a semelhança entre as amostras.



**Figura 24.** Ilustração da análise de comparação múltipla (teste de Tukey-Kramer) aplicada aos resultados de AUC obtido a partir dos experimentos de liberação de liberação *in vitro* do AZT a partir das seguintes amostras: solução aquosa, nanopartículas de PLA e nanopartículas de PLA-PEG (1:0,25).

De acordo com os resultados, pode-se observar que o maior valor de AUC foi conseguido pelas nanopartículas de PLA-PEG (1:0,25) ( $AUC \approx 147 \mu\text{g} \cdot \text{min} / \text{mL}$ ) seguido pelo fármaco em solução ( $AUC \approx 101,7 \mu\text{g} \cdot \text{min} / \text{mL}$ ) e por fim pelas nanopartículas de PLA ( $AUC \approx 85,5 \mu\text{g} \cdot \text{min} / \text{mL}$ ). Comparando-se as diferentes nanopartículas, pode-se claramente verificar que as nanopartículas de PLA-PEG liberaram uma maior quantidade de fármaco nas 12h de ensaio do que as partículas de PLA. As diferenças foram estatisticamente significativas. Observaram-se valores de AUC semelhantes entre as nanopartículas de PLA e o do fármaco em solução (diferenças estatisticamente não-significativas). Esses valores de forma alguma significam que essas formulações apresentaram semelhante perfil de liberação do fármaco, mas devido ao fato da solução liberar quantidades muito maiores de fármaco e em menores tempos do que as nanopartículas formaram-se trapézios muito altos em um

curto período de tempo (2h), os quais as somas coincidem com a AUC das partículas de PLA que apresentam trapézios menores, mas em tempo bem maior (12h). Fato que pode ser visualizado no gráfico do perfil de liberação *in vitro*. Fez-se análise estatística das AUC de cada intervalo de tempo para essas duas amostras e observou-se diferenças estatísticas a partir do primeiro tempo de coleta (5 min) até a última coleta (12h).

Na determinação do perfil de liberação *in vitro* do AZT, ambas as formulações de nanopartículas, PLA e PLA-PEG (1:0,25), mostraram um prolongamento no tempo de liberação em relação à solução aquosa de AZT. Os resultados foram estatisticamente significantes comparando os valores de AUC das diferentes formulações, onde as nanopartículas de PLA-PEG exibiram maior valor de AUC do que as compostas somente por PLA, indicando uma liberação mais rápida de AZT. O processo de liberação do fármaco a partir da matriz polimérica ocorreu em duas etapas: a etapa inicial que foi caracterizada por uma rápida liberação nos primeiros 60 min e a etapa subsequente que foi caracterizada por uma liberação sustentada do fármaco, devido a difusão deste da matriz para o meio receptor. Os resultados indicaram que a presença do PEG afetou o perfil de liberação do fármaco, onde se observou uma liberação mais rápida de AZT quando este se encontrava veiculado em nanopartículas de PLA-PEG (1:0,25) nas 12h de estudo. As nanopartículas de PLA-PEG também mostraram um maior efeito *burst*, justificável pela presença de AZT inserido entre as cadeias de PEG na superfície das partículas.

As nanopartículas de PLA-PEG apresentaram velocidade de liberação mais rápida devido a diferenças na estrutura interna e externa dessas partículas em relação às nanopartículas de PLA. Analisando a estrutura da superfície das nanopartículas de PLA, obviamente, a natureza menos hidrofílica das cadeias terminais do PLA na superfície das NP restringiu a hidratação inicial da matriz polimérica, resultando em um menor

*burst* e conseqüentemente causando uma liberação mais lenta do fármaco. Já para as partículas de PLA-PEG, a presença do PEG na superfície torna as partículas mais hidrofílicas, apresentando um maior e mais rápido intumescimento, levando a uma liberação mais rápida e mais regular do fármaco.

A presença do PEG na matriz polimérica faz com que se formem poros na matriz polimérica quando em contato com um meio aquoso, facilitando, dessa maneira, a entrada do meio receptor e permitindo a liberação do fármaco (Matsumoto et al, 1999, Gref et al, 2001).

Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores, onde estes verificaram que nanopartículas contendo PEG apresentavam velocidade de liberação mais rápida do fármaco em ensaios *in vitro*. De acordo com Avgoustakis e colaboradores (2002), a velocidade de liberação de cisplatina, um anticancerígeno, a qual também apresentou-se bifásica, foi afetada pela composição das nanopartículas. A diminuição da razão PLGA/PEG aumentou a velocidade de liberação do fármaco. Matsumoto e colaboradores (1999) desenvolveram nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo progesterona, e observaram que razões molares crescentes de PEG na formulação aumentavam gradativamente a velocidade de liberação do fármaco a partir da matriz. Esses autores observaram também que o peso molecular do PEG também interfere na velocidade de liberação, onde o PEG 20kDa liberou 20% a mais do conteúdo do que as partículas compostas por PEG 6kDa. Park e Kim (2004) também verificaram que a presença do PEG confere maior molhabilidade e capacidade de intumescimento às nanopartículas, uma vez que os segmentos hidrofílicos do PEG interagem mais facilmente com a água e favorecem a hidratação das partículas.

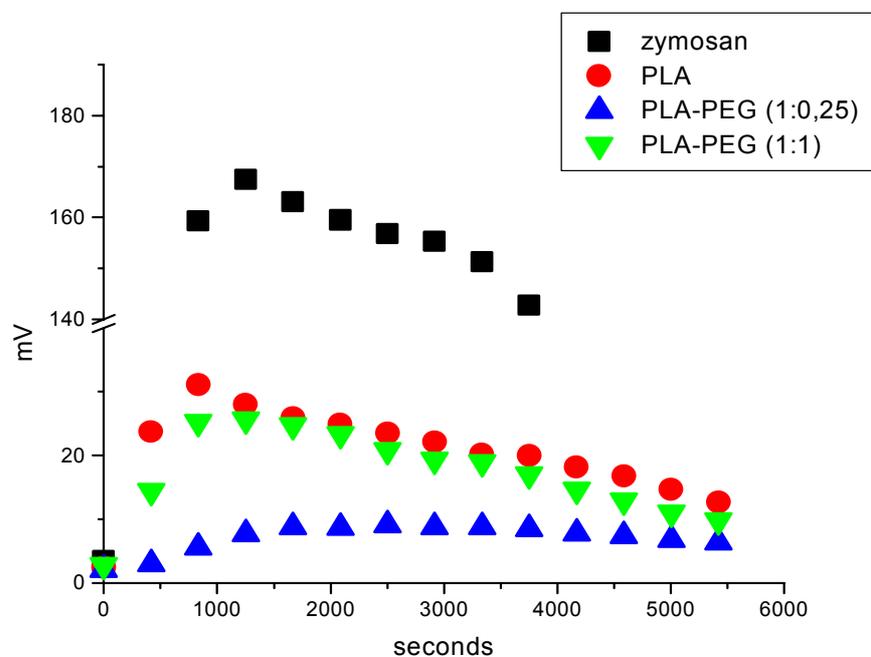
Como todos os experimentos foram conduzidos sob condições *sink*, algumas diferenças observadas são devidas provavelmente a diferenças na estrutura interna das

nanopartículas (compactações, aglomerados, etc). Sob condições *in vivo*, onde o líquido fisiológico é continuamente renovado, novas condições de equilíbrio são estabelecidas, além da presença de sistemas enzimáticos, poderia se esperar que maior quantidade de fármaco fosse liberada (GORNER et al., 1999).

## 5.5. Ensaios de fagocitose *ex vivo* por LPMN

### 5.5.1. Avaliação da fagocitose por LPMN através de quimiluminescência

O ensaio foi realizado com o objetivo de verificar se haveria diferença nos perfis de ativação de células fagocíticas pelas nanopartículas de PLA e de blendas de PLA-PEG. A fagocitose foi monitorada por quimiluminescência dependente do luminol por 90 min, utilizando-se como controle positivo o zymozan, uma substancia altamente estimulante da fagocitose. Os resultados estão apresentados na figura 25 e na tabela 11.



**Figura 25.** Fagocitose das nanopartículas por LPMN monitorada por quimiluminescência.

**Tabela 11.** Intensidade de luz obtida por quimiluminescência das amostras ensaiadas.

<b>Amostra</b>	<b>Intensidade de luz</b>
Zymozan	$7,05 \times 10^5$
Nanopartículas de PLA	$1,17 \times 10^5$
Nanopartículas de PLA-PEG (1:1)	$1,0 \times 10^5$
Nanopartículas de PLA-PEG (1:0,25)	$0,38 \times 10^5$

n=3

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que as nanopartículas compostas por blendas de PLA:PEG foram mais eficazes em limitar a fagocitose por LPMN do que as partículas de PLA. A emissão de luz pelo luminômetro ocorre devido à oxidação do luminol presente no meio reacional, em que essa oxidação ocorre na presença de radicais livres que são gerados pelos LPMN durante a fagocitose. Isso significa que quanto menor a intensidade de luz, menor a fagocitose. Com isso, observa-se que a blenda 1:0,25 foi a que apresentou maior eficiência em evitar a fagocitose. Já para as nanopartículas de PLA, a emissão de luz foi maior, indicando que houve um maior *burst* oxidativo resultante do processo de fagocitose. O controle positivo, zymozan, mostrou maior emissão de luz, indicando maior fagocitose pelos LPMN.

Esses resultados indicam que as blendas de PLA:PEG, principalmente a blenda 1:0,25, estariam formando uma camada hidrofílica protetora na superfície das nanopartículas, tornando-as mais resistentes ao reconhecimento pelos LPMN.

Os sistemas coloidais são geralmente rapidamente removidos da circulação sanguínea pelo SFM, que é composto por células (macrófagos e monócitos). As principais células fagocíticas são as encontradas no fígado (células de Kupffer), no baço e na medula óssea.

Os resultados claramente evidenciaram que as nanopartículas compostas apenas por PLA ativaram de maneira mais eficaz a fagocitose por LPMN. As nanopartículas de

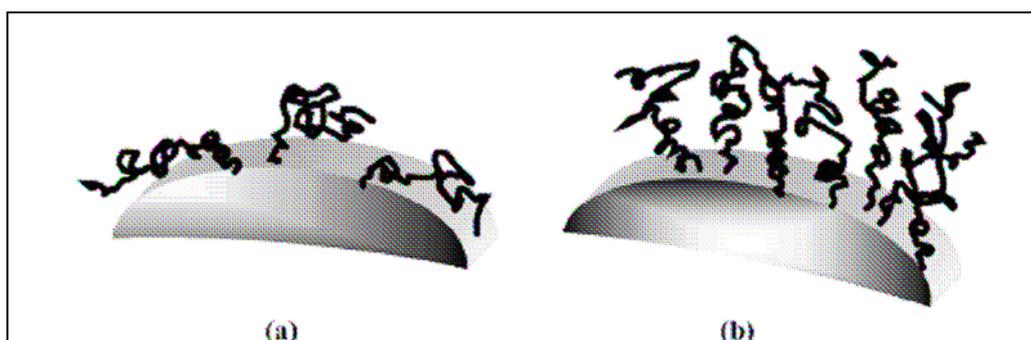
blendas de PLA-PEG exibiram menor emissão luz, indicando que houve menor oxidação do luminol devido ao fato da fagocitose ter ocorrido em pequenas proporções gerando poucas ERO. A blenda mais efetiva em evitar a fagocitose pelos LPMN foi a composta por proporções 1:025 de PLA:PEG, que apresentou menor emissão de fótons pela quimiluminescência. A blenda composta por proporções de 1:1 de PLA:PEG não apresentou-se tão eficaz em evitar a fagocitose, uma vez que os valores de emissão de luz foram bastante próximos aos obtidos com as nanopartículas de PLA. Esse resultado pode ser explicado pelo tipo de conformação que o PEG pode ter assumido na superfície das nanopartículas por estar em alta concentração.

Várias teorias têm sido propostas para explicar a aparente resistência às proteínas e características estéricas de materiais contendo PEG em sua superfície. A mais aceita argumenta que natureza hidrofílica e flexível das cadeias de PEG permite a elas uma conformação mais estendida quando livre em solução. Quando opsoninas e outras proteínas são atraídas à superfície das partículas, elas encontram as cadeias estendidas de PEG e começam a comprimi-las. Essa compressão força as cadeias de PEG a adquirir uma conformação altamente energética e mais condensada. Essa mudança na conformação cria uma força repulsiva que impede a adsorção das proteínas (OWENS e PEPPAS, 2006).

O peso molecular do PEG, a densidade das cadeias na superfície e a conformação adquirida pelas cadeias são fatores críticos para se conseguir propriedades protetoras. Em superfícies com baixa densidade de cobertura, as cadeias de PEG apresentam uma grande motilidade e assumem uma configuração do tipo “cogumelo” (*mushroom*), onde em média as cadeias estariam localizadas próximas à superfície. Essa conformação não é tão efetiva em evitar a fagocitose, pois espaços entre cadeias poderiam ser locais para adsorção de proteínas. Por outro lado, concentrações muito

altas de cadeias de PEG na superfície das partículas restringem a sua movimentação, exibindo frequentemente uma configuração semi-linear ou do tipo “escova” (*brush*). Embora a superfície esteja coberta por inteiro, essa concentração diminui a mobilidade das cadeias de PEG e assim diminui as propriedades de impedimento estérico da cadeia de PEG. Dessa maneira, uma cobertura superficial eficaz seria aquela localizada entre as conformações *mushroom* e *brush*, ou seja, onde a maioria das cadeias esteja em uma configuração ligeiramente constringida, mas presente em concentrações suficientes para garantir que não existam buracos ou espaços na superfície sem cobertura (OWENS e PEPPAS, 2006). A figura 26 ilustra um esquema representativo das conformações citadas do PEG na superfície das nanopartículas.

Acredita-se que a superfície modificada com longas cadeias de PEG resiste à adsorção de proteínas via “estabilização estérica” – a adsorção de proteínas na superfície causaria uma desordenada compressão das cadeias e PEG, então a adsorção é resistida pela energia entrópica de desolvatação das cadeias e havendo uma restrição da liberdade conformacional dessas cadeias de PEG (JEON ET AL., 1991).



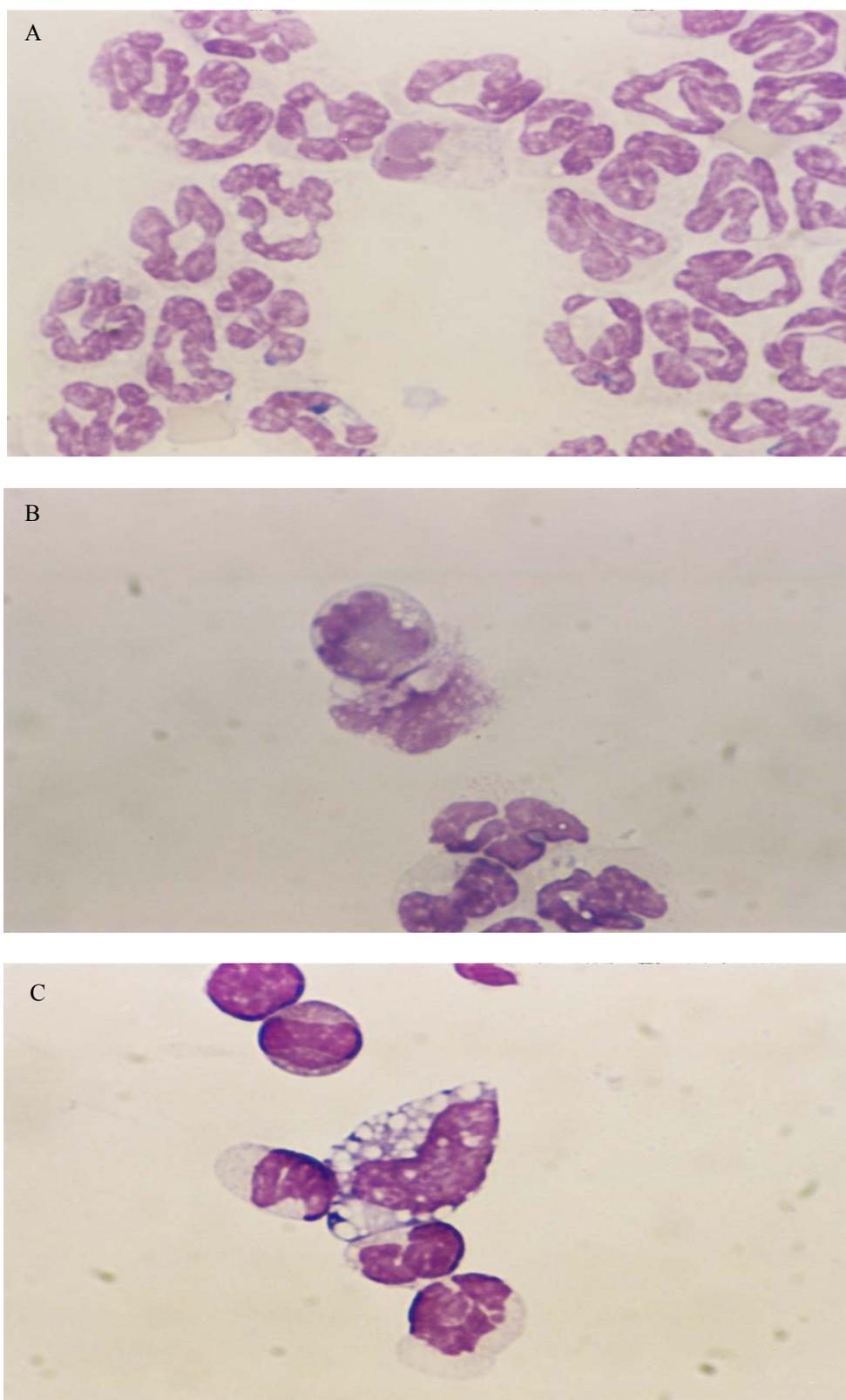
**Figura 26.** Diagrama esquemático da configuração do PEG na superfície da partícula: a) configuração *mushroom* e b) configuração *brush* (adaptado de MOGHIMI e SZEBENI, 2003).

Dessa maneira, o resultado obtido pela blenda PLA-PEG 1:1, pode ser justificado devido ao uso de concentrações muito altas de PEG. A barreira estérica poderia estar prejudicada devido à dificuldade de movimentação das cadeias de PEG na superfície das partículas, resultando então em ineficiência da camada protetora, o que levou a maior fagocitose quando comparada com a blenda contendo menor proporção de PEG (1:0,25). Outros autores já observaram que a densidade de PEG na superfície das partículas aumenta quando o conteúdo de PEG nas nanopartículas é aumentado (DE JAEGHERE et al., 1999; AVGOUSTAKIS et al., 2003).

### **5.5.2. Avaliação da fagocitose por LPMN através de microscopia**

A interação entre as diferentes formulações de nanopartículas (PLA e PLA-PEG 1:0,25) e os LPMN a 37°C foi observada microscopicamente (aumento de 400x). A afinidade relativa das células pelas diferentes partículas foi medida pela contagem do número de células que captaram uma ou mais partículas.

A figura 27 mostra as fotografias obtidas a partir da microscopia e a quantificação da fagocitose das nanopartículas pelos LPMN encontra-se na tabela 12.



**Figura 27.** Imagens microscópicas dos LPMN: A) incubados sem nanopartículas; B) incubados com nanopartículas de PLA-PEG; C) incubados com nanopartículas de PLA.

**Tabela 12.** Valores resultantes da análise quantitativa da fagocitose monitorada por microscopia.

<i>Amostra</i>	<i>Células fagocitantes (%)</i>	<i>Média de partículas fagocitadas/LPMN</i>
Nanopartículas de PLA	51,5 ± 7,5	3,1 ± 0,1
Nanopartículas de PLA-PEG (1:0,25)	19,3 ± 6,1	1,4 ± 0,3

n=3

As fotografias obtidas a partir da microscopia da fagocitose das nanopartículas pelos LPMN mostraram claramente as diferenças no perfil fagocítico entre as duas formulações de nanopartículas. A figura 27-A ilustra os LPMN incubados em tampão PBS na ausência de nanopartículas, onde pode ser verificada a ausência de vacúolos intracelulares, indicando que não houve fagocitose. A figura 27-B ilustra os LPMN na incubados na presença de nanopartículas de PLA-PEG (1:0,25), onde verifica-se a presença de alguns vacúolos intracelulares, indicando que houve ativação de algumas células levando ao processo de fagocitose. E a figura 27-C ilustra os LPMN incubados na presença de nanopartículas de PLA, em que verifica-se a presença de um grande número de vacúolos, indicando que houve um processo fagocítico bem mais intenso. A partir das fotos pode-se claramente afirmar que as nanopartículas de PLA-PEG foram bem mais eficazes em evitar a fagocitose pelos LPMN, indicando que a presença do PEG foi eficiente na formação de uma camada protetora na partícula, tornando-a menos atrativa às células.

A quantificação da fagocitose das nanopartículas pelos LPMN revelou que as nanopartículas de PLA-PEG foram mais eficazes em evitar a fagocitose pelos LPMN, onde houve ativação de um número bem menor de células (cerca de 2,7x menos) em

relação a ativação de células pelas nanopartículas de PLA. Os resultados também mostram que além da capacidade das nanopartículas de PLA em ativar um maior número de células, houve captação de maior número de partículas por célula.

Esses resultados corroboram com o ensaio de fagocitose monitorado por quimiluminescência, comprovando que a formação de nanopartículas compostas por blendas de PLA-PEG (1:0,25) são bastante eficazes no escape da fagocitose e são promissoras como sistema de longa circulação sanguínea.

## 5.6. ENSAIOS *IN VIVO*

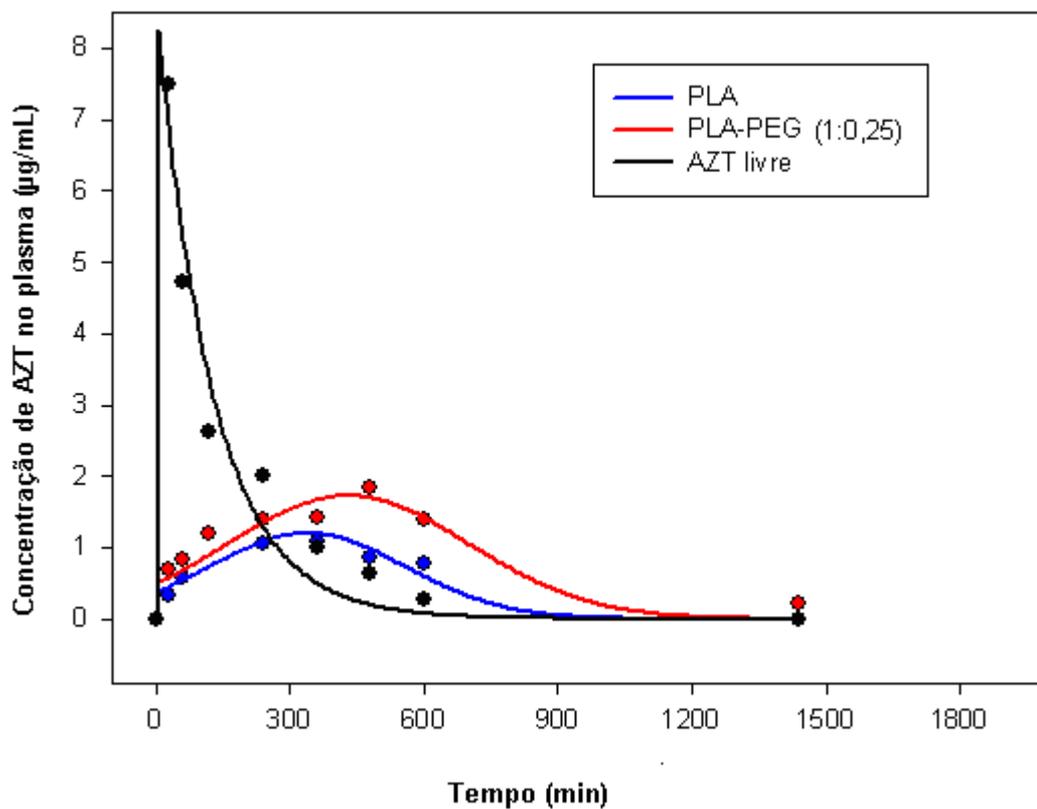
Após a obtenção e caracterização das nanopartículas contendo AZT, procurou-se avaliar *in vivo* o comportamento desse sistema coloidal. A via de administração escolhida foi a intranasal, pois devido aos problemas farmacocinéticos apresentado pelo AZT em formulações entéricas, principalmente relacionados ao metabolismo hepático, resolveu-se estudar uma rota alternativa à oral.

A via intranasal oferece uma série de vantagens quando comparada com outras vias não-parentais, como a oral, pois é facilmente acessível, a quantidade de fluidos na cavidade nasal é baixa, o epitélio nasal apresenta fenestrações e o material absorvido tem acesso direto à circulação sanguínea, evitando, dessa maneira, a primeira passagem hepática (Tobio et al., 1998).

Após ter sido verificado a eficiência das nanopartículas formadas por blendas de PLA-PEG (1:0,25) em diminuir a ativação de LPMN, procurou-se avaliar também, em modelo animal, se após administração intranasal as nanopartículas compostas pelas blendas seriam capazes de se manter por tempo prolongado na circulação sanguínea.

### 5.6.1. Estudo da biodisponibilidade intranasal do AZT contido nas nanopartículas

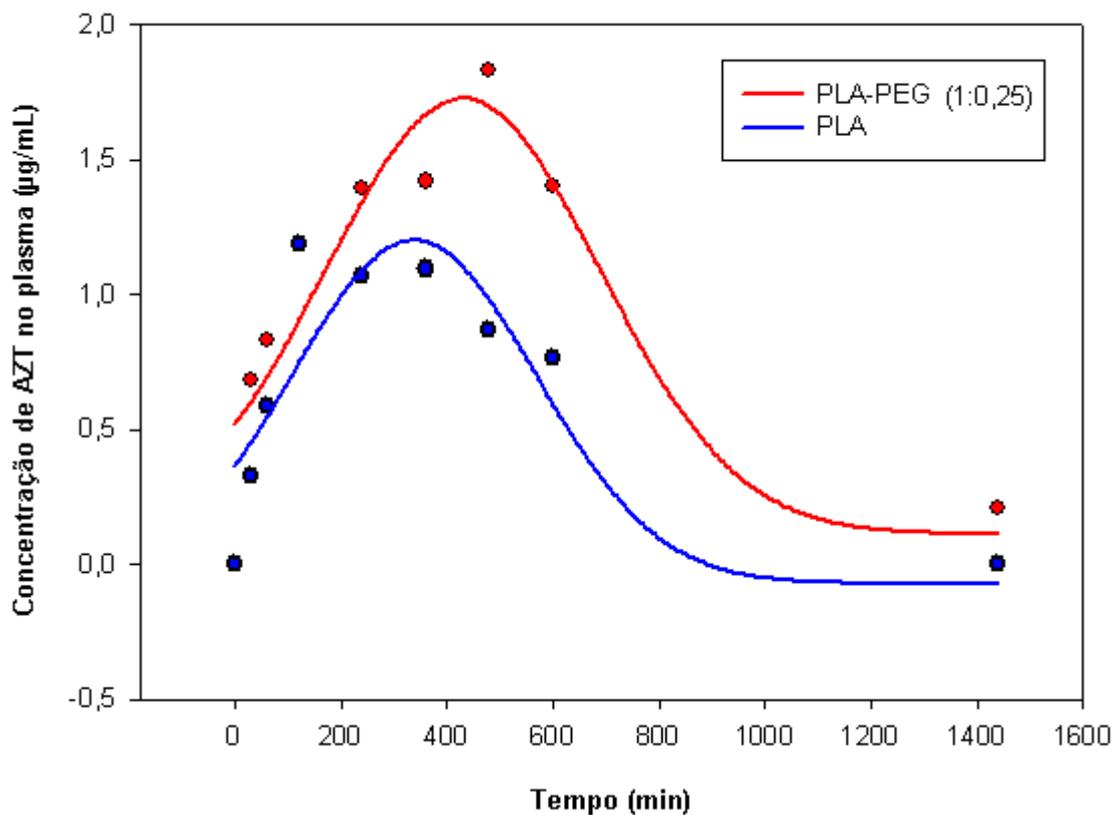
Para a avaliação farmacocinética, uma dose de  $40\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de AZT nas diferentes formulações, foi administrada via intranasal em ratos ( $n=6$ ). Avaliou-se parâmetros farmacocinéticos, como a AUC,  $C_{\text{max}}$  e  $t_{\text{max}}$ , entre as formulações testadas (solução aquosa de AZT, nanopartículas de PLA e nanopartículas de PLA-PEG (1:0,25)). Os resultados estão expressos nas figuras 28 e 29 e na tabela 13.



**Figura 28.** Curva concentração-tempo do AZT a partir das diferentes formulações após administração intranasal.

A figura 28 ilustra a curva concentração *versus* tempo das diferentes formulações contendo AZT. Analisando-se o perfil plasmático do AZT em solução, pode-se observar um efeito *burst* inicial, nos primeiros 30 min após a administração intranasal, onde uma grande quantidade de fármaco foi absorvida ( $\sim 7,5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Já pela curva do AZT das nanopartículas de PLA e PLA-PEG (75:25), nos primeiros 30 min após a administração observa-se absorção de aproximadamente  $0,3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $0,7\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. Observaram-se grandes diferenças entre os perfis do fármaco livre com o contido nas nanopartículas, onde se pode claramente verificar um prolongamento no tempo de permanência do fármaco na circulação sanguínea quando este foi veiculado nas nanopartículas. A concentração plasmática de AZT em solução decaiu abruptamente após 30 min, devido ao seu rápido metabolismo, o qual contribuiu para o seu curto  $t_{1/2}$ .

Na figura 29 (ampliação das curvas PLA e PLA-PEG 1:0,25) pode ser observado a curva concentração *versus* tempo do AZT presente nas formulações de nanopartículas. Os resultados mostram que as nanopartículas de PLA-PEG (1:0,25) sustentaram por mais tempo as concentrações plasmáticas de AZT após a administração intranasal, sendo que este ainda foi detectado após 24h ( $\sim 0,21 \pm 0,08\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), enquanto que com as partículas de PLA, após 24h o AZT não foi mais detectado por CLAE. A tabela 13 ilustra os parâmetros farmacocinéticos após administração intranasal das formulações analisadas.



**Figura 29.** Curva concentração *versus* tempo do AZT a partir das formulações de nanopartículas após administração intranasal.

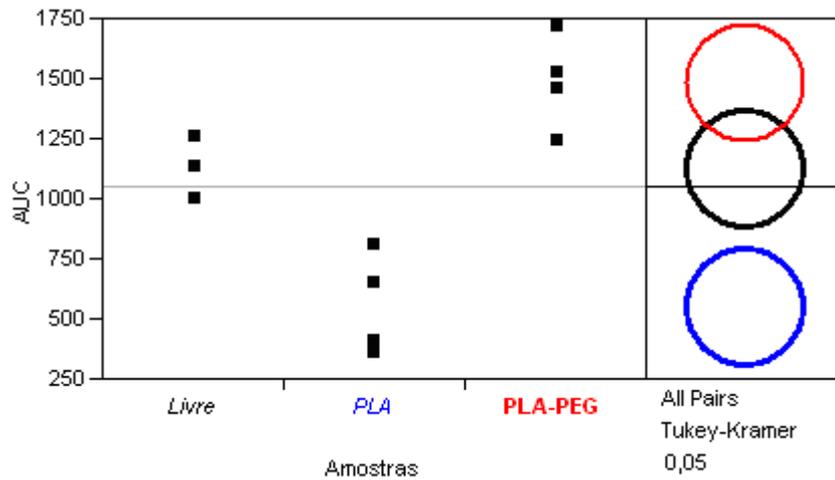
**Tabela 13.** Parâmetros farmacocinéticos do AZT nas diferentes formulações após administração intranasal.

Amostra	AUC ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	$C_{\text{max}}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	$t_{\text{max}}$ (min)
Solução aquosa de AZT	$1126,8 \pm 129,2$	$7,5 \pm 0,3$	30
Nanopartículas de PLA	$552,2 \pm 208,6$	$1,18 \pm 0,9$	240
Nanopartículas de PLA- PEG (1:0,25)	$1482,7 \pm 197,7$	$1,8 \pm 0,8$	480

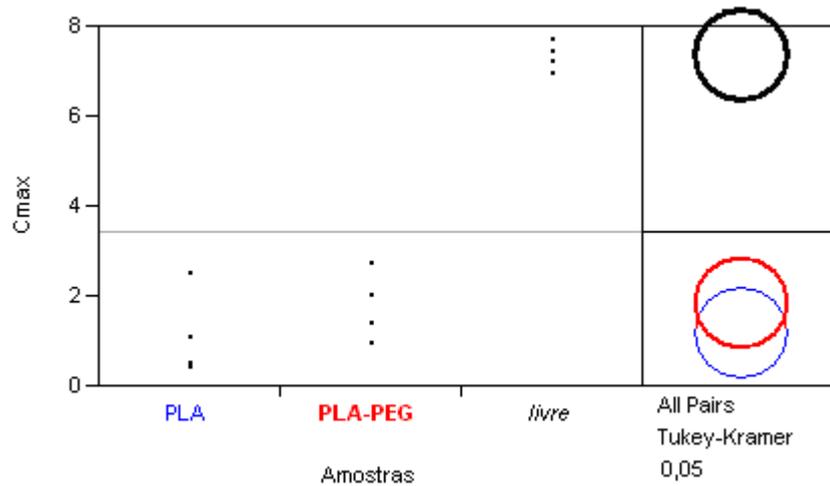
n=6

Os seguintes parâmetros farmacocinéticos foram determinados: tempo de concentração máxima ( $t_{\max}$ ), concentração máxima ( $C_{\max}$ ), e a área sobre a curva concentração *versus* tempo (AUC). A AUC foi calculada pelo método dos trapézios.  $C_{\max}$  e  $t_{\max}$  foram diretamente lidos das curvas concentração *versus* tempo.

Os resultados obtidos mostram grandes diferenças nos parâmetros analisados entre o fármaco livre e o presente nas nanopartículas. O fármaco em solução apresentou o maior  $C_{\max}$  no menor tempo, mas não a maior AUC. Essas diferenças são suportadas pela análise estatística (Fig. 30 e 31), onde mostra diferenças significativas entre as amostras. Comparando-se as diferentes formulações de nanopartículas, observou-se que o AZT das partículas de PLA-PEG apresentou a maior AUC, sendo 2,7 vezes maior que o apresentado a partir das partículas de PLA, indicando uma maior biodisponibilidade do AZT quando este é veiculado pelas partículas formadas pela blenda. A análise estatística revelou diferenças significativas nas AUC para as três diferentes amostras (Fig. 30). Os perfis de absorção do AZT a partir das partículas não foram similares, pois com as nanopartículas de PLA-PEG o fármaco apresentou  $t_{\max}$  em 7h enquanto com as partículas de PLA apresentou  $t_{\max}$  em 4h. Em relação ao  $C_{\max}$ , não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas formulações de nanopartículas, como observado na figura 31.



**Figura 30.** Ilustração da análise de comparação múltipla (teste de Tukey-Kramer) aplicada aos resultados de AUC obtidos a partir dos experimentos de biodisponibilidade do AZT a partir das seguintes amostras: fármaco em solução, nanopartículas de PLA e nanopartículas de PLA-PEG (1:0,25).



**Figura 31.** Ilustração da análise de comparação múltipla (teste de Tukey-Kramer) aplicada aos resultados de  $C_{max}$  obtidos a partir dos experimentos de biodisponibilidade do AZT a partir das seguintes amostras: fármaco em solução, nanopartículas de PLA e nanopartículas de PLA-PEG (1:0,25).

No ensaio *in vivo*, os resultados que relacionam a concentração de AZT no plasma pelo tempo após a administração intranasal indicaram um prolongamento da permanência do AZT na corrente sanguínea quando este foi veiculado em nanopartículas quando comparado com a solução aquosa de AZT. Esse perfil já era esperado, uma vez que na solução aquosa de AZT, este se encontra bem mais disponível para absorção, enquanto que o AZT presente nas nanopartículas deve passar por processos de dissociação da matriz polimérica para então estar disponível para absorção. Comparando-se o perfil concentração *versus* tempo das duas formulações de nanopartículas pode-se observar claramente um prolongamento do tempo de permanência do AZT na corrente sanguínea quando este esteve veiculado nas nanopartículas de PLA-PEG (1:0,25). Indicando que a blenda foi eficiente em produzir nanopartículas com superfície modificada e que resistiu de maneira mais eficaz à fagocitose.

Por evitar a opsonização, nanopartículas contendo PEG podem escapar do SFM, alcançando o objetivo de se obter uma liberação lenta constante do fármaco por períodos estendidos de tempo na circulação sanguínea, aumentando parâmetros farmacocinéticos do fármaco, como a AUC (GREF et al., 1994).

Os dados obtidos no estudo *in vivo* corroboram com os resultados obtidos no ensaio *ex vivo* de fagocitose das nanopartículas por LPMN, em que houve menor tendência de fagocitose de nanopartículas de PLA-PEG (1:0,25) do que por nanopartículas de PLA. Os resultados obtidos pelo ensaio de potencial Zeta também corroboram com os dados obtidos do ensaio *in vivo*, onde as nanopartículas de PLA-PEG exibiram menor valor de potencial de superfície, sugerindo que o PEG estaria depositado na superfície das nanopartículas.

## 6. DISCUSSÃO

Embora a morbidade e a mortalidade dos pacientes com AIDS estejam sendo reduzidas, os tratamentos atuais não erradicam o HIV e nem curam a AIDS. Os fármacos anti-HIV disponíveis na terapêutica apresentam curto  $t_{1/2}$ , baixa biodisponibilidade, baixa penetração e retenção no SNC, além de efeitos colaterais indesejáveis. Esses parâmetros dão aos pesquisadores oportunidade para elaborar e desenvolver novos sistemas de liberação para fármacos anti-retrovirais a fim de vencer as barreiras de transporte e problemas relacionados ao seu metabolismo e eliminação. Sistemas de liberação de fármacos anti-HIV tem sido desenvolvidos para compensar curto tempo de meia-vida/tempo de circulação, aumentar a biodisponibilidade, melhorar penetração e retenção no SNC, e promover liberação prolongada de fármacos nos órgãos e tecidos.

Sendo assim, desenvolveu-se nanopartículas de PLA e de blendas de PLA-PEG contendo AZT, fármaco de escolha no tratamento da AIDS, e avaliou-se a sua biodisponibilidade após administração intranasal.

As nanopartículas de PLA e de blendas de PLA-PEG nas diferentes razões de massa foram obtidas com êxito pela técnica da dupla emulsão-evaporação do solvente. Observou-se diferenças relacionadas a forma geral da apresentação das nanopartículas, como formação de agregados e ausência de homogeneidade de tamanho das partículas, a medida que aumentou-se a proporção de PEG na blenda. A técnica utilizada também permitiu encapsular o AZT com adequada eficiência, pois é eficaz na encapsulação de fármacos com características hidrofílicas, como é o caso do AZT, onde este fica retido na fase aquosa interna, enquanto a fase intermediária da emulsão apresenta característica apolar, o que torna difícil o escape do fármaco para a fase aquosa externa.

A metodologia analítica por CLAE desenvolvida mostrou-se adequada para a quantificação do AZT no plasma de rato, no meio de dissolução do ensaio de liberação *in vitro* e no sobrenadante resultante da separação do fármaco livre do encapsulado.

A farmacopéia americana (USP XXVI) não descreve uma metodologia analítica por CLAE para determinação de AZT em plasma, e por isso foi necessária realização de uma validação para a metodologia desenvolvida.

A validação do método de análise de AZT em plasma por CLAE foi avaliada em termos da seletividade/especificidade, precisão, exatidão e limites de quantificação e detecção. Os resultados indicaram que a metodologia utilizada é segura, os valores obtidos a partir dos parâmetros analisados mostraram-se adequados e condizentes com as resoluções vigentes. Dessa maneira, o método por CLAE desenvolvido e validado pode seguramente ser utilizado para avaliar farmacocinética do AZT em ratos.

Porém, fazer a validação de um método analítico não implica que ele está isento de erros e que pode ser usado indiscriminadamente, mas permite obter informações estatisticamente confiáveis, confirmando que o método está adequado para o uso proposto (BRUCE et al., 1998).

Muitos métodos para a determinação de AZT encontram-se disponíveis na literatura. Este fármaco tem sido bastante estudado sob o ponto de vista farmacológico, sendo que a grande maioria dos trabalhos refere-se à sua determinação em fluidos biológicos, utilizando CLAE (ALMUDARIS et al., 1995; AYMARD et al., 2000; FRIJUS-PLESSEN et al., 1990, KAMALI e RAWLINS, 1990; KUPFERSCHMIDT e SCHMID, 1989; LACROIX et al., 1990; SCHRIVE e PLASSE, 1994; TAN e BOUDINOT, 2000). Dessa maneira, surge a necessidade de se fazer a avaliação de parâmetros referentes à validação, demonstrando assim a viabilidade e a segurança do método.

A CLAE também foi uma técnica importante para a determinação da eficiência de encapsulação do AZT nas nanopartículas de PLA e PLA-PEG. Os resultados também indicaram influência da concentração de PEG na eficiência de encapsulação, em que os melhores resultados foram obtidos com a maior concentração de PEG.

De acordo com a literatura, diversos fatores são capazes de influenciar a quantidade de fármaco associada aos sistemas nanoestruturados, dentre os quais se destacam as características físico-químicas do fármaco (CALVO et al., 1996) o pH do meio (FERNANDÉZ-URRUSUNO et al., 1999), as características da superfície das partículas ou a natureza do polímero (VILA et al., 2002), a quantidade de fármaco adicionada à formulação (BRASSEUR et al., 1991), a ordem de adição do fármaco na formulação, ou seja, antes (incorporação) ou após (incubação) à formação das nanoestruturas (FRESTA et al., 1995), e o tipo de tensoativo adsorvido à superfície polimérica (FONTANA et al., 1998).

Em relação às nanopartículas, diferentes formas de associação do fármaco são descritas, sendo relatado que este pode estar dissolvido ou disperso dentro da matriz polimérica, ou ainda pode estar adsorvido ao polímero (VAUTHLER-HOLTZSCHERER et al., 1991). No entanto, até o momento, não está clara a diferença entre a adsorção do fármaco à matriz polimérica e a sua dispersão molecular na partícula. Segundo Fresta e colaboradores (1995), os fármacos, quando associados pelo processo de incorporação, estariam dissolvidos, dispersos, adsorvidos ou quimicamente ligados à matriz polimérica. Por outro lado, utilizando-se o método de incubação, dependendo da natureza química do fármaco e do polímero, esse poderia estar adsorvido às nanoestruturas (LOPES et al., 2000).

Após a obtenção das nanopartículas e observação da capacidade das mesmas em encapsular o AZT, realizou-se ensaios para observar as principais características físico-

químicas das nanopartículas, tais como, forma geral, determinação do diâmetro médio e verificação da carga de superfície. Os resultados indicaram grande influência da presença de PEG e das diferentes concentrações do mesmo nas propriedades físico-químicas das partículas obtidas.

As partículas obtidas com PLA e as obtidas a partir das blendas com menores proporções de PEG (1:01 e 1:025) apresentaram os melhores resultados relacionados à forma geral esférica das partículas, homogeneidade de forma e ausência de agregados. O aumento da concentração de PEG na blenda levou a resultados menos favoráveis nos requisitos citados, não sendo as partículas obtidas adequadas para serem utilizadas como sistemas de liberação controlada.

A forma geral das nanopartículas pode ser afetada por uma série de fatores, como o peso molecular dos polímeros utilizados, concentração dos mesmos, mas é preferencialmente afetada pela técnica de preparação, e como esperado, partículas obtidas pelas técnicas de emulsificação apresentam-se mais esféricas que aquelas obtidas por outras técnicas de microencapsulação, como a nanoprecipitação, por exemplo. O processo de sonicação leva à formação de gotículas esféricas e com diâmetro bem controlado (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Da mesma maneira que a forma geral das nanopartículas foi influenciada pela presença e concentração de PEG, o diâmetro médio também o foi. O maior índice de polidispersidade foi obtido com as partículas contendo a maior proporção de PEG (1:1), indicando que o aumento da viscosidade da fase aquosa da emulsão resulta em glóbulos maiores devido à resistência à emulsificação.

Vários estudos têm sido desenvolvidos para a avaliação dos principais fatores que afetam o diâmetro das partículas de sistemas nanoestruturados. Geralmente, as nanopartículas, mesmo preparadas através de diferentes métodos, apresentam diâmetros

médios entre 100 e 300nm, no entanto, partículas com diâmetros em torno de 60 a 70nm (GOVENDER et al., 2000) ou mesmo inferiores a 50nm podem ser obtidas (SEIJO et al., 1990). A composição quali-quantitativa e o método de preparação das nanopartículas são fatores determinantes do diâmetro médio e da polidispersão das partículas

A determinação do diâmetro médio e da distribuição de tamanho de partículas é muito importante no processo de desenvolvimento das mesmas e para sua posterior aplicação farmacêutica. A própria definição de partículas coloidais é baseada nas características de tamanho da estrutura. O ideal seria que após a preparação, as nanopartículas apresentassem um perfil monomodal de distribuição, ou seja, somente uma população de partículas (em relação ao tamanho), e um baixo índice de polidispersidade. A homogeneidade de tamanho em uma formulação é um indicativo de estabilidade e de que alguns comportamentos do sistema, tais como tendência a agregação das partículas ou sedimentação das partículas em função do tempo, possam ser previstos com mais segurança. Além do mais, o tamanho e a distribuição de tamanho das partículas afetam o perfil de liberação do fármaco a partir do sistema nanoestruturado, como também o comportamento *in vivo* do sistema após a administração. Nesse sentido, o tamanho das partículas pode, por exemplo, modular os mecanismos de captura por macrófagos, influenciando, dessa maneira, na estabilidade biológica do sistema e alterando o comportamento de biodistribuição das nanopartículas.

É importante mencionar que a tendência à agregação e sedimentação das nanopartículas dispersas, em função do tempo, pode ser monitorada pela determinação de mudanças na distribuição de tamanho de partículas.

Outro parâmetro que deve ser analisado no desenvolvimento de nanopartículas é o valor do potencial de superfície, que apresenta grande influência na interação das partículas com componentes celulares. O ensaio de determinação do potencial Zeta das nanopartículas foi realizado com objetivo de verificar se o PEG adicionado à formulação teria capacidade de alterar a carga superficial das nanopartículas. A determinação do potencial Zeta é um importante parâmetro para analisar a estabilidade físico-química da dispersão de nanopartículas. Altos valores de potencial Zeta indicam alta carga elétrica na superfície das nanopartículas, as quais mantêm fortes forças repelentes entre partículas de maneira a prevenir agregação das mesmas (MU e FENG, 2002).

As medidas de potencial Zeta foram determinadas pela mobilidade eletroforéticas das nanopartículas, e observou-se que a presença do PEG na formulação, mesmo sendo na forma de uma mistura física e não por formação de copolímero, alterou o valor de potencial de superfície das partículas, resultando em partículas com propriedade de superfície modificada em relação às nanopartículas de PLA.

A influência da carga superficial de nanopartículas na capacidade destas sofrerem fagocitose foi descrita em vários estudos. A adsorção de proteínas plasmáticas ocorre devido a interações entre a proteína e a superfície da partícula, em que a carga superficial interfere nessa interação. Partículas carregadas negativamente ou positivamente são capazes de sofrer interações com proteínas plasmáticas por atração iônica, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals. A superfície das proteínas plasmáticas é bastante heterogênea, sendo capaz de expor grupos positivos e negativos capazes de formar pontes de hidrogênio tão bem quanto interações hidrofóbicas (CLAESSON et al., 1995).

Alguns trabalhos demonstraram que partículas compostas por PLA, que apresentaram valor de potencial Zeta entre -20 e -76mV, descreveram um aumento na captação por macrófagos com o aumento no valor do potencial, fato também observado com lipossomas. De acordo com Tabata e colaboradores (1990), esse fato ocorre devido a uma maior participação das forças de Van der Waals no processo de interação macrófago-partícula, Wilhelm (2003) explica esse fato pela alta afinidade das partículas aniônicas pela membrana celular, levando então à internalização.

A adesão celular e a fagocitose são dependentes da energia livre de superfície. Em estudos de Tabata e colaboradores (1990), a medida da hidrofobicidade de muitas partículas e a mudança na energia livre durante o processo de fagocitose, mostrou que estas variáveis poderiam estar relacionadas. A fagocitose aumentou com o aumento da variação da energia livre negativa. Assim, o processo de engolfamento na fagocitose seria essencialmente relacionado aos efeitos de energia livre interfacial. Uma relação positiva entre a energia livre e o potencial de superfície também foi verificado, em que observou-se um aumento da fagocitose com o aumento no potencial Zeta negativo. Sugerindo-se então a participação de forças eletrostáticas na interação entre macrófagos e a superfície das partículas.

Os fosfolipídeos (lecitinas), os poloxamers (copolímeros dos óxidos de etileno e de propileno) e os polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial Zeta. Especialmente os poliésteres, como o PLA, e as lecitinas fornecem um potencial negativo à interface, enquanto que, os poloxamers (tensoativos não-iônicos) tendem a reduzir o valor absoluto deste parâmetro (LEGRAND et al.,1999).

A técnica de preparação das nanopartículas também afeta a orientação dos segmentos hidrofóbicos de PLA e hidrofílicos de PEG. Pelas técnicas de emulsificação

a maioria dos segmentos de PEG são, logicamente, orientados através da fase aquosa externa (VILA et al., 2004). O propósito dessas cadeias de PEG é criar uma camada que bloqueia a adesão de opsoninas presentes no sangue, tornando essas partículas “camufladas” ou “invisíveis” para as células fagocíticas (OWENS e Peppas, 2006). Ensaios utilizando microscopia eletrônica de transmissão com criofratura demonstraram visualmente a capacidade de nanopartículas contendo PEG em rejeitar a adsorção de proteínas do plasma (PERACCHIA et al., 1999). A barreira estérica hidratada de PEG influencia tanto a quantidade quanto a qualidade de componentes plasmáticos adsorvidos, prejudicando assim a interação das nanopartículas com as células fagocíticas (RILEY et al., 2001).

Dessa maneira, verifica-se que a carga superficial das partículas pode influenciar de maneira significativa a estabilidade das partículas em suspensão através da repulsão eletrostática entre as partículas. É também um fator importante para determinar a interação *in vivo* das partículas com as membranas celulares, as quais são geralmente negativamente carregadas. E por fim, a partir da determinação do potencial Zeta pode-se conhecer o componente dominante da superfície da partícula (DONG e FENG, 2004).

O estudo de DSC das nanopartículas foi realizado e observou-se que o fármaco encontra-se disperso molecularmente na matriz polimérica, dados estes que corroboram com os estudos no infravermelho que mostram ausência de modificações na estrutura química do AZT após o processo de microencapsulação.

O desenvolvimento de novas formas farmacêuticas é facilitado pelo uso de métodos térmicos de caracterização com aplicação direta ao controle de qualidade. A análise térmica refere-se a um grupo de técnicas nas quais as propriedades físicas da substância e/ou de seus produtos de reação são medidas em função da temperatura na qual são submetidas (WENDLANT, 1986). Conseqüentemente, a temperatura e a

energia associada com eventos tais como fusão, reações de oxidação e redução, transição vítrea, sublimação, decomposição, cristalização ou transição gel-cristais líquidos podem ser avaliadas.

Em se tratando de polímeros, estes, em função da temperatura, podem sofrer mudança de estado que alteram as suas propriedades físico-mecânicas. As transições mais importantes no estudo de comportamento polímeros são a de fusão cristalina, transição vítrea e decomposição. Todos esses eventos podem ser visualizados no DSC (SIMAL, 2002).

Abaixo da temperatura de transição vítrea, os polímeros se comportam de maneira rígida, ou seja, não apresentam energia suficiente para permitir deslocamento de uma cadeia em relação à outra por mudanças conformacionais. Acima da temperatura de transição vítrea, ocorre uma mudança acentuada nas propriedades mecânicas do polímero, onde as cadeias poliméricas sofrem rotação e movimentos difusionais. É a mobilidade de uma cadeia polimérica que determina as características do produto final. Esse efeito é importante para se obter informações à respeito de que efeitos ocorrem quando do armazenamento do produto final em temperaturas elevadas (CANEVAROLO, 2002).

Após a realização das caracterizações físico-químicas das nanopartículas, procedeu-se a realização do ensaio de dissolução *in vitro* para avaliar o perfil de liberação do AZT a partir das diferentes matrizes poliméricas, PLA e PLA-PEG. OS resultados indicaram que a liberação do AZT a partir das nanopartículas de PLA-PEG foi mais rápida, resultado perfeitamente justificável devido à uma melhor molhabilidade das partículas pela característica hidrofílica do PEG, tornando a matriz polimérica mais porosa quando em contato com o meio de liberação.

A avaliação do perfil de liberação de um fármaco *in vitro*, é um requisito muito importante no conjunto de avaliações de um sistema de liberação controlada. A partir desse perfil pode-se supor como o sistema vai se comportar *in vivo*. Segundo Soppimath e colaboradores (2001), a liberação dos fármacos a partir de sistemas nanoparticulados poliméricos depende de diferentes fatores: a) da dessorção do fármaco da superfície das partículas; b) da difusão do fármaco através da matriz das nanoesferas; c) da difusão através da parede polimérica das nanocápsulas; d) da erosão da matriz polimérica ou e) da combinação dos processos de difusão e erosão.

Observando o perfil de liberação do AZT a partir das nanopartículas, pode-se concluir que durante o tempo de estudo da cinética de liberação (12h), o principal mecanismo envolvido na liberação foi a difusão do fármaco através da matriz polimérica. Devido ao curto tempo de estudo da liberação não seria adequada a aplicação de um modelo de cinética, como por exemplo, o modelo de Higuchi. Este modelo somente concorda com dados experimentais após um período de pelo menos seis dias, indicando que no estágio anterior a este o processo seria controlado puramente por difusão, e o efeito da degradação do PLA ainda não estaria evidente (MONTANARI et al., 2003). Desde que a degradação do PLA é lenta, a liberação do fármaco no período de tempo estudado dependeria principalmente da sua difusão. Em tal caso, o tamanho, dureza e porosidade das nanopartículas apresentam efeitos significativos nas propriedades de liberação (MU e FENG, 2002).

Já é bem conhecido e discutido o porquê de que partículas coloidais convencionais são rapidamente eliminadas da corrente sanguínea. O conceito de modificação superficial de carreadores particulados, desenvolvido nos últimos 17 anos para controlar processos de opsonização, interações específicas e não-específicas da partícula com o SFM, trouxe várias questões a respeito de quais seriam as propriedades

ótimas de superfície de um sistema carreador (STOLNIK et al., 1995). Essas propriedades seriam modificadas pela adsorção ou ligação covalente de um polímero hidrofílico na superfície coloidal. Além disso, carga superficial, tamanho, hidrofília e a conformação das cadeias do polímero que compõe a partícula seriam outros importantes fatores que influenciariam a interação da partícula com o sistema biológico.

A fagocitose consiste em um mecanismo normal do sistema imunológico em resposta à materiais estranhos, microorganismos patogênicos e ao câncer. É um processo ativo realizado por células especializadas que especificamente ou inespecificamente reconhecem e eliminam o antígeno. O processo de fagocitose é mediado pela opsonização, e o complemento sérico é o maior componente do sistema de opsoninas. O sistema complemento, o qual é essencial no reconhecimento de agentes patogênicos, é composto por aproximadamente 30 proteínas presentes no plasma ou como receptores na superfície de muitas células. A ativação do complemento leva a produção de anafilatoxinas que são potentes ativadoras das células fagocíticas (VITTAZ et al., 1997).

A fagocitose é um processo complexo que envolve várias etapas, tais como a quimiotaxia humoral e celular; reconhecimento do corpo estranho; engolfamento; e digestão do corpo estranho (HAMPTON et al, 1998). Os LPMN, principalmente os neutrófilos, fagocitam e destroem microorganismos invasores e, desta maneira, desempenham um importante papel nos mecanismos de defesa do organismo em todos os níveis tissulares (CHAPPLE, 1997). Para exercer a sua função, os LPMN devem migrar para o sítio da infecção induzidos por sinais químicos específicos, reconhecer, fagocitar e finalmente destruir o patógeno invasor. Sua atividade microbicida é um processo dinâmico que requer energia. As alterações metabólicas associadas com a ação microbicida dos LPMN são referidas como explosão ou *burst* oxidativo ou respiratório

(BABIOR, 1984). Ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio durante a fagocitose através da ativação do complexo nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzida oxidase (NADPH). Os radicais liberados do oxigênio são capazes de oxidar membranas celulares e também de formar pontes dissulfeto entre os aminoácidos cisteína de diversas proteínas estruturais levando à morte celular (MOTTA JUNIOR, 2004).

O zymosan é composto por fragmentos da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que em contato com soro são reconhecidos e fagocitados pelos neutrófilos. O zymosan ativa a via alternativa do complemento ocorrendo sua opsonização pelas frações C3b e C3bi. A ativação do *burst* oxidativo ocorre devido à presença de receptores para as frações C3b (CR1) e C3bi (CR3) nos neutrófilos. O zymozan gera uma forte resposta na quimiluminescência dependente luminol, devido a grande produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no fagolisossoma (LEHNMEYER et al, 1979). A interação do zymozan com o receptor libera ácido araquidônico, pela ação da fosfolipase A<sub>2</sub>, havendo ativação a NADPH – oxidase (WALSH et al, 1981).

Quimiluminescência é o processo de emissão de luz que advém de uma reação química. Tal reação produz energia em quantidade suficiente que leva a formação de uma fração de moléculas no estado eletronicamente excitado. Quando o sistema passa do estado fundamental para o estado excitado, com manutenção de spin, o retorno do mesmo para o estado fundamental, parte da energia é liberada na forma de luz, sendo esse processo chamado de fluorescência. No caso em que a excitação do sistema ocorrer com inversão de spin, o retorno para o estado fundamental leva a emissão de luz, processo chamado de fosforescência (DODEIGNE et al, 2000).

O estudo da quimiluminescência celular gerada pelo processo fagocítico teve seu início com o trabalho pioneiro de Allen et al, em 1972, que observaram a emissão de luz nativa gerada no processo de fagocitose de bactérias opsonizadas por LPMN. Essa quimiluminescência é devida a ativação do sistema NADPH oxidase onde há a formação das ERO. A luz nativa observada por Allen, seria devida a oxidação de biomoléculas pelas ERO com geração de produtos no estado eletronicamente excitado e que emitem luz. O maior problema na detecção e estudo da quimiluminescência nativa está no fato de ser necessário uma grande quantidade de neutrófilos nos experimentos o que dificulta a investigação destes eventos. No período de 1976 a 1978, várias tentativas foram feitas para encontrar compostos exógenos capazes de aumentar a intensidade de luz emitida, agindo assim como sondas quimiluminescentes. O primeiro trabalho utilizando o luminol como sonda quimiluminescente, freqüentemente denominada quimiluminescência dependente de luminol, mostrou um aumento na quimiluminescência da ordem de 1000 vezes, quando comparado com a quimiluminescência nativa (ALLEN e LOOSE, 1976).

A oxidação do luminol em meio aquoso, gerando quimiluminescência, pode ser obtida por várias ERO (peróxido de hidrogênio, radical ânion superóxido, ácido hipocloroso e oxigênio singlete), em especial na presença de catalisadores como mieloperoxidase. A mieloperoxidase é uma enzima presente nos LPMN. Fagócitos estimulados geram o ânion radical superóxido no meio, e este, leva a formação de outras ERO como radical hidroxil, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete. Todas essas espécies são oxidantes do luminol, com conseqüente emissão de luz.

A partir de todo esse embasamento teórico, torna-se evidente que o uso da quimiluminescência dependente do luminol é uma técnica bastante interessante para monitorar a eficiência das nanopartículas em ativar ou não a fagocitose por LPMN. Essa

técnica também mostra-se interessante pois não há a necessidade de se incorporar às partículas substâncias fluorescentes ou radioativas, as quais poderiam alterar a superfície das nanopartículas.

Os resultados do ensaio de fagocitose *ex vivo* das nanopartículas de PLA e PLA-PEG demonstraram que a formação de blenda foi eficaz em evitar a captação pelos LPMN, indicando efetividade na modificação de superfície com o PEG. Além do mais, observou-se que a conformação deste também influenciou no processo de captação, onde a blenda com menor proporção de PEG foi mais efetiva em evitar a captação por apresentar uma melhor conformação das cadeias.

Gref e colaboradores (2000) mostraram também em ensaios *ex vivo* que nanopartículas formadas por blendas de PLA-PEG apresentavam menor adsorção de proteínas plasmáticas quando comparadas com nanopartículas de PLA. Esses autores sugerem que todo o PEG utilizado na blenda concentra-se na superfície das partículas, e que o comprimento das cadeias e a densidade de PEG na superfície são os fatores que influenciam na adsorção de opsoninas plasmáticas. Esses autores observaram também que a eficiência da camada de PEG em evitar a opsonização alcançou um limite, onde acima de 5% de PEG não se observou mais aumento da eficácia, mesmo aumentando-se as concentrações de PEG.

Assim, já está bem estabelecido que com mudanças apropriadas em algumas propriedades físico-químicas de nanopartículas poliméricas, tais como tamanho e superfície, torna-se possível modular seus parâmetros de biodisponibilidade. No desenvolvimento de um sistema coloidal para liberação de fármacos, os quais permitam uma biodistribuição mais ampla e que possam alcançar alvos em partículas, diferente das células do SFM, é necessário evitar a remoção das nanopartículas do sangue pelas células de Kupfer ou outras populações de células pertencentes ao SFM. No caso de

carreadores poliméricos de fármacos, para a prevenção da remoção das partículas do sangue sugere-se o desenvolvimento de partículas com tamanho bastante reduzido ou a modificação da superfície com polímeros hidrofílicos evitando a adsorção de opsoninas na superfície das partículas as quais as fazem serem reconhecidas por macrófagos do SFM (GREF et al., 1994).

Os ensaios *in vivo* corroboram perfeitamente com os ensaios *ex vivo* indicando que a blenda PLA-PEG foi eficaz em formar nanopartículas com superfície modificada e com propriedades de maior tempo de circulação sanguínea. A presença do PEG na formulação alterou todos os parâmetros farmacocinéticos avaliados após administração intranasal.

Na literatura, diversos estudos já comprovaram a eficácia do PEG em produzir nanopartículas com longo tempo de circulação sanguínea. O PEG deposita-se na superfície das nanopartículas expondo suas cadeias hidrofílicas, as quais servem como barreira estérica para as células do SFM, o qual é o principal responsável pela eliminação das partículas do sangue. Dessa maneira, as partículas tornam-se “invisíveis” ao sistema fagocitário e o conteúdo das mesmas é gradativamente liberado. Já as partículas de PLA na ausência de PEG tornam-se vulneráveis à opsonização e posterior ataque pelas células do SFM e permanecem por tempo menor na circulação, com conseqüente diminuição na concentração plasmática. A modificação da superfície de partículas é buscada com o objetivo de obter liberação do fármaco em locais específicos, devido à possibilidade da barreira estérica de influenciar a biodistribuição das partículas tornando-as com potencial de direcionamento tecidual.

A opsonização das partículas administradas encontra-se diretamente dependente da polaridade da superfície das partículas, em que quanto mais hidrofóbica esta for, maior será a extensão da opsonização. Como proposto por Allen e colaboradores, a mais

de uma década, “se desejas ser invisível, sejas como a água”. Essa explanação mostra que a capacidade das nanopartículas em sofrer opsonização e posterior fagocitose depende também da polaridade da superfície da partícula. Estudos indicam que alto nível de adsorção protéica ocorre, principalmente, devido a atrações hidrofóbicas existente entre a proteína e a superfície, que ocorreriam mais em superfícies hidrofóbicas que nas hidrofílicas (JEONG et al., 1991). Assim a introdução de cadeias de polímero hidrofílico na superfície das nanopartículas, como agente de cobertura, é um processo interessante para tornar a superfície mais hidrofílica e reduzir as interações hidrofóbicas. Além do mais, de acordo com certos autores, se o material apresenta uma superfície bastante hidrofóbica ou carga superficial negativa, a interação com os macrófagos pode ser direta. Essa teoria foi confirmada por Chen et al (1997), que descreveram que de acordo com critérios de molhabilidade, ocorre uma fagocitose facilitada quando as nanopartículas são mais hidrofóbicas que as células.

A formação de partículas com tempo de circulação estendido a partir de blendas de poliésteres com PEG tem recente aplicação. O processo de obtenção por síntese de um copolímero PLA-PEG é um processo complicado e oneroso, em que se requer uma série de etapas sintéticas e processos de purificação. Além do mais, no processo de síntese de muitos polímeros biodegradáveis, utilizam-se catalisadores para ativar as reações. Para aplicações biomédicas de polímeros, onde estes vão estar em contato com o organismo, uma pequena quantidade remanescente desses catalisadores pode causar uma série de complicações no meio biológico (KIM et al., 1999). Dessa maneira, a obtenção das partículas de PLA-PEG a partir de blendas tem se mostrado econômica, conveniente e eficaz, sendo então um recurso adotado para obter sistemas com propriedades estéricas desejadas (BROZ et al., 2003). Gref e colaboradores (2000) preparam nanopartículas a partir de blendas de PLA-PEG e investigaram os efeitos de

diferentes razões molares dos polímeros nas propriedades físico-químicas e farmacêuticas das partículas.

O PEG é amplamente utilizado para cobrir a superfície de partículas com o objetivo de se obter propriedades estéricas eficazes para permitir maior tempo de circulação sanguínea. As porções terminais das cadeias de PEG podem estar adsorvidas ou ligadas na superfície da partícula, formando uma espécie de “nuvem conformacional”, a qual é bastante hidrofílica e flexível. Essa camada formada funciona como uma barreira protetora efetiva para inibir a opsonização.

As partículas cobertas com PEG podem ser obtidas pela adsorção física do PEG, ou dos seus derivados na superfície das partículas. As partículas também podem ser diretamente preparadas a partir de blocos de copolímeros, PEG-R, em R pode ser um bloco hidrofóbico, como o PLA e PLGA, ou também podem ser obtidas a partir de blendas de poliésteres biodegradáveis com outros polímeros contendo PEG (DONG e FENG, 2004).

Como os avanços tecnológicos caminham no sentido de melhorar a meia-vida plasmática e a biodistribuição de nanopartículas administrada pela via intravenosa, é interessante também se explorar o potencial desses carreadores coloidais de fármacos por outras vias, como a via intranasal. Nesse sentido, é surpreendente que, embora seja geralmente aceito que partículas hidrofóbicas são transportadas através da mucosa intestinal mais facilmente do que partículas hidrofílicas, pouco é conhecido sobre os requisitos das partículas para vencer a mucosa nasal (TOBIO et al., 1998).

O transporte de partículas através da superfície de mucosas tem sido extensivamente estudado nos últimos anos. Uma conclusão desses estudos é que o tamanho das partículas é um fator crítico que afeta muito a interação e transporte através da mucosa, e que em geral, partículas menores que 1 $\mu$ m são mais eficientes em permear

as barreiras da mucosa (JUNG et al., 2000). Além do tamanho da partícula, a composição da superfície das mesmas, e também a sua carga superficial e hidrofília são fatores que se sabe que influenciam a interação de nanopartículas com o meio biológico. Nesta área Vila e colaboradores (2004) verificaram que a presença da cobertura de PEG na superfície das nanopartículas aumentou a sua estabilidade quando em contato com os fluidos da mucosa nasal, e conseqüentemente melhorou a habilidade dessas nanopartículas em permear a mucosa nasal.

A pesquisa a respeito da utilização de sistemas de liberação controlada pela via intranasal está em grande avanço. Principalmente, no uso de polímeros biodegradáveis que apresentem propriedades bioadesivas à mucosa nasal, como é o caso do PEG. A cavidade nasal apresenta ampla área superficial e é altamente vascularizada, em que os fármacos absorvidos evitam o metabolismo hepático, sendo uma via bastante interessante para fármacos que sofrem extenso metabolismo de primeira passagem, como é o caso do AZT.

A resolução de problemas relacionados às formulações convencionais está na atualidade nas mãos da busca por sistemas carreadores diferenciados e com propriedades especiais. As nanopartículas poliméricas apresentam características muito interessantes e peculiares, que fazem das quais os sistemas coloidais mais pesquisados e com maior potencial. A escolha do AZT como fármaco-modelo para novos sistemas é bastante pertinente, devido á grande demanda por esse fármaco e por seus graves efeitos colaterais. Este trabalho propôs o desenvolvimento de dois tipos diferentes de nanopartículas contendo AZT: partículas com a superfície modificada que apresentassem longo tempo de circulação sanguínea e partículas convencionais que sofressem rápida captação por células do SFM. O objetivo não foi destacar qual tipo de formulação seria a mais interessante para o AZT, pois na verdade, as duas o são, uma

vez que as nanopartículas de PLA ao sofrerem fagocitose se acumulam nos macrófagos que são células altamente infectadas pelo vírus HIV, mas da mesma maneira o uso de nanopartículas de longa circulação contendo AZT também é interessante devido ao fato de ocorrer liberação do fármaco em outros sítios que também representem reservatórios do HIV. Na realidade, este trabalho mostrou que o uso de blendas poliméricas, ou seja, misturas físicas entre polímeros, são capazes de alterar propriedades físico-químicas das partículas e principalmente as propriedades biológicas. O uso da via intranasal também foi de grande relevância neste trabalho, uma vez que se mostrou adequada para a absorção das nanopartículas.

## 7. CONCLUSÕES

As nanopartículas de PLA e de blendas de PLA:PEG com diferentes razões de massa foram obtidas com êxito pela técnica de dupla emulsão-evaporação do solvente, tanto na presença quanto na ausência de fármaco. Essa técnica permitiu encapsular o AZT com adequada eficiência (em média 48%), pois é eficaz para a encapsulação de fármacos com características hidrofílicas, como é o caso do AZT.

As análises físico-químicas mostraram que as nanopartículas obtidas apresentaram forma praticamente esférica e diâmetro entre 265 e 374nm, em que as melhores características morfológicas entre as nanopartículas de PLA-PEG foram obtidas com as blendas com 1:0,1 e 1:0,25. As medidas de potencial Zeta sugerem que o PEG encontra-se disposto na superfície das nanopartículas.

Os estudos de DSC sugerem que o AZT encontra-se em um estado físico de dispersão molecular amorfa na matriz polimérica, e os estudos na região do infravermelho sugerem que o processo de microencapsulação não gerou nenhuma incompatibilidade polímero-polímero ou fármaco-polímero.

Os ensaios de liberação *in vitro* indicaram que as nanopartículas são capazes de prolongar a liberação do fármaco, e que o PEG influencia a cinética de liberação do fármaco a partir da matriz polimérica, sendo que as nanopartículas de PLA apresentaram a liberação mais sustentada do que as de PLA-PEG (1:0,25).

No estudo *ex vivo*, com leucócitos polimorfonucleares, verificou-se que o PEG também influenciou o reconhecimento das nanopartículas por estas células, alterando o perfil de fagocitose das nanopartículas. O ensaio indicou que as nanopartículas de PLA-PEG (1:0,25) foram mais eficientes em evitar a ativação dos LPMN do que as partículas de PLA.

Estudos *in vivo* em ratos foram realizados e indicaram que a via intranasal se mostrou adequada para a administração de nanopartículas. O perfil de biodisponibilidade das nanopartículas apresentou-se prolongado em função da presença de PEG na partícula. Os resultados demonstraram que as nanopartículas de blenda de PLA-PEG (1:0,25) apresentaram maior tempo de circulação sanguínea do que as nanopartículas de PLA.

Dessa maneira, pode-se afirmar que presença do PEG na formulação influenciou tanto aspectos farmacotécnicos como aspectos celulares e biológicos, levando a obtenção de nanopartículas com propriedades físico-químicas e biológicas diferenciadas.

O trabalho também demonstra que as nanopartículas de PLA e de blends de PLA-PEG (1:0,25) podem ser utilizadas como um eficiente sistema de liberação intranasal de fármacos. As nanopartículas contendo AZT são potenciais sistemas de liberação controlada para aplicação no tratamento da AIDS. Estudos posteriores, logicamente, devem ser realizados para confirmar essa aplicação.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA – ANVISA. Resolução – RE nº 889, de 29 de maio de 2003. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Disponível em: [www.anvisa.org.br](http://www.anvisa.org.br)

ALLEN, R.C.; LOOSE, L.D. Phagocytic activation of luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 69, p. 245-253, 1976.

ALLEN, R.C.; STJERNHOLM, R.L.; STEELE, R.H. Evidence for the generation of in electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leucocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.47, p.679-684, 1972.

ALMUDARIS, A.; ASHTON, D.S.; RAY, A. VALKO, K. Trace analysis of impurities in 3'-azido-3'-deoxythymidine by reversed-phase high performance liquid chromatography and thermospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v.689, p.31-38, 1995.

ALONSO, M.J. Nanomedicines for overcoming biological barriers. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 58, p.168–172, 2004.

ALYAUTDIN, R.N.; PETROV, V.E.; LANGER, K.; BERTHOLD, A.; KHARKEVICH, D.A.; KREUTER, J. Delivery of loperamide across the blood–brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Pharm. Res.* V.14, p. 325–328, 1997.

ALYAUTDIN, R.N.; TEZIKOV, E.B.; RAMGE, P.; KHARKEVICH, D.A.; BEGLEY, D.J.; KREUTER, J. Significant entry of tubocurarine into the brain of rats by absorption to polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles: an in situ brain perfusion study. *J. Microencapsul.*, V.15, 67–74, 1998.

AMATO, V.N.; MEDEIROS, E.A.S.; KALLAS, E.G.; LEVI, G.C.; BALDY, J.L.S.; MEDEIROS, R.S.S. **AIDS na prática médica**. São Paulo: Sarvier, 1996. p.1-6, 8, 22, 129-132.

ANDERSON, J.M.; SHIVE, M.S. Biodegradable and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Del. Reviews*, v.28, p.5-24, 1997.

ARAÚJO, A.A.S.; STORPIRTIS, S.; MERCURI, L.P.; CARVALHO, F.M.S.; SANTOS FILHO, M.; MATOS, J.R. Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with the excipients used in solid dosage forms. *Int. J. Pharm.*, v.260, p.303-314, 2003.

ATAMAN-ONAL, Y.; MUNIER, S.; GANÉE, A.; TERRAT, C.; DURANT, P-Y. Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. *J. Control. Release*, v.112, p.175-185, 2006.

AVGOUSTAKIS, K. Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Curr. Drug Deliv.*, v.4, p.321-33, 2004.

AVGOUSTAKIS, K.; BELETSI, A.; PANAGI, Z.; KLEPETSANIS, P.; KARYDAS, A.G.; ITHAKISSIOS, D.S. PLGA-mPEG nanoparticles for cisplatin in vitro nanoparticles degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *J. Control. Release*, v.79, p.123-135, 2002.

AVGOUSTAKIS, K.; BELETSI, A.; PANAGI, Z.; KLEPETSANIS, P.; LIVANIOU, E.; EVANGELATOS, G.; ITHAKISSIOS, D.S. Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA–mPEG nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, v. 259, p.115–127, 2003.

AYMARD, G.; LEGRAND, M.; TRICHEREAU, N.; DIQUET, B. Determination of twelve antiretroviral agents in human plasma sample using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, v.744, p.227-240, 2000.

BABIOR, B.M. Oxygen – dependent microbial killing by phagocytes. *New. Engl. J. Med.*, v.298, p.659-668, 1978.

BAZILE, D.; PRUD'HOMME, C.; BASSOULLET, M.T.; MARLARD, M.; SPENLEHAUER, G.; VEILLARD, M. Stealth PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *J. Pharm. Sci.*, v. 84, p. 493–498, 1995.

BENDER, A.; SCHAFFER, V.; STEFFAN, A.; ROYER, C.; KREUTER, J.; RUBSAMEN-WAIGMANN, H.; VON BRIESEN, H. Inhibition of HIV in vitro by antiviral drug targeting using nanoparticles. *Res. Virol.*, v.145, p.215–220, 1994.

BENDER, A.; VON BRIESEN, H.; KREUTER, J.; DUCAN, I.B.; RUBSAMEN-WAIGMANN, H. Efficiency of nanoparticles as carrier system for antiviral agents in human immunodeficiency virus-infected human monocytes/macrophages in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.40, p.1467–1471, 1996.

BLUM, M.R.; LIAO, S.H.T.; GOOD, S.S.; MIRANDA, P. Pharmacokinetics and bioavailability of zidovudine in humans. *Am. J. Med.*, v. 85, p. 189–194, 1988.

BOGDANOVA, S.; SIDZHAKOVA, D.; KARAIVANOVA, V.; GEORIEVA, S. Aspects of the interactions between indomethacin and nicotinamide in solid dispersions. *Int. J. Pharm.*, v.163, p.1-10, 1996.

BOZKIR, A.; HAYTA, G.; SAKA, O.M. Comparison of biodegradable nanoparticles and multiple emulsions (water-in-oil-in-water) containing influenza virus antigen on the in vivo immune response in rats. *Pharmazie*, v.59(9), p.723-5, 2004.

BRASSEUR, N.; BRAULT, D.; COUVREUR, P. Adsorption of hematoporphyrin onto polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: carrier capacity and drug release *Int. J. Pharm.*, v.70, p.129-135, 1991.

BREW, B.J.; ROSENBLUM, M.; PRICE, R.W. AIDS dementia complex and primary HIV brain infection. *J. Neuroimmunol.* 20 (1988) 133–140.

BROOKING, J.; DAVIS, S.S.; ILLUM, L. Transport of nanoparticles across the rat nasal mucosa. *J. Drug Targeting*, v.9, p. 267–279, 2001.

BROZ, M.E.; VANDERHART, D.L.; WASHBURN, N.R. Structure and mechanical properties of poly(d,l-lactic acid)/poly(caprolactone) blends. *Biomaterials*, v. 24, p.4181-4190, 2003.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *J. Pharm. Sci.*, v.85, p.530-536, 1996.

CANEVAROLO, S.V. *Ciencia dos polímeros*. Artliber Editora, São Paulo, 2002.

CEGNAR, M.; PREMZL, A.; ZAVASNIK-BERGANT, V.; KRISTL, J.; KOS, J. Poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles as a carrier system for delivering cysteine protease inhibitor cisplatin into tumor cells. *Exp. Cell Res.* v. 301(2), p. 223-31, 2004.

- CHAPLE, I.L.C. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J. Clin. Periodontol.*, v.24, p. 287-296, 1997.
- CHEN, H.; LANGER, R.; EDWARDS, D.A. A film tension theory of phagocytosis. *J. Colloid Interface Sci.*, v. 190, p.118-133, 1997.
- CHOGNOT, D.; LEONARD, M.; SIX, J.L.; DELLACHERIE, E. Surfactive water-soluble copolymers for the preparation of controlled surface nanoparticles by double emulsion/solvent evaporation. *Coll. Surf. B: Biointerfaces*, v.51, p.86-92, 2006.
- CHONG, C.S.; CAO, M.; WONG, W.W.; FISCHER, K.P.; ADDISON, W.R.; KWON, G.S.; TYRRELL, D.L.; SAMUEL, J. Enhancement of T helper type 1 immune responses against hepatitis B virus core antigen by PLGA nanoparticle vaccine delivery. *J. Control. Release*, v.102(1), p.85-99, 2005.
- CLAESSON, P.M.; BLOMBERG, E.; FROBERG, J.C.; NYLANDER, T.; ARNEBRANT, T. Protein interactions at solid interface. *Adv. Colloid Interface Sci.*, v.57, p.161–167, 1995.
- CLERCQ, E.D. Antiviral drugs in current clinical use. *J. Clin. Virol.*, v.30, p.115-133, 2004.
- CLERCQ, E.D. Antiviral drugs: current state of the art. *J. Clin. Virol.*, v.22, p.73-89, 2001.
- CUI, F.; CUN, D.; TAO, A.; YANG, M.; SHI, K.; ZHAO, M.; GUAN, Y. Preparation and characterization of melittin-loaded poly (DL-lactic acid) or poly (DL-lactic-co-glycolic acid) microspheres made by the double emulsion method. *J. Control. Release*, v.107, p.310-9, 2005.
- CULLEN, B.R. Regulations of HIV-1 gene expression. *FASEB J.*, v.5, p.2361-2368, 1991.

DE JAEGHERE, F.; ALLEMANN, E.; LEROUX, J.C.; STEVELS, W.; FEIJEN, J.; DOELKER, E.; GURNY, R. Formulation and lyoprotection of poly(lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles: influence on physical stability and in vitro cell uptake. *Pharm. Res.*, v.16, p.859–866, 1999.

DODEIGNE, C., THUMUS, L., LEJEUNE, R. Chemiluminescence as diagnostic tool. A review. *Talanta*, v.51, p.415-439, 2000.

DOMIN, B.A.; MAHONY, W.B.; ZIMMERMAN, T.P. Membrane permeation mechanisms of 29,39-dideoxynucleosides. *Biochem. Pharmacol.* v.46, p.725–729, 1993.

DONG, Y.; FENG, S-S. Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, v.25, p.2843-2849, 2004.

DYKE, K.V.; WOODFORK, K. terapia da infecção pelo vírus da Imunodeficiência Humana. In: Craig, C.R.; Stitzel, R.E. Farmacologia Moderna com Aplicações Clínicas. Guanabara Koogan, RJ 6 ed. 2005.

FERNANDEZ, M.; RODRIGUES, I.C.; MARGARIT, M.V.; CEREZO, A. Characterization of solid dispersions of piroxicam/polyethyleneglycol 400. *Int. J. Pharm.*, v.84, p.197-202, 1992.

FERNÁNDEZ-URRUSUNO, R.; CALVO, P., REMUNÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.*, v.16, p.1576-1581, 1999.

FITZGERALD, J.F.; CORRIGAN, O.I. Investigation of the mechanism governing the release of levamisole from poly-lactide-co-glycolide delivery systems. *J. Control. Release*, v.42, p.125-132, 1996.

FONSECA, L. M. **Efeito da nicotina nas Funções de Leucócitos Polimorfonucleares Neutrófilos *in vitro***. Tese (Doutorado). FMRP-USP, 1991.

FONTANA, G.; PITARRESI, G.; TOMARCHIO, V.; CARLISI, B.; SAN BIAGIO, P. L. Preparation, characterization and in vitro antimicrobial activity of ampicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials*, v.19, p.1009, 1998.

FRESTA, M.; PUGLISI, G.; GIAMMONA, G.; CAVALLARO, G.; MICALI, N.; FURNERI, P. M. Pefloxacin mesilate- and ofloxacin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: characterization of the colloidal drug carrier formulation. *J. Pharm. Sci.*, v.84, p.895-902, 1995.

FRIJUS-PLESSEN, N.; MICHAELIL, H.C.; FOTH, H.; KARL, G.F. Determination of 3'-azido-3'-deoxythymidine, 2',3'-dideoxycytidine, 3'-fluoro-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxyinosine in biological samples by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, v.534, p.101-107, 1990.

GIAMMONA, G.; CAVALLARO, G.; PITARRESI, G. Studies of macromolecular prodrugs of zidovudine. *Adv. Drug Del. Rev.*, v.39, p.153-164, 1999.

GORNER, T.; GREF, R.; MICHENOT, D.; SOMMER, F.; TRAN, M.N.; DELLACHERIE, E. Lidocaine-loaded biodegradable nanospheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymeric matrix. *J. Control. Release*, v.57, p.259-268, 1999.

GOVENDER, T.; RILEY, T.; EHTEZAZI, T. ; GARNETT, M. C.; STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, v.199, p.95-110, 2000.

GRAF, R.; DOMB, A.; QUELLEC, P.; BLUNK, T.; MULLER, R.H.; VERBAVATZ, J.M.; LANGER, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv. Drug Del. Rev.*, v.16, p.215–223, 1995.

GRAF, R.; LUCK, M.; QUELLEC, P.; MARCHAND, M.; DELLACHERIE, E.; HARNISCH, S.; BLUNK, T.; MULLER, R.H.; ‘Stealth’ corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): Influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, v.18, p.301-313, 2000.

GRAF, R.; MINAMITAKE, Y.; PEACHIER, M.T.; TRUBETSKOY, V.; TORCHILIN, V.; LANGER, R. Biodegradable long-circulating nanospheres. *Science* v.263, p. 1600–1603, 1994.

GRAF, R.; QUELLEC, P.; SANCHEZ, A.; CALVO, P.; DELLACHERIE, E.; ALONSO, M.J. Development and characterization of Cya-loaded poly(lactic acid)poly(ethylene glycol)PEG micor and nanoparticles. Comparison with conventional PLA particulate carriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.51, p.111-118, 2001.

GULYAEV, A.E.; GELPERINA, S.E.; SKIDAN, I.N.; ANTROPOV, A.S.; KIVMAN, G.Y.; KREUTER, J. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. *Pharm. Res.* V.16, p. 1564–1569, 1999.

HAMPTON, M.B.; KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood*, v. 92, p. 3007-3017, 1998.

HEIATI, H.; TAWASHI, R.; PHILLIPS, N.C. Solid lipid nanoparticles as drug carriers II. Plasma stability and biodistribution of solid lipid nanoparticles containing the lipophilic prodrug 3%-azido-3%-deoxythymidine palmitate in mice. *Int. J. Pharm.* v.174, p.71–80, 1998.

HO, D.D.; POMERANTZ, R.J.; KAPLAN, J.C. Pathogenesis of infections with human immunodeficiency virus. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v.31, p.278-286, 1987.

HUSSAIN, A.A. Intranasal drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, v. 29, p.39-40, 1998.

ICH Harmonized Tripartite Guideline. *Validation of analytical procedures: methodology*, 1996, p.1-8.

IWATA, M.; MCGINITY, J.W. Preparation of multi-phase microspheres of poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) containing a W/O emulsion by multiple solvent evaporation technique. *J. Microencapsulation*, v.9, p.201-214, 1992.

JAIN, R.A. The manufacturing techniques of various loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide)(PLGA) devices. *Biomaterials*, v.21, p.2475-2490, 2000.

JEONG, S.I.; LEE, J.H.; ANDRADE, J.D.; DE GENNES, P.G. Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide I. Simplified theory. *J. Colloid Interface Sci.*, v.142, p.149-158, 1991.

JUNG, T.; KAMM, W.; BREITENBACH, A.; HUNGERER, K.D.; HUNDT, E.; KISSEL, T. Tetanus toxoid loaded nanoparticles from sulfobutylated poly(vinylalcohol)-graf-poly(lactide-co-glycolide): evaluation of antibody response after oral and nasal application in mice. *Pharm. Res.*, v.18, p.352–360, 2001.

JUNG, T.; KAMM, W.; BREITENBACH, A.; KAISERLING, E.; XIAO, J. X.; KISSEL, T. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake?, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.50, p.147-160, 2000.

KAKUDA, T.N.; STRUBLE, K.A.; PISCITELLI, S.C. Protease inhibitors for the treatment of human immunodeficiency virus infection, *Am. J. Health Syst. Pharm.* v.55, p.233–254, 1998.

KAMALI, F.; RAWLINS, M.D. Simple and rapid assay for zidovudine and zidovudine glucuronide in plasma using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, v.530, p.474-479, 1990.

KAWASHIMA, Y. Nanoparticulate systems for improved drug delivery. *Adv Drug Del. Reviews*, v.47, p.1-2, 2001.

KIM, S.Y.; SHIN, G.; LEE, Y.M. Amphiphilic diblock copolymeric nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and glycolide: properties, cytotoxicity and drug release behaviour. *Biomaterials*, v.20, p.1033-1042, 1999.

KLECKER, R.W.; COLLINS, J.M.; YARCHOAN, R.; THOMAS, R.; JENKINS, J.F.; BRODER, S. MYERS, C.E. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of 3V-azido-3V-deoxythymidine: a novel pyrimidine analog with potential application for the treatment of patients with AIDS and related diseases. *Clin. Pharmacol. Ther.*, v. 41, p. 407– 412, 1987.

KREUTER, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Del. Rev.*, v.47, p.65-81, 2001.

KRISHNAMOORTHY, R.; MITRA, A.K. Prodrugs for nasal drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, v. 29 (1-2), p.135-146, 1998.

KUMAR, P.N.; SWEET, D.E.; MCDOWELL, J.A.; SYMONDS, W.; LOU, Y.; HETHERINGTON, S., LAFON, S. Safety and pharmacokinetics of abacavir (1592U89) following oral administration of escalating single doses in human immunodeficiency virus type 1-infected adults. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 43, p. 603–608, 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.160-169, 2006.

KUPFERSCHMIDT, R.; SCHMID, R.W. Specific routine determination of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) in plasma by partly automated liquid chromatography. *Clin. Chem.*, v.35, n.7, p.1313-1317, 1989.

KWON, H.-Y.; LEE, J.-Y.; CHOI, S.-W.; JANG, Y.; KIM, J.-H. Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method. *Colloids and Surfaces*. V.182, p.123-130, 2001.

KWONG, P.D.; WYATT, R.; ROBINSON, J.; SWEET, R.W.; SODROSKI, J.; HENDRICKSON, W.A. Structure of an HIV gp120 envelop glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing antibody. *Nature* v.393, p.648–659, 1998.

LACROIX, C.; HOANG, T.P.; WOJCIECHOWSKI, F.; DUWOOS, H.; NOUVEAU, J. Simultaneous quantification of zidovudine and its metabolites in serum and urine by high-performance liquid chromatography using a column-switching technique. *J. Chromatogr.*, v.525, p.240-245, 1990.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-PH. [Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. A review.](#) *S.T.P. Pharma Sci.*, v.9, p.411, 1999.

LEHNMEYER, J. E.; SNYDERMAN, R.; HOHNSTON, R. B. Stimulation of neutrophil oxidative metabolism by chemotactic peptides: Influence of calcium ion concentration and cytochalasin B and comparison with stimulation by phorbol myristate acetate. *Blood*, v. 54, p. 35-45, 1979.

LI, X.; CHAN, W.K.; Transport, metabolism and elimination mechanisms of anti-HIV agents. *Adv. Drug Del. Rev.*, v.39, p.81–103, 1999.

LIPTON, S.A. Treating AIDS dementia, *Science*, v.276, p.1629–1630, 1997.

LOBENBERGN R.; ARAUJO, L.; KREUTER. Body distribution of azidothymidine bound to nanoparticles after oral administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.44, p.127-132, 1997.

LOPES, E. C; POHLMANN, A. R.; BASSANI, V.; GUTERRES, S. S. Polymeric colloidal systems containing ethionamide: Preparation and physico-chemical characterization. *Pharmazie*, v.55, p.527, 2000.

LOURENÇO, C.; TEIXEIRA, M.; SIMÕES, S.; GASPAR, R. Steric stabilization of nanoparticles: size and surface properties. *Int. J. Pharm.*, v.138, p.1-12, 1996.

LU, Z.; YEH, T.K.; TSAI, M.; AU, J.L.; WIENJES, M.G. Paclitaxel-loaded gelatin nanoparticles for intravesical bladder cancer therapy. *Clin. Cancer Res.*, v.10(22), p.7677-7784, 2004.

MAINARDES, R.M.; EVANGELISTA, R.C. PLGA Nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. *Int. J. Pharm.*, v.290, p.137-144, 2005.

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. *Current Drug Delivery*, v.3(3), p. 275-285, 2006.

MANDAL, T.K.; TENJARLA, S. Preparation of biodegradable microcapsules of zidovudine using solvent evaporation: Effect of the modification of aqueous phase. *Int. J. Pharm.*, v. 137, p.187-197, 1996.

MARKOWITZ, M. Inibidores da protease: o que eles são, como funcionam, quando usá-los. **International Association of Physicians in AIDS Care (IAPAC)**, 1996. Disponível em:<http://www.iapac.org>.

MATSUMOTO, J.; NAKADA, Y.; SAKURAI, K.; NAKAMURA, T.; TAKAHASHI, Y. Preparation of nanoparticles consisted of poly(l-lactide)-poly(ethylene glycol)-poly(l-lactide) and their evaluation in vitro. *Int. J. Pharm.*, v.185, p.93-101, 1999.

MERCK index. 12.ed. Withehouse Station, 1996.

MIRCHANDANI, H.; CHIEN, Y.W. Drug delivery approaches for anti-HIV drugs, *Int. J. Pharm.*, v.95, p.1-21, 1993.

MOGHIMI, S.M.; SZEBENI, J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Progress in Lipid Research*, v.42, p. 463-478, 2003.

MONTANARI, L.; CILURZO, F.; SELMIN, F.; CONTI, B.; GENTA, I.; OLETTI, G.; ORSINI, F.; VALVO, L. Poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing bupivacaine: comparison between gamma and beta irradiation effects. *J. Control. Release*, v.90, p.281-290, 2003.

MOURÃO, S.C.; COSTA, P.I.; SALGADO, H.R.M.; GREMIÃO, M.P.D. Improvement of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholine-containing liposomes. *Int. J. Pharm.*, V.295, P.157-162, 2005.

MU, L.; FENG, S.S. Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol®). *J. Control. Release*, v.80, p.129-144, 2002.

MURA, P.; BETTINETI, G.P.; BRAMANTI, G.; MANDERIOLI, A. Thermal behaviour of naproxen in mixtures polyethylene glycol. *Acta Symp. Pharm. Therm. Anal. I Freiburg*, 1993.

NARISHETTY, S.T.K.; PANCHAGNULA, R. Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action. *J. Control. Release*, v. 95, p. 367– 379, 2004.

OH, S.Y.; JEONG, S.Y.; PARK, T.G.; LEE, J.H. Enhanced transdermal delivery of AZT (zidovudine) using iontophoresis and penetration enhancer. *J. Control. Release*, v.51, p.161-168, 1998.

OWENS, D.E.; PEPPAS, N.A. Opsonization, biodistribution and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, v.30, p.93-102, 2006.

PARK, S-J.; KIM, S-H. Preparation and characterization of biodegradable poly(l-lactide)poly(ethylene glycol) microcapsules containing erythromycin by emulsion solvent evaporation technique. *J. Colloid and Interface Sci.* v. 271, p.336-341, 2004.

PERACCHIA, M.T.; HARNISCH, S.; PINTO-ALPHANDARY, H.; GULIK, A.; DEDIEU, J.C.; DESMAELE, D.; D'ANGELO, J.; MULLER, R.H.; COVREUR, P. Visualization of in vitro protein-rejecting properties of PEGylated stealth polycyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials*, v.20, p.1269-1275, 1999.

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 Defic. Syndr.* v.4, p.959–966, 1991.

PHILLIPS, N.C., TSOUKAS, C. Liposomal encapsulation of azidothymidine results in decreased hematopoietic toxicity and enhanced activity against murine acquired immunodeficiency syndrome. *Blood*, v.79, p.1137–1143, 1992.

PIALOUX, G.; FOURNIER, S.; MOULIGNIER, A.; POVEDA, J.-D.; CLAVEL, F.; DUPONT, B. Central nervous system as a sanctuary for HIV-1 infection despite treatment with zidovudine, lamivudine and indinavir, *AIDS* v.11, p.1302–1303, 1997.

POLI, G.; PANTALEO, G.; FAUCI, A. S. Immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Clin. Infect. Dis.*, v.17 (1), p.224-229, 1993.

PRICE, R.W. Understanding the AIDS dementia complex (ADC): the challenge of HIV and its effects on the central nervous system, in: R.W. Price, S.W. Perry (Eds.), *HIV, AIDS and the Brain*, Raven Press, New York, 1993, pp. 1–45.

RESNICK, L., BERGER, J.R., SHAPSHAK, P. TOURTELLOTTE, W.W. Early penetration of the blood–brain barrier by HIV, *Neurology*, v.38, p.9–14, 1988.

RICHMAN, D.D.; SILICIANO, R.F., Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy, *Science*, v.278, p.1295–1300, 1997.

RILEY, T. GOVENDER, S.; STOLNIK, S.; XIONG, C.D.; GARNETT, M.C. ILLUM, L.; DAVIS, S.S. Colloidal stability and drug incorporation aspects of micellar-like PLA-PEG nanoparticles. *Colloids and surf B: Biointerfaces*, v.16, p.147-159, 1999.

RILEY, T.; STOLNIK, S.; HEALD, C. R.; XIONG, C. D.; GARNETT, M. C.; ILLUM, L. DAVIS, S. S. Physicochemical Evaluation of Nanoparticles Assembled from Poly(lactic acid)-Poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) Block Copolymers as Drug Delivery Vehicles. *Langmuir*, v.17, p.3168-3174, 2001.

RODANTE, F.; VECCHIO, S.; CATALANI, G.; TOMASSETI, M. Compatibility between active components of a comercial drug. *Il Farmaco*, v.57, p.833-843, 2002.

RONALD, J.; SAWCHUK, Z. Y. Investigation of distribution, transport and uptake of anti-HIV drugs to the central nervous system, *Adv. Drug Del. Rev.* v.39, p.5–31, 1999.

ROSE, M.; FISCHER, D.; KISSEL, T. Surface-modified biodegradable albumin nano- and micospheres. II. Efect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v.46, p.255-263, 1998.

ROTHENBERG, R.; WOELFEL, M.; STONEBURNER, R.; MILBERG, J.; PARKER, R.; TRUMAN, B. Survival with the acquired immunodeficiency syndrome: experience with 5833 cases in New York City, *New Engl. J. Med.* v.317, p.1297–1302, 1987.

SAWCHUK, R.J.; YANG, Z. Investigation of distribution, transport and uptake of anti-HIV drugs to the central nervous system, *Adv. Drug Del.Rev.* v.39, p.5–31, 1999.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Physicochemical characterization ans stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. *Química Nova*, v.26, 2003.

SCHRIVE, I.; PLASSE, J.C. Quantification of zidovudine and one of its metabolites in plasma and urine by solidphase extraction and high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, v.657, p.233-237, 1994.

SEIJO, B.; FATTAL, E.; TREUPEL, L. R.; COUVREUR, P.; *Int. J. Pharm.*, Design of nanoparticles of less than 50 nm diameter: preparation, characterization and drug loading, v.62, p.1-7, 1990.

SIMAL, AL.L. Estrutura e propriedades dos polímeros. EDUFSCar, São Carlos, 2002.

SOMAVARAPU, S.; ALPAR, H.O.; SONG, C.Y.S. Biodegradable nanoparticles in nasal vaccine delivery: effect of particle size and loading. *Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, v.25, p. 645–646, 1998.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release*, v.70, p.1-20, 2001.

SPENCE, R.A.; KATI, W.M.; ANDERSON, K.S.; JOHSON, K.A. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science*, v.267, p.988, 1995.

STOLNIK, S., DUNN, S.E., GARNETT, M.C., DAVIES, M.C. COOMBES, A.G. et al. Surface modification of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres by biodegradable poly(lactide)-poly(ethylene glycol) copolymers. *Pharm. Res.*, v.11, p.1800-1808, 1994.

TABATA, Y.; IKADA, Y. Phagocytosis of polymer microspheres by macrophages. *Adv. Polym. Sci.*, v.94, p.107-141, 1990.

TAN, X.; BOUDINOT, D. Simultaneous determination of zidovudine and its monophosphate in mouse plasma and peripheral red blood cells by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, v.740, n.2, p.281-287, 2000.

TAN, X.; CHU, C.K.; BOUDINOT, F.D. Development and optimization of anti-HIV nucleoside analogs and prodrugs: A review of their cellular pharmacology, structure-activity relationships and pharmacokinetics, *Adv. Drug Del. Rev.*, v.39, p.117–151, 1999.

THOMAS, N.S.; PANCHAGNULA, R. Transdermal delivery of zidovudine: effect of vehicles on permeation across rat skin and their mechanism of action. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.18, p.71-79, 2003.

TOBIO, M.; GREF, R.; SANCHEZ, A.; LANGER, R.; ALONSO, M.J. Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. *Pharm. Res.* v.15(2), p.270-275, 1998.

VAUTHLER-HOLTZSCHERER, C.; BENABBOU, S.; SPENLEHAUER, G.; VEILLARD, M.; COUVREUR, P. Methodology for the preparation of ultra-dispersed polymer systems. *S.T.P. Pharma Sci.*, v.1, p.109, 1991.

VENIER-JULIENNE, M.C.; BENOIT, J.P. Preparation, purification and morphology of polymeric nanoparticles as drug carriers. *Pharm. Acta. Helv.*, v.71, p.121-128, 1996.

VERRECHIA, T.; SPENLEHAUER, G.; BAZILE, D.V.; MURRY-BRELIER, A.; ARCHIMBAUD, Y.; VEILLARD, M. Non-stealth poly(lactic acid/albumin and stealth (poly(lactic acid-polyethylene glycol))nanoparticles as injectable drugs carriers. *J. Control. Release*, v. 36, p.49– 51, 1995.

VILA, A.; GILL, H.; MCCALLION, O.; ALONSO, M.J. Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: effect of particle size and PEG coating density. *J. Control. Release*, v.98, p.231-244, 2004.

VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; ÉVORA, C.; SORIANO, I.; MCCALLION, O.; ALONSO, M.J. PLA-PEG particles as nasal protein carriers: the influence of the particle size. *Int. J. Pharm.*, v.292, p.43-52, 2005.

VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; TOBÍO, M.; CALVO, P.; ALONSO, M. J.; *J. Design of biodegradable particles for protein delivery. Control. Release*, v.78, p.15-24, 2002.

VITTAZ, M.; BAZILE, D.; SPENLEHAUER, G.; VERRECCHIA, T.; VEILLARD, M.; PUISIEUX, F.; LABARRE, D. Effect of PEO surface density on long circulating PLA\_PEG nanoparticles which are very low complement activators. *Biomaterials*, v.17, p. 1575-1581, 1996.

WALSH, C. E.; WAITE, B. M.; THOMAS, M. J.; DeCHATELET, L. R. Release and metabolism of arachidonic acid in human neutrophils. *J. Biol. Chem.*, v. 256, p. 7228-7234, 1981.

WENDLANDT, W.W. Thermal Analysis. Wiley interscience publication, 3 ed., New York, p.814, 1986.

WILHELM, C.; BILLOTEY, C.; ROGER, J.; PONS, J.N.; BACRI, J.C.; GAZEAU, F. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials*, v.24, p.1001–1011, 2003.

WILLIAMS, G.C.; SINKO, P.J. Oral absorption of the HIV protease inhibitors: a current update. *Adv. Drug Del. Rev.* v.39, p.211–238, 1999.

YARCHOAN, R. MITSUYA, H.; MYERS, C.E.; BRODER, S. Clinical pharmacology of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (zidovudine) and related dideoxynucleosides. *New Engl. J. Med.*, v. 321, p. 726-738, 1989.





# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)