UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de poli (n-buti
cianoacrilato) contendo a associação lamivudina e zidovudina

Thayane Grilo Araujo

Dissertação para obtenção do Título de **MESTRE**

Orientadora: Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri

São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato) contendo a associação lamivudina e zidovudina

Thayane Grilo Araujo

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de

MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri

São Paulo

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Araujo, Thayane Grilo

A663d Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato) contendo a associação lamivudina e zidovudina / Thayane Grilo Araujo. -- São Paulo, 2016. 102p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia Orientador : Consiglieri, Vladi Olga

Farmacotécnica 2. Nanotecnologia 3. Tecnologia farmacêutica
 T. II. Consiglieri, Vladi Olga, orientador.

615.4 CDD

Thayane Grilo Araujo

Desenvolvimento e	caracterização de nanopartícul	as de poli (n-buti	l cianoacrilato)
co	ntendo a associação lamivudina	a e zidovudina	

Comissão Julgadora da Dissertação
para obtenção do Título de Mestre
Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Orientadora / Presidente
1º examinador
2º examinador
 3º examinador
o chammadoi

São Paulo, ____ de ____ de 2016.

Dedico esse trabalho aos meus pais **Silvana e Edemir**, pela proteção e amor incondicional que me proporcionam todos os dias,

Ao meu irmão **Eric**, por todo apoio e amizade,

Ao meu namorado **Renato**, pelo carinho e por me incentivar, À minha orientadora Prof^a. Dra. **Vladi Olga Consiglieri**, por confiar e acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus por guiar meus passos e, principalmente por me conceder forças e sabedoria para concluir essa jornada.

À minha mãe por todo amor, por estar sempre comigo e me apoiar. Serei eternamente grata por toda sua dedicação, pelos seus conselhos e pelo companheirismo que temos uma com a outra. Você é o meu maior exemplo.

Ao meu pai por acreditar em mim, por me incentivar a buscar sempre o meu melhor e por me dar amor, suporte e segurança em todos os momentos. Obrigada por todo esforço dedicado a mim e ao Eric.

Ao meu irmão por todo carinho, pelos momentos de risada e por me ajudar sempre, com você tenho a certeza de que sempre terei alguém para contar.

Ao meu namorado por me incentivar, por me dar amor e carinho sempre que preciso, por me ouvir e me dar conselhos. Sou grata por todos os momentos que passamos juntos e por você ter entrado na minha vida. Agradeço também, aos seus pais e suas irmãs por sempre me acolherem.

À Prof^a. Dra. Vladi Olga Consiglieri, minha querida orientadora, por me acolher e por me dar essa oportunidade. Obrigada por todos os ensinamentos, pela paciência, pela amizade e por depositar sua confiança em mim.

Ao Prof. Dr. Marcelo Guimarães que me trouxe à Faculdade de Ciências Farmacêuticas. À Dra. Claudinéia pelo suporte e por muitas vezes dividir seus conhecimentos comigo. Aos técnicos do laboratório de farmacotécnica Edgar e Dora por serem sempre tão solícitos e me ajudar quando necessário.

À minha amiga Rafaella, que mesmo longe continua presente. Às minhas amigas Gabriele e Camila. Vocês três terão sempre um lugar em meu coração, obrigada por essa amizade maravilhosa.

Aos amigos que fiz durante essa jornada, Gabriela, Thamires, André Daneluti e Juliana, pelas conversas, conselhos e risadas, Thalita, Michelle Barão, Rafael, Tércio, Maíra, Michelli Dário, José Eduardo, Katherine e Ivan, vocês tornaram os dias no laboratório mais leves, sempre lembrarei com muito carinho de todos.

À CAPES pelo auxílio financeiro e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelo acolhimento e estrutura proporcionados. A Universidade Presbiteriana Mackenzie por ter me concedido o título de Farmacêutica.

Ao Prof. Dr. André Rolim Baby, por ter aberto as portas de seu laboratório e permitido que eu realizasse os experimentos no HPLC.

Á Profa. Dra. Eunice Kano por toda ajuda e acolhimento.

À Profa. Dra. Nádia Araci Bou Chacra por permitir o uso do equipamento ZetaSizer[®] Nano ZS90. E aos alunos Katherine, Ivan e Aline pela assistência.

Ao Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz, por disponibilizar o uso dos equipamentos de DSC e TG e à técnica Eremita e ao aluno Lucas pelo auxílio nas análises.

À Profa. Dra. Silvia Storpirtis por permitir a utilização de seu laboratório para que fosse possível realizar os experimentos de citotoxicidade e ao seu aluno Rafael por toda ajuda.

À técnica Rosana e aluna Cintia do laboratório de bioquímica e propriedades funcionais dos alimentos por serem tão solicitas e permitirem o uso do liofilizador.

Ao Prof. Dr. Cristiano de Oliveira do Instituto de Física por disponibilizar o uso do equipamento de SAXS e sua aluna Maximilia por auxiliar na análise e interpretação dos resultados.

A todos os funcionários, professores e coordenação do programa de Pós Graduação de Fármacos e Medicamentos.

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecía impossível"

Charles Chaplin

RESUMO

ARAUJO, T.G. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato) contendo a associação lamivudina e zidovudina. 2016. 100f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A zidovudina (AZT), fármaco antirretroviral utilizado no tratamento da AIDS, apresenta biodisponibilidade oral em torno de 60% e seu uso prolongado pode ocasionar efeitos tóxicos e tolerância ao tratamento. A lamivudina (3TC), apesar de demonstrar menor citotoxicidade e menor resistência viral, é considerada também menos potente. A associação entre os dois fármacos é recomendável em função da boa resposta terapêutica e maior adesão ao tratamento. As nanopartículas são uma alternativa para melhorar a biodisponibilidade e o transporte de fármacos sobretudo através da BHE. Nesse sentido, as nanopartículas poliméricas de poli (n-butil cianoacrilato) (PBCA) apresentam grande potencial para melhoria características farmacêuticas, além de possibilitar resultados terapêuticos mais eficazes por meio da modificação de sua superfície, direcionando o fármaco ao sítio alvo. Diante do exposto, foram desenvolvidas nanopartículas de PBCA contendo a associação lamivudina e zidovudina (3TC/AZT) revestidas com polissorbato 80 (Ps80). As nanopartículas obtidas foram caracterizadas e apresentaram resultados coerentes aos encontrados na literatura. Após a encapsulação dos fármacos e o revestimento com Ps80, notou-se um aumento no diâmetro médio e o potencial Zeta foi próximo de zero. Esses resultados juntamente com a análise de SAXS comprovam o revestimento das nanopartículas de PBCA. Os dados de DSC e TG/DTG mostram que a encapsulação foi eficiente para a estabilização térmica dos fármacos. Foi desenvolvido e validado o método analítico por CLAE, a fim de determinar a eficiência de encapsulação. A validação do método analítico para quantificação simultânea do 3TC e AZT, tanto nas nanopartículas de PBCA quanto nas nanopartículas revestidas, apresentou linearidade, especificidade, precisão e exatidão adequadas de acordo com as normativas. A porcentagem de encapsulação dos fármacos foi igual a 44,45% e 30,44%. As nanopartículas de PBCA e PBCA-Ps80, em concentrações abaixo de 100 µg/mL, apresentaram viabilidade celular superior a 70% em células Caco-2, comprovando que o sistema apresenta baixa citotoxicidade, o que representa uma alternativa promissora para a encapsulação de fármacos antirretrovirais e consequente progresso no tratamento da AIDS.

Palavras chave: lamivudina, zidovudina, AIDS, nanopartículas, poli (n-butilcianoacrilato), polissorbato 80.

ABSTRACT

ARAUJO, T.G. Development and characterization of poly (n- butyl cyanoacrylate) nanoparticles containing the combination of lamivudine and zidovudine. 2016. 100f. Dissertação (Mestrado) — Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Zidovudine (AZT), which is an anti-retroviral drug used in the treatment of AIDS, has oral bioavailability around 60% and its prolonged use can cause toxic effects and tolerance to the treatment. Lamivudine (3TC), although it has lower cytotoxicity and lower viral resistance, is also considered less potent. The association between these two drugs is recommended based on the good therapeutic response and greater adherence to treatment. Nanoparticles are an alternative to improve the bioavailability and the transport of drugs, particularly through the BBB. Thus, the polymeric nanoparticles of poly (n-butyl cyanoacrylate) (PBCA) have great potential for improving the pharmaceutical characteristics, besides enabling more effective therapeutic results through the modification of its surface, directing the drug to the target site. That being said, PBCA nanoparticles were developed containing the association of lamivudine and zidovudine (3TC/AZT) coated with polysorbate 80 (Ps80). Nanoparticles obtained were characterized and presented coherent results when compared to those found in the literature. After the encapsulation of pharmaceuticals and Ps80 coating, it was noted an increase in the average diameter and Zeta potential was close to zero. These results along with the SAXS analysis proved the coating of the PBCA nanoparticles. The data of DSC and TG/DTG show that encapsulation was efficient for thermal stabilization of pharmaceuticals. An analytical method by HPLC was developed and validated to determine the efficiency of encapsulation. The validation of the analytical method for simultaneous quantification of 3TC and AZT, in both the PBCA nanoparticles and coated nanoparticles, presented as in linearity, specificity, precision and accuracy according to the regulations. The percentage of drug encapsulation was equal to 44.45% and 30.44%. The nanoparticles of PBCA and PBCA-Ps80, at concentrations below 100 µ g/ml, presented cell viability greater than 70% in Caco-2 cells, proving that the system has low cytotoxicity, which represents a promising alternative for the encapsulation of antiretroviral drugs and consequent progress in AIDS treatment.

Key words: lamivudine, zidovudine, AIDS, nanoparticles, poly (n-butyl Cyanoacrylate), polysorbate 80.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Progresso global em resposta ao HIV entre os anos 2000-2015	7
Figura 2 – Estrutura de uma partícula viral do HIV.	8
Figura 3 – Demonstração da ação dos medicamentos disponíveis no mercado sobre o ciclo da replicação viral do HIV.	12
Figura 4 – Estrutura química da zidovudina.	14
Figura 5 – Estrutura química da lamivudina	16
Figura 6 – Representação esquemática da estrutura de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas	20
Figura 7 – Etapas de iniciação e propagação envolvidas durante o processo de polimerização do alquil cianoacrilato: (a) aniônico, (b) zwitteriônico e (c) radicalar	22
Figura 8 – Representação do esquema da síntese de nanopartículas de PBCA carregadas com fármaco e revestidas com Ps80	26
Figura 9 – Esquema de preparo para obtenção das nanopartículas de PBCA isentas de fármaco	34
Figura 10 Distribuição de tamanho das nanopartículas de PBCA	48
Figura 11 – Distribuição do potencial zeta das nanopartículas de PBCA	49
Figura 12 – Intervalo de Confiança (95%) do Teste de Fisher relativo a diferença das médias de diâmetro das nanoparticulas de PBCA, PBCA* e PBCA*-M.	51
Figura 13 – Intervalo de Confiança (95%) do Teste de Fisher relativo a diferença das médias de potencial zeta das nanoparticulas de PBCA, PBCA* e PBCA*-M.	52
Figura 14 – Curva DSC das nanopartículas de PBCA e PBCA-Ps80 obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 $^{\circ}$ C/min.	57
Figura 15 – Curva TG/DTG das nanopartículas de PBCA e PBCA-Ps80 obtidas sob atmosfera dinâmica de N ₂ (100 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.	57

Figura 16 – Viabilidade de células Caco-2 incubadas com diferentes concentrações de PBCA e PBCA-Ps80 por 6 h, avaliada pela técnica do MTT.	59
Figura 17 – Curva DSC do AZT obtida sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.	65
Figura 18 – Curvas TG/DTG do AZT obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 (100 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.	65
Figura 19 – Curva DSC do 3TC obtida sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.	66
Figura 20 – Curvas TG/DTG do 3TC obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 (100 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.	67
Figura 21 – Curvas DSC do AZT, 3TC e mistura física AZT:3TC (1:1) obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 $^{\circ}$ C/min.	68
Figura 22 – Curvas TG/DTG do AZT, 3TC e mistura física 3TC+AZT (1:1) obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 (100 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.	68
Figura 23 – Curvas DSC do AZT, 3TC, PBCA, da mistura física PBCA-3TC-AZT e das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.	70
Figura 24 – Curvas TG/DTG do AZT, 3TC, PBCA, da mistura física PBCA+3TC+AZT e das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 (100 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.	70
Figura 25 – Curvas DSC do PBCA, das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT, PBCA-Ps80 e PBCA-3TC/AZT-Ps80 obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.	71
Figura 26 – Curvas TG/DTG do PBCA, das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT, PBCA-Ps80 e PBCA-3TC/AZT-Ps80 obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 (100 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.	72
Figura 27 – Perfil da intensidade de SAXS em função do módulo do vetor de espalhamento para as amostras.	73
Figura 28 – Curvas de SAXS e modelagem para as nanopartículas de PBCA	74

Figura 29 – Curvas analíticas dos padrões de 3TC e AZT obtidas com o método analítico desenvolvido.	78
Figura 30 – Cromatograma do placebo 1 (PBCA para quantificação do fármaco total) (a), placebo 2 (PBCA para quantificação do fármaco livre) (b), placebo 3 (PBCA-Ps80 para quantificação do fármaco total) (c) e placebo 4 (PBCA-Ps80 para quantificação do fármaco livre).	80
Figura 31 – Cromatograma da injeção da fase móvel constituída de tampão fosfato 10 mM e metanol (70:30 v/v).	81
Figura 32 – Cromatograma da injeção da solução padrão de 3TC e AZT diluídos na fase móvel na concentração de 5,0 µg/mL.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados de diâmetro médio, indice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas isentas de fármaco (PBCA).	48
Tabela 2 – Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas isentas de fármaco liofilizadas (PBCA*).	50
Tabela 3 – Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas isentas de fármaco liofilizadas com 3% de manitol como agente crioproteror (PBCA*-M).	50
Tabela 4 – Teste de Fisher para a comparação das características físico-químicas das nanoparticulas de PBCA, PBCA* e PBCA*-M.	51
Tabela 5 – Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas isentas de fármaco de acordo com o método de revestimento	53
Tabela 6 – Teste de Tukey para a comparação do potencial zeta das nanopartículas de PBCA, PBCA-Ps80U e PBCA-Ps80A	54
Tabela 7 – Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas contendo lamivudina e zidovudina encapsuladas (PBCA-3TC/AZT).	62
Tabela 8 – Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas contendo lamivudina e zidovudina encapsuladas e revestidas com polissorbato 80 (PBCA-3TC/AZT-Ps80).	63
Tabela 9 – Parâmetros relativos à curva analítica dos padrões de 3TC e AZT.	78
Tabela 10 – Precisão por repetibilidade e intermediária das soluções padrão de lamivudina do método para quantificação simultânea de 3TC e AZT.	82
Tabela 11 – Precisão por repetibilidade e intermediária das soluções padrão de zidovudina do método para quantificação simultânea de 3TC e AZT.	82
Tabela 12 – Exatidão por recuperação da lamivudina na presença de nanopartículas de PBCA.	83
Tabela 13 – Exatidão por recuperação da lamivudina na presença de nanopartículas de PBCA-Ps80.	84
Tabela 14 – Exatidão por recuperação da zidovudina na presença de nanopartículas de PBCA.	84
Tabela 15 – Exatidão por recuperação da zidovudina na presença de nanopartículas de PBCA-Ps80.	85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Parâmetros avaliados para síntese das nanopartículas de	
PBCA-3TC/AZT.	61
Quadro 2 – Condições cromatográficas para quantificação simultânea de	
lamivudina e zidovudina nas nanopartículas de PBCA revestidas ou não.	77

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Precisão, calculada como CV (%)	42
Equação 2 – Exatidão (%)	43
Equação 3 – Limite de Quantificação	43
Equação 4 – Limite de Detecção	43
Equação 5 - Eficiência de encapsulação (%)	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% Porcentagem °C Graus Celsius

® Marca registrada

AIDS Acquired Immunodeficiency Syndrome

ART Terapia Antirretroviral

AZT Zidovudina

BHE Barreira Hematoencefálica

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CQA Controle de Qualidade Alto

CQB Controle de Qualidade Baixo

CQM Controle de Qualidade Médio

DLS Espalhamento de Luz Dinâmico

DSC Calorimetria Exploratória Diferencial
DST Doença Sexualmente Transmissível

FDA Food and Drug Administration

g/L grama por litro

HCI Ácido Clorídrico

HIV Vírus da Imunodeficiência Humana

HPLC High Performance Liquid Chromatography

M Molar

mg Miligrama
mL Mililitro

mM Milimolar

MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio)

mV Milivolt N Normal

NaOH Hidróxido de Sódio

nm Nanômetros

PACA Polialquilcianoacrilato

PBCA Poli (n-butil cianoacrilato)

PBCA-Ps80 Nanopartículas de PBCA revestidas com polissorbato 80

PBCA* Nanopartículas ressuspendidas

PBCA*-M Nanopartículas com 3% de manitol ressuspendidas

Ps80 Polissorbato 80

R² Coeficiente de determinação

rpm Rotações por minuto

SNC Sistema Nervoso Central

TG/DTG Termogravimetria/Termogravimetria derivada

μg Microgramas

μL Microlitros

PBCA-3TC/AZT Nanopartículas de PBCA com lamivudina e zidovudina

PBCA-3TC/AZT-Ps80 Nanopartículas de PBCA com a associação de fármacos

e revestidas com polissorbato 80

3TC Lamivudina

SUMÁRIO

1 IN I RODUÇAO	2
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA ou AIDS)	5
2.1.1 Dados epidemiológicos	6
2.2 O vírus da AIDS e o mecanismo de infecção	8
2.2.1 Estágios da infecção pelo HIV	10
2.3 Medicamentos antirretrovirais	11
2.3.1 Zidovudina	13
2.3.2 Lamivudina	15
2.3.3 Associação 3TC + AZT	16
2.4 A Barreira Hematoencefálica (BHE) e a infecção pelo HIV	17
2.5 Nanotecnologia	18
2.6 Nanopartículas poliméricas	19
2.7 Nanopartículas de poli (alquil-cianoacrilato) (PACA)	21
2.7.1 Mecanismos de polimerização	21
2.8 Nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato) (PBCA)	23
2.8.1 Nanopartículas poliméricas revestidas com polissorbato 80	24
2.9 Metodologia para caracterização de nanopartículas	26
3 OBJETIVO	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Material	32
4.1.1 Matérias primas, solventes e reagentes	32
4.1.2 Equipamentos e dispositivos diversos	33
4.2 Métodos	34
4.2.1 Preparo das nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato) isentas de forma (PBCA)	

4.2.2 Preparo das nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato) contendo fármaco (PBCA-3TC/AZT)
4.2.3 Avaliação do processo de liofilização das nanopartículas de poli (n-buti cianoacrilato)
4.2.4 Revestimento das nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato) com polissorbato 80
4.2.5 Distribuição do diâmetro médio e índice de polidispersividade
4.2.6 Determinação do potencial zeta das nanopartículas
4.2.7 Planejamento estatístico
4.2.8 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)
4.2.9 Termogravimetria (TG) / Termogravimetria Derivada (DTG)
4.2.10 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)
4.2.11 Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PBCA e PBCA-Ps80 38
4.2.11.1 Cultivo das células de Caco-2
4.2.11.2 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> para determinação da viabilidade celular das células Caco-2 em presença das nanopartículas de PBCA e PBCA Ps80 38
4.2.12 Desenvolvimento e validação de método analítico por HPLC para determinação da eficiência de encapsulação dos fármacos nas nanopartículas de PBCA e PBCA-Ps80
4.2.12.1 Preparo das soluções40
4.2.12.2 Especificidade
4.2.12.3 Linearidade
4.2.12.4 Precisão
4.2.12.5 Exatidão
4.2.12.6 Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)43
4.2.13 Determinação da eficiência de encapsulação dos fármacos às nanopartículas poliméricas
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO46
5.1 Desenvolvimento e caracterização das nanopartículas de PBCA e PBCA-Ps80
5.1.1 Preparo das nanopartículas de PBCA
5.1.2 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencia zeta

5.1.3 Avaliação do processo de liofilização
5.1.4 Obtenção das nanopartículas de PBCA-Ps80
5.1.5 Caracterização térmica por DSC e TG/DTG das nanopartículas de PBCA e PBCA-Ps80
5.1.6 Avaliação da citotoxicidade
5.2 Desenvolvimento e caracterização das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT e PBCA-3TC/AZT-Ps80
5.2.1 Preparo das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT e PBCA-3TC/AZT-Ps80 60
5.2.2 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencia zeta
5.2.3 Caracterização térmica por DSC e TG/DTG
5.3 Caracterização das nanopartículas por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)
5.4 Desenvolvimento e validação de método analítico por HPLC para determinação da eficiência de encapsulação dos fármacos nas nanopartículas de PBCA e PBCA-Ps80
5.4.1 Linearidade
5.4.2 Especificidade
5.4.3 Precisão
5.4.4 Exatidão
5.4.5 Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)
5.5 Eficiência de encapsulação dos fármacos às nanopartículas poliméricas 85
6 CONCLUSÃO
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
ANEXOS

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um retrovírus do gênero *Lentiviridae* que ataca células específicas do sistema imunológico chamadas células T ou CD4, o que leva a um comprometimento do sistema imunológico do paciente (SANTOS; BECK, 2009). Em 1985, o HIV foi reconhecido como o agente etiológico transmissor da AIDS (CDC, 2000) e, pelo fato de a cura da AIDS ainda não ter sido descoberta, é um dos retrovírus mais estudados nos dias de hoje.

Desde 1981, quando o primeiro caso de AIDS foi reportado, estima-se que 39 milhões de pessoas morreram devido à infecção pelo HIV (WHO, 2016). Durante o processo de disseminação sistêmica do HIV, os macrófagos e monócitos são algumas das células infectadas pelo vírus e, uma vez presente nessas células, o HIV consegue atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e é capaz de causar diversos prejuízos cognitivos ao paciente (WANG; SUN; GOLDSTEIN, 2008; VIEIRA; SOUZA, 2013).

Diversos fármacos já foram identificados por apresentarem atividade antirretroviral. Os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos foram a primeira classe a ser utilizada no tratamento da AIDS e apresentam vasta literatura sobre suas características e atuação no tratamento (BECK *et al.*, 2007, TABORIANSKI, 2003).

A zidovudina é um análogo sintético da timidina, também conhecida como 3'azido- 2',3'-dideoxitimidina; azidotimidina ou AZT, e é altamente utilizada no tratamento da AIDS. A administração mais comum do fármaco é através da via oral, porém apresenta meia-vida muito curta, de aproximadamente 1 h, e baixa biodisponibilidade oral, em torno de 60% (NASCIMENTO, et al., 2004, SERRA, et al., 2008, SINGH et al., 2010) o que acarreta altas doses e alta frequência posológica.

A lamivudina, 3TC ou 2',3'-didesoxinucleosídeo, é um análogo sintético da citidina e é utilizada no tratamento da AIDS combinada à zidovudina (ERON, et al., 1995, MONTEIRO et al., 2006). É administrada por via oral na forma de comprimidos ou soluções, apresenta biodisponibilidade em torno de 82%, podendo variar em cada paciente e apresenta menor toxicidade celular do que a zidovudina (NASCIMENTO, et al., 2004, DEZANI, 2010).

É comum o HIV desenvolver resistência aos medicamentos quando estes são utilizados isoladamente na terapêutica (MARKOWITZ, 1996 *apud* TABORIANSKI, 2003). De acordo com o Ministério da Saúde (2008), a combinação AZT/3TC apresenta, em diversos estudos clínicos, boa resposta terapêutica e é bem tolerada pelos pacientes.

A fim de propor novos sistemas de liberação, estruturas nanocarreadoras vêm sendo amplamente estudadas. As nanopartículas podem ser classificadas de acordo com o material utilizado em seu preparo. Os polímeros naturais, sintéticos e semissintéticos são utilizados no preparo de nanopartículas poliméricas e, por apresentarem características favoráveis, como a fácil reprodutibilidade na fabricação, boa estabilidade e biocompatibilidade e biodegradabilidade, seu uso tem se destacado (MALLIPEDDI; ROHAN, 2010).

Outra vantagem do uso das nanopartículas poliméricas como carreadores é que uma grande variedade de fármacos hidrofílicos ou lipofílicos podem ser incorporados e, em razão da possibilidade de utilizar diversos materiais poliméricos para o seu preparo, o desempenho da nanopartícula pode ser adaptado (MALLIPEDDI; ROHAN, 2010). O poli (n-butil-cianoacrilato) (PBCA) é um monômero derivado do Polialquilcianoacrilato (PACA) e é amplamente utilizado no preparo de nanopartículas, apresentando grande potencial como sistema de liberação de fármacos (ARIAS et al., 2006; DOUGLAS; ILLUM; DAVIS, 1984; MÜLLER et al., 1992 TIAN et al., 2011).

As nanopartículas surgem como uma alternativa de grande potencial para melhorar a biodisponibilidade e o transporte de fármacos sobretudo através da BHE. Muitos estudos mostram que, ao revestir as nanopartículas de PBCA com polissorbato 80, é possível transportar quantidades significativas de fármaco através da BHE e assim fazer com que concentrações adequadas cheguem ao cérebro para o tratamento (KUO; SU, 2007, WILSON *et al.*, 2008, TIAN *et al.*, 2011). Tal fato é bastante vantajoso se considerado que o HIV habita e se multiplica no SNC (KUO; SU, 2007; WANG; SUN; GOLDSTEIN, 2008; VIEIRA; SOUZA, 2013)

Sendo assim, o propósito do presente trabalho foi desenvolver nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato) contendo a associação AZT/3TC, revestí-las com polissorbato 80 e caracterizá-las quanto aos parâmetros físico-químicos.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA ou AIDS)

Em 1981 nos Estados Unidos da América, foi reportado o primeiro caso de AIDS em um homem homossexual. Nos anos seguintes, outros casos em usuários de drogas e em populações de minoria racial foram reconhecidos. A partir de então, criou-se um estereótipo das pessoas que poderiam estar com AIDS, sendo que 46% dos casos reportados eram em homossexuais, 25% em usuários de drogas injetáveis e 11% em heterossexuais (CDC, 2001; CAMPBELL, 1990; BECK *et al.*, 2007).

Em 1985 o vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi reconhecido como agente etiológico transmissor da AIDS (CDC, 2000). Nos anos 80 houve um rápido crescimento do número de casos e mortes de pessoas infectadas com o HIV. Ao mesmo tempo, o número de casos em mulheres e homens heterossexuais também aumentou. Foi descoberto, também nos anos 80, que recipientes contendo sangue e objetos que entrassem em contato com o sangue contaminado, poderiam transmitir a AIDS. Somente no final dos anos 90 o número de casos de AIDS reportados começou a diminuir (CDC, 2001; CAMPBELL, 1990). Apesar dos mais de 30 anos de pesquisa, a AIDS ainda é um doença incurável e vacinas preventivas contra o HIV ainda não foram desenvolvidas (SHIBATA *et al* 2013). Atualmente, o que existe no mercado são medicamentos para tratamento da AIDS e redução dos sintomas.

Pelo fato de a cura da AIDS ainda não ter sido descoberta, o vírus da imunodeficiência humana é um dos mais estudados nos dias de hoje. O HIV é um retrovírus do gênero *Lentiviridae* e, até então, são conhecidos dois tipos: o HIV-1 prevalente no Brasil e no mundo e o HIV-2 que tem maior prevalência na África (SANTOS; BECK, 2009).

2.1.1 Dados epidemiológicos

O combate ao vírus da imunodeficiência humana se tornou um dos mais sérios desafios de saúde do mundo, isso porque a infecção pelo HIV não tem cura e afeta não só a saúde dos indivíduos como também famílias, comunidades e o desenvolvimento e crescimento econômico das nações (WHO, 2015).

De acordo com os dados divulgados pela World Health Organization (2016) e o U.S. Department of Health & Human Services (2016), no ano de 2014 o número de pessoas portadoras do HIV/AIDS no mundo era de aproximadamente 36.9 milhões, sendo que 2,6 milhões dessas pessoas eram crianças abaixo dos 15 anos de idade. Dados mais antigos mostram que no ano de 2013 o número mundial de portadores do HIV/AIDS era de 35 milhões, ou seja, em apenas um ano mais de um milhão de pessoas foram infectadas pelo HIV. Porém, apesar dos desafios, em junho de 2015, estimava-se que 15,8 milhões de pessoas portadoras do HIV tinham acesso ao tratamento antirretroviral. Esse número pode ser considerado como um sinal promissor, já que no mesmo período de 2014 somente 13.6 milhões de pessoas tiveram acesso ao tratamento (UNAIDS, 2016).

Desde 1981, quando o primeiro caso de AIDS foi reportado, estima-se que 35 milhões de pessoas morreram devido à infecção pelo HIV e, apesar dos avanços científicos, no ano de 2015 foram registradas 1,1 milhões de mortes devidas a causas relacionadas com a AIDS, isso porque o acesso à terapia antirretroviral ainda é insuficiente (WHO, 2016).

Apesar dos números ainda serem alarmantes, a preocupação global com o HIV gerou um impacto positivo nos últimos 15 anos. Na Figura 1, é possível observar a redução do número de pessoas que são infectadas pelo HIV e morrem devido a causas relacionadas com o vírus. E também o avanço no número de portadores que tem acesso ao tratamento antirretroviral.

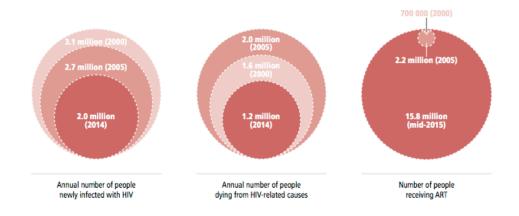


Figura 1 – Progresso global em resposta ao HIV entre os anos 2000-2015

(Fonte: WHO, 2015)

Existe uma preocupação crescente no que diz respeito à prevenção e ao tratamento do HIV, o que sugere que no futuro haverá um declínio no número de infecções e mortes relacionadas ao HIV. No ano de 2015, 17 milhões de pessoas tiveram acesso à terapia antirretroviral, dos quais 15,2 milhões eram de países de baixa e média renda (WHO, 2016).

No Brasil, o primeiro caso reportado de AIDS foi em 1982 no estado de São Paulo. Em 1985, por uma iniciativa federal, foi criado, por meio da Portaria 236, de 2 de maio de 1985, o Programa de Controle da SIDA ou AIDS, atualmente Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. Desde o primeiro caso registrado até o ano de 2012, foram relatados 656.701 casos de AIDS no Brasil, sendo que, somente no ano de 2011, 38.776 novos casos foram notificados (BRASIL, 2015).

Quando observada a incidência da epidemia por região durante 10 anos, todas as regiões do Brasil, exceto o Sudeste, apresentaram alta no número de casos por 100 mil habitantes. Contudo, apesar de o Sudeste ser a única região que demonstrou queda no número de casos por 100 mil habitantes, o maior número de casos acumulados (56%) está concentrado nesta região (BRASIL, 2015). A partir de 1996, o Brasil assegura o acesso aos medicamentos antirretrovirais pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e passou a ser um dos primeiros países em desenvolvimento a garantir o tratamento universal e gratuito aos portadores do HIV (DOURADO *et al.*, 2006).

2.2 O vírus da AIDS e o mecanismo de infecção

Conforme representado na Figura 2, o HIV é constituído por uma membrana lipoproteica que é formada por complexos glicoproteicos integrados a lipídeos. Esses complexos são formados por uma glicoproteína externa, a gp120, e por uma proteína transmembranar, a gp41. A ligação dessas duas proteínas não é estável, pelo fato de a gp120 mudar sua estrutura de acordo com as mudanças do ambiente. É essa proteína que, comumente, é encontrada no soro e no tecido linfático de pacientes infectados pelo HIV (DELICATO, 2005 *apud* BELLINI; FRASSON, 2006; RUBBERT; BEHRENS; OSTROWSKI, 2011).

Na parte interna, o HIV apresenta outra membrana constituída por uma proteína denominada p17. Essa membrana delimita o espaço onde há uma cápsula proteica que contém o antígeno p24. No interior dessa cápsula há duas moléculas de RNA associadas à nucleoproteína p7 e à enzima transcriptase reversa. A replicação do HIV se dá pelas enzimas transcriptase reversa, integrase e protease, presentes no interior da cápsula viral (DELICATO, 2005 *apud* BELLINI; FRASSON, 2006; RUBBERT; BEHRENS; OSTROWSKI, 2011).

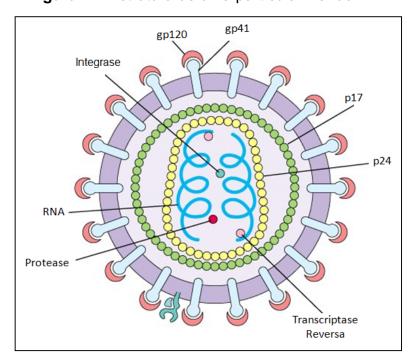


Figura 2 – Estrutura de uma partícula viral do HIV.

(Fonte: adaptado de RUBBERT; BEHRENS; OSTROWSKI, 2011)

O HIV ataca e danifica o sistema imunológico e, para que isso seja possível, precisa ocorrer a ligação do vírus a receptores específicos (SOUZA; ALMEIDA, 2003). Os linfócitos T são os principais componentes do sistema imunológico e cerca de 60% deles contém uma glicoproteína chamada CD4 em sua superfície que atua como molécula receptora. É por intermédio desse receptor e outros co-receptores, como o CCR5, que o HIV infecta os linfócitos T e também monócitos e macrófagos, eosinófilos, células dentríticas, sistema nervoso central, entre outros (RUBBERT; BEHRENS; OSTROWSKI, 2011; SANTOS; BECK, 2009).

Pode-se dizer então, que as células T CD4 funcionam como porta de entrada para que o HIV possa infectar o organismo (SOUZA; ALMEIDA, 2003). Essa infecção dos linfócitos auxiliares ocorre devido à ligação da glicoproteína gp120 ao receptor CD4 na superfície da célula hospedeira e aos co-receptores. Então as membranas do vírus e da célula se fundem e o núcleo viral é depositado no citoplasma da célula hospedeira onde se inicia a replicação do RNA viral (KULKOSKY; SKALKA, 1990 EDWARDS *et al.*, 2001).

As células T CD4 que são infectadas acabam sofrendo apoptose e assim ocorre uma diminuição significativa no numero de linfócitos T CD4, estado característico de pacientes infectados pelo HIV. O declínio no número dessas células gera um comprometimento do sistema imunológico do paciente (CORBEIL et al., 2001; SANTOS; BECK, 2009).

Durante o processo de disseminação sistêmica do HIV, os macrófagos e monócitos são algumas das células infectadas pelo vírus e, uma vez presente nessas células, o HIV consegue atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). São relatadas grandes quantidades de DNA viral presentes dos tecidos cerebrais dos portadores da AIDS, o que comprova o fato de o HIV habitar e se multiplicar no cérebro do paciente (KUO; SU, 2007; WANG; SUN; GOLDSTEIN, 2008; VIEIRA; SOUZA, 2013)

Ao atravessar a BHE, o vírus é capaz de causar diversos prejuízos cognitivos ao paciente ao provocar o desenvolvimento de patologias neurodegenerativas (WANG; SUN; GOLDSTEIN, 2008; VIEIRA; SOUZA, 2013). Quase metade da população infectada pelo HIV desenvolve alguma forma de disfunção neurológica, provavelmente devido à entrada do HIV no sistema nervoso central (NOWACEK; GENDELMAN, 2009). Devido a esse fato, é imprescindível que os medicamentos

anti-HIV atravessem a BHE e produzam o efeito terapêutico desejável, para que os níveis da infecção pelo HIV sejam reduzidos (KUO; SU, 2007).

2.2.1 Estágios da infecção pelo HIV

Nem todos os portadores do vírus de imunodeficiência humana evoluem para a AIDS. Segundo a World Health Organization (2015), essa evolução pode levar de 10 a 15 anos e ainda é possível retardá-la com a utilização correta da terapia antirretroviral. São considerados três estágios da infecção pelo HIV e o tratamento pode desacelerar e prevenir essa evolução, porém após a exposição ao vírus o portador pode transmitir o HIV independente da fase em que se encontra.

A primeira fase é chamada de infecção aguda, ocorre entre 2 a 4 semanas após a exposição ao vírus e geralmente o portador apresenta sintomas similares ao da gripe, fazendo com que a maior parte dos casos passe despercebido. A segunda fase é o período de latência, um período assintomático no qual o HIV está se reproduzindo se maneira lenta, os pacientes podem passar um longo período de tempo nesta fase, principalmente se estiverem sendo medicados. É durante o período de latência que o sistema imune vai ficando cada vez mais deprimido, pela depleção dos linfócitos T CD4 (CDC, 2015).

A terceira e última fase é a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, o estágio mais avançado da infecção pelo HIV, quando o sistema imune do portador está seriamente danificado. É considerado que o paciente progrediu para AIDS quando a contagem de células CD4 apresenta resultado abaixo de 200 células/mm³, visto que uma pessoa com condições normais de saúde apresenta 800 a 1200 células/mm³. Devido à baixa imunidade, é comum que o paciente desenvolva doenças oportunistas, nesses casos, independente da contagem de células CD4, pode-se considerar o diagnóstico de AIDS (CASSEB *et al.*, 2007; CDC, 2015).

De acordo com o Centers for Disease Control and Prevention (2015), as pessoas diagnosticadas com AIDS que não tiverem acesso à terapia antirretroviral, sobrevivem normalmente por três anos após receberem o diagnóstico e, caso haja

alguma infecção oportunista, a expectativa de vida do paciente cai para apenas um ano.

2.3 Medicamentos antirretrovirais

Os fármacos antirretrovirais (ARV) existentes no mercado, bem como suas combinações, são bastante eficazes para melhorar a qualidade de vida dos portadores do HIV e retardar a progressão da doença, uma vez que ainda é incurável. (TABORIANSKI, 2003, CHEQUER et al., 2013). Diversos fármacos já foram identificados por apresentarem atividade antirretroviral e todos possuem similar mecanismo de ação: inibir a replicação viral em diferentes etapas e, então, são classificados de acordo com as enzimas virais que são capazes de inibir e seu mecanismo de ação (SOUZA; ALMEIDA, 3003).

As três classes de fármacos ARV mais conhecidas e utilizadas no tratamento da AIDS (FLEXNER, 2004; TABORIANSKI, 2003; SOUZA; ALMEIDA, 2003), são:

- Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos;
- Inibidores da transcriptase reversa n\u00e3o an\u00e1logos de nucleos\u00eddeos;
- Inibidores da protease.

Na Figura 3 é possível observar a enzima viral e a fase em que cada classe de fármaco exerce sua ação.

Transcriptase reversa

Proteinas Virais

Novas partículas virais

Drogas capazes de inibir a enzima protease

Novas partículas virais

Drogas capazes de inibir a enzima protease

Figura 3 – Demonstração da ação dos medicamentos disponíveis no mercado sobre o ciclo da replicação viral do HIV.

(Fonte: SOUZA; ALMEIDA, 2003)

Desde 2003, duas novas classes de fármacos ARV foram aprovadas pelo FDA para uso em pacientes portadores do HIV (BRITO, 2011). Esses fármacos são classificados como inibidores de fusão e inibidores da integrase, tendo como único representante de cada classe a enfuvirtida e o raltegravir, respectivamente (BRASIL, 2016; BRITO, 2011). Segundo o Departamento de DST, AIDS e Hepatites virais do Brasil (2016), atualmente existem 22 medicamentos para tratamento da infecção pelo HIV divididos nas cinco classes citadas anteriormente.

Os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos foram a primeira classe a ser utilizada no tratamento da AIDS e apresentam vasta literatura sobre suas características e atuação no tratamento (BECK *et al.*, 2007; TABORIANSKI, 2003). Esses fármacos atuam inibindo a transcriptase reversa e geralmente são utilizados na terapêutica em combinação para evitar o desenvolvimento da resistência viral (SILVA *et al.* 2006; DEZANI, 2010).

Independente da classe em que o fármaco se enquadra, todos têm como finalidade retardar a reprodução do vírus para fazer com que o processo da doença seja mais lento. Depois de um determinado tempo, é comum o HIV desenvolver

resistência aos medicamentos quando esses são utilizados isoladamente, esse tempo varia de acordo com o fármaco e com o paciente, podendo levar dias ou anos (MARKOWITZ, 1996 *apud* TABORIANSKI, 2003).

Em 1996, na 11ª Conferência Internacional da AIDS realizada em Vancouver, foram apresentados resultados positivos para o tratamento da doença com a terapia tríplice, conhecida popularmente como coquetel de drogas, para que falhas na terapêutica fossem evitadas. Foi relatado que a utilização do coquetel de drogas era capaz de diminuir em 100 vezes o ritmo de replicação do HIV em relação à monoterapia até então empregada (SOUZA; ALMEIDA, 2003, SPINK; CARVALHEIRO, 2002).

A utilização de antirretrovirais combinados vem mostrando resultados positivos em todos os lugares em que é utilizada. O que se tem de mais recente na literatura sugere que a primeira escolha para tratamento do HIV se inicie com a combinação de três fármacos, sendo dois inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e um inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeos (TABORIANSKI, 2003; WHO, 2013).

Segundo o *Guideline* publicado em 2013 pela WHO, sobre o uso dos antirretrovirais para tratamento e prevenção da infecção pelo HIV, os fármacos de primeira escolha para a terapia antirretroviral (ART) são o tenofovir (TDF), lamivudina (3TC) e efavirenz (EFV) combinados. Nos casos em que há alguma restrição e o TDF é contraindicado, a primeira alternativa para substituição é a zidovudina (AZT), principalmente nos casos de nefropatia e gestação. Vale ressaltar que o Protocolo Clínico brasileiro publicado pelo Ministério da Saúde (2013), segue as mesmas orientações do *Guideline* publicado pela WHO, ou seja, possui o mesmo esquema de terapia inicial.

2.3.1 Zidovudina

Em 1964, HORWITZ e colaboradores sintetizaram a zidovudina e a caracterizaram como fármaco antineoplásico. Sua atividade antirretroviral só foi observada em 1974 por OSTERTAG e colaboradores, porém seu efeito inibitório

sobre o HIV foi relatado após a aplicação clínica do fármaco por MITSUYA e colaboradores, em 1985, e sua aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*) aconteceu dois anos depois, em 1987 (MONTEIRO *et al.*, 2006).

A zidovudina (Figura 4) é um análogo sintético da timidina, também conhecida como 3'azido- 2',3'-dideoxitimidina; azidotimidina ou AZT e é amplamente utilizada no tratamento da AIDS. É um dos representantes da classe de inibidores da transcriptase reversa análogo de nucleosídeos e foi o primeiro fármaco relatado por possuir efeito inibitório contra o HIV (SOUZA; ALMEIDA, 2003).

Figura 4 – Estrutura química da zidovudina.

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

De acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010), o AZT possui massa molecular de 267,2 e temperatura de fusão em torno de 124 °C, é um pó cristalino, acastanhado e apresenta polimorfismo. É levemente solúvel em água e solúvel em etanol e o comprimento de onda de máxima absorção no espectro ultravioleta é de 266,5 nm. É um fármaco hidrofílico, seu valor de pKa é de 9,8 (CHECA et al., 2005) e apresenta logP de 0,05 (SINGH et al., 2010).

A administração mais comum do fármaco é através da via oral, na forma de cápsulas, comprimidos e xaropes. Após administração, o fármaco é absorvido rapidamente e quase que por completo pelo trato gastrintestinal, contudo, o AZT sofre extenso metabolismo de primeira passagem e, devido a sua rápida biotransformação, a biodisponibilidade sistêmica do fármaco é em torno de 60%, podendo variar de acordo com cada indivíduo (NASCIMENTO *et al.*, 2004; BALINT, 2001; ARAUJO, 2003). O tempo de meia vida relatado também é muito curto:

MOORE e colaboradores (1999) observaram que, após a administração de 300 mg de AZT via oral, o tempo de meia vida encontrado foi de $1,50 \pm 0,24$ horas.

O AZT é um pró-fármaco e entra nas células por difusão passiva, sofre fosforilação intracelular pela ação das proteínas quinases, o que ocasiona um metabólito trifosfatado. Esse metabólito, que é ativo, é capaz de inibir competitivamente a transcriptase reversa, enzima que converte o RNA viral em DNA pró-viral e, consequentemente, diminuir a replicação do HIV (BALINT, 2001; SOUZA; STORPIRTIS, 2004). A biotransformação da zidovudina ocorre, em maior parte, por glicuronidação hepática, quando o AZT é convertido em um metabólito inativo e excretado pela urina (ARAUJO, 2003; BALINT, 2001).

Em relação à distribuição sistêmica, o AZT é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica atingindo 50% da concentração plasmática em adultos e 24% em crianças. Atravessa parcialmente a placenta e também é encontrado no sêmen de pacientes soro positivos (TABORIANSKI, 2003; ARAUJO, 2003).

Além de possuir meia vida muito curta e sofrer extenso metabolismo de primeira passagem, o uso prolongado deste medicamento pode ocasionar o aparecimento de efeitos tóxicos, como leucopenia, neutropenia e anemia, esta tornase significativa normalmente após 4 a 6 semanas, rápida resistência viral e consequente falha na terapêutica. A dose usual da zidovudina é de 300 mg duas vezes ao dia (NASCIMENTO et al., 2004; TABORIANSKI, 2003; ARAUJO, 2003).

2.3.2 Lamivudina

A lamivudina, 3TC ou 2',3'-didesoxinucleosídeo (Figura 5), é um análogo sintético da citidina, e pertence à classe dos inibidores da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo e foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 1995 (ERON *et al.*, 1995, MONTEIRO *et al.*, 2006). De acordo com SOUDEYNS *et al.* (1991) *apud* BALINT (2001), o 3TC demonstra menor citotoxicidade e menor resistência viral em relação à zidovudina, porém também é menos potente que o AZT. Os dois fármacos são normalmente utilizados associados no esquema terapêutico para tratamento da AIDS (MONTEIRO *et al.*, 2006).

NH₂

Figura 5 – Estrutura química da lamivudina.

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

O 3TC é administrado através da via oral na forma de comprimidos ou soluções, seu mecanismo de ação é similar ao do AZT, sendo absorvido rapidamente no intestino por difusão passiva. A lamivudina apresenta biodisponibilidade sistêmica em torno de 80%, podendo variar em cada paciente e atinge o líquido cefalorraquidiano em pequenas quantidades. A eliminação da maior parte do fármaco ocorre pela urina após 12 horas da administração da dose (BALINT, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2004; DEZANI, 2010). A dose usual da lamivudina é de 150 mg, duas vezes ao dia (TABORIANSKI, 2003).

O 3TC é um pó cristalino, branco a branco-amarelado, facilmente solúvel em água, ácido clorídrico 0,1 M e hidróxido de sódio 0,1 M, ligeiramente solúvel em metanol e etanol e insolúvel em acetona. Possui massa molecular igual a 229,26, ponto de fusão na faixa de 176 °C a 178 °C e o comprimento de onda máximo é de 270 nm (BRASIL, 2010). A lamivudina apresenta pKa de 4,3 (SOUZA; STORPIRTIS, 2004) e logP de 0,06 (DEZANI, 2010).

2.3.3 Associação 3TC + AZT

A associação entre fármacos antirretrovirais surge como uma estratégia terapêutica para aumentar a adesão ao tratamento e reduzir o uso de diversos medicamentos na terapêutica (SOUZA; STORPIRTIS, 2004). De acordo com o Ministério da Saúde (2008), a combinação AZT/3TC apresenta, em diversos estudos clínicos, boa resposta terapêutica e é bem tolerada pelos pacientes. Tanto o 3TC

quanto o AZT fazem parte da lista de medicamentos essenciais da WHO, e estão presentes tanto no *Guideline* publicado em 2013 pela WHO quando no Protocolo Clínico brasileiro publicado pelo Ministério da Saúde (2014).

No mercado já existem medicamentos contendo dois ou mais fármacos antirretrovirais associados. A Fundação Oswaldo Cruz, por exemplo, produz comprimidos revestidos que contém lamivudina e zidovudina nas concentrações de 150 mg e 300 mg, respectivamente. Na literatura existem estudos que comprovam que a associação dos dois fármacos não causa prejuízo no que diz respeito à absorção e efeito dos mesmos (MOORE *et al.*, 1999).

A monoterapia com AZT promove diversos efeitos colaterais, bem como rápida resistência viral ao fármaco, o mesmo ocorre com a lamivudina, sendo assim, a associação do AZT ao 3TC surgiu com a proposta de aumentar a supressão viral e diminuir a resistência aos fármacos, mostrando-se mais eficiente para o tratamento da AIDS e melhor tolerada pelos pacientes (MALLIPEDDI; ROHAN, 2010, MOODLEY *et al.*, 1998, NASCIMENTO *et al.*, 2004).

2.4 A Barreira Hematoencefálica (BHE) e a infecção pelo HIV

Para manter um bom funcionamento e evitar o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, o sistema nervoso central (SNC) possui um mecanismo de barreira para selecionar as substâncias que chegam até ele, a barreira hematoencefálica (BHE), que possui interface entre o encéfalo e os vasos sanguíneos e controla as substâncias que passam do sangue para o SNC e viceversa, impedindo a passagem de macromoléculas, substâncias tóxicas, medicamentos e regulando a homeostase cerebral (ROJAS et al., 2011, VIEIRA; SOUZA, 2013).

A BHE é organizada de tal forma que a permeabilidade seja muito restrita, dificultando moléculas de penetrar através da barreira. Ela é composta por células endoteliais, ocludinas, claudinas, astrócitos, pericitos e matriz extracelular (ROJAS et al., 2011).

A permeabilidade seletiva da BHE se dá não somente ao endotélio que regula a troca de substâncias, mas também à presença de enzimas degradantes presentes no interior do endotélio, dessa forma, com exceção de água, gases como oxigênio e dióxido de carbono e algumas moléculas lipossolúveis muito pequenas, poucas substâncias passam facilmente pela BHE. Os íons, glicose, aminoácidos e componentes do ácido nucléico, que são moléculas hidrofílicas, passam pela BHE por canais especializados. Já os peptídeos e proteínas que não tem um sistema específico de transporte, demoram mais para atravessar a BHE (ROJAS et al., 2011).

Alterações neurológicas, como a demência associada ao HIV, esclerose múltipla e doença de Alzheimer, podem alterar a permeabilidade da BHE, comprometendo sua integridade. No caso da infecção pelo HIV, a glicoproteína gp120 presente em sua membrana, induz a toxicidade e diminui a resistência das junções íntimas (JI), que são as principais reguladoras da permeabilidade celular, aumentando a permeabilidade e a migração de leucócitos, consequentemente, levando ao crescimento da multiplicação do vírus no SNC (BALLABH; BRAUN; NEDERGAARD, 2004; ROJAS et al., 2011).

2.5 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma das mais promissoras áreas de pesquisa e é definida como a ciência que compreende a manipulação de materiais em nanoescala e pode ser utilizada em diversos segmentos produtivos incluindo fármacos e medicamentos, alimentos e cosméticos (FDA, 2011; NICOLAS; COUVREUR, 2009). O físico Richard Feynman apresentou os conceitos que fundamentam a nanotecnologia em uma palestra intitulada "Há muito espaço lá em baixo", em uma reunião da Sociedade Americana, no Instituto de Tecnologia da Califórnia em 1959. Feynman relatou um processo no qual os cientistas seriam capazes de manipular átomos individuais e moléculas muito antes de se ouvir falar no termo nanotecnologia. A nomenclatura de nanotecnologia foi utilizada pela primeira vez em 1974 pelo professor Norio (FDA, Taniguchi na Universidade de Tóquio, Japão 2012; **NATIONAL** NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2015; HUNT JR., 2004).

A Food and Drug Administration (FDA) publicou em 2011 o primeiro projeto de orientação sobre o uso de nanopartículas, chamado de "Draft Guidance for Industry, Considering Whether na FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology", o qual foi atualizado no ano de 2014. No Guideline, nanotecnologia é definida como a compreensão e controle da matéria em dimensões entre cerca de 1 a 100 nanômetros, que apresentem propriedades físicas, químicas ou biológicas que permitam aplicações inovadoras para este material (FAROKHZAD; LANGER, 2009). Além disso, os materiais que apresentarem tamanho de superfície fora da faixa de nanoescala definida pela FDA podem também ser considerados nanotecnologia, ou seja, quando os mesmos forem maiores que 100 nm e menores que 1000 nm, mas apresentarem propriedades físicas ou químicas ou efeitos biológicos que demonstrem característica inovadora relacionada à sua dimensão (ZHANG et al., 2007).

O uso da nanotecnologia a fim de otimizar fármacos já existentes tem atraído grande atenção e já existem diversos estudos que comprovam seus benefícios. Os nanosistemas são capazes de proporcionar a melhora da solubilidade de fármacos pouco solúveis, aumento da biodisponibilidade, direcionamento dos fármacos ao local alvo, liberação modificada, terapia combinada utilizando dois ou mais medicamentos, facilitar a circulação de substâncias através de barreiras fisiológicas, proteção dos medicamentos contra degradação e consequente aumento da estabilidade, significativa melhora da terapêutica, entre outros (ALAM, et al., 2010; ZHANG et al., 2007; FAROKHZAD; LANGER, 2009; ROGER et al., 2010)

2.6 Nanopartículas poliméricas

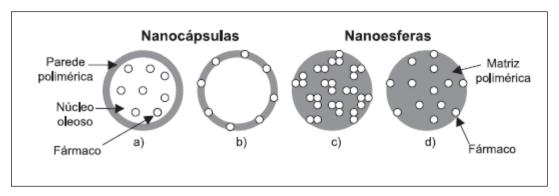
As nanopartículas podem ser classificadas de acordo com o material utilizado em seu preparo, como os lipossomos, dendrímeros, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas, nanopartículas poliméricas, entre outros (MALLIPEDDI; ROHAN, 2010).

Polímeros naturais, sintéticos e semi-sintéticos são utilizados no preparo de nanopartículas poliméricas e, por apresentarem características favoráveis, como a fácil reprodutibilidade na fabricação, boa estabilidade e biocompatibilidade e biodegradabilidade, seu uso tem se destacado. Os polímeros que são comumente

empregados no preparo das nanopartículas são: quitosana, gelatina, poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poliglicólico (PGA), poli alquil cianoacrilato (PACA), entre outros (MALLIPEDDI; ROHAN, 2010). Pode-se também utilizar polímeros como revestimento, como polietileno glicol, para modificação da superfície das nanopartículas (HAAS, 2007).

A definição de nanopartícula inclui duas diferentes estruturas chamadas de nanocápsulas e nanoesferas, que apresentam diferença entre si quando se refere à composição e organização estrutural (Figura 6). As nanocápsulas são constituídas por um núcleo aquoso ou oleoso envolvido por um invólucro polimérico e, o fármaco pode estar dissolvido nesse núcleo ou adsorvido à parede polimérica. No caso das nanoesferas, é formada uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK et al., 2003; HILLAIREAU; COUVREUR, 2009; TAVARES, 2013). A composição da nanopartícula e o método de preparo são os fatores que determinam a formação de um tipo ou de outro e a disposição do fármaco (MONTEIRO, 2013).

Figura 6 - Representação esquemática da estrutura de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.



(Fonte: Adaptado de SCHAFFAZIK et al., 2003).

Uma grande variedade de fármacos hidrofílicos ou lipofílicos pode ser incorporada às nanopartículas poliméricas e em razão da possibilidade de utilizar diversos materiais poliméricos, o desempenho da nanopartícula pode ser adaptado de acordo com o ativo biológico a ser incorporado e o resultado final desejado (MALLIPEDDI; ROHAN, 2010).

2.7 Nanopartículas de poli (alquil-cianoacrilato) (PACA)

A síntese dos monômeros inicialmente chamados de alquil cianoacrilato (ACA) foi relatada pela primeira vez por Alan Ardis, em 1949, e ficaram disponíveis comercialmente em 1958; estes monômeros chamam a atenção devido à sua excelente propriedade adesiva (PARK *et al.*, 2002; NICOLAS; COUVREUR, 2009). Podem ser utilizados como suturas cirúrgicas, principalmente os ACA de cadeia longa, como o n-butil cianoacrilato e, no mercado, são encontrados alguns produtos disponíveis como o Indermil[®], Liquiband[®] e Histoacryl[®]. O uso dos PACA como carreadores nanoestruturados se iniciou nos anos 80 e desde então vem ganhando espaço por demonstrar resultados significativos no tratamento de diversas patologias (NICOLAS; COUVREUR, 2009; VAUTHIER *et al.*, 2003).

Quando comparados com outros sistemas nanoestruturados, esses sistemas de liberação de fármacos apresentam algumas vantagens: são monômeros biocompatíveis e biodegradáveis, de preparo simples e com a facilidade de transposição de escala laboratorial para escala industrial (*scale-up*) (SOPPIMATH, *et al.*, 2001; TAVARES, 2013; VAUTHIER *et al.*, 2003).

2.7.1 Mecanismos de polimerização

O método de preparo influencia no tipo de nanopartícula obtida. O método mais simples e mais comumente empregado é a polimerização do monômero correspondente e pode ser utilizado no preparo de nanocápsulas, pelo método de polimerização interfacial ou no preparo de nanoesferas, pelo método de polimerização em emulsão (VAUTHIER et al., 2003; TAVARES, 2013).

O método de polimerização em emulsão é simples, não utiliza solvente orgânico, apresenta um número pequeno de etapas e, em geral, produz nanopartículas estáveis e com bom rendimento (ALYAUTDIN *et al.*, 1997; XI-XIAO *et al.*, 2006). Os monômeros de PACA podem ser sintetizados por três diferentes mecanismos de polimerização conforme demonstrado na Figura 7: (a) aniônico, (b) zwitteriônico e (c) radicalar.

Figura 7 – Etapas de iniciação e propagação envolvidas durante o processo de polimerização do alquil cianoacrilato: (a) aniônico, (b) zwitteriônico e (c) radicalar.

(Fonte: NICOLAS; COUVREUR, 2009)

A polimerização ocorre, geralmente, em meio reacional aquoso, com solução diluída de HCl e pH ajustado para 2,5, é iniciada pelos íons hidroxila presentes na água ou pelos grupos nucleofílicos presentes nas cadeias dos tensoativos ou estabilizantes. O tamanho das nanoesferas produzidas pode variar de 50 a 300 nm. A polimerização dura em torno de 3 a 4 horas sob agitação vigorosa, variando de acordo com a natureza do polímero (VAUTHIER *et al.*, 2003).

O Pluronic[®] e o Dextran[®] são os tensoativos ou estabilizantes que são comumente empregados na polimerização dos monômeros de PACA, sendo que o uso de diferentes estabilizantes pode influenciar no diâmetro e também no potencial zeta das nanopartículas. Quando o Dextran[®] é empregado, o mesmo é capaz de recobrir as partículas formadas e estabilizá-las pelo mecanismo de repulsão estérica (NICOLAS; COUVREUR, 2009; LIMOUZIN *et al.*, 2003; VAUTHIER *et al.*, 2003; TAVARES, 2013).

Para que sejam obtidas as características físico-químicas desejadas, as condições de preparo das nanopartículas de PACA devem ser controladas. Conforme demonstrado na literatura, o pH do meio reacional pode interferir significativamente no diâmetro e no potencial zeta das nanopartículas, bem como na

porcentagem de fármaco associado. O uso da quantidade adequada de tensoativos interfere não somente na estabilidade das nanoestruturas, mas também na eficiência de encapsulação do fármaco, podendo aumentar a porcentagem de encapsulação ou, quando em excesso, diminuir (COUVREUR; VAUTHIER, 1991; MCCARRON et al., 1999; REDDY; MURTHY, 2004b; NICOLAS; COUVREUR, 2009).

2.8 Nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato) (PBCA)

O poli (n-butil-cianoacrilato) é um monômero derivado do PACA e é amplamente utilizado no preparo de nanopartículas, apresentando grande potencial como sistema de liberação de fármacos. Possui propriedades favoráveis ao seu uso, como a biocompatibilidade e biodegradabilidade, o aumento da biodisponibilidade sistêmica, baixa toxicidade, possibilidade de veiculação de diversos fármacos e possibilidade de modificação da superfície com diferentes revestimentos (ARIAS et al., 2006; DOUGLAS; ILLUM; DAVIS, 1984; MÜLLER et al., 1992 TIAN et al., 2011).

A degradação dos polímeros sintéticos pelos sistemas biológicos é uma das questões que determinam a aceitabilidade dos mesmos, uma vez que a biodegradação é necessária para assegurar a liberação do fármaco e para evitar a acumulação do material polimérico no organismo, o que pode desencadear efeitos tóxicos. O PBCA sofre degradação intracelular, os grupos alquil são hidrolisados por esterases, aumentando a hidrofilicidade do polímero até que ele se torne totalmente solúvel em água (HILLAIREAU; COUVREUR, 2009).

HILLAIREAU e colaboradores (2006) realizaram um estudo com a zidovudina trifosfatada combinada a um polímero catiônico, e esse complexo foi encapsulado em nanopartículas de PBCA. Foi comparada a absorção celular do AZT trifosfatado livre com o AZT trifosfatado encapsulado e os testes *in vitro* demonstraram que ao veicular o fármaco às nanopartículas de PBCA a absorção pelos macrófagos foi aumentada em 30 vezes quando comparada ao fármaco livre.

A polimerização ocorre conforme descrito no item anterior (2.8.1) e, de acordo com as variações do método, o tamanho de partícula encontrado para o PBCA varia entre 100 a 200 nm (DOUGLAS; ILLUM; DAVIS, 1984). MÜLLER e colaboradores

(1992) demonstraram resultados de tamanho de partícula variados para nanopartículas de PBCA produzidas pelo mesmo método, porém com diferentes estabilizantes. No mesmo estudo, foram apresentados diferentes resultados de potencial zeta para as mesmas nanopartículas. A única variação foi o tipo de diluente que em que foi realizada a diluição para a medição.

ALONSO e colaboradores (1991) avaliaram as características físico-químicas de nanopartículas de PBCA contendo sulfato de amicacina. Para a realização das análises foram preparadas amostras com diferentes concentrações do fármaco que, em algumas amostras, foi adicionado durante a polimerização e em outras foi incubado junto às nanopartículas já formadas. Pode-se notar que a diferença na concentração do fármaco, bem como o momento de sua adição, interferiu no tamanho e no potencial zeta das nanopartículas.

2.8.1 Nanopartículas poliméricas revestidas com polissorbato 80

Para que seja atingido o sucesso terapêutico de inúmeras doenças, é de extrema importância que o fármaco consiga chegar ao SNC e, para que isso aconteça, ele deve primeiro atravessar a BHE. As nanopartículas podem melhorar ainda mais a eficiência e a especificidade do transporte de fármacos para o cérebro. No geral, para que isso aconteça duas estratégias podem ser utilizadas, alvo indireto ou ação direta no receptor. No primeiro caso, as nanoestruturas são constituídas de materiais que se ligam a moléculas específicas do corpo humano que tem alta afinidade com os receptores localizados na BHE (WONG et al., 2010).

Os polissorbatos, em especial o polissorbato 80, são tensoativos não iônicos e são comumente utilizados por apresentarem baixa toxicidade e não apresentarem riscos para a administração intravenosa (WONG et al., 2010). Muitos estudos mostram que ao revestir as nanopartículas de PBCA com polissorbato 80 é possível aumentar significativamente o transporte de fármacos pela BHE, fator essencial para promover o resultado adequado no tratamento de diversas doenças, como o câncer, Alzheimer, doenças neurológicas, AIDS entre outros (PETRI et al., 2007; KUO; SU, 2007, WILSON et al., 2008, TIAN et al., 2011).

Se utilizado sozinho, o polissorbato pode atuar como micela nanocarreadora, mas ele é comumente utilizado como revestimento para outras nanoestruturas conferindo a esses sistemas as propriedades necessárias para atravessar a BHE (WONG et al., 2010). O mecanismo preciso de transporte de fármacos encapsulados em nanopartículas de PBCA revestidas por polissorbato 80 (Ps80) ainda não é totalmente conhecido. Supõe-se que acontece por meio de ligações covalentes com a apolipoproteina E, A-I ou B-100, seguido por endocitose das nanoparticulas, mediada por receptores localizados nas células endoteliais do cérebro (TIAN et al, 2011; REMPE et al., 2011). PETRI et al (2007) desenvolveram um estudo que demonstra, através de eletroforese bidimensional, a hipótese de que o transporte através da BHE se da pela interação das nanopartículas com a apolipoproteina A-I.

GULYAEV *et al.* (1999) avaliaram o transporte da doxorrubicina através da BHE. Foram realizados testes em ratos, nos quais o grupo controle recebeu doxorrubicina, disponível comercialmente, diluída em solução salina e o grupo teste recebeu a formulação de nanopartículas ressuspensa em solução salina contendo 1% de polissorbato 80. O teste *in vivo* demonstrou altas concentrações de doxorrubicina (> 6 μg/g) no cérebro após 2 a 4 horas da administração da suspensão de nanopartículas revestidas e, quando administrado só o fármaco livre, as concentrações ficaram abaixo do limite de detecção (< 0,1 μg/g).

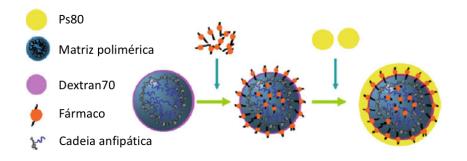
Demais estudos demonstram resultados semelhantes, ALYAUTDIN e colaboradores (1997) sintetizaram nanopartículas de PBCA revestidas com Ps80 e incorporaram loperamida, que é um agonista opióide e exerce seu efeito através do SNC. Os pesquisadores testaram a analgesia provocada em ratos pelo teste de tail-flick e concluíram que as nanopartículas sem o revestimento não foram capazes de gerar efeito analgésico, por outro lado, as revestidas provocaram um efeito maior e mais duradouro.

REMPE et al. (2011) realizaram um estudo in vitro utilizando células endoteliais do cérebro de um suíno para demonstrar o transporte de nanopartículas de PCBA revestidas com polissorbato 80 através da BHE e a influência desses nanocarreadores na integridade da barreira. Os resultados foram obtidos com a avaliação da resistência elétrica transendotelial e foi possível observar que as nanopartículas promovem uma desestruturação reversível na BHE após 4 h, coincidindo com o tempo em que foi relatada a maior taxa de permeação. Esse

relato indica que pode existir alguma ligação entre a perda de integridade da barreira e a difusão de partículas. Contudo, durante todo o período de tempo observado no experimento houve permeação das substâncias de referência, apontando que existem outros mecanismos envolvidos, como a transcitose e a endocitose.

A representação da disposição e estrutura das nanopartículas de PBCA contendo fármaco e revestidas com Ps80 foi proposta por SUN e colaboradores (2010), conforme Figura 8. No entanto, não foram encontrados testes que comprovem este arranjo.

Figura 8 – Representação do esquema da síntese de nanopartículas de PBCA carregadas com fármaco e revestidas com Ps80.



(Fonte: Adaptado de SUN et al., 2010)

2.9 Metodologia para caracterização de nanopartículas

Por dispor de diversas vantagens para a terapêutica, a nanotecnologia desperta grande interesse por parte de muitos pesquisadores e a grande quantidade de publicações nesta área torna este fato evidente. Em consequência, conhecer as propriedades físico-químicas da partícula, é essencial para o desenvolvimento de um sistema de liberação seguro e eficaz (MCNEIL, 2011; CHO et al., 2013).

Diversas técnicas podem ser empregadas para caracterizar e compreender tais nanoestruturas. Nesse quesito, pode-se citar como exemplo o espalhamento de luz dinâmico (DLS); mobilidade eletroforética (potencial zeta); microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET); microscopia de força atômica (AFM);

análise térmica (DSC e TG); difração de raios laser (LD) e espalhamento de raio-x a baixo ângulo (SAXS).

A análise de tamanho médio é a informação mais básica na caracterização das nanopartículas, porém é um dos fatores determinantes para biodistribuição da mesma (CHO et al., 2013). A técnica de DLS é comumente utilizada para este fim, pois além de produzir resultados precisos rapidamente, é um método de fácil aplicação (KECK, 2010). O resultado é expresso em diâmetro médio de partícula e a homogeneidade do sistema como índice de polidispersividade (PI), sendo que um valor de PI entre 0,1 a 0,25 indica uma estreita faixa de distribuição de tamanho; valores superiores a 0,5 indicam uma ampla distribuição (CHO et al., 2013).

A técnica que emprega difração de raios laser (LD), apresenta como principal vantagem uma extensa faixa de medição e, é utilizada para investigar se o sistema é monodisperso, pois pode ser aplicada para verificar o tamanho de micropartículas, nanopartículas bem como mistura das mesmas (KECK; MULLER, 2008).

Técnicas de microscopia avançada como MEV; MET e AFM, fornecem resultados no que diz respeito à distribuição de tamanho, morfologia e topografia superficial das nanopartículas. O MEV gera uma informação tridimensional da morfologia e superfície da amostra e no MET, apesar de resultar em uma imagem bidimensional, a resolução é superior ao obtido pelo MEV. A microscopia de força atômica gera um perfil tridimensional da superfície da amostra e é a única entre as três técnicas que é compatível com diversos tipos de amostra e condições atmosféricas (DOMINGO; SAURINA, 2012).

Monitorar eventos termoquímicos por meio de ensaios como DSC e TG pode fornecer informações importantes sobre a estabilidade da amostra, degradação química dos compostos, encapsulação de fármacos nas nanopartículas, bem como sobre o revestimento das mesmas e também pode indicar uma possível interação entre os componentes da formulação (DOMINGO; SAURINA, 2012).

O potencial Zeta é a carga de superfície da partícula e geralmente é mensurado pela mobilidade eletroforética. O valor da carga superficial influencia criticamente a interação que a nanopartícula terá com o meio em que for exposta (CHO et al., 2013).

Ao desenvolver uma nanoestrutura, conhecer sua estrutura é de extrema importância, o espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) é uma técnica que envolve raios de alta energia e produz resultados interessantes em relação às nanopartículas. Essa radiação interage diretamente com os elétrons presentes na amostra e fornece informações sobre a organização da densidade eletrônica da estrutura que está em estudo (PEREIRA, 2004). O SAXS é capaz de fornecer dados em relação ao tamanho, forma, agregação de micelas, interação e organização dos componentes do sistema, auxiliando na hipótese da representação de um modelo estrutural para as nanopartículas que estão sendo avaliadas (DOMINGO; SAURINA, 2012; MEZZALIRA, 2005).

Objetivos

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e a caracterização de nanopartículas poliméricas de poli (butil cianoacrilato) e revestidas com polissorbato 80 contendo os fármacos lamivudina e zidovudina.

3.2 Objetivos específicos

- Preparo das nanopartículas poliméricas contendo associação de antirretrovirais e revestidas com polissorbato 80;
- Caracterização físico-química das nanopartículas isentas de fármaco e revestimento, bem como das nanopartículas completas;
- Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PBCA e PBCA-Ps80 para comprovar a viabilidade da administração oral os fármacos;
- Desenvolvimento e validação de método cromatográfico para quantificação simultânea dos fármacos (3TC e AZT) encapsulados nas nanopartículas revestidas ou não, utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC).

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Matérias primas, solventes e reagentes

- Acetonitrila grau cromatográfico Merck[®]
- Ácido clorídrico, p.a. Synth[®];
- Água ultrapurificada MilliQ;[®]
- Bicarbonato de sódio, p.a. Ecibra[®];
- Cloreto de potássio (KCI) p.a. Synth[®];
- Cloreto de sódio (NaCl) p.a. Synth[®];
- Dextran from Leuconostoc ssp. 70.000 p.a. Sigma-Aldrich[®];
- Dimetilsulfóxido p.a. ASC Carlo Erba[®];
- Fosfato de potássio monobásico anido (KH₂PO₄) p.a. Synth[®];
- Fosfato de sódio monobásico anidro p.a. Synth[®];
- Fosfato dissódico p.a. (Na₂HPO₄) Merck[®]
- Glicose p.a. Sigma-Aldrich[®];
- Hidróxido de sódio p.a. Synth[®];
- Histoacryl[®] B. Braun;
- Kit MTT para citotoxicidade (MTT em pó 15 mg/frasco, solução de solubilização de MTT – 10% de Triton X-100 plus e 0,1 N HCl em isopropanol anidro) - Sigma-Aldrich[®];
- Lamivudina matéria prima de grau farmacêutico de pureza (gentilmente cedida pela FURP, São Paulo SP);
- Lamivudina, substância química de referência, grau de pureza > 99% (gentilmente cedida pela FURP, São Paulo - SP)
- Manitol grau farmacêutico;
- Meio DMEM sem fenol Cultilab[®];
- Metanol grau cromatográfico Merck[®]
- Polissorbato 80 (Tween[®] 80) p.a. Mapric
- Solução de antibióticos penicilina e estreptomicina Cultilab[®];

- Solução de tripsina 0,25% e EDTA 1mM Cultilab[®];
- Solução salina tampão fosfato (PBS)
- Zidovudina matéria prima de grau farmacêutico de pureza (gentilmente cedida pela FURP, São Paulo - SP);
- Zidovudina, substância química de referência, grau de pureza > 99% (gentilmente cedida pela FURP, São Paulo - SP).

4.1.2 Equipamentos e dispositivos diversos

- Agitador magnético Radleys[®];
- Balança analítica Shimadzu[®] modelo AX200;
- Banho de ultrassom Unique® modelo UltraSonic Cleaner;
- Barra magnética recoberta com vidro Fisatom[®];
- Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) DSC 7020 Exstar, SII Nano
 Technology Inc., Japão;
- Centrifuga Hitachi[®] RX2;
- Coluna de fase reversa C-18, CLC-C8(M), com 4,6 mm x 25,0 cm e diâmetro de partícula de 5 μ m Shimadzu[®];
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, detector espectrofotométrico de arranjo de diodos, modelo SPD-M20A, equipado com programa LC solution -Shimadzu[®]:
- Tubo de Eppendorf Eppendorf[®]
- Fluxo laminar LFS 12 Veco Instruments[®];
- Garrafas de cultivo celular 25 e 75 cm² TPP;
- Leitora de placas Espectrofotômetro Nano Drop NanoDrop Technology;
- Liofilizador ThermoElectron[®] modelo Supermodulyo;
- Membrana filtrante com abertura 0,45 μm Milipore[®];
- Micropipetas de 1 10 μL, 10 100 μL e 100 1000 μL Thermo Scientific[®];
- NANOSTAR Bruker[®];
- Papel de filtro quantitativo
- Placa de 96 poços com fundo chato TPP;
- Potenciômetro Hanna[®] Instruments;

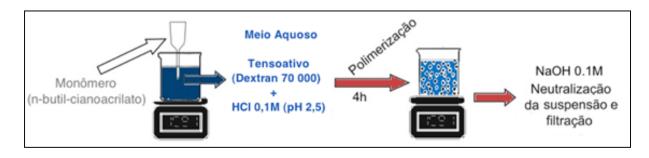
- Termobalança (TG) TG/DTA7020 -Exstar, SII Nano Technology Inc., Japão;
- Ultrafiltro do tipo *Microcon Ultracel YM-10* (Regenerated cellulose 10.000 MWCO) Millipore[®]
- Zetasizer[®] Nano ZS90 Malvern Instruments;

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo das nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato) isentas de fármaco (PBCA)

Para o preparo das nanopartículas foi empregado o método de polimerização em emulsão, amplamente descrito na literatura (CHAUVIERRE *et al.*, 2003; COUVREUR; VAUTHIER, 1991). Conforme ilustrado na Figura 9 foram adicionados 100 mg de Dextran[®] 70.000 a uma solução aquosa de HCl 0,1 N (pH 2,5). Foram adicionados 100 μL do monômero n-butil-2-cianoacrilato lentamente à solução e, então, a agitação foi ajustada para 800 rpm. Após 4 h de agitação, a polimerização foi finalizada por meio da adição de NaOH 0,1 N até pH 7,0 - 7,5. As nanopartículas obtidas foram filtradas em papel de filtro quantitativo.

Figura 9 – Esquema de preparo para obtenção das nanopartículas de PBCA isentas de fármaco



4.2.2 Preparo das nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato) contendo fármaco (PBCA-3TC/AZT)

As nanopartículas contendo fármaco foram preparadas conforme o método descrito anteriormente no item 4.2.1. Foram adicionados 100 mg de Dextran 70.000 e 100 µL do monômero n-butil-2-cianoacrilato à uma solução aquosa de 10 mL de HCl 0,1 N (pH 2,5). Após 2 h de agitação a 800 rpm, 50 mg de AZT e 25 mg de 3TC foram adicionadas ao meio reacional, obtendo-se uma concentração final de 5 mg/mL e 2,5 mg/mL, respectivamente. Ao completar 4 horas de agitação, a polimerização foi finalizada por meio da adição de NaOH 0,1 N até pH 7,0 - 7,5. As nanopartículas obtidas foram filtradas em papel de filtro quantitativo.

4.2.3 Avaliação do processo de liofilização das nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato)

As nanopartículas obtidas no item 4.2.1 foram divididas em duas alíquotas, sendo que em uma delas foram adicionados 3% de manitol (PBCA-M) como agente crioprotetor (TIAN *et al.*, 2011; ALYAUTDIN *et al.*, 1997). Ambas alíquotas (PBCA e PBCA-M) foram congeladas em freezer, por 24 h, e liofilizadas. O pó obtido foi ressuspenso em PBS na concentração de 20 mg/mL, sob constante agitação, gerando quatro amostras, Am1 e Am2 – PBCA ressuspenso (PBCA*) e Am3 e Am4 – PBCA com 3% de manitol ressuspenso (PBCA*-M). As amostras foram avaliadas em relação ao diâmetro médio e potencial zeta, no equipamento Zetasizer[®] Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK).

4.2.4 Revestimento das nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato) com polissorbato 80

As nanopartículas liofilizadas, obtidas no item 4.2.3, foram ressuspensas em PBS na concentração de 20 mg/mL e, então, foi adicionado 1% de polissorbato 80

em relação ao volume total da suspensão. A amostra foi submetida à agitação constante de 400 rpm por 30 min. (KREUTER *et al.,* 2003). O mesmo foi feito para as nanopartículas de PBCA–3TC/AZT obtidas no item 4.2.2. Dessa forma foram obtidas as nanopartículas de PBCA revestidas (PBCA-Ps80) e as nanopartículas de PBCA-3TC/AZT revestidas (PBCA-3TC/AZT-Ps80)

4.2.5 Distribuição do diâmetro médio e índice de polidispersividade

O diâmetro médio das nanopartículas e o seu índice de polidispersividade, foram determinados por espalhamento dinâmico de luz (DLS). Para análise, a suspensão de nanopartículas, isentas ou não de fármaco, foi diluída em água ultrapura MilliQ na proporção de 1:50. Para cada amostra foram realizadas medidas em triplicata, à temperatura de 25 °C e um ângulo de 90°, no equipamento Zetasizer[®] Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK).

4.2.6 Determinação do potencial zeta das nanopartículas

O potencial zeta foi avaliado pela medida da mobilidade eletroforética, por meio da equação de Helmholtz-Smoluchowski que utiliza a relação entre a velocidade da partícula e o campo elétrico aplicado para gerar o valor de potencial zeta (EGOROVA, 1994). A suspensão de nanopartículas foi diluída em água ultrapura MilliQ na proporção de 1:50. Para cada amostra foram realizadas medidas em triplicata, à temperatura de 25 °C, no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK).

4.2.7 Planejamento estatístico

O planejamento estatístico para avaliação da interferência do processo de liofilização no diâmetro médio e potencial Zeta das nanopartículas, bem como da eficiência do revestimento, foi realizado no programa Minitab[®] 17 utilizando a análise

de variância (ANOVA) seguida de testes de Tukey ou Fisher, quando necessário. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de p < 0,05.

4.2.8 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Cerca de 2,0 mg de amostra das nanopartículas obtidas nos itens anteriores, bem como das matérias-primas e suas misturas físicas, foram dispostas em cápsula de alumínio hermeticamente fechadas e submetidas à análise no Calorímetro de Varredura DSC 7020 (Exstar, SII Nano Technology Inc., Japão), sob atmosfera de nitrogênio de 50mL/min, na razão de aquecimento de 10 °C/min, na faixa de temperatura de 25 a 300 °C. Previamente, foi utilizado o padrão Índio metálico para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia. As curvas foram obtidas no programa Origin[®] 8.0.

4.2.9 Termogravimetria (TG) / Termogravimetria Derivada (DTG)

Para o ensaio de termogravimetria dinâmica foram empregados cerca de 2 mg de amostra, acondicionadas em cadinho aberto de platina e submetidas à análise no equipamento Termobalança TG/DTA 7220 (Exstar, SII Nano Technology Inc, Japão), sob atmosfera de nitrogênio de 100 mL/min, na razão de aquecimento de 10 °C/min, na faixa de temperatura de 25 a 600 °C. A calibração do equipamento foi feita com padrão de oxalato de cálcio. As curvas foram obtidas no programa Origin[®] 8.0.

4.2.10 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

As medidas de SAXS foram realizadas no Instituto de Física da USP. As amostras foram avaliadas sem diluição prévia e injetadas em um capilar de vidro introduzido em um porta-amostra. As medidas foram feitas à temperatura ambiente e

em alta resolução com uma distância de 106,4 cm amostra – detector, atingindo-se valores de q próximos a 0.005Å^{-1} . Os dados foram apresentados em termos da intensidade versus o vetor transferência de momento do espaço reciproco, q, $q=4\pi sen(\theta)/\lambda$, onde 2θ é o ângulo de espalhamento e λ o comprimento de onda da radiação incidente.

4.2.11 Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PBCA e PBCA-Ps80

4.2.11.1 Cultivo das células de Caco-2

As células Caco-2 foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC; Rockville, MD, EUA) e cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) com alta concentração de D-glicose (4,5 g/L), bicarbonato de sódio (2,2 g/L) e suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 1% de solução de glutamina 200 mM, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. O banco celular foi mantido em incubadora sob temperatura de 37 °C, atmosfera constituída de 5% de CO₂ e 90% de umidade relativa, cultivado em garrafas de 75 mm², sendo que o meio era substituído a cada dois dias. O subcultivo foi realizado quando a cultura atingia, no mínimo, 80% de cobertura da garrafa (cerca de 3 a 4 dias). O meio de cultivo foi aspirado e descartado e as células aderidas à parede da garrafa foram isoladas com 2 mL de solução de tripsina (0,25%) e EDTA (1 mM) e incubadas a 37 °C por 5 min. As células foram ressuspendidas em meio DMEM e divididas na proporção de 1:4 em novas garrafas contando 15 mL deste meio.

4.2.11.2 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* para determinação da viabilidade celular das células Caco-2 em presença das nanopartículas de PBCA e PBCA Ps80

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados conforme o protocolo descrito no guia ISO 10993-5 (ISO, 2009), que dispõe sobre as técnicas para avaliação *in vitro* da citotoxicidade.

As células Caco-2 foram semeadas em meio DMEM em microplacas de 96 poços, na densidade de 2 x 10⁴ células/poço, incubadas por 24h a 37 °C com 5% de CO₂ e 90% de umidade. Após esse período, o meio de cultura foi retirado e foram adicionados 100 µL das soluções de nanopartículas PBCA e PBCA-Ps80, diluídas em meio DMEM sem fenol, nas concentrações de 1,0; 5,0; 20,0; 50,0; 75,0 e 100,0 µg/mL (em quadruplicata). Foram adicionados também meio DMEM sem fenol contendo dimetilsulfóxido (DMSO) a 50% como controle positivo e meio contendo apenas meio DMEM sem fenol como controle negativo. As placas foram incubadas a 37 °C por 4 h. Posteriormente, as soluções dos poços foram aspiradas e foram adicionados 30 µL da solução de MTT (solução a 5 mg/mL, diluída em meio DMEM sem fenol e tampão PBS 9:1 v/v). Após 2 h de incubação a 37 °C foram adicionados 70 µL da solução de MTT (10% de Triton X-100 plus e 0,1 N HCl em isopropanol anidro). A placa foi levada ao agitador orbital, com agitação de 100 rpm durante 15 min, a fim de facilitar a solubilização dos cristais de formazan. Após a solubilização, as absorbâncias foram quantificadas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 nm e 690 nm. O cálculo para determinação da porcentagem de viabilidade celular foi realizado a partir das médias das respectivas absorbâncias em relação à média do controle negativo, considerado como 100% de viabilidade.

4.2.12 Desenvolvimento e validação de método analítico por HPLC para determinação da eficiência de encapsulação dos fármacos nas nanopartículas de PBCA e PBCA-Ps80

No presente método, utilizaram-se as seguintes condições cromatográficas:

- Fase móvel: tampão fosfato 10 mM e metanol (70:30), o tampão fosfato 10 mM foi previamente filtrado em membrana de acetato de celulose 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 µm;
- Coluna: coluna de fase reversa C-18, com 4,6 mm x 25,0 cm e diâmetro de partícula de 5 µm;
- Fluxo: 1 mL/min;
- Temperatura: 40 °C;
- Volume de injeção: 20 µL;

Comprimento de onda de detecção: 270 nm.

O método previamente desenvolvido foi validado conforme preconizado pelo ICH Q2(R1) (2005) e pela RDC 899/03. A validação foi realizada de forma que possam ser quantificados simultaneamente os fármacos lamivudina e zidovudina encapsulados nas nanopartículas contendo ou não revestimento. Sendo que, em ambos os casos o método compreende tanto a formulação total, para quantificar a concentração total de fármacos, quanto o filtrado do ultrafiltrado, que representa a quantificação da porção livre dos fármacos.

4.2.12.1 Preparo das soluções

Solução estoque: para o preparo da solução estoque foram transferidos quantitativamente a quantidade de 50 mg de 3TC e 50 mg de AZT, substância química de referência, grau de pureza > 99%, para balão volumétrico de 50 mL, na sequência, o volume foi completado com metanol e acetonitrila na proporção de 8:2 resultando em uma solução de concentração 1,0 mg/mL.

Todas as soluções foram preparadas em cada dia de análise, a partir da solução estoque.

- Solução padrão: as soluções padrão foram preparadas através de diluições sucessivas da solução estoque para balão volumétrico de volume adequado.
 O volume de cada balão foi completado com tampão fosfato 10 mM e metanol na proporção de 7:3. Foram feitas seis soluções padrão nas seguintes concentrações: 20,0 μg/mL; 10,0 μg/mL; 5,0 μg/mL; 2,5 μg/mL; 1,25 μg/mL e 0,5 μg/mL.
- Soluções de controle de qualidade alto (CQA), médio (CQM) e baixo (CQB) para precisão: a partir da solução estoque, foi preparada uma solução estoque secundária em metanol e acetonitrila (8:2) na concentração de 500 μg/mL. Foram retirados 200 μL, 100 μL e 25 μL e transferidos para balões volumétricos de 10 mL, o volume foi completado com tampão fosfato 10 mM

- e metanol (7:3) originando as concentrações de 10,0 μg/mL (CQA), 5,0 μg/mL (CQM) e 1,25 μg/mL (CQB), respectivamente.
- Soluções de controle de qualidade alto (CQA), médio (CQM) e baixo (CQB) para exatidão: a partir da solução estoque, foram preparadas duas soluções estoque secundária em metanol e acetonitrila (8:2) na concentração de 500 μg/mL. Na primeira foi adicionado 1 mL da suspensão de nanopartículas de PBCA e na secunda foi adicionado 1 mL da suspensão de nanopartículas de PBCA-Ps80, antes do volume ser completado. Feitas essas soluções, foram retirados 200 μL, 100 μL e 25 μL e transferidos para diferentes balões volumétricos de 10 mL, o volume foi completado com tampão fosfato 10 mM e metanol (7:3) originando as concentrações de 10,0 μg/mL (CQA), 5,0 μg/mL (CQM) e 1,25 μg/mL (CQB), respectivamente, para cada espécie de nanopartícula.
- Soluções placebo: A solução placebo 1 foi feita partindo das nanopartículas de PBCA obtidas no item 4.2.1, para quantificação total dos fármacos. 100 μL da suspensão foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com metanol:acetonitrila (8:2), em seguida, 1 mL foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com tampão fosfato 10 mM e metanol (7:3). A solução foi centrifugada por 10.000 rpm, durante 15 min à 20 °C.

Para o preparo da solução placebo 2, com a finalidade de quantificar os fármacos livres, a suspensão das nanopartículas de PBCA obtidas no item 4.2.1 foi centrifugado a 10.000 rpm, durante 15 min à 20 °C em ultrafiltro Millipore[®] 10K. Posteriormente, 100 μL do filtrado foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com metanol:acetonitrila (8:2). Em seguida, 1 mL foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com tampão fosfato 10 mM e metanol (7:3). O mesmo foi feito para as nanopartículas revestidas (PBCA-Ps80) obtidas no item 4.2.3, originando as soluções placebo 3 e placebo 4.

Todas as soluções foram previamente filtradas em membrana de acetado de celulose 0,45 µm (Milipore[®]) antes de serem injetadas no HPLC.

4.2.12.2 Especificidade

A especificidade foi avaliada através da comparação visual entre o cromatograma da solução padrão de 10 μg/mL e os cromatogramas das soluções placebo 1, 2, 3 e 4, bem como da fase móvel (diluente).

Como critério de aceitação deste parâmetro, temos que, nos cromatogramas de placebo e da fase móvel, não devem surgir picos no mesmo tempo de retenção dos fármacos.

4.2.12.3 Linearidade

Para construção da curva de calibração e avaliar a linearidade, as soluções padrão nas seis concentrações previamente descritas foram feitas em triplicata e injetadas. Após a obtenção do cromatograma, pode-se estabelecer a curva de calibração e o coeficiente de determinação (R²). O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação é de R = 0,99 (BRASIL, 2003).

4.2.12.4 Precisão

Esse parâmetro foi determinado analisando as soluções de controle de qualidade, em três diferentes concentrações (CQA, CQM e CQB), sendo que foram avaliadas a precisão intra e inter-dia. Para isso, foram utilizadas seis réplicas de cada solução, que foram injetadas no mesmo dia (precisão intra-dia) e em dias consecutivos (precisão inter-dia).

A precisão foi calculada com base na Equação 1:

$$CV(\%) = \frac{DP}{Cm\acute{e}dia}X100$$
 Equação 1

Em que: CV (%) = coeficiente de variação DP = desvio padrão Cmédia = concentração média determinada

4.2.12.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada com base na leitura das soluções de CQA, CQM e CQB contaminadas com nanopartículas de PBCA e PBCA Ps80. Para cada amostra foram analisadas seis réplicas no mesmo dia (exatidão intra-dia) e em dias consecutivos (exatidão inter-dia). Após as leituras, a exatidão foi calculada segundo à Equação 2.

$$E(\%) = \frac{Valor\ mensurado}{Valor\ teórico} X100$$
 Equação 2

Em que: E (%) = exatidão Valor mensurado = concentração média experimental Valor teórico = concentração teórica

4.2.12.6 Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)

Os limites de quantificação e detecção foram obtidos por meio das Equações 3 e 4, respectivamente.

$$LQ = \frac{10\sigma}{CA}$$
 Equação 3

$$LD = \frac{3.3\sigma}{CA}$$
 Equação 4

Em que: LQ = limite de quantificação

LD = limite de detecção

σ = desvio padrão médio do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração

CA = coeficiente angular da curva de calibração

44

4.2.13 Determinação da eficiência de encapsulação dos fármacos às nanopartículas

poliméricas

Para a quantificação do 3TC e AZT encapsulados nas nanopartículas de

PBCA e PBCA-Ps80, foi utilizado o método por HPLC previamente validado.

Foram avaliadas as nanopartículas de PBCA-3TC/AZT obtidas no item 4.2.2

e as de PBCA-3TC/AZT-Ps80 obtidas no item 4.2.3. Para determinar a

concentração total dos dois fármacos, 100 µL da suspensão foi transferido para

balão volumétrico de 10 mL e o volume do balão foi completado com

metanol:acetonitrila (8:2). Logo após, 1 mL foi transferido para balão volumétrico de

10 mL e o volume foi completado com tampão fosfato 10 mM e metanol (7:3). A

solução foi centrifugada por 10.000 rpm, durante 15 min à 20 °C e o sobrenadante

foi utilizado para leitura no HPLC. Com o propósito de quantificar os fármacos livres,

a suspensão das nanopartículas contendo a associação de antirretrovirais,

revestidas ou não, foi centrifugada por 10000 rpm, durante 15 min à 20 °C em

ultrafiltro Millipore® 10K. Posteriormente, 100 µL do filtrado foi transferido para balão

volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com metanol:acetonitrila (8:2).

Posteriormente, 1 mL foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi

completado com tampão fosfato 10 mM e metanol (7:3). Essa solução foi utilizada

para leitura no HPLC.

A concentração total dos fármacos corresponde à porção de fármaco livre

somada à porção de fármaco encapsulado. Sendo assim, podemos utilizar a

Equação 5 para determinar a % de encapsulação dos fármacos.

$$\%EE = \frac{C_T - F_L}{C_T} x 100$$
 Equação 5

Em que: %EE = eficiência de encapsulação

C_T = concentração total

F_L = fármaco livre

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento e caracterização das nanopartículas de PBCA e PBCA-Ps80

5.1.1 Preparo das nanopartículas de PBCA

Ao desenvolver um sistema nanoparticulado contendo fármacos é de grande importância garantir que o sistema tenha boa estabilidade e um comportamento biológico adequado. Para isso, a obtenção de parâmetros satisfatórios em relação ao diâmetro médio, distribuição de tamanho e potencial zeta é fundamental.

Tais características podem influenciar na captação celular das nanopartículas, no modo e local de liberação do fármaco encapsulado e na estabilidade do sistema nanoparticulado (MÜLLER *et al.*, 1992; COUVREUR; VAUTHIER, 1991; MCCARRON *et al.*, 1999; REDDY; MURTHY, 2004b). Sendo assim, é relevante que as condições empregadas na síntese das nanopartículas sejam controladas.

Estudos publicados na literatura apresentam diferentes condições para a síntese de nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato), os parâmetros escolhidos para o desenvolvimento do trabalho são comumente utilizados e, com base nos resultados publicados, originam nanoestruturas com características físico-químicas consideradas adequadas (ALYAUTDIN *et al.*, 1997; REDDY; MURTHY, 2004a; VAUTHIER *et al.*, 2003; TAVARES, 2013; XI-XIAO *et al.*, 2006; WILSON *et al.*, 2008; REUKOV *et al.*, 2011).

Os parâmetros utilizados para síntese das nanopartículas de PBCA, pelo método de polimerização em emulsão (CHAUVIERRE *et al.*, 2003; COUVREUR; VAUTHIER, 1991) foram:

- Concentração do monômero: 1%;
- Concentração do tensoativo (Dextran® 70.000): 1%;
- Meio reacional: HCl 0,1 M;
- pH do meio reacional: 2,5;
- Tempo de agitação do sistema: 4 horas, com posterior neutralização do sistema;

- Velocidade de agitação: 800 rpm;
- Temperatura: ambiente.

Quando comparado a outros agentes estabilizantes, como o Pluronic[®], o Dextran[®] apresenta resultados mais adequados para estabilização das nanopartículas, uma vez que ele é capaz de gerar partículas com menor grau de agregação (REDDY; MURTHY, 2004a; REUKOV *et al.*, 2011). Durante o preparo, o monômero PBCA foi adicionado lentamente ao meio reacional e a reação foi conduzida em baixo pH. As nanopartículas foram sintetizadas por meio da reação de polimerização em emulsão.

5.1.2 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta

Os métodos de análise utilizados para avaliar as características físicoquímicas das nanopartículas devem gerar resultados confiáveis, para isso devem-se
avaliar todos os parâmetros fornecidos que expressem indícios de que a análise
está sendo realizada de maneira adequada. No caso da técnica de espalhamento
dinâmico de luz (DLS), por exemplo, o valor de *Count Rate* que demonstra o número
de fótons detectados por segundo, é um indicativo da qualidade da amostra, pois
monitora sua estabilidade em função do tempo. É o atenuador que indica se a
diluição da amostra foi eficaz para a leitura. Associando esses dois fatores aos
resultados obtidos é possível afirmar uma boa reprodutibilidade e confiabilidade da
análise (MALVERN INSTRUMENTS LIMITED, 2011).

Os resultados de diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas de PBCA sintetizadas neste trabalho podem ser vistos na Tabela 1 e, de maneira geral, assemelham-se ao encontrado em literatura.

Tabela 1 – Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas isentas de fármaco (PBCA).

Diâmetro Médio (nm)	Polidispersão	Potencial Zeta (mV)
149,5 ± 0,96	0,105 ± 0,01	-2,69 ± 0,40

Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 3).

O diâmetro médio das nanopartículas de PBCA isentas de fármaco foi de 149,5 nm (Figura 10). A literatura demonstra variações nos valores de diâmetro médio encontrados: Monteiro (2013), Tavares (2013), Joshi e colaboradores (2004) e Sommerfeld e colaboradores (1997) relataram diâmetro médio de 143,8 nm, 175,1 ± 3,9 nm, 146,8 ± 2,6 nm e entre 164 e 326 nm, respectivamente. Vauthier e colaboradores (2003) relatam estudos em que o diâmetro médio das nanopartículas poliméricas obtidas pelo método de polimerização em emulsão variou entre 50 e 300 nm. Contudo, Shibata e colaboradores (2013) consideram vantajosa a redução de tamanho das nanopartículas poliméricas, uma vez que o diâmetro dessas nanoestruturas pode afetar a biodistribuição e a absorção celular.

Size Distribution by Intensity

15

15

0

0.1

10

100

1000

1000

Size (d.nm)

Figura 10 – Distribuição de tamanho das nanopartículas de PBCA

O valor de polidispersão inferior a 0,3 sugere a presença de um sistema monodisperso (KÜLKAMP *et al.*, 2009). Ao associar o resultado de polidispersão ao desvio padrão e aos parâmetros de atenuador e de *count rate* obtidos na análise das nanopartículas de PBCA em suspensão, pode-se considerar que a análise foi bem conduzida e apresenta boa reprodutibilidade.

O potencial Zeta foi de -2,69 ± 0,40 mV (Figura 11) e, similar aos resultados de diâmetro, há variações quanto ao valor da carga superficial dessas nanopartículas relatados na literatura. Reddy e Murthy (2004b) fizeram a diluição das nanopartículas em diferentes meios e relataram potencial zeta entre -0,5 e -27,5 mV. No trabalho de Müller e colaboradores (1992), as nanopartículas de PBCA diluídas em água ultrapura apresentaram potencial zeta igual a -6,3 mV e Tavares (2013) encontrou potencial zeta de -11,7 ± 1,34 mV. Sugere-se, na literatura, que esses valores de potencial zeta ligeiramente negativos podem ser atribuídos ao baixo grau de dissociação dos grupamentos acrílicos presentes na estrutura das nanopartículas (REDDY; MURTHY, 2004a) e também devido à adsorção de ânions provindos da fase aquosa (MEI *et al.*, 2011).

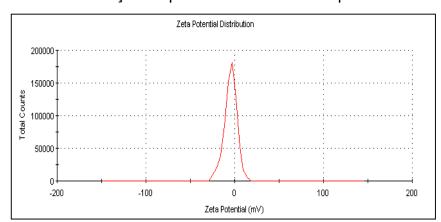


Figura 11 - Distribuição do potencial zeta das nanopartículas de PBCA

5.1.3 Avaliação do processo de liofilização

A liofilização consiste em um processo de secagem por congelamento e sublimação do gelo a vácuo, o que confere maior conservação de produtos farmacêuticos e alimentícios. No caso de nanopartículas poliméricas, o congelamento e o processo de liofilização podem resultar na alteração das características físico-químicas e na quebra dessas nanoestruturas com consequente liberação do fármaco previamente encapsulado, fazendo necessário o uso de agentes crioprotetores (SCHAFFAZICK et al., 2003; ARAUJO, 2009). O manitol é um exemplo de agente crioprotetor utilizado com frequência na proteção das

nanopartículas de PBCA durante o processo de liofilização (TIAN *et al.*, 2011; PETRI *et al.*, 2007; KUO; SU, 2007).

Nas Tabelas 2 e 3 podem-se observar os resultados de diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas de PBCA submetidas à liofilização.

Tabela 2 – Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas isentas de fármaco liofilizadas (PBCA*).

Diâmetro Médio (nm)	Polidispersão	Potencial Zeta (mV)
150,10 ± 1,48	0,130 ± 0,02	-2,07 ± 0,35

Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 3).

Tabela 3 – Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas isentas de fármaco liofilizadas com 3% de manitol como agente crioproteror (PBCA*-M).

Diâmetro Médio (nm)	Polidispersão	Potencial Zeta (mV)
155,30 ± 3,73	0,207 ± 0,01	-3,70 ± 0,42

Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 3).

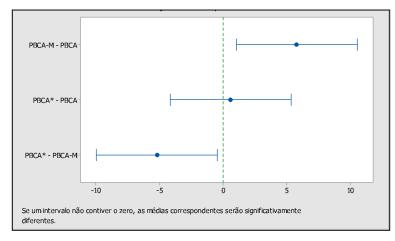
Tanto as nanopartículas liofilizadas sem agente crioprotetor quanto na presença de 3% de manitol apresentaram resultados de diâmetro médio e potencial zeta muito próximos dos encontrados na suspensão de nanopartículas. Os resultados de diâmetro médio e potencial zeta obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e apresentaram Valor-p 0,049 e 0,002, respectivamente. Como o Valor-p foi menor que 0,05 para as duas análises, aplicou-se o teste de Fisher para verificar em qual grupo se encontrava a diferença. Os resultados podem ser vistos da Tabela 4, bem como nas Figuras 12 e 13.

Tabela 4 – Teste de Fisher para a comparação das características físico-químicas das nanopartículas de PBCA, PBCA* e PBCA*-M.

Análise estatística - Fisher				
Amostras	Grupo (Diâmetro)	Grupo (Potencial Zeta)		
PBCA	149,5 ± 0,96 ^A	-2,69 ± 0,40 ^A		
PBCA*	150,10 ± 1,48 ^A	$-2,07 \pm 0,35^{A}$		
PBCA*-M	$155,30 \pm 3,73^{B}$	$-3,70 \pm 0,42^{B}$		

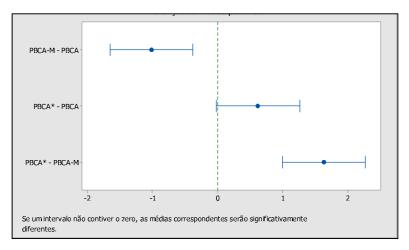
Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 3). As letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Legenda: PBCA - nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato), PBCA* - nanopartícula isenta de fármaco liofilizada e PBCA*-M - nanopartícula isenta de fármaco liofilizada com 3% de manitol.

Figura 12 – Intervalo de Confiança (95%) do Teste de Fisher relativo a diferença das médias de diâmetro das nanopartículas de PBCA, PBCA* e PBCA*-M.



Legenda: PBCA - nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato), PBCA* - nanopartícula isenta de fármaco liofilizada e PBCA*-M - nanopartícula isenta de fármaco liofilizada com 3% de manitol.

Figura 13 – Intervalo de Confiança (95%) do Teste de Fisher relativo a diferença das médias de potencial zeta das nanopartículas de PBCA, PBCA* e PBCA*-M.



Legenda: PBCA - nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato), PBCA* - nanopartícula isenta de fármaco liofilizada e PBCA*-M - nanopartícula isenta de fármaco liofilizada com 3% de manitol.

A partir dos resultados obtidos, notou-se que há uma diferença estatisticamente significativa entre a amostra em suspensão (PBCA*) e a amostra liofilizada com 3% de manitol (PBCA*-M), porém apesar de haver diferença estatística entre o tamanho e o potencial zeta dessas nanopartículas, seu efeito biológico pode não ser alterado.

O leve aumento de tamanho e de polidispersividade que ocorreu nas nanopartículas PBCA*-M pode ser explicado pela atuação do agente crioprotetor, o qual é capaz de formar uma matriz amorfa ao redor das nanopartículas e promover um espaçamento entre elas e, assim, evitar que haja danos causados pelo congelamento (ARAUJO, 2009). O fato de as estruturas poliméricas não serem danificadas na ausência do agente crioprotetor se torna favorável, uma vez que o manitol poderia ser mais um interferente a ser considerado em outras análises.

5.1.4 Obtenção das nanopartículas de PBCA-Ps80

Com a finalidade de revestir as nanopartículas de PBCA com polissorbato 80, foram avaliados dois métodos descritos em literatura. Após a ressuspensão das nanopartículas obtidas no item anterior, foi adicionado polissorbato na concentração

de 1% na suspensão de nanopartículas e a amostra foi separada em duas alíquotas. A primeira foi incubada em ultrassom durante 30 min. (WILSON *et al.*, 2008; PETRI *et al.*, 2007) e a segunda submetida à agitação constante de 400 rpm por 30 min. (KREUTER *et al.*, 2003). Na Tabela 5 é possível observar os resultados de diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas de PBCA-Ps80 obtidas pelos diferentes métodos.

Tabela 5 – Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas isentas de fármaco de acordo com o método de revestimento.

Nanopartícula	Método de	Diâmetro	Polidispersão	Potencial
	revestimento	Médio (nm)		Zeta (mV)
PBCA-Ps80U	Ultrassom por	224,53 ± 4,42	0,203 ± 0,004	-2,25 ± 0,18
	30 min.			
PBCA-Ps80A	Agitação a			
	400 rpm por	231,36 ± 2,37	$0,215 \pm 0,004$	-1,98 ± 0,27
	30 min.			

Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Legenda: PBCA-Ps80U – nanopartícula de poli (n-butil cianoacrilato) revestidas de polissorbato 80 por ultrassom e PBCA-Ps80A – nanopartícula de poli (n-butil cianoacrilato) revestidas de polissorbato 80 por ultrassom.

A partir dos resultados obtidos, observa-se que tanto as nanopartículas revestidas por ultrassom quanto as revestidas por agitação apresentaram aumento no tamanho de partícula quando comparadas com as nanopartículas não revestidas. Esse aumento representa o primeiro indício de que houve adsorção do tensoativo na superfície das nanopartículas. Gelperina *et al.* (2002) prepararam nanopartículas de PBCA revestidas com polissorbato 80 para incorporação de doxorrubicina, o revestimento foi realizado submetendo as nanopartículas a agitação constante durante 30 min. e o diâmetro médio das nanopartículas vazias revestidas com Ps80 encontrado na caracterização foi de 250 ± 30 nm.

No caso de revestimentos de superfícies, o potencial Zeta é um parâmetro relevante e que deve ser considerado, já que avalia a carga de superfície da partícula. A análise de variância ANOVA e o teste de Tukey foram utilizados para

avaliar a eficiência do revestimento em relação à mudança de potencial Zeta. Após submeter as amostras à análise estatística de variância ANOVA, encontrou-se Valorp de 0,011 e então seguiu-se com o teste de Tukey. O resultado encontrado no teste de Tukey pode ser visto na Tabela 6.

Tabela 6 – Teste de Tukey para a comparação do potencial zeta das nanopartículas de PBCA, PBCA-Ps80U e PBCA-Ps80A

Análise estatística - Tukey			
Amostras	Grupo (Potencial Zeta)		
PBCA	-2,69 ± 0,40 ^A		
PBCA-Ps80U	-2,25 ± 0,18 ^A		
PBCA-Ps80A	-1,98 ± 0,27 ^B		

Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 3). As letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Legenda: PBCA - nanopartícula de poli (n-butil cianoacrilato), PBCA-Ps80U — nanopartícula de poli (n-butil cianoacrilato) revestidas de polissorbato 80 por ultrassom e PBCA-Ps80A — nanopartícula de poli (n-butil cianoacrilato) revestidas de polissorbato 80 por ultrassom.

É possível notar que não há diferença estatisticamente significativa entre a amostra PBCA e PBCA-Ps80U, ou seja, a partícula revestida pelo método de ultrassom não apresentou mudanças em sua carga superficial. Já a amostra revestida por agitação (PBCA-Ps80A) apresenta valor de potencial Zeta estatisticamente diferente em relação à amostra sem revestimento e, coerente ao que já era esperado, após o revestimento da nanopartícula com polissorbato 80 o valor de potencial Zeta foi mais próximo de zero. Sun e colaboradores (2010), caracterizaram nanopartículas de PBCA revestidas com polissorbato 80 para incorporação de cúrcuma, com o objetivo de auxiliar o transporte através da BHE, uma vez que a cúrcuma pode bloquear a formação de tumores cerebrais e auxiliar no tratamento do Alzheimer. Durante a caracterização, os pesquisadores relataram que o potencial Zeta da partícula foi próximo de zero. O mesmo foi encontrado por Huang e colaboradores (2007) que prepararam nanopartículas de PBCA pelo método de polimerização em emulsão para veiculação do paclitexel, medicamento utilizado no tratamento do câncer, onde o potencial zeta foi de -0,3 ± 0,3.

Esse acontecimento pode ser explicado pelo fato de o polissorbato ser um tensoativo não iônico, ou seja, não apresenta carga. Sendo assim, é coerente que os valores sejam menos negativos e próximos de zero. Nesse caso, o baixo valor de potencial zeta gera fortes indícios de que o tensoativo não iônico está presente na superfície das nanopartículas (SUN *et al.*, 2010).

A partir desses resultados, o método de agitação a 400 rpm durante 30 min. foi selecionado para dar continuidade no presente trabalho.

A respeito do potencial zeta, considera-se que nanopartículas que apresentam valores próximos a ± 30 mV são mais estáveis (DE MELO *et al.*, 2010; CAO *et al.*, 2009). Por outro lado, a estabilidade do sistema nanoparticulado com carga superficial próxima de zero pode ser explicada devido à estabilização estérica promovida pelo tensoativo que possui cadeia carbônica suficientemente grande para ser capaz de criar um impedimento estérico evitando ou minimizando a agregação entre as partículas (MELO JR. *et al.*, 2012; KÜLKAMP *et al.*, 2009).

O índice de polidispersão encontrado foi levemente superior ao das nanopartículas não revestidas, podendo estar relacionado com o revestimento não homogêneo das partículas. Contudo, o valor encontrado é inferior a 0,3, o que indica um sistema monodisperso e os parâmetros de atenuador e *count rate* foram considerados adequados, demonstrando que não houve interferência na qualidade da análise.

5.1.5 Caracterização térmica por DSC e TG/DTG das nanopartículas de PBCA e PBCA-Ps80

A análise térmica é uma técnica amplamente utilizada para verificar o comportamento de fármacos, bem como a ocorrência de incompatibilidade ou interação entre os componentes avaliados. É possível compreender também a associação entre os fármacos e o polímero (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MAINARDES, 2007).

Na Figura 14 é possível observar a curva DSC do polímero e do PBCA-Ps80. A curva do PBCA demonstra perda de água até cerca de 200 °C e logo após,

próximo de 225 °C se inicia um pequeno evento endotérmico seguido por um exotérmico referente à decomposição da estrutura polimérica, resultados semelhantes foram relatados por Reddy e Murthy (2004b), Sullivan e Birkinshaw (2004) e Joshi et al. (2010). Na curva referente às nanopartículas revestidas é possível observar um evento endotérmico em torno de 172 °C, o qual pode ser atribuído à fusão do polissorbato 80. O evento térmico de decomposição do PBCA próximo a 225°C não é observado, é visto somente um último evento exotérmico entre 275 °C e 300 °C, o qual é semelhante nas duas curvas. Ao avaliar e comparar as duas curvas de DSC, nota-se tanto o aparecimento guando a ausência de alguns picos, esse perfil distinto de cada curva evidencia a interação e associação entre o polímero e o tensoativo (DANELUTI, 2011). As curvas de TG e DTG (Figura 15) do PBCA e PBCA-Ps80, assim como as de DSC, também demonstram comportamentos diferentes. Na curva DTG da nanopartícula sem o revestimento o primeiro evento de perda de massa ocorre em aproximadamente 180 °C, próximo da temperatura de decomposição do polímero na curva de DSC, para as nanopartículas revestidas essa perda de massa é antecipada, iniciando-se em aproximadamente 102 °C, porém esse evento acontece em menor intensidade. Logo após, no momento em que ocorre a maior perda de massa do PBCA, observa-se um patamar em que não há perda de massa das nanopartículas revestidas. Os diferentes eventos de perda de massa da amostra PBCA-Ps80 em relação ao PBCA destacam a ocorrência do revestimento.

Figura 14 – Curva DSC das nanopartículas de PBCA e PBCA-Ps80 obtidas sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.

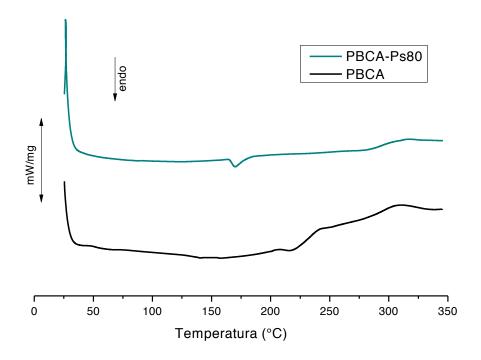
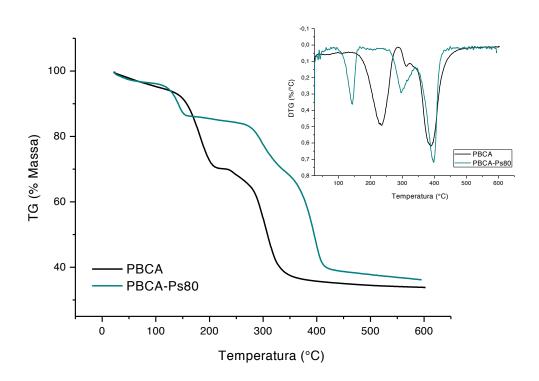


Figura 15 – Curva TG/DTG das nanopartículas de PBCA e PBCA-Ps80 obtidas sob atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.



5.1.6 Avaliação da citotoxicidade

Avaliar a toxicidade de uma nova substância é um dos primeiros passos para entender como ela irá reagir em contato com o organismo. Os estudos de citotoxicidade são ensaios de toxicologia *in vitro* amplamente utilizados e, quando comparados com testes em animais, além da questão ética, eles são mais vantajosos por serem mais fáceis de controlar e reproduzir e o custo é menos elevado. Entre os diferentes testes que podem ser utilizados para avaliar a citotoxicidade, podemos citar como exemplo a atividade mitocondrial de células ativas e, em relação a esse tipo de ensaio, o mais utilizado é o de MTT - (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio) (LEWINSKI *et al.*, 2008; FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

As mitocôndrias ativas possuem a enzima succinil-desidrogenase mitocondrial que é capaz de clivar o anel de tetrazólio presente no MTT (LEWINSKI *et al.*, 2008). O MTT é um sal amarelado solúvel em água que é convertido em um composto roxo insolúvel após a reação com a enzima presente no interior da mitocôndria (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

Segundo Vauthier e colaboradores (2003) a citotoxicidade das nanopartículas de PACA podem estar relacionadas a vários fatores, como por exemplo, a liberação de produtos de degradação, a estimulação de células com consequente liberação de mediadores inflamatórios e a adesão à membrana.

A fim de garantir que as nanopartículas poliméricas de PBCA não apresentassem citotoxicidade significativa e que o revestimento com Ps80 não inviabilizaria o uso desses nanocarreadores para incorporação de fármacos, foram avaliadas nanopartículas de PBCA e PBCA-Ps80, diluídas em meio DMEM sem fenol, nas concentrações de 1,0; 5,0; 20,0; 50,0; 75,0 e 100,0 μg/mL. Para garantir a mortalidade total das células foi utilizado meio DMEM sem fenol contendo DMSO a 50% como controle positivo e como controle negativo meio contendo apenas meio DMEM sem fenol. Os resultados encontrados podem ser vistos na Figura 16

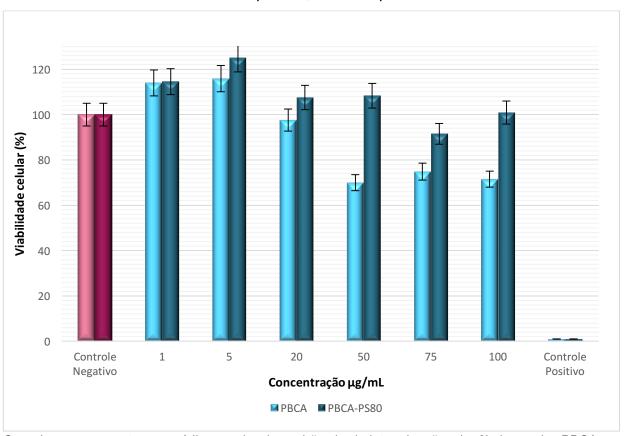


Figura 16 – Viabilidade de células Caco-2 incubadas com diferentes concentrações de PBCA e PBCA-Ps80 por 6 h, avaliada pela técnica do MTT.

Os valores representam a média e o desvio padrão de 4 determinações (n=6). Legenda: PBCA - nanopartícula de poli (n-butil cianoacrilato) e PBCA-Ps80 - nanopartícula de poli (n-butil cianoacrilato) revestida com polissorbato 80.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados conforme o protocolo descrito no guia ISO 10993-5 (ISO, 2009) e os valores obtidos no controle negativo foram considerados como viabilidade celular de 100%. A partir do gráfico apresentado na Figura 16 é possível observar que não há sinais de toxicidade celular para nenhuma das concentrações de PBCA e PBCA-Ps80 avaliadas. Nota-se que, para a maioria das amostras, junto ao aumento da concentração há uma diminuição da viabilidade celular, porém em todos os casos apresentados a viabilidade celular foi superior a 70%, o que, segundo a ISO 10993-5 não caracteriza o composto como sendo citotóxico.

Os resultados encontrados nesse trabalho, corroboram o achado de Kreuter e colaboradores (1984) apud Vauthier et al. (2003), os quais, após incubarem as nanopartículas de PBCA com hepatócitos, relataram que as nanopartículas de

PBCA não induziram nenhum efeito citotóxico até a concentração de 75,0 µg/mL. No entanto, quando expostas a 150 µg/mL do polímero foram observados danos celulares significativos.

O polissorbato 80 se mostrou um revestimento eficaz na redução do potencial citotóxico das nanopartículas, uma vez que em todas as concentrações avaliadas a viabilidade celular foi superior à das nanopartículas sem revestimento. O'SULLIVAN et al. (2004) conduziram um estudo para avaliar o uso do polissorbato 40 (Tween® 40) e polissorbato 80 (Tween® 80) para aumentar a entrega de fitoquímicos a células de adenocercinoma de cólon humano. Os pesquisadores avaliaram a citotoxicidade dos tensoativos em células Caco-2, na concentração de 1 ml/L, através do ensaio de MTT e relataram viabilidade celular de 98,3% para o polissorbato 80 após 24h de incubação. Além disso, foram realizados testes adicionais e em nenhum deles foi observado efeitos citotóxicos do polissorbato 80.

Um estudo produzido por Gelperina e colaboradores (2002) para avaliar a toxicidade da doxorrubicina livre e associada à nanopartículas de PBCA revestidas com Ps80 em ratos sadios demonstrou que a administração intravenosa das nanopartículas de PBCA na concentração de 100 a 400 mg/kg não causou mortalidade no período de observação, bem como não produziu alterações no peso corporal ou no peso dos órgãos internos. Foram observadas alterações comportamentais quando administradas doses de nanopartículas de PBCA que excediam a terapêutica, porém esse efeito foi transitório e reversível, dentro de 10 a 15 min. após a injeção. A presença do polissorbato 80 como revestimento das nanopartículas não promoveu alterações nos resultados de toxicidade descritos acima.

- 5.2 Desenvolvimento e caracterização das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT e PBCA-3TC/AZT-Ps80
- 5.2.1 Preparo das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT e PBCA-3TC/AZT-Ps80

As nanopartículas de PACA são estruturas versáteis e que permitem a incorporação de diversos fármacos, entretanto o momento em que o mesmo será

adicionado no meio reacional deve ser analisado, uma vez que alguns fármacos são capazes de interferir na polimerização podendo ocasionar a perda de sua atividade (VAUTHIER *et al.*, 2003). Moléculas com caráter hidrofílico, como é o caso da lamivudina e da zidovudina, podem tanto ser adicionadas após o inicio da polimerização quanto com as nanoestruturas pré-formadas, no último caso ocorre a adsorção dos fármacos na nanopartícula (SIMEONOVA *et al.*, 2003; MacCARRON *et al.*, 2009).

Para a síntese das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT partiu-se do método inicial de polimerização em emulsão. A partir desse método foi avaliada qual a melhor concentração e o melhor tempo para a adição dos fármacos. Foram produzidas nanopartículas de PBCA-3TC/AZT nas seguintes condições (Quadro 1):

Quadro 1 – Parâmetros avaliados para síntese das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT.

Concentração 3TC (mg/mL)	Concentração AZT (mg/mL)	Tempo (h)
2,5	5,0	2 h após o início da polimerização
2,5	5,0	3 h após o início da polimerização
5,0	5,0	1 h após o início da polimerização para o AZT e 2 h para o 3TC

As nanopartículas produzidas foram avaliadas em relação ao diâmetro médio, potencial zeta e eficiência de encapsulação. A porcentagem de encapsulação de cada fármaco é um fator importante a ser considerado, pois a proporção de cada um presente nas nanopartículas deve ser o mais próximo da posologia recomendada. Baseado nos resultados obtidos, as concentrações de 3TC e AZT, de 2,5 mg/mL e 5,0 mg/mL, respectivamente, adicionadas no tempo de 2 h, originaram a formulação escolhida para dar continuidade nos experimentos.

5.2.2 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta

Os resultados de diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT podem ser vistos na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas contendo lamivudina e zidovudina encapsuladas (PBCA-3TC/AZT).

Diâmetro Médio (nm)	Polidispersão	Potencial Zeta (mV)
160,90 ± 0,53	0,174 ± 0,008	$-2,90 \pm 0,06$

Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 3).

Ao avaliar os dados obtidos, percebe-se que houve um aumento do diâmetro médio em relação às nanopartículas de PBCA, o que pode evidenciar o primeiro indício da encapsulação dos fármacos às nanopartículas. Diante dessa afirmação, a literatura mostra que os resultados podem ser distintos em cada caso, dependo do fármaco veiculado na formulação.

SCHAFFAZICK e colaboradores (2003) descreveram dois estudos em que nanopartículas poliméricas de PBCA foram preparadas pelo método de polimerização em emulsão, com a única diferença do fármaco encapsulado. No primeiro caso o fármaco utilizado foi o cloridrato de betoxolol e a adição do fármaco às nanopartículas não resultou em aumento do diâmetro. No segundo caso, o fármaco em estudo foi o sulfato de amicacina que, ao ser encapsulado nas nanopartículas, aumentou não só o diâmetro médio como também alterou o potencial zeta quando a concentração do fármaco foi modificada.

O potencial Zeta se manteve semelhante ao encontrado nas nanopartículas de PBCA. O índice de polidispersividade inferior a 0,3 indica limitada variabilidade no tamanho das partículas e, ao associar este resultado ao desvio padrão e aos parâmetros de atenuador e de *count rate* obtidos na análise das nanopartículas de

PBCA-3TC/AZT, pode-se considerar que a análise foi bem conduzida e apresenta boa reprodutibilidade.

Os resultados de diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT-Ps80 podem ser vistos na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados de diâmetro médio, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas contendo lamivudina e zidovudina encapsuladas e revestidas com polissorbato 80 (PBCA-3TC/AZT-Ps80).

Diâmetro Médio (nm)	Polidispersão	Potencial Zeta (mV)
325,45 ± 7,00	0,391 ± 0,028	-4,18 ± 0,38

Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 3).

É possível observar que houve um aumento no diâmetro médio das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT-Ps80 quando comparado ao diâmetro das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT sem revestimento (Tabela 7 - 160,90 ± 0,53) e também em comparação às nanopartículas de PBCA revestidas (Tabela 5 - 231,36 ± 2,37). Em relação aos valores da Tabela 5, esse aumento pode ser atribuído ao incremento dos dois fármacos às nanoestruturas (ALONSO et al., 1991). Em relação aos resultados das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT, o acréscimo de tamanho é referente à adsorção do tensoativo na superfície das nanopartículas. O índice de polidispersividade acima de 0,3, como já citado anteriormente, pode ser decorrente do revestimento não homogêneo das nanopartículas, o que justifica também o valor aumentado de desvio padrão no diâmetro médio. Porém a distribuição do tamanho dessas nanopartículas ainda é considerada com unimodal.

Quanto ao potencial Zeta, apesar de estar levemente mais negativo, a carga superficial da partícula ainda é próxima de zero, dado que, segundo Sun e colaboradores (2010), evidencia que o tensoativo não iônico está presente na superfície das nanopartículas. Petri e colaboradores (2007) revestiram com Ps80 as nanopartículas de PBCA contendo doxorrubicina e relataram potencial Zeta igual a - 6,1 ± 0,4. Quando consideramos os resultados de diâmetro médio juntamente com o

valor de potencial Zeta, fica evidente de que houve o revestimento das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT.

5.2.3 Caracterização térmica por DSC e TG/DTG

Inicialmente, foram avaliados o comportamento térmico dos fármacos puros AZT e 3TC e também da mistura física 3TC+AZT 1:1 a fim de verificar a interação entre os fármacos. Na curva DSC do AZT, apresentada na Figura 17, pode-se observar um primeiro evento endotérmico na faixa de 125 °C a 135 °C, característico do processo de fusão do fármaco, confirmando o preconizado na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, e que demonstra o alto grau de pureza do fármaco. A decomposição do AZT se inicia partir de aproximadamente 200 °C e ocorre em duas etapas: o primeiro evento, entre 200 e 250 °C, é exotérmico e, na segunda etapa, há um evento endotérmico entre 300 e 325 °C. A curva obtida, bem como os picos endo e exotérmicos encontrados, foram semelhantes ao descrito por Araujo (2003) e Mainardes (2007). A curva de TG/DTG do AZT (Figura 18) demonstra que até aproximadamente 180 °C, a zidovudina não sofre perda de massa, sendo estável termicamente até essa temperatura. Logo após, são observados dois momentos de perda de massa relacionados à decomposição térmica do fármaco, tais eventos podem ser vistos mais claramente na curva DTG. O primeiro se inicia em torno de 200 °C a 250 °C, o que reforça o achado na curva DSC e o segundo, entre aproximadamente 260 °C e 315 °C. Após os dois eventos de perda de massa, iniciase uma decomposição lenta do AZT, o que sugere a eliminação gradativa de material carbonáceo, devido à carbonização (PORFÍRIO et al., 2015; ARAUJO, 2003).

Figura 17 – Curva DSC do AZT obtida sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.

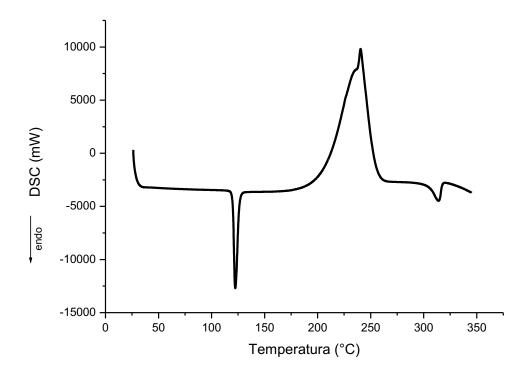
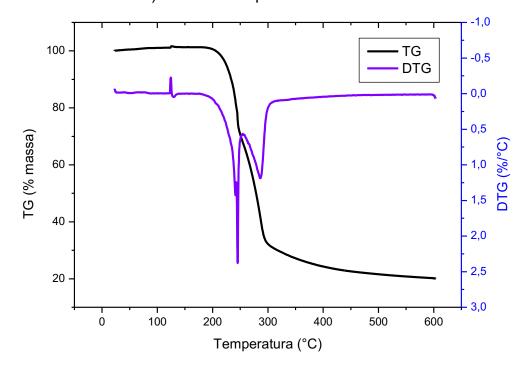
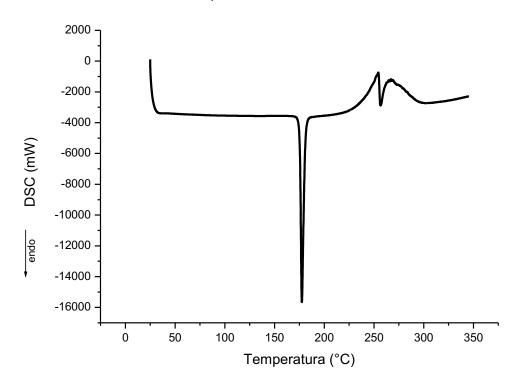


Figura 18 – Curvas TG/DTG do AZT obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 (100 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.



A curva DSC da lamivudina (Figura 19) apresenta o primeiro evento endotérmico entre 175 e 180 °C, característico do ponto de fusão do fármaco e que comprova seu grau de pureza. A partir de 250 até 300 °C, podem-se observar dois pequenos eventos exotérmicos, os quais sugerem o início da decomposição térmica do 3TC, resultados estes semelhantes ao encontrado por Souza (2008). Por sua vez, a curva de TG/DTG (Figura 20) do 3TC apresenta um patamar até aproximadamente 200 °C, indicando estabilidade térmica e basicamente dois eventos de perda de massa. O primeiro ocorre entre 200 e 300 °C e, a partir de então, inicia-se uma lenta perda de massa. Esses eventos correspondem à decomposição do 3TC, resultados que corroboram o achado na curva de DSC do fármaco (PORFÍRIO et al., 2015).

Figura 19 – Curva DSC do 3TC obtida sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.



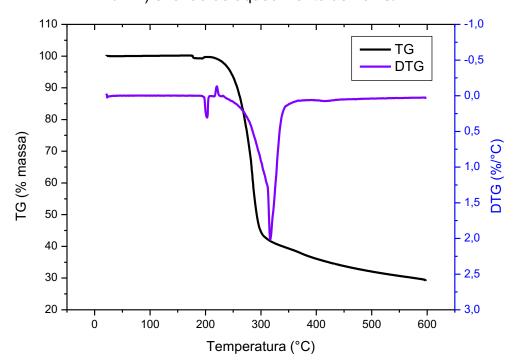


Figura 20 – Curvas TG/DTG do 3TC obtidas sob atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.

A Figura 21 apresenta a curva DSC dos dois fármacos isolados e de sua mistura física. É possível notar na curva da mistura física que houve dois eventos endotérmicos, sendo um deles mais intenso, em torno de 115 °C, correspondente à zidovudina e um de menor intensidade, em torno de 150 °C, que se refere à lamivudina. O evento de decomposição exotérmico da zidovudina fica claro na curva da mistura física. É possível notar que houve interação física entre os fármacos, uma vez que os pontos de fusão foram deslocados e, ao avaliar as curvas de TG/DTG (Figura 22), nota-se uma diferença entre o patamar de estabilidade térmica dos fármacos e da mistura física, podendo ser visto com mais clareza no DTG que, na mistura física, o maior evento de perda de massa da zidovudina, que ocorre em torno de 200 °C, é deslocado para aproximadamente 250 °C indicando uma maior estabilidade térmica. Por outro lado, a lamivudina se apresenta mais instável termicamente, uma vez que sua perda de massa ocorre de forma mais rápida.

Figura 21 – Curvas DSC do AZT, 3TC e mistura física AZT+3TC (1:1) obtidas sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.

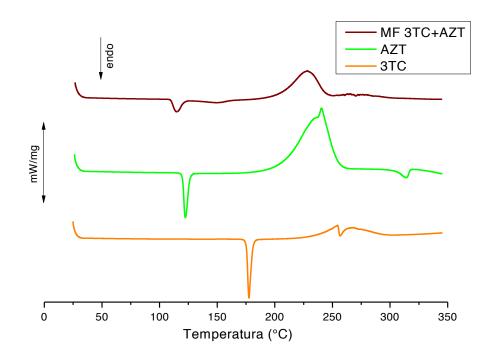
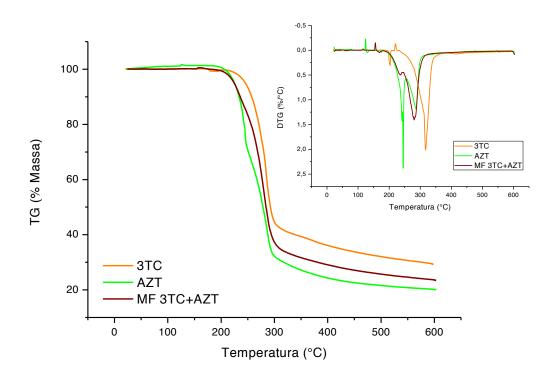


Figura 22 – Curvas TG/DTG do AZT, 3TC e mistura física 3TC+AZT (1:1) obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 (100 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.



Nas Figuras 23 e 24 podem ser vistas, respectivamente, as curvas de DSC e TG/DTG do AZT, 3TC, PBCA, da mistura física PBCA+3TC+AZT e das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT.

Inicialmente, em relação à curva da mistura física PBCA+3TC+AZT é possível notar dois eventos endotérmicos, o primeiro, entre 75 e 90 °C, aparenta ser uma somatória de eventos do ponto de fusão do AZT e da perda de água do polímero PBCA, sendo que o ponto de fusão da zidovudina, que ocorreu em 122 °C, é deslocado. O segundo evento ocorreu entre 150 e 175 °C e corresponde ao ponto de fusão da lamivudina. As duas endotermas são seguidas de dois eventos exotérmicos, correspondentes à decomposição do AZT (em torno de 200 °C) e do 3TC (em torno de 250 °C) e, após 300 °C, ocorre um pequeno evento exotérmico semelhante ao do PBCA. Esses eventos são equivalentes aos encontrados nas curvas DSC do AZT, 3TC e do PBCA. A curva DSC das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT apresenta comportamento semelhante ao observado na curva do polímero: nota-se a ausência dos picos endotérmicos correspondentes aos fármacos, o que indica fortemente que houve a associação entre a nanoestrutura e os fármacos antirretrovirais, além disso, a ausência dos picos de degradação dos fármacos indica que a encapsulação nas nanopartículas de PBCA foi eficiente para melhorar a estabilidade térmica dos fármacos. Ao confrontar a curva das nanopartículas completas e da mistura física, fica evidente que há uma distinção entre elas. Esse fato aponta para a formação de um sistema diferente de uma simples mistura de matérias primas.

Igualmente, ao considerar as curvas TG/DTG da mistura física e das nanopartículas completas, nota-se que a primeira apresenta praticamente uma única perda de massa, entretanto, na segunda, é possível notar que ocorrem dois eventos distintos de perda de massa, apresentando um comportamento semelhante ao PBCA. Essa distinção entre as curvas TG/DTG da mistura física e das nanopartículas PBCA-3TC/AZT sugere que houve interação entre os fármacos e as nanopartículas.

Figura 23 – Curvas DSC do AZT, 3TC, PBCA, da mistura física PBCA-3TC-AZT e das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.

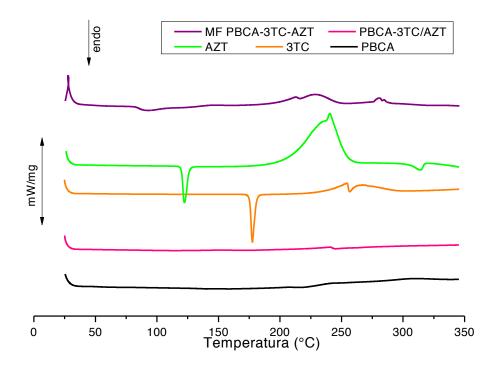
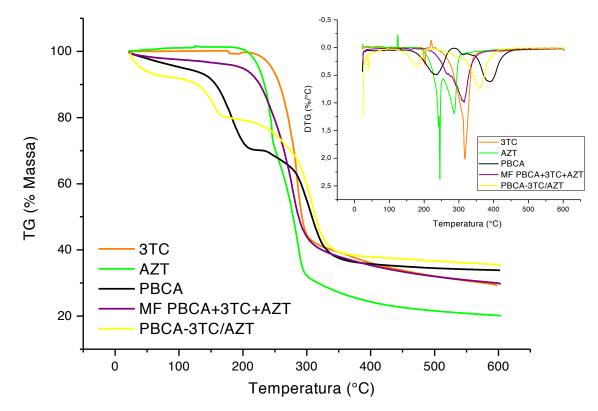


Figura 24 – Curvas TG/DTG do AZT, 3TC, PBCA, da mistura física PBCA+3TC+AZT e das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT obtidas sob atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.



Por fim, podemos avaliar a curva de DSC da nanopartícula de PBCA-3TC/AZT-Ps80 comparada às curvas do polímero com e sem revestimento e da nanopartícula de PBCA-3TC/AZT (Figura 25). Observa-se que o comportamento térmico da nanopartícula completa é muito semelhante ao da nanopartícula de PBCA-Ps80 e difere da nanopartícula de PBCA-3TC/AZT. Esse fato evidencia a ocorrência do revestimento e o aumento da estabilização térmica dos fármacos como citado anteriormente. O mesmo ocorre nas curvas de TG/DTG (Figura 26) porém, ao contrário do que se observa para as nanopartículas de PBCA-Ps80, as nanopartículas contendo fármaco, quando revestidas, apresentam uma menor perda de massa na temperatura próxima de 115 °C e só voltam a perder massa próximo aos 300 °C, apesar disso, o perfil de % de perda de massa das nanopartículas completas ainda é muito semelhante ao do PBCA-Ps80.

Figura 25 – Curvas DSC do PBCA, das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT, PBCA-Ps80 e PBCA-3TC/AZT-Ps80 obtidas sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.

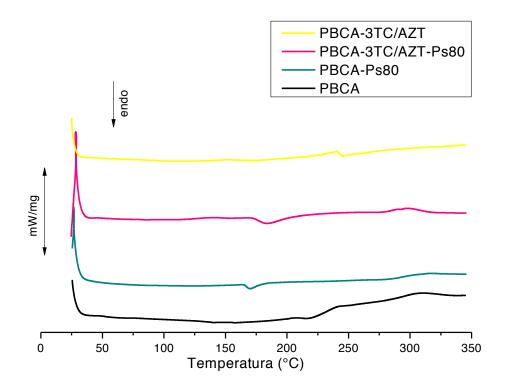
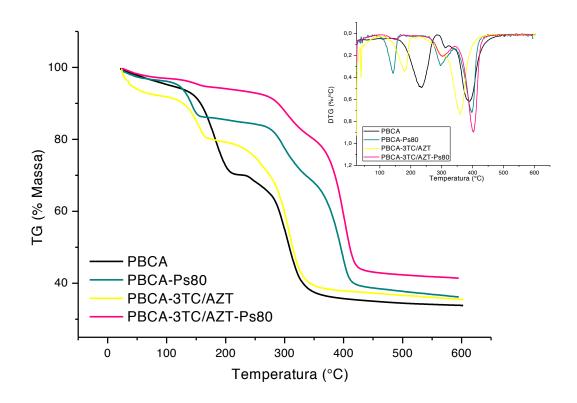


Figura 26 – Curvas TG/DTG do PBCA, das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT, PBCA-Ps80 e PBCA-3TC/AZT-Ps80 obtidas sob atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.



5.3 Caracterização das nanopartículas por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Para se obter informações estruturais do interior e interface das nanopartículas obtidas nesse trabalho, foi realizada a análise de SAXS. Na Figura 27 é possível observar a curva das amostras analisadas por SAXS em escala absoluta.

10³ - PBCA PBCAps PBCAtc Comp

Figura 27 – Perfil da intensidade de SAXS em função do módulo do vetor de espalhamento para as amostras.

PBCA: Nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato), PBCAps: Nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato) revestidas com polissorbato 80, PBCAtc: Nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato) contendo lamivudina e zidovudina e Comp: Nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato) contendo a associação de fármacos e revestidas.

q [Å⁻¹]

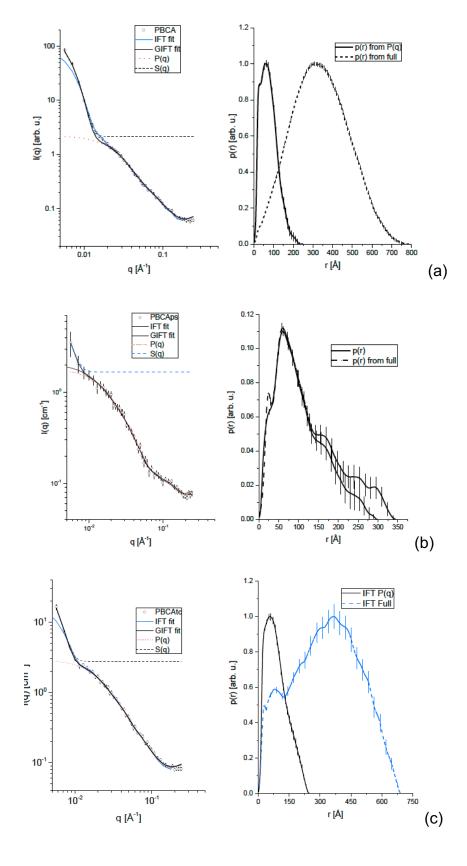
10⁻¹

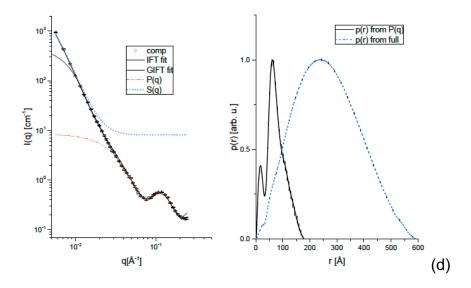
10⁻²

As nanopartículas de PBCA, PBCAps e PBCAtc apresentam dois eventos bem claros na curva. Nota-se que próximo a 0.01Å-1 tem-se uma rápida subida na curva o que pode indicar que a curva acima de ~0.01Å-1 corresponde a estruturas internas das amostras e, abaixo desse valor tem-se distâncias de correlação maiores. A fim de estudar esses dois eventos em separado, é possível assumir uma forma média para as estruturas internas e um aglomerado das estruturas maiores formando a partícula grande.

Para que fosse possível avaliar o aglomerado, foi feita uma análise dos resultados no programa WGIFT (OLIVEIRA *et al.*, 2009). O programa permite realizar a modelagem de um fator de forma através da construção de uma função p(r) e o aglomerado utilizando uma função que descreva seu tamanho geral. Foram realizadas duas modelagens, uma que avalia o sistema como um todo e fornece uma p(r) média e, outra, que assumi o desacoplamento do sistema. A Figura 28 apresenta os dados de SAXS e a modelagem para as nanopartículas avaliadas.

Figura 28 – Curvas de SAXS e modelagem para as nanopartículas de PBCA.





A esquerda os círculos correspondem aos dados de SAXS e as linhas às curvas teóricas. A direita curva de distribuição de distâncias entre pares. (a) PBCA: Nanopartículas de poli (n-butil ciano acrilato), (b) PBCAps: Nanopartículas de poli (n-butil ciano acrilato) revestidas com polissorbato 80, (c) PBCAtc: Nanopartículas de poli (n-butil ciano acrilato) contendo lamivudina e zidovudina e (d) Comp: Nanopartículas de poli (n-butil ciano acrilato) contendo a associação de fármacos e revestidas

É possível observar que o ajuste dado pelo método de IFT não consegue descrever a parte inicial da curva, e o ajuste teórico fica abaixo dos dados experimentais. Isto ocorre, uma vez que o programa não é capaz de fazer o ajuste dos tamanhos apresentados, os quais são considerados grandes e acabam ficando fora da resolução dos dados. Já pelo método GIFT temos um bom ajuste dos dados.

Comparando as curvas do PBCA e PBCA-Ps80, nota-se que o segundo apresenta uma curva de espalhamento menos intensa, o que acaba originando dados mais ruidosos. A subida na curva a baixos ângulos da amostra de PBCA-Ps80 ocorreu a menores valores de q, o que indica tamanhos de aglomerados maiores do que no caso da nanopartícula de PBCA, corroborando os dados de DLS, uma vez que as nanopartículas revestidas apresentam diâmetro médio superior ao das nanopartículas sem o revestimento.

Para a amostra das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT observa-se um comportamento da curva semelhante ao PBCA. Os tamanhos de aglomerados são similares e por essa razão temos um aumento da curva de SAXS em regiões próximas. Em relação às curvas (a), (b) e (c) tem-se uma subida abrupta na curva de

SAXS para q~0.01Å⁻¹, que ocorre devido aos tamanhos grandes das nanopartículas. Os dados apresentados acima de q~0.01Å⁻¹ indicam a presença de partículas globulares de dimensões máximas entre 200 Å – 300Å. Isso indica que dentro das nanopartículas avaliadas existem subdomínios com tamanhos desta ordem.

Em relação as nanopartículas completas, já era esperado a formação de grandes aglomerados, uma vez que o diâmetro dessas nanopartículas são maiores do que a resolução dos dados de SAXS. Nessa curva (d) temos uma oscilação de espalhamento por volta de q~0.1Å-1 esse fato é uma indicação da presença de interfaces com tensoativos. Nesse caso os contrastes positivo/negativo das cabeças polares e da cauda carbônica respectivamente, geram esta oscilação na curva de espalhamento.

5.4 Desenvolvimento e validação de método analítico por HPLC para determinação da eficiência de encapsulação dos fármacos nas nanopartículas de PBCA e PBCA-Ps80

A princípio, para a quantificação simultânea do 3TC e AZT por HPLC, foi aplicado o método proposto na Farmacopeia Brasileira 5ª edição, porém o pico de eluição da lamivudina não se separava dos interferentes da amostra. Outros métodos descritos na literatura (LAVRA et al., 2008; BECK et al., 2007; DEZANNI, 2010) também foram experimentados. Em dois dos métodos, o problema de eluição da lamivudina também ocorreu, porém no terceiro foi possível separar a lamivudina dos picos interferentes, entretanto, o tempo de retenção da zidovudina foi superior a 30 min. Após modificações nos métodos avaliados, a fase móvel foi constituída por uma mistura de tampão fosfato de sódio 10 mM e metanol. O fluxo e as proporções de cada solvente foram ajustados para que os picos saíssem sem interferentes e o tempo de retenção de cada um proporcionasse uma corrida com menor tempo possível para otimizar o gasto de solvente orgânico e o tempo total das leituras. A diluição das amostras a partir da solução estoque foi feita com a fase móvel como diluente para evitar o aparecimento do volume morto. Desse modo, após várias

tentativas, foram estabelecidas as condições cromatográficas utilizadas nesse trabalho que são apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2 – Condições cromatográficas para quantificação simultânea de lamivudina e zidovudina nas nanopartículas de PBCA revestidas ou não.

Condições Cromatográficas			
Face máyel	Tampão Fosfato de sódio 10 mM e		
Fase móvel	metanol (70:30)		
Fluxo	1,0 mL/min		
Temperatura	40 °C		
Volume de injeção	20 μL		
Comprimento de onda	270 nm		

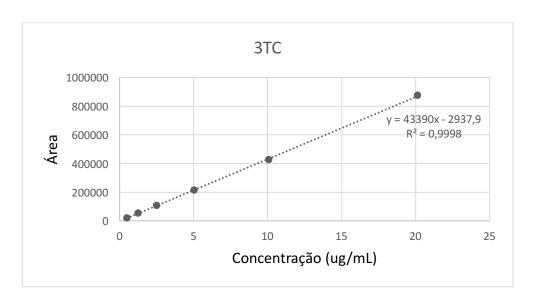
5.4.1 Linearidade

A capacidade do método em apresentar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito é denominada linearidade (ICH, 2005, ANVISA, 2003). Essa correlação entre o sinal medido e a concentração da solução pode ser determinada matematicamente utilizando-se a curva analítica obtida a partir de soluções padrão com concentração conhecida, o critério mínimo de aceitação do coeficiente de correlação é de 0,99 e deve ser determinada pela análise de, pelo menos, cinco concentrações diferentes (RIBANI, 2004; ANVISA, 2003).

A linearidade foi avaliada por meio da injeção em triplicada das soluções padrão de 3TC e AZT nas concentrações de 0,5; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 µg/mL. A partir das áreas originadas de cada leitura foi construída a curva analítica de cada

fármaco (Figura 29). Os parâmetros relacionados à linearidade (coeficiente angular, linear e de determinação) estão apresentados na Tabela 9.

Figura 29 – Curvas analíticas dos padrões de 3TC e AZT obtidas com o método analítico desenvolvido.



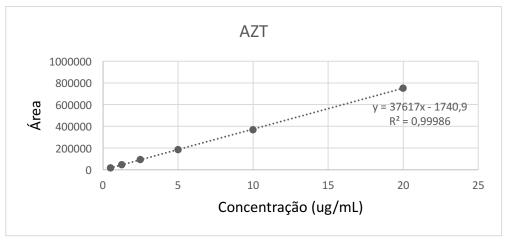


Tabela 9 – Parâmetros relativos à curva analítica dos padrões de 3TC e AZT.

Parâmetro	Valor 3TC	Valor AZT
Coeficiente angular (a)	43390	37617
Coeficiente linear (b)	2937,9	1740,9
Coeficiente de determinação (r²)	0,9998	0,99986

Tanto a curva da lamivudina quanto a da zidovudina, apresentaram r² superior a 0,999. Sendo assim, o método desenvolvido para quantificação simultânea de 3TC e AZT por HPLC é considerado linear nas condições apresentadas.

5.4.2 Especificidade

Segundo o ICH (2005) e a RDC 899/03 a especificidade é a capacidade do método de avaliar de forma inequívoca o composto em análise na presença de componentes que podem interferir no desempenho da medição, podendo aumentar ou reduzir o sinal. Estes interferentes já estão presentes na matriz e podem ser, por exemplo, outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas ou produtos de degradação. A especificidade garante que o pico apresentado no espectro seja exclusivamente do composto em questão (RIBANI, 2004).

A determinação da especificidade do método previamente desenvolvido, foi feita por meio da comparação visual dos cromatogramas das injeções das soluções placebo 1, 2, 3 e 4 (Figura 30), da fase móvel (Figura 31) e da solução padrão de 3TC e AZT 5,0 μg/mL (Figura 32). Observa-se que não há eluição de nenhum pico relacionado a interferentes nos tempos de retenção da lamivudina (3,960 min.) e da zidovudina (8,903 min.).

Figura 30 – Cromatograma do placebo 1 (PBCA para quantificação do fármaco total) (a), placebo 2 (PBCA para quantificação do fármaco livre) (b), placebo 3 (PBCA-Ps80 para quantificação do fármaco total) (c) e placebo 4 (PBCA-Ps80 para quantificação do fármaco livre).

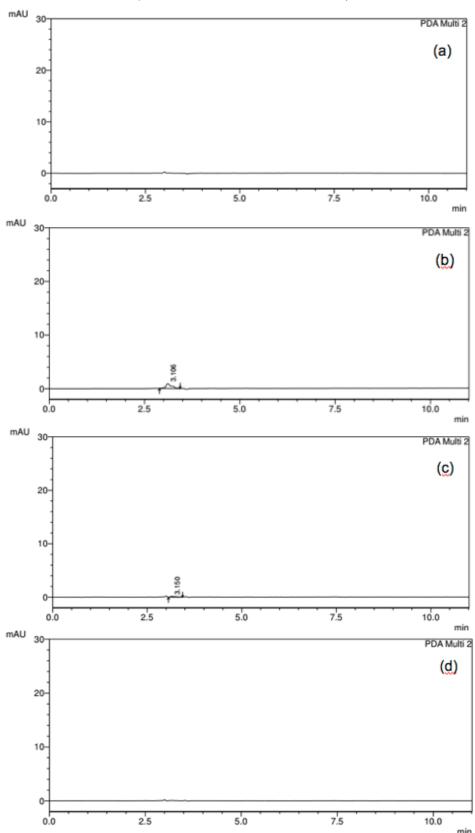


Figura 31 – Cromatograma da injeção da fase móvel constituída de tampão fosfato 10 mM e metanol (70:30 v/v).

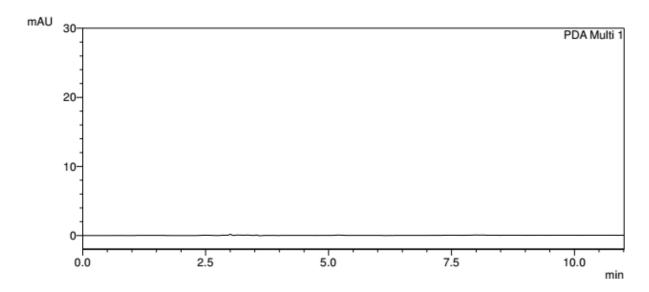
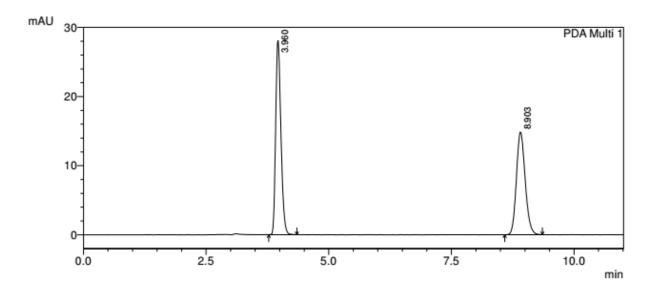


Figura 32 – Cromatograma da injeção da solução padrão de 3TC e AZT diluídos na fase móvel na concentração de 5,0 μg/mL.



5.4.3 Precisão

A precisão avalia a dispersão dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma mesma amostra. É determinada a partir do coeficiente de variação (CV), normalmente em porcentagem (%), também conhecido como desvio padrão

relativo (DPR). No presente trabalho, foi avaliada a precisão por repetibilidade (intracorrida) e a precisão intermediária (intercorrida). Foram realizadas leituras das soluções padrão de 3TC e AZT nas concentrações de CQA, CQM e CQB (10,0; 5,0; 1,25 μg/mL, respectivamente) em sextuplicatas em um único dia para precisão por repetibilidade e em dias consecutivos para precisão intermediária. Os resultados são apresentados nas Tabelas 10 e 11 e considerados aceitáveis quando não excederem 5% (ICH, 2005; ANVISA, 2003, INMETRO 2010).

Tabela 10 – Precisão por repetibilidade e intermediária das soluções padrão de lamivudina do método para quantificação simultânea de 3TC e AZT.

Concentração teoria (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	CV% (intradia)	Concentração experimental (µg/mL)	CV% (interdia)
1,25	1,11 ± 0,002	0,26	1,11 ± 0,002	0,24
5,0	4,63 ± 0,004	0,07	4,64 ± 0,010	0,22
10,0	9,23 ± 0,004	0,04	9,29 ± 0,004	0,04

Os valores da concentração experimental são expressos como média ± desvio padrão. (n = 6). CV% - Coeficiente de variação.

Tabela 11 – Precisão por repetibilidade e intermediária das soluções padrão de zidovudina do método para quantificação simultânea de 3TC e AZT.

Concentração teoria (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	CV% (intradia)	Concentração experimental (µg/mL)	CV% (interdia)
1,25	1,11 ± 0,003	0,30	1,11 ± 0,004	0,36
5,0	4,61 ± 0,004	0,09	4,63 ± 0,09	0,21
10,0	9,20 ± 0,002	0,03	9,25 ± 0,003	0,32

Os valores da concentração experimental são expressos como média ± desvio padrão. (n = 6). CV% - Coeficiente de variação.

5.4.4 Exatidão

A exatidão é a proximidade dos resultados individuais obtidos em uma análise em relação a um valor de referência. Para avaliar a exatidão do método foi utilizado o teste de recuperação, ou seja, concentrações conhecidas dos fármacos foram determinadas na presença de nanopartículas de PBCA e PBCA-Ps80. As análises foram realizadas em sextuplicata em um único dia e em dias consecutivos. Os resultados de exatidão para o 3TC e o AZT na presença dos interferentes podem ser vistos nas Tabelas 12, 13, 14 e 15, e, como preconizado nas normativas internacionais e brasileiras, todos os resultados de exatidão (%) se encontram na faixa entre 95 e 105%.

Tabela 12 – Exatidão por recuperação da lamivudina na presença de nanopartículas de PBCA.

Concentração teoria (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	E% (intradia)	Concentração experimental (µg/mL)	E% (interdia)
1,25	1,26 ± 0,053	101,33	1,26 ± 0,054	100,29
5,0	5,00 ± 0,263	100,06	5,18 ± 0,197	103,61
10,0	10,05 ± 0,447	100,55	10,20 ± 0,426	102,03

Os valores da concentração experimental são expressos como média ± desvio padrão. (n = 6). E% - Exatidão.

Tabela 13 – Exatidão por recuperação da lamivudina na presença de nanopartículas de PBCA-Ps80.

Concentração teoria (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	E% (intradia)	Concentração experimental (µg/mL)	E% (interdia)
1,25	1,25 ± 0,002	100,57	1,20 ± 0,069	96,71
5,0	4,99 ± 0,004	99,96	5,10 ± 0,107	102,06
10,0	10,07 ± 0,007	100,76	9,83 ± 0,341	98,37

Os valores da concentração experimental são expressos como média ± desvio padrão. (n = 6). E% - Exatidão.

Tabela 14 – Exatidão por recuperação da zidovudina na presença de nanopartículas de PBCA.

Concentração teoria (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	E% (intradia)	Concentração experimental (µg/mL)	E% (interdia)
1,25	1,26 ± 0,038	100,99	1,25 ± 0,043	100,77
5,0	5,02 ± 0,190	100,42	5,14 ± 0,142	102,98
10,0	10,08 ± 0,326	100,81	10,30 ± 0,236	103,03

Os valores da concentração experimental são expressos como média ± desvio padrão. (n = 6). E% - Exatidão.

Tabela 15 – Exatidão por recuperação da zidovudina na presença de nanopartículas de PBCA-Ps80.

Concentração teoria (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	E% (intradia)	Concentração experimental (µg/mL)	E% (interdia)
1,25	1,23 ± 0,003	99,13	1,18 ± 0,071	95,00
5,0	5,13 ± 0,006	102,75	5,13 ± 0,005	102,68
10,0	9,91 ± 0,002	99,19	9,68 ± 0,336	96,82

Os valores da concentração experimental são expressos como média ± desvio padrão. (n = 6). E% - Exatidão.

5.4.5 Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)

O LD representa a menor concentração do analito detectada pelo método, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais que foram estabelecidas. Já o LQ é a menor quantidade do analito em uma matriz que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. (RIBANI, 2004, ANVISA, 2003, INMETRO 2010).

Foram construídas curvas analíticas para determinação do LQ e LD com base nas Equações 3 e 4. A partir da equação da reta y = 45176x + 1105,8 da curva analítica da lamivudina os valores encontrados para o LQ e LD foram de $0,24~\mu g/mL$ e $0,08~\mu g/mL$, respectivamente. Para a zidovudina a equação da reta da curva analítica utilizada foi y = 39618x + 1361 e os valores encontrados para o LQ e LD foram de $0,34~\mu g/mL$ e $0,11~\mu g/mL$, respectivamente.

5.5 Eficiência de encapsulação dos fármacos às nanopartículas poliméricas

A quantificação da lamivudina e da zidovudina presente nas nanopartículas de PBCA e PBCA-Ps80 foi realizada através do método previamente desenvolvido e

validado conforme os itens anteriores e a porcentagem de eficiência de encapsulação (%EE) foi calculada a partir da Equação 5. Acerca das nanopartículas sem o revestimento a porcentagem de encapsulação encontrada foi de 44,45 ± 0,08%, sendo que 34,69% desse total era de AZT e os outros 9,75% de 3TC. Em relação à proporção dos fármacos encapsulados, esses foram os resultados mais próximo do esquema terapêutico atual, visto que a dose de lamivudina administrada para os pacientes é a metade da dose de zidovudina.

Reddy e Murthy (2004b) avaliaram a influência da concentração do monômero de PBCA no meio reacional e a eficiência de encapsulação do metotrexato. Na concentração de 1% de monômero, a mesma utilizada neste trabalho, os pesquisadores relataram %EE de 43,1 e o aumento da concentração do monômero resultou no aumento progressivo da porcentagem de encapsulação do metotrexato. Sun et al., (2010) variaram a proporção entre a curcumina (fármaco) e o polímero e ao analisar a eficiência de encapsulação observaram resultados entre 21,1 e 28,7%. Tavares (2013) avaliou a porcentagem de encapsulação nas nanopartículas de PBCA em três diferentes concentrações de aciclovir e notou um incremento da encapsulação até 5,0 mg/mL a qual foi de 63,9 ± 2,5%. Já na concentração de 10 mg/mL o achado foi de 36,0 ± 1,2. Petri e colaboradores (2007) relatam a 65 ± 11% de eficiência de encapsulação para as nanopartículas de PBCA contendo doxorrubicina. Apresentados os resultados encontrados em literatura, fica claro que a porcentagem de encapsulação é um parâmetro variável e que depende do fármaco a ser veiculado e da síntese para obtenção das nanoestruturas, além disso, nota-se que o processo de encapsulação para as nanopartículas de PBCA pode ser saturável.

Quanto as nanopartículas revestidas com Ps-80 a %EE foi reduzida para 30,44 ± 0,76%. Este resultado vai de encontro ao relatado por Tavares (2013), que ao revestir com trimetilquitosana as nanopartículas de PBCA contendo aciclovir teve uma perda de 21,7%. No presente trabalho, a perda de encapsulação foi de 14,01%, supõe-se que pode haver um deslocamento dos fármacos para o meio reacional no momento do revestimento e, também, que o processo de liofilização necessário para que haja o revestimento com Ps80 possa interferir na quantidade de fármaco que esta adsorvido na superfície das nanopartículas.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Nanopartículas de PBCA contendo lamivudina e zidovudina, revestidas com polissorbato 80, foram obtidas pela técnica de polimerização em emulsão. O método de obtenção, bem como as condições empregadas para a síntese das nanopartículas contendo ou não fármacos se mostraram adequados.

As características físico-químicas das nanopartículas de PBCA-3TC/AZT-Ps80 revelaram diâmetro médio de 325,45 nm, índice de polidispersão de 0,391, potencial Zeta de -4,18 mV e um sistema monodisperso. A eficiência de encapsulação foi de 44,45% para as nanopartículas de PBCA não revestidas e de 30,44% para as revestidas com Ps80, não foram encontrados relatos na literatura sobre a encapsulação simultânea de dois fármacos em nanopartículas poliméricas contendo somente fase aquosa.

Os dados obtidos nas análises de DSC e TG/DTG comprovam a formação de um sistema nanoestruturado capaz de aumentar a estabilidade térmica dos fármacos antirretrovirais estudados. Esses dados, juntamente com os resultados de SAXS, demonstram que o método empregado para o revestimento das nanopartículas de PBCA foi eficaz.

Nos ensaios de citotoxicidade as amostras de PBCA e PBCA-Ps80 apresentaram viabilidade celular superior a 70% em todas as concentrações estudadas e o revestimento foi capaz de reduzir a toxicidade celular das nanopartículas.

Até o momento não há na literatura método analítico para quantificação simultânea do 3TC e AZT em nanopartículas de PBCA revestidas ou não. O método desenvolvido foi validado uma vez que atendeu aos atributos especificados nos regulamentos nacionais e internacionais para os parâmetros de linearidade, especificidade, exatidão, precisão, limite de quantificação e detecção.

Deste modo, conclui-se que as nanopartículas de PBCA-3TC/AZT-Ps80 são um sistema promissor para veiculação de fármacos antirretrovirais e possíveis melhoras na terapêutica.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, M. I.; BEG, S.; SAMAD, A.; BABOOTA, S.; KOHLI, K.; ALI, J.; AHUJA, A.; AKBAR, M. Strategy for effective brain drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 5, p. 385-403, 2010.
- ALONSO, M. J.; LOSA, C.; CALVO, P.; VILA-JATO, J. Approaches to improve the association of amikacin sulphate to poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 68, n. 1, p. 69-76, 1991.
- ALYAUTDIN, R. N. PETROV, V. E., LANGER, K., BERTHOLD, A., KHARKEVICH, D. A., KREUTER, J. Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. **Pharmaceutical research**, v. 14, n. 3, p. 325-328, 1997.
- ARAÚJO, A.S.A. Análise térmica e determinação dos parâmetros cinéticos de preparações farmacêuticas e novas especialidades de zidovudina (AZT). São Paulo: USP, 2003. 241p. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- ARAUJO, R. S. Desenvolvimento, caracterização e liofilização de nanopartículas e encapsulamento de antibiótico de uso veterinário. Ouro Preto: UFOP, 2009. 131 p. Dissertação (Mestrado) Escola de Farmácia Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2009.
- ARIAS, J. L.; GALLARDO V.; LINARES-MOLINERO, F.; DELGADO, A.V. Preparation and characterization of carbonyl iron/poly (butylcyanoacrylate) core/shell nanoparticles. **Journal of colloid and interface science**, v. 299, n. 2, p. 599-607, 2006.
- BALINT, G. A. Antiretroviral therapeutic possibilities for human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome. **Pharmacology & therapeutics**, v. 89, n. 1, p. 17-27, 2001.
- BALLABH, P.; BRAUN, A.; NEDERGAARD, M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. **Neurobiology of disease**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2004.
- BECK, R. C. R., et al. Validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação da lamivudina e zidovudina em comprimidos. **Química Nova**, v. 30, n.5, p. 1225-1228, 2007.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, 5.ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **AIDS no Brasil.** Disponível em: http://www.aids.gov.br/pagina/aids-no-brasil> Acesso em: 14 Jun 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 236**, de 2 de maio de 1985. Programa Nacional de DST/AIDS. Diário Oficial da União, Brasília, 1985.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, Brasília, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Quais são os antirretrovirais.** Disponível em: http://www.aids.gov.br/pagina/quais-sao-os-antirretrovirais Acesso em: 26 Out 2016.
- BRASIL. Resolução **R.E. nº 899**, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: 10 nov. 2016.
- BRITO, M. A. Fármacos recentes usados para o tratamento da infecção pelo HIV-1: enfuvirtida, maraviroc, raltegravir e etravirina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 2, p. 159-168, 2011.
- CAMPBELL, C. A. Women and AIDS. **Social Science & Medicine**, v. 30, n. 4, p. 407-415, 1990.
- CAO, J.; SUN, J.; WANG, X.; LI, X.; DENG, Y. N-Trimethyl chitosan-coated multivesicular liposomes for oxymatrine oral delivery. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 35, n. 11, p. 1339-1347, 2009.
- CASSEB, J., et al. T CD4+ cells count among patients co-infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1): high prevalence of tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 4, p. 231-233, 2007.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC. **HIV and AIDS United States, 1981-2000.** Disponível em: http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5021a2.htm Acesso em: 14 Jun 2015.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. What is HIV/AIDS? Disponível em: www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html Acesso em: 06 Jun 2015.
- CHAUVIERRE, C.; LABARRE, D.; COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Novel polysaccharide-decorated poly(isobutyl cyanoacrylate) nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 11, p.1786-1793, 2003.
- CHECA, A.; SOTO, V. G.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S.; SAURINA, J. Fast determination of pK a values of reverse transcriptase inhibitor drugs for AIDS treatment by using pH-gradient flow-injection analysis and multivariate curve resolution. **Analytica chimica acta**, v. 554, n. 1, p. 177-183, 2005.
- CHEQUER, P. et al. **Impacto da terapia anti-retroviral**. [On line]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/31impacto_terapia.pdf> Acesso em: 10 Jun 2014.
- CHO, E. J. et al. Nanoparticle characterization: state of the art, challenges, and emerging technologies. **Molecular pharmaceutics**, v. 10, n. 6, p. 2093-2110, 2013.

- CORBEIL, J. *et al.* Temporal gene regulation during HIV-1 infection of human CD4+ T cells. **Genome research**, v. 11, n. 7, p. 1198-1204, 2001.
- COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as drug carrier: present state and perspectives. **Journal of controlled release**, v. 17, n. 2, p. 187-198, 1991.
- DANELUTI, A. L. M. Estudo termoanalítico envolvendo estabilidade e préformulação de ácido fítico livre/emulsão. São Paulo: USP, 2011. 112 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- DE MELO, N. F. S.; GRILLO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F.; DIAS FILHO, N. L.; DE PAULA, E.; DE ARAÚJO, D. R. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (L-lactídeo) contendo benzocaína. **Química Nova**, v. 33, p. 65-69, 2010.
- DELICATO, L. S. O papel dos co-receptores CCRS e CXCR4 na infecção pelo vírus HIV. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia em Enfermagem) Curso de Enfermagem, Fundação Faculdades Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2005. *Apud* BELLINI, M.; FRASSON, P.C. CIÊNCIAS E SEU ENSINO: O QUE DIZEM OS CIENTISTAS E OS LIVROS DIDÁTICOS SOBRE O HIV/AIDS?. Ciência & Educação, v. 12, n. 3, p. 261-274, 2006.
- DEZANI, A. B. Avaliação in vitro da solubilidade e da permeabilidade da lamivudina e da zidovudina. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica. São Paulo: USP, 2010. 140f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- DOMINGO, C.; SAURINA, J. An overview of the analytical characterization of nanostructured drug delivery systems: towards green and sustainable pharmaceuticals: a review. **Analytica chimica acta**, v. 744, p. 8-22, 2012.
- DOUGLAS, S. J.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. Particle size and size distribution of poly (butyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles. II. Influence of stabilizers. **Journal of colloid and interface science**, v. 103, n. 1, p. 154-163, 1985.
- DOURADO, I.; VERAS, S. M. M. A.; BARREIRA, D.; BRITO, A. M. Tendências da epidemia de Aids no Brasil após a terapia anti-retroviral. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. supl., p. 9-17, 2006.
- EDWARDS, T. G. *et al.* Relationships between CD4 independence, neutralization sensitivity, and exposure of a CD4-induced epitope in a human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. **Journal of virology**, v. 75, n. 11, p. 5230-5239, 2001.
- EGOROVA, E. M. The validity of the Smoluchowski equation in electrophoretic studies of lipid membranes. **Eletrophoresis**, v. 15, n. 8-9, p. 1125-1131, 1994
- ERON, J. J., *et al.* Treatment with lamivudine, zidovudine, or both in HIV-positive patients with 200 to 500 CD4+ cells per cubic millimeter. **New England Journal of Medicine**, v.333, n.25, p.1662-1669, 1995.
- FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. **ACS nano**, v. 3, n. 1, p. 16-20, 2009.

FLEXNER, Charles. Agentes anti-retrovirais e tratamento da infecção pelo HIV. In: HARDMAN, Joel G. et al. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2004. Cap. 50, p. 1145 a 1179, 2014.

FLEXNER, Charles. Agentes anti-retrovirais e tratamento da infecção pelo HIV. In: HARDMAN, Joel G. et al. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2004. Cap. 50, p. 1145 a 1179.

Food and Drug Administration. **FDA Continues Dialogue on 'Nano' Regulation.** FDA Consumer Health Information. 2012

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

GELPERINA, S. E. *et al.* Toxicological studies of doxorubicin bound to polysorbate 80-coated poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracranial glioblastoma. **Toxicology letters**, v. 126, n. 2, p. 131-141, 2002.

GULYAEV, A. E.; GELPERINA, S. E.; SKIDAN, I. N.; ANTROPOV, A. S.; KIVMAN, G. Y.; KREUTER, J. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. **Pharmaceutical research**, v. 16, n. 10, p. 1564-1569, 1999.

HAAS, S.E. Avaliação da Eficácia e Farmacocinética de Nanocápsulas Poliméricas de Quinina em Ratos Infectados com *Plasmodium berghei*. Porto Alegre: UFRGS, 2007. 153 P. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

HILLAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 17, p. 2873-2896, 2009.

HILLAIREAU, H.; LE DOAN, T.; BESNARD, M.; CHACUN, H.; JANIN, J.; COUVREUR, P. Encapsulation of antiviral nucleotide analogues azydothimidine-triphosphate and cidofovir in poly(isso-butylcianoacrilato) nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, n.324, p.37-42, 2006.

HORWITZ, J.P.; CHAU, J.; NOEL, M. Nucleosides.5.monomesylates of (1,2)-deoxybeta-Dlyxofuranosil-thymine. **Journal of Organic Chemistry**, Columbus, v. 29, p. 2076, 1964.

HUANG, Chi-Yu *et al.* Synthesis of high loading and encapsulation efficient paclitaxel-loaded poly (n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion. **International journal of pharmaceutics**, v. 338, n. 1, p. 267-275, 2007.

HUNT JR, W. H. Nanomaterials: Nomenclature, novelty, and necessity. **JOM**, v. 56, n. 10, p. 13-18, 2004.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION GUIDELINE. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**. United States of America, 2005. Disponível em:

- http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf Acesso em: 10 nov. 2016.
- ISO International Organization for Standardization. ISO 10993-5 Biological Evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 3^a ed, ISO, 2009.
- JOSHI, S. A.; CHAVHAN, S. S.; SAWANT, K. K. Rivastigmine-loaded PLGA and PBCA nanoparticles: preparation, optimization, characterization, in vitro and pharmacodynamic studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 2, p. 189-199, 2010.
- KECK, C. M. Particle size analysis of nanocrystals: improved analysis method. **International journal of pharmaceutics**, v. 390, n. 1, p. 3-12, 2010.
- KECK, C. M.; MÜLLER, R. H. Size analysis of submicron particles by laser diffractometry—90% of the published measurements are false. **International journal of pharmaceutics**, v. 355, n. 1, p. 150-163, 2008.
- KREUTER, J. *et al.* Toxicity and association of polycyanoacrylate nanoparticles with hepatocytes. **Journal of microencapsulation**, v. 1, n. 3, p. 253-257, 1984. *Apud* VAUTHIER, C; DUBERNET, C; FATTAL, E; PINTO-ALPHANDARY, H; COUVREUR, P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 55, n. 4, p. 519-48, 2003.
- KREUTER, J.; RAMGE, P.; PETROV, V.; HAMM, S.; GELPERINA, S. E.; ENGELHARDT, B.; ALYAUTDIN, R.; VON BRIESEN, H.; BEGLEY, D. J. Direct evidence that polysorbate-80-coated poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles.**Pharmaceutical research**, v. 20, n. 3, p. 409-416, 2003.
- KÜLKAMP, I. C.; PAESE, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, v. 32, n. 2078, 2009.
- KULKOSKY, J.; SKALKA, A. M.. HIV DNA Integration: Observations and Inferences. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 3, n. 9, p. 839-851, 1990.
- KUO, Y.; SU, F. Transport of stavudine, delavirdine, and saquinavir across the blood–brain barrier by polybutylcyanoacrylate, methylmethacrylate-sulfopropylmethacrylate, and solid lipid nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 340, n. 1, p. 143-152, 2007.
- LAVRA, Z. M. M. et al. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de Lamivudina, zidovudina e nevirapina em comprimidos dose-fixa combinada por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 31, p. 969-974, 2008.
- LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R. Cytotoxicity of nanoparticles. **Small**, v. 4, n. 1, p. 26-49, 2008.
- LIMOUZIN, C.; CAVAGGIA, A.; GANACHAUD, F.; HEMMERY, P. Anionic polymerization of n-butyl cyanoacrylate in emulsion and miniemulsion. **Macromolecules**, v. 36, p. 667–674, 2003.

- MAINARDES, R. M. Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina. Araraquara: UNESP, 2007. 133p. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade Estadual Paulista, 2007.
- MALLIPEDDI, R., ROHAN, L. C. Progress in antiretroviral drug delivery using nanotechnology. **International journal of nanomedicine**, v.5, p.533, 2010.
- MALVERN INSTRUMENTS LIMITED. **Dynamic Light Scattering**: Common Terms Defined. 2011 Disponível em: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2011/02/DLS_Terms_defined_Malvern.pdf Acesso em: 15 Jun 2015.
- MARKOWITZ, M. Inibidores da protease: o que eles são, comofuncionam, quando usá-los. International Association of Physicians in AIDS Care (IAPAC), 1996. Apud TABORIANSKI, A.M. Validação de métodos para análise e estudos de estabilidade de anti-retrovirais em preparações farmacêuticas. São Paulo: USP, 2003. 167 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- McCARRON, P. A.; WOOLFSON, D.; KEATING, S. M. Response surface methodology as a predictive tool for determining the effects of preparation conditions on the physicochemical properties of poly (isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, p. 37-47, 1999.
- MCNEIL, Scott E. Challenges for nanoparticle characterization. **Characterization of nanoparticles intended for drug delivery**, p. 9-15, 2011.
- MEI, Z.; LIU, S.; WANG, L.; JIANG, J.; XU, J.; & SUN, D. Preparation of positively charged oil/water nano-emulsions with a sub-PIT method. **Journal of colloid and interface science**, v. 361, n. 2, p. 565-572, 2011.
- MELO JR, M. A.; SANTOS, L. S. S.; DO CARMO GONÇALVES, M.; NOGUEIRA, A. F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Quim. Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872-1878, 2012.
- MEZZALIRA, G. Caracterização de suspensões de nanopartículas poliméricas estudadas como carreadores de fármacos através das técnicas de espalhamento de luz e de raios-X a baixo ângulo. Porto Alegre: UFRGS, 2005. 124p. Dissertação (mestrado) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005
- MITSUYA, H.; WEINHOLD, K.J.; FURMAN, P.A.;STACLAIR, M.H.; LERMAN, S.N.; GALLO, R.C.; BOLLOGNESI, D.; BARRY, D.W.; BRODER, S. 3'-azido-3'-deoxythymidine (BW A09U)- na antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human lymphotropic- T vírus type III lymphadenopathy-associated virus in vitro. **Proceedings of the National Academy Sciences of the U.S.A.**, Washington, v. 82, n. 20, p. 7096, 1985.
- MONTEIRO, D. B. et al. Desenvolvimento e validação do método analítico de doseamento da matéria-prima lamivudina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Rev Bras Farm**, v. 87, n. 4, p. 120-123, 2006.

- MONTEIRO, L. M. Sistema nanoestruturado polimérico contendo hidroximetilnitrofural: preparação, caracterização físico-química e avaliação in vitro da atividade leishmanicida potencial. São Paulo: USP, 2013. 129 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- MOODLEY, J. *et al.* Pharmacokinetics and antiretroviral activity of lamivudine alone or when coadministered with zidovudine in human immunodeficiency virus type 1-infected pregnant women and their offspring. **Journal of Infectious Diseases**, v.178, n.5, p.1327-1333, 1998.
- MOORE, K. H.; SHAW, S.; LAURENT, A. L.; LLOYD, P.; DUNCAN, B.; MORRIS, D. M.; O'MARA, M. J.; PAKES, G. E. Lamivudine/zidovudine as a combined formulation tablet: bioequivalence compared with lamivudine and zidovudine administered concurrently and the effect of food on absorption. **J. Clin. Pharmacol.**, v.39, n. 6, p. 593-605, 1999.
- MÜLLER, R. H.; LHERM, C.; HERBORT, J.; BLUNK, T.; COUVREUR, P. Alkylcyanoacrylate drug carriers: I. Physicochemical characterization of nanoparticles with different alkyl chain length. **International journal of pharmaceutics**, v. 84, n. 1, p. 1-11, 1992.
- NASCIMENTO, J. E. *et al.* Avaliação farmacocinética de comprimidos contendo lamivudina e zidovudina em plasma humano. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, n.1, 2004.
- NICOLAS, J.; COUVREUR, P. Synthesis of poly (alkyl cyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 1, n. 1, p. 111-127, 2009.
- NOWACEK, A.; GENDELMAN, H. E. NanoART, neuroAIDS and CNS drug delivery. **Nanomedicine**, v. 4, n. 5, p. 557-574, 2009.
- O'SULLIVAN, S. M.; WOODS, J. A.; O'BRIEN, N. M. Use of Tween 40 and Tween 80 to deliver a mixture of phytochemicals to human colonic adenocarcinoma cell (CaCo-2) monolayers. **British journal of nutrition**, v. 91, n. 05, p. 757-764, 2004.
- OSTERTAG, W.; ROSELER, G.; KRIEG, C.J.; KIND, J. COLE, T.; CROZIER, T.; GAEDICKE, G.; STEINHEIDER, G.; KLUGE, N.; DUBE, S. Induction of endogenous virus and thymine kinase by 7-bromodeoxyridine in cell-cultures transformed by friend virus. **Proceedings of the National Academy Sciences of the U.S.A.**, Washington, v.71, p.4980, 1974.
- PARK, D.H.; KIM, S. B.; AHN, K-D, KIM, E. Y.; KIM, Y. J.; HAN, D. K. In vitro degradation and cytotoxicity of alkyl 2-cyanoacrylate polymers for application to tissue adhesives. **Journal of applied polymer science**, v. 89, n. 12, p. 3272-3278, 2003.
- PEREIRA, F. V. Comportamento mesomórfico, estrutura e ordenação de cristais líquidos poliméricos em massa e em solução: um estudo através de Espalhamento de Luz de Raios-x. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

- PETRI, B.; BOOTZ, A.; KHALANSKY, A.; HEKMATARA, T.; MÜLLER, R.; UHL, R.; KREUTER, J.; GELPERINA, S. Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants. **Journal of Controlled Release**, v. 117, n. 1, p. 51-58, 2007.
- PORFÍRIO, L. D. O.; COSTA, A. A.; CONCEIÇÃO, R. R.; MATOS, T. D. O.; ALMEIDA, E. D. P.; SARMENTO, V. H. V.; ARAUJO, A. A. S.; NUNES, R. D. S.; LIRA, A. A. M. Compatibility study of hydroxypropylmethylcellulose films containing zidovudine and lamivudine using thermal analysis and infrared spectroscopy. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, n. 1, p. 817-828, 2015.
- REDDY, H. L.; MURTHY, R. S. R. Study of influence of polymerization factors on formation of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles and in vitro drug release kinetics, **Ars Pharmaceutica**, n. 45, v.3, p. 211-234, 2004a.
- REDDY, L. H.; MURTHY, R. R. Influence of polymerization technique and experimental variables on the particle properties and release kinetics of methotrexate from poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles. **Acta pharmaceutica**, v. 54, n. 2, p. 103-118, 2004b.
- REMPE, R. *et al.* Transport of poly (n-butylcyano-acrylate) nanoparticles across the blood–brain barrier in vitro and their influence on barrier integrity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 406, n. 1, p. 64-69, 2011.
- REUKOV, V.; MAXIMOV, V.; VERTEGEL, A. Proteins conjugated to poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles as potential neuroprotective agents. **Biotechnology and bioengineering**, v. 108, n. 2, p. 243-252, 2011.
- ROGER, E. *et al.* Biopharmaceutical parameters to consider in order to alter the fate of nanocarriers after oral delivery. **Nanomedicine**, v. 5, n. 2, p. 287-306, 2010.
- ROJAS, H.; RITTER, C.; DAL PIZZOL, F. Mecanismos de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo: ênfase no papel das metaloproteinases de matriz. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 222-227, 2011.
- RUBBERT, A.; BEHRENS, G.; OSTROWSKI, M. 3. Pathogenesis of HIV-1 Infection Pathogenesis of HIV-1 Infection.**Pathogenesis**, v. 1, p. 26, 2011.
- SANTOS, J. S.; BECK, S. T. A coinfecção tuberculose e HIV: um importante desafio-Artigo de revisão. **RBAC**, v. 41, n. 3, p. 209-215, 2009.
- SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
- SHIBATA, A.; MCMULLEN, E.; PHAM, A.; BELSHAN, M.; SANFORD, B.; ZHOU, Y.; GOEDE, M.; DATE, A.A.; DESTACHE, C. J. Polymeric nanoparticles containing combination antiretroviral drugs for HIV type 1 treatment. **AIDS research and human retroviruses**, v. 29, n. 5, p. 746-754, 2013.
- SILVA, G. R.; LAGES, G. P.; PIANETTI, G. A.; NUNAN, E. A.; SOARES, C. D. V.; CAMPOS, L. M. M. Determinação de lamivudina, estavudina e nevirapina, em

- comprimidos, por cromatográfica líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v.29, n.6, p. 1159-1163, 2006
- SIMEONOVA, M. *et al.* Poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles for topical delivery of 5-fluorouracul. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p. 133-140, 2003.
- SINGH, S., *et al.* Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticles of a water soluble drug: zidovudine. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.58, n.5, p.650-655, 2010.
- SOMMERFELD, P.; SCHROEDER, U.; SABEL, B. A. Long-term stability of PBCA nanoparticle suspensions suggests clinical usefulness. **International journal of pharmaceutics**, v. 155, n. 2, p. 201-207, 1997.
- SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **J. Control. Release**, v.70, p.1-20, 2001.
- SOUDEYNS, H. *et al.* Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and in vitro toxicity of 2'-deoxy-3'-thiacytidine (BCH-189), a novel heterocyclic nucleoside analog. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 35, n. 7, p. 1386-1390, 1991.
- SOUZA, J., STORPIRTIS, S. Atividade anti-retroviral e propriedades farmacocinéticas da associação entre lamivudina e zidovudina. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, n.1, 2004.
- SOUZA, M. A. F. Avaliação Termoanalítica e Cinética de Medicamentos Antiretrovirais (Estavudina, Lamivudina, Zidovudina) e síntese de novos produtos derivados dos antiretrovirais. João Pessoa: UFPB, 2008. 142 p. Tese (Doutorado) Centro de Ciências Exatas e da Natureza Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.
- SOUZA, M.V.N.; ALMEIDA, M.V. Drogas anti-VIH: passado, presente e perspectivas futuras. **Química Nova,** v. 26, n. 3, p. 366-372, 2003.
- SPINK, M.J.P.; CARVALHEIRO, J.R. Os múltiplos sentidos das vacinas para a AIDS; The multiple meanings of HIV/AIDS vaccines. **Psicol. USP**, v. 13, n.1, p. 79-106, 2002.
- SULLIVAN, C. O.; BIRKINSHAW, C. In vitro degradation of insulin-loaded poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles. **Biomaterials**, v. 25, p. 4375–4382, 2004.
- SUN, M. *et al.* Enhancement of transport of curcumin to brain in mice by poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticle. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 8, p. 3111-3122, 2010.
- TABORIANSKI, A. M. Validação de métodos para análise e estudos de estabilidade de anti-retrovirais em preparações farmacêuticas. São Paulo: USP, 2003. 167 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- TAVARES, G. D. Nanopartículas de poli (n-butil-cianoacrilato) revestidas com N,N,N-trimetilquitosana: desenvolvimento, caracterização e estudos de permeabilidade in vitro. São Paulo: USP, 2013. 191 p. Tese (Doutorado) —

- Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- TIAN, X. LIN, X. N.; WEI, F.; FENG, W.; HUANG, Z. C.; WANG, P.; REN, L.; DIAO, Y. Enhanced brain targeting of temozolomide in polysorbate-80 coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 445-452, 2011.
- U.S. Department of Health & Human Services. **Global Statistics**, 2016. Disponível em: https://www.aids.gov/hiv-aids-basics/hiv-aids-101/global-statistics/ Acesso em: 23 Out 2016.
- UNAIS. **Global HIV Statistics**, 2016. Disponível em: http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet> Acesso em: 23 Out 2016.
- UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Draft Guidance for Industry: Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology.** 2011. Disponível em: http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/Nanotechnology/ucm258391.ht m> Acesso em: 14 Jun 2015.
- UNITED STATES. Food and Drug Administration. Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology. Jun 2014.
- UNITED STATES. National Nanotechnology Initiative. **What is Nanotechnology?.** Disponível em: http://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition Acesso em: 20 Jun 2015.
- VAUTHIER, C; DUBERNET, C; FATTAL, E; PINTO-ALPHANDARY, H; COUVREUR, P. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 55, n. 4, p. 519-48, 2003.
- VIEIRA, G.D.; SOUSA, C. M. Aspectos celulares e fisiológicos da Barreira Hematoencefálica. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 1, n. 4, p. 166, 2013.
- WANG, H.; SUN, J.; GOLDSTEIN, H.. Human immunodeficiency virus type 1 infection increases the in vivo capacity of peripheral monocytes to cross the blood-brain barrier into the brain and the in vivo sensitivity of the blood-brain barrier to disruption by lipopolysaccharide. **Journal of virology**, v. 82, n. 15, p. 7591-7600, 2008.
- WILSON, B.; SAMANTA, M. K.; SANTHI, K.; KUMAR, K. P. S.; PARAMAKRISHNAN, N.; SURESH, B. Targeted delivery of tacrine into the brain with polysorbate 80-coated poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics** and **Biopharmaceutics**, v. 70, n. 1, p. 75-84, 2008.
- WONG, H. L. *et al.* Nanotechnology applications for improved delivery of antiretroviral drugs to the brain. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 4, p. 503-517, 2010.
- World Health Organization. **10 FACTS ON HIV/AIDS.** Disponível em: http://www.who.int/features/factfiles/hiv/facts/en/index3.html Acesso em: 23 Out 2016.

World Health Organization. **Global Health Observatory data.** Disponível em: http://www.who.int/gho/hiv/en/> Acesso em: 14 Jun 2015.

World Health Organization. **Global health sector response to HIV, 2000-2015: focus on innovations in Africa: progress report**. 2015 Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/198065/1/9789241509824_eng.pdf?ua=1 Acesso em: 24 Out 2016.

World Health Organization. **The use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection**: Recommendations for a public health approach. Department of HIV/AIDS, Geneva, WHO, 2013

XI-XIAO, Y., *et al.* Polybutylcyanoacrylate nanoparticles as a carrier for mitomycin C in rabbits bearing VX2-liver tumor. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.46, p. 211–217, 2006.

ZHANG, Y. et al. Polybutylcyanoacrylate nanoparticles as novel vectors in cancer gene therapy. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 144-153, 2007.

Anexos