

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS
CONTENDO CETOPROFENO E AVALIAÇÃO *in vitro*
DA CITOTOXICIDADE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daniele Adriane Ribas

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO
CETOPROFENO E AVALIAÇÃO *in vitro* DA
CITOTOXICIDADE**

Daniele Adriane Ribas

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle da Qualidade e Avaliação Biofarmacêutica de Insumos e Medicamentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Cruz

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

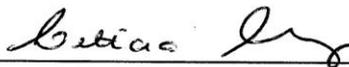
**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO
CETOPROFENO E AVALIAÇÃO *in vitro* DA CITOTOXICIDADE**

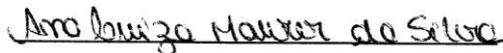
elaborada por
Daniele Adriane Ribas

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

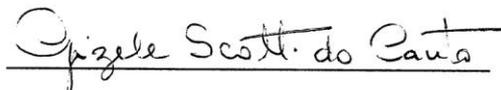
COMISSÃO EXAMINADORA



Letícia Cruz, Dra.
(Presidente/Orientadora)



Ana Luíza Maurer da Silva, Dra. (UNISINOS)



Gizele Scotti do Canto, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 28 de agosto de 2013.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Leticia Cruz por sua orientação, confiança e conhecimentos transmitidos.

À Profa. Dra. Elizandra Braganhol por sua colaboração dedicada na realização dos experimentos de citotoxicidade.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica pela amizade e auxílios prestados.

Aos meus pais, base de minha formação, agradeço pelo incentivo, compreensão e amor incondicional.

Ao Rodrigo, por estar compartilhando comigo esta etapa; por seu amor, incentivo e compreensão.

Em especial, a Deus, pela Fé e Sabedoria necessárias para enfrentar os momentos de dificuldades e incertezas.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO CETOPROFENO E AVALIAÇÃO *in vitro* DA CITOTOXICIDADE

AUTORA: DANIELE ADRIANE RIBAS

ORIENTADORA: LETÍCIA CRUZ

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de agosto de 2013.

O objetivo deste trabalho foi preparar, caracterizar e avaliar *in vitro* a citotoxicidade de nanocápsulas (NC) de Eudragit S100[®] contendo cetoprofeno. As suspensões nanoestruturadas foram preparadas em triplicata pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado. Triglicerídeos de cadeia média (TCM) ou óleo de rosa mosqueta (ORM) foram utilizados como núcleo oleoso na preparação de tais formulações. Previamente, foram realizados testes de inchamento/dissolução dos filmes de Eudragit S100[®], os quais revelaram a viabilidade do emprego de ambos os óleos como núcleo das NC. Os resultados da caracterização físico-química dos sistemas (pH, tamanho, potencial zeta, teor, eficiência de encapsulamento) não demonstraram diferenças consideráveis entre os diferentes tipos de formulações. O teor de cetoprofeno nas suspensões nanoestruturadas foi muito próximo à concentração teórica, indicando ausência de perda ou degradação do fármaco durante o processo de preparação. Obteve-se uma taxa de associação do cetoprofeno às NC superior a 90%. O tamanho de partícula nas formulações encontrou-se na faixa de 173 a 197 nm, resultados compatíveis com o método de preparação empregado. Quanto à liberação *in vitro*, a análise matemática dos perfis demonstrou uma cinética de primeira ordem com difusão do fármaco como mecanismo de liberação. A fim de avaliar a influência do componente oleoso frente à fotodegradação do cetoprofeno, amostras foram expostas à radiação UVC. A fotodegradação foi menos evidente nas NC contendo ORM como núcleo, possivelmente pelo maior potencial antioxidante deste óleo. O teste de citotoxicidade *in vitro* avaliou a sobrevivência de fibroblastos da linhagem 3T3 frente a quatro concentrações de cetoprofeno (1, 10, 50 e 100 µM) em 24 e 48 horas. Após 48h de exposição, observou-se uma redução da viabilidade celular para todos os grupos testados. Contudo, esta diminuição não foi diferente significativamente do grupo controle. Desta forma, as formulações preparadas podem ser consideradas promissoras para veiculação do cetoprofeno em doenças como a artrite reumatoide.

Palavras-chave: Nanopartículas. Nanocápsulas. Cetoprofeno. Óleo de rosa mosqueta. Eudragit S100[®]. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Master Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Santa Maria

DEVELOPMENT OF NANOCAPSULES CONTAINING KETOPROFEN AND *in vitro* EVALUATION OF CYTOTOXICITY

AUTHOR: DANIELE ADRIANE RIBAS

ADVISOR: LETÍCIA CRUZ

Place and Date of Defense: Santa Maria, August 28, 2013.

The aim of this work was to prepare, characterize and evaluate the *in vitro* cytotoxicity of Eudragit S100[®] nanocapsules (NC) containing ketoprofen. The nanostructured suspensions were prepared in triplicate by the method of interfacial deposition of preformed polymer. Caprylic/capric triglyceride or rosehip oil were used as the oil core in the preparation of such formulations. Previously, tests of swelling/dissolution of the films of Eudragit S100[®] were performed and showed the feasibility of using both oils as the core of the NC. The results of the physico-chemical characterization of the systems (pH, size, zeta potential, content, encapsulation efficiency) showed no significant differences between the various types of formulations. The concentration of ketoprofen in the formulations was very close to the theoretical concentration, indicating no loss or degradation of the drug during the preparation process. The encapsulation efficiency of ketoprofen in NC was higher than 90%. The particle size of the formulations was found in the range of 173-197 nm, which is in accordance to the method of preparation employed. Regarding the *in vitro* release, the mathematical analysis of the profiles showed a first order kinetics with drug diffusion as release mechanism. In order to evaluate the influence of the oil component in the ketoprofen photodegradation, samples were exposed to UVC radiation. The photodegradation was less evident in the rosehip oil NC, probably due to the greatest antioxidant potential of this oil. The *in vitro* cytotoxicity assay evaluated the viability of 3T3 cell line against four concentrations of ketoprofen (1, 10, 50 and 100 μ M) for 24 and 48 hours. After 48 hours of exposure, there was a reduction in cell viability in all tested groups. However, this decrease was not significantly different from the control group. Thus, the prepared formulations can be considered promising alternatives for the delivery of ketoprofen in inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis.

Keywords: Nanoparticles. Nanocapsules. Ketoprofen. Rosehip oil. Eudragit S100[®], Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Representação estrutural dos ácidos arilalcanoicos.....	16
Figura 2	– Estrutura química do cetoprofeno (ácido [2-(3-benzoilfenil) propanoico]).	17
Figura 3	– Diferentes tipos de carreadores.....	18
Figura 4	– Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	19
Figura 5	– Cromatogramas das nanocápsulas brancas (a) e nanocápsulas contendo cetoprofeno (b).....	43
Figura 6	– Média das nove curvas analíticas do cetoprofeno em metanol.....	44
Figura 7	– Representação gráfica do inchamento/dissolução dos filmes de Eudragit S100® (n=3) em contato com TCM (a) e contato com o óleo de rosa mosqueta (b).....	46
Figura 8	– Gráficos de diâmetro médio obtidos no equipamento Zetasizer para as formulações NC1-TCM (a), NC2-TCM (b), NC1-ORM (c) e NC2-ORM (d)...	49
Figura 9	– Gráficos de potencial zeta obtidos no equipamento Zetasizer para as formulações NC1-TCM (a), NC2-TCM (b), NC1-ORM (c) e NC2-ORM (d)...	51
Figura 10	– Perfis de liberação do cetoprofeno em solução metanólica e nas suspensões de nanocápsulas (n=3).....	52
Figura 11	– Fotodegradação do cetoprofeno associado à nanodispersão (ND) e às formulações de nanocápsulas (NC2-TCM e NC2-ORM). Erro! Indicador não definido.	
Figura 12	– Gráficos demonstrativos da viabilidade celular após 24 h (a) e 48 h (b) de exposição.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Composição quali-quantitativa das diferentes formulações de nanocápsulas. ...	35
Tabela 2	– Mecanismos de liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos de diferentes geometrias.....	39
Tabela 3	– Avaliação da exatidão do método analítico de doseamento do cetoprofeno.	44
Tabela 4	– Avaliação da repetibilidade e precisão intermediária do método analítico para quantificação do cetoprofeno.	45
Tabela 5	– Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas (n=3).	47
Tabela 6	– Parâmetros da modelagem matemática.	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo Geral.....	13
2.2	Objetivos Específicos	13
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3.1	Anti-inflamatórios não-esteroides e Cetoprofeno	15
3.2	Nanopartículas Poliméricas	18
3.2.1	Métodos de preparação	20
3.2.2	Caracterização Físico-Química.....	23
3.2.3	Liberação de fármacos a partir de sistemas nanoparticulados	25
3.3	Associação de AINES a nanopartículas poliméricas	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	MATERIAL	31
4.1.1	Matérias-primas	31
4.1.2	Aparelhos e Equipamentos	31
4.1.3	Solventes e outros materiais	32
4.1.4	Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade	32
4.2	MÉTODOS.....	32
4.2.1	Validação da metodologia analítica para determinação do cetoprofeno nos sistemas nanoestruturados	32
4.2.2	Teste de inchamento/dissolução de filmes poliméricos.....	34
4.2.3	Preparação das suspensões de nanocápsulas	34
4.2.4	Caracterização das suspensões de nanocápsulas	35
4.2.5	Perfil de liberação <i>in vitro</i>	38
4.2.6	Modelagem Matemática dos Perfis Cinéticos	38
4.2.7	Estudo de fotoestabilidade do cetoprofeno nas suspensões.....	39
4.2.8	Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade	40
4.3	Análise Estatística dos Resultados	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1	Validação do método analítico.....	42
5.2	Dissolução/Inchamento dos filmes poliméricos.....	46
5.3	Caracterização físico-química	47
5.4	Estudos de liberação <i>in vitro</i>	52
5.5	Estudo de Fotoestabilidade	53
5.6	Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade.....	54
6	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

O uso de substâncias químicas para melhorar a dor e a inflamação é uma das necessidades mais antigas da humanidade. Desde o isolamento da salicilina e a demonstração de seus efeitos antipiréticos em 1829 por Leraux, um longo caminho de pesquisa vem sido trilhado (MONTEIRO *et al.*, 2008).

Dentre os agentes terapêuticos empregados no tratamento da dor e inflamação, os anti-inflamatórios não-esteroides (AINES) estão entre os mais utilizados, contabilizando cerca de 5% das prescrições médicas em todo o mundo (SMALLEY *et al.*, 1995). Os AINES constituem um grupo heterogêneo de compostos que possuem funções terapêuticas em comum, ou seja, são analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios. Estes fármacos, ao inibirem a síntese de prostaglandinas (PGI_2 , PGE_1 e PGE_2), diminuem a vasodilatação, causam efeitos inibitórios nos nociceptores, centro termorregulador hipotalâmico e modulam os sinais e sintomas da inflamação (FELDMAN; McMAHON, 2000).

Os AINES apresentam propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas, sendo os fármacos de primeira escolha no tratamento de doenças reumáticas e não-reumáticas, assim como em traumas e contusões. Acredita-se que seus efeitos farmacológicos estejam relacionados à inibição de uma das isoformas da enzima ciclo-oxigenase, a COX-2, essencial para a síntese de mediadores prostanoídes da inflamação. Por sua vez, os efeitos indesejáveis relacionados ao uso dos AINES podem ser resultantes de sua inibição da COX-1, enzima constitutiva expressa na maioria dos tecidos, desempenhando funções de “manutenção” no organismo (RANG *et al.*, 2007).

O cetoprofeno, anti-inflamatório não-esteróide pertencente à classe dos ácidos arilcanóicos, é considerado um dos mais potentes inibidores da COX dentro das concentrações terapêuticas. Além de inibir a síntese de prostaglandinas, o fármaco também inibe a via lipo-oxigenase da cascata do ácido araquidônico, atua como um potente inibidor da bradicinina (importante mediador da dor e inflamação) e estabiliza as membranas lisossômicas contra a alteração osmótica, impedindo a liberação de enzimas que medeiam reações inflamatórias e causam destruição tecidual (ASHVINI *et al.*, 2011).

Apesar da eficácia dos AINES para o controle da dor aguda e crônica ser bem reconhecida, o tratamento oral com estes fármacos é acompanhado por alguns efeitos colaterais, especialmente em nível gastrointestinal. Os efeitos gastrointestinais comuns incluem

desconforto gástrico, dispepsia, diarreia (algumas vezes constipação), náuseas e, em alguns casos, hemorragias e ulcerações gástricas (FRANÇA; KOROLKOVAS, 2006).

Neste contexto, a administração oral de AINES associados a sistemas nanoparticulados poliméricos tem sido pesquisada, especialmente em relação à diminuição dos efeitos colaterais destes fármacos (AMMOURY *et al.*, 1993; GUTERRES *et al.*, 1995; MÜLLER *et al.*, 2001; GUTERRES *et al.*, 2001; RAFFIN, *et al.*, 2003). O desenvolvimento de formulações que permitam a liberação controlada de fármacos em sítios específicos, visando à diminuição de efeitos tóxicos e/ou aumento do índice terapêutico, tem recebido grande atenção nos últimos anos. Assim, tais sistemas coloidais poliméricos têm sido propostos como vetores de fármacos no sentido de modificar a sua farmacocinética, incluindo alteração no seu perfil de distribuição tissular, podendo, ainda aumentar a biodisponibilidade de muitas substâncias ativas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2002).

Apesar das inúmeras vantagens relacionadas às nanopartículas, muitos estudos tem abordado a toxicidade de materiais nanoparticulados, incluindo as nanopartículas metálicas, *quantum dots* e nanotubos de carbono. No caso dos mamíferos, tem sido relatado que materiais nanoparticulados com tamanhos de 0,1-1,0 μm são tóxicos para o sistema respiratório (LIMA *et al.*, 2011). O tamanho das nanopartículas, propriedade que as torna especiais para diferentes áreas tecnológicas, também pode ser responsável pelo aparecimento de um novo padrão de toxicidade, em que ainda não se tem totalmente esclarecido o real potencial tóxico, as possíveis formas de exposição, as consequências para os sistemas biológicos em geral, inclusive dos produtos de degradação destes materiais (CHEN *et al.*, 2006).

Tendo em vista o fato de que estudos sobre a toxicidade de nanopartículas são ainda insuficientes, toda e qualquer produção científica a esse respeito contribui para a regulamentação do uso e produção destes materiais (BARRENA *et al.*, 2009).

Considerando o exposto, o presente trabalho baseou-se no desenvolvimento de nanocápsulas contendo cetoprofeno, tendo em vista, a potencialidade de associação de anti-inflamatórios não-esteroides a nanopartículas poliméricas, além de ter objetivado a avaliação *in vitro* da toxicidade de tais formulações frente a uma linhagem de fibroblastos. Cabe ressaltar que até o momento não foram encontrados relatos na literatura sobre a preparação de nanocápsulas poliméricas contendo o referido fármaco.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver nanocápsulas poliméricas contendo cetoprofeno e avaliar *in vitro* a citotoxicidade das formulações.

2.2 Objetivos Específicos

- a) preparar suspensões aquosas de nanocápsulas contendo cetoprofeno com diferentes composições, através do método de deposição interfacial do Eudragit S100[®];
- b) validar uma metodologia analítica para a determinação do cetoprofeno nas nanocápsulas poliméricas;
- c) caracterizar as formulações nanoparticuladas quanto ao teor de fármaco, eficiência de encapsulamento, pH, tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta;
- d) avaliar a fotodegradação do cetoprofeno incorporado aos sistemas nanoestruturados frente à radiação UVC;
- e) estudar o perfil de liberação *in vitro* do cetoprofeno a partir das nanocápsulas pelo método de difusão em sacos de diálise;
- f) avaliar *in vitro* a citotoxicidade das formulações selecionadas em células fibroblásticas da linhagem 3T3.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Anti-inflamatórios não-esteroides e Cetoprofeno

Os anti-inflamatórios não-esteroides estão entre os mais usados de todos os fármacos. Esses agentes proporcionam alívio sintomático de dor e edema, como ocorre na osteoartrite e artrite reumatóide, e em afecções inflamatórias mais agudas, como os traumas e fraturas. Também proporcionam alívio de dor pós-operatória, dental, menstrual e de cefaléias e enxaquecas (RANG *et al.*, 2001).

Segundo a Associação Americana de Reumatologia, dentre as doenças crônicas existentes, as doenças reumáticas são as que mais afetam os indivíduos, sendo os AINES os fármacos de escolha no alívio dos sintomas dessas doenças, a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes (BORNE, 2008).

Os AINES apresentam três tipos principais de ações farmacológicas: ação anti-inflamatória, ação analgésica e ação antipirética. Em geral, todos estes efeitos estão relacionados à inibição da enzima ciclo-oxigenase (COX) e, conseqüentemente, inibição da síntese de prostaglandinas e tromboxanos (RANG *et al.*, 2001).

A COX encontra-se em duas isoformas: COX-1 e COX-2. A COX-1 é uma enzima constitutiva expressa na maioria dos tecidos, estando envolvida na homeostase dos tecidos, e é responsável pela produção de prostaglandinas envolvidas na citoproteção gástrica. Por sua vez, a COX-2 é induzida nas células inflamatórias quando ativadas, sendo responsável pela produção dos mediadores prostanoídes da inflamação (TURINI; DUBOIS, 2002; MIZUSHIMA, 2010).

Recentemente foi descoberta uma variante do gene da COX-1, descrito como COX-3. Essa parece ser expressa em altos níveis no sistema nervoso central e pode ser encontrada também no coração e na aorta. Essa enzima é seletivamente inibida por fármacos analgésicos e antipiréticos, como paracetamol e dipirona, e é potencialmente inibida por alguns AINES. Essa inibição pode representar um mecanismo primário central pelo qual esses fármacos diminuem a dor e possivelmente a febre. A relevância desta isoforma ainda não está totalmente esclarecida (HERSH *et al.*, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2008).

Dessa forma, acredita-se que a ação anti-inflamatória dos AINES deve-se à inibição da COX-2, enquanto seus efeitos indesejáveis, principalmente os que afetam o trato gastrointestinal, resultem de sua inibição da COX-1 (KUMMER; COELHO, 2002).

O maior grupo dos AINES é pertencente à classe dos ácidos arilalcanoicos, cuja estrutura está representada na Figura 1.

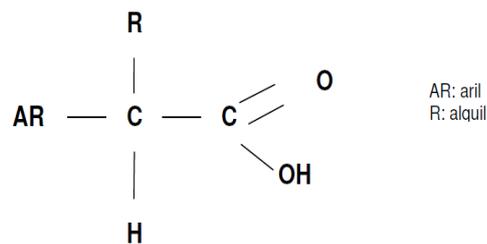


Figura 1 – Representação estrutural dos ácidos arilalcanoicos

São pertencentes a este grupo fármacos como indometacina, sulindaco, diclofenaco sódico, ibuprofeno, tolmetina e cetoprofeno. Tendo em vista a relação estrutura atividade desta classe de compostos, todos os agentes possuem um centro ácido (função carboxílica), o qual apresenta uma relação de similaridade com a função ácido carboxílico presente no ácido araquidônico. A substituição de um grupo metila no carbono 2, aumenta a atividade anti-inflamatória, além de formar um centro quiral. Esses compostos de ácido propiônico substituído, com alta potência anti-inflamatória são denominados profenos (BORNE, 1998).

O cetoprofeno, ácido [2-(3-benzoilfenil) propanoico] (Figura 2) é um dos mais potentes AINES. Apresenta-se como um pó branco ou quase branco, praticamente insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos como acetona e etanol e possui pKa de 4,76 (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; SHENG *et al.*, 2006). Seu mecanismo de ação está fundamentado na inibição reversível da enzima ciclo-oxigenase, por competir com seu substrato, o ácido araquidônico, resultando na inibição da síntese de prostaglandinas (PGE2 e PGF2). Diferente dos outros AINES, o cetoprofeno, além de inibir a síntese de prostaglandinas, também inibe a síntese de leucotrienos e estabiliza as membranas lisossômicas contra a alteração osmótica, impedindo a liberação de mediadores da inflamação, resultando em uma menor destruição tecidual. Além disso, tem sido relatada uma atividade inibitória sobre a bradicinina, um importante mediador da dor e da inflamação (ASHVINI *et al.*, 2011).

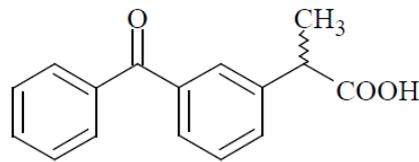


Figura 2 – Estrutura química do cetoprofeno (ácido [2-(3-benzoilfenil) propanoico]).

Com relação à farmacocinética, o cetoprofeno é rapidamente absorvido pela via oral, com pico plasmático entre 0,5-2 horas. Apresenta alta ligação a proteínas plasmáticas (99%) e é metabolizado em sua menor parte por hidroxilação e a maior parte pela conjugação com o ácido glicurônico (FRANÇA; KOROLKOVAS, 2006).

O cetoprofeno é indicado para o tratamento em longo prazo da artrite reumatóide e osteoartrite. Também possui indicação no tratamento de dores musculares, tendinites, dismenorreia, entre outros processos inflamatórios. A dose comumente empregada por via oral situa-se entre 50 e 300 mg (dose máxima diária). Apesar de sua eficácia no tratamento da dor aguda e crônica ser bem reconhecida, sua administração é acompanhada por alguns efeitos colaterais (FRANÇA; KOROLKOVAS, 2006).

A principal limitação ao emprego terapêutico do cetoprofeno está relacionada aos efeitos lesivos no trato gastrointestinal. Seus efeitos adversos podem ser atribuídos ao contato direto do fármaco com a mucosa gástrica e por ação sistêmica, após absorção. A irritação local causada pelo contato direto com a mucosa está relacionada com a ionização do fármaco. Por serem ácidos orgânicos fracos, os AINES, em pH baixo, tornam-se moléculas não-ionizadas com características apolares, o que lhes permite atravessar a membrana mucosa e acumular-se nas células epiteliais. Com a mudança de pH ácido para neutro no interior da mucosa, o fármaco torna-se ionizado acumulando-se no interior das células epiteliais, causando danos às mesmas. Entretanto, esse dano “tópico” não parece ser fundamental para a patogênese da sintomatologia ulcerosa, motivo pelo qual, mesmo a administração intramuscular ou intravenosa dos AINES pode causar úlceras gástricas ou duodenais (FIORUCCI *et al.*, 2001).

Por sua vez, a atividade sistêmica compreende a inibição da COX-1 gástrica, que é responsável pela síntese das prostaglandinas. Estes eicosanóides agem inibindo a secreção ácida pelo estômago, aumentando o fluxo sanguíneo na mucosa gástrica e promovendo a secreção de muco citoprotetor. A inibição da sua síntese, portanto, acarreta ao estômago uma

maior suscetibilidade às lesões. Porém, estudos com camundongos que apresentavam deficiência destas enzimas, demonstraram que as ciclo-oxigenases não estão exclusivamente relacionadas com os efeitos adversos dos AINES. Além disso, observou-se que os fármacos COX-2 seletivos demonstraram uma baixa redução da ação lesiva. Estas informações sugerem que há um mecanismo independente da inibição da COX, como a indução da liberação do fator de necrose tumoral alfa, o qual pode dirigir células da membrana gástrica a apoptose (FIORUCCI *et al.*, 2001; MIZUSHIMA, 2010).

3.2 Nanopartículas Poliméricas

Há diferentes tipos de nanocarreadores tais como nanocápsulas, nanoesferas, complexos lipídicos, micelas poliméricas e dendrímeros, conforme demonstrado na Figura 3 (TORCHILIN, 2001; HUGHES, 2005; RAWAT, 2006; AMIJI, 2007; PARK, 2007; JABR-MILANE *et al.*, 2008).

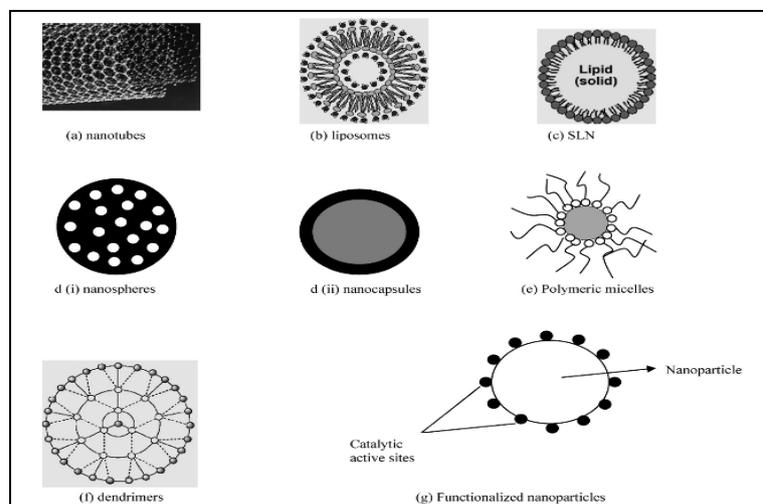


Figura 3 – Diferentes tipos de carreadores

Legendas: (a) Nanotubos. (b) Lipossomas: vesículas com um núcleo aquoso envolvido por uma membrana lipídica. (c) Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN): carreadores coloidais submicrométricos formados a partir de lipídeos sólidos. (d) Nanopartículas poliméricas. (i) Nanoesferas: Nanopartículas com fármaco disperso em uma matriz polimérica. (ii) Nanocápsulas: nanopartículas com fármaco envolto por uma membrana polimérica. (e) Micelas poliméricas: co-polímeros em bloco, anfifílicos associados em solução aquosa. (f) Dendrímeros: série repetida de compostos macromoleculares que formam uma cavidade em seu interior. (g) Nanopartículas funcionalizadas: partículas monodispersas, de forma e tamanho uniformes com composição superficial definida (Adaptado de RAWAT, 2006).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam tamanho inferior a 1 μm . As nanopartículas podem ser classificadas em nanocápsulas e nanoesferas, diferindo entre si pela sua organização estrutural (Figura 4). As nanocápsulas podem ser definidas como sistemas nano-vesiculares que apresentam uma estrutura “parede-núcleo”, podendo o fármaco estar confinado no núcleo (aquoso ou oleoso) e/ou adsorvido à parede polimérica. Por sua vez, as nanoesferas, isentas de óleo em sua composição, são constituídas por uma matriz polimérica, na qual o fármaco pode estar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK et al., 2003; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

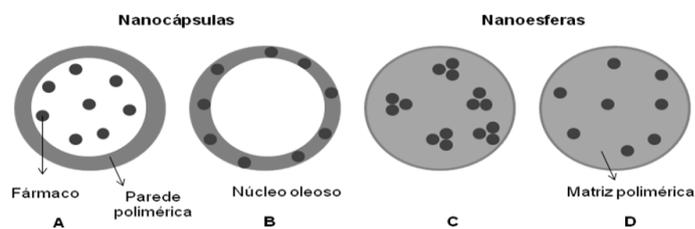


Figura 4 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas

Legendas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso; b) fármaco adsorvido à parede polimérica; c) fármaco retido na matriz polimérica; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente à matriz polimérica.

Entre as vantagens das nanopartículas poliméricas como carreadores de fármacos, destacam-se: a) capacidade de aumentar o efeito terapêutico da substância ativa, sem ocasionar alterações na molécula; b) aumento da eficácia terapêutica de fármacos, por vetorizar a liberação destes em alvos celulares específicos; c) tamanho submicrométrico, o que permite a liberação do fármaco através de uma série de barreiras, incluindo a endotelial; d) liberação controlada ou sustentada de fármacos, reduzindo os possíveis efeitos adversos destas substâncias; e) sistemas versáteis, ou seja, podem ser administrados por diversas vias (oral, nasal, pulmonar, parenteral e oftálmica) (KAMALY, 2012).

Tendo em vista suas inúmeras vantagens, as nanopartículas têm sido empregadas com sucesso em diversas áreas, tais como a vetorização de fármacos anticancerígenos, antibióticos, peptídeos ou proteínas e fármacos para uso oftálmico (BARENHOLZ, 2012; NECKEL; LEMOS-SENNA, 2005).

Com relação à administração oral de nanopartículas, novos sistemas de liberação vêm sendo desenvolvidos visando especialmente à diminuição dos efeitos colaterais de certos fármacos, destacando-se os anti-inflamatórios não-esteroides, os quais causam frequentemente irritação à mucosa gastrointestinal (MÜLLER *et al.*, 2004; FONSECA *et al.*, 2008; DOMINGUES *et al.*, 2008; BERNARDI *et al.*, 2009). Além disso, tais sistemas podem

ser desenvolvidos visando à proteção de fármacos degradáveis no trato gastrointestinal, como peptídeos, proteínas e/ou hormônios, aumentando a biodisponibilidade dos mesmos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

3.2.1 Métodos de preparação

As nanopartículas podem ser preparadas por diferentes métodos e geralmente apresentam tamanho entre 100 e 500 nm (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998). Os métodos mais usuais para a preparação de nanopartículas poliméricas envolvem a dispersão de polímeros pré-formados e a polimerização interfacial de monômeros dispersos (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010; RAO; GECKELER, 2011).

Várias técnicas podem ser utilizadas para a preparação de nanopartículas poliméricas, tais como evaporação de solvente, *salting-out*, fluido supercrítico, micro e mini-emulsão e polimerização interfacial (RAO; GECKELER, 2011). A escolha do método de preparação dependerá de vários fatores, tais como o tamanho da nanopartícula que se pretende obter, o qual deve ser compatível com a via de administração pretendida; solubilidade do fármaco (lipo ou hidrofílico) e natureza do polímero empregado. Também deve-se avaliar a toxicidade das matérias-primas envolvidas em cada método de obtenção das nanopartículas poliméricas (AGNIHOTRI *et al.*, 2004).

O método de polimerização de monômeros dispersos apresenta algumas desvantagens para a preparação de nanopartículas, como a geração de resíduos tóxicos provenientes dos monômeros, tensoativos residuais ou catalisadores empregados na reação (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998).

Por sua vez, a utilização de polímeros pré-formados previne o aparecimento de moléculas residuais resultantes do processo de polimerização (monômeros, oligômeros, precursores), as quais podem interagir com o fármaco durante a etapa de polimerização e, por exemplo, levar à desnaturação e inativação de peptídeos (LAMPRECHT *et al.*, 1999; REIS *et al.*, 2006; CHÉCOT-MOINARD *et al.*, 2008).

Incluído na classificação de dispersão de polímeros pré-formados encontra-se o método de deposição interfacial de polímeros pré-formados para a preparação de nanocápsulas, o qual foi empregado no desenvolvimento das formulações alvo de estudo deste trabalho.

A técnica de deposição interfacial, descrita inicialmente por Fessi e colaboradores em 1989, baseia-se na deposição interfacial de um polímero após o deslocamento de um solvente miscível com a água. A rápida difusão do solvente resulta na redução da tensão interfacial entre as duas fases, o que causa um aumento na área superficial e conduz à formação de pequenas gotículas de solvente orgânico. Esta técnica consiste em três componentes básicos: o polímero (natural, sintético ou semi-sintético), um solvente do polímero e um não-solvente do polímero. Solventes orgânicos (etanol, acetona, diclorometano) miscíveis com a água e de fácil remoção são empregados como solventes do polímero. Por esta razão, a acetona é frequentemente usada como solvente neste método (FESSI *et al.*, 1989; RAO; GECKELER, 2011).

Os demais constituintes da fase orgânica (substância ativa, polímero, óleo e tensoativo de baixo EHL) são dissolvidos para serem adicionados, sob agitação, a uma fase aquosa contendo um tensoativo de alto EHL. A formação das nanopartículas pode ser explicada pela turbulência interfacial durante a difusão dos solventes de diferente miscibilidade (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998). As gotículas do solvente de tamanho nanométrico são estabilizadas pelos tensoativos e o polímero precipita na interface óleo/água. O diâmetro médio das nanopartículas formadas situa-se entre 100 e 500 nm (FESSI *et al.*, 1989). As características físico-químicas das nanocápsulas obtidas por esta técnica são afetadas por um conjunto de parâmetros tecnológicos, que incluem a solubilidade do princípio ativo, a concentração do agente tensoativo e a natureza e volume do óleo (SOUTO *et al.*, 2012).

Como vantagens deste método pode-se citar a alta eficiência de encapsulamento para fármacos lipofílicos, alta reprodutibilidade e melhor controle do tamanho das partículas. Entre as desvantagens do método está a grande quantidade de solvente orgânico empregado, além da solubilidade das substâncias empregadas (devem ser lipossolúveis) (LEGRAND *et al.*, 1999).

A preparação de nanocápsulas implica na obtenção de uma solução oleosa, formada pela dissolução da substância ativa em um óleo adequado. Por esta razão, o óleo selecionado deverá ser um solvente adequado para o fármaco, de modo a prevenir a sua difusão e cristalização na fase externa aquosa, durante a preparação das nanocápsulas, e não deverá degradar o polímero. Podem ser utilizados óleos vegetais, parafina líquida ou misturas de triglicerídeos de cadeia média (TCM). As características físico-químicas das nanocápsulas obtidas por deslocamento do solvente são afetadas por um conjunto de parâmetros tecnológicos, que incluem a solubilidade do princípio ativo, a concentração do agente tensoativo e a natureza e volume do óleo (DOMB *et al.*, 2002; SOUTO *et al.*, 2011).

Os tensoativos não são essenciais para a formação das nanocápsulas, mas são importantes para a estabilização da suspensão, de forma a prevenir a aglomeração das partículas, durante o armazenamento (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998).

Para a preparação dos nanocarreadores poliméricos podem ser empregados polímeros naturais, sintéticos ou semi-sintéticos, sendo que o critério de seleção está condicionado à solubilidade da substância ativa a ser incorporada no sistema.

Os polímeros naturais, como peptídeos, proteínas e polissacarídeos (quitosana), apresentam a propriedade de bioadesão a mucosas como ocular, nasal, urinária, gastrintestinal e vaginal, proporcionando biocompatibilidade, biodegradabilidade e, conseqüentemente, maior disponibilidade da substância ativa administrada. No entanto, o processo de obtenção e purificação pode causar variação nos lotes, sendo esta uma desvantagem deste tipo de material (SEVERINO *et al.*, 2011).

Por sua vez, os polímeros sintéticos podem manifestar toxicidade quando degradados ou hidrolisados, mas mantém-se a reprodutibilidade em cada lote, sendo assim, mais seguros para a veiculação de fármacos (SEVERINO *et al.*, 2011).

Considerando os polímeros sintéticos comumente utilizados na preparação de nanocarreadores poliméricos, encontram-se os poliésteres biodegradáveis, especialmente a poli- ϵ -caprolactona (PCL), o poli(ácido láctico) (PLA) e o poli(ácido láctico-*co*-glicólico) (PLGA) (LAMPRECHT *et al.*, 2000a; 2000b; LU; CHEN, 2004). Poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) e poli- ϵ -caprolactona podem ser empregados também em formulações destinadas à via intravenosa (RAVI KUMAR, 2000).

Outra classe de polímeros bastante empregada na preparação de nanocarreadores poliméricos são os co-polímeros do ácido metacrílico e metacrilato de metila (Eudragit[®]), os quais destacam-se por sua solubilidade pH-dependente (Eudragit S100[®]) e por aumentar o tempo de residência de substâncias ativas no sítio de ação, devido às suas propriedades bioadesivas (Eudragit RS[®]). Entre os vários tipos, os polímeros Eudragit[®] S e L que se dissolvem, respectivamente, em valores de pH superiores a 7 e 6 são os mais empregados. Estes polímeros são resistentes ao pH gástrico, mas altamente solúveis no meio intestinal alcalino, modulando assim a liberação de fármacos (DITGEN *et al.*, 1997).

3.2.2 Caracterização Físico-Química

Uma etapa posterior à preparação das nanopartículas, porém, não menos importante, diz respeito à caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados. Os parâmetros mais estudados são: morfologia, distribuição de tamanho, potencial zeta, pH, teor e eficiência de encapsulamento. Uma avaliação completa inclui a determinação da cinética de liberação *in vitro* do fármaco. As informações obtidas na etapa de caracterização são de grande importância para a proposição de modelos de sua organização em nível molecular, bem como a elucidação do mecanismo de associação de fármacos a essas partículas nanométricas. Porém, tal caracterização é tecnicamente difícil tendo em vista a natureza coloidal das partículas, sendo necessária a combinação de diversas técnicas de análise (MAGENHEIN; BENITA, 1991; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Macroscopicamente, as suspensões coloidais apresentam um reflexo azulado (efeito Tyndall), o qual resulta do movimento Browniano das partículas em um meio líquido. Para a determinação do tamanho de partícula, o método mais indicado é a espectroscopia de correlação de fótons (PCS), o qual indica a distribuição de tamanho das nanoestruturas, essencial para a caracterização das formulações. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) torna-se importante quando se deseja obter uma imagem da partícula isolada do meio (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; COUVREUR *et al.*, 2002).

Quanto à análise da superfície das nanopartículas, a medida do potencial zeta torna-se uma ferramenta muito útil, uma vez que este reflete o potencial de superfície das partículas através de técnicas de eletroforese. O potencial zeta das nanopartículas depende principalmente da natureza química do polímero e do tensoativo e do pH do meio. Quando nanocápsulas são preparadas empregando-se poliésteres ou metacrilatos usando tensoativos não-iônicos, obtêm-se valores de potencial zeta negativos devido à presença de grupos carboxílicos terminais. Todavia, valores positivos são obtidos quando são utilizados polímeros catiônicos e agentes estabilizantes não-iônicos. Quanto maiores os valores de potencial zeta (em módulo), mais estável é o sistema, ou seja, menor é a tendência de que ocorram fenômenos de agregação e sedimentação das nanopartículas dispersas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; FESSI; ELAISSARI, 2010).

A determinação do potencial zeta também tem importância na elucidação do mecanismo de associação do fármaco às nanopartículas e na proposição de organização destas. Um exemplo disto foi o trabalho desenvolvido por Calvo e colaboradores (1996), no

qual observaram os efeitos da composição das formulações sobre o potencial zeta. Verificou-se que a presença do óleo nas nanocápsulas conferiu a estas um potencial zeta mais negativo do que as nanoesferas, sugerindo que a camada polimérica ao redor do núcleo oleoso seria um filme polimérico delgado. Por outro lado, Mosqueira e colaboradores (2000), demonstraram que o óleo estaria totalmente encapsulado, pois não observaram alteração do potencial de superfície das partículas em função da natureza do núcleo oleoso.

A análise potenciométrica do pH das suspensões também torna-se importante para mensurar a estabilidade do sistema, já que alterações significativas do pH em função do tempo podem indicar uma possível degradação polimérica ou oxidação de componentes da formulação (LEGRAND *et al.*, 1999; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A determinação do teor de fármaco presente nas nanopartículas é fundamental, porém complexa, pela necessidade de separar o fármaco livre do associado, devido a natureza coloidal do sistema. O teor total de fármaco é determinado pela completa dissolução das nanopartículas em solvente adequado (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A eficiência de encapsulamento é determinada após a separação do fármaco livre da parcela incorporada à nanopartícula. Para as nanocápsulas, a técnica de separação mais empregada é a ultrafiltração-centrifugação, a qual consiste no emprego de uma membrana de porosidade definida (10 kDa), permitindo a separação entre a fase aquosa dispersante e a fração de nanopartículas, sendo o fármaco livre quantificado no ultrafiltrado (FESSI *et al.*, 1989; MAGENHEIM; BENITA, 1991; GUTERRES *et al.*, 1995). O teor de fármaco associado às nanoestruturas é calculado pela diferença entre o total de fármaco contido na suspensão e a quantidade de fármaco livre no ultrafiltrado (GUTERRES *et al.*, 2000).

A caracterização completa dos sistemas nanoestruturados envolve a determinação da cinética de liberação *in vitro* do fármaco a partir das nanopartículas. Diversos fatores modulam a liberação do fármaco a partir dos sistemas nanoparticulados poliméricos, tais como a dessorção do fármaco da superfície das nanopartículas; a difusão através da matriz das nanoesferas ou da parede polimérica das nanocápsulas; a erosão da matriz polimérica ou uma combinação dos processos de difusão e erosão (SOPPPIMATH *et al.*, 2001; CRUZ *et al.*, 2006). Métodos baseados na difusão em membranas de diálise e a separação por ultracentrifugação tem sido utilizados com o intuito de avaliar o perfil cinético de liberação do fármaco associado às nanoestruturas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUPTA *et al.*, 2010).

3.2.3 Liberação de fármacos a partir de sistemas nanoparticulados

Formulações de liberação controlada de fármacos apresentam muitas vantagens que superam as formas convencionais, tais como redução da frequência de doses, diminuição dos efeitos adversos, maior atividade farmacológica e efeito terapêutico prolongado (ZHANG *et al.*, 2003).

O processo de difusão é consideravelmente lento quando se trata de sistemas macroscópicos. Por outro lado, o processo ocorre rapidamente para sistemas submicrométricos, com tempos de liberação na ordem de horas ou minutos para partículas na faixa de tamanho nanométrico. Neste caso, o carreador mantém sua integridade estrutural, pois a liberação do fármaco resulta somente de uma alteração no equilíbrio de partição entre a partícula e a fase contínua. Ainda sobre difusão, o solvente pode entrar na partícula (através de poros ou hidratação) e dissolver o fármaco, o qual difundirá para o meio. Este processo é denominado transporte caso-II, difusão não-Fickiana ou anômala (WASHINGTON, 1990).

Por outro lado, a erosão da matriz polimérica decorre de processos que resultam na hidrólise e desorganização das cadeias de polímero, promovendo a passagem do fármaco para o meio de liberação (ZHANG *et al.*, 2003).

Vários métodos foram propostos para estudar a liberação de fármacos *in vitro*, baseados na difusão por membranas (biológicas ou artificiais) (LOSA *et al.*, 1993; CALVO *et al.*, 1996), ultracentrifugação (FONTANA *et al.*, 1998; GREF *et al.*, 2001) ou ultrafiltração-centrifugação (LOPES *et al.*, 2000). Entretanto, ainda existem algumas dificuldades técnicas para estudar a liberação de fármacos *in vitro*, como a separação das nanopartículas do meio de liberação. Neste aspecto, a técnica de diálise tem sido muito utilizada, pois neste método a suspensão é adicionada a membranas de diálise com tamanho de poro definido, impedindo a passagem da nanoestrutura para o meio de liberação, permitindo somente a quantificação do fármaco no meio (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O perfil de liberação de fármacos a partir de nanopartículas depende da natureza do sistema. No caso de um sistema matricial, como as nanoesferas o fármaco está distribuído uniformemente e a liberação ocorre por difusão ou erosão da matriz. Uma rápida liberação inicial pode ser atribuída à fração do fármaco adsorvida na superfície das nanopartículas. Em seguida, uma taxa de liberação exponencial pode ser observada, devido à difusão do fármaco a partir da matriz. Este mecanismo de liberação descreve uma cinética de primeira ordem. No caso das nanocápsulas (sistema reservatório), o fármaco está envolto pelo polímero e a

liberação ocorre por difusão através da parede polimérica. Assim, teoricamente, a liberação segue uma cinética de ordem zero (SOPPIMATH *et al.*, 2001; GRASSI; GRASSI, 2005).

Em um estudo de Calvo e colaboradores (1996) foram avaliados os perfis de liberação corneal da indometacina a partir de diferentes carreadores: nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões. Os resultados demonstraram perfis de liberação semelhantes para todas as formulações, sendo que o fármaco foi completamente liberado em 4 horas. A similaridade entre os perfis de liberação de nanocápsulas e nanoemulsões evidenciou que o revestimento polimérico não teve influência na liberação. Porém, a partição do fármaco entre as gotículas de óleo e o meio aquoso foi o fator determinante na liberação da indometacina a partir das nanocápsulas e nanoemulsões. Por outro lado, a rápida liberação a partir das nanoesferas ocorreu, possivelmente, devido à difusão do fármaco através da parede polimérica, visto que a baixa temperatura de transição vítrea ($T_g = -60\text{ }^\circ\text{C}$) torna a poli- ϵ -caprolactona altamente permeável a fármacos de baixo peso molecular, como a indometacina.

O mecanismo descrito acima também foi observado em outro estudo. Lopes e colaboradores (2005) avaliaram o perfil de liberação do antitumoral camptotecina, em nanocápsulas de PLA e nanocápsulas de PLA funcionalizadas com polietilenoglicol (PLA-PEG). A cinética de liberação da camptotecina a partir das nanocápsulas foi avaliada pelo método da difusão através de membranas de diálise. A rápida difusão da camptotecina livre para o meio de liberação, alcançando cerca de 50% em 5 horas, sugere que a presença da membrana polimérica das nanocápsulas retardou a liberação do fármaco. Porém, verificou-se que o perfil de liberação não variou significativamente em função da natureza do polímero, concluindo que o fenômeno de partição da camptotecina entre o núcleo oleoso e o meio aquoso das partículas, e entre este e o meio de liberação, provavelmente é o fator que governa a liberação, embora a presença da parede polimérica tenha retardado a liberação do fármaco.

No entanto, em um estudo de liberação da albumina sérica bovina a partir de nanocápsulas de PLA, foi relatado que o revestimento polimérico teve influência sobre a liberação, indicando que a difusão através da parede polimérica foi o mecanismo determinante neste caso (LU *et al.*, 1999).

O perfil de liberação da primidona a partir de nanocápsulas de PCL contendo benzoato de benzila como núcleo oleoso, foi avaliado através da técnica de ultrafiltração-centrifugação em fluido gástrico e intestinal simulado. Para fins comparativos, formulou-se uma dispersão do fármaco em óleo (controle), na qual a liberação da primidona foi completa em 8 h de experimento. No mesmo intervalo de tempo, a liberação do fármaco a partir das nanocápsulas em pH 7,4 e pH 1,25 foi de 76% e 83%, respectivamente. Segundo os autores, uma possível

explicação para a menor quantidade de primidona liberada a partir das nanocápsulas, seria a interação entre o fármaco e o polímero. Por outro lado, a rápida liberação nas primeiras horas de experimento (efeito *burst*) sugere que parte do fármaco estaria adsorvido na superfície das nanocápsulas. Além disso, observou-se que o pH do meio não influenciou o perfil de liberação do fármaco (FERRANTI *et al.*, 1999).

3.3 Associação de aines a nanopartículas poliméricas

Existem vários trabalhos citados na literatura referentes a estudos realizados com anti-inflamatórios associados aos sistemas coloidais, demonstrando a sua eficácia terapêutica e tecnológica. Dentre eles, pode-se citar a nimesulida, a indometacina, o piroxicam, o diclofenaco e o ibuprofeno (GUTERRES *et al.*, 1995; POHLMANN *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2002; MÜLLER *et al.*, 2004; ALVES *et al.*, 2005; POHLMANN *et al.*, 2007; DOMINGUES *et al.*, 2008; FONSECA, 2008). Porém, existem poucos relatos na literatura sobre a associação do cetoprofeno a sistemas nanoestruturados.

Guterres e colaboradores (1995) prepararam nanocápsulas de poli(ácido láctico) contendo diclofenaco e avaliaram a estabilidade das mesmas durante o armazenamento a temperatura ambiente. Parâmetros como o pH, tamanho de partícula, teor de fármaco (total e encapsulado) e peso molecular do polímero foram determinados em intervalos definidos (0, 1, 3, 6 e 8 meses). Observou-se que os sistemas mantiveram-se estáveis independentemente do óleo empregado na formulação (benzoato de benzila ou Miglyol 810[®]), porém a degradação do polímero ocorreu mais rapidamente na presença do benzoato de benzila como núcleo oleoso das nanocápsulas, resultando em um decréscimo dos valores de pH. Verificou-se também que a concentração de diclofenaco não afetou o pH das suspensões. Sistemas estáveis foram preparados utilizando 0,75% de tensoativo lipofílico, uma concentração consideravelmente menor que as anteriormente descritas na literatura para este tipo de colóide.

Em outro estudo, Cetin e colaboradores (2010) desenvolveram e caracterizaram nanopartículas de Eudragit L100[®] e Eudragit L100[®]/PLGA contendo diclofenaco sódico preparadas pelo método de nanoprecipitação. As nanopartículas apresentaram-se esféricas quando analisadas por microscopia de força atômica. A faixa de tamanho, determinada por espectroscopia de correlação de fótons, foi de 241-274 nm. Eficiências de encapsulamento

relativamente baixas (26-68%) foram obtidas por se tratar de um fármaco hidrofílico. Os perfis de liberação das formulações demonstraram um efeito *burst*, com uma liberação inicial do fármaco superior a 30% em 4 horas. Para as formulações de Eudragit L100[®], praticamente todo o fármaco foi liberado em 12 h de experimento. Por outro lado, as nanopartículas constituídas pela blenda polimérica foram capazes de promover uma liberação sustentada do fármaco em 72 horas. A extensão da liberação foi dependente da quantidade de Eudragit L100[®], aumentando quanto maior a proporção deste polímero na blenda.

A degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas de PCL foi alvo de investigação de um estudo conduzido por Müller e colaboradores (2004). Verificou-se uma redução do teor de diclofenaco nas suspensões de nanocápsulas e seus produtos secos por aspersão, devido à formação simultânea de nanocristais durante a formulação e também ao início da degradação do fármaco. Esta redução mostrou-se dependente do tipo e da concentração do sistema tensoativo utilizado no preparo das formulações, sendo que a presença de Epikuron 170[®] em concentração superior a 3,06 mg/mL preveniu a diminuição do teor e o aparecimento de produtos de degradação. A exposição das suspensões e dos pós correspondentes à luz UVC, confirmaram a estabilização do diclofenaco promovida pelo tensoativo. A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas permitiu a identificação de dois produtos de degradação do diclofenaco nas formulações preparadas com baixa concentração ou ausência de Epikuron 170[®].

Nanocápsulas de poli (D,L-ácido láctico) contendo diclofenaco na forma ácida foram preparadas por Guterres e colaboradores (1995). A avaliação da toxicidade gastrintestinal destas formas, em ratos, demonstrou uma significativa proteção da mucosa gastrintestinal após a administração do fármaco nanoencapsulado, quando comparada com a administração de uma solução aquosa deste fármaco. Os mesmos resultados foram observados por Müller e colaboradores (2001), quando foram avaliadas suspensões de nanoesferas de PCL contendo diclofenaco na forma ácida. Guterres e colaboradores (2001) também avaliaram a toxicidade gastrintestinal de formas sólidas obtidas a partir secagem por aspersão das suspensões de nanocápsulas e nanoesferas de PCL, contendo diclofenaco. O estudo demonstrou que os produtos secos apresentaram um efeito protetor da mucosa gastrintestinal. Schaffazick (2001) avaliou a toxicidade gastrintestinal de nanopartículas liofilizadas contendo diclofenaco. Os liofilizados de nanoesferas ou nanocápsulas também apresentaram um efeito protetor sobre a mucosa gastrintestinal.

Kheradmandnia e colaboradores, em 2010, formularam e caracterizaram nanopartículas lipídicas sólidas preparadas a partir de uma mistura de cera de abelha e cera de

carnaúba. Demonstrou-se uma eficiência de encapsulamento de 97% para o cetoprofeno, indicando uma boa compatibilidade do fármaco com o núcleo lipídico das nanopartículas. De acordo com os autores, a curta meia-vida, a baixa solubilidade em água, a baixa biodisponibilidade e os efeitos adversos no trato gastrointestinal, tornam o cetoprofeno um bom candidato para a formulação de formas farmacêuticas de liberação controlada.

Em um trabalho de Sakeena e colaboradores (2010), foram preparadas nanoemulsões de ésteres do óleo de palma contendo cetoprofeno visando à aplicação tópica. As nanoemulsões contendo o fármaco foram comparadas com um produto comercial, Fastum[®] Gel. Os estudos da atividade anti-inflamatória e analgésica foram conduzidos em ratos através da avaliação do edema de pata induzido por carragenina a fim de comparar as formulações nanoparticuladas com o produto comercial. Através dos estudos realizados, os autores concluíram que não houve diferenças significativas entre as nanoemulsões contendo cetoprofeno e o produto comercial, destacando a viabilidade do desenvolvimento de formulações nanoestruturadas para a liberação tópica do cetoprofeno.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Matérias-primas

- a) Cetoprofeno (Henrifarma – São Paulo);
- b) Monoestearato de sorbitano (Span 60[®]) (Delaware - Porto Alegre);
- c) Monooleato de sorbitano (Span 80[®]) (Sigma Aldrich - São Paulo);
- d) Polissorbato 80 (Tween 80[®]) (Delaware - Porto Alegre);
- e) Triglicerídeos de cadeia média (Delaware - Porto Alegre);
- f) Óleo de rosa mosqueta (Qualithá – Santa Maria);
- g) Eudragit S100[®] (Co-polímero do ácido metacrílico e metacrilato de metila) (Degussa – São Paulo).

4.1.2 Aparelhos e Equipamentos

- a) Evaporador rotatório (Fisatom – São Paulo);
- b) Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência (HPLC Shimadzu LC-10A - Japão);
 - Bomba LC-20 AT
 - Controlador CBM-20A
 - Válvula de injeção manual (Rheodyne)
 - Pré-coluna (SecurityGuard C₁₈ 4 x 3.0 mm)
 - Coluna Gemini C₁₈ (150 x 4,60 mm, 5µm, Phenomenex – EUA)
 - Detector UV-VIS SPD-M20A
- c) Potenciômetro modelo pH21 (Hanna Instruments, Brasil);
- d) Balança analítica (Shimadzu - Japão);
- e) Câmara de fotoestabilidade (Lâmpada Phillips – UVC, 30 W);
- f) Agitador magnético TE-0851 (Tecnal - São Paulo); 752-A (Fisatom – São Paulo);

g) Microcentrífuga (Sigma - Alemanha).

4.1.3 Solventes e outros materiais

- a) Acetona P.A. (Nuclear - São Paulo; Quimex - Porto Alegre);
- b) Metanol (grau HPLC) (Tedia - São Paulo);
- c) Ácido acético glacial P.A. (Impex - São Paulo);
- d) Membrana de celulose regenerada 0,45 μ m (Sartorius - EUA);
- e) Dispositivo de ultrafiltração/centrifugação (Amicon Ultra[®] 10,000 MW, Millipore - EUA).

4.1.4 Avaliação in vitro da citotoxicidade

- a) Meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), fungizone, penicilina/estreptomicina, tripsina/EDTA e albumina bovina sérica (Gibco BRL, EUA);
- b) Dimetilsulfóxido (Sigma Aldrich, São Paulo);
- c) Linhagem celular 3T3 (American Type Culture Collection, Carsbald, EUA);
- d) Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma Aldrich, São Paulo);

4.2 Métodos

4.2.1 Validação da metodologia analítica por CLAE para determinação do cetoprofeno nos sistemas nanoestruturados

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi o método empregado para a quantificação do cetoprofeno nas formulações nanoestruturadas.

A fase móvel foi constituída por metanol/água (70/30, v/v), tendo seu pH ajustado a 3,0 com ácido acético a 10%. O fluxo empregado foi de 1 mL/min e o volume de injeção foi

de 20 µL. O comprimento de onda de detecção para o cetoprofeno foi de 254 nm. As condições cromatográficas foram estabelecidas segundo o método de Najmuddin e colaboradores (2010).

O método foi previamente validado através da avaliação dos seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão intermediária, repetibilidade, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, conforme a Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003).

O parâmetro de especificidade foi determinado através da análise dos cromatogramas obtidos para as suspensões de nanocápsulas isentas do fármaco (brancas) em comparação com os obtidos para as formulações contendo cetoprofeno. A presença de detector de arranjo de diodos possibilitou a determinação da pureza do pico cromatográfico, descartando a interferência dos excipientes na quantificação do fármaco ou uma possível degradação deste durante a análise.

Para a obtenção da curva analítica do cetoprofeno (linearidade), foram escolhidos 6 pontos com as seguintes concentrações: 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 e 15,0 µg/mL. Essas soluções foram obtidas a partir de diluições de uma solução-mãe de concentração 1 mg/mL, sendo que as alíquotas foram diluídas com metanol para um volume final de 10 mL. As amostras foram injetadas em cromatógrafo sob as condições citadas anteriormente.

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade e da precisão intermediária. Para a determinação da repetibilidade, foram preparadas seis diluições da amostra na concentração de trabalho (9 µg/mL) e estas analisadas por CLAE em um único dia. A precisão intermediária foi avaliada da mesma forma, porém em três dias consecutivos.

O parâmetro exatidão foi avaliado através do método do placebo contaminado. O método consistiu da adição de alíquotas de uma solução contendo o fármaco a uma formulação branca. Foram realizadas nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três níveis de concentração (baixa, média e alta). Os resultados foram expressos em termos de recuperação da substância ativa adicionada.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados diretamente a partir da inclinação (σ) e do desvio padrão do intercepto (DP), obtidos a partir das curvas analíticas. Os limites de detecção e de quantificação foram expressos, respectivamente através das Equações 1 e 2.

$$LD = 3,3\sigma/S \quad (1)$$

$$LQ = 10\sigma/S \quad (2)$$

Onde σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo y (b); e S é a média do coeficientes angulares (a) das curvas analíticas.

4.2.2 Teste de inchamento/dissolução de filmes poliméricos

Para a obtenção dos filmes poliméricos, foram dispersos aproximadamente 2 g de Eudragit S100[®] em 10 mL de acetona. Após a evaporação do solvente, o filme foi dividido em fragmentos pesando cerca de 100 mg. A seguir, os filmes foram imersos no óleo a ser empregado no preparo das formulações (triglicerídeos de cadeia média ou óleo de rosa mosqueta). Em intervalos de tempo pré-definidos, os filmes foram retirados do contato com o óleo e pesados a fim de verificar alterações na massa do polímero decorrentes de sua interação com o óleo.

4.2.3 Preparação das suspensões de nanocápsulas

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas em triplicata pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989), de acordo com a composição de fases descrita na Tabela 1. Uma fase orgânica constituída de acetona, do polímero (Eudragit S100[®]), do óleo (triglicerídeos de cadeia média ou óleo de rosa mosqueta), de um tensoativo de baixa hidrofília (Span 60 ou Span 80) e do fármaco foi mantida sob agitação magnética e aquecimento 40°C até a completa dissolução de seus componentes. Separadamente, uma fase aquosa foi preparada sob agitação magnética através da dispersão de um tensoativo de alta hidrofília (Polissorbato 80) em água. Após, a fase orgânica foi vertida na fase aquosa e a mistura permaneceu sob agitação durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, a acetona foi eliminada e a água concentrada por evaporação sob pressão reduzida em rotaevaporador. O volume final foi ajustado para 10 mL. Para fins comparativos, foram preparadas formulações sem adição do fármaco (nanocápsulas brancas - NCB).

Tabela 1 – Composição quali-quantitativa das diferentes formulações de nanocápsulas.

Composição	NC¹-TCM	NC²-TCM	NC¹-ORM	NC²-ORM
Fase orgânica				
Acetona (mL)	27	27	27	27
Eudragit S100 ^{®*} (g)	0,1	0,1	0,1	0,1
TCM ^{**} (µL)	330	330	-	-
Óleo rosa mosqueta	-	-	330	330
Cetoprofeno (g)	0,01	0,01	0,01	0,01
Span 60 (g)	0,077	-	0,077	-
Span 80 (g)	-	0,077	-	0,077
Fase aquosa				
Água (mL)	53	53	53	53
Tween 80 (g)	0,077	0,077	0,077	0,077

*Co-polímero do ácido metacrílico, solúvel em pH alcalino.

**Mistura de triglicerídeos de cadeia média.

4.2.4 Caracterização das suspensões de nanocápsulas

4.2.4.1 Determinação do teor de cetoprofeno nas formulações

A determinação da concentração de cetoprofeno nas formulações foi realizada por CLAE após a extração do fármaco presente nas nanopartículas poliméricas. Para isso, retirou-se uma alíquota da suspensão correspondente à concentração de 9,0 µg/mL, a qual foi diluída em metanol (q.s.p. 10mL). As amostras foram filtradas em membrana (0,45 µm) e analisadas quanto ao seu teor.

4.2.4.2 Determinação do pH

O pH foi determinado diretamente nas suspensões de nanocápsulas mediante a utilização de potenciômetro previamente calibrado com soluções-tampão de pH 4,0 e 7,0. As determinações para cada formulação foram realizadas em triplicata.

4.2.4.3 Determinação do tamanho de partícula das suspensões coloidais

O tamanho de partícula e a distribuição de tamanho foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) em Zetasizer[®] Nano, após diluição das amostras em água ultra-pura. As medidas são resultantes do espalhamento de luz causado pela presença de partículas em um meio líquido. A partir do movimento Browniano, tais partículas geram um determinado raio hidrodinâmico que é detectado por flutuações da luz incidente. A distribuição de tamanho das partículas foi determinada pelo índice de polidispersão (PDI), o qual é medido pela extensão da distribuição do tamanho das vesículas na amostra (MULLER *et al.*, 2004). As leituras foram realizadas em triplicata.

4.2.4.4 Determinação do Potencial Zeta das partículas

O potencial Zeta foi determinado por mobilidade eletroforética em Zetasizer[®] Nano após a diluição das amostras em NaCl 10 mM ($n=3$).

4.2.4.5 Eficiência de Encapsulamento

Para a determinação da concentração de fármaco livre (cetoprofeno não-associado), as nanopartículas foram submetidas à técnica de ultrafiltração-centrifugação (Amicon[®] 10000 MW, Millipore). A concentração de cetoprofeno no ultrafiltrado foi determinada por CLAE, sob as condições cromatográficas anteriormente descritas. A eficiência de encapsulamento (%) foi calculada pela diferença entre as concentrações total e livre, conforme a equação abaixo:

$$EE = \frac{\text{Teor total} - \text{Teor livre}}{\text{Teor total}} \times 100 \quad (3)$$

4.2.5 Perfil de liberação *in vitro*

A avaliação do perfil de liberação *in vitro* do cetoprofeno a partir das nanopartículas foi realizada utilizando-se a técnica de difusão em sacos de diálise. Uma alíquota de 1,5 mL da suspensão de nanocápsulas foi transferida para o interior da membrana de diálise, a qual, após o seu fechamento, foi colocada em um béquer contendo 150 mL de meio intestinal simulado (tampão fosfato pH 6,8). Este sistema foi mantido em banho termostaticado a 37°C sob agitação. Em intervalos de tempo pré-determinados (0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 e 480 min) alíquotas de 1 mL do meio de liberação foram coletadas e analisadas por CLAE, segundo condições cromatográficas previamente estabelecidas no estudo. O volume retirado foi imediatamente repostado com o meio de liberação, a fim de manter a condição *sink*, ou seja, a não saturação do meio de liberação. O ensaio foi realizado em triplicata para todos os tipos de formulações nanoestruturadas contendo cetoprofeno, assim como para o fármaco livre. A modelagem matemática dos dados foi empregada para analisar os perfis de liberação do fármaco livre e nanoencapsulado.

4.2.6 Modelagem Matemática dos Perfis Cinéticos

A descrição matemática das curvas cinéticas foi realizada pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo monoexponencial (Equação 4).

$$C = C_0 e^{-kt} \quad (4)$$

Onde: C é a concentração no tempo t ; C_0 representa a concentração inicial e k é a constante cinética.

Com a finalidade de elucidar o mecanismo de liberação do fármaco a partir dos sistemas em estudo, foi aplicado o modelo da Lei da Potência (Equação 5). Este modelo relaciona a liberação do fármaco com o tempo através da seguinte equação:

$$f_t = a.t^n \quad (5)$$

Onde: a é uma constante que incorpora características estruturais e geométricas da formulação; n é o expoente de liberação, indicativo do mecanismo de liberação do fármaco; e a função de t é a liberação fracional do fármaco (SIEPMANN e PEPPAS, 2001).

O valor de n foi utilizado para caracterizar o mecanismo de liberação, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 – Mecanismos de liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos de diferentes geometrias.

Expoente de liberação (n)			Mecanismo de liberação do fármaco
Filmes	Cilindros	Esferas	
0,5	0,45	0,43	Difusão Fickiana
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Transporte anômalo
1,0	$> 0,89$	$> 0,85$	Transporte caso II
$> 1,0$			Transporte Super-caso II

A modelagem dos perfis cinéticos obtidos foi realizada através do programa Micromath Scientist[®], a partir do qual foram considerados o coeficiente de correlação e a análise visual do gráfico como parâmetros para indicadores de bom ajuste ao modelo matemático.

4.2.7 Estudo de fotoestabilidade do cetoprofeno nas suspensões

A fotodegradação do cetoprofeno foi avaliada usando uma lâmpada artificial UVC. Para a condução do estudo, uma dispersão de tensoativos ou suspensão de nanocápsulas NC²-TCM e NC²-ORM (200 μ L em cubeta de quartzo de 10 cm), foram expostas à radiação UVC por 6 horas a uma distância fixa de 10 cm ($n=3$). Após a exposição durante 6 horas, foram retiradas alíquotas de 90 μ L de cada amostra, as quais foram diluídas em metanol (q.s.p. 10 mL em balão volumétrico) para análise por CLAE. O mesmo procedimento também foi realizado para as amostras protegidas da luz, a fim de refutar a hipótese de degradação térmica.

4.2.8 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade

Os estudos de citotoxicidade foram realizados em linhagem celular de fibroblastos 3T3 proveniente da ATCC. As culturas celulares foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e mantidas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂. Após chegar a 90% de confluência (1 milhão de células/frasco), as células foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em placas de 96 poços de fundo redondo. As placas foram mantidas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ e posteriormente tratadas com cetoprofeno livre ou formulações de nanocápsulas (NC²-TCM e NC²-ORM) nas concentrações 1, 10, 50 e 100 µM. Células tratadas com DMSO ou nanocápsulas brancas NC²B-TCM e NC²B-ORM foram usadas como controles.

Após 24 e 48 horas de tratamento, a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT, que avalia a funcionalidade mitocondrial. Este método é baseado na capacidade que células viáveis possuem em reduzir o MTT e formar a partir deste o formazan, um produto de coloração azul. Uma solução de MTT (solução-estoque estéril de 5 mg/mL) foi adicionada ao meio de incubação contido nos poços a uma concentração final de 0,5 mg/mL. As células permaneceram por mais 60 minutos em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂. Na sequência, o meio foi removido e as placas foram submetidas a agitação com DMSO por 30 minutos. A densidade óptica de cada poço foi medida em 492 nm. As absorbâncias observadas foram usadas para o cálculo do percentual de viabilidade celular tendo como referência a absorbância do meio com DMSO somente.

4.3 Análise Estatística dos Resultados

A metodologia estatística dos dados incluiu análise descritiva de variáveis como a média, desvio padrão relativo, estudos de correlação, regressão linear simples, análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, considerando-se níveis de significância de 0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação do método analítico por CLAE

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser validado. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência (RIBANI *et al.*, 2004). O processo de validação deve garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, garantindo a confiabilidade dos resultados (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

A validação do método para o doseamento do cetoprofeno a partir das formulações nanoestruturadas foi realizada através da avaliação dos seguintes parâmetros analíticos: especificidade, linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão, limites de detecção e de quantificação.

A especificidade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e pode ser definida pela capacidade que o método possui de medir exatamente a substância de interesse em uma amostra complexa, ou seja, na presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da própria matriz (CASSIANO *et al.*, 2009). Uma maneira de se obter a especificidade do método cromatográfico é através da avaliação com detectores modernos, como por exemplo, o detector de arranjo de fotodiodos, ferramenta útil para verificar a pureza dos picos cromatográficos, demonstrando que o pico é atribuído a um só componente (RUELA *et al.*, 2009). Os cromatogramas apresentados na Figura 5 mostram a especificidade do método, através da comparação de formulações isentas do fármaco (brancas) com formulações contendo cetoprofeno encapsulado. Pode-se observar que não há interferência dos componentes da formulação no pico do fármaco.

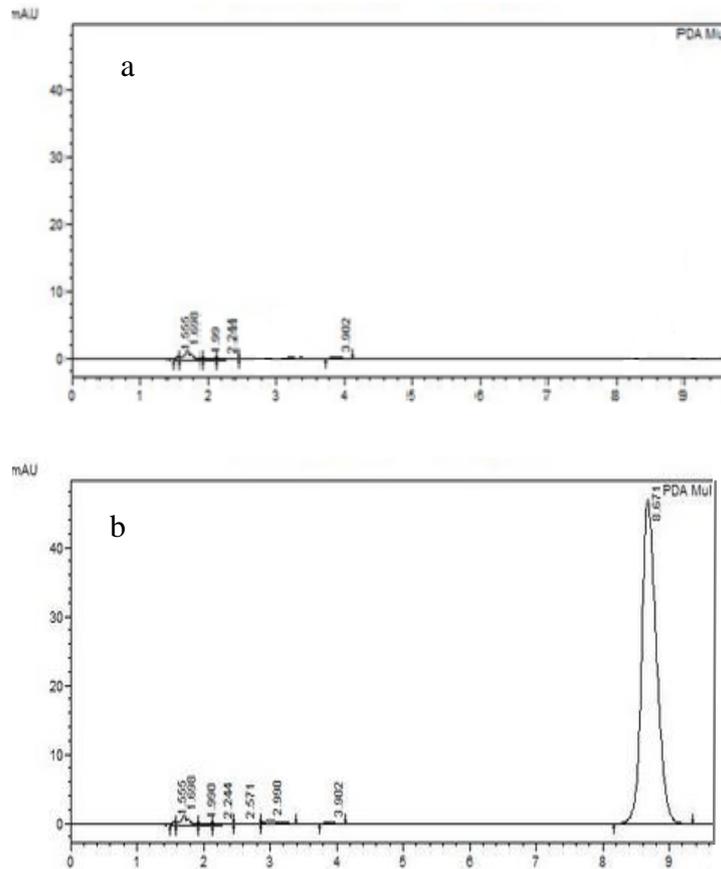


Figura 5 – Cromatogramas das nanocápsulas brancas (a) e nanocápsulas contendo cetoprofeno (b).

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse, dentro de um determinado intervalo (BRASIL, 2003). A relação matemática entre o sinal medido (área do pico) e a concentração da substância de interesse pode ser expressa através de uma curva analítica.

A média das nove curvas analíticas do cetoprofeno em metanol, na faixa de concentração de 3 a 15 $\mu\text{g/mL}$, pode ser visualizada na Figura 6. Os coeficientes de correlação (r) das curvas intra- e inter-dias apresentaram valores acima de 0,99, de acordo com o que é preconizado pela ANVISA (BRASIL, 2003).

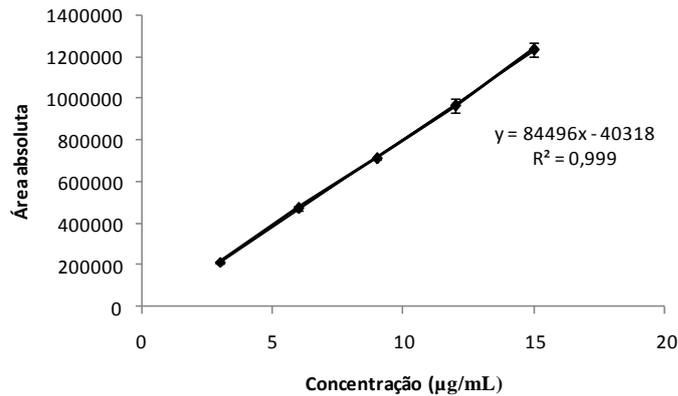


Figura 6 – Média das nove curvas analíticas do cetoprofeno em metanol.

A exatidão representa a proximidade dos resultados obtidos pelo método analítico em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003). Entre os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método analítico estão os ensaios de recuperação. Tal ensaio pode ser conduzido pela adição de concentrações conhecidas da substância ativa a uma mistura dos componentes da formulação (método do placebo contaminado).

Para a determinação deste parâmetro foram preparadas amostras de NC brancas acrescidas de uma solução de cetoprofeno nas concentrações de 7,0, 10,0 e 13,0 µg/mL. O percentual de recuperação para todas as amostras foi próximo de 100% (Tabela 3), de acordo com o que é estipulado pela ANVISA (BRASIL, 2003).

Tabela 3 – Avaliação da exatidão do método analítico de doseamento do cetoprofeno.

Níveis de concentração	Concentração adicionada (µg/mL)	Concentração média recuperada (µg/mL)	Recuperação média (%)
Baixa	7,00	6,78 ± 0,09	96,55 ± 1,55
Média	10,00	9,93 ± 0,28	98,76 ± 3,95
Alta	13,00	13,20 ± 0,37	100,84 ± 2,55

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (BRASIL, 2003).

A repetibilidade é a concordância dos resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e instrumentação. Por sua vez, a precisão intermediária indica o efeito de eventos aleatórios intra-laboratório, tais como diferentes dias, diferentes analistas, diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores, no desempenho do método

analítico. Assim sendo, a precisão intermediária pode fornecer de forma mais representativa, a variabilidade dos resultados em um mesmo laboratório (RIBANI *et al.*, 2004; CASSIANO *et al.*, 2009).

A determinação destes parâmetros foi realizada mediante a análise de seis amostras diferentes, porém de mesma concentração (9 µg/mL), sob condições operacionais idênticas, no mesmo dia (repetibilidade) e em três dias consecutivos (precisão intermediária). Os resultados podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4 – Avaliação da repetibilidade e precisão intermediária do método analítico por CLAE para quantificação do cetoprofeno em nanocápsulas.

	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	DPR (%)
Dia 1 (n=6)	9,00	8,58 ± 0,16	2,05
Dia 2 (n=6)	9,00	8,36 ± 0,18	2,66
Dia 3 (n=6)	9,00	8,73 ± 0,16	1,94
Inter-dias	9,00	8,56 ± 0,19	1,63

Os resultados referentes aos ensaios de exatidão, repetibilidade, precisão intermediária e linearidade apresentaram-se adequados, com valores de desvio padrão relativo abaixo de 3%, permitindo considerar validada a metodologia para a quantificação do cetoprofeno na faixa de concentração de 3,0 a 15,0 µg/mL.

Os termos limite de quantificação e de detecção são utilizados para demonstrar a habilidade do método em quantificar/detectar baixas concentrações de um analito. O limite de quantificação refere-se à menor quantidade do analito presente em uma amostra, que pode ser detectado sob as condições experimentais estabelecidas. Já o limite de detecção é dito como a menor concentração do analito que pode ser detectada em uma amostra, porém sem ser quantificada (BRASIL, 2003).

A menor concentração de cetoprofeno, detectada e quantificada com precisão e exatidão aceitáveis, foi 0,29 µg/mL e 0,89 µg/mL, respectivamente. Estes resultados indicam a sensibilidade do método para a quantificação do fármaco nas nanocápsulas e nos ensaios de liberação.

5.2 Dissolução/Inchamento dos filmes poliméricos

Filmes de Eudragit S100[®] foram colocados em contato com os dois tipos de óleos empregados no preparo das formulações com o intuito de verificar uma possível interação destes com o material usado como revestimento polimérico das nanocápsulas. A massa inicial do polímero em contato com o TCM e o ORM foi de $19,0 \pm 3,5$ mg e $33,1 \pm 1,0$ mg, respectivamente. Após 60 dias em contato com os diferentes tipos de óleo, os filmes de Eudragit S100[®] sofreram pequenas variações em seu peso, apresentando uma massa de $18,0 \pm 4,4$ mg para os filmes em contato com TCM (Figura 7a) e $31,4 \pm 1,4$ mg para aqueles em contato com o ORM (Figura 7b). A análise estatística indicou que as diferenças observadas não foram significativas ($p < 0,05$), sugerindo a viabilidade de emprego do TCM ou ORM na formulação de nanocápsulas de Eudragit S100[®].

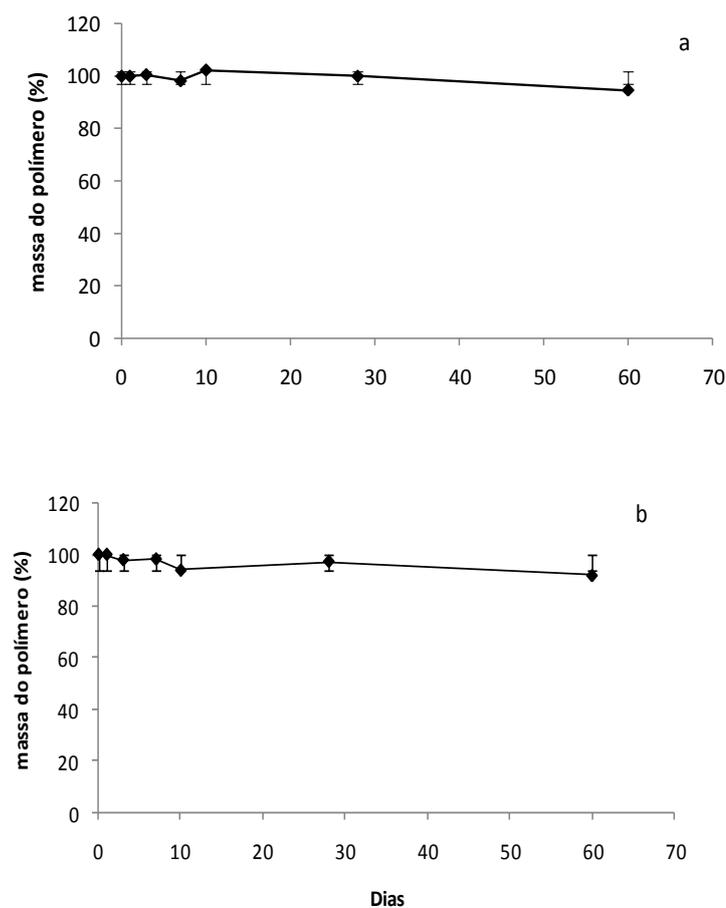


Figura 7 – Representação gráfica do inchamento/dissolução dos filmes de Eudragit S100[®] (n=3) em contato com TCM (a) e contato com o óleo de rosa mosqueta (b).

Este resultado corrobora o estudo de Schaffazick e colaboradores (2002) que verificaram, através de ensaios de dissolução/inchamento de filmes de Eudragir S90[®], que este não sofre alteração de massa quando em contato com Miglyol[®] 810 (triglicerídeos de cadeia média). Sendo assim, nanocápsulas de Eudragit S90[®]/Miglyol[®] 810, puderam ser adequadamente formadas, sem prejuízo à sua estrutura parede-núcleo.

5.3 Caracterização físico-química

Após a preparação, todas as suspensões de nanocápsulas apresentaram-se macroscopicamente homogêneas e com aspecto leitoso. Observou-se também o efeito Tyndall, ou seja, um reflexo azulado resultante do movimento browniano das partículas em suspensão. A Tabela 5 relaciona as características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas preparadas.

Tabela 5 – Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas (n=3).

Formulação	Teor de Fármaco (mg/mL)	pH	Tamanho de Partícula (nm)	Polidispersão	Potencial Zeta (mV)
NC ¹ -TCM	0,97±0,01	4,3±0,2	196±11	0,18±0,04	-12,1±1,6
NC ² -TCM	0,99±0,03	4,2±0,3	193±9	0,19±0,01	-8,7±1,5
NC ¹ -ORM	0,99±0,02	4,1±0,2	188±26	0,26±0,08	-11,2±0,9
NC ² -ORM	1,00±0,02	4,2±0,02	186±14	0,19±0,03	-12,9±2,6
NC ^{B1} -TCM	-	5,4±0,05	186±9	0,19±0,03	-21,8±4,0
NC ^{B2} -TCM	-	4,7±0,05	180±13	0,13±0,03	-18,4±4,7
NC ^{B1} -ORM	-	5,2±0,05	197±18	0,26±0,04	-15,3±1,6
NC ^{B2} -ORM	-	4,4±0,2	173±4	0,13±0,02	-21,2±0,3

O teor de fármaco nas formulações foi muito próximo à concentração teórica (1,0 mg/mL), indicando ausência de perda ou degradação do fármaco durante o processo de preparação. Assim como em outros estudos envolvendo a associação de AINES a nanopartículas poliméricas, a taxa de associação do cetoprofeno às nanocápsulas foi superior a 90%, resultado este, devido à elevada solubilidade do fármaco no núcleo oleoso das nanocápsulas (WEISS, 2001; CRUZ, 2005; DOMINGUES, 2006).

A polidispersão foi inferior a 0,2 para a maioria das formulações, indicando uma distribuição estreita de tamanho (Figura 8). O tamanho de partícula nas formulações encontrou-se na faixa de 173 a 197 nm. Tais resultados são compatíveis com outros sistemas coloidais preparados pelo método de deposição interfacial de polímeros pré-formados (MÜLLER, 2003; GUTERRES *et al.*, 2007; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010). Com relação à influência da composição das formulações no diâmetro médio das partículas, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$).

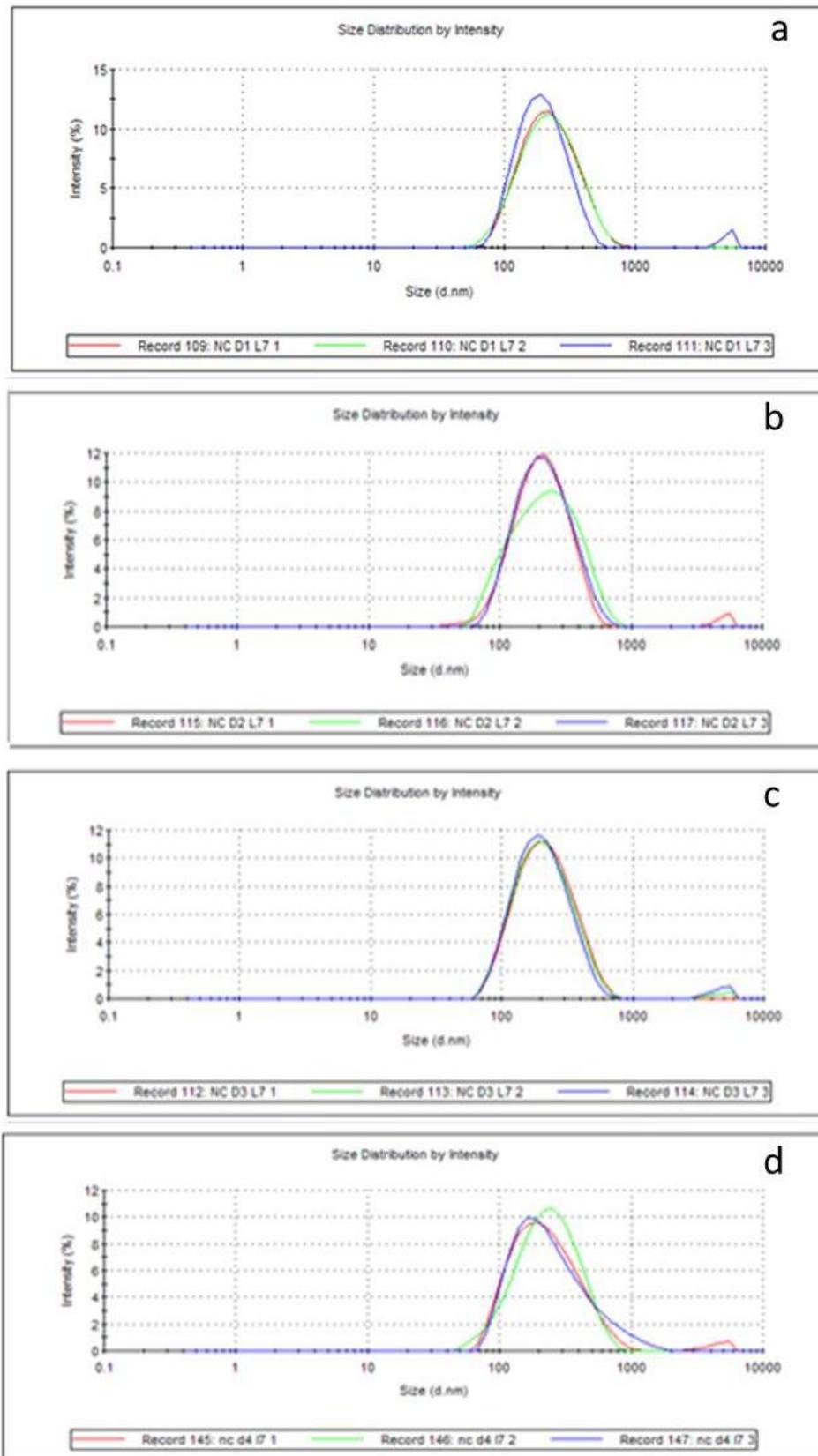


Figura 8 – Gráficos de diâmetro médio obtidos no equipamento Zetasizer para as formulações NC1-TCM (a), NC2-TCM (b), NC1-ORM (c) e NC2-ORM (d).

Valores de pH ligeiramente menores foram encontrados para as nanocápsulas contendo cetoprofeno, quando comparados com as formulações isentas do fármaco. Os menores valores de pH para as nanocápsulas contendo o fármaco devem-se, provavelmente, à natureza ácida do cetoprofeno (pK_a 4,76).

Com relação ao potencial zeta, todas as formulações apresentaram valores negativos, resultado compatível com a natureza do polímero empregado (Figura 9). Observou-se valores menores de potencial zeta (em módulo) para as nanocápsulas contendo cetoprofeno.

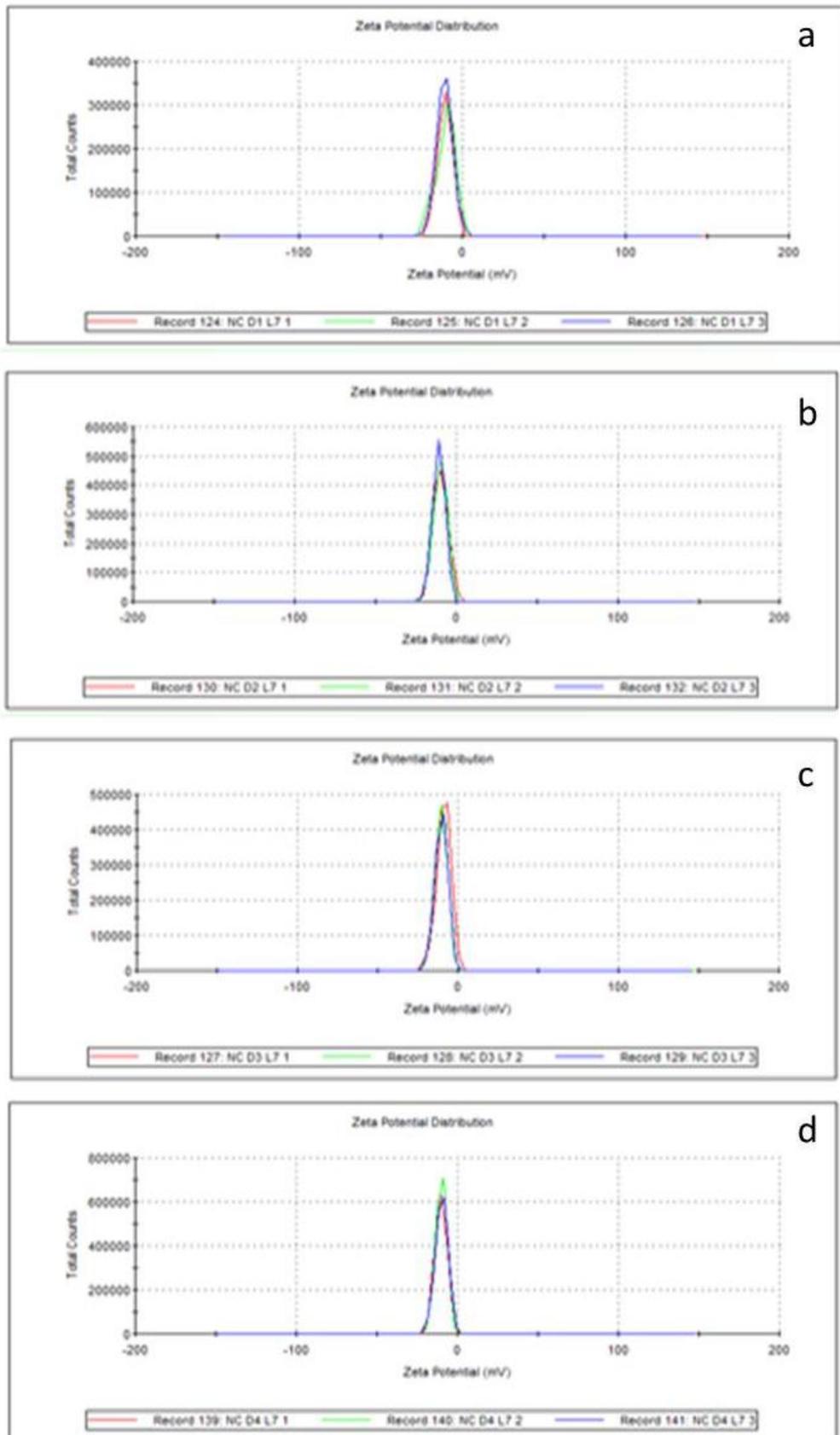


Figura 9 – Gráficos de potencial zeta obtidos no equipamento Zetasizer para as formulações NC1-TCM (a), NC2-TCM (b), NC1-ORM (c) e NC2-ORM (d)

5.4 Estudos de liberação *in vitro*

Os ensaios de liberação revelaram um perfil semelhante para todas as formulações de nanocápsulas, independente do óleo utilizado (Figura 10). Constatou-se que aproximadamente 100% do fármaco foi liberado das nanocápsulas em 4 horas de experimento. Por outro lado, as soluções metanólicas de cetoprofeno, liberaram a totalidade do fármaco em aproximadamente 2 horas de ensaio.

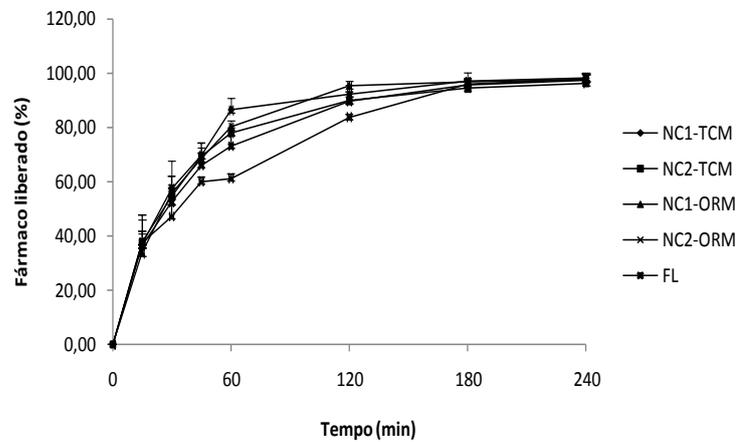


Figura 10 – Perfis de liberação do cetoprofeno em solução metanólica e nas suspensões de nanocápsulas (n=3).

A descrição matemática dos perfis cinéticos foi realizada pelo ajuste dos pontos experimentais aos modelos monoexponencial (Equação 4) e Korsmeyer-Peppas (Equação 5), a fim de entender o mecanismo de liberação do fármaco a partir das nanocápsulas. Para a escolha do modelo matemático que melhor se ajusta aos pontos experimentais foram observados os melhores ajustes gráficos, bem como os maiores coeficientes de correlação e valores de critério de seleção do modelo (MSC) obtidos.

Tabela 6 – Parâmetros da modelagem matemática.

	NC ¹ -TCM	NC ² -TCM	NC ¹ -ORM	NC ² -ORM
Primeira ordem				
<i>r</i>	0,9827±0,0135	0,9973±0,0007	0,9991±0,0006	0,9838±0,0063
<i>k</i> (h ⁻¹)	0,0292±0,0049	0,0263±0,0024	0,0266±0,0018	0,0272±0,0016
Korsmeyer-Peppas				
<i>r</i>	0,9209±0,0268	0,9514±0,0111	0,9374±0,0086	0,9685±0,0045
<i>a</i>	0,2429±0,0620	0,2340±0,0509	0,2133±0,0232	0,2109±0,0029
<i>n</i>	0,2755±0,0448	0,2796±0,0359	0,2981±0,0202	0,2972±0,0016

De acordo com os coeficientes de correlação mostrados na Tabela 6 todas as formulações apresentaram um bom ajuste à equação que descreve uma cinética de primeira ordem, visto que os coeficientes de correlação foram próximos de 0,99. Neste caso, a liberação depende apenas da concentração do fármaco, sem efeito *burst* (liberação abrupta), o que indica que o fármaco está confinado no núcleo oleoso das nanocápsulas. Em relação ao mecanismo de liberação do fármaco, o expoente *n* obtido indica que a liberação do cetoprofeno é ocasionada por difusão deste a partir das nanoestruturas, pois os valores foram inferiores a 0,43 em todos os casos.

5.5 Estudo de Fotoestabilidade

Com o objetivo de avaliar a influência do componente oleoso frente à fotodegradação do cetoprofeno, as amostras foram expostas à radiação UVC. As formulações selecionadas para este ensaio foram as seguintes: nanocápsulas preparadas utilizando Span 80[®], alternando-se o tipo de óleo utilizado (TCM ou ORM). A seleção destas formulações para a realização do estudo de estabilidade foi motivada pelos resultados do experimento de liberação, já que o tipo de tensoativo não influenciou o perfil de liberação do cetoprofeno a partir das nanocápsulas. Além disso, segundo a literatura (JÄGER *et al.*, 2009), nanocápsulas preparadas com monoestearato de sorbitano (Span 60) são consideradas de núcleo lipídico, pois este é sólido à temperatura ambiente, ao contrário do monooleato de sorbitano (Span 80). Cada formulação foi comparada ao seu respectivo controle-escuro, a fim de refutar quaisquer variações no método, tal como oscilações de temperatura no interior da câmara de fotoestabilidade. Para fins comparativos, também foram preparadas nanodispersões do

fármaco na mesma concentração (1,0 mg/mL). Após 6h de exposição à radiação UVC, o teor remanescente de cetoprofeno na NC-TCM e NC-ORM foi de 57% e 63% (Figura 11), respectivamente; enquanto que na nanodispersão apenas 29% do fármaco manteve-se intacto. A maior proteção ao fármaco, conferida pelas nanocápsulas contendo óleo de rosa mosqueta como núcleo, pode ser justificada pelo alto poder antioxidante deste óleo, o qual é rico em ácidos graxos insaturados, como os ácidos oléico, linoléico e linolênico. Franco e colaboradores (2007) evidenciaram o poder antioxidante da planta, obtendo uma inibição de 80% do radical DPPH para o extrato etanólico.

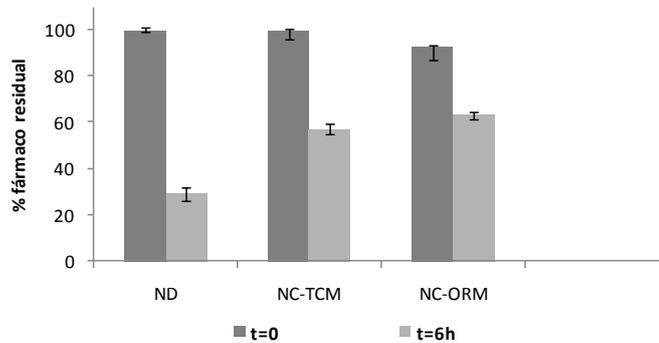


Figura 11 – Fotodegradação do cetoprofeno associado à nanodispersão (ND) e às formulações de nanocápsulas (NC2-TCM e NC2-ORM).

5.6 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade

O teste de citotoxicidade *in vitro* permitiu observar a sobrevivência de células fibroblásticas da linhagem 3T3 frente a quatro concentrações de cetoprofeno (1, 10, 50 e 100 μM) e avaliando-se dois tempos de exposição, 24 e 48 horas. As absorbâncias observadas para o meio celular na presença de DMSO (controle) foram usadas como referência para o cálculo do percentual de viabilidade celular. Os resultados podem ser visualizados nas figuras 12a e 12b.

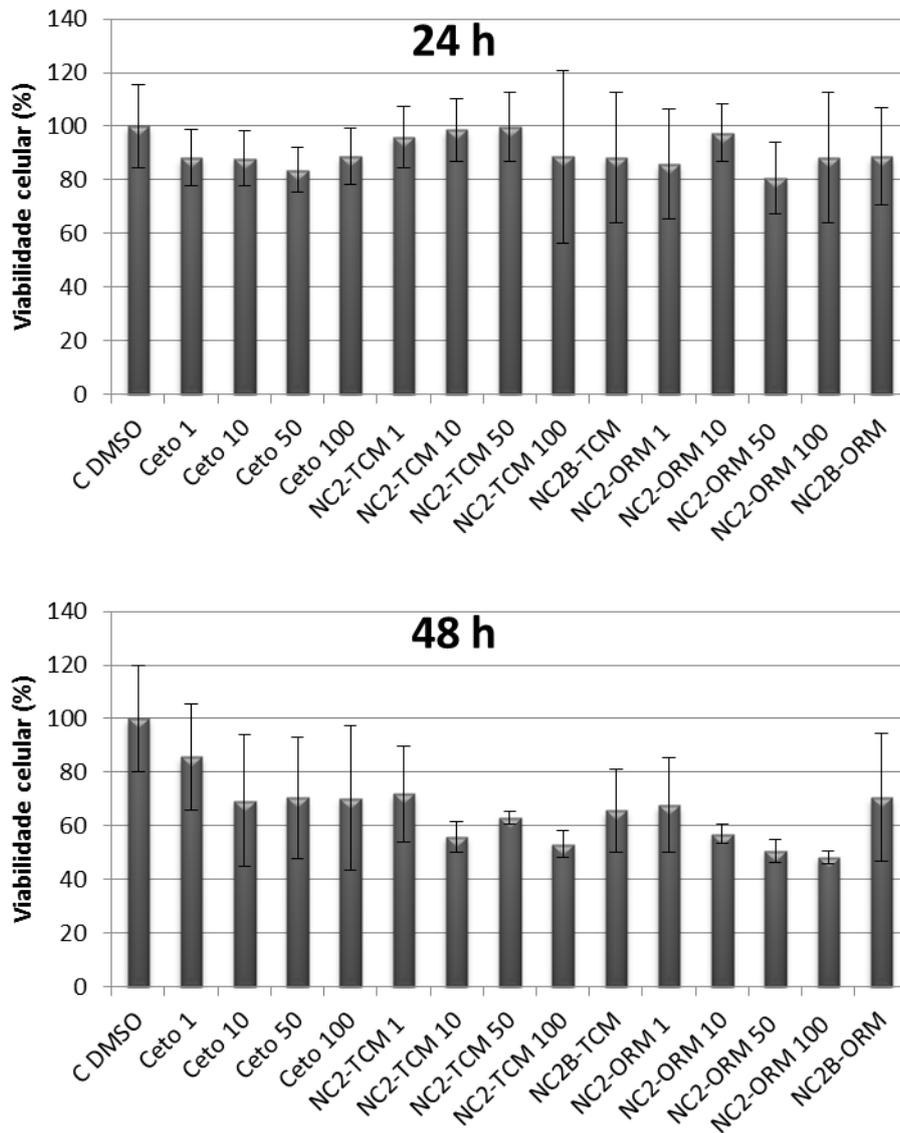


Figura 12 – Gráficos demonstrativos da viabilidade celular após 24 h (a) e 48 h (b) de exposição.

Após 24 horas, a viabilidade celular foi acima de 80% para todos os grupos testados. Entretanto, com o aumento do tempo de exposição para 48 horas, foi observada uma redução da viabilidade celular em todos os casos. Para as concentrações mais elevadas de cetoprofeno, ou seja, 50 e 100 μM , esta redução foi mais expressiva. Por exemplo, enquanto que 88% das células foram viáveis frente às nanocápsulas de óleo de rosa mosqueta na concentração de 100 μM de cetoprofeno após 24 horas, as mesmas células mostraram viabilidade de 48% após 48 horas nas mesmas condições experimentais.

Comparando-se o cetoprofeno livre com o nanoencapsulado pode-se observar que a viabilidade celular foi superior para as formulações de nanocápsulas no tempo de 24 horas,

exceto para NC²-ORM e NC²-TCM na concentração de 100 µM, pois o percentual de viabilidade celular foi o mesmo. Ainda, para a formulação NC²-ORM nas concentrações de 1 e 50 µM os percentuais foram levemente inferiores aos correspondentes ao fármaco livre. Em 48 horas de experimento, a mesma comparação resultou na observação contrária, ou seja, as células tratadas com nanocápsulas apresentaram uma viabilidade inferior ao fármaco livre em todas as situações. Neste caso, os demais componentes da formulação poderiam também ser os responsáveis pela queda na viabilidade celular, visto que as formulações brancas também apresentaram redução neste parâmetro.

Campos e colaboradores (2012) também realizaram um estudo de citotoxicidade com células fibroblásticas 3T3, porém avaliaram nanoesferas de PCL contendo o anestésico lidocaína. Observou-se uma maior viabilidade celular (cerca de três vezes maior) para os fibroblastos expostos às formulações nanoestruturadas, quando comparados ao fármaco livre na mesma concentração (0,5% de lidocaína), evidenciando o efeito protetor conferido pelo encapsulamento do fármaco.

6 CONCLUSÕES

- a) a validação da metodologia analítica por CLAE para a quantificação do cetoprofeno nas nanocápsulas poliméricas, provou ser específica, linear, precisa e exata, podendo ser aplicada para a determinação do teor do cetoprofeno em nanocápsulas poliméricas;
- b) o método de precipitação do polímero pré-formado foi adequado para preparar nanocápsulas poliméricas com o Eudragit S100[®] contendo cetoprofeno;
- c) todas as suspensões de nanocápsulas desenvolvidas neste trabalho apresentaram características físico-químicas adequadas e compatíveis com outros sistemas nanoestruturados relatados na literatura;
- d) o estudo de liberação *in vitro* demonstrou que as nanocápsulas de Eudragit S100[®], preparadas com os diferentes tipos de óleo, foram capazes de liberar o fármaco no meio intestinal simulado através de difusão, descrevendo uma cinética de primeira ordem;
- e) as nanocápsulas poliméricas foram capazes de aumentar a fotoestabilidade do cetoprofeno, sendo que a proteção conferida foi maior para as formulações preparadas com óleo de rosa mosqueta;
- f) a avaliação da citotoxicidade *in vitro* em células 3T3 demonstrou que as formulações de nanocápsulas (NC¹-ORM e NC¹-TCM) apresentaram viabilidade celular superior no tempo de 24 horas, quando comparadas ao cetoprofeno livre;
- g) ainda sobre a citotoxicidade, constatou-se, pelos resultados obtidos no tempo de 48h, uma redução mais expressiva da viabilidade celular, no entanto, esta foi equivalente a do grupo controle.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid topical formulations containing nimesulida-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, v.60, p. 900-904, 2005.
- AMIJI, M. M. Nanotechnology: improving targeted delivery. **Drug Delivery**, 2007.
- AMMOURY, N. et al. Indomethacin-loaded poly(D,L-lactide) nanocapsules: protection from gastrointestinal ulceration and anti-inflammatory activity evaluation in rats. **Clinical Material**, v. 13, p. 121-130, 1993.
- ASHVINI, U. V.; KAVITHA, K.; MEHABOOB, Y. Design and evaluation of ketoprofen loaded albumin microspheres. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 910-924, 2011.
- BARENHOLZ, Y.; PEER, D. Liposomes and other assemblies as drugs and nano-drugs: From basic and translational research to the clinics. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 2, p. 115-116, 2012.
- BARRENA, R. et al. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. **Chemosphere**, v. 75, n. 7, p. 850-857, 2009.
- BARRATT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 5, p. 163-171, 2000.
- BJORKMAN, D. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated toxicity of the liver, lower gastrointestinal tract, and esophagus. **The American Journal of Medicine**, v. 105, p. 17-21, 1998.
- BORNE, R. F. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: FOYE, W. O.; LEMKE, T. L.; WILLIAMNS, D. A. **Principles of Medicinal Chemistry**. 4nd. ed. Philadelphia: Willians & Wilkins, 1998. p. 535-580.
- BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 25 jan. 2013.
- BRASIL. **Farmacopéia brasileira**. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. Volume 2.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules and nanoemulsions, as ocular drug carrier. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 5, p. 530-536, 1996.

CAMPOS, E. V. R. et al. Preparation and characterization of poly(ϵ -Caprolactone) nanospheres containing the local anesthetic lidocaine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 1, p. 215-225, 2013.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análise de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CHEN, Z. et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. **Toxicology Letters**, v. 163, p. 109-120, 2006.

COUVREUR, P. et al. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Carrier Systems**, v.19, p. 99-134, 2002.

CRUZ, L. **Estudo físico-químico de sistemas nanoestruturados contendo indometacina e seu éster etílico e avaliação in vivo da atividade antiedematogênica**. 2005. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

CRUZ, L. et al. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, p. 198-205, 2006.

DITTMER, M.; DURRANI, M.; LEHMANN, K. Acrylic polymers: a review of pharmaceutical applications. **S.T.P. Pharma Science**, v. 6, p. 403-437, 1997.

DOMINGUES, G. S. et al. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1966-1972, 2008.

FADEEL, B.; GARCIA-BENNETT, A. E. Better safe than sorry: understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 362-374, 2010.

FELDMAN, M.; McMAHON, A. T. Cyclooxygenase-2 inhibitors provide benefits similar to those of traditional nonsteroidal antiinflammatory drugs, with less gastrointestinal toxicity? **Annuary International Medicine**, v. 132, p. 134-143, 2000.

FERRANTI, V. et al. Primidone-loaded poly-o-caprolactone nanocapsules: incorporation efficiency and in vitro release profiles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, p. 107-111, 1999.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. R1-R4, 1989.

FIORUCCI, S.; ANTONELLI, E.; MORELLI, A. Mechanism of non-steroidal anti-inflammatory drug-gastrophaty. **Clinical Review: digest liver disease**, v. 33, suppl. 2, p. 35-43, 2001.

FONSECA, L. D. da et al. Nanocapsule@xerogel microparticles containing sodium diclofenac: A new strategy to control the release of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 358, p. 292-295, 2008.

FONTANA, G. et al. Preparation, characterization and in vitro antimicrobial activity of ampicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles. **Biomaterials**, v.19, p. 1009, 1998.

FRANÇA, F. F. de A. C. de; KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara: edição 2006/2007**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

FRANCO, D. et al. Processing of rosa rubiginosa: extraction of oiland antioxidant substances. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3506-3512, 2007.

GRAF, R. et al. Development and characterization of Cya-loaded poly(lactic acid)poly(ethylene glycol) PEG micor and nanoparticles. Comparison with conventional PLA particulate carriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 51, p. 111-118, 2001.

GUPTA, H. et al. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 324-333, 2010.

GUTERRES, S. S. et al. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, p. 57-63, 1995.

GUTERRES, S. S. et al. Gastrointestinal tolerance following oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. **S.T.P. Pharma Sciences**, v. 11, p. 229-233, 2001.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. I47-I57, 2007.

HERSH, E. V.; LALLY, E. T.; MOORE, P. A. Update on cyclooxygenase inhibitors: has a third COX isoform entered the fray? **Current Medical Research And Opinion**, v. 21. n. 8, p. 1217-1226, 2005.

HUGUES, G. A. Nanostructure-mediated drug delivery. **Nanomedicine**, v. 1, n. 1, p. 22-30, 2005.

KAMALY, N. et al. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 2971-3010, 2012.

KHERADMANDNIA, S. et al. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 753-759, 2010.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.

JABR-MILANE, L. et al. Multi-functional nanocarriers for targeted delivery of drugs and genes. **Journal Controlled Release**, 2008.

JÄGER, E. et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 130-140, 2009.

LAMPRECHT, A. et al. Biodegradable nanoparticles for targeted drug delivery in treatment of inflammatory bowel disease. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 299, n. 2, 2001.

LAMPRECHT, A. et al. Biodegradable microparticles as a two-drug controlled release formulation: a potential treatment of inflammatory bowel disease. **Journal of Controlled Release**, v. 69, p. 445-454, 2000a.

- LAMPRECHT, A. et al. Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, p. 177-182, 2000b.
- LEGRAND, P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review. **S. T. P. Pharma Science**, v. 9, p. 411-418, 1999.
- LIMA, R. et al. Evaluation of cyto- and genotoxicity of poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. **Journal of Polymers and The Environment**, v. 19, p. 196-202, 2011.
- LOPES, E. C. et al. Polymeric colloidal systems containing ethionamide: preparation and physico-chemical characterization. **Pharmazie**, v.55, p. 527, 2000.
- LOSA, C. et al. Design of new formulations for topical ocular administration: polymeric nanocapsules containing metipranolol. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 1, p. 80-87, 1993.
- LU, Z. et al. A method for the preparation of polymeric nanocapsules without stabilizer. **Journal of Controlled Release**, v. 61, n. 1-2, p. 107-112, 1999.
- LU, Y.; CHEN, S. C. Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1621-1633, 2004.
- MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticles characterization: a comprehensive physicochemical approach. **S. T. P. Pharma Sciences**, v. 1, n. 4, p. 221-241, 1991.
- MIZUSHIMA, T. Molecular mechanism for various pharmacological activities of NSAIDS. **Pharmaceutics**, v. 3, p. 1614-1636, 2010.
- MOINARD-CHÉCOT, D. et al. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion-diffusion process. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 17, n. 2, p. 458-468, 2008.
- MONTEIRO, E. C. A. et al. O reumatologista revisita: os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 9, p. 53-63, 1998.
- MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010.

MÜLLER, C. R. et al. Spray-dried diclofenac-loaded Poly(ϵ -Caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. **Pharmazie**, v. 56, n. 11, p. 864-867, 2001.

MÜLLER, C. R. et al. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 555-560, 2004.

NAJMUDDIN, M. et al. Floating microspheres of ketoprofen: formulation and evaluation. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 164-168, 2010.

NECKEL, G. L.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de nanocápsulas contendo camptotecina a partir do ácido poli(D,L-lático) e de copolímeros diblocos do ácido poli(D,L-lático) e polietilenoglicol. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 4, p. 504-511, 2005.

PARK, K. Nanotechnology: what it can do for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 120, n. 1, p. 1-3, 2007.

POHLMANN, A. R. et al. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 305-312, 2002.

POHLMANN, A. R. et al. Structural model of polymeric nanospheres indomethacin ethyl ester and in vivo antiedematogenic activity. **International Journal of Nanotechnology**, v. 4, n. 5, 2007.

QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 1113-1128, 1998.

RAFFIN, R. P. et al. Nanocápsulas poliméricas secas contendo indometacina: estudo de formulação e de tolerância gastrointestinal em ratos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, n. 2, p. 163-72, 2003.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; DALE, M. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S. Nanocarriers: promising vehicles for bioactive drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 9, p. 1790-1798, 2006.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, n. 36, p. 887-913, 2011.

RAVI KUMAR, M. N. V. Nano and microparticules as controlled drug delivery devices. **Journal Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 3, supl. 2, p. 234-258, 2000.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S. Nanocarriers: promising vehicles for bioactive drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 9, p. 1790-1798, 2006.

REIS, C.P. et al. Nanoencapsulation I: methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**. v. 2, p. 8-21, 2006.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-80, 2004.

RUELA, A. L. M.; ARAÚJO, M. B.; PEREIRA, G. R. Desenvolvimento e validação de um método analítico rápido por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de nimesulida em estudos de liberação in vitro. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 165-168, 2009.

SAKEENA, M. H. F. et al. Anty-inflammatory and analgesic effects of ketoprofen in palm oil esters nanoemulsion. **Journal of Oleo Science**, v. 59, p. 667-671, 2010.

SCHAFFAZICK, S. R. **Caracterização físico-química e avaliação biológica de liofilizados de nanopartículas poliméricas contendo diclofenaco**. 2001. 165 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

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

SEVERINO, P. et al. Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativos. **Polímeros**, v. 21, n. 5, p. 361-368, 2011.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modelling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 2-3, p. 139-157, 2001.

SMALLEY, W. E. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the incidence of hospitalizations for peptic ulcer disease in elderly persons. **American Journal of Epidemiology**, v. 141, p. 539-545, 1995.

SHENG, J. J. et al. Solubilization and dissolution of insoluble weak acid, ketoprofen: effects of pH combined with surfactant. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, p. 306-314, 2006.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

TORCHILIN, V. P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 1-2, p. 137-172, 2001.

TURINI, M. E.; DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. **Annual Review of Medicine**, v. 53, p. 35-57, 2002.

ZHANG, M. et al. Simulation of drug release from biodegradable polymeric microspheres with bulk and surface erosions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 10, p. 2040-2056, 2003.

WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 58, p. 1-12, 1990.

WEISS, V. **Avaliação tecnológica de suspensões e nebulizados de nanocápsulas e nanoesferas contendo indometacina**. 2001. 165 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.