

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AMANDA MARTINEZ LYRA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE
SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MICROPARTICULADOS CONTENDO EFAVIRENZ**

PONTA GROSSA

2016

AMANDA MARTINEZ LYRA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE
SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MICROPARTICULADOS CONTENDO EFAVIRENZ**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
da Universidade Estadual de Ponta Grossa,
como requisito para obtenção do título de
mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

Coorientadora: Dr^a. Traudi Klein

PONTA GROSSA

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Lyra, Amanda Martinez
L992 Desenvolvimento, caracterização e
avaliação in vivo de sistemas de liberação
microparticulados contendo Efavirenz/
Amanda Martinez Lyra. Ponta Grossa, 2016.
102f.

Dissertação (Mestrado em Ciências
Farmacêuticas - Área de Concentração:
Fármacos, Medicamentos e Biociências
Aplicadas à Farmácia), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor
Farago.
Coorientadora: Prof^a Dr^a Traudi Klein.

1.Micropartículas. 2.Eudragit. 3.Spray
drying. 4.Cromatografia líquida de alta
eficiência. 5.Parâmetros bioquímicos.
I.Farago, Paulo Vitor. II. Klein, Traudi.
III. Universidade Estadual de Ponta
Grossa. Mestrado em Ciências
Farmacêuticas. IV. T.

CDD: 615.014

AMANDA MARTINEZ LYRA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE
SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MICROPARTICULADOS CONTENDO EFAVIRENZ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito para defesa do mestrado.

Ponta Grossa, 17 de fevereiro de 2016.

Dr^a Traudi Klein – Coorientadora

Doutora em Ciências Farmacêuticas

Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof^a. Dr^a. Josiane de Fátima Padilha de Paula

Doutora em Química

Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. Marcos Luciano Bruschi

Doutor em Ciências Farmacêuticas

Universidade Estadual de Maringá

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCIÊNCIAS
APLICADAS À FARMÁCIA, NÚMERO DA ATA 03/2016, DA MESTRANDA AMANDA
MARTINEZ LYRA REALIZADA NO DIA 17 DE FEVEREIRO DE 2016, NA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos dezoito dias de Fevereiro de dois mil e dezesseis, às 09h00min na sala 115, auditório do PPGCF, Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência da Doutora Traudi Klein reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda Amanda Martinez Lyra na linha de pesquisa: Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à farmácia/ desenvolvimento e controle de fármacos, medicamentos e correlatos, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): Josiane de Fátima Padilha de Paula (UEPG/PR) e Marcos Luciano Bruschi (UEM/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título do trabalho foi: Desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vivo* de sistemas de liberação micro-partículas contendo efavirenz. Encerrado a defesa, a banca pronunciou-se aprovado a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 60 dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): que sejam feitas alterações numéricas

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Traudi Klein
Traudi Klein 1- (DEFAR – UEPG) - Presidente

Josiane de Fátima Padilha de Paula
Josiane de Fátima Padilha de Paula 2- (DEFAR-UEPG) - Titular

Marcos Luciano Bruschi
Marcos Luciano Bruschi 3- (DEFAR-UEM) - Titular

Ponta Grossa, 17 de Fevereiro de 2016.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por confiar a mim mais esta oportunidade, me amparando e abençoando a cada dia.

À minha família, que sempre acreditou em mim, por todos os esforços, incentivos, orações, dificuldades enfrentadas, compreensão e pelo amor incondicional.

Ao meu irmão, Gabriel Martinez de Oliveira, que abriu mão de alguns dias de suas férias para enfrentar a minha rotina laboratorial, me ajudando com a finalização de algumas análises na reta final. Não tenho palavras para agradecer seu companheirismo, esforço e dedicação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, pelos ensinamentos, entusiasmo e confiança transmitidos, e principalmente pela oportunidade de ser sua orientada.

À minha coorientadora e amiga, Dr^a. Traudi Klein, sempre alegre e confiante. Obrigada pela indicação, pelas inúmeras risadas, pelo apoio, contribuição e conhecimento proporcionado.

À Prof^a Dr^a. Rosi Zanoni da Silva, por seu carisma e suas sábias palavras, despertando meu interesse pela área acadêmica e de pesquisa. Seu incentivo foi crucial.

Ao Prof. Dr. Sinvaldo Baglie, por permitir o uso de equipamentos do Laboratório de Produção de Medicamentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sem restrição de horários. Agradeço, ainda, a cordialidade desde a minha graduação, as conversas produtivas e agradáveis, e, principalmente, por ser um exemplo pessoal e profissional a ser seguido.

À Prof^a. Dr^a. Priscileila Colerato Ferrari, por sua paciência e seu tempo, compartilhando seu conhecimento e me auxiliando na avaliação dos resultados.

Às Prof^a. Dr^a. Andressa Novatski e Prof^a. M.Sc. Jéssica Mendes Nadal, por contribuírem com seus conhecimentos.

À Prof^a. Dr^a. Vanessa Migliorini Urban, por me salvar várias vezes, disponibilizando o solvente necessário para realização das análises.

Ao Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso e ao farmacêutico Anderson José de Melo e Silva, por me auxiliarem na realização dos testes bioquímicos.

À minha colega de turma Ana Paula Prestes, pela grande ajuda com o experimento *in vivo*.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelos ensinamentos e exemplo profissional.

Aos meus amigos, especialmente, Amanda Migliorini Urban, Barbara Justus, Bruna Mikulis Lemes, Daniele Siqueira de Pontes, Jéssica Lopes Fontoura, Leomar Emanuel de Almeida Mecca, Melissa Marques Gonçalves e Tanaane Ienk, pelo carinho, pelos abraços, por todas as palavras de incentivo, pelo apoio e compreensão, pelo conhecimento compartilhado, pelos momentos de desabafo e de diversão.

Aos colegas de turma do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Aos colegas de laboratório, em especial, à Dr^a Débora Maria Borsato e Prof^a. Dr^a Inês Janete Mattoso Takeda, pelo convívio e pelas boas conversas.

Aos colegas do Laboratório de Produção de Medicamentos, pelo convívio do dia a dia, pelas conversas e risadas que tornaram meus dias de trabalho mais agradáveis.

À auxiliar de limpeza Marli, que, por várias vezes, interrompeu seu serviço para abrir a porta de um laboratório pra mim.

Ao Laboratório Farmacêutico Federal, Farmanguinhos – FIOCRUZ, por doar o fármaco necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

À Evonik Industries, pela doação dos polímeros utilizados.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários, da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O efavirenz (EFV) é o fármaco de primeira escolha da classe dos inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeo utilizado no tratamento de infecções por HIV-1. Pertence à classe II do sistema de classificação biofarmacêutico e sua dose terapêutica é de 600 mg, tomados antes de dormir devido aos efeitos colaterais. Com objetivo de melhorar a biodisponibilidade do fármaco com possível redução dos efeitos colaterais, foram desenvolvidas micropartículas com Eudragit® L100 ou S100, por *spray drying*. As formulações M1 a M4 foram preparadas em etanol:água (50:50, V/V), e M5 a M8 em etanol:tampão fosfato pH 7,4 (50:50, V/V). Foram obtidas micropartículas com rendimentos (40 – 70%), umidades (1,41 – 5,77%), tamanhos de partícula (2,02 – 4,07 μm) e potenciais zeta (-61 a -43 mV) adequados. A quantificação do fármaco foi realizada por meio do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência desenvolvido e validado. O método mostrou-se específico, linear ($r = 0,9997$, $n = 3$), preciso, exato e robusto, na faixa de 8,0 a 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com tempo de corrida e o tempo de retenção de 5,0 e 3,5 minutos, respectivamente. M1 a M4 apresentaram morfologia esférica, com teor de fármaco entre 90 – 104%, e M5 a M8 exibiram morfologia achatada e distorcida, com teor de fármaco entre 67 – 75%. Nenhuma interação química foi observada nos espectros de infravermelho por transformada em Fourier para as micropartículas M1 a M4. No entanto, houve alargamento e aumento da intensidade de algumas bandas nos espectros das micropartículas M5 a M8, sugerindo uma modificação nas ligações químicas. As análises térmicas e de difração de raios X indicaram que a incorporação do EFV às micropartículas contribuiu para a amorfização do fármaco. Ensaio de liberação *in vitro* confirmaram a baixa solubilidade do fármaco em água (22,88%). As micropartículas liberaram menos de 22% em meio ácido, promovendo maior liberação em pH 6,8. Todas as formulações avaliadas aumentaram a solubilidade e a eficiência de dissolução do fármaco, e exibiram cinética de liberação biexponencial, segundo os modelos matemáticos aplicados, sendo estratégias interessantes para o aumento da biodisponibilidade do fármaco. A M3 foi responsável pela maior liberação em pH 6,8 (73,69%) e, de acordo com o modelo de Korsmeyer-Peppas, apresentou características de transporte anômalo (difusão e erosão do polímero), enquanto que nas demais micropartículas o processo de liberação foi controlado por difusão. No ensaio *in vivo*, os animais submetidos à administração de M3 apresentaram menos alterações nos parâmetros bioquímicos, quando comparados ao grupo de tratamento com EFV, sugerindo que as micropartículas contribuíram para a redução dos efeitos colaterais tais como aumento nos níveis plasmáticos de colesterol, LDL e HDL e triglicerídeos. Foi observado um decaimento na quantificação do fármaco puro durante o período avaliado no estudo de estabilidade. As micropartículas não mostraram mudanças significativas no teor de EFV durante 180 dias. Os termogramas indicaram que não houve diferença na faixa de fusão do fármaco e nos decaimentos das curvas termogravimétricas, sugerindo que não houve formação de novos produtos e, consequentemente, perda da estabilidade. A avaliação do índice de Carr e do fator de Hausner indicou que a M3 apresentou melhores propriedades de fluxo e de compactação quando comparadas ao EFV puro, características que podem melhorar o escoamento e facilitar a rotina industrial.

Palavras-chave: Micropartículas, Eudragit, *spray drying*, cromatografia líquida de alta eficiência, perfil de liberação, parâmetros bioquímicos, propriedades de fluxo.

ABSTRACT

The efavirenz is the first choice drug of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors used in the treatment of HIV-1 infections. It belongs to class II of the Biopharmaceutics Classification System and your therapeutic dose is of 600 mg, taken before bedtime due the side effects. With the aim of improve the drug's bioavailability with possible reduction of side effects, microparticles with Eudragit[®] L100 or S100 were developed by spray drying. The formulations M1 to M4 were prepared in ethanol:water (50:50, V/V) and M5 to M8 in ethanol:phosphate buffer pH 7.4 (50:50, V/V). Microparticles were obtained with yield (40 - 70%), humidity (1.41 - 5.77%), particle size (2.02 - 4.07 μm) and zeta potential (-61 to -43) suitable. The drug's quantification was realized by high performance liquid chromatography analytical method developed and validated. The method proved to be specific, linear ($r = 0.9997$, $n = 3$), precise, accurate and robust in a range of 8.0 to 50.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, with analysis and retention time of 5.0 and 3.5 minutes, respectively. M1 to M4 showed spherical morphology with drug content between 90 - 104%, and M5 to M8 exhibited flattened and distorted morphology with drug content between 67 - 75%. No chemical interactions was observed in the Fourier transformed infrared spectrum for microparticles M1 to M4. However, there enlargement and increased intensity of some bands in the spectra of microparticles M5 to M8, suggesting a modification of chemical bonds. The thermal analysis and X ray diffraction indicated that the incorporation of EFV into the microparticles contributed to the amorphization of the drug. In vitro drug release confirmed the low solubility of the drug in water (22.88%). The microparticles released less than 22% in acid medium promoting higher release at pH 6.8. All formulations evaluated increased the drug solubility and dissolution efficiency, and exhibited biexponential release kinetics according to the applied mathematical models, being interesting strategies to increase the drug's bioavailability. The M3 accounted for the major release in pH 6.8 (73.69%) and, according to the Korsmeyer-Peppas model showed anomalous transport characteristics (diffusion and erosion of the polymer), while in other microparticles the release process was controlled by diffusion. In in vitro assay the animals subjected to the administration of M3 exhibited less alterations in the biochemical parameters compared to treatment group EFV, suggesting that the microparticles contributed to the reduction of side effects such as increase in cholesterol, LDL, HDL and triglycerides plasmatic levels. It was observed decay in the quantification of pure drug during the period evaluated in the stability study. The microparticles showed no significant changes in the content of EFV during the 180 days. The thermograms showed no difference in the drug melting range and decays of thermogravimetric curves suggesting no formation of new products and consequently loss of stability. The evaluation of Carr index and Hausner factor indicated that M3 showed better flow and compression properties compared to pure EFV, characteristics which can improving the flow and to facilitate industrial routine.

Keywords: Microparticles, Eudragit, spray drying, high performance liquid chromatography, release profile, biochemical parameters, flow properties.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: ETAPAS DO CICLO DE REPLICAÇÃO DO HIV E ALVOS DOS ANTIRRETROVIRAIS	23
FIGURA 2: ESTRUTURA DO ANTIRRETROVIRAL EFV	25
FIGURA 3: MODELOS DE ESTRUTURAS DAS MICROPARTÍCULAS	28
FIGURA 4: ESTRUTURA QUÍMICA GENÉRICA DOS EUDRAGIT® L100 E S100	32
FIGURA 5: DESENHO EXPERIMENTAL DAS ETAPAS REALIZADAS.....	38
FIGURA 6: CROMATOGRAMAS DO PADRÃO EFV E DAS MICROPARTÍCULAS OBTIDOS POR HPLC	50
FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CURVA ANALÍTICA MÉDIA PARA A DETERMINAÇÃO DO EFV OBTIDA POR HPLC ($\lambda = 252 \text{ nm}$) EM METANOL 87%....	51
FIGURA 8: ELETROMICROGRAFIA FEG-SEM DO FÁRMACO PURO E POLÍMEROS	55
FIGURA 9: ELETROMICROGRAFIA FEG-SEM DAS MICROPARTÍCULAS COM E SEM FÁRMACO OBTIDAS EM AUMENTO DE 3000X.....	57
FIGURA 10: ESPECTRO FTIR DO EFV	58
FIGURA 11: ESPECTRO FTIR DO EUDRAGIT® L100.....	59
FIGURA 12: ESPECTRO FTIR DO EUDRAGIT® S100	60
FIGURA 13: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF1, M1 E M1SF	61
FIGURA 14: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF1, M1 E M1SF (AUMENTO DE 3000 A 1500 cm^{-1}).....	61
FIGURA 15: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF1, M1 E M1SF (AUMENTO DE 1250 A 500 cm^{-1}).....	61
FIGURA 16: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF2, M2 E M2SF	62
FIGURA 17: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF2, M2 E M2SF (AUMENTO DE 3000 A 1500 cm^{-1}).....	62
FIGURA 18: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF2, M2 E M2SF (AUMENTO DE 1250 A 500 cm^{-1}).....	62
FIGURA 19: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF3, M3 E M3SF	63
FIGURA 20: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF3, M3 E M3SF (AUMENTO DE 3000 A 1500 cm^{-1}).....	63
FIGURA 21: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF3, M3 E M3SF (AUMENTO DE 1250 A 500 cm^{-1}).....	63
FIGURA 22: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF4, M4 E M4SF	64
FIGURA 23: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF4, M4 E M4SF (AUMENTO DE 3000 A 1500 cm^{-1}).....	64
FIGURA 24: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF4, M4 E M4SF (AUMENTO DE 1250 A 500 cm^{-1}).....	64
FIGURA 25: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF5, M5 E M5SF	65
FIGURA 26: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF5, M5 E M5SF (AUMENTO DE 3000 A 1500 cm^{-1}).....	65

FIGURA 27: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF5, M5 E M5SF (AUMENTO DE 1250 A 500 cm^{-1}).....	65
FIGURA 28: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF6, M6 E M6SF	66
FIGURA 29: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF6, M6 E M6SF (AUMENTO DE 3000 A 1500 cm^{-1}).....	66
FIGURA 30: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF6, M6 E M6SF (AUMENTO DE 1250 A 500 cm^{-1}).....	66
FIGURA 31: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF7, M7 E M7SF	67
FIGURA 32: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF7, M7 E M7SF (AUMENTO DE 3000 A 1500 cm^{-1}).....	67
FIGURA 33: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF7, M7 E M7SF (AUMENTO DE 1250 A 500 cm^{-1}).....	67
FIGURA 34: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF8, M8 E M8SF	68
FIGURA 35: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF8, M8 E M8SF (AUMENTO DE 3000 A 1500 cm^{-1}).....	68
FIGURA 36: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF8, M8 E M8SF (AUMENTO DE 1250 A 500 cm^{-1}).....	68
FIGURA 37: DIFRATOGRAMAS DO FÁRMACO PURO E DOS POLÍMEROS	69
FIGURA 38: DIFRATOGRAMAS DAS MISTURAS FÍSICAS.....	70
FIGURA 39: DIFRATOGRAMAS DAS MICROPARTÍCULAS SEM FÁRMACO.....	70
FIGURA 40: DIFRATOGRAMAS DAS MICROPARTÍCULAS COM FÁRMACO.....	71
FIGURA 41: CURVAS DSC PARA O FÁRMACO E OS POLÍMEROS.....	72
FIGURA 42: CURVAS DSC PARA AS MISTURAS FÍSICAS	72
FIGURA 43: CURVAS DSC PARA AS MICROPARTÍCULAS.....	73
FIGURA 44: CURVAS DSC PARA AS MICROPARTÍCULAS SEM FÁRMACO.....	73
FIGURA 45: CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS DO FÁRMACO E DOS POLÍMEROS	74
FIGURA 46: CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS DAS MISTURAS FÍSICAS.....	74
FIGURA 47: CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS DAS MICROPARTÍCULAS	75
FIGURA 48: CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS DAS MICROPARTÍCULAS SEM FÁRMACO	75
FIGURA 49: PERFIS DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO E DAS MICROPARTÍCULAS..	77
FIGURA 50: ELETROMICROGRAFIAS FEG-SEM DAS MICROPARTÍCULAS EM AUMENTO DE 20000X.....	79
FIGURA 51: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS AVALIADOS.....	84
FIGURA 52: ELETROMICROGRAFIAS FEG-SEM DO EFV – ESTABILIDADE (3000X)	87
FIGURA 53: ELETROMICROGRAFIAS FEG-SEM DA M1 – ESTABILIDADE (3000X)	88
FIGURA 54: ELETROMICROGRAFIAS FEG-SEM DA M2 – ESTABILIDADE (3000X)	88
FIGURA 55: ELETROMICROGRAFIAS FEG-SEM DA M3 – ESTABILIDADE (3000X)	89
FIGURA 56: ELETROMICROGRAFIAS FEG-SEM DA M4 – ESTABILIDADE (3000X)	89
FIGURA 57: CURVAS DSC E TG DAS AMOSTRAS SUBMETIDAS AO ESTUDO DE ESTABILIDADE	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CLASSES DE MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRAIS.....	24
TABELA 2: POLÍMEROS USADOS EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....	31
TABELA 3: VARIÁVEIS INDEPENDENTES E DEPENDENTES TESTADAS NO DELINEAMENTO FATORIAL 2 ³ PARA OTIMIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO EFV.....	39
TABELA 4: COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS.....	39
TABELA 5: PERCENTUAIS DE RENDIMENTO E UMIDADE DAS MICROPARTÍCULAS	48
TABELA 6: RESULTADOS DE ANOVA PARA LINEARIDADE DO MÉTODO.....	51
TABELA 7: RESUMO DOS PARÂMETROS DA CURVA ANALÍTICA DO EFV.....	52
TABELA 8: DADOS DA REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.....	52
TABELA 9: DOSEAMENTO DE FÁRMACO NAS MICROPARTÍCULAS.....	54
TABELA 10: TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA DAS MICROPARTÍCULAS	55
TABELA 11: PRINCIPAIS BANDAS ENCONTRADAS NO ESPECTRO FTIR DO EFV	59
TABELA 12: PERCENTUAIS DE VARIAÇÃO DE MASSA (Δm) DAS AMOSTRAS ANALISADAS.....	76
TABELA 13: DADOS DA DISSOLUÇÃO DO FÁRMACO E DAS MICROPARTÍCULAS	77
TABELA 14: RESULTADOS OBTIDOS PARA OS MODELOS MATEMÁTICOS TESTADOS (pH 1,5).....	80
TABELA 15: RESULTADOS OBTIDOS PARA OS MODELOS MATEMÁTICOS TESTADOS (pH 6,8).....	81
TABELA 16: RESULTADOS OBTIDOS PARA O MODELO KORSMEYER-PEPPAS ..	82
TABELA 17: RESULTADOS (MÉDIA $\pm$ DP) DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO TESTE PILOTO	83
TABELA 18: RESULTADOS (MÉDIA $\pm$ DP) DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	84
TABELA 19: DOSEAMENTO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$ DAS MICROPARTÍCULAS SUBMETIDAS AO TESTE DE ESTABILIDADE	86
TABELA 20: PERCENTUAIS DE VARIAÇÃO DE MASSA (Δm) DAS AMOSTRAS ANALISADAS DURANTE O ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	90
TABELA 21: ESCALA PARA AVALIAÇÃO DO FLUXO DE PÓS.....	92
TABELA 22: RESUMO DAS PROPRIEDADES DE FLUXO E DE COMPACTAÇÃO DO EFV E M3.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*)

ALT: alanina aminotransferase

AMC: Comitê de Métodos Analíticos (*Analytical Methods Committee*)

ANOVA: análise de variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST: aspartato aminotransferase

AUC: área sob a curva (*Area under the curve*)

C_{máx}: concentração plasmática máxima

COL: colesterol

DF: graus de liberdade

DNA: ácido desoxirribonucleico

DP: desvio padrão

DPR: desvio padrão relativo

DRX: Difração de Raios X (*X Ray Diffraction*)

DSC: Calorimetria Exploratória Diferencial (*Differential Scanning Calorimetry*)

ED: eficiência de dissolução

EE: eficiência de encapsulação

EFV: Efavirenz

EL100: Eudragit[®] L100

ES100: Eudragit[®] S100

FTIR: Espectroscopia de Infravermelho por Transformada em Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

GGT: gama glutamiltransferase

HAART: terapia antirretroviral altamente ativa (*High Activity Antiretroviral Therapy*)

HDL: lipoproteína de alta densidade (*High Density Lipoprotein*)

HIV: vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

HIV-1 / HIV-2: vírus da imunodeficiência humana tipo 1 / tipo 2

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

HPMC: hidroxipropilmetilcelulose

ICH: conselho internacional de harmonização dos requisitos técnicos para medicamentos para uso humano (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use*)

ITRNN: inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeo

KBr: brometo de potássio

LD: limites de detecção

LDL: lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein*)

LogP: coeficiente de partição

LQ: limites de quantificação

M1: micropartícula 1 – EFV 0,2 g, EL100 1,8 g, etanol:água (50:50, V/V)

M2: micropartícula 2 – EFV 0,4 g, EL100 1,6 g, etanol:água (50:50, V/V)

M3: micropartícula 3 – EFV 0,2 g, ES100 1,8 g, etanol:água (50:50, V/V)

M4: micropartícula 4 – EFV 0,4 g, ES100 1,6 g, etanol:água (50:50, V/V)

M5: micropartícula 5 – EFV 0,2 g, EL100 1,8 g, etanol:tampão fosfato pH 7,4 (50:50, V/V)

M6: micropartícula 6 – EFV 0,4 g, EL100 1,6g, etanol:tampão fosfato pH 7,4 (50:50, V/V)

M7: micropartícula 7 – EFV 0,2g, ES100 1,8 g, etanol:tampão fosfato pH 7,4 (50:50, V/V)

M8: micropartícula 8 – EFV 0,4 g, ES100 1,6 g, etanol:tampão fosfato pH 7,4 (50:50, V/V)

MF: mistura física

MS: média dos quadrados

MSC: critério de seleção do modelo (*Model Selection Criteria*)

n: número de repetições

P.F.: ponto de fusão

PCL: poli (ϵ -caprolactona)

pH: potencial hidrogeniônico

pKa: - Log da constante de acidez, K_a

PTFE: politetrafluoretileno

PVP: poli(vinilpirrolidona)

r: coeficiente de correlação

r^2 : coeficiente de determinação

R: rendimento

RNA: ácido ribonucleico

S: inclinação da curva

SEM-FEG: Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (*Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy*)

SF: sem fármaco

SS: soma dos quadrados

SUS: sistema único de saúde

TG: Termogravimetria (*Thermogravimetry*)

Tween[®] 80: Monooleato de sorbitano etoxilado (polissorbato 80)

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

min: minuto

®: marca registrada

g: grama

mg: miligrama (10^{-3} g)

µg: micrograma (10^{-6} g)

kg: quilograma (10^3 g)

L: litro

mL: mililitro (10^{-3} L)

µL: microlitro (10^{-6} L)

%: porcentagem

°: grau

°C: grau Celsius

cm²: centímetros (10^{-2} m) quadrados

mm: milímetro (10^{-3} m)

µm: micrômetro (10^{-6} m)

mm³: milímetro cúbico

kV: quilovolt

rpm: rotações por minuto

λ: comprimento de onda

Å: ångström (10^{-10} m)

mA: miliampere

ΔH_{fusão}: variação da entalpia de fusão

J: Joule, unidade de energia

↑endo: representação de pico endotérmico para cima

Δm: variação de massa

U.L⁻¹: Unidade internacional por litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 AIDS	22
3.1.1 Ciclo do HIV	22
3.1.2 Tratamento.....	24
3.1.3 HAART	24
3.2 EFAVIRENZ.....	25
3.3 MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS	27
3.3.1 Micropartículas Poliméricas e Diminuição de Efeitos Colaterais	28
3.3.2 Sistemas Poliméricos Contendo EFV	30
3.3.3 Polímeros	31
3.3.3.1 Sistemas pH-dependentes	31
3.3.4 <i>Spray Drying</i>	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 EQUIPAMENTOS	35
4.2 REAGENTES E SOLVENTES	36
4.2.1 Fármaco	36
4.2.2 Polímeros	36
4.2.3 Água Purificada	36
4.2.4 Solventes e Demais Reagentes	36
4.2.5 Demais Materiais	36
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL	37
4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	39
4.4.1 Obtenção das Micropartículas Poliméricas	39
4.4.1.1 Delineamento Fatorial	39
4.4.1.2 <i>Spray Drying</i>	40
4.4.1.3 Mistura Física	40
4.4.2 Rendimento das Micropartículas	40

4.4.3 Determinação do Teor de Umidade.....	40
4.4.4 Desenvolvimento e Validação do Método Analítico por HPLC	41
4.4.4.1 Equipamentos e Condições Cromatográficas	41
4.4.4.2 Preparo das Soluções Padrão	41
4.4.4.3 Desenvolvimento e Validação do Método para Quantificação de EFV	41
4.4.5 Quantificação do EFV Incorporado às Micropartículas	43
4.4.6 Caracterização dos Sistemas Poliméricos.....	43
4.4.6.1 Espectrometria de Difração a Laser.....	43
4.4.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (<i>Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy</i> – FEG-SEM)	43
4.4.6.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada em Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> – FTIR)	43
4.4.6.4 Difração de Raios X (<i>X Ray Diffraction</i> – DRX).....	44
4.4.6.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (<i>Differential Scanning Calorimetry</i> – DSC) ..	44
4.4.6.6 Termogravimetria (<i>Thermogravimetry</i> – TG)	44
4.4.7 Perfil de liberação <i>in vitro</i>	44
4.4.7.1 Modelos Matemáticos Para Avaliar a Cinética de Liberação.....	45
4.4.8 Avaliação <i>in vivo</i>	46
4.4.8.1 Teste Piloto.....	46
4.4.8.2 Avaliação Bioquímica	46
4.4.9 Estabilidade	47
4.4.10 Determinação das Propriedades de Fluxo e de Compactação	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	48
5.1.1 Rendimento e Teor de Umidade	48
5.1.2 Desenvolvimento e Validação do Método Analítico para Quantificação do EFV	49
5.1.3 Quantificação do EFV Incorporado às Micropartículas	53
5.1.4 Caracterização dos Sistemas Microparticulados	54
5.1.4.1 Espectrometria de Difração a Laser.....	54
5.1.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (FEG-SEM).....	55
5.1.4.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada em Fourier (FTIR).....	58
5.1.4.4 Difração de Raios X (DRX)	69
5.1.4.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	71
5.1.4.6 Termogravimetria (TG)	73

5.1.5 Perfil de Liberação <i>in vitro</i>	76
5.1.5.1 Modelos Matemáticos Para Avaliar a Cinética de Liberação.....	80
5.1.6 Avaliação <i>in vivo</i>	82
5.1.6.1 Teste Piloto	82
5.1.6.2 Avaliação Bioquímica	84
5.1.7 Estabilidade	85
5.1.8 Determinação das Propriedades de Fluxo e de Compactação	92
6 CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS	95
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL	102

1 INTRODUÇÃO

A síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome* – AIDS) causada pelo vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus* – HIV) foi responsável por cerca de 34 milhões de mortes no mundo, desde 1981, quando os primeiros casos foram registrados (WHO, 2015). Segundo o Boletim Epidemiológico HIV-AIDS de 2015 há aproximadamente 781 mil pessoas com a doença no Brasil (BRASIL, 2015).

O vírus afeta o sistema imunológico, principalmente os linfócitos T CD4⁺, que são importantes células de defesa do organismo, necessários para sua replicação e liberação de novos vírus. Com isso, há o rompimento da célula (chamada de hospedeira), comprometendo a saúde do indivíduo, tornando-o mais vulnerável a outras doenças oportunistas (OJEWOLE et al., 2008).

Em 1996, no Brasil, com a distribuição no Sistema Único de Saúde (SUS), o coquetel tornou-se acessível à população. A terapia antirretroviral altamente ativa (*High Activity Antiretroviral Therapy* - HAART), onde três ou mais fármacos de classes diferentes são administrados simultaneamente, resultou em melhoria da expectativa e qualidade de vida para estes pacientes. Entretanto, essa estratégia resulta em vários efeitos colaterais, tais como fadiga, náuseas, vômitos, diarreia e lipodistrofia, que dificultam a adesão do paciente ao tratamento (BRITO et al., 2010; GEOCZE et al., 2010; GRANGEIRO et al., 2014; MAX; SHERER, 2000).

Dentre os medicamentos utilizados nesta terapia, o Efavirenz (EFV), é o fármaco de primeira escolha da classe dos inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeo (ITRNN). A dose terapêutica para adultos é de 600 mg, uma vez ao dia, ingeridos antes de dormir devido aos efeitos colaterais, como tontura e sensação de estado mental alterado (CHIAPPETTA et al., 2011; MARZOLINI et al., 2001).

De acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica, o EFV é um fármaco de classe II (STORPIRTIS et al., 2011), apresentando baixa solubilidade em água (cerca de 4 µg.mL⁻¹), o que resulta em uma biodisponibilidade oral limitada e errática (40-45%) (CHIAPPETTA et al., 2010). O seu manuseio e a prática industrial são dificultados devido à baixa densidade, alta afinidade e aderência a superfícies de diferentes materiais e elevada resistência ao escoamento, apresentados pelo EFV (ALVES, 2010; VIANA et. al. 2006).

O SUS disponibiliza ainda solução oral de EFV 30 mg.mL⁻¹ para uso pediátrico. Porém, devido a palatabilidade ruim apresenta baixa aceitação por parte dos pacientes. Além

disso, por conter fármaco puro, pode apresentar os mesmos problemas de biodisponibilidade e efeitos colaterais dos comprimidos de EFV (PUORRO, 2015).

Na área farmacêutica, os pós, seja para o uso direto ou para a obtenção de outras formas farmacêuticas, são de grande importância e sua produção em escala industrial envolve algumas operações como mistura, transporte pneumático e alimentação por funis. Logo, as propriedades de fluxo dos materiais podem influenciar na eficiência do processo. Nesse sentido, a associação do fármaco com um polímero pode melhorar as propriedades de fluxo, facilitando seu manuseio e diminuindo perdas durante o processo industrial, além de melhorar a palatabilidade do fármaco, aumentando a adesão ao tratamento (GARCIA; PEREIRA; DIAS, 2012).

Os sistemas poliméricos de liberação de fármacos consistem em partículas de tamanho uniforme e reduzido, com considerável aumento da superfície de contato, propiciando dissolução e absorção moduladas, determinadas pelas características dos carreadores, geralmente polímeros hidrofílicos (BIKIARIS et al., 2005; SATHIGARI et al., 2009).

Dessa forma, a incorporação do EFV em sistemas de liberação microparticulados é uma estratégia promissora para o tratamento da AIDS. A veiculação do EFV nesses sistemas pode, com a melhoria do perfil de dissolução, levar a diminuição da dosagem e, conseqüentemente, diminuição dos efeitos colaterais, com manutenção dos efeitos terapêuticos, além de proporcionar um decréscimo do custo total do tratamento (DIMER et al., 2014; PATEL et al., 2013; SAKS; GARDNER, 1997).

Os polímeros sintéticos são materiais bastante versáteis, apresentando inúmeras aplicações, inclusive no setor farmacêutico, na produção de medicamentos e cosméticos (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

Os copolímeros derivados do ácido metacrílico e metilmetacrílico, comercializados como Eudragit[®], permitem a liberação seletiva do fármaco de acordo com a mudança de pH. Entre os diferentes tipos comercializados, o Eudragit[®] L100 (EL100) e o Eudragit[®] S100 (ES100) são polímeros entéricos pH-dependentes e solúveis a partir de pH 6,0 e 7,0, respectivamente. Devido a este comportamento, EL100 e ES100 são insolúveis na boca e no estômago, e começam a ser solúveis no duodeno (pH próximo a 6,0), proporcionando resistência gástrica às formulações. Tais polímeros são interessantes para a produção de micropartículas por *spray drying*, uma vez que são inertes (ARCE VELASQUEZ et al., 2014; CRUZ et al., 2010; ESPOSITO et al., 2002).

A técnica de secagem por aspersão, ou *spray drying*, é bastante utilizada em produtos farmacêuticos. Pode ser empregada tanto em fármacos e polímeros solúveis como insolúveis. É um processo confiável, reprodutível e possibilita uniformizar o tamanho das partículas (SOLLOHUB; CAL, 2009).

Assim, este trabalho teve por objetivo desenvolver e caracterizar sistemas poliméricos microparticulados contendo EFV, obtidos por *spray drying*, e avaliar *in vitro* e *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver e caracterizar sistemas poliméricos microparticulados contendo EFV, visando o aumento da disponibilidade e a redução de efeitos colaterais.

2.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver e obter micropartículas de EFV, a partir dos polímeros EL100 e ES100;
- Desenvolver e validar um método de cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) para quantificação do EFV;
- Quantificar o EFV incorporado às micropartículas pelo método HPLC;
- Determinar o tamanho e o potencial zeta das micropartículas;
- Caracterizar os sistemas poliméricos obtidos por meio de estudos morfológicos, espectroscópicos e térmicos;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro*, por meio de ensaios de dissolução;
- Investigar, por meio de modelos matemáticos, a cinética e o mecanismo de liberação do fármaco;
- Avaliar, *in vivo*, os efeitos nos parâmetros bioquímicos: colesterol total, lipoproteína de alta densidade (*High density lipoprotein* – HDL), lipoproteína de baixa densidade (*Low density lipoprotein* – LDL), triglicerídeos, Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT) e gama glutamiltransferase (GGT) de ratos Wistar, após tratamento com EFV puro e microparticulado;
- Avaliar a estabilidade do EFV nas micropartículas poliméricas;
- Determinar as propriedades de fluxo e de compactação do EFV puro e microparticulado;
- Analisar estatisticamente os resultados obtidos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 AIDS

A infecção pelo vírus HIV leva a uma das doenças infecciosas mais mortais, a AIDS. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, em torno de 34 milhões de pessoas morreram desde 1981, quando os primeiros casos foram registrados e cerca de 36,9 milhões vivem com o vírus (WHO, 2015). Segundo o Boletim Epidemiológico HIV-AIDS de 2015 há aproximadamente 781 mil pessoas com a doença no Brasil (BRASIL, 2015).

Nela, o sistema imunológico é prejudicado, deixando o paciente vulnerável a uma série de infecções oportunistas, desordens neurológicas e neoplasias malignas (BRITO et al., 2010). As manifestações neurológicas mais comuns, ligadas diretamente ao HIV, são o transtorno cognitivo e motor menor e a demência. As consequências relacionadas às doenças oportunistas do sistema nervoso central, como neurotoxoplasmose, meningite tuberculosa e neurocriptococose, também são importantes causas de danos cognitivos e psiquiátricos (CHRISTO, 2010). Portanto, o correto e precoce diagnóstico destas condições e a pronta intervenção terapêutica podem minimizar as complicações neuropsiquiátricas.

O HIV é um membro do gênero *Lentivirus* da família *Retroviridae* e, atualmente, abrange dois sorotipos identificados: HIV-1 e HIV-2 (BRITO et al., 2010). Ambos causam a doença em humanos, no entanto, HIV-2 é menos virulento e é mais prevalente na África, enquanto que a infecção por HIV-1 é global (OJEWOLE et al., 2008).

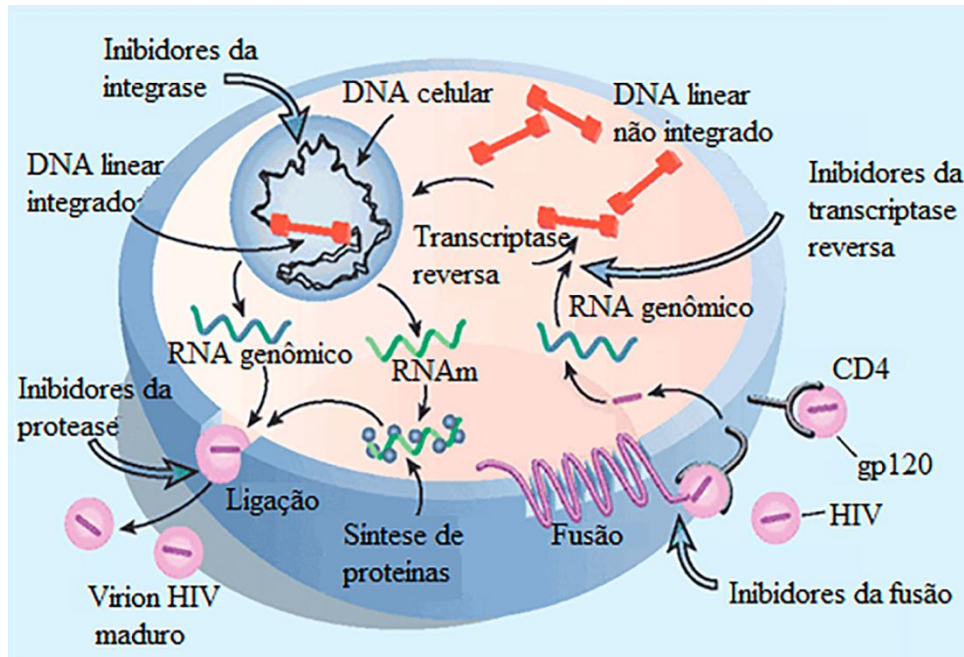
A infecção resulta principalmente da integração do genoma viral dentro da célula hospedeira com a finalidade de replicação celular. O alvo principal do vírus é o linfócito T CD4⁺, macrófagos e células dendríticas. Por esta razão, o quadro clínico da AIDS é caracterizado em função da contagem sanguínea desses linfócitos no indivíduo infectado pelo HIV (linfócitos T CD4⁺ inferior a 350 células/mm³) ou carga viral de HIV superior a 100.000 cópias.mL⁻¹. Com o desenvolvimento desse quadro clínico, é recomendada a terapia anti HIV específica (CHINEN; SHEARER, 2010).

O HIV é transmitido por fluidos corporais, incluindo soro, fluido seminal, secreções vaginais, líquido amniótico e leite materno (OJEWOLE et al., 2008).

3.1.1 Ciclo do HIV

O ciclo do HIV, em etapas, está representado na Figura 1.

FIGURA 1: ETAPAS DO CICLO DE REPLICAÇÃO DO HIV E ALVOS DOS ANTIRRETROVIRAIS



Fonte: Adaptado de: The Biology Project (2000)

A ligação do vírus se dá pela glicoproteína gp 120 (etapa 1). Com a ligação entre gp 120 e o receptor $CD4^+$, este último sofre uma alteração conformacional e a gp 120 liga-se também ao co-receptor (representado por algumas moléculas receptoras para quimiocinas, em especial CCR5 e CXCR4; etapa 2) (CUNICO; GOMES; VELLASCO JUNIOR, 2008).

O domínio fusogênico da glicoproteína gp 41 e do co-receptor CXCR4 promove a fusão e internalização do material genético viral e das enzimas necessárias à replicação. Após a internalização, o capsídeo, proteína viral que reveste o material genético, é perdida, dando início ao processo de replicação (etapa 3). A enzima transcriptase reversa usa a fita simples de ácido ribonucleico (RNA) viral como molde para produzir dupla fita de ácido desoxirribonucleico (DNA) viral (etapa 4). Após a transcrição, a dupla fita de DNA migra para o núcleo, onde é incorporada ao cromossoma da célula hospedeira pela ação da enzima integrase (etapa 5). A expressão dos genes virais resulta na transcrição do RNA a partir do DNA do vírus e na tradução das proteínas virais responsáveis por aumentar a replicação e inibir a imunidade inata (etapa 6). Em seguida, a enzima protease atua na fase final da montagem de um novo vírus. As proteínas são incorporadas às partículas virais, que são liberadas na forma ativa, prontas para infectar novas células hospedeiras (etapa 7) (CUNICO; GOMES; VELLASCO JUNIOR, 2008).

A compreensão do ciclo do HIV é importante porque as estratégias utilizadas para o tratamento têm como alvo várias etapas do ciclo.

3.1.2 Tratamento

Como os vírus compartilham muitos processos metabólicos da célula hospedeira, é difícil encontrar fármacos que sejam seletivos para o patógeno. Todavia, existem algumas enzimas que são específicas do vírus e que se tornaram potenciais alvos dos fármacos antirretrovirais. Eles são divididos em cinco classes, conforme a Tabela 1.

TABELA 1: CLASSES DE MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRAIS

CLASSE TERAPÊUTICA	MECANISMO DE AÇÃO	FÁRMACOS
Inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (INTR)	Atuam na enzima transcriptase reversa; são fosforilados por enzimas da célula hospedeira, incorporando-se à cadeia de DNA criada pelo vírus. Essa cadeia torna-se defeituosa e impede que o vírus se reproduza.	Abacavir, didanosina, estavudina, lamivudina, tenofovir e zidovudina.
Inibidores da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeos (ITRNN)	Não necessitam da fosforilação intracelular. Eles se ligam ao sítio alostérico da transcriptase reversa, bloqueando a ação da enzima e a multiplicação viral.	Efavirenz, nevirapina e etravirina
Inibidores da protease	Impedem a ação da enzima protease e, consequentemente, a produção de novos vírus.	Fosamprenavir, lopinavir, atazanavir e darunavir
Inibidores da fusão	São responsáveis por impedir a entrada do vírus na célula.	Enfuvirtida
Inibidores da integrase	Bloqueiam inserção do DNA viral ao DNA humano. Assim, inibem a replicação do vírus e sua capacidade de infectar novas células.	Raltegravir

Fonte: Adaptado de Brunton; Chabner; Knollmann (2012)

3.1.3 HAART

Em 1996, o Brasil iniciou a distribuição do coquetel para tratamento da AIDS no SUS. Como resultado dessa política de saúde, houve redução significativa da mortalidade e do número de internações por doenças oportunistas. Dessa forma, o governo brasileiro poupa com internações e investe na produção local de medicamentos, fato que torna viável o acesso ao tratamento antirretroviral (GEOCZE et al., 2010).

A HAART consiste na combinação de três ou mais fármacos de classes diferentes, que são administrados simultaneamente. Com o uso do esquema HAART, a replicação do

HIV é inibida, com redução da carga viral plasmática e prolongamento da sobrevida do paciente. O vírus permanece latente nas células T de memória, integrado no genoma do hospedeiro, constituindo uma fonte para reativação potencial se os fármacos forem interrompidos (MAX; SHERER, 2000).

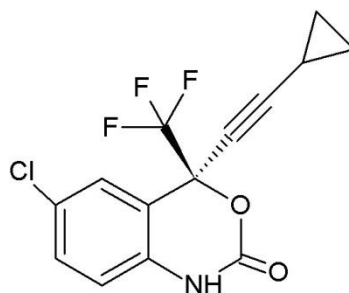
Todavia, o esquema é complexo e apresenta muitos efeitos adversos (fadiga, náuseas, vômitos, diarreia e lipodistrofia) que contribuem para a descontinuidade da medicação, resultando em aumento da carga viral no sangue e diminuição da contagem dos linfócitos T CD4⁺. Isso pode aumentar a resistência do HIV aos medicamentos, resultando em uma falha na terapia e infecções oportunistas (MAX; SHERER, 2000; GEOCZE et al., 2010).

Tais efeitos adversos podem ser atribuídos às subseqüentes altas doses, essenciais para se alcançar o efeito terapêutico, devido às concentrações inadequadas de fármaco no local da ação, e/ou à baixa biodisponibilidade de vários antirretrovirais, por apresentarem baixa solubilidade (BRITO et al., 2010; COSTA, 2011; OJEWOLE et al., 2008).

3.2 EFAVIRENZ

EFV, ou (4S)-6-cloro-4-(2-ciclopropiletil)-4-(trifluorometil)-2,4-dihidro-1H-3,1-benzoxan-2-ona (FIGURA 2), é o fármaco antirretroviral de primeira escolha da classe dos ITRNN, utilizado especificamente no tratamento de infecções por HIV-1 (CHIAPPETTA et al., 2011).

FIGURA 2: ESTRUTURA DO ANTIRRETROVIRAL EFV



Fonte: o autor

O fármaco é um sólido cristalino, branco, de massa molar 315,68 g.mol⁻¹ e faixa de fusão entre 139-141 °C, cuja fórmula molecular é C₁₄H₉ClF₃NO₂. Ácido fraco, com pKa 10,2, LogP 5,4 e características lipofílicas, apresentando baixa solubilidade intrínseca em água (4 µg.mL⁻¹) e baixa taxa de dissolução intrínseca (0,037 mg/cm²/min) (CHIAPPETTA et al., 2010; GALLICANO, 2000; MADHAVI et al., 2011). Em pH acima de 9,0; a molécula é ionizada devido a perda de um hidrogênio no nitrogênio do grupo carbamato, aumentando consideravelmente a sua solubilidade em água (MAURIN et al., 2002).

Apresenta baixa densidade, elevada resistência ao escoamento, alta afinidade e aderência a superfícies de diferentes materiais, o que dificulta seu manuseio e a prática industrial (ALVES, 2010; VIANA et. al. 2006).

O fármaco liga-se intensamente às proteínas plasmáticas (99,5 a 99,75%), atravessa a barreira hematoencefálica, atinge a concentração plasmática máxima em até cinco horas após administração e sua biodisponibilidade é aumentada com a ingestão de alimentos ricos em gordura (BEDOR, 2011; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). A concentração plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) após administração oral de 600 mg é de $12,9 \pm 1,17 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O tempo para atingir a $C_{m\acute{a}x}$ é de 3 a 5 horas, sendo o equilíbrio alcançado entre 6 e 10 dias (BEDOR, 2011; PORCHE, 2000).

Sua meia-vida de 52 a 76 horas possibilita uma única administração diária. A dose terapêutica para adultos é de 600 mg, que são tomados antes de dormir devido aos efeitos colaterais, como tontura, cefaleia, sonolência, amnésia, agitação, depressão e sensação de estado mental alterado (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; EMA, 2013; MARZOLINI et al., 2001).

Também foram relatados casos de erupção cutânea e alterações em exames laboratoriais. Foi observado aumento dos níveis séricos das enzimas hepáticas AST e ALT em 3% dos pacientes e GGT para valores superiores a cinco vezes o limite superior normal, em 4% dos pacientes. Também há relatos de elevações de 10-20% nos níveis de colesterol total em alguns pacientes e aumento dos triglicerídeos em até 49% (EMA, 2013).

De acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica, o EFV é um fármaco de classe II, apresentando baixa solubilidade em água, o que resulta em uma biodisponibilidade oral limitada e errática (40-45%) (CHIAPPETTA et al., 2010; STORPIRTIS et al., 2011).

Sendo assim, é necessária uma dose elevada para que sua concentração sanguínea alcance os níveis terapêuticos, propiciando, dessa forma, aumento dos efeitos colaterais e da toxicidade, que, ocasionalmente, pode diminuir a adesão do paciente ao tratamento (GOMES et al., 2015b; KAWABATA et al., 2011).

Sua palatabilidade ruim também pode contribuir para a descontinuação da terapia, principalmente por pacientes pediátricos que fazem uso do fármaco em forma de suspensão (PUORRO, 2015).

Portanto, melhorar a solubilidade do EFV é essencial para que sua biodisponibilidade seja adequada. Com isso, os sistemas poliméricos de liberação de fármacos tornaram-se uma alternativa, pois, consistem em partículas de tamanho uniforme e reduzido, com considerável aumento da superfície de contato, propiciando dissolução e absorção moduladas,

determinadas pelas características dos carreadores, geralmente polímeros hidrofílicos, (BIKIARIS et al., 2005; SATHIGARI et al., 2009).

A veiculação do EFV nesses sistemas de liberação microparticulados pode, com a melhoria do perfil de dissolução, levar a diminuição da dosagem e, conseqüentemente, diminuição dos efeitos colaterais, com manutenção dos efeitos terapêuticos. A associação com um polímero pode, ainda, melhorar as propriedades de fluxo do fármaco, facilitando seu manuseio e diminuindo perdas durante o processo industrial, além de melhorar a palatabilidade do fármaco, aumentando a adesão ao tratamento (DIMER et al., 2014; GARCIA; PEREIRA; DIAS, 2012; PATEL et al., 2013; SAKS; GARDNER, 1997).

Dessa forma, sistemas microparticulados contendo EFV são uma estratégia promissora para o tratamento da AIDS.

3.3 MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS

A busca pelo sucesso terapêutico com fármacos utilizados em longo prazo, com absorção limitada, toxicidade elevada ou metabolização rápida, levou os pesquisadores da área farmacêutica a estudarem novas alternativas de administração. A tecnologia de liberação modificada de fármacos representa uma das áreas mais promissoras da ciência. Nos últimos anos, diversos sistemas de administração de fármacos surgiram com a finalidade de modular a cinética de liberação e/ou liberar o ativo em sítios específicos (MAINARDES, 2007; RESTANI et al., 2010).

As formas farmacêuticas de liberação modificada objetivam o prolongamento da ação farmacológica das substâncias ativas, reduzindo o número de administrações diárias e minimizando as flutuações nas concentrações plasmáticas do fármaco para obter melhor eficácia terapêutica, aumentar a adesão do paciente ao tratamento e diminuir os efeitos colaterais (ANSEL; ALLEN JR; POPOVICH, 2013; AULTON, 2005; RESTANI et al., 2010). Estas possibilitam também obter a mesma eficácia clínica com o decréscimo dos custos do tratamento, sendo uma alternativa econômica quando comparada com formas farmacêuticas de liberação imediata (SAKS; GARDNER, 1997).

Neste contexto, as micropartículas poliméricas são particularmente interessantes, pois são capazes de promover a liberação modificada de fármacos a partir de uma ampla variedade de polímeros e por diversos métodos de obtenção. Indicadas para a administração oral, parenteral, nasal ou pulmonar, as micropartículas são capazes de promover uma liberação prolongada, retardada ou sustentada de um composto bioativo, enquanto que o

Geralmente, os efeitos secundários que acompanham a administração de sistemas micro e nanoestruturados são substancialmente reduzidos em relação ao fármaco livre; como por exemplo, a cardiotoxicidade de doxorrubicina que é reduzida quando um desses sistemas de liberação de medicamentos é utilizado, devido a redução dos picos de fármaco (ALLEN; CULLIS, 2004; COUVREUR et al., 1982).

Tendo em vista que a formação de micropartículas pode proteger o fármaco de possíveis degradações, melhorar sua solubilidade e/ou controlar sua liberação, contribuindo para a melhoria da biodisponibilidade e, portanto, redução da dose terapêutica e da toxicidade, consequentemente, uma menor quantidade de fármaco será necessária para se obter ação terapêutica. Embora o custo inicial do tratamento com esses sistemas seja mais elevado que o custo de produção das formas farmacêuticas convencionais, quando analisado o custo total da terapia levando em conta a quantidade de fármaco necessária, bem como o custo do tratamento de efeitos colaterais, pode haver um custo semelhante entre as terapias (ALLEN; CULLIS, 2004; PIMENTEL et al., 2007).

Buscando reduzir os efeitos colaterais da olanzapina, Dimer et al. (2014) avaliaram alterações nos parâmetros bioquímicos de ratos após tratamento com olanzapina livre e em nanocápsulas com núcleo lipídico, constituídas de poli (ϵ -caprolactona) (PCL) e monoestearato de sorbitano. O experimento foi realizado em ratos Wistar machos de 2 meses de idade, que foram divididos em três grupos: controle (tampão fosfato pH 6,2), olanzapina livre (solução de olanzapina em tampão fosfato pH 6,2; 1 mg.mL⁻¹) e olanzapina encapsulada (nanocápsulas de núcleo lipídico carregadas com olanzapina; 1 mg.mL⁻¹).

Durante 28 dias, os animais receberam o equivalente a 2,5 mg.kg⁻¹ de acordo com cada grupo, por via subcutânea. No último dia de tratamento, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e anestesiados com combinação de 100 mg.kg⁻¹ de quetamina e 10 mg.kg⁻¹ de xilazina, via intraperitoneal. Após, foi procedida a coleta de sangue para realização dos testes bioquímicos (glicose, colesterol total e frações, triglicerídeos). Foi observada redução significativa nos níveis de colesterol total em ratos tratados com o fármaco nanoencapsulado, quando comparados àqueles que receberam o fármaco livre. Os demais parâmetros não apresentaram diferença estatística (DIMER et al., 2014).

No entanto, até o presente momento, não há estudos avaliando as alterações nos parâmetros bioquímicos, com uso de micropartículas contendo EFV.

3.3.2 Sistemas Poliméricos Contendo EFV

Yang, Grey e Doney (2010) desenvolveram um novo modelo cinético para avaliar a recristalização do fármaco. Foram elaboradas dispersões sólidas de EFV amorfo em poli vinilpirrolidona (PVP – K-29/32) por *spray drying*. A recristalização foi avaliada pela energia de ativação sob diferentes condições de armazenamento (temperatura e umidade relativa) e comparada com o modelo desenvolvido.

Seremeta, Chiappetta e Sosnik (2013) desenvolveram a encapsulação de EFV em nanopartículas de PCL puro, Eudragit[®] RS100 puro e blendas de PCL/Eudragit[®] RS100, por dois métodos: nanoprecipitação e emulsão simples o/a com evaporação do solvente. As partículas obtidas pelos dois métodos apresentaram diâmetro entre 90 e 530 nm, com potencial zeta > +30 mV. Observou-se, *in vitro*, que a incorporação do Eudragit[®] RS100 na formulação reduziu o efeito *burst* e promoveu uma liberação prolongada do fármaco, quando comparadas com nanopartículas constituídas apenas de PCL. E, segundo o modelo de Korsmeyer-Peppas, a liberação ocorreu pela combinação de dois fenômenos: difusão e relaxamento das cadeias poliméricas.

Alves et al. (2014) obtiveram dispersões sólidas de EFV em PVP K-30 por malaxagem e evaporação do solvente e observaram que em proporções elevadas, o PVP K-30 diminuiu a liberação do fármaco.

Poucos estudos fizeram avaliação *in vivo*, a citar Tshweu et al. (2013) que compararam a farmacocinética oral e a concentração plasmática, em ratos, de quatro formulações com EFV, a 20 mg.kg⁻¹: nanopartículas de PCL e nanopartículas de PCL revestidas com quitosana, obtidas por emulsão múltipla/*spray drying*; micela polimérica de Pluronic F127 e nanopartícula de EFV puro. Obtiveram nanopartículas entre 200 e 250 nm de diâmetro, com 86 a 93% de eficiência de encapsulação, onde as nanopartículas mostraram um aumento da área sob a curva (*Area under the curve* – AUC) em relação à micela polimérica, sendo a nanopartícula não revestida a formulação que apresentou diferença estatística.

Patel et al. (2013) realizaram estudo farmacocinético (em coelhos) e perfusão intestinal (em ratos) de nanosuspensão liofilizada de EFV em PVP K-30. A absorção e a concentração plasmática de EFV foram maiores para a nanosuspensão liofilizada, quando comparada com EFV puro.

3.3.3 Polímeros

Os polímeros sintéticos representam uma das classes de materiais mais versáteis que existem, apresentando inúmeras aplicações, inclusive no setor farmacêutico, na produção de medicamentos e cosméticos (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

A Tabela 2 apresenta uma lista representativa de polímeros que têm sido investigados para aplicações em liberação modificada de fármaco.

TABELA 2: POLÍMEROS USADOS EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

	Classificação	Polímero
Naturais	Polímeros a base de proteínas	Colágeno, albumina, gelatina
	Polissacarídeos	Agarose, alginato, ácido hialurônico, dextrano, quitosana, ciclodextrina
Sintéticos	<i>Biodegradáveis:</i>	
	Poliéster	Poli (ácido láctico), poli (ácido glicólico), Poli (hidroxibutirato), poli (ϵ -caprolactona), Poli (ácido β -málico)
	Polianidrido	Poli (ácido sebácico), poli (ácido adípico), Poli (ácido terftálico)
	Poliamidas	Poli (imino carbonatos), poliaminoácidos
	Polímeros fosforosos	Polifosfatos, polifosfonatos, polifosfazenos
	Outros	Poli (cianoacrilatos), poliuretanos, Polidihidropiranos, poliacetais
	<i>Não biodegradáveis:</i>	
	Derivados de celulose	Carboximetil celulose, etilcelulose, celulose acetato, celulose acetato propionato, hidroxipropilmetilcelulose
	Silicones	Polidimetilsiloxano, sílica coloidal
	Polímeros Acrílicos	Polimetacrilatos, poli (metilmetacrilato), poli hidro (etilmetacrilato)
	Outros	Polivinilpirrolidona, polietilvinilacetato, poloxameros, poloxaminas

Fonte: Adaptado de Pillai; Panchagnula (2001)

3.3.3.1 Sistemas pH-dependentes

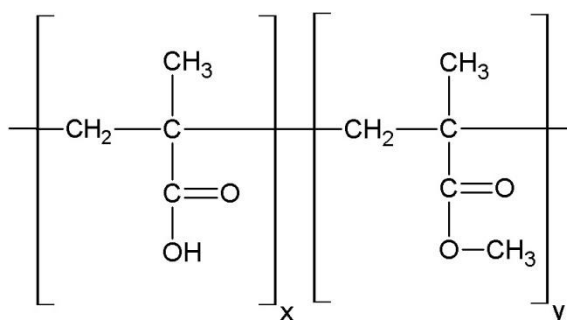
Os sistemas pH-dependentes exploram as variações de pH ao longo do trato gastrointestinal para liberação seletiva de fármacos. Baseiam-se, geralmente, no revestimento das formulações com polímeros insolúveis em pH ácido e solúveis em pH neutro ou ligeiramente alcalino. Estes polímeros devem ser capazes de prevenir a liberação do componente ativo no estômago e intestino delgado proximal e promovê-la no íleo terminal ou cólon proximal (FREIRE et al., 2006).

Os copolímeros derivados do ácido metacrílico e metilmetacrilato são polímeros acrílicos, comercializados como Eudragit[®], satisfazem estas condições e são bastante

utilizados na concepção de sistemas pH-dependentes. Além disso, os revestimentos constituídos por estes polímeros podem ser aplicados nas várias formas farmacêuticas sólidas e permite a utilização de diversos equipamentos convencionais utilizados pela indústria farmacêutica (FREIRE et al., 2006).

Dentre os vários tipos, os polímeros EL100 e ES100 (FIGURA 4) são bastante empregados. Estes são obtidos da copolimerização por adição do ácido metacrílico e metacrilato de metila. A diferença de solubilidade em meio aquoso destes copolímeros depende de relação existente entre os grupos carboxílicos livres e esterificados que é de 1:1 para o EL100 e de 1:2 para o ES100. Sistemas que se baseiam no revestimento com estes polímeros compostos têm sido explorados (FARAGO, 2007; FREIRE et al., 2006).

FIGURA 4: ESTRUTURA QUÍMICA GENÉRICA DOS EUDRAGIT® L 100 E S100



Fonte: o autor. Onde x representa os grupos carboxílicos livres e y, os esterificados.

Eudragit® L100

O EL100 é um polímero entérico pH-dependente, constituído por ácido metacrílico e metacrilato de metila, e é solúvel a partir de pH 6,0 (ESPOSITO et al., 2002). Devido a este comportamento, EL100 é insolúvel na boca e no estômago, e começa a ser solúvel no duodeno e jejuno (pH próximo a 6,0).

Eudragit® S100

O ES100 é um copolímero aniônico que apresenta solubilidade pH-dependente, sendo insolúvel em pH ácido, mas solúvel no meio intestinal em pH 7,0 (íleo e cólon) proporcionando resistência gástrica às formulações (ARCE VELASQUEZ et al., 2014; CRUZ et al., 2010; DEW et al., 1982).

O mecanismo de dissolução do polímero foi descrito por El Kamel et al. (2001) como um possível mecanismo combinado de dissolução com um processo de intumescimento.

A utilização de ES100 no âmbito da liberação específica de fármacos no cólon foi pela primeira vez referida por Dew et al. (1982), com cápsulas de sulfassalazina revestida com o polímero.

Estas propriedades são essenciais para formulações que permitirão a proteção de compostos bioativos no estômago e, posteriormente, liberá-los na porção intestinal para absorção.

Dessa forma, micropartículas de EL100 e ES100 podem ser utilizadas para a liberação de fármacos na parte inferior do duodeno. Tais polímeros são interessantes para a produção de micropartículas por *spray drying*, uma vez que são inertes (ESPOSITO et al., 2002).

3.3.4 *Spray Drying*

O processo de formação de micropartículas, para ser considerado ideal, deve apresentar como características: rapidez, simplicidade, reprodutibilidade, baixo custo, facilidade em transpor para a escala industrial, apresentar rendimento elevado e produtos com teor de fármaco ou eficiência de encapsulação adequados. A técnica de *spray drying*, ou secagem por aspersão, é importante e aplicada nas áreas farmacêuticas. Pode ser empregada tanto em fármacos e polímeros solúveis como insolúveis. A secagem por atomização, como também é conhecida, é um processo confiável, reprodutível e possibilita o controle do tamanho das partículas (SOLLOHUB; CAL, 2009).

O princípio da metodologia por *spray drying* é baseado na nebulização de uma solução ou suspensão de polímero e substância ativa, por meio de um bico atomizador em uma câmara dessecante. A nebulização forma várias gotículas, das quais o solvente é rapidamente evaporado por uma corrente de ar aquecido, dando origem às micropartículas sólidas. Essas micropartículas obtidas por *spray drying* são geralmente livres de solvente orgânico, em relação a outros métodos de preparação (ESPOSITO et al., 2002; SOSNIK; SEREMETA, 2015).

As variáveis do processo podem ser controladas visando à obtenção de rendimento e de teor de umidade adequados, diminuição da aderência das partículas na câmara de secagem, estabilidade química e tamanho de partícula.

Para aumentar o rendimento e diminuir o teor de umidade é bastante comum o uso de adjuvantes de secagem, como amido, dióxido de silício coloidal, lactose, maltodextrina, entre outros. O uso do adjuvante também diminui a aderência das partículas nas paredes do equipamento (OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; VASCONCELOS et al., 2005).

Outro fator que pode influenciar a aderência é a velocidade de alimentação (velocidade com que a formulação passa pelo sistema de secagem). Altas velocidades conduzem à diminuição da temperatura de saída e ao acúmulo de material na parede da câmara, visto que o líquido presente nas gotículas acaba não evaporando por completo (OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; SOSNIK; SEREMETA, 2015).

A distribuição e o tamanho de partícula estão relacionados ao tamanho da gotícula, e a adição de tensoativos leva a formação de gotículas menores, reduzindo o tamanho de partícula. Outras variáveis interferem no diâmetro, como por exemplo, a viscosidade da formulação que, quando elevada, propicia o aumento do tamanho das partículas. Além disso, a temperatura diminui a viscosidade da formulação e reduz a tensão superficial, contribuindo para formação de gotículas menores, uma secagem mais rápida e teores de umidade menores (OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; SOARES, 2002; SOSNIK; SEREMETA, 2015).

As partículas resultantes do processo de secagem por *spray drying* podem exibir um orifício na superfície, decorrente da vaporização do líquido contido no interior (OLIVEIRA; PETROVICK, 2009; SOARES, 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético (SOLAB, modelo SL-91, Piracicaba, Brasil);
- Analisador automático de Bioquímica Respons 920 (DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim, Alemanha);
- Analisador de umidade (SHIMADZU, modelo MOC63u, Quioto, Japão);
- Balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil);
- Coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) e pré-coluna (10 mm x 4 mm, 5 µm, GL SCIENCES INERTSIL[®] ODS3, Tóquio, Japão).
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (MERCK-HITACHI, modelo Lachrom D-7000, Tóquio, Japão);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Difratorômetro de raios X (RIGAKU, modelo Ultima IV, Quioto, Japão);
- Dissolutor de cubas (NOVA ÉTICA, modelo 299-6ATTS , Vargem Grande Paulista, Brasil);
- Espectrômetro de auto correlação a laser (MALVERN INSTRUMENTS, modelo Zetasizer Nano series ZS90, Worcestershire, Reino Unido);
- Espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR-Prestige-21, Quioto, Japão);
- Estufa (NOVA ÉTICA, modelo 410/D, Vargem Grande Paulista, Brasil);
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater, Quioto, Japão);
- Microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca);
- Potenciômetro digital de bancada (HANNA INSTRUMENTS, modelo HI 221, São Paulo, Brasil);
- Sistema de calorimetria exploratória diferencial STA 6000 (PERKIN ELMER, Waltham, MA, Estados Unidos);
- Sistema de secagem por aspersão, *Spray dryer* (LABMAQ, modelo MSD 0.5; Ribeirão Preto, Brasil);
- Sistema de ultrapurificação de água (Milli-Q[®], MILLIPORE, Bedford, MA, Estados Unidos);
- Ultracentrífuga refrigerada (HITACHI, modelo Himac CR21GII, Tóquio, Japão);
- Ultrassom, *Ultrasonic Cleaner* (ODONTOBRÁS, 1440DA, Ribeirão Preto, Brasil).

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

4.2.1 Fármaco

Efavirenz (EFV, 99%) foi doado por Farmanguinhos, Laboratório Farmacêutico Federal - FIOCRUZ (Rio de Janeiro, Brasil). O fármaco foi utilizado como padrão para o desenvolvimento do método analítico por HPLC e como ativo nas formulações.

4.2.2 Polímeros

Eudragit[®] L 100 e Eudragit[®] S 100 foram doados por Evonik Industries AG (Darmstadt, Alemanha).

4.2.3 Água Purificada

- Para análises em cromatógrafo líquido, determinação do tamanho de partícula e potencial zeta foi utilizada água ultrapura, obtida por sistema de ultrapurificação de água (Milli-Q[®], MILLIPORE, Bedford, MA, Estados Unidos).
- Para o desenvolvimento dos sistemas microparticulados e demais análises foi empregada água destilada em equipamento FANEM LTDA (modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil).

4.2.4 Solventes e Demais Reagentes

- Ácido clorídrico 37% (HCl, SYNTH, Diadema, Brasil);
- Brometo de potássio (KBr) grau espectroscópio (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- Etanol P.A. (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil);
- Fosfato de sódio dibásico PA heptahidratado (BIOTEC, Curitiba, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico PA hidratado (BIOTEC, Curitiba, Brasil);
- Hidróxido de sódio P.A. (NaOH, BIOTEC, Curitiba, Brasil);
- Kits para testes bioquímicos (colesterol, HDL, LDL, triglicerídeos, AST, ALT e GGT) (KOVARENT, São Gonçalo, Brasil).
- Metanol grau HPLC (ApplyChem Panreac Química, Barcelona, Espanha);
- Solução salina 0,9% (Sorimax FARMAX, Divinópolis, Brasil).

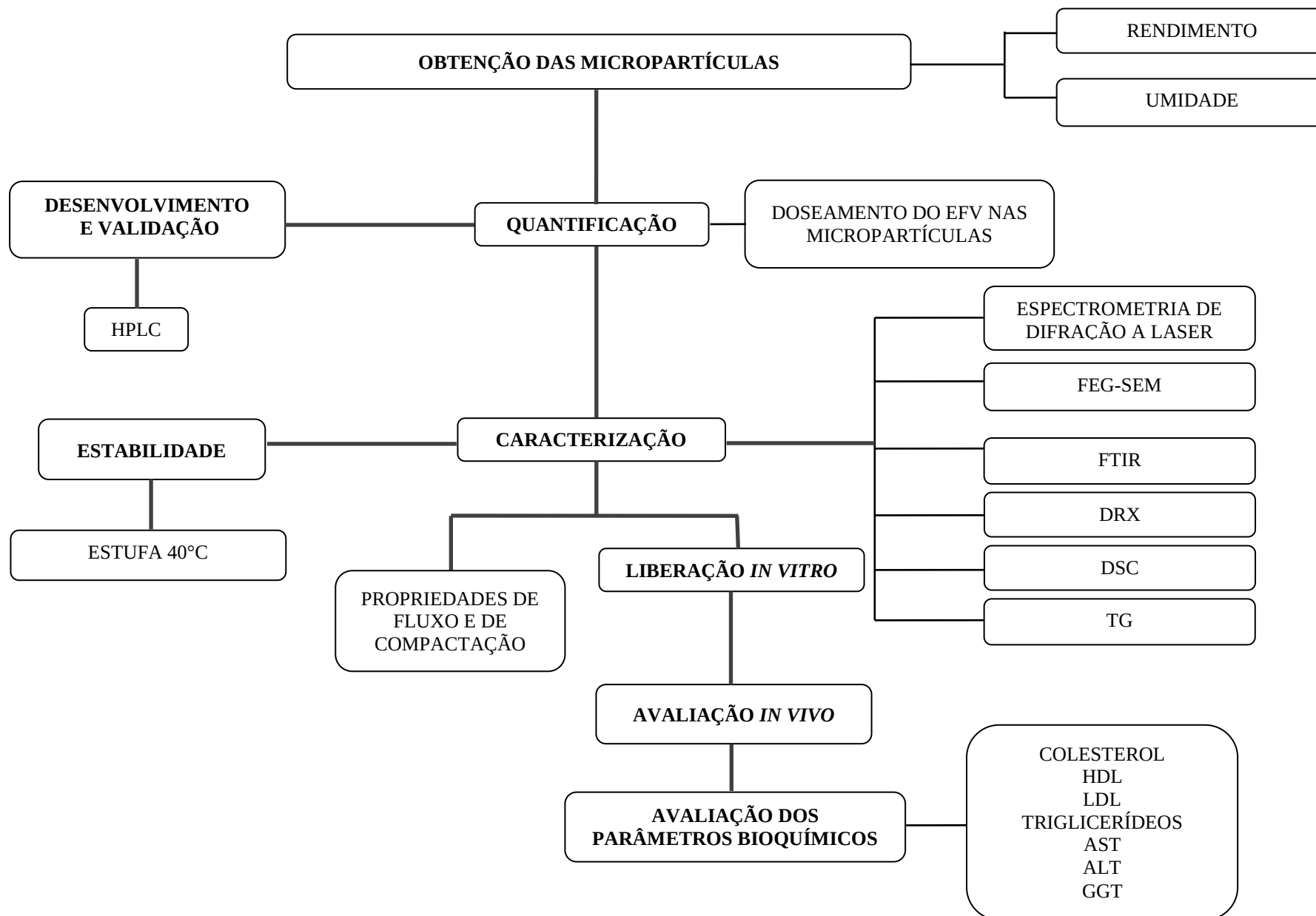
4.2.5 Demais Materiais

- Filtro para seringa PTFE (politetrafluoretileno) (0,45 µm x 25 mm, Cromafil[®], Xtra, MACHEREY-NAGEL GNBH & CO. KG, Düren, Alemanha);
- Seringa para HPLC de 100 µL (Microliter 710, HAMILTON, Bonaduz, Suíça).

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

A pesquisa consistiu em diferentes etapas sequenciais. A primeira correspondendo à obtenção das micropartículas poliméricas de EL100 e ES100, contendo EFV, por *spray drying*, determinadas após um planejamento fatorial. Em seguida, foi realizada a quantificação do fármaco nas micropartículas, empregando o método HPLC, previamente desenvolvido e validado. Posteriormente, as micropartículas obtidas foram caracterizadas por meio de métodos morfológicos, espectroscópicos e térmicos. Após, foi realizado o ensaio de dissolução *in vitro* para avaliar o perfil de liberação das micropartículas e selecionar a melhor formulação para realizar o estudo *in vivo*, o qual consistiu na avaliação dos parâmetros bioquímicos. Paralelamente, as micropartículas foram conduzidas ao estudo de estabilidade. E, por fim, as propriedades de fluxo e compactação foram determinadas para o fármaco e a formulação selecionada. As etapas realizadas no presente trabalho estão esquematizadas no fluxograma a seguir (FIGURA 5):

FIGURA 5: DESENHO EXPERIMENTAL DAS ETAPAS REALIZADAS



4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.4.1 Obtenção das Micropartículas Poliméricas

4.4.1.1 Delineamento Fatorial

Um desenho experimental do tipo fatorial 2^3 foi empregado visando otimização das formulações. As variáveis envolvidas na formulação estão sumarizadas na Tabela 3.

TABELA 3: VARIÁVEIS INDEPENDENTES E DEPENDENTES TESTADAS NO DELINEAMENTO FATORIAL 2^3 PARA OTIMIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO EFV

VARIÁVEIS INDEPENDENTES	NÍVEIS		VARIÁVEIS DEPENDENTES
	(-)	(+)	
TEOR DE FÁRMACO	10%	20%	Diâmetro médio das partículas
TIPO DE POLÍMERO	EL100	ES100	
TIPO DE SOLVENTE	Etanol:água (50:50, V/V)	Etanol:tampão fosfato pH 7,4 (50:50, V/V)	Doseamento do EFV nas micropartículas % de liberação

A mistura etanol:tampão fosfato pH 7,4 (50:50, V/V) foi testada para avaliar a influência da solubilização do polímero na formação da partícula (RAFFIN et al., 2007a).

Os fatores limitantes para a escolha da melhor formulação foram as variáveis dependentes. Ou seja, o menor diâmetro das partículas, a maior quantidade de fármaco incorporado e o perfil de liberação que proporcionou a liberação mais rápida, foram as respostas determinantes para a seleção ou exclusão das formulações.

Todas as combinações entre as variáveis acima foram testadas e estão representadas na Tabela 4.

TABELA 4: COMPOSIÇÃO DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

FORMULAÇÃO	FÁRMACO (%)	POLÍMERO	SOLVENTE (50:50, V/V)
M1	10 (0,2 g) (-)	EL100 (1,8 g) (-)	Etanol:água (-)
M2	20 (0,4 g) (+)	EL100 (1,6 g) (-)	Etanol:água (-)
M3	10 (0,2 g) (-)	ES100 (1,8 g) (+)	Etanol:água (-)
M4	20 (0,4 g) (+)	ES100 (1,6 g) (+)	Etanol:água (-)
M5	10 (0,2 g) (-)	EL100 (1,8 g) (-)	Etanol:tampão fosfato pH 7,4 (+)
M6	20 (0,4 g) (+)	EL100 (1,6 g) (-)	Etanol:tampão fosfato pH 7,4 (+)
M7	10 (0,2 g) (-)	ES100 (1,8 g) (+)	Etanol:tampão fosfato pH 7,4 (+)
M8	20 (0,4 g) (+)	ES100 (1,6 g) (+)	Etanol:tampão fosfato pH 7,4 (+)

Foram preparadas micropartículas sem fármaco (SF), nas mesmas proporções, para fins comparativos.

4.4.1.2 *Spray Drying*

O fármaco puro foi dissolvido em etanol (100 mL). Posteriormente, o polímero foi acrescentado e a solução foi mantida sob agitação magnética por 15 minutos (SOLAB, modelo SL-91, Piracicaba, Brasil). Em seguida, foi adicionada água ou tampão fosfato pH 7,4 (100 mL) e manteve-se a agitação por mais 15 minutos. A preparação foi então conduzida à secagem por aspersão, utilizando o *Spray Dryer* LABMAQ, modelo MSD 0.5 (Ribeirão Preto, Brasil), sob as seguintes condições: pressão 2,0 bar, fluxo 0,20 L.hora⁻¹, 60 °C.

Todas as formulações foram obtidas em triplicata e os produtos foram armazenados à temperatura ambiente, em recipientes hermeticamente fechados, ao abrigo da luz. As condições estabelecidas (tempo de agitação, pressão, fluxo e temperatura) foram mantidas constantes para minimizar as flutuações.

4.4.1.3 Mistura Física

Com o propósito de permitir uma análise comparativa, as misturas físicas (MF) com o fármaco e o polímero foram elaboradas, nas mesmas proporções. Ambos foram pesados e misturados com auxílio de uma espátula, resultando em uma mistura simples e homogênea.

4.4.2 Rendimento das Micropartículas

O rendimento (R) das formulações foi calculado pela razão entre a massa obtida após a preparação, e a soma das massas utilizadas do polímero e do fármaco, conforme apresentado na Equação 1.

$$R = \frac{\text{massa obtida de micropartícula}}{\text{massa inicial (polímero + efavirenz)}} \times 100 \quad (\text{EQUAÇÃO 1})$$

4.4.3 Determinação do Teor de Umidade

O conteúdo de água presente nas formulações foi determinado por analisador de umidade (SHIMADZU, modelo MOC63u, Quioto, Japão), previamente calibrado. Para cada amostra, de aproximadamente 0,050 g foi colocada em um prato de alumínio e mantida em aquecimento a 105 °C, até peso constante, resultando no teor de umidade expresso em porcentagem. Os ensaios com as micropartículas foram realizados, em triplicata, logo após obtenção das mesmas.

4.4.4 Desenvolvimento e Validação do Método Analítico por HPLC

4.4.4.1 Equipamentos e Condições Cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo MERCK-HITACHI (Lachrom D-7000; Tóquio, Japão), equipado com detector UV L-7400, bomba L-7100, degaseificador e injetor manual Rheodyne (volume de injeção de 20 μL), software Chromquest. As amostras foram injetadas com auxílio de seringa de 100 μL (Microliter 710, HAMILTON, Bonaduz, Suíça).

Foi utilizada coluna de fase reversa C18 GL Sciences Inertsil[®] ODS3 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm , Tóquio, Japão), acoplada a pré-coluna GL Sciences Inertsil[®] ODS3 (10 mm x 4 mm, 5 μm , Tóquio, Japão).

A eluição foi realizada à temperatura ambiente, em modo isocrático, sendo a fase móvel metanol:água (87:13, V/V), com fluxo de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O tempo de análise foi de 5,0 minutos e a detecção ocorreu 252 nm.

4.4.4.2 Preparo das Soluções Padrão

A solução padrão estoque de EFV foi preparada em metanol:água (87:13, V/V), 500,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Diluições foram realizadas com objetivo de obter soluções com concentração entre 8,0 e 50,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, onde a concentração de 20,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ponto médio da curva) foi definida como 100%. Antes de serem injetadas no cromatógrafo, as soluções foram filtradas em filtro de politetrafluoretileno (PTFE, Cromafil[®] Xtra, 0,45 μm x 22 mm, Macherey-Nagel GNBH & Co. KG, Düren, Alemanha).

4.4.4.3 Desenvolvimento e Validação do Método para Quantificação de EFV

Para avaliar a melhor condição para a corrida cromatográfica, foi realizado um experimento em gradiente exploratório, variando a concentração de metanol de 5 a 100% em 60 minutos. Após isso, as condições cromatográficas foram otimizadas para se obter melhor resolução do pico para EFV. Uma amostra contendo os polímeros foi injetada antes das análises para todas as amostras, como controle negativo.

A validação do método analítico por HPLC foi realizada segundo os critérios propostos pelo *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005) e pela Resolução 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003). Foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

A especificidade foi determinada por análise dos cromatogramas das micropartículas com fármaco em comparação àqueles obtidos com as formulações sem fármaco, com o objetivo de confirmar que nenhum componente da formulação interfere na quantificação do EFV.

A linearidade do método foi avaliada por regressão linear usando o método dos mínimos quadrados, pela média dos pontos de três curvas analíticas autênticas, nas concentrações de: 8,0; 14,0; 20,0; 26,0; 32,0 e 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A inclinação e outros parâmetros das curvas analíticas foram calculados por regressão linear e análise de variância (ANOVA). Avaliação de cada ponto foi realizada em triplicata.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados com base no desvio padrão (DP) e inclinação (S) das curvas analíticas, por meio das Equações 2 e 3.

$$LD = \frac{3,3 \times DP}{S} \quad (\text{EQUAÇÃO 2}) \qquad LQ = \frac{10 \times DP}{S} \quad (\text{EQUAÇÃO 3})$$

A precisão do método foi determinada seguindo o guia do ICH (2005). A precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária.

Para repetibilidade, três concentrações (17,0; 23,0 e 29,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram avaliadas em triplicata. A precisão intermediária foi avaliada por desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) de seis injeções a 17,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, analisadas intradia, interdía e com diferentes analistas.

A exatidão foi determinada por análises de recuperação, adicionando-se a quantidade de 3 mg de EFV à uma solução padrão de EFV (500,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Alíquota de 60 μL da solução padrão EFV (500,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou 800,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi diluída para 1,5 mL com fase móvel, em triplicata, resultando em amostras à 20,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou 32,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A exatidão (%) do método foi calculada, em triplicata, conforme Equação 4.

$$\%Exatidão = \frac{C_{32} - C_{20}}{32 - 20} \times 100 \quad (\text{EQUAÇÃO 4})$$

onde, C₃₂ e C₂₀ correspondem ao valor da concentração experimental obtida.

A robustez foi avaliada nas amostras a 20,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, por variações na taxa de fluxo para 0,995 e 1,005 mL.min^{-1} , e a concentração da fase móvel metanol:água para 86:14 (V/V) e 88:12 (V/V). Teste Tukey de Análise de variância (ANOVA) foi realizado para avaliar se as variações alteram o resultado das análises cromatográficas. Os resultados foram analisados

utilizando o DPR comparando com os valores obtidos para a condição padrão (taxa de fluxo de 1,000 mL.min⁻¹ e fase móvel metanol:água 87:13 (V/V)).

4.4.5 Quantificação do EFV Incorporado às Micropartículas

Para o doseamento do fármaco, as micropartículas foram pesadas (quantidade equivalente a 20 mg de EFV), colocadas em balões volumétricos com 8 mL de metanol:água (87:13, V/V) e mantidas sob agitação por 24 horas. Após, as amostras foram submetidas a banho de ultrassom por 30 minutos, os volumes foram completados para 10 mL e filtrados em PTFE (0,45 µm). Antes da corrida analítica, as amostras foram diluídas para se obter concentrações teóricas de 20,0 µg.mL⁻¹, considerando 100% de incorporação. O mesmo procedimento foi realizado com o fármaco puro para que pudesse ser observada uma possível degradação.

4.4.6 Caracterização dos Sistemas Poliméricos

4.4.6.1 Espectrometria de Difração a Laser

O tamanho de partícula e potencial zeta foram determinados por espalhamento de luz dinâmico, após o preparo de uma suspensão das micropartículas (1:500, V/V) em água ultrapura. As medidas, em triplicata, foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano series ZS90 (MALVERN INSTRUMENTS, Worcestershire, Reino Unido).

4.4.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (*Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy* – FEG-SEM)

A avaliação morfológica e de superfície das micropartículas foi realizada em microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). As amostras foram submetidas à metalização com ouro em metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU, Quioto, Japão). Para obtenção das eletromicrografias, foi empregada voltagem de aceleração de 15 kV e utilizado *software* específico (*Electron Optical Design*).

4.4.6.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada em Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* – FTIR)

As micropartículas poliméricas foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2%, m/m), no equipamento IR Prestige 21

(SHIMADZU, Quito, Japão), na faixa de 4000-400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 scan.min^{-1} . Os espectros obtidos foram avaliados frente aos espectros do fármaco puro, da mistura física e da formulação branco referente.

4.4.6.4 Difração de Raios X (*X Ray Diffraction* – DRX)

As micropartículas foram examinadas em difratômetro de raios X Shimadzu XRD-6000, *scan* de 2°.min⁻¹ e 2 θ de 5° a 80°, radiação K α de cobre ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), corrente de 40 mA e voltagem de 40 kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade.

4.4.6.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (*Differential Scanning Calorimetry* – DSC)

As amostras foram colocadas em célula calorimétrica de alumina. O instrumento STA 6000 (PERKIN ELMER, Waltham, MA, Estados Unidos) foi calibrado usando índio (In; P.F.= 156,6°C; $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54 \text{ J.g}^{-1}$) como padrão. As amostras foram aquecidas a uma taxa constante de 10 °C.min⁻¹, de 20 a 400 °C, sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min⁻¹) constante.

4.4.6.6 Termogravimetria (*Thermogravimetry* – TG)

A análise termogravimétrica foi realizada no mesmo equipamento, STA 6000 (PERKIN ELMER, Waltham, MA, Estados Unidos), utilizando célula calorimétrica de alumina, onde as amostras foram aquecidas a uma taxa constante de 10 °C.min⁻¹, de 20 a 600 °C, sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min⁻¹) constante.

4.4.7 Perfil de liberação *in vitro*

Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados para o EFV puro e para as micropartículas M1 a M4, com quantidade equivalente a 45 mg de fármaco. Os ensaios foram conduzidos em dissolutor de cubas (NOVA ÉTICA, modelo 299-6ATTS, Vargem Grande Paulista, Brasil), utilizando o aparato 2 (pá), temperatura em 37 °C, agitação de 100 rpm, por um período de 6 horas.

Os ensaios foram realizados empregando o método A proposto pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Inicialmente, foram utilizados 750 mL de água destilada pH 1,5, ajustado com solução de HCl 0,1 M (SYNTH, Diadema, Brasil), e, após duas horas, adicionou-se 250 mL de tampão fosfato pH 6,8, ajustando o pH com NaOH 2 M (BIOTEC, Curitiba, Brasil).

Amostras (1,0 mL) foram coletadas em intervalos de tempo pré-determinados, com reposição do meio de dissolução em igual volume. As leituras foram realizadas em 252 nm

utilizando o método HPLC validado. As análises foram realizadas em triplicata, mantendo-se as condições *sink*.

Os gráficos representando os perfis de liberação foram obtidos plotando-se a porcentagem corrigida de EFV liberada em função do tempo. A eficiência de dissolução (ED) foi calculada por meio da Equação 5 (KHAN, 1975; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

$$ED = \frac{AUC}{AUC_{total}} \times 100 \quad (\text{EQUAÇÃO 5})$$

Onde: ED é a eficiência de dissolução, AUC é a área sob a curva de dissolução em função do tempo e AUC_{total} é a área total do retângulo definido por 100% de dissolução e pelo tempo limite do ensaio.

Teste Tukey de ANOVA foi aplicado para comparar os perfis de liberação.

4.4.7.1 Modelos Matemáticos Para Avaliar a Cinética de Liberação

Com o objetivo de determinar a cinética de liberação das micropartículas, os dados da dissolução *in vitro* foram ajustados aos modelos matemáticos monoexponencial (EQUAÇÃO 6), biexponencial (EQUAÇÃO 7), ordem zero (EQUAÇÃO 8), Weibull (EQUAÇÃO 9) e Korsmeyer-Peppas (EQUAÇÃO 10), cujas equações são descritas abaixo:

$$\text{Monoexponencial: } \frac{Q_t}{Q_\infty} = 1 - [e^{-kt}] \quad (\text{EQUAÇÃO 6})$$

$$\text{Biexponencial: } \frac{Q_t}{Q_\infty} = 1 - [Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}] \quad (\text{EQUAÇÃO 7})$$

$$\text{Ordem zero: } Q_t = kt \quad (\text{EQUAÇÃO 8})$$

$$\text{Weibull: } \frac{Q_t}{Q_\infty} = 1 - [e^{-\left(\frac{t}{T_d}\right)^b}] \quad (\text{EQUAÇÃO 9})$$

$$\text{Korsmeyer-Peppas: } \frac{Q_t}{Q_\infty} = at^n \quad (\text{EQUAÇÃO 10})$$

Onde: Q_t é a quantidade de fármaco liberado no tempo t ; Q_∞ é a quantidade inicial de fármaco; k , α e β são as constantes cinéticas de liberação; A e B são as frações do fármaco que contribuíram para as fases da função exponencial (*burst* e sustentada, respectivamente); a é a constante que incorpora as características estruturais e geométricas do transportador; n é o expoente de liberação, indicativo do mecanismo de liberação do fármaco (ARCE VELASQUEZ et al., 2014; CRUZ et al., 2010).

A modelagem matemática foi realizada utilizando o software *Scientist*, versão 2.0 (MICROMATH®, St. Louis, Estados Unidos). A seleção do modelo foi baseada no melhor

coeficiente de correlação (r) e critério de seleção do modelo (*Model Seletion Criteria*, MSC), ambos fornecidos pelo *software*.

4.4.8 Avaliação *in vivo*

A realização do estudo *in vivo* foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, sob o processo 6955/2015.

O procedimento total utilizou 60 ratos machos Wistar, alojados em gaiolas de plástico, com acesso à água e ração *ad libitum*, com ciclo claro/escuro de 12 horas.

A micropartícula que, *in vitro*, liberou o fármaco mais rapidamente foi selecionada para a realização deste teste (M3).

O experimento foi dividido em duas etapas: teste piloto e avaliação bioquímica.

4.4.8.1 Teste Piloto

Em um primeiro momento, foi realizado um teste piloto para determinar a concentração de fármaco ideal e o tempo de duração do tratamento que mostrasse alteração nos parâmetros bioquímicos. Os animais foram divididos em grupos: controle (solução salina); EFV 20 mg.kg⁻¹; EFV 100 mg.kg⁻¹; EFV 200 mg.kg⁻¹. Os grupos tratados com fármaco foram subdivididos por período de tratamento em 7 e 14 dias. Cada grupo foi composto por 3 ratos, num total de 21 ratos e 7 grupos.

4.4.8.2 Avaliação Bioquímica

Após a avaliação dos resultados do teste piloto, foi selecionada a menor concentração de EFV e o menor tempo de tratamento que fossem capazes de alterar os exames bioquímicos.

Dessa forma, os 39 animais restantes foram divididos em grupos: controle (solução salina; 9 ratos); micropartícula sem fármaco (9 ratos); EFV 100 mg.kg⁻¹ (9 ratos); micropartícula contendo EFV (M3, equivalente a EFV 100 mg.kg⁻¹, 12 ratos).

O tempo de tratamento selecionado, de acordo com o teste piloto, foi de 7 dias.

Os animais receberam o tratamento por gavagem durante um período pré-determinado e, após jejum de 12 horas, foram anestesiados com quetamina (75 mg.kg⁻¹) e xilazina (15 mg.kg⁻¹) por via intramuscular. O sangue foi coletado pela artéria carótida e as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos em ultracentrífuga refrigerada a 10 °C (HITACHI, modelo Himac CR21GII, Tóquio, Japão) para obtenção do plasma, que foi armazenado à -80 °C para análise posterior.

As dosagens plasmáticas de colesterol, HDL, LDL, triglicerídeos, AST, ALT e GGT foram realizadas utilizando kits para testes bioquímicos (KOVARENT, São Gonçalo, Brasil).

As análises foram realizadas em aparelho automatizado Respons 920 (DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim, Alemanha).

Os valores foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão relativo. Os dados foram avaliados estatisticamente com o programa GraphPad Prisma, versão 5.0 usando teste *t* de Student com nível de significância de 5%.

4.4.9 Estabilidade

Amostras do fármaco e das micropartículas de M1 a M4, em triplicata, foram conduzidos a um estudo de estabilidade acelerada, realizado em estufa (NOVA ÉTICA, modelo 410/D, Vargem Grande Paulista, Brasil) a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (BRASIL, 2012).

Foram avaliados o doseamento, a morfologia (FEG-SEM) e as análises térmicas (DSC e TG), nas mesmas condições descritas anteriormente, nos períodos 0, 30, 60, 90 e 180 dias.

Teste Tukey de ANOVA ($p > 0,05$) foi aplicado para avaliar se houve diferença estatística no doseamento de fármaco.

4.4.10 Determinação das Propriedades de Fluxo e de Compactação

Para esta análise, foi selecionada a micropartícula que, *in vitro*, liberou o fármaco mais rapidamente (M3). Visando a comparação das propriedades de fluxo e de compactação, fármaco puro e a micropartícula foram avaliados, em triplicata, quanto à densidade aparente, densidade compactada, Índice de compressibilidade e Fator de Hausner.

Amostras de EFV (1,5 g) e M3 (2 g) foram transferidas para provetas de 10 mL. O valor da densidade aparente foi obtido pela razão entre massa e volume ocupado sem compactação (volume aparente). A densidade compactada foi obtida pela razão entre massa e volume ocupado após 100 impactos a 10 mm de altura (volume compactado).

O fator de Hausner foi determinado por meio da razão entre as densidades compactada e aparente, apresentadas pelas amostras (USP, 2006).

O índice de compressibilidade ou índice de Carr foi calculado segundo a Equação 11 (USP, 2006):

$$\text{Índice de Carr} = \frac{(\text{densidade compactada} - \text{densidade aparente})}{\text{densidade compactada}} \times 100 \quad (\text{EQUAÇÃO 11})$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As micropartículas foram obtidas com sucesso por *spray drying* e apresentaram aspecto macroscópico de pó branco levemente amarelado.

5.1.1 Rendimento e Teor de Umidade

O teor de umidade do EFV, EL100 e ES100 foi, respectivamente, 0,57%, 3,20% e 3,53%.

O rendimento das micropartículas foi calculado pela Equação 1, em triplicata, e os resultados de rendimento e umidade estão apresentados na Tabela 5.

TABELA 5: PERCENTUAIS DE RENDIMENTO E UMIDADE DAS MICROPARTÍCULAS

Formulação	Rendimento (%)	Umidade (%)
	Média ± DP*; DPR**	Média ± DP*; DPR**
M1	45,77 ± 3,68; 8,04	3,56 ± 0,96; 0,27
M2	45,62 ± 3,36; 7,38	4,38 ± 0,33; 0,08
M3	56,59 ± 3,41; 6,02	1,98 ± 0,56; 0,28
M4	54,16 ± 4,97; 9,18	1,41 ± 0,20; 0,14
M5	51,51 ± 1,82; 3,53	3,85 ± 2,21; 0,57
M6	42,76 ± 1,05; 2,45	5,77 ± 0,83; 0,14
M7	63,21 ± 2,99; 4,73	3,74 ± 0,81; 0,22
M8	59,64 ± 1,13; 1,90	3,60 ± 0,28; 0,08

*DP: desvio padrão; ** DPR: desvio padrão relativo

Os rendimentos obtidos variaram entre 42,76 e 63,21%, sendo que as formulações com o polímero ES100 apresentaram rendimento superior às aquelas contendo EL100. Os resultados foram superiores aos encontrados por Raffin et al. (2007a), de 36% para micropartículas de pantoprazol, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e ES100, e por Cruz et al. (2010), 47%, para micropartículas de alendronato de sódio e ES100, ambos por *spray drying*. Tais valores foram adequados, tendo em vista a dificuldade de se obter rendimentos muito altos utilizando o *spray dryer*, onde quantidade significativa do material fica aderida às paredes do equipamento (HEGAZY; DEMIREL; YAZAN, 2002; SOSNIK; SEREMETA, 2015).

Buscando aumentar o rendimento por *spray drying*, Pohlmann et al. (2002) utilizaram dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem. No entanto, obtiveram rendimentos entre 60 e 80%, e percentuais de umidade entre $1,98 \pm 0,02$ e $3,38 \pm 0,72$ para nanopartículas de PCL contendo indometacina.

Os valores (%) de umidade obtidos foram próximos aos dos materiais de partida, variando entre $1,41 \pm 0,20$ e $5,77 \pm 0,83$, sendo mais baixos nas micropartículas contendo ES100.

5.1.2 Desenvolvimento e Validação do Método Analítico para Quantificação do EFV

Após a corrida em gradiente exploratório, foi definida a fase móvel metanol:água 87:13 (V/V) e o fluxo de $1,000 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ como sendo as condições padrão para o restante das análises. O tempo de corrida e o tempo de retenção foram 5,0 e 3,5 minutos, respectivamente, o que é adequado para rotina laboratorial, onde é imprescindível que as análises sejam simples e rápidas.

Especificidade é a habilidade de um método analítico diferenciar e quantificar o analito em presença de impurezas ou outros componentes na amostra (ICH, 2005).

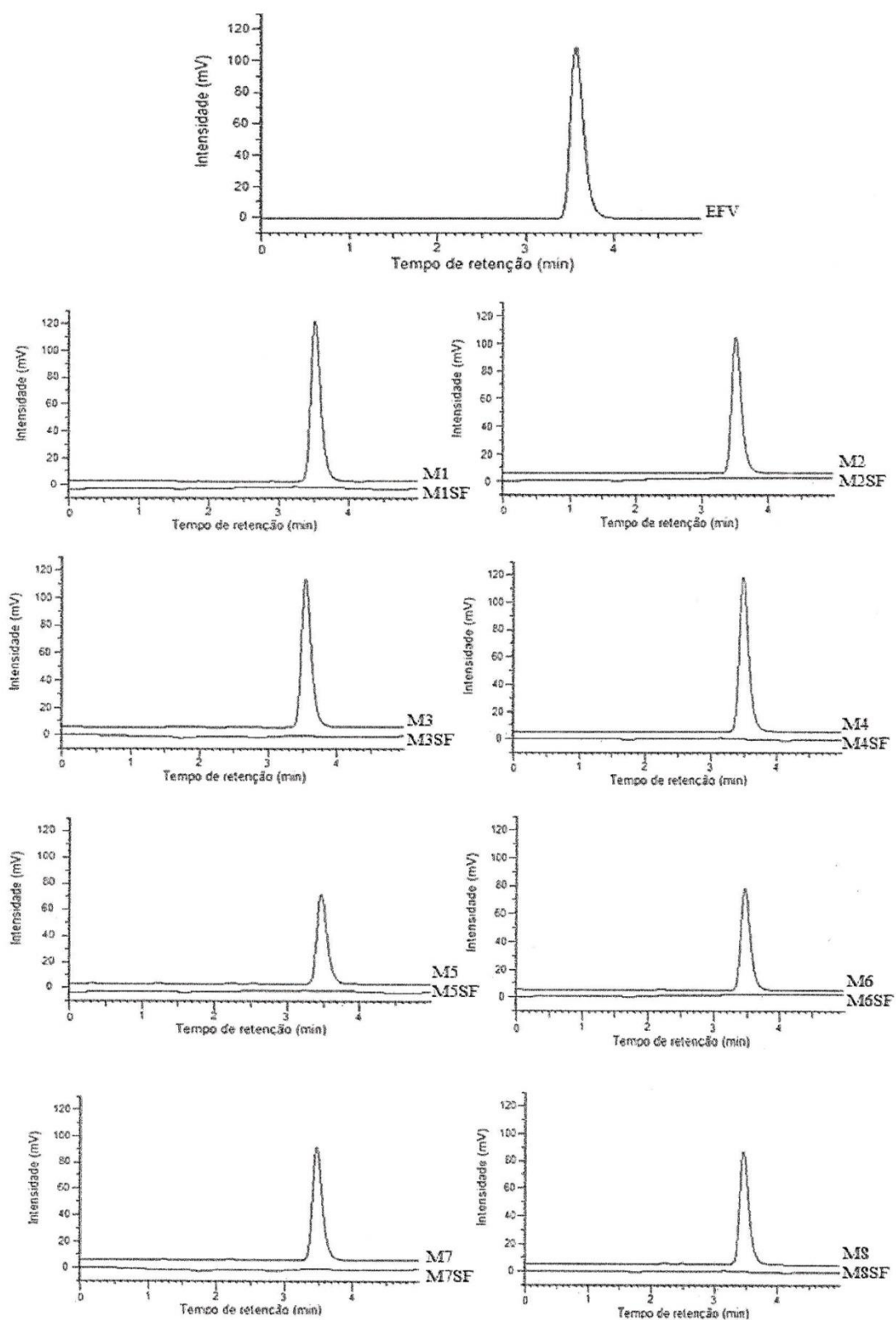
O primeiro cromatograma da Figura 6 mostra a especificidade do método para o EFV, frente a possíveis impurezas.

A especificidade em relação às micropartículas foi demonstrada por comparação dos cromatogramas das micropartículas com e sem fármaco (FIGURA 6). Os resultados mostram que não há interferência na quantificação e no tempo de retenção do EFV.

Sendo assim, é possível confirmar a especificidade do método proposto para a quantificação do EFV matéria prima e micropartículas com Eudragit®.

No entanto, houve redução da intensidade e da área do pico para as micropartículas de M5 a M8, refletindo em menores teores de fármaco, possivelmente devido a alguma interação entre fármaco, polímero e sais do tampão ou ineficiência do método empregado.

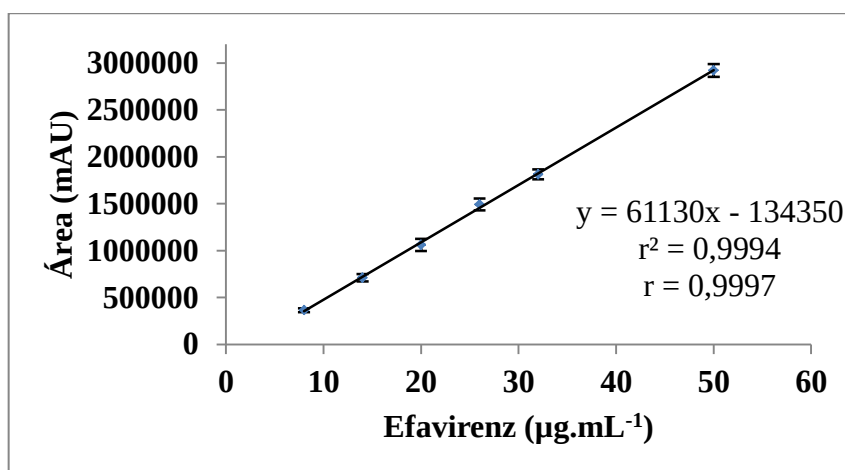
FIGURA 6: CROMATOGRAMAS DO PADRÃO EFV E DAS MICROPARTÍCULAS OBTIDOS POR HPLC*



*Utilizando pré coluna e coluna C18, fase móvel metanol 87% e fluxo de 1,000 mL.min⁻¹.

A linearidade do método foi avaliada por meio de seis níveis de concentração: 8,0; 14,0; 20,0; 26,0; 32,0 e 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foi observada relação linear entre a área do pico e a concentração de EFV em uma faixa de concentração de 8,0 a 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A equação linear obtida para o método foi $y = 61130x - 134350$ ($n = 3$, $r = 0,9997$) (FIGURA 7).

FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CURVA ANALÍTICA MÉDIA PARA A DETERMINAÇÃO DO EFV OBTIDA POR HPLC ($\lambda = 252 \text{ nm}$) EM METANOL 87%



O DPR da inclinação foi de 3%, estando de acordo com o limite proposto pelo ICH e pela ANVISA de até 5%. O valor negativo de b está dentro do intervalo de confiança de 95% da curva analítica, pelo teste ANOVA.

De acordo com o *Analytical Methods Committee* (AMC), um valor de coeficiente de correlação próximo a 1 não é necessariamente o resultado de relação linear, e por isso, deve ser aplicado o teste de falta de ajuste (*lack of fit*). Este teste avalia a variação dos valores residuais (GOMES et al., 2015a; HADAD; EMARA; MAHMOUD, 2009). O teste ANOVA para a linearidade está apresentado na Tabela 6. Para falta de ajuste, o valor de F foi menor que o valor de F tabelado, para o intervalo de 95% de confiança ($\alpha = 0,05$), portanto, a regressão linear não apresentou falta de ajuste (KLEIN; LONGHINI; DE MELLO, 2012).

TABELA 6: RESULTADOS DE ANOVA PARA LINEARIDADE DO MÉTODO

	SS	DF	MS	F	Ftab
Modelo	1,2443 x 10 ¹³	1	1,2443 x 10 ¹³	4749,9190	4,4940
Resíduo	4,1916 x 10 ¹⁰	16	2,6198 x 10 ⁹	Linear	3,2590
Falta de ajuste	7,3023 x 10 ⁹	4	1,8255 x 10 ¹⁰		
Erro puro	3,4614 x 10 ¹⁰	12	2,8845 x 10 ⁹	Não há falta de ajuste	

Onde: SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: média dos quadrados, F : valor F do teste; F_{tab} : valor do F tabelado

A menor concentração onde o EFV pode ser detectado (LD) e quantificado (LQ) com aceitável precisão e exatidão foi 0,099 e 0,30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A Tabela 7 resume os parâmetros da curva.

TABELA 7: RESUMO DOS PARÂMETROS DA CURVA ANALÍTICA DO EFV

Linearidade	
Faixa linear	8,0 – 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Limite de Detecção	0,099 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Limite de Quantificação	0,30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Dados de regressão	
N	3
Inclinação (α)	61130
Desvio Padrão da Inclinação	1828,027
Desvio Padrão Relativo da Inclinação (%)	2,99
Intercepto (b)	-134350
Coeficiente de correlação (r)	0,9997

*y = ax + b, onde x é a concentração do composto e y é a área sob a curva

A precisão de um método analítico descreve a proximidade das medidas individuais de uma substância quando o procedimento é aplicado repetidamente para múltiplas alíquotas (ICH, 2005). Repetibilidade expressa a precisão sob as mesmas condições de operação durante um curto intervalo de tempo. Foi avaliada a precisão intermediária, expressa como variação intradia, interdia e com diferentes analistas. O teste *t*-student avalia a existência de qualquer diferença entre os diferentes níveis de um fator. Até 5 % não há diferença significativa na área do pico e no tempo de retenção do EFV. O DPR para repetibilidade nas concentrações 17,0; 23,0 e 29,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram de 0,33%, 0,47% e 0,17%, respectivamente. Quanto a precisão intermediária, os valores de DPR foram de 0,62%, 0,73% e 1,05% para intradia, interdia e segundo analista, respectivamente. Os resultados são apresentados na Tabela 8, confirmando a precisão do método desenvolvido.

TABELA 8: DADOS DA REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

	Concentração Teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$, Média $\pm$ DP*)	DPR** (%)
Repetibilidade (n = 9)			
	17	16,95 $\pm$ 0,06	0,33
	23	23,05 $\pm$ 0,11	0,47
	29	29,11 $\pm$ 0,05	0,17
Precisão intermediária			
Intradia (n = 3)	17	17,12 $\pm$ 0,11	0,62
Interdia (n = 3)	17	17,22 $\pm$ 0,13	0,73
Diferentes analistas (n = 3)	17	16,99 $\pm$ 0,18	1,05
Média $\pm$ DP* (n = 9)	17	17,11 $\pm$ 0,16	0,92

*DP: desvio padrão; ** DPR: desvio padrão relativo

A exatidão do método por ensaios de recuperação foi determinada pela adição de quantidade exata de EFV a uma solução de concentração conhecida do fármaco. A % média de recuperação $\pm$ DP e DPR foram $100,08 \pm 0,62$ e 0,62%, respectivamente. Portanto, estes resultados indicam que o método proposto é considerado exato.

A robustez de um procedimento analítico é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado por pequenas e deliberadas variações dos parâmetros do método, fornecendo uma indicação da sua confiabilidade em condições normais de uso (ICH, 2005). Para a avaliação da robustez, o fluxo de $1,000 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e a fase móvel metanol:água 87:13 (V/V) foram consideradas condições padrão. O teste Tukey a um nível de significância de 5% mostrou que não houve diferença significativa na área do pico e o tempo de retenção do EFV quando a taxa de fluxo variou de $1,000 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ para $0,995 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (DPR = 0,96%) e para $1,005 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (DPR = 1,36%), e quando a concentração da fase móvel variou de 87:13 (V/V) para 86:14 (V/V) (DPR = 1,88%) e para 88:12 (V/V) (DPR = 0,78%). Portanto, o método provou ser robusto para o fármaco analisado, sob as condições avaliadas.

5.1.3 Quantificação do EFV Incorporado às Micropartículas

O fármaco puro mostrou-se estável frente ao procedimento realizado.

As formulações preparadas em etanol:água (50:50, V/V) (M1 a M4) apresentaram teor de fármaco superior a 90%, com baixos valores de desvio padrão e desvio padrão relativo para as análises em triplicata (TABELA 9). Outros trabalhos com EFV apresentaram eficiência de encapsulação superior a 80% (SEREMETA; CHIAPPETTA; SOSNIK, 2013; TSHWEU et al., 2013).

A mistura de solventes em pH 7,4 foi utilizada a fim de se avaliar a influência da solubilização dos polímeros durante o processo de formação das micropartículas, de forma semelhante realizada por Raffin et al. (2007a), que dissolveram o ES100 em solução de NaOH 0,05 M previamente à obtenção de micropartículas com pantoprazol.

Entretanto, as micropartículas preparadas em etanol:tampão fosfato pH 7,4 (50:50, V/V) (M5 a M8), não puderam ser devidamente quantificadas, apresentando teor de fármaco entre 60 e 80%, portanto, abaixo do valor aceitável (80-120%) (BRASIL, 2003). Sendo assim, as formulações de M5 a M8 foram descartadas de algumas análises posteriores (DSC, TG, dissolução *in vitro*, análise *in vivo* e estabilidade).

TABELA 9: TEOR DE FÁRMACO NAS MICROPARTÍCULAS

Micropartículas	Doseamento (% $\pm$ DP*)	DPR**
M1	104,25 $\pm$ 1,81	1,74
M2	90,34 $\pm$ 3,27	3,62
M3	99,65 $\pm$ 1,04	1,04
M4	94,01 $\pm$ 4,41	4,69
M5	68,38 $\pm$ 2,55	3,74
M6	67,38 $\pm$ 6,08	9,03
M7	74,91 $\pm$ 8,47	11,30
M8	75,90 $\pm$ 6,47	8,53

*DP: desvio padrão; ** DPR: desvio padrão relativo

5.1.4 Caracterização dos Sistemas Microparticulados

5.1.4.1 Espectrometria de Difração a Laser

O tamanho de partícula reduzido pode melhorar a solubilidade e favorecer a taxa de dissolução devido ao aumento da superfície de contato (KAWABATA et al., 2011).

As micropartículas apresentaram tamanhos variando entre 2,02 e 4,70 μm (TABELA 10) sendo menor nas formulações preparadas em etanol:tampão fosfato pH 7,4 (50:50, V/V), possivelmente pelo fato dos polímeros serem mais solúveis acima de pH 6,0 (ESPOSITO et al., 2002). Os diâmetros obtidos foram menores que os encontrados em outros estudos com micropartículas de ES100 por *spray drying* (CRUZ et al., 2010; ESPOSITO et al., 2002; RAFFIN et al., 2007a; RAFFIN et al., 2007b).

Considerando a possibilidade do uso das micropartículas em forma de suspensão, essas foram analisadas quanto ao potencial zeta, diferença de potencial entre a camada de íons próxima à superfície da partícula e a região eletroneutra da solução. Partículas com potencial zeta absoluto maior que 30 mV são consideradas estáveis (AULTON, 2005; FRANGE; GARCIA, 2009; LIBERMAN; RIEGER; BANKER, 1989; TSHWEU et al., 2013).

O SUS disponibiliza solução oral de EFV 30 mg.mL⁻¹ para uso pediátrico, porém, devido a palatabilidade ruim apresenta baixa aceitação por parte dos pacientes. Além disso, por conter fármaco puro, pode apresentar os mesmos problemas de biodisponibilidade e efeitos colaterais dos comprimidos de EFV (PUORRO, 2015).

Dessa forma, a incorporação de EFV às micropartículas pode melhorar a palatabilidade e reduzir os efeitos colaterais, melhorando a biodisponibilidade.

A Tabela 10 mostra que todas as micropartículas apresentaram potencial zeta, em módulo, superior a 40 mV, indicativo de boa estabilidade (FRANGE; GARCIA, 2009).

TABELA 10: TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA DAS MICROPARTÍCULAS

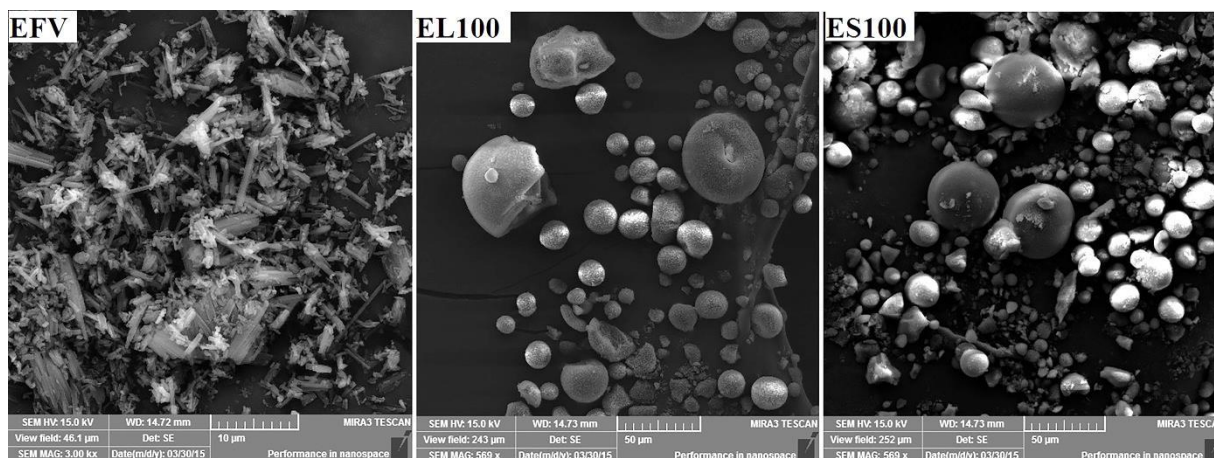
FORMULAÇÃO	TAMANHO (µm) MÉDIA ± DP*; DPR**	POTENCIAL ZETA (mV) MÉDIA ± DP*; DPR**
M1	3,99 ± 0,79; 19,84	-61,23 ± 2,58; 4,21
M2	4,08 ± 0,58; 14,32	-58,35 ± 2,33; 4,00
M3	4,70 ± 0,69; 14,70	-51,15 ± 0,92; 1,80
M4	4,68 ± 0,97; 20,84	-44,63 ± 4,95; 11,10
M5	2,02 ± 0,42; 20,95	-46,17 ± 1,14; 2,46
M6	2,24 ± 0,80; 35,53	-43,67 ± 3,40; 7,77
M7	3,93 ± 1,19; 30,27	-44,57 ± 3,04; 6,83
M8	2,76 ± 1,28; 46,58	-44,1 ± 1,47; 3,34

*DP: desvio padrão; ** DPR: desvio padrão relativo

5.1.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (FEG-SEM)

A eletromicrografia do fármaco confirma seu caráter cristalino, apresentando-se na forma de cristais em agulha, conforme encontrado por Madhusudhan et al. (2012) e Alves et al. (2014), enquanto que os polímeros apresentaram-se predominantemente na forma de esferas de tamanhos variados (FIGURA 8).

FIGURA 8: ELETROMICROGRAFAS FEG-SEM DO FÁRMACO PURO E POLÍMEROS



Eletromicrografias obtidas em aumento de 3000X para o EFV e 569X para os polímeros.

As micropartículas preparadas em etanol:água (50:50, V/V), (M1 a M4), apresentaram morfologia esférica, similar àquelas encontradas na literatura para micropartículas com ES100, por *spray drying* (CRUZ et al., 2010; ESPOSITO et al., 2002; RAFFIN et al., 2007a).

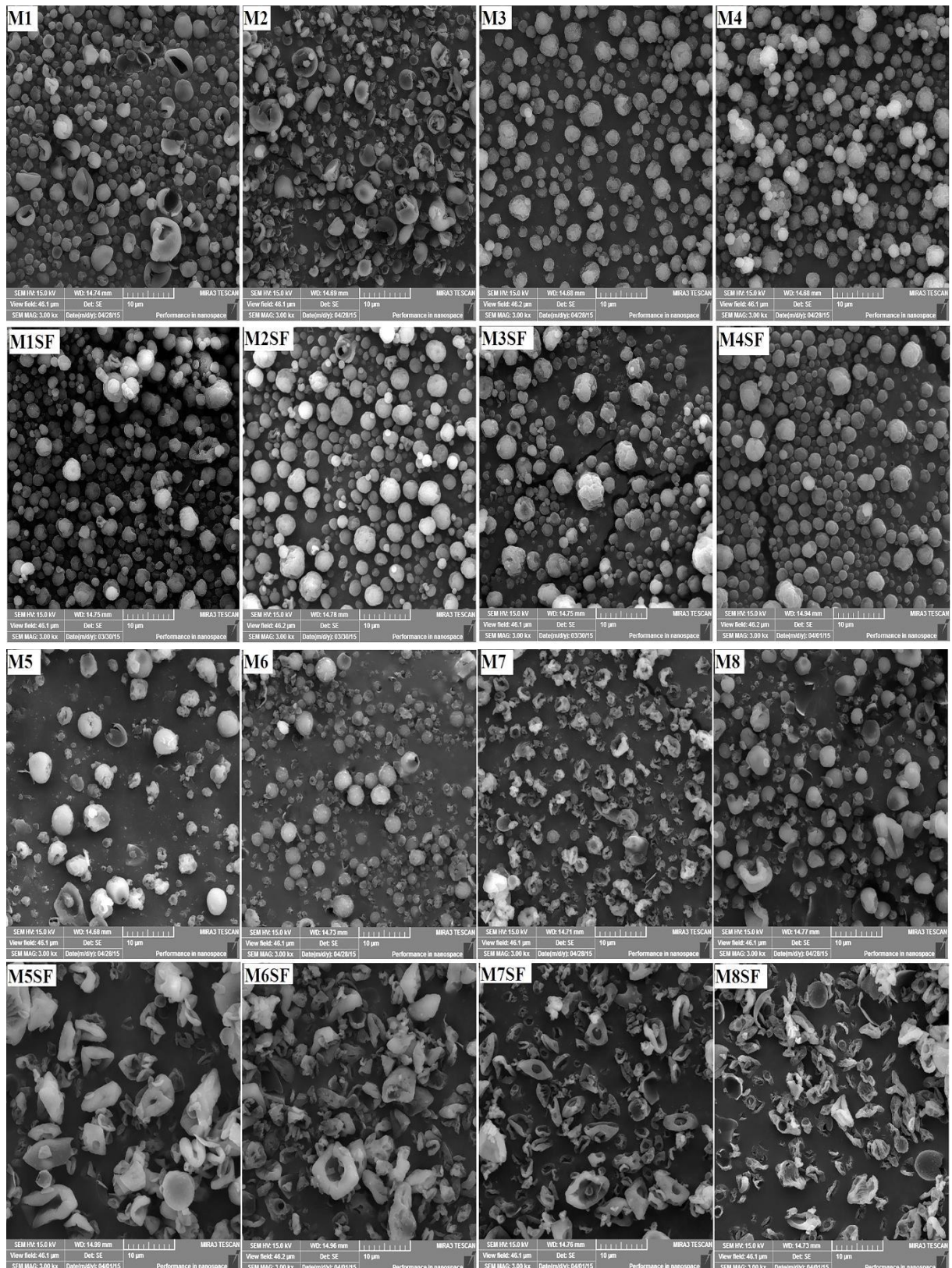
Já as micropartículas (M5 a M8) preparadas em etanol:tampão fosfato pH 7,4 (50:50, V/V) mostraram-se distorcidas e achatadas, como mostra a Figura 9.

A presença ou aumento da concentração de fármaco não alterou o tamanho e a morfologia das micropartículas preparadas em etanol:água (50:50, V/V). Por outro lado, a

presença de EFV em formulações elaboradas em etanol:tampão fosfato pH 7,4 (50:50, V/V) contribuiu para forma esférica.

Algumas micropartículas apresentaram rugosidades e concavidades na superfície. Tais concavidades são típicas em amostras produzidas por *spray drying*, pois são decorrentes da ação de capilaridade na superfície seca das partículas, que, no momento da extração do líquido para o exterior, acontece de forma uniforme ao redor da gotícula, criando uma pressão interna sub-atmosférica, resultando em partículas colabadas. Este fenômeno também pode ser devido ao impacto das partículas úmidas na parede da câmara de secagem, que acabam por deformar ou colabar (KULKARNI; NAIK, 2013; RAFFIN et al., 2007a; WALTON, 2000).

FIGURA 9: ELETROMICROGRAFIAS FEG-SEM DAS MICROPARTÍCULAS COM E SEM FÁRMACO OBTIDAS EM AUMENTO DE 3000X



5.1.4.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada em Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica que fornece informações sobre os grupos funcionais da molécula. A porção de maior utilidade para a análise desses grupos está situada entre 4000 e 400 cm^{-1} . A técnica tem sido amplamente utilizada para investigar interações entre fármaco e polímero que possam ter ocorrido durante o processo de formação das micropartículas (FAYAD, 2010). Com o objetivo de avaliar possível interação entre fármaco e carreador, foram analisados espectros do EFV puro, polímeros puros, mistura física e formulações com e sem fármaco.

O espectro FTIR do EFV puro (FIGURA 10) apresentou as bandas características do fármaco, estando de acordo com os dados encontrados na literatura, como mostra a Tabela 11. Podem ser observadas bandas intensas na região de 900 a 650 cm^{-1} , que correspondem ao anel aromático presente na estrutura do EFV (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

FIGURA 10: ESPECTRO FTIR DO EFV

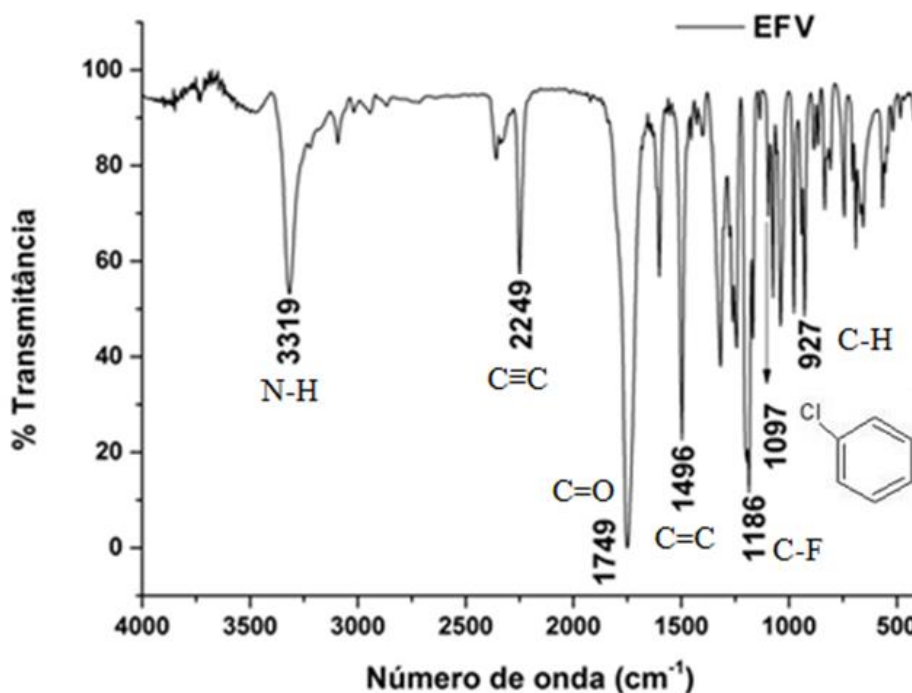


TABELA 11: PRINCIPAIS BANDAS ENCONTRADAS NO ESPECTRO FTIR DO EFV

BANDAS	RESULTADO (cm. ⁻¹)	LITERATURA (cm. ⁻¹)	REFERÊNCIAS
Vibração angular C-H do anel aromático fora do plano	900-650	900-650	(SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006)
Cloro benzeno	1097	1096 e 1089	(COSTA, 2011)
Vibração de estiramento N-H	3319	3311; 3314; 3319	(ALVES et al., 2014; SEREMETA; CHIAPPETTA; SOSNIK, 2013)
Vibração do estiramento C≡C, estiramento da tripla ligação exocíclica	2249	2249; 2250; 2253	(ALVES et al., 2014; BEDOR, 2011; COSTA, 2011; SEREMETA; CHIAPPETTA; SOSNIK, 2013; TSHWEU et al., 2013)
Vibração do estiramento C=O	1749	1740; 1742; 1749	(ALVES et al., 2014; BEDOR, 2011; SEREMETA; CHIAPPETTA; SOSNIK, 2013; TSHWEU et al., 2013)
Vibração do estiramento C-O	1166	1165	(ALVES et al., 2014)
Estiramento C=C do anel benzeno	1496 e 1602	1494 e 1601; 1602	(ALVES et al., 2014); (SEREMETA; CHIAPPETTA; SOSNIK, 2013)
Estiramento C-N	1242	1240	(ALVES et al., 2014)
Deformação C-H no plano	1039 e 1074	1037 e 1073	(ALVES et al., 2014)
Deformação C-H fora do plano	927 e 977	926 e 976	(ALVES et al., 2014)
C-F	1186 e 1197	1186 e 1197	(SEREMETA; CHIAPPETTA; SOSNIK, 2013)

Os espectros dos polímeros foram muito semelhantes entre eles, uma vez que a estrutura base é a mesma, sendo a proporção entre os grupos carboxílicos livres e esterificados que é de 1:1 para o EL100 e de 1:2 para o ES100. Os espectros obtidos para os polímeros (FIGURAS 11 e 12) foram condizentes com os encontrados na literatura (FARAGO, 2007).

FIGURA 11: ESPECTRO FTIR DO EUDRAGIT® L100

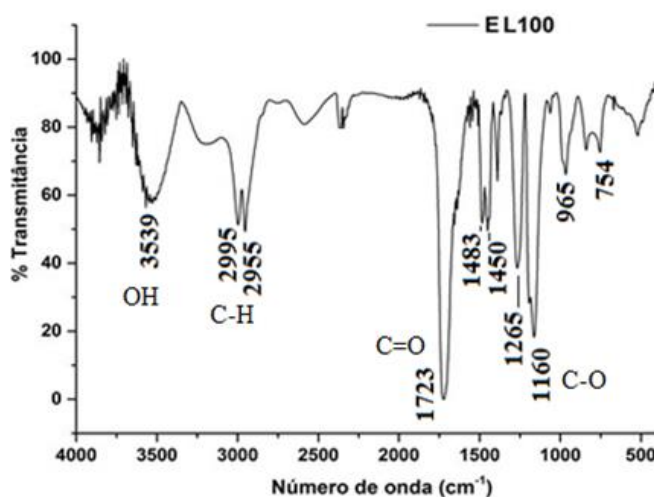
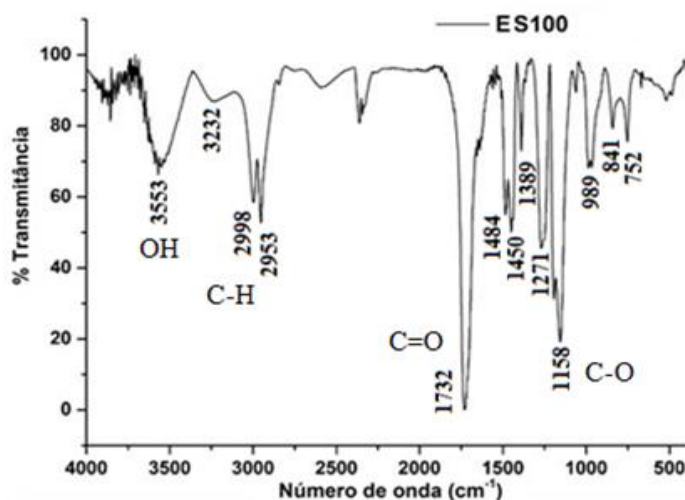


FIGURA 12: ESPECTRO FTIR DO EUDRAGIT® S100



As Figuras de 13 a 36 (M5 a M8) mostram os comparativos entre os espectros FTIR do fármaco, das misturas físicas e das formulações com e sem fármaco. Nos espectros com detalhes em aumento, indicadas por setas de linha contínua, notam-se as bandas de absorção referente ao fármaco nas mesmas posições tanto para as micropartículas carregadas com EFV como para as misturas físicas.

Ainda nos espectros com aumento, as setas de linha tracejada indicam a ausência de bandas características do fármaco.

Nas formulações preparadas em etanol:água (50:50, V/V) houve manutenção das bandas características do fármaco, sem surgimento de novas bandas, sugerindo que não houve ligação química entre o fármaco e os polímeros, como mostra as Figuras de 13 a 24 (M1 a M4) (MENDES, 2011).

As Figuras de 25 a 36, referente às formulações de M5 a M8, mostram alargamento e aumento da intensidade da banda em torno de $3440 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ e da banda em 524 cm^{-1} . Possivelmente, essas alterações nos espectros FTIR estão relacionadas ao baixo doseamento de EFV apresentado por essas micropartículas.

Nos espectros das micropartículas, as bandas características do EFV são referentes ao fármaco presente na superfície da partícula, como pode ser observado em outras análises (DRX, DSC e dissolução). Tais bandas apresentam maiores intensidades nas formulações com 20% de fármaco.

FIGURA 13: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF1, M1 E M1SF

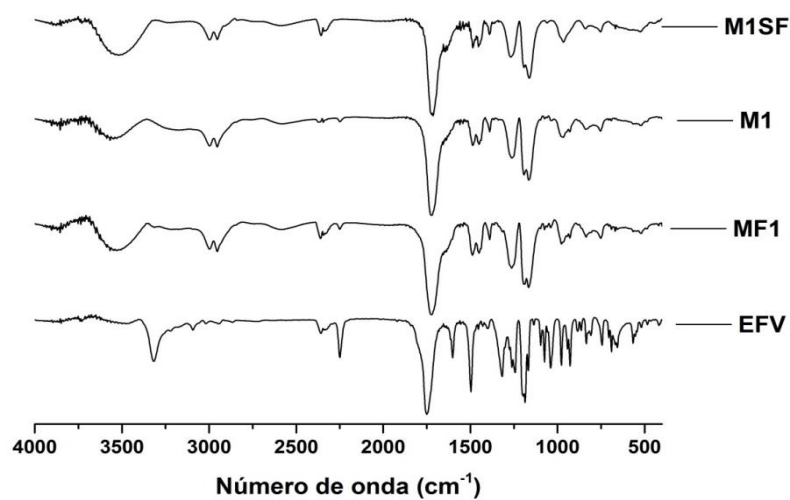
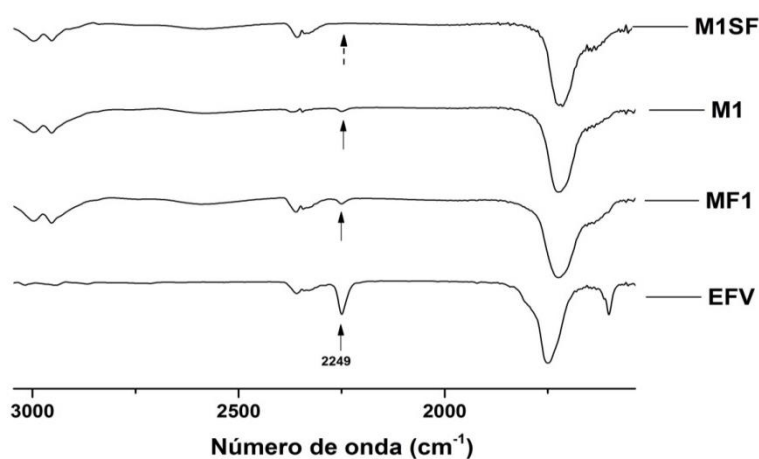
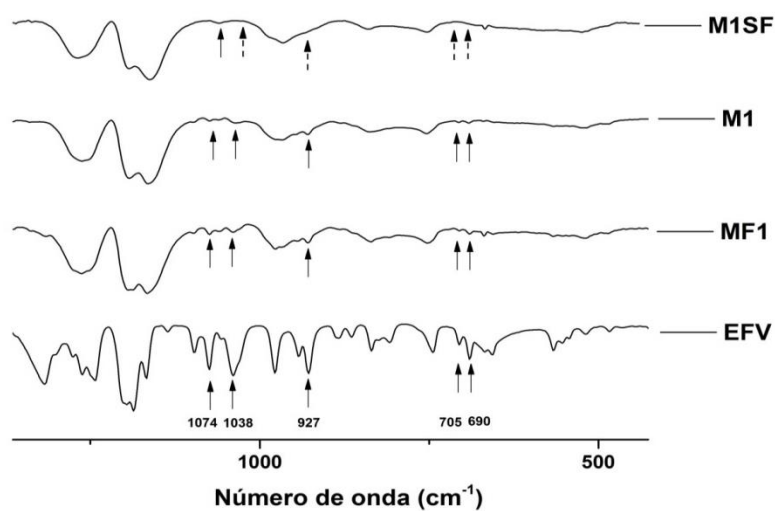
FIGURA 14: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF1, M1 E M1SF (AUMENTO DE 3000 A 1500 cm^{-1})FIGURA 15: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF1, M1 E M1SF (AUMENTO DE 1250 A 500 cm^{-1})

FIGURA 16: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF2, M2 E M2SF

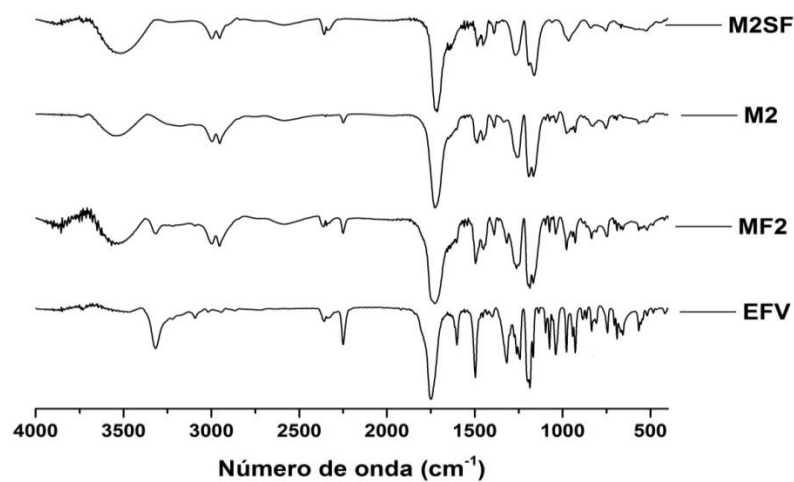
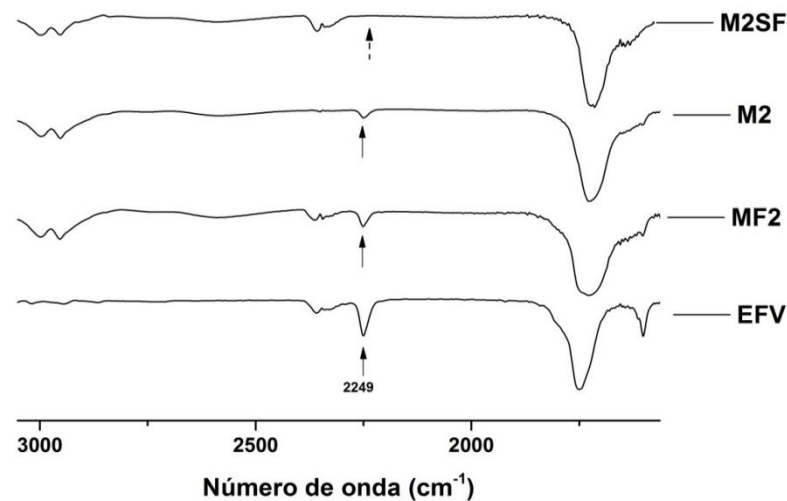
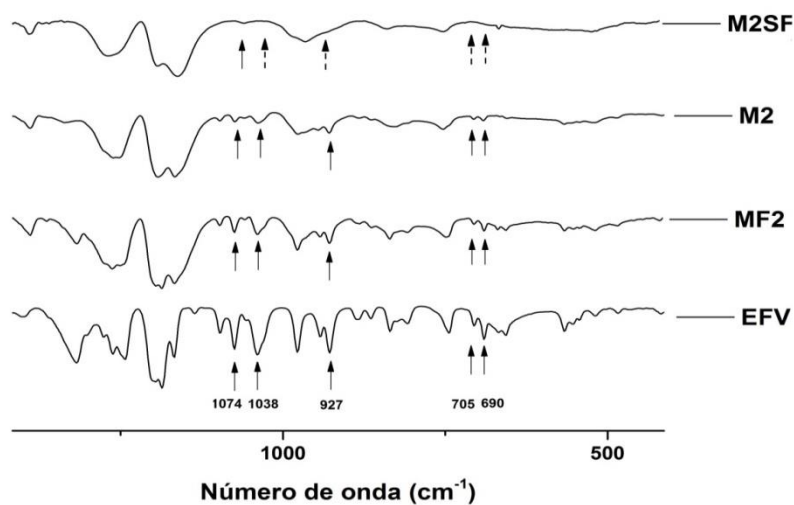
FIGURA 17: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF2, M2 E M2SF (AUMENTO DE 3000 A 1500 cm^{-1})FIGURA 18: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF2, M2 E M2SF (AUMENTO DE 1250 A 500 cm^{-1})

FIGURA 19: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF3, M3 E M3SF

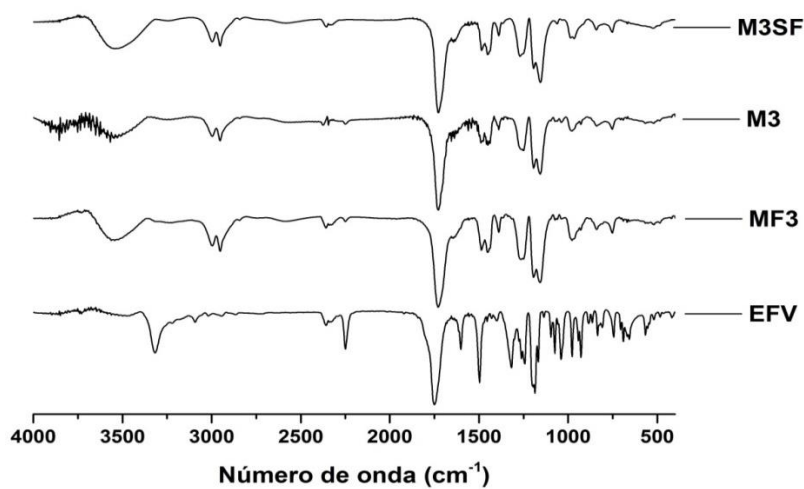
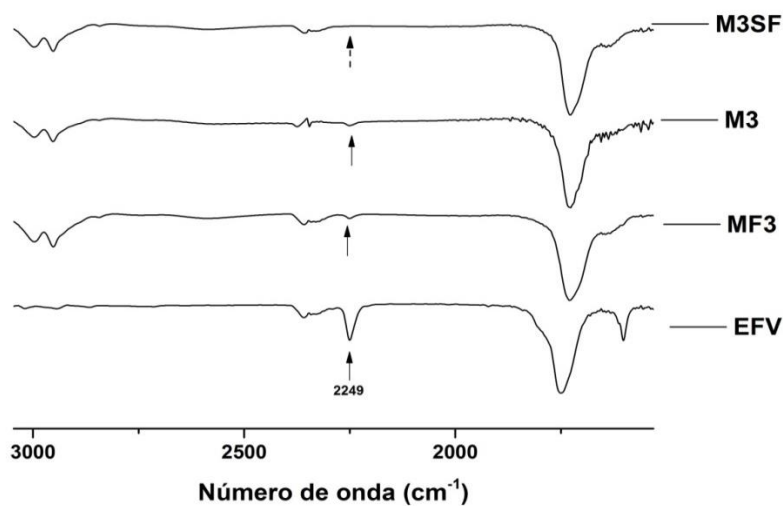
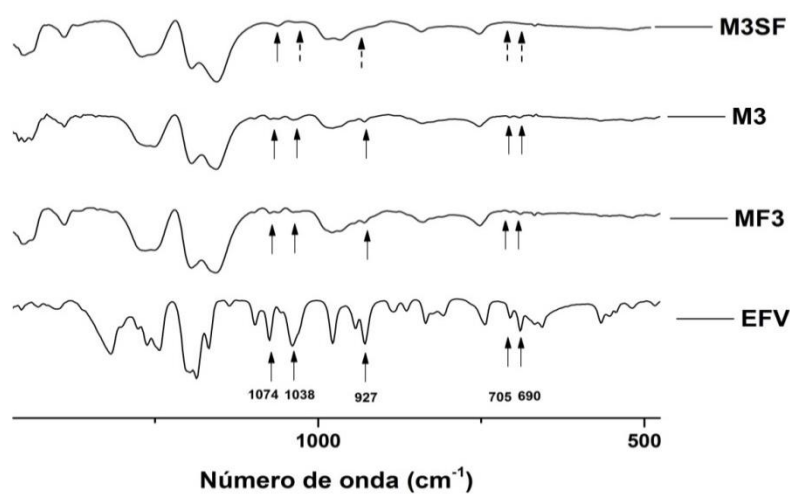
FIGURA 20: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF3, M3 E M3SF (AUMENTO DE 3000 A 1500 cm^{-1})FIGURA 21: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF3, M3 E M3SF (AUMENTO DE 1250 A 500 cm^{-1})

FIGURA 22: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF4, M4 E M4SF

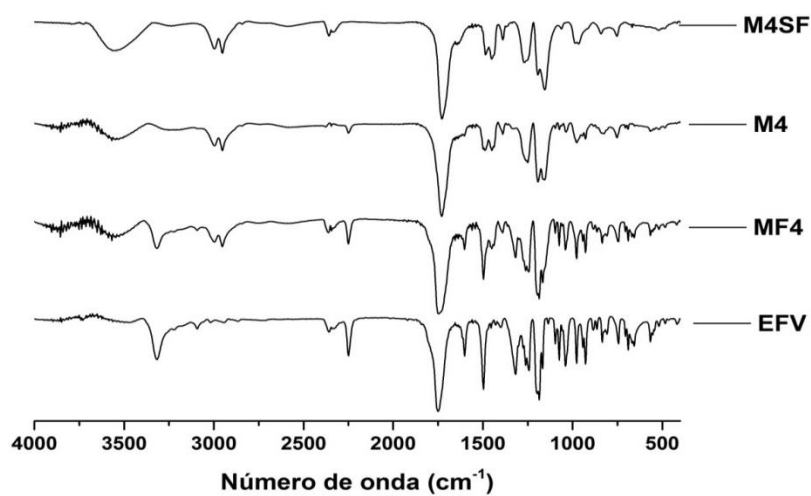
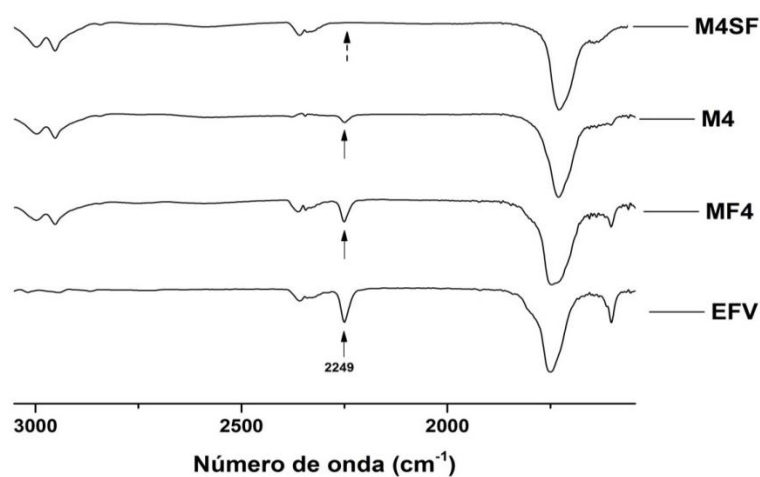
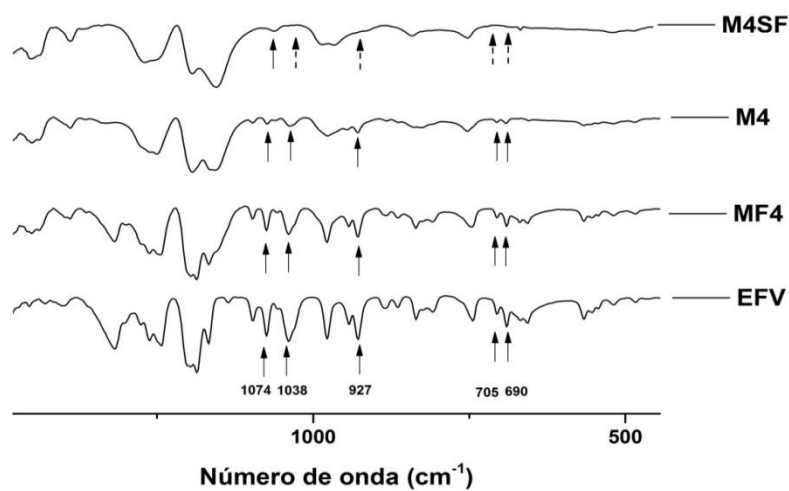
FIGURA 23: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF4, M4 E M4SF (AUMENTO DE 3000 A 1500 cm^{-1})FIGURA 24: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF4, M4 E M4SF (AUMENTO DE 1250 A 500 cm^{-1})

FIGURA 25: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF5, M5 E M5SF

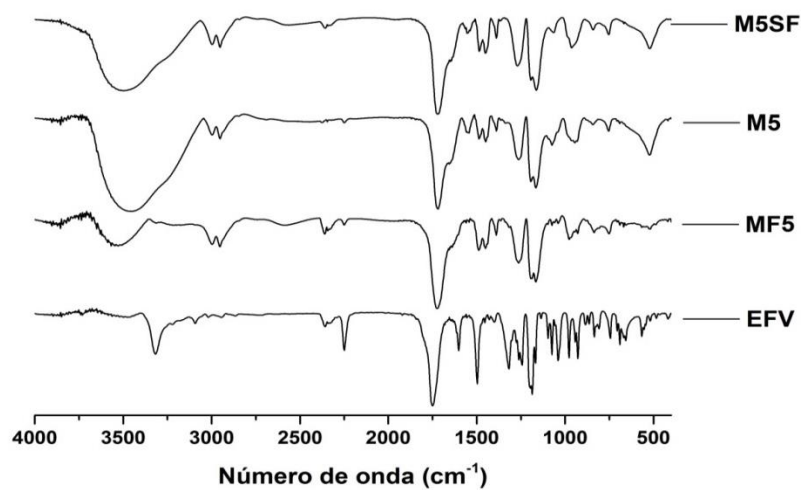
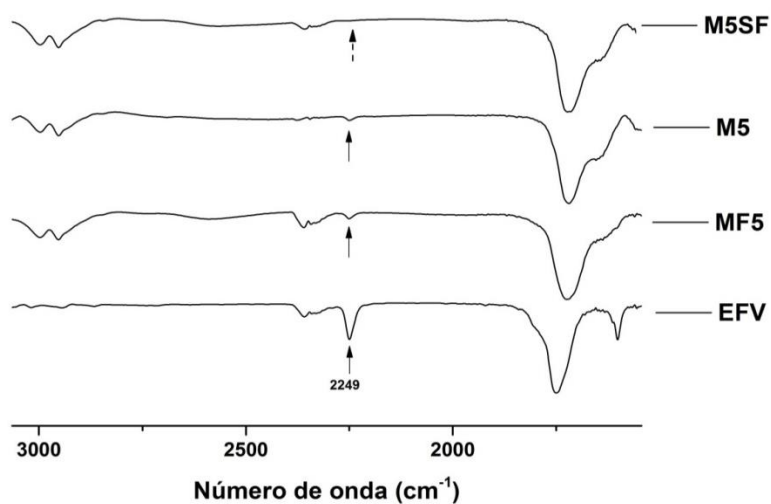
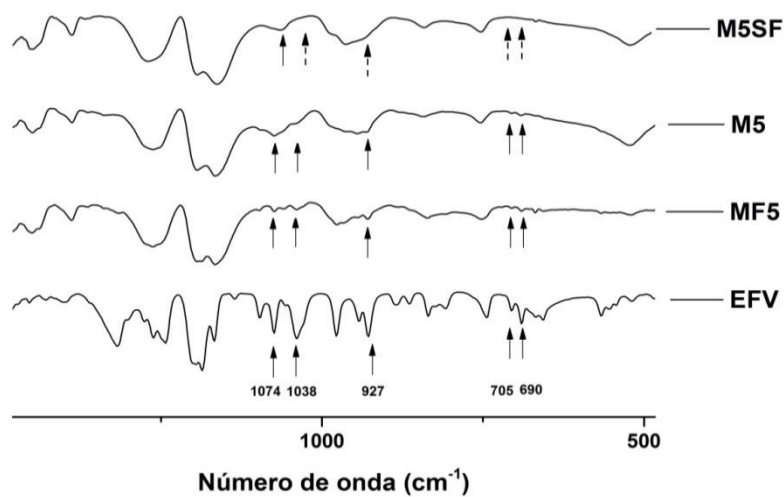
FIGURA 26: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF5, M5 E M5SF (AUMENTO DE 3000 A 1500 cm^{-1})FIGURA 27: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF5, M5 E M5SF (AUMENTO DE 1250 A 500 cm^{-1})

FIGURA 28: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF6, M6 E M6SF

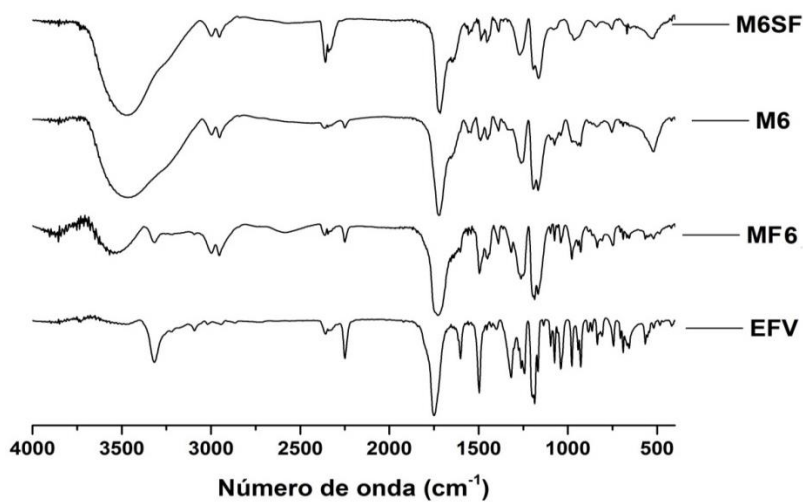
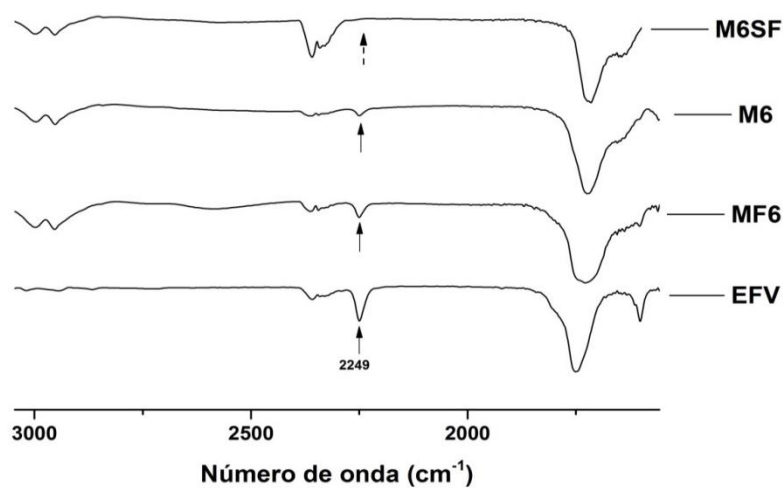
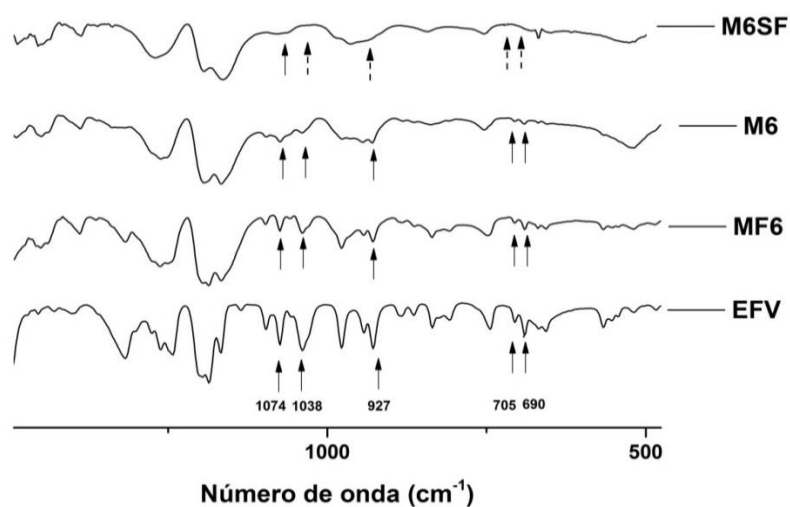
FIGURA 29: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF6, M6 E M6SF (AUMENTO DE 3000 A 1500 cm^{-1})FIGURA 30: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF6, M6 E M6SF (AUMENTO DE 1250 A 500 cm^{-1})

FIGURA 31: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF7, M7 E M7SF

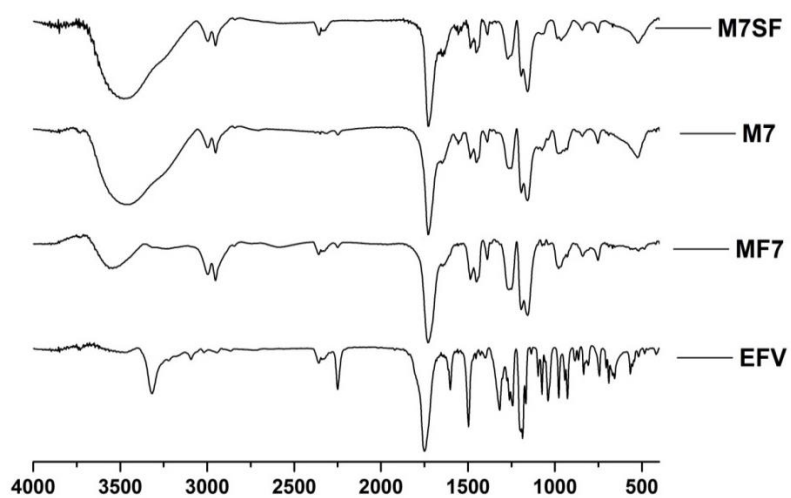
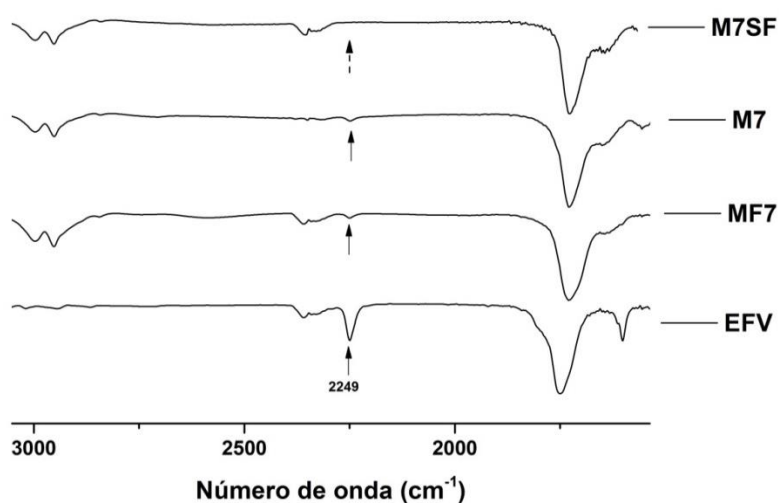
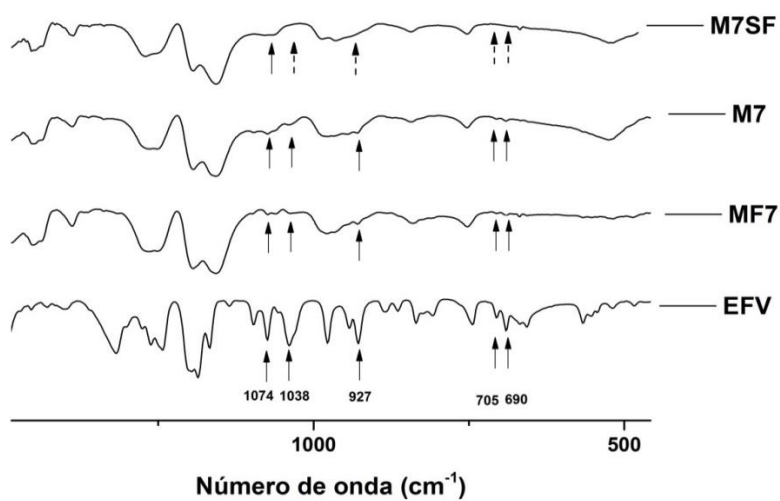
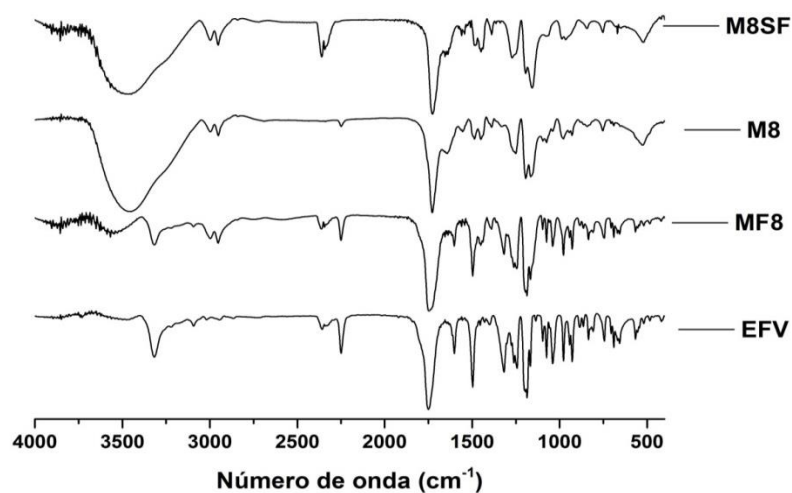
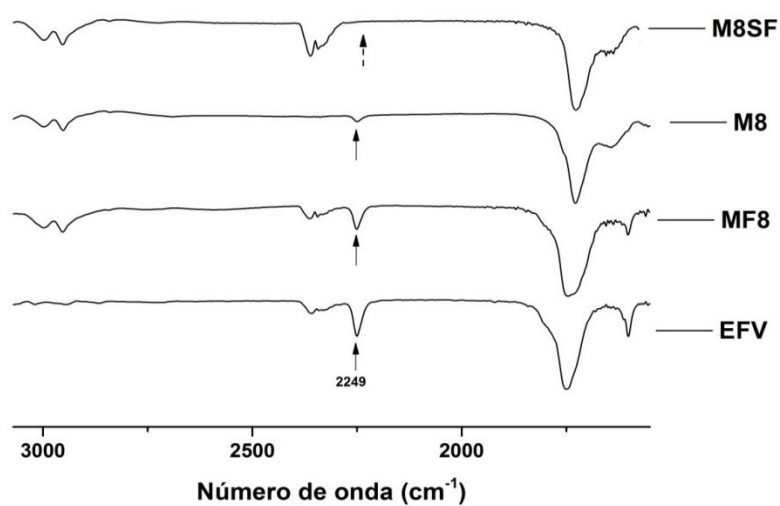
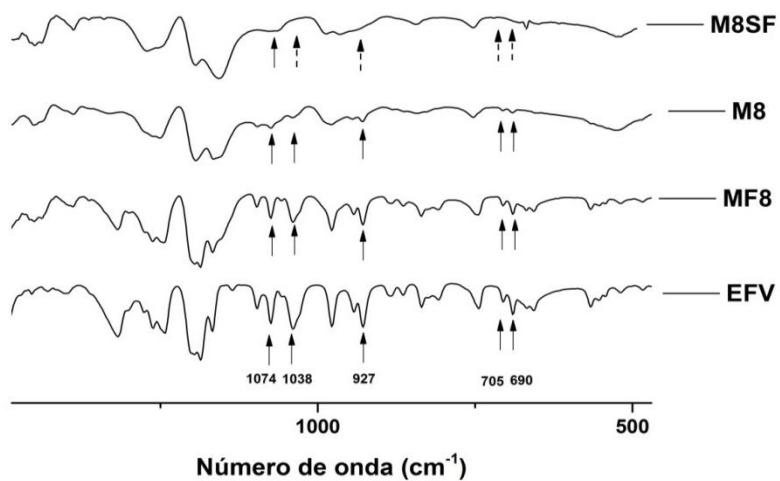
FIGURA 32: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF7, M7 E M7SF (AUMENTO DE 3000 A 1500 cm^{-1})FIGURA 33: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF7, M7 E M7SF (AUMENTO DE 1250 A 500 cm^{-1})

FIGURA 34: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF8, M8 E M8SF

FIGURA 35: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF8, M8 E M8SF (AUMENTO DE 3000 A 1500 cm^{-1})FIGURA 36: ESPECTROS FTIR DO EFV, MF8, M8 E M8SF (AUMENTO DE 1250 A 500 cm^{-1})

5.1.4.4 Difração de Raios X (DRX)

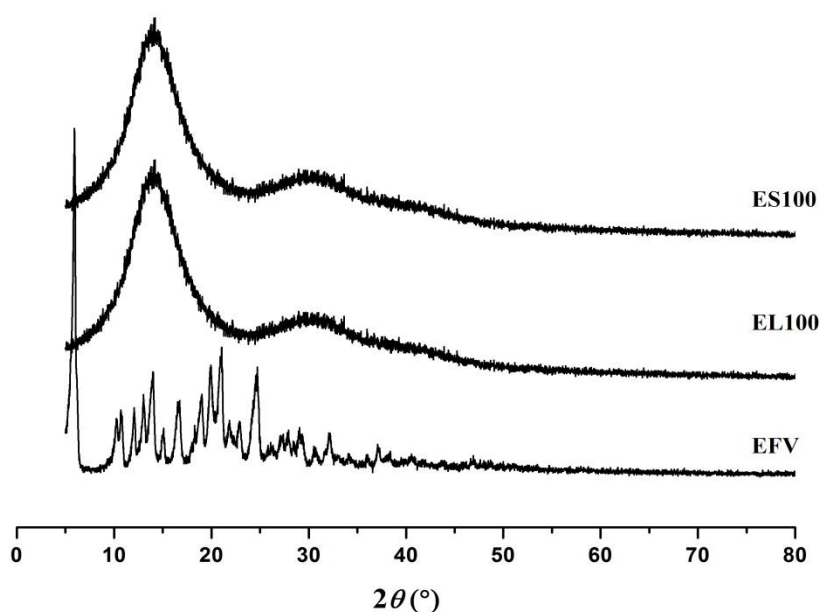
A difração de raios X é uma das principais técnicas de avaliação da cristalinidade do material. O padrão difratométrico é único para cada composto cristalino. Substâncias amorfas não apresentam picos bem definidos no difratograma como as cristalinas e são mais solúveis devido à disposição aleatória de suas moléculas, precisando de menos energia para separá-las. Logo, a dissolução tende a ser mais rápida no estado amorfo (RIEKES et al., 2011). Assim, a cristalinidade da substância é uma característica que pode influenciar a solubilidade e, portanto, melhorar a biodisponibilidade oral (COSTA, 2011; GOMES et al., 2015b; KAWABATA et al., 2011).

Com a finalidade de observar uma possível redução da cristalinidade, foram obtidos difratogramas do EFV puro, polímeros, misturas físicas e formulações com e sem fármaco.

O difratograma do EFV puro (FIGURA 37) apresentou um pico principal em $2\theta = 5,92^\circ$ e outros secundários em: $13,93^\circ$, $19,94^\circ$, $21,00^\circ$ e $24,62^\circ$, confirmando a natureza cristalina do fármaco, visualizada por FEG-SEM. Os resultados foram semelhantes aos encontrados na literatura: $6,20^\circ$, $20,20^\circ$, $21,35^\circ$ e $25,00^\circ$ (COSTA, 2011), $6,24^\circ$, $19,4^\circ$, $21,38^\circ$ e $25,02^\circ$ (ALVES et al., 2014).

Os polímeros não apresentaram picos de cristalinidade bem definidos (FIGURA 37), sendo semelhante ao encontrado na literatura (FARAGO, 2007).

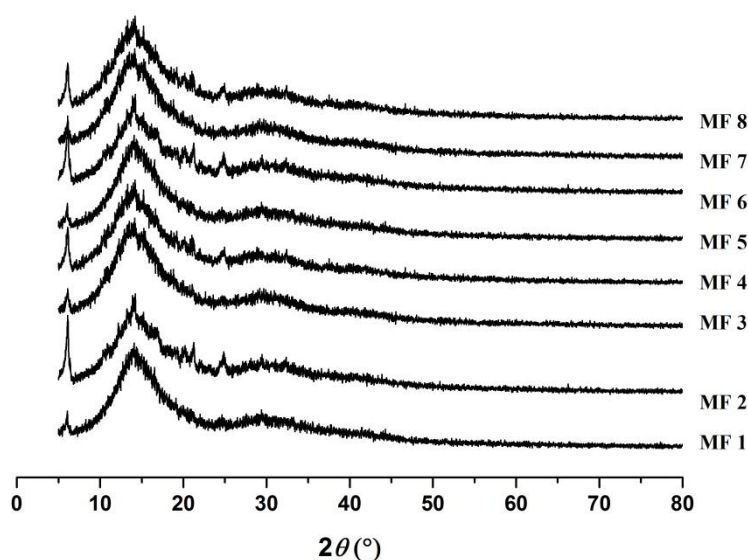
FIGURA 37: DIFRATOGRAMAS DO FÁRMACO PURO E DOS POLÍMEROS



A intensidade do pico é afetada pelo tamanho do cristal e pela cristalinidade (COSTA, 2011). A redução ou ausência de picos definidos significa redução da cristalinidade ou processo de amorfização (GOMES et al., 2015b; MADHUSUDHAN et al., 2012).

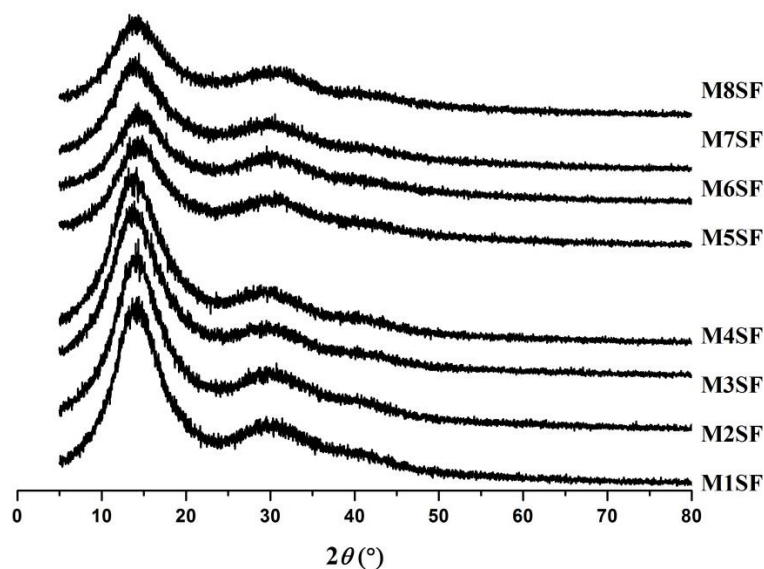
Nos difratogramas das misturas físicas, (FIGURA 38), pode-se observar um pico entre $5,98^\circ$ e $6,16^\circ$, indicando a presença de fármaco na forma cristalina. Picos em torno de 21° e 24° também são visíveis nas misturas físicas com maior quantidade de fármaco proporcionalmente (MF 2, MF 4, MF 6 e MF 8).

FIGURA 38: DIFRATOGRAMAS DAS MISTURAS FÍSICAS



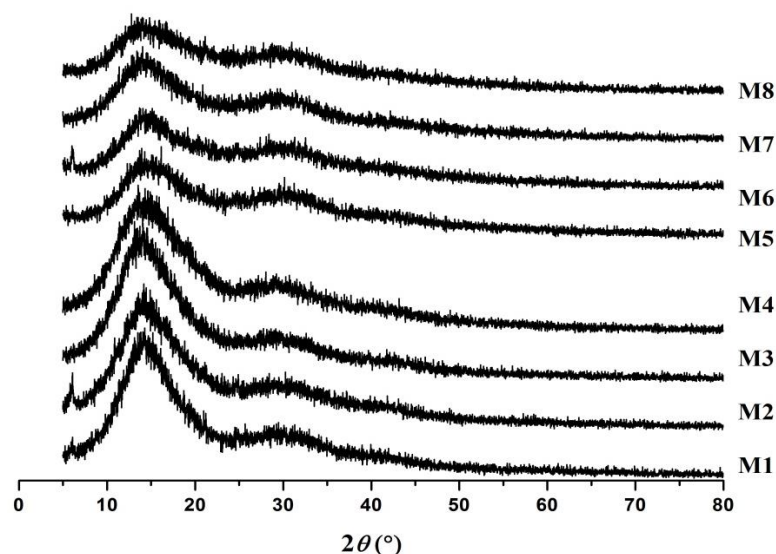
As micropartículas sem fármaco apresentaram caráter amorfo, semelhante ao polímero, como pode ser visto nos difratogramas (FIGURA 39).

FIGURA 39: DIFRATOGRAMAS DAS MICROPARTÍCULAS SEM FÁRMACO



Já as micropartículas carregadas com EFV, (FIGURA 40), apresentaram ausência ou redução da intensidade desses picos, sugerindo amorfização do fármaco durante o processo de encapsulação. No caso das micropartículas com 20% de fármaco em EL100 (M2 e M6) é possível observar alguns picos de cristalinidade do fármaco, o que pode indicar a presença de microdomínios do fármaco no material polimérico (MENDES, 2011).

FIGURA 40: DIFRATOGRAMAS DAS MICROPARTÍCULAS COM FÁRMACO



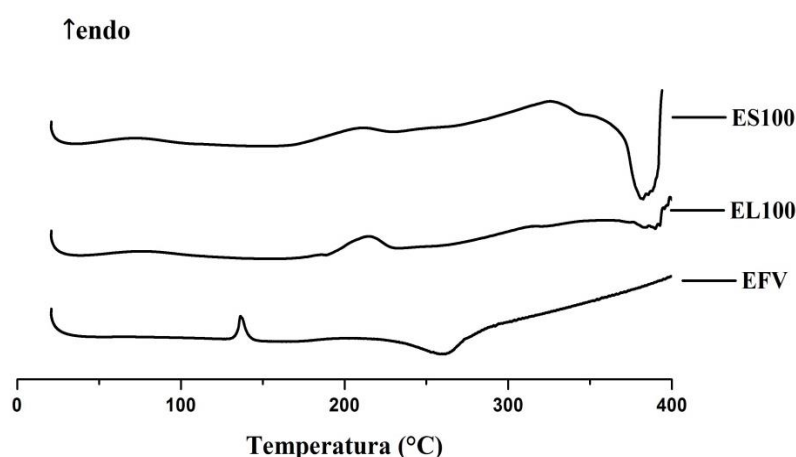
5.1.4.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A técnica envolve aquecimento da amostra e medida subsequente da temperatura e da energia associadas a uma série de eventos térmicos, incluindo fusão, cristalização, transição vítrea e reações de decomposição (COSTA, 2011). Esta análise foi empregada às micropartículas elaboradas em etanol:água (50:50, V/V, M1 a M4) a fim de avaliar a possível amorfização ou degradação do fármaco decorrente do processo de encapsulação. Eventos endotérmicos são indicados para cima (↑endo).

O EFV puro exibiu um pico endotérmico em torno de 136 °C, como mostra a Figura 41. O resultado obtido apresenta-se similar aos encontrados na literatura, 136,86 – 141,75 °C (ALVES et al., 2014), 137 °C (COSTA, 2011), 138,7 – 140,5 °C (PINTO, 2012), 135,27 – 139,79 °C (MADHAVI et al., 2011), valores que são atribuídos para o pico referente ao processo de fusão do fármaco. Um evento exotérmico em 216 – 290 °C sugere a decomposição térmica do EFV, condizente com o valor de 215 – 296 °C encontrado por Bedor (2011).

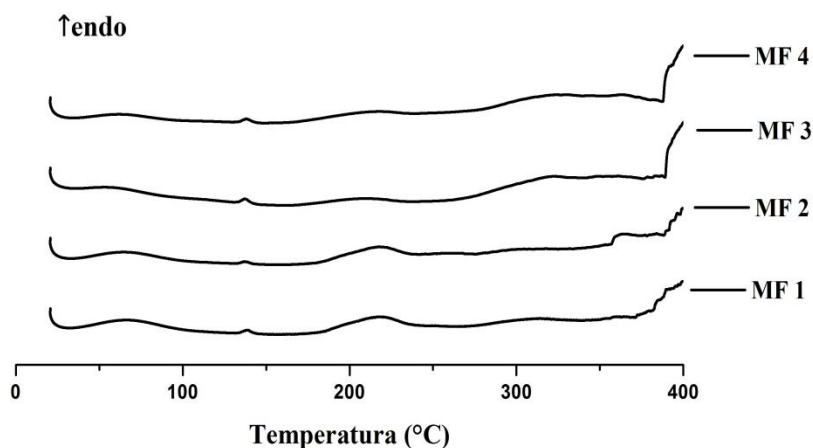
Ambos os polímeros apresentaram pico endotérmico em 70 °C, condizente com o encontrado por Raffin et al. (2007a) em 69 °C. A degradação térmica ocorreu em 326 °C e 374 °C para ES100 e EL100, respectivamente, conforme observado na Figura 41.

FIGURA 41: CURVAS DSC PARA O FÁRMACO E OS POLÍMEROS



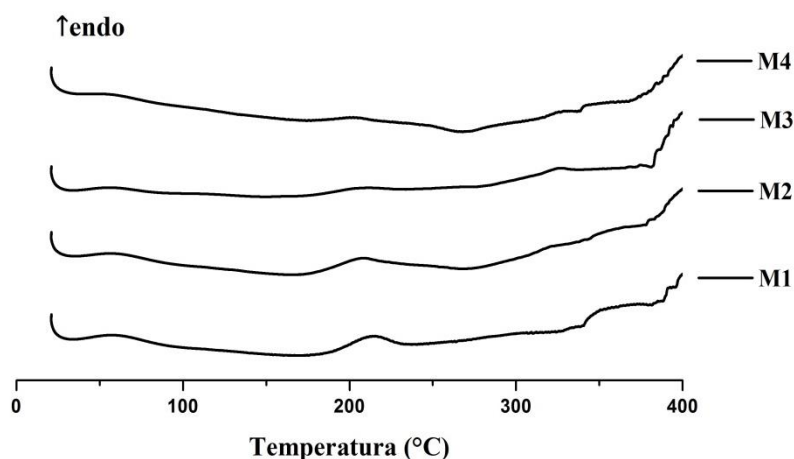
Embora em menor intensidade, as misturas físicas também apresentaram o pico endotérmico referente ao fármaco em torno de 137 °C. As curvas mostram características tanto do fármaco, quanto do polímero (FIGURA 42).

FIGURA 42: CURVAS DSC PARA AS MISTURAS FÍSICAS



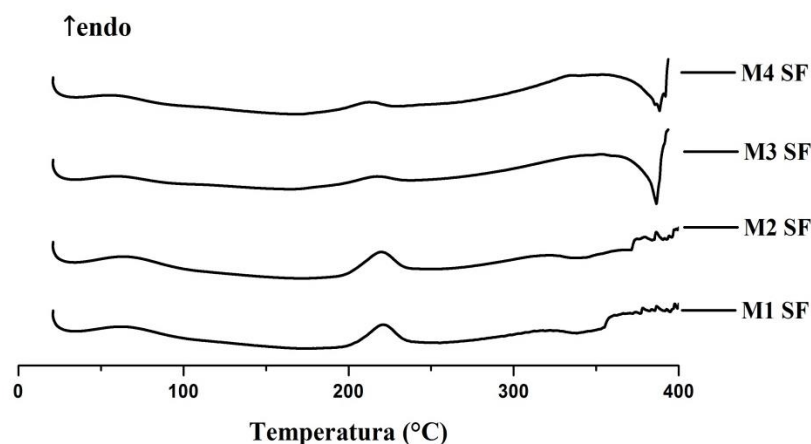
Nas micropartículas carregadas com EFV, o pico de fusão do fármaco não foi observado, sugerindo possível amorfização do fármaco (FIGURA 43) (GOMES et al., 2015b; MADHUSUDHAN et al., 2012).

FIGURA 43: CURVAS DSC PARA AS MICROPARTÍCULAS



As micropartículas sem fármaco (FIGURA 44) apresentaram curvas semelhantes a dos polímeros utilizados.

FIGURA 44: CURVAS DSC PARA AS MICROPARTÍCULAS SEM FÁRMACO



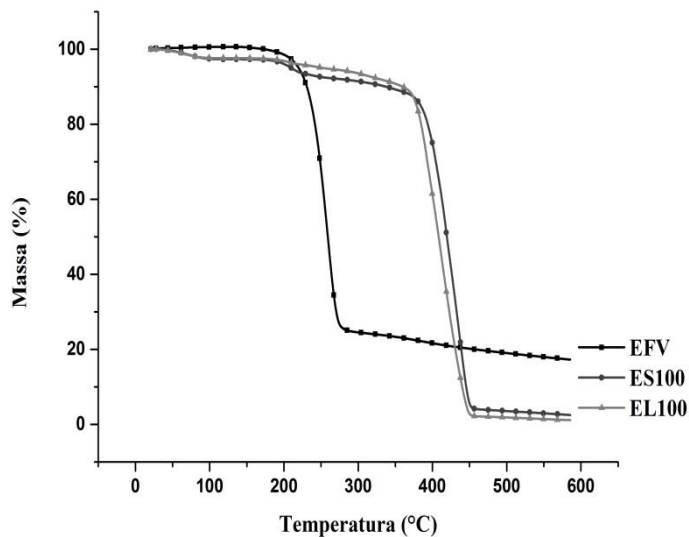
5.1.4.6 Termogravimetria (TG)

A análise termogravimétrica é utilizada para avaliar as propriedades térmicas dos materiais e sua estabilidade, por meio da perda ou ganho de massa em função da temperatura. Os polímeros apresentam um decaimento entre 390 – 450 °C, resultando em diminuição na sua massa molar que pode ser justificada por mudanças estruturais que ocorrem quando são submetidos a um tratamento térmico. Essas mudanças são caracterizadas pela ruptura de ligações químicas, dando origem a novas estruturas voláteis (FAYAD, 2010).

A curva termogravimétrica do EFV (FIGURA 45) apresenta um processo de decomposição térmica entre 180 – 282 °C, próximo do valor encontrado por Bedor (2011), de 183,48 – 280,31 °C.

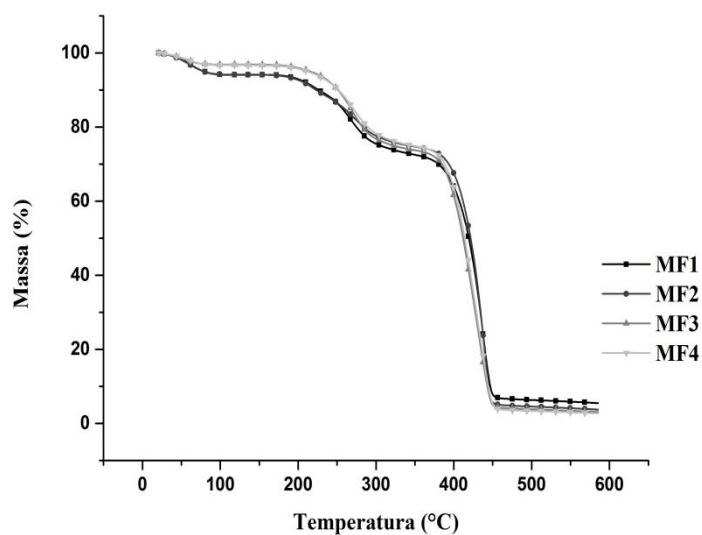
A Tabela 12 fornece informações sobre a variação da massa e perda de água (Δm_1), durante a análise.

FIGURA 45: CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS DO FÁRMACO E DOS POLÍMEROS



As misturas físicas apresentaram dois eventos, além da perda de água (Δm_1), um entre 185 – 300 °C referente à fusão do fármaco (Δm_2) e outro entre 350 – 460 °C, referente à fusão do polímero (Δm_3) (FIGURA 46).

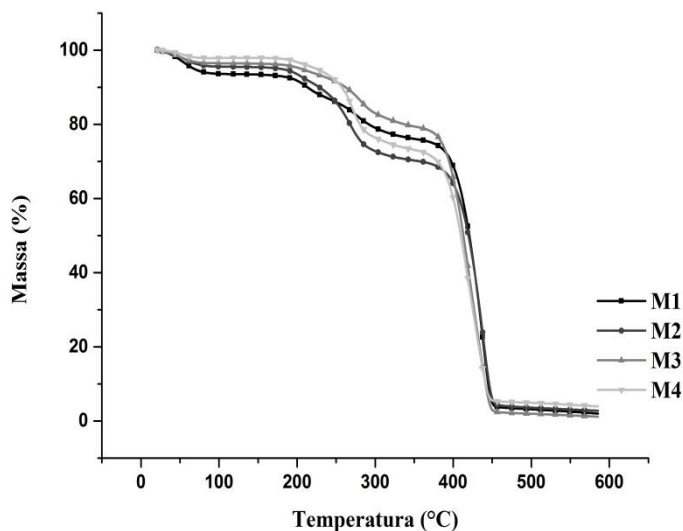
FIGURA 46: CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS DAS MISTURAS FÍSICAS



O processo de formação das micropartículas não interferiu na estabilidade térmica do fármaco, visto que as micropartículas apresentaram o Δm_1 referente a perda de água, um

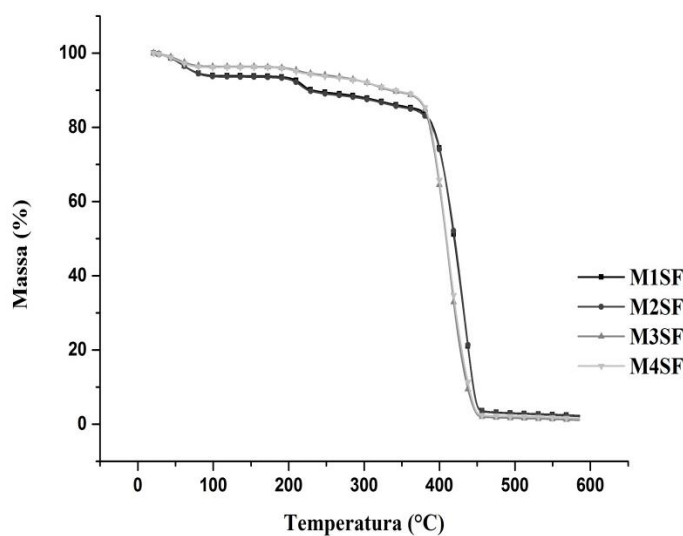
decaimento entre 190 – 300 °C, que condiz com a fusão do fármaco (Δm_2). Outro decaimento, entre 370 – 460 °C referente à fusão do polímero (Δm_3) pode ser observado na Figura 47.

FIGURA 47: CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS DAS MICROPARTÍCULAS



Micropartículas sem fármaco apresentaram apenas um decaimento, além da perda de água, entre 370 – 460 °C (Δm_3), condizente com o valor encontrado para a fusão dos polímeros (FIGURA 48).

FIGURA 48: CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS DAS MICROPARTÍCULAS SEM FÁRMACO



Os termogramas mostram uma primeira variação de massa Δm_1 até 100 °C, referente à perda de água; Δm_2 , indicativo do decaimento do fármaco; e Δm_3 relativo ao decaimento do polímero. Os percentuais das variações foram calculados e estão expostos na Tabela 12.

TABELA 12: PERCENTUAIS DE VARIAÇÃO DE MASSA (Δm) DAS AMOSTRAS ANALISADAS

AMOSTRA	Δm_1 (%) 20 – 100 °C	Δm_2 (%) 180 – 300 °C	Δm_3 (%) 350 – 460 °C
EFV	0,56	79,35	-
EL100	2,55	-	95,63
ES100	2,26	-	97,81
MF1	5,79	20,95	90,54
MF2	5,68	18,84	93,32
MF3	3,11	22,16	94,17
MF4	3,25	20,71	94,92
M1	6,30	17,44	95,07
M2	4,40	25,00	93,84
M3	3,44	16,12	96,93
M4	2,16	23,46	92,69
M1SF	6,03	-	94,50
M2SF	6,50	-	96,34
M3SF	3,58	-	98,06
M4SF	3,78	-	97,73

Onde: Δm : variação de massa; M: micropartícula; MF: mistura física; SF: sem fármaco

Todas as amostras apresentam baixo percentual de perda de água, indicativo de baixa umidade. As amostras contendo ES100 tiveram menor perda de água que aquelas contendo EL100, fato que também foi observado por meio do analisador de umidade.

5.1.5 Perfil de liberação *in vitro*

Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados com as micropartículas preparadas em etanol:água (50:50, V/V, M1 a M4), devido às maiores eficiências de encapsulação, e comparados com o perfil de liberação do fármaco puro. Os valores obtidos para cada intervalo de coleta foram corrigidos considerando-se as alíquotas retiradas.

Os perfis de liberação do fármaco e das micropartículas podem ser analisados na Figura 49.

FIGURA 49: PERFIS DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO E DAS MICROPARTÍCULAS

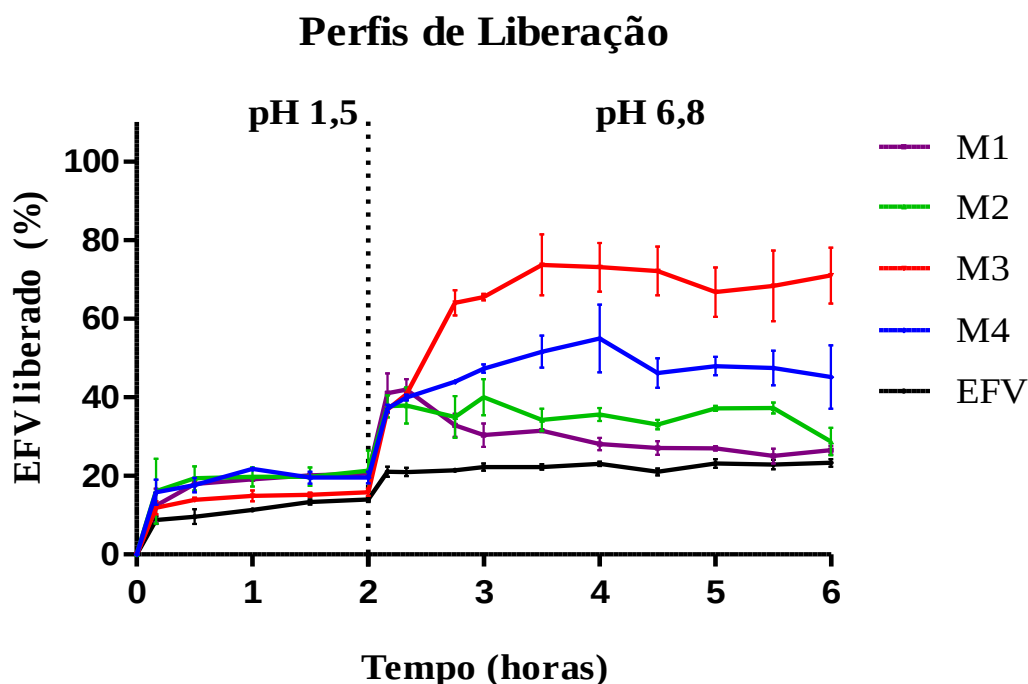


Tabela 13 sumariza os resultados para a dissolução do EFV e das micropartículas.

TABELA 13: DADOS DA DISSOLUÇÃO DO FÁRMACO E DAS MICROPARTÍCULAS

MEIO DE DISSOLUÇÃO		pH 1,5 (0 a 2 horas)		pH 6,8 (0 a 6 horas)		
AMOSTRA	% _{MÁX} ± DP*	TEMPO _{MÁX}	ED (%)	% _{MÁX} ± DP*	TEMPO _{MÁX}	ED (%)
M1	20,55 ± 0,32	2 horas	17,16	41,93 ± 2,68	2,33 horas	25,74
M2	21,30 ± 5,18	2 horas	17,92	40,02 ± 4,59	3 horas	29,79
M3	15,81 ± 0,91	2 horas	14,13	73,69 ± 7,73	3,5 horas	47,96
M4	21,82 ± 0,12	1 hora	17,78	54,94 ± 8,64	4 horas	37,34
EFV	13,99 ± 0,66	2 horas	10,65	22,88 ± 1,18	5,5 horas	18,38

Onde: %_{MÁX}: porcentagem máxima liberada no período avaliado; DP: desvio padrão; TEMPO_{MÁX}: tempo em que houve liberação máxima do fármaco no período avaliado; ED: eficiência de dissolução.

O EFV puro exibiu menor liberação em meio ácido (13,99%), com ED abaixo de 11%, comprovando sua baixa solubilidade em água (ALVES et al., 2014; MADHAVI et al., 2011; SATHIGARI et al., 2009).

Tendo em vista os resultados obtidos, nota-se que M3 foi a formulação que melhor controlou a liberação de fármaco em meio ácido (menos de 16%), apresentando a menor ED (14,13%). As outras formulações liberaram menos de 22% de fármaco em meio ácido, resultando em ED inferiores a 18%. Resultados que atribuem gastrorresistência às micropartículas (ARCE VELASQUEZ et al. 2014; RAFFIN et al., 2007b).

A mudança de pH ocasionou um pico de liberação em todas as amostras analisadas, sendo mais evidente na M1, que alcança seu maior % de liberação (41,93%) em pouco mais de 2 horas, e apresentou a menor ED das micropartículas avaliadas, cerca de 26%. Comportamento semelhante foi observado para a M2, que em pH 6,8 atingiu 40% de liberação e ED próximo a 30%.

A micropartícula que apresentou maior percentual de liberação foi a M3 (73,69%), com ED perto de 48%. A M4 teve sua maior liberação em 4 horas (54,94%), com ED em torno de 37%.

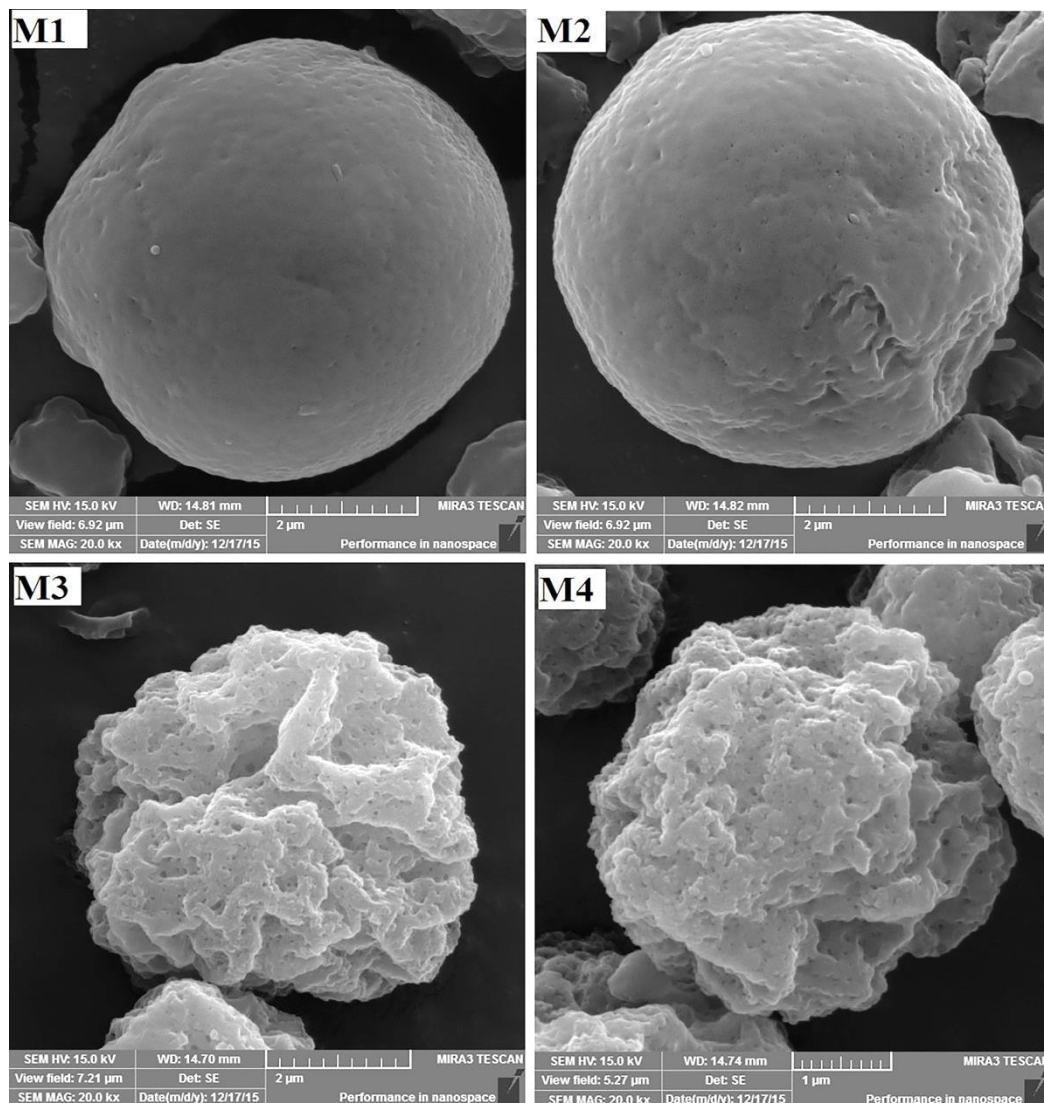
O fármaco puro alcançou a concentração de 22,88% em 5,5 horas, em pH 6,8, com ED abaixo de 19%.

Valores elevados de eficiência de dissolução são verificados em formas farmacêuticas de liberação imediata (FORTUNATO et al., 2007). Sendo assim, as micropartículas obtidas aumentaram a eficiência de dissolução do EFV, sendo estratégias interessantes para o aumento da solubilidade e da biodisponibilidade do fármaco.

Embora M1 e M2 sejam compostas por EL100, a liberação do fármaco ocorreu de forma mais lenta que nas micropartículas M3 e M4, constituídas de ES100. Isto pode ter ocorrido devido às características morfológicas das micropartículas, visto que as com EL100 apresentaram superfície mais lisa, com presença de poucos e pequenos poros. Já as micropartículas com ES100, exibiram superfície rugosa com poros maiores e em maior quantidade, o que pode ter facilitado a liberação do fármaco. A superfície das micropartículas pode ser observada na Figura 50.

A concentração do polímero ES100 teve influência sob a superfície da partícula, de modo que uma concentração maior de ES100 originou micropartículas com superfícies mais rugosas, o que pode ter favorecido a entrada do meio de dissolução, levando a uma maior liberação do fármaco.

FIGURA 50: ELETROMICROGRAFIAS FEG-SEM DAS MICROPARTÍCULAS EM AUMENTO DE 20000X



O teste de Tukey de ANOVA ($p > 0,05$) foi aplicado aos perfis de liberação nas duas primeiras horas (pH 1,5) e no período total do experimento (pH 6,8).

Em meio ácido, as micropartículas M1, M2 e M4 apresentaram diferença estatística quando comparadas com EFV. A M3 foi a micropartícula que melhor controlou a liberação de EFV no pH 1,5, apresentando maior gastrorresistência (atribuída ao polímero ES100) e menor liberação de fármaco (RAFFIN et al., 2007b).

Considerando o período total do experimento (6 horas), as micropartículas M3 e M4 apresentaram maiores % de liberação de fármaco, quando comparadas ao EFV puro, ou seja, o polímero foi capaz de aumentar significativamente a solubilidade do fármaco em pH 6,8 (RAFFIN et al, 2007a; RAFFIN et al, 2007b). As micropartículas M1 e M2 não apresentaram diferença estatística em relação ao EFV.

Sendo assim, a micropartícula escolhida para a realização do teste *in vivo* foi a M3, pois, controlou mais a liberação em meio ácido e liberou mais fármaco no pH 6,8.

5.1.5.1 Modelos Matemáticos Para Avaliar a Cinética de Liberação

EL100 e ES100 são polímeros de liberação entérica, começam a dissolver em pH entre 6 e 7 devido a ionização dos grupos carboxílicos, permitindo, dessa forma, a penetração do solvente e a liberação do fármaco (EL KAMEL, 2001).

Os modelos cinéticos foram aplicados aos perfis de liberação no pH 1,5 (TABELA 14) e 6,8 (TABELA 15). Nas tabelas, em negrito, o resultado do modelo matemático com melhor valor de *r* para cada formulação analisada.

TABELA 14: RESULTADOS OBTIDOS PARA OS MODELOS MATEMÁTICOS TESTADOS (pH 1,5)

pH 1,5 (0 a 2 horas)				
	MONOEXPONENCIAL	BIEXPONENCIAL	ORDEM ZERO	WEIBULL
EFV	r: 0,8362 MSC: 0,0030 K: 0,0016	r: 0,9616 MSC: 1,2518 A: 0,8750 ALPHA: 7,5456 ⁻¹⁹ B: 0,1216 BETA: 0,0894	r: 0,8272 MSC: -0,0724 K: 0,1451	r: 0,9954 MSC: 3,6883 TD: 1387565,2137 TO: 5,7107 ⁻¹⁷
M1	r: 0,7853 MSC: -0,1749 K: 0,0026	r: 0,9974 MSC: 3,9364 A: 0,8018 ALPHA: 1,2756 ⁻¹⁸ B: 0,1972 BETA: 0,0937	r: 0,7649 MSC: -0,2956 K: 0,2246	r: 0,9939 MSC: 3,4030 TD: 626437,7318 TO: 2,7839 ⁻¹⁴
M2	r: 0,7015 MSC: -0,4943 K: 0,0027	r: 0,9970 MSC: 3,7684 A: 0,7989 ALPHA: 9,5735 ⁻¹⁹ B: 0,2010 BETA: 0,1584	r: 0,6810 MSC: -0,5946 K: 0,2311	r: 0,9974 MSC: 4,2618 TD: 1073153267,2171 TO: 5,4836 ⁻¹⁷
M3	r: 0,7137 MSC: -0,4766 K: 0,0019	r: 0,9957 MSC: 3,4172 A: 0,8499 ALPHA: 1,0753 ⁻¹⁸ B: 0,1499 BETA: 0,1529	r: 0,6988 MSC: -0,5514 K: 0,1731	r: 0,9995 MSC: 5,8379 TD: 2699822261,068 TO: 5,8757 ⁻¹⁷
M4	r: 0,6784 MSC: -0,5289 K: 0,0026	r: 0,9872 MSC: 2,3377 A: 0,8026 ALPHA: 1,4238 ⁻¹⁸ B: 0,1971 BETA: 0,1544	r: 0,6546 MSC: -0,6298 K: 0,2252	r: 0,9872 MSC: 2,6681 TD: 1698774519,3395 TO: 5,3698 ⁻¹⁷

Os resultados mostram que as micropartículas M1 e M4 apresentaram liberação biexponencial, enquanto que as M2, M3 e EFV apresentaram melhor r para o modelo de Weibull.

TABELA 15: RESULTADOS OBTIDOS PARA OS MODELOS MATEMÁTICOS TESTADOS (pH 6,8)

pH 6,8 (0 a 6 horas)				
	MONOEXPONENCIAL	BIEXPONENCIAL	ORDEM ZERO	WEIBULL
EFV	r: 0,8695 MSC: 0,3186 K: 0,0010	r: 0,9524 MSC: 1,9360 A: 0,7598 ALPHA: 3,6569 ⁻¹⁹ B: 0,2118 BETA: 0,0105	r: 0,8467 MSC: 0,1020 K: 0,0892	r: 0,9547 MSC: 2,0492 TD: 23412,3818 TO: 9,8079 ⁻¹⁷
M1	r: 0,4425 MSC: -0,4597 K: 0,0016	r: 0,7233 MSC: 0,2407 A: 0,6926 ALPHA: 2,3249 ⁻¹⁹ B: 0,2886 BETA: 0,0265	r: 0,3910 MSC: -0,6198 K: 0,1222	r: 0,6622 MSC: 0,2018 TD: 377927,0961 TO: 7,6511 ⁻¹⁶
M2	r: 0,7537 MSC: -0,0662 K: 0,0019	r: 0,8790 MSC: 0,9813 A: 0,6412 ALPHA: 3,5398 ⁻¹⁹ B: 0,3063 BETA: 0,0144	r: 0,7033 MSC: -0,3586 K: 0,1403	r: 0,8757 MSC: 1,0808 TD: 18329,8620 TO: 1,5392 ⁻¹⁴
M3	r: 0,9199 MSC: 1,7417 K: 0,0042	r: 0,9301 MSC: 1,4964 A: -0,3268 ALPHA: 0,0263 B: 1,2638 BETA: 0,0054	r: 0,8934 MSC: 1,3542 K: 0,2525	r: 0,9271 MSC: 1,5626 TD: 176,330309 TO: 4,0637 ⁻¹⁶
M4	r: 0,8895 MSC: 1,0135 K: 0,0027	r: 0,9181 MSC: 1,3504 A: 0,4549 ALPHA: 9,3271 ⁻¹⁹ B: 0,4996 BETA: 0,0075	r: 0,8444 MSC: 0,4764 K: 0,1837	0,9098 1,3832 1232,07932 3,5982 ⁻¹³

A modelagem considerando as 6 horas de experimento mostrou que todas as micropartículas apresentaram liberação biexponencial. O fármaco continuou sendo melhor representado pelo modelo de Weibull.

Segundo o modelo biexponencial, a liberação ocorre em duas fases. Uma liberação rápida inicial relacionada ao efeito *burst* (parâmetro A e constante cinética alpha) e outra liberação lenta, que indica sustentação da liberação do fármaco (parâmetro B e constante cinética beta). A liberação rápida pode ser associada ao fármaco adsorvido à superfície da micropartícula (indicado nas análises de FTIR, DRX e DSC), enquanto que a liberação lenta

pode ser referente ao fármaco presente no interior das cadeias poliméricas (CRUZ et al., 2010).

A fim de elucidar o mecanismo de liberação do fármaco, os dados foram analisados pelo modelo de Korsmeyer-Peppas. Nesse modelo, a determinação do valor exponencial n pode prever o mecanismo de liberação. Para sistemas de liberação com geometria esférica, um valor de n inferior a 0,43 indica que a liberação é controlada por difusão (transporte Fickiano). Quando n é superior a 0,85, a liberação se dá por erosão do polímero (transporte caso II ou mecanismo de transporte não-Fickiano). Enquanto valores entre 0,43 e 0,85 indicam transporte anômalo, com características dos dois mecanismos (ARCE VELASQUEZ et al., 2014; CRUZ et al., 2010).

Todas as micropartículas, em pH 1,5 ou 6,8, apresentaram n inferior a 0,43, exceto a M3 em pH 6,8, cujo valor de n (em negrito) se encontra entre 0,43 e 0,85, como mostra a Tabela 16.

Dessa forma, apenas a M3 exibiu uma combinação dos dois mecanismos de liberação, caracterizando um transporte anômalo. As demais partículas, a liberação é controlada por difusão (transporte Fickiano).

TABELA 16: RESULTADOS OBTIDOS PARA O MODELO DE KORSMEYER-PEPPAS

KORSMEYER PEPPAS	pH 1,5 (0 a 2 horas)		pH 6,8 (0 a 6 horas)	
	r	n	r	n
EFV	0,9954	0,2120	0,9546	0,3307
M1	0,9939	0,1809	0,6622	0,1619
M2	0,9974	0,0973	0,8755	0,2448
M3	0,9995	0,1088	0,9078	0,7100
M4	0,9872	0,0954	0,9081	0,4230

5.1.6 Avaliação *in vivo*

5.1.6.1 Teste Piloto

O teste piloto foi realizado a fim de investigar e selecionar a melhor combinação entre concentração de EFV e tempo de tratamento para que haja alteração nos parâmetros bioquímicos para, então, proceder a avaliação bioquímica com a micropartícula.

Para o grupo controle, os resultados de colesterol, HDL e LDL obtidos estão em concordância com os encontrados por Santos et al. (2010). AST e ALT estão próximos aos valores do Biotério do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da

Paraíba (2006) (BRANCO et al., 2011). Os níveis de triglicerídeos encontrado no teste piloto estão dentro da faixa do estudo realizado por Melo et al. (2012).

A Tabela 17 sumariza os resultados do teste piloto para o grupo controle e os grupos de tratamento.

TABELA 17: RESULTADOS (MÉDIA $\pm$ DP) DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO TESTE PILOTO

	COL (mg.dL ⁻¹)	LDL (mg.dL ⁻¹)	HDL (mg.dL ⁻¹)	TRI (mg.dL ⁻¹)	AST (U.L ⁻¹)	ALT (U.L ⁻¹)
Controle	76,00 $\pm$ 7,33	23,67 $\pm$ 10,63	40,33 $\pm$ 10,02	68,50 $\pm$ 11,35	68,00 $\pm$ 6,41	68,33 $\pm$ 11,08
20 mg.kg⁻¹						
7 dias	115,00 $\pm$ 0,87*	33,00 $\pm$ 17,14	58,33 $\pm$ 4,95*	141,67 $\pm$ 23,65*	63,33 $\pm$ 4,84	58,00 $\pm$ 7,52
14 dias	115,00 $\pm$ 16,59*	34,33 $\pm$ 20,66	58,33 $\pm$ 18,88	111,00 $\pm$ 24,72	49,00 $\pm$ 14,29	50,33 $\pm$ 10,00
100 mg.kg⁻¹						
7 dias	110,00 $\pm$ 11,17*	39,67 $\pm$ 18,58*	52,00 $\pm$ 8,38*	92,00 $\pm$ 15,41	58,67 $\pm$ 9,69	57,33 $\pm$ 4,39
14 dias	96,33 $\pm$ 2,61*	31,33 $\pm$ 1,84*	49,33 $\pm$ 3,10*	78,00 $\pm$ 6,66	61,67 $\pm$ 2,48	58,33 $\pm$ 2,62
200 mg.kg⁻¹						
7 dias	116,67 $\pm$ 20,33*	48,33 $\pm$ 24,68*	53,33 $\pm$ 12,76*	90,00 $\pm$ 12,57	66,67 $\pm$ 13,86	61,33 $\pm$ 18,90
14 dias	125,33 $\pm$ 3,77*	50,00 $\pm$ 4,00*	60,00 $\pm$ 2,89*	78,33 $\pm$ 9,57	61,00 $\pm$ 15,40	59,33 $\pm$ 4,28

Onde: DP: desvio padrão; COL: colesterol; TRI: triglicerídeos; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase. Controle: grupo tratado com salina. O símbolo * representa diferença estatística em relação ao grupo controle. Para cada grupo o n amostral foi igual a 3.

Considerando os valores do grupo controle como 100%, o tratamento com EFV 20 mg.kg⁻¹ aumentou os níveis de colesterol total e triglicerídeos em até 51,32% e 106,82%, respectivamente, em relação ao controle.

Com a concentração de 100 mg.kg⁻¹ observou-se, após 7 dias, os maiores aumentos nos níveis de colesterol (44,74%), LDL (67,60%) e HDL (28,94%).

Para a concentração de 200 mg.kg⁻¹, os maiores aumentos foram vistos após 14 dias de tratamento, sendo colesterol (64,71%), LDL (111,24%) e HDL (48,77%).

Embora as concentrações de 100 e 200 mg.kg⁻¹ aumentaram os níveis de triglicerídeos em 34,31% e 31,39%, não houve diferença estatística em relação ao controle. É possível que isso tenha ocorrido devido ao baixo n amostral.

Nota-se que, para todas as concentrações de EFV, o tempo de 14 dias não mostrou diferença em relação ao tempo de 7 dias. Logo, foi selecionada a menor concentração de EFV capaz de alterar mais parâmetros (100 mg.kg⁻¹) e o menor tempo de tratamento (7 dias).

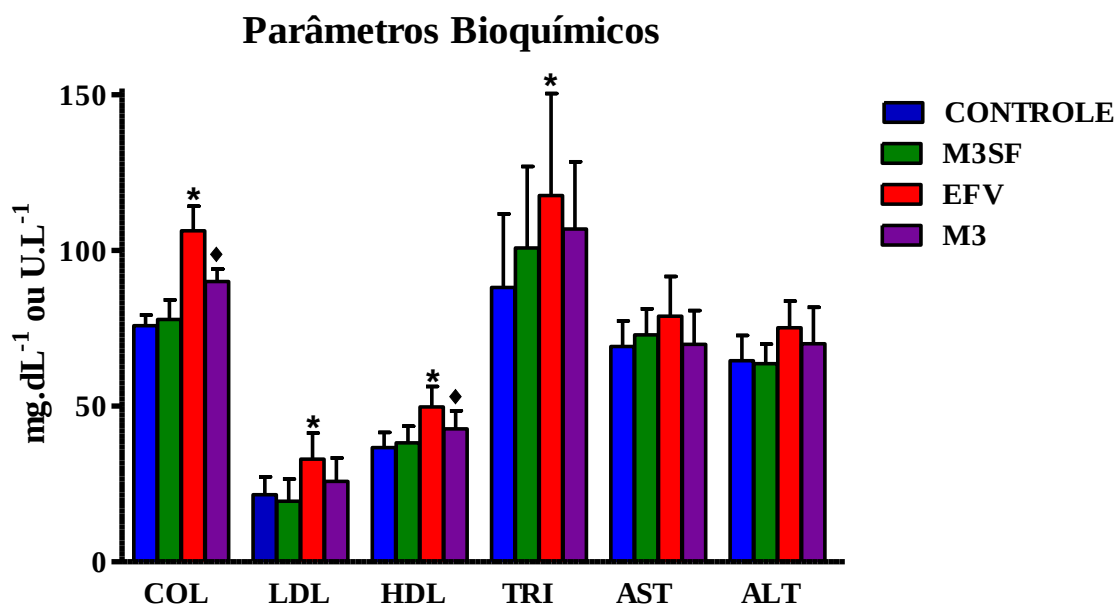
Os níveis de GGT não puderam ser dosados e foram excluídos da avaliação bioquímica.

5.1.6.2 Avaliação Bioquímica

Os níveis dosados no grupo controle e no grupo tratado com EFV (100 mg.kg⁻¹), desta etapa, foram condizentes com os valores obtidos para os respectivos grupos do teste piloto.

A Figura 51 mostra a representação gráfica dos níveis bioquímicos avaliados.

FIGURA 51: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS AVALIADOS



Onde: COL, LDL, HDL e TRI são expressos em mg.dL⁻¹; AST e ALT expressos em U.L⁻¹. Os símbolos * e ♦ representam diferença estatística em relação ao grupo controle e são estatisticamente diferentes entre si.

Os resultados apresentados pelos grupos estão expostos na Tabela 18.

TABELA 18: RESULTADOS (MÉDIA ± DP) DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

	COL (mg.dL ⁻¹)	LDL (mg.dL ⁻¹)	HDL (mg.dL ⁻¹)	TRI (mg.dL ⁻¹)	AST (U.L ⁻¹)	ALT (U.L ⁻¹)
Controle	75,89 ± 3,44	21,60 ± 5,66	36,67 ± 4,87	88,11 ± 23,63	69,22 ± 8,14	64,67 ± 8,05
M3SF	77,89 ± 6,21	19,51 ± 7,11	38,22 ± 5,33	100,78 ± 26,23	72,89 ± 8,36	63,67 ± 6,30
EFV	106,33 ± 7,87*	33,02 ± 8,40*	49,78 ± 6,59*	117,67 ± 32,75*	78,89 ± 12,75	75,22 ± 8,57
M3	90,00 ± 4,02♦	25,87 ± 7,53	42,75 ± 5,82♦	106,92 ± 21,61	69,83 ± 10,84	70,00 ± 11,75

Onde: DP: desvio padrão; COL: colesterol; TRI: triglicerídeos; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase. Controle: grupo tratado com salina; M3SF: grupo tratado com micropartícula M3 sem fármaco; EFV: grupo tratado com EFV 100 mg.kg⁻¹; M3: grupo tratado com micropartícula M3 em concentração equivalente a EFV 100 mg.kg⁻¹. Os símbolos * e ♦ representam diferença estatística em relação ao grupo controle e são estatisticamente diferentes entre si.

Não houve diferença estatística entre os grupos controle e M3SF em nenhum dos parâmetros avaliados, mostrando que não houve interferência dos polímeros nos parâmetros bioquímicos dosados.

Considerando os valores do grupo controle como 100%, o tratamento com EFV 100 mg.kg⁻¹ alterou os parâmetros avaliados, exceto AST e ALT, com aumentos significativos: colesterol (40,12%), LDL (52,88%), HDL (35,76%) e triglicerídeos (33,54%).

O grupo tratado com M3 apresentou elevação significativa nos níveis de colesterol (18,59%) e HDL (16,59%), quando comparados ao grupo controle. Entretanto, estes aumentos foram estatisticamente menores em relação ao grupo EFV. Dessa forma, houve redução de 21,53% nos níveis de colesterol, em relação ao grupo que recebeu o fármaco puro. Os demais parâmetros não foram estatisticamente diferentes do grupo controle, ou seja, o grupo tratado com M3 não apresentou elevações nos níveis de triglicerídeos e LDL como o grupo que recebeu o fármaco puro.

As dosagens das enzimas AST e ALT foram semelhantes nos quatro grupos avaliados, não apresentando diferença estatística.

Em estudo com olanzapina, Dimer et al. (2014) mostraram que houve redução significativa nos níveis de colesterol total em ratos tratados com o fármaco nanoencapsulado, quando comparados àqueles que receberam o fármaco livre.

Os resultados sugerem que a incorporação de EFV às micropartículas poliméricas contribuiu para a redução dos níveis plasmáticos de colesterol, LDL, HDL e triglicerídeos, após tratamento em ratos, quando comparados ao tratamento com fármaco puro. Esse resultado pode ser associado ao fato das micropartículas aumentarem a solubilidade e a biodisponibilidade do fármaco, facilitando, dessa forma, sua absorção e diminuindo a concentração de fármaco livre.

5.1.7 Estabilidade

Durante o período avaliado, as micropartículas não apresentaram alterações de cor e odor, porém, mostraram-se mais aglomeradas e úmidas com o passar do tempo.

A Tabela 19 mostra o doseamento das micropartículas, em triplicata, durante os períodos avaliados. Teste Tukey de ANOVA ($p > 0,05$) foi aplicado para avaliar se houve diferença estatística no doseamento de fármaco.

TABELA 19: DOSEAMENTO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$ DAS MICROPARTÍCULAS SUBMETIDAS AO TESTE DE ESTABILIDADE

	0 DIA (MÉDIA $\pm$ DPR)	30 DIAS (MÉDIA $\pm$ DPR)	60 DIAS (MÉDIA $\pm$ DPR)	90 DIAS (MÉDIA $\pm$ DPR)	180 DIAS (MÉDIA $\pm$ DPR)
M1.1	21,70 $\pm$ 1,82	19,10 $\pm$ 0,16	18,65 $\pm$ 2,09	19,46 $\pm$ 1,60	17,80 $\pm$ 1,30
M1.2	18,01 $\pm$ 1,51	19,04 $\pm$ 1,68	18,30 $\pm$ 0,76	18,03 $\pm$ 3,72	20,75 $\pm$ 3,42
M1.3	22,84 $\pm$ 4,17	19,55 $\pm$ 0,96	18,95 $\pm$ 0,20	18,36 $\pm$ 0,82	19,62 $\pm$ 0,53
M2.1	18,53 $\pm$ 1,65	19,01 $\pm$ 0,99	19,16 $\pm$ 1,83	21,15 $\pm$ 0,05	19,53 $\pm$ 2,24
M2.2	18,61 $\pm$ 2,67	17,97 $\pm$ 1,25	18,82 $\pm$ 0,29	20,86 $\pm$ 2,50	20,21 $\pm$ 2,20
M2.3	22,41 $\pm$ 1,46	17,99 $\pm$ 1,77	18,63 $\pm$ 1,30	21,45 $\pm$ 0,56	20,66 $\pm$ 0,27
M3.1	20,08 $\pm$ 3,60	16,69 $\pm$ 2,96	19,84 $\pm$ 1,78	18,60 $\pm$ 3,36	20,99 $\pm$ 3,06
M3.2	19,78 $\pm$ 0,95	18,69 $\pm$ 1,26	19,96 $\pm$ 0,28	18,42 $\pm$ 0,25	18,28 $\pm$ 0,34
M3.3	23,08 $\pm$ 1,21	18,60 $\pm$ 0,47	18,78 $\pm$ 0,15	18,56 $\pm$ 0,13	19,88 $\pm$ 1,10
M4.1	18,18 $\pm$ 1,04	18,43 $\pm$ 0,22	19,96 $\pm$ 0,28	19,13 $\pm$ 1,39	18,32 $\pm$ 0,16
M4.2	21,13 $\pm$ 0,97	19,91 $\pm$ 0,59	20,48 $\pm$ 1,21	18,84 $\pm$ 1,34	19,34 $\pm$ 0,95
M4.3	19,42 $\pm$ 4,35	18,07 $\pm$ 0,01	18,58 $\pm$ 0,70	19,64 $\pm$ 0,16	19,16 $\pm$ 0,14
EFV1	23,97 $\pm$ 0,23	20,21 $\pm$ 1,02	20,22 $\pm$ 1,50	21,85 $\pm$ 0,23	20,54 $\pm$ 0,07
EFV2	23,94 $\pm$ 0,92	20,07 $\pm$ 1,28	20,01 $\pm$ 0,83	19,92 $\pm$ 1,12	20,02 $\pm$ 1,17
EFV3	24,01 $\pm$ 2,03	20,36 $\pm$ 1,77*	20,43 $\pm$ 0,50*	20,10 $\pm$ 0,39*	20,89 $\pm$ 1,35*

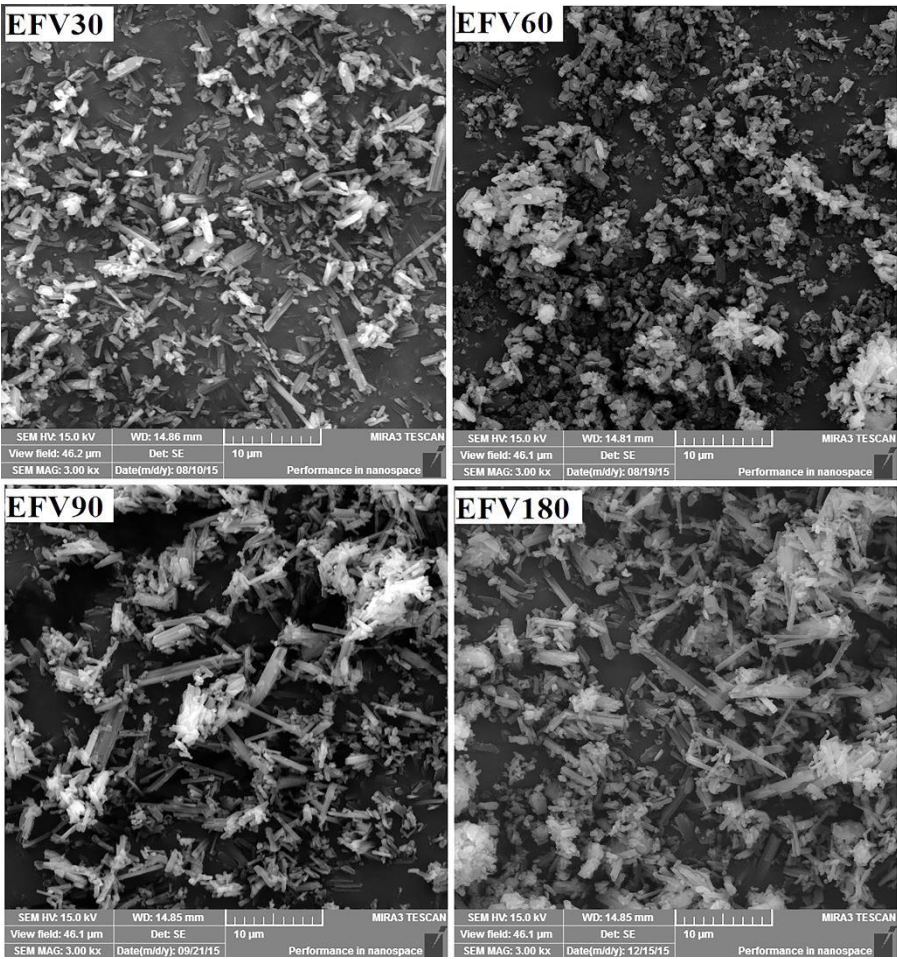
Onde: média expressa em $\mu\text{g.mL}^{-1}$; DPR: desvio padrão relativo. O símbolo * representa diferença estatística em relação ao grupo 0 DIA.

O fármaco apresentou um leve decaimento no teor, mostrando diferença estatística quando comparado com o valor inicial (0 dia).

As micropartículas não mostraram mudança significativa no teor de EFV durante o período avaliado.

Por meio das eletromicrografias FEG-SEM é possível visualizar que não houve alterações morfológicas no fármaco ou nas micropartículas durante o período do estudo de estabilidade. Entretanto, as micropartículas mostraram-se mais aglomeradas, como mostram as Figuras 52 a 56.

FIGURA 52: ELETROMICROGRAFIA FEG-SEM DO EFV – ESTABILIDADE (3000X)



Onde: 30, 60, 90 e 180 representam os dias em que as amostras foram analisadas, a contar do início do estudo.

FIGURA 53: ELETROMICROGRAFIA FEG-SEM DA M1 (ESTABILIDADE)

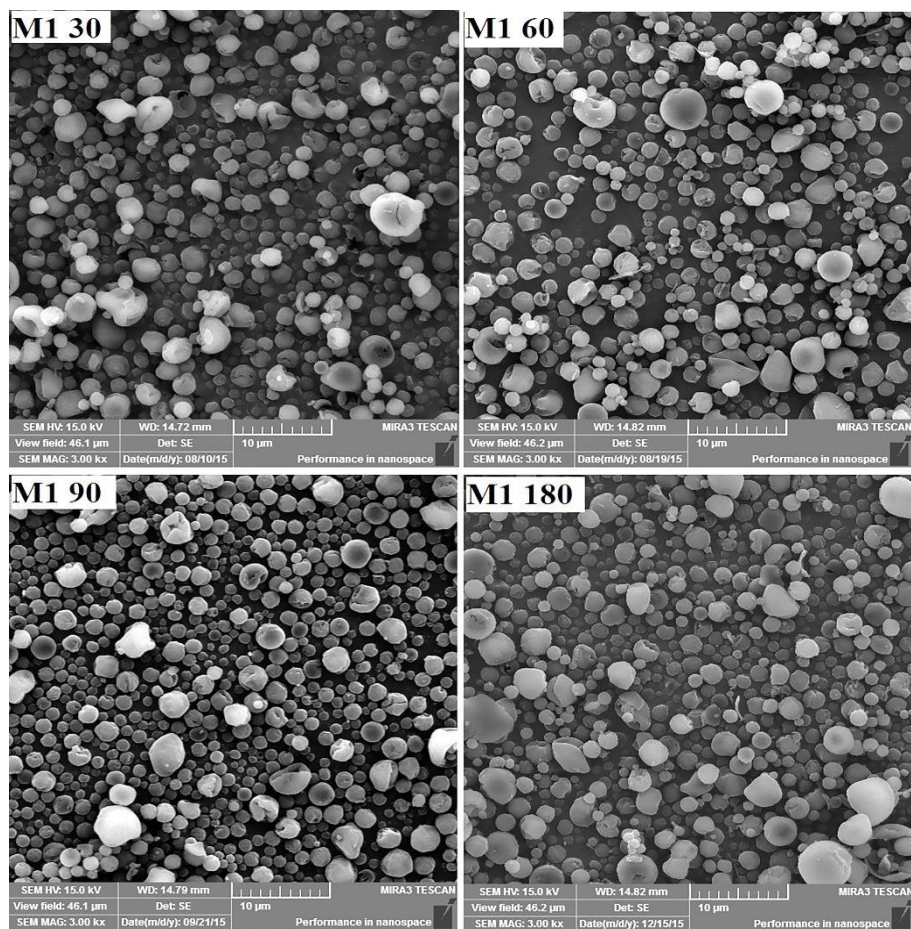
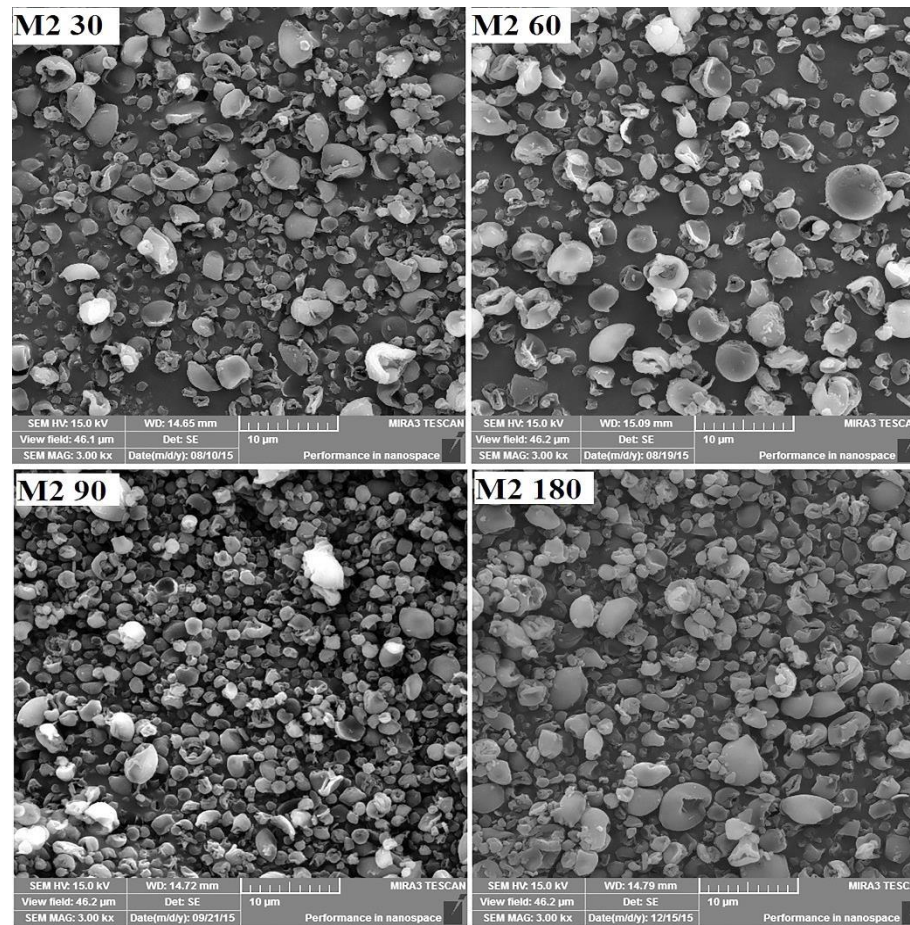


FIGURA 54: ELETROMICROGRAFIA FEG-SEM DA M2 (ESTABILIDADE)



Eletromicrografias obtidas em aumento de 3000X, onde: 30, 60, 90 e 180 representam os dias em que as amostras foram analisadas, a contar do início do estudo.

FIGURA 55: ELETROMICROGRAFIA FEG-SEM DA M3 (ESTABILIDADE)

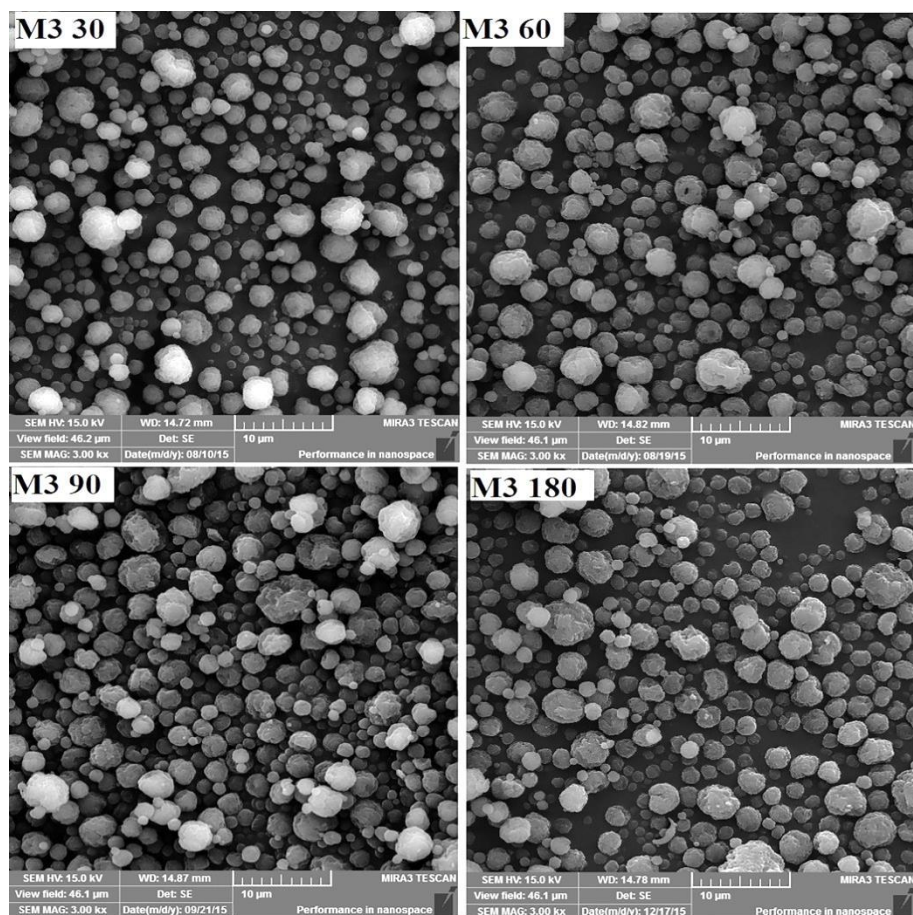
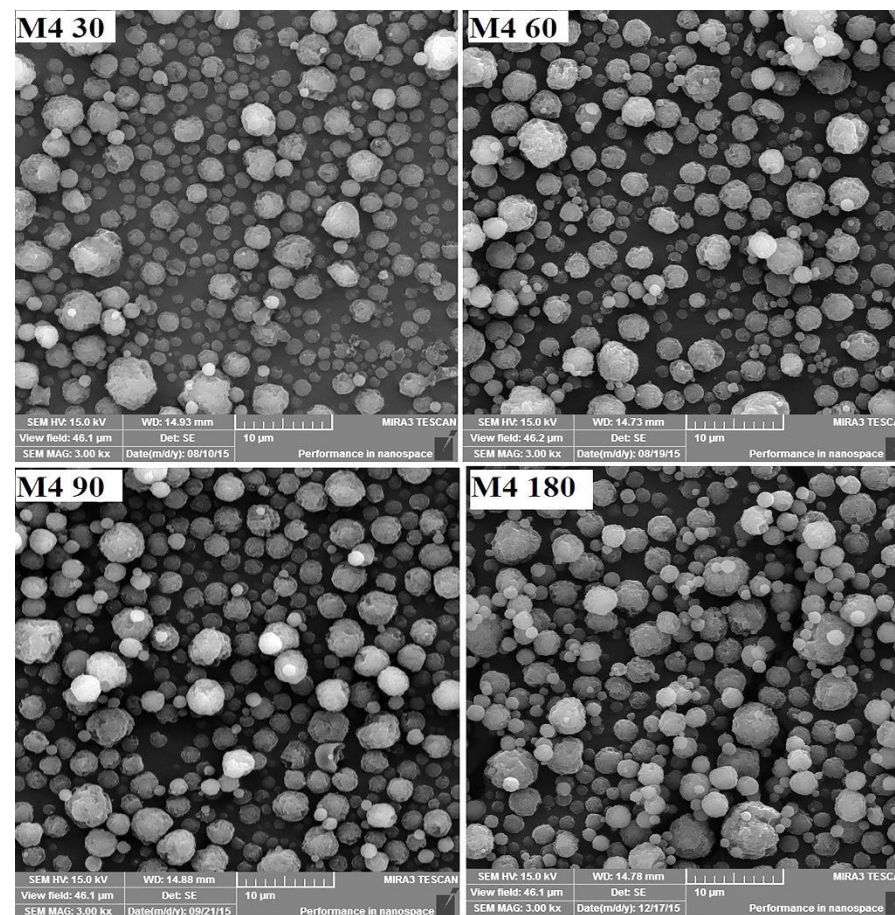


FIGURA 56: ELETROMICROGRAFIA FEG-SEM DA M4 (ESTABILIDADE)



Eletromicrografias obtidas em aumento de 3000X, onde: 30, 60, 90 e 180 representam os dias em que as amostras foram analisadas, a contar do início do estudo.

Também foram realizadas análises térmicas (DSC e TG) a fim de identificar possíveis alterações de estabilidade.

Os termogramas (Figura 57) mostram não houve diferença na faixa de fusão do fármaco e nos decaimentos das curvas termogravimétricas, sugerindo que não houve formação de novos produtos e, conseqüentemente, perda da estabilidade.

Os Δm foram calculados e estão expostos na Tabela 20.

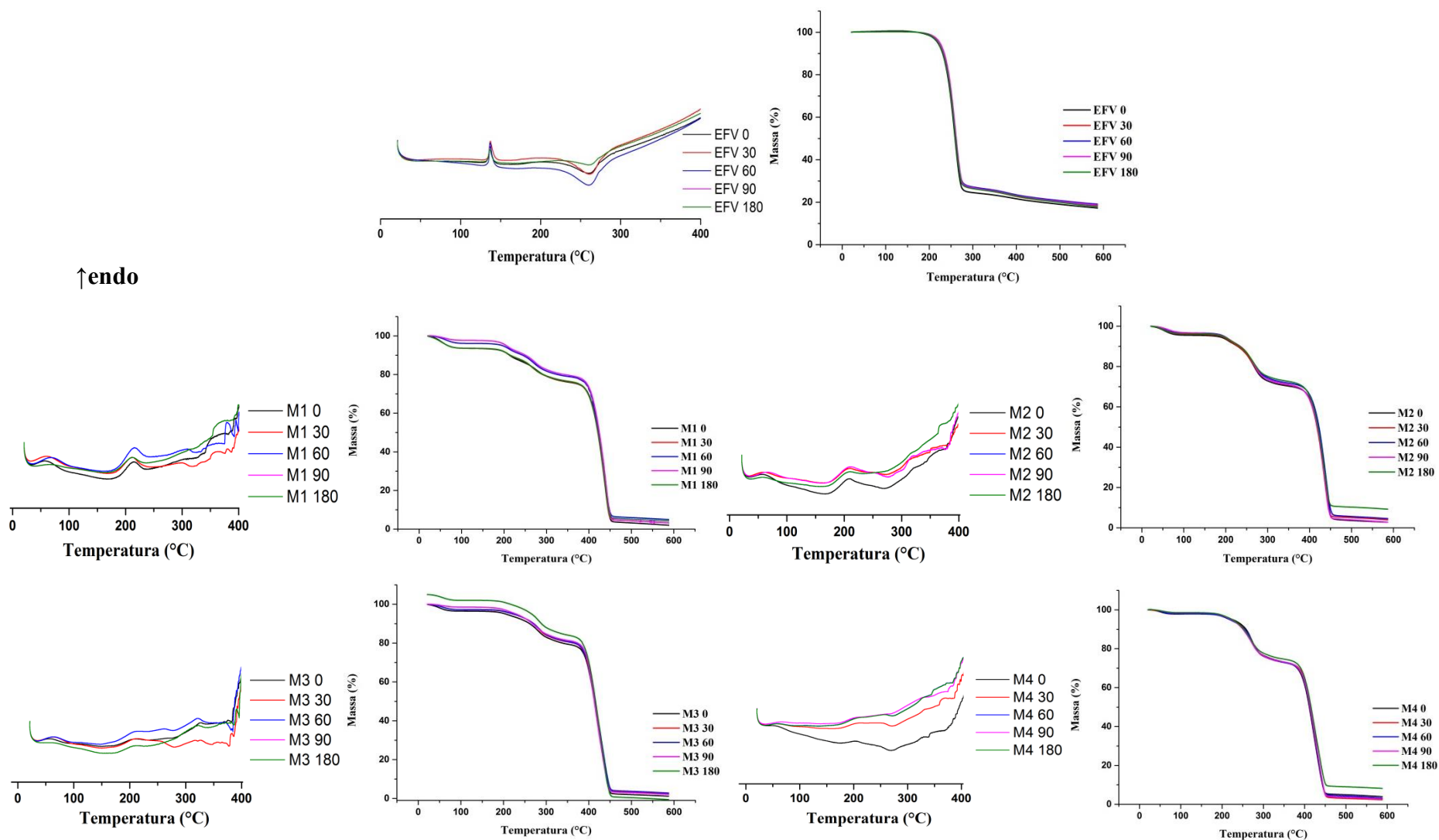
TABELA 20: PERCENTUAIS DE VARIAÇÃO DE MASSA (Δm) DAS AMOSTRAS ANALISADAS DURANTE O ESTUDO DE ESTABILIDADE

AMOSTRA	Δm_1 (%) 20 – 100 °C	Δm_2 (%) 180 – 300 °C	Δm_3 (%) 350 – 460 °C
EFV 0	-	82,16	-
EFV 30	-	81,68	-
EFV 60	-	82,68	-
EFV 90	-	81,50	-
EFV 180	-	81,98	-
M1 0	6,18	17,94	95,50
M1 30	5,88	18,14	94,16
M1 60	3,71	17,13	91,94
M1 90	2,33	17,09	94,23
M1 180	6,38	17,28	92,98
M2 0	3,66	24,50	94,26
M2 30	3,82	24,52	92,23
M2 60	3,32	23,92	91,83
M2 90	3,07	26,00	93,72
M2 180	3,61	23,15	85,08
M3 0	3,15	17,68	97,02
M3 30	2,81	16,42	95,86
M3 60	2,69	16,93	95,22
M3 90	1,33	17,33	96,05
M3 180	2,93	18,22	94,51
M4 0	2,16	24,98	92,82
M4 30	1,91	25,27	95,30
M4 60	2,36	25,30	93,61
M4 90	1,64	25,54	94,80
M4 180	1,44	23,93	87,58

Como pode ser observado na tabela acima, não houve discrepância nos valores percentuais de Δm durante o período analisado, bem como não houve formação de novos produtos ou alterações nas curvas analisadas, sugerindo que não houve perda de estabilidade com a incorporação de EFV nas micropartículas poliméricas.

A Figura 57 mostra o comparativo das curvas de DSC e TG para as amostras avaliadas.

FIGURA 57: CURVAS DSC E TG DAS AMOSTRAS SUBMETIDAS AO ESTUDO DE ESTABILIDADE



Onde: 0, 30, 60, 90 e 180 representam os dias em que as amostras foram analisadas, a contar do início do estudo.

5.1.8 Determinação das Propriedades de Fluxo e de Compactação

A avaliação das propriedades de fluxo e de compactação foi realizada com a formulação selecionada para a avaliação *in vivo*, a micropartícula M3.

O índice de Carr e o fator de Hausner fornecem um resultado indireto da facilidade de escoamento e compressibilidade do pó (GARCIA; PEREIRA; DIAS, 2012; USP, 2006).

O EFV e a M3 foram classificados com base no índice de Carr e Fator de Hausner, segundo a Tabela 21.

TABELA 21: ESCALA PARA AVALIAÇÃO DO FLUXO DE PÓS

CARACTERÍSTICA DO PÓ	ÍNDICE DE CARR	FATOR DE HAUSNER
EXCELENTE	< 10	1,00 – 1,11
BOM	11 – 15	1,12 – 1,18
ACEITÁVEL	16 – 20	1,19 – 1,25
MEDIANO	21 – 25	1,26 – 1,34
DEFICIENTE	26 – 31	1,35 – 1,45
MUITO DEFICIENTE	32 – 37	1,46 – 1,59
PÉSSIMO	>38	> 1,60

Adaptado de USP (2006)

A Tabela 22 exibe os resultados médios obtidos da avaliação das propriedades de fluxo e de compactação, em triplicata.

TABELA 22: RESUMO DAS PROPRIEDADES DE FLUXO E COMPACTAÇÃO DO EFV E M3

PARÂMETROS	EFV (MÉDIA ± DP)	M3 (MÉDIA ± DP)
DENSIDADE APARENTE	0,14 ± 0,01 (g.mL ⁻¹)	0,23 ± 0,02 (g.mL ⁻¹)
DENSIDADE COMPACTADA	0,20 ± 0,02 (g.mL ⁻¹)	0,29 ± 0,02 (g.mL ⁻¹)
ÍNDICE DE CARR	28,85 ± 0,22	19,76 ± 0,34
FATOR DE HAUSNER	1,40 ± 0,00	1,25 ± 0,01
CLASSIFICAÇÃO DO FLUXO	Deficiente	Aceitável

De acordo com o índice de Carr e o fator de Hausner, o fluxo do EFV foi classificado como deficiente. A baixa densidade apresentada pelo EFV juntamente com sua afinidade e aderência em superfícies foi relatada em outros trabalhos (ALVES, 2010; VIANA et al. 2006).

A M3 mostrou melhora na densidade e, segundo os parâmetros avaliados, foi classificada como fluxo aceitável. Foi observado que a micropartícula apresentou bem menos aderência a superfícies que o fármaco puro. Tais características podem facilitar o escoamento do produto nas máquinas, reduzindo o tempo e a perda de material (GARCIA; PEREIRA; DIAS, 2012).

6 CONCLUSÃO

- As micropartículas contendo EFV foram obtidas com sucesso, utilizando os polímeros Eudragit[®] L100 e Eudragit[®] S100, por *spray drying*;
- O método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência desenvolvido foi válido para quantificação do EFV puro e nas micropartículas desenvolvidas, sendo um método simples, específico, linear, preciso, exato e robusto, com picos bem definidos e de boa resolução, representando uma alternativa para a rotina laboratorial;
- As micropartículas preparadas em etanol:água (50:50, V/V) apresentaram boa morfologia e teor de fármaco adequado, enquanto as preparadas em etanol:tampão (50:50, V/V) mostraram-se distorcidas, achatadas e com baixo teor de fármaco, pelo método avaliado;
- Todas as formulações deram origem a micropartículas de tamanho reduzido, com rendimento, umidade e potencial zeta adequados;
- A formação das micropartículas não alterou quimicamente as estruturas dos componentes iniciais, contudo, nas micropartículas de M5 a M8 pode-se observar alargamento e aumento da intensidade de bandas no espectro FTIR;
- O processo de obtenção das micropartículas promoveu a amorfização do fármaco, comprovado pelos estudos de FEG-SEM, DRX e DSC;
- As micropartículas M3 e M4 proporcionaram um aumento considerável na disponibilidade do fármaco em pH 6,8;
- A micropartícula M3, em pH 1,5, controlou a liberação do fármaco; enquanto que em pH 6,8 foi capaz de liberar maior quantidade de ativo, resultando no melhor perfil de liberação;
- Os animais submetidos à administração de M3 apresentaram menos alterações nos parâmetros bioquímicos, quando comparados ao grupo que recebeu tratamento com fármaco livre, sugerindo que as micropartículas contribuíram para redução dos efeitos colaterais observados nos níveis bioquímicos;
- As análises DSC e TG mostraram que não houve alteração e degradação das micropartículas submetidas ao estudo de estabilidade acelerada;
- A micropartícula M3 apresentou melhores propriedades de fluxo e de compactação, características que melhoram o escoamento e facilitam a rotina industrial.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M. et al. Pharmaceutical microencapsulation technology for development of controlled release drug delivery systems. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 5, p.254-257, 2011.
- ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science**, v. 303, n. 5665, p.1818-1822, 2004.
- ALVES, L. D. S. **Desenvolvimento de dispersões sólidas binárias visando o incremento da solubilidade aquosa do antirretroviral efavirenz**. 2010. 133 f. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica). Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, PE, 2010.
- ALVES, L. D. S. et al. Solid dispersion of efavirenz in PVP K-30 by conventional solvent and kneading methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 104, p.166-174, 2014.
- ANSEL, H. C.; ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9ª ed. São Paulo:Artmed Editora, 2013. 716 p.
- ARCE VELASQUEZ, A. D. et al. Novel Pullulan-Eudragit® S100 blend microparticles for oral delivery of risedronate: Formulation, in vitro evaluation and tableting of blend microparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 38, p.212-217, 2014.
- AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2ª ed. São Paulo:Artmed, 2005. 677 p.
- BEDOR, D. C. G. **Avaliação biofarmacotécnica do Efavirenz um fármaco classe II (SCB)**. 2011. 184.f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pernambuco, Recife, PE, 2011.
- BIKIARIS, D. et al. Physicochemical studies on solid dispersions of poorly water-soluble drugs: evaluation of capabilities and limitations of thermal analysis techniques. **Thermochimica Acta**, v. 439, n. 1, p.58-67, 2005.
- BIRNBAUM, D. T.; BRANNON-PEPPAS, L. Microparticle drug delivery systems. In: (Ed.). **Drug Delivery Systems in Cancer Therapy**: Springer, 2004. p.117-135.
- BRANCO, A. C. S. C. et al. Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 2, p. 209-214, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA. Resolução R.E. 899 de 29 de Maio de 2003. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA. Farmacopeia Brasileira. 5ª ed. v.1, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA. Resolução RDC nº 45 de 9 de Agosto de 2012. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico HIV AIDS. Ano IV, n. 1. Brasília, 2015. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2015/58534/boletim_aids_11_2015_web_pdf_19105.pdf>. Acesso em 10/01/2016.

BRITO, C. J. et al. O papel do exercício na era da terapia anti-retroviral fortemente ativa. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 18, n. 4, p.109-116, 2010.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. R. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12ª ed. McGraw Hill Brasil, 2012. 2112 p.

CHIAPPETTA, D. A. et al. Efavirenz-loaded polymeric micelles for pediatric anti-HIV pharmacotherapy with significantly higher oral bioavailability. **Nanomedicine** (London, England), v. 5, n. 1, p.11-23, 2010.

CHIAPPETTA, D. A. et al. Oral pharmacokinetics of the anti-HIV efavirenz encapsulated within polymeric micelles. **Biomaterials**, v. 32, n. 9, p.2379-2387, 2011.

CHINEN, J.; SHEARER, W. T. Secondary immunodeficiencies, including HIV infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n.2, p. 195-203, 2010.

CHRISTO, P. P. Alterações cognitivas na infecção pelo HIV e AIDS. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 2, p. 242-247, 2010.

COSTA, M. D. **Desenvolvimento e avaliação de sistemas incrementadores de dissolução de efavirenz**. 2011. 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2011.

COUVREUR, P. et al. 1982. Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II. Doxorubicin-loaded nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, p. 790-792, 1982.

CRUZ, L. et al. Gastroresistant microparticles containing sodium alendronate prevent the bone loss in ovariectomized rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, p.441-447, 2010.

CUNICO, W.; GOMES, C. R.; VELLASCO JUNIOR, W. T. HIV - recentes avanços na pesquisa de fármacos. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p.2111-2117, 2008.

DEW, M. et al. An oral preparation to release drugs in the human colon. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 14, n. 3, p.405-408, 1982.

DIMER, F. A. et al. Nanoencapsulation of olanzapine increases its efficacy in antipsychotic treatment and reduces adverse effects. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 6, p.1137-1145, 2014.

EL-KAMEL, A. et al. Preparation and evaluation of ketoprofen floating oral delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 220, p.13-21, 2001.

EMA. European Medicines Agency. **Efavirenz Teva: EPAR Anexo I - Resumo das Características do Medicamento**, 2013. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002352/WC500121447.pdf>. Acesso em 19/05/2014.

ESPOSITO, E. et al. Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n. 1, p.329-334, 2002.

FARAGO, P. V. **Desenvolvimento de sistemas poliméricos para a liberação modificada do cloridrato de metformina**. 2007. 195 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007.

FAYAD, S. J. **Obtenção e caracterização de micro e nanopartículas a base de proteína isolada de soja**. 2010. 106.f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2010.

FORTUNATO, K. A. et al. Influência da Complexação com β -ciclodextrina sobre a Liberação do Acetato de Dexametasona a partir de Matrízes Hidrofílicas de Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e Polioxetileno (PEO). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 4, p.513-521, 2007.

FRANGE, R.; GARCIA, M. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p.263-271, 2009.

FREIRE, A. C. et al. Liberação específica de fármacos no colon por via oral. II -Tipos de sistemas utilizados. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 3, p.337-355, 2006.

GALLICANO, K. Antiretroviral-Drug Concentration in Semen. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n.4, p. 1117-1118, 2000.

GARCIA, A. Q. R.; PEREIRA, T. C. B.; DIAS, I. L. T. Estudo das propriedades de fluxo no desenvolvimento de paracetamol pó veiculado em sachê. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 4, p.469-475, 2012.

GEOCZE, L. et al. Qualidade de vida e adesão ao tratamento anti-retroviral de pacientes portadores de HIV. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 4, p. 743-749, 2010.

GOMES, M. L. S. et al. A Simple RP-HPLC/UV Method for Determination of Cilostazol in Polymeric Nanoparticles Suspensions: Development and Validation. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 34, n. 4, p.803-809, 2015a.

GOMES, T. A. et al. Estratégias utilizadas para o incremento da solubilidade do fármaco antiretroviral classe II: Efavirenz. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 2, p.239-249, 2015b.

GRANGEIRO, A. et al. The HIV-Brazil cohort study: design, methods and participant characteristics. **Public Library of Science**, v. 9, 2014.

HADAD, G. M.; EMARA, S.; MAHMOUD, W. M. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the determination of paracetamol with dantrolene or/and cetirizine and pseudoephedrine in two pharmaceutical dosage forms. **Talanta**, v. 79, n. 5, p.1360-1367, 2009.

HEGAZY, N.; DEMIREL, M. Z.; YAZAN, Y. Preparation and in vitro evaluation of pyridostigmine bromide microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n. 1, p.171-174, 2002.

ICH. International Conference on the Harmonisation of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use guideline, **Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1)**, v. 1, 2005.

KAWABATA, Y. et al. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p.1-10, 2011.

KHAN, K. The concept of dissolution efficiency. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 27, n. 1, p.48-49, 1975.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; DE MELLO, J. C. P. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of Paullinia cupana var. sorbilis (guaraná). **Talanta**, v. 88, p.502-506, 2012.

KULKARNI, N. B.; NAIK, P. S. W. J. B. Metformin hydrochloride microparticles for oral controlled release: Effect of formulation variables. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, 2013.

KUMAR, M. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p.234-258, 2000.

LAGO, V. V.; PEREIRA, R. N.; BERTOL, C. D. Propriedades micromeríticas e análise físico-química de matérias-primas de alopurinol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p.385-393, 2012.

LIBERMAN, H. A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. **Pharmaceutical dosage forms: disperse systems**. ed. New York: 1989. 489 p.

MADHAVI, B. B. et al. Dissolution enhancement of efavirenz by solid dispersion and PEGylation techniques. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 1, p.29-34, 2011.

MADHUSUDHAN, A. et al. Design and evaluation of Efavirenz loaded solid lipid nanoparticles to improve the oral bioavailability. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 4, p.84-89, 2012.

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

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, p.375-399, 2002.

MARZOLINI, C. et al. Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. **Aids**, v. 15, n. 1, p.71-75, 2001.

MAURIN, M. et al. Kinetics and mechanism of hydrolysis of efavirenz. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 4, p.517-521, 2002.

MAX, B.; SHERER, R. Management of the adverse effects of antiretroviral therapy and medication adherence. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p.96-116, 2000.

MELO, M. G. D. et al. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n.4, p. 1-6, 2012.

MENDES, J. B. E. **Desenvolvimento e avaliação de micropartículas poliméricas contendo resveratrol**. 2011. 88.f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, 2011.

OJEWOLE, E. et al. Exploring the use of novel drug delivery systems for antiretroviral drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, p.697-710, 2008.

OLIVEIRA, W. O.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.4, p. 641-650, 2009.

PATEL, G. V. et al. Nanosuspension of efavirenz for improved oral bioavailability: formulation optimization, *in vitro*, *in situ* and *in vivo* evaluation. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 40, p.80-91, 2013.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, p.447-451, 2001.

PIMENTEL, L. F. et al. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, p.503-514, 2007.

PINTO, E. C. **Estudo de dissolução intrínseca de efavirenz como ferramenta para antecipação de sua biodisponibilidade**. 2012. 158.f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2012.

POHLMANN, A. R. et al. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 4, p.305-312, 2002.

PORCHE, D. J. Efavirenz. **Journal of the Association of Nurses in AIDS Care**, v. 11, n. 3, p.95-98, 2000.

PUORRO, A. T. **Impactos das políticas públicas sobre as patentes dos antirretrovirais para a sustentabilidade do programa de distribuição universal pelo SUS no Brasil**. 201. 85 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste). Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

RAFFIN, R. et al. Development of HPMC and Eudragit S100[®] blended microparticles containing sodium pantoprazole. **Pharmazie**, v. 62, n. 5, p.361-364, 2007a.

RAFFIN, R. et al. Gastro-resistant microparticles containing sodium pantoprazole: stability studies and *in vivo* anti-ulcer activity. **The Open Drug Delivery Journal**, v. 1, p.28-35, 2007b.

RESTANI, R. B. et al. Development of functional mesoporous microparticles for controlled drug delivery. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p.333-339, 2010.

RIEKES, M. K. P. et al. Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 5, p.962-968, 2011.

SAKS, S. R.; GARDNER, L. B. The pharmacoeconomic value of controlled-release dosage forms. **Journal of Controlled Release**, v. 48, p.237-242, 1997.

SANTOS; M. R. V. et al. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 6, n. 10, p. 1-6, 2010.

SATHIGARI, S. et al. Physicochemical characterization of efavirenz-cyclodextrin inclusion complexes. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, p.81-87, 2009.

SEREMETA, K. P.; CHIAPPETTA, D. A.; SOSNIK, A. Poly(epsilon-caprolactone), Eudragit(R) RS 100 and poly(epsilon-caprolactone)/Eudragit(R) RS 100 blend submicron particles for the sustained release of the antiretroviral efavirenz. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 102, p.441-449, 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª ed. Rio de Janeiro, RJ:LTC editora, 2006.

SOARES, L. A. L. **Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek – Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final**. 2002. 285 f. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 2002.

SOLLOHUB, K.; CAL, K. Spray drying technique: II. Current applications in pharmaceutical technology. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p.587-597, 2009.

SOSNIK, A.; SEREMETA, K. P. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 223, p.40-54, 2015.

STORPIRTIS, S. et al. O Sistema de Classificação Biofarmacêutica e as Bioisenções. In: (Ed.). **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. cap. 18, p.187-201.

THE BIOLOGY PROJECT. The Replication Cycle of HIV. Arizona, 2000. Disponível em: <<http://www.biology.arizona.edu/immunology/tutorials/AIDS/treatment.html>>. Acesso em 31/05/2014.

TSHWEU, L. et al. Enhanced oral bioavailability of the antiretroviral efavirenz encapsulated in poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles by a spray-drying method. **Nanomedicine (London, England)**, v. 9, n. 12, p.1821-1833, 2013.

UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP 29. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.

VASCONCELOS, E. A. F et al. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil® 200 nas características dos extratos secos por aspersão da Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p.243-249, 2005.

VIANA, O. S. et al. Desenvolvimento de formulações e tecnologia de obtenção de comprimidos revestidos de efavirenz – terapia anti-HIV. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, 2006.

VILLANOVA, J. C.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, p.51-64, 2010.

WALTON, D. The morphology of spray-dried particles a qualitative view. **Drying Technology**, v. 18, n. 9, p.1943-1986, 2000.

WHO, World Health Organization. HIV/AIDS – key facts, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>>. Acesso em: 10/01/2016.

YANG, J.; GREY, K.; DONEY, J. An improved kinetics approach to describe the physical stability of amorphous solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 384, p.24-31, 2010.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 011/2015

Protocolo UEPG – Processo 6955/2015

Título – “Projeto de pesquisa “Desenvolvimento, caracterização e avaliação in vivo de sistemas de liberação microparticulados contendo efavirenz”

Interessado: Paulo Victor Farago

Data de Entrada – 07/05/2015

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – 07/05/2015 a 03/03/2017

Considerações

Prezado Professor Paulo Victor Farago:

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos. Aprovado o uso de 40 ratos machos até 250 g.

Situação: APROVADO.

Ponta Grossa, 21 de maio de 2015.

Atenciosamente,

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROESP - CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

Profª. Dra. Maria Marta Lodi
Coordenadora

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROESP
Fone: (042) 3220-3264