

Odinei Fogolari

**SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PARA LIBERAÇÃO DE  
PROGESTERONA: NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS,  
MICROEMULSÃO E NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS  
SÓLIDAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Sayer

Florianópolis  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Fogolari, Odinei

Sistemas Nanoestruturados para Liberação de Progesterona: Nanopartículas Poliméricas, Microemulsão e Nanopartículas Lipídicas Sólidas / Odinei Fogolari ; orientador, Pedro Henrique Hermes de Araújo ; coorientadora, Claudia Sayer – Florianópolis, SC, 2017.

224 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Nanopartículas PMMA/P (MMA-co-AA). 3. Microemulsão. 4. Nanopartículas lipídicas sólidas. 5. Progesterona. I. Araújo, Pedro Henrique Hermes. II. Sayer, Claudia. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

Odinei Fogolari

**SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PARA LIBERAÇÃO DE  
PROGESTERONA: NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS,  
MICROEMULSÃO E NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 11 de setembro de 2017.

---

Prof. Dr. Pedro H. H. de Araújo  
Orientador

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia Sayer  
Coorientadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cintia Soares  
Coordenadora do PósENQ

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup>. Fernanda Vitória Leimann, Dr.<sup>a</sup>.  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Prof. Odinei Hess Gonçalves, Dr.  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Prof. Paulo Emilio Feuser, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina



*Dedico com todo amor a minha esposa e família.*



## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e ao Laboratório de Controle e Processos de Polimerização, pela oportunidade, suporte técnico e infraestrutura.

Aos orientadores Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Sayer pelos ensinamentos, compreensão, incentivo e amizade.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Fernanda Vitória Leimann e ao Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves da UTFPR/Campo Mourão-PR pela contribuição e auxílio em diversas etapas deste trabalho.

Aos amigos e colegas do LCP por todo o apoio e amizade. Ao colega Iaçanã George Berté Parisotto pelo auxílio nas análises de reologia. Ao Thiago Ouriques Machado, Alessandra Cristina de Meneses, entre tantos outros pelo auxílio prestado.

À Universidade Federal da Fronteira Sul pelo incentivo à qualificação por meio do Plano de Educação Formal (PLEDUCA). Aos colegas da Coordenação de Laboratórios do *Campus* Chapecó pela amizade e apoio.

Ao Leandro Guarezi Nandi, da Central de Análises do EQA, pelo auxílio nas análises de FTIR e DSC.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME).

À empresa Bioxen Pesquisa e Desenvolvimento em Medicina Veterinária pelo apoio inicial ao desenvolvimento do trabalho.

Aos membros da banca de defesa, pela disponibilidade e contribuições tão valiosas ao trabalho.

Às pessoas que auxiliaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.





*“Sem a convicção de uma harmonia íntima do Universo não poderia haver ciência. Esta convicção é, e continuará a ser, a base de toda criação científica. Em toda a extensão de nossos esforços, nas lutas dramáticas entre as velhas e as novas concepções, entrevemos a ânsia eterna de compreensão, a intuição inabalável da harmonia universal, que se robustece na própria multiplicidade dos obstáculos que se oferecem ao nosso entendimento”.*

Albert Einstein



## RESUMO

Progestógenos possuem diversas aplicações na saúde humana e animal, especialmente em protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). A progesterona (P4) apresenta vantagens em relação a progestinas, no entanto possui baixa biodisponibilidade quando administrada por via oral e é um composto hidrofóbico de difícil solubilização em formulações injetáveis. Por isso, este trabalho tem por objetivo obter, caracterizar e avaliar a incorporação de progesterona em nanopartículas poliméricas (PMMA e P(MMA-co-AA)), microemulsão à base de tensoativos não iônicos e nanopartículas lipídicas sólidas, a fim de auxiliar na administração e liberação sustentada deste composto. Inicialmente, foi validado um método espectrofotométrico UV para quantificação de P4 em nanopartículas poliméricas. Os ensaios demonstraram que o método é seletivo, preciso, exato e robusto o suficiente para a determinação de P4 em partículas de PMMA. Em seguida foi realizada análise da síntese e caracterização de nanopartículas poliméricas, as quais foram obtidas por meio de reações de polimerização em miniemulsão de metacrilado de metila (MMA). As partículas apresentaram morfologias de nanoesferas e nanocápsulas, com diâmetros médios entre 150-300 nm. Foi possível incorporar até  $20 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{látex}}^{-1}$  mantendo estabilidade e eficiência de encapsulação acima de 60%. Nos testes de liberação *in vitro* com nanoesferas, aproximadamente 20% do fármaco foi instantaneamente solubilizado no meio, possivelmente por estar adsorvido na camada superficial das partículas. Enquanto em nanocápsulas, apenas 2% foi liberado instantaneamente. Apesar do perfil semelhante de liberação, os ensaios demonstraram que nanocápsulas apresentam maior potencial de retenção do fármaco. O segundo sistema polimérico avaliado foi partículas de P(MMA-co-AA) sensíveis ao pH, as quais foram sintetizadas por meio da copolimerização de MMA e ácido acrílico (AA) em miniemulsão. As partículas apresentaram tamanhos entre 200-300 nm quando em  $\text{pH} < 4,25$ . Verificou-se que 54% das cargas ácidas decorrentes da ionização do P(MMA-co-AA) encontram-se na superfície das partículas. A eficiência de encapsulação para amostras com  $20 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{látex}}^{-1}$  ficou em aproximadamente 60%. A liberação *in vitro* ocorreu de forma mais rápida em pH 6 e 8 se comparado ao pH 3, devido à ionização dos grupos carboxílicos e inchamento das partículas. A ocorrência de intumescimento no processo de liberação foi confirmada com a aplicação do modelo de Weibull, cujos coeficientes obtidos estão correlacionados com mecanismo de transporte combinado (intumescimento/difusão). A próxima etapa envolveu a obtenção e

caracterização de microemulsão com potencial para entrega de P4. A microemulsão foi preparada com polisorbato 80/1-butanol e triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico (Crodamol GTCC®) como fase oleosa. Por meio do diagrama de fase foram identificadas as proporções entre os componentes que formaram microemulsão. Foram selecionadas duas formulações para testes com progesterona, as quais contêm 45% e 10% de água na composição e permitiram incorporar 24,7 e 52,5 mg<sub>P4.g<sub>ME</sub><sup>-1</sup></sub>, respectivamente. As microemulsões apresentaram pH neutro, gotas com tamanho inferior a 30 nm, comportamento Newtoniano e baixa viscosidade (< 44,6 mPa.s). Sob esses aspectos, apresentaram estabilidade e potencial para uso na liberação de P4. Nos testes de permeação em célula de difusão, a liberação de P4 incorporada em microemulsão foi mais lenta se comparada ao controle (P4 solubilizada em Crodamol). A liberação na amostra de Crodamol foi controlada pela erosão, enquanto para microemulsão ocorreram mecanismos combinados (difusão e erosão). O quarto sistema avaliado foi nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), preparadas pelo método de emulsificação-ultrassom a partir de lipídeos sólidos (ácido láurico, ácido esteárico e monoestearato de glicerila - MEG) e líquido (Crodamol GTCC®). As formulações que apresentaram melhor estabilidade e potencial para incorporação de fármaco foram ácido esteárico/Crodamol e MEG/Crodamol, ambas com teores lipídicos de 1 e 2,5%. Essas formulações apresentaram tamanho de partícula entre 140 – 360 nm. O limite de incorporação de P4 na mistura lipídica ficou entre 0,5 – 1,0 g<sub>P4.g<sub>Lipídeo</sub><sup>-1</sup></sub>. As eficiências de encapsulação ficaram acima de 93%. As análises de FTIR indicaram que a formulação MEG/Crodamol pode favorecer a solubilização de P4 nas partículas se comparadas ao sistema ácido esteárico/Crodamol. Mudanças no tipo de lipídeo e relação P4/lipídeos produziram diferentes perfis de permeação em célula de difusão. Formulações com MEG/Crodamol e menor relação P4/lipídeo apresentaram perfis de liberação mais lentos. Neste caso, os coeficientes obtidos com a aplicação do modelo de Weibull foram correlacionados com mecanismo difusional de Fick.

**Palavras-chave:** nanopartículas de PMMA, P(MMA-co-AA), nanopartículas lipídicas, microemulsão, validação de método, progesterona.

## ABSTRACT

Progestogens have diverse applications in human and animal health, especially in fixed-time artificial insemination protocols (FTAI). Progesterone (P4) has advantages over progestins, however has low bioavailability when administered orally and is a hydrophobic compound of difficult solubilization in injectable formulations. Therefore, the aim of this work is to obtain, characterize and evaluate the incorporation of progesterone in polymeric nanoparticles (PMMA and P(MMA-co-AA)), microemulsion based on nonionic surfactants and solid lipid nanoparticles, in order to assist in the administration and sustained release of this compound. Initially, a UV spectrophotometric method was validated for P4 quantification in polymer nanoparticles. Assays demonstrated that the method is selective, precise, accurate and robust enough for P4 determination in PMMA particles. Then, was performed analysis of the synthesis and characterization of polymer nanoparticles, which were obtained by miniemulsion polymerization reactions of methyl methacrylate (MMA). Particles presented morphologies of nanospheres and nanocapsules, with average diameters between 150-300 nm. Was possible to incorporate up to  $20 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{latex}}^{-1}$  maintaining stability and encapsulation efficiency above 60%. In the *in vitro* release tests with nanospheres, approximately 20% drug was instantly solubilized, possibly because was adsorbed on the surface layer of the particles. While in nanocapsules, only 2% was released instantaneously. Although the similar release profile, the assays demonstrated that nanocapsules have greater potential for drug retention. The second polymer system evaluated was pH-sensitive P(MMA-co-AA) particles, which were synthesized by the copolymerization of MMA and acrylic acid (AA) in miniemulsion. Particles had sizes between 200-300 nm when at  $\text{pH} < 4.25$ . Was verified that 54% of the acidic charges resulting from the ionization of P(MMA-co-AA) are on the particles surface. Encapsulation efficiency for samples with  $20 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{latex}}^{-1}$  was approximately 60%. The *in vitro* release occurred more rapidly at pH 6 and 8 when compared to pH 3, due to the ionization of the carboxylic groups and swelling of the particles. Occurrence of swelling in the release process was confirmed with the application of the Weibull model, whose coefficients obtained are correlated with combined transport mechanisms (swelling/diffusion). Next step involved the obtaining and characterization of microemulsion with potential for P4 delivery. Microemulsion was prepared with polysorbate 80/1-butanol as surfactants and caprylic/caprylic acid triglycerides (Crodamol GTCC®) as the oil phase. By means of the phase diagram was identified the

proportions between the components which formed microemulsion. Two formulations for progesterone tests were selected, which contain 45% and 10% water in the composition and allowed to incorporate 24.7 and 52.5  $\text{mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{ME}}^{-1}$ , respectively. Microemulsions presented neutral pH, droplets smaller than 30 nm, Newtonian behavior and low viscosity ( $< 44,6 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ ). Under these aspects, they presented stability and potential for use in the P4 release. In the permeation tests in diffusion cell, the P4 release incorporated in microemulsion was slower when compared to the control (P4 solubilized in Crodamol). Release in the Crodamol sample was controlled by erosion, while for microemulsion combined mechanisms (diffusion and erosion) occur. The fourth system evaluated was solid lipid nanoparticles (NLS), prepared by the emulsification-ultrasound method from solid lipids (lauric acid, stearic acid, monostearate glyceryl - MEG) and liquid (Crodamol GTCC®). Formulations that showed the best stability and potential for drug incorporation were stearic acid/Crodamol and MEG/Crodamol, both with lipid contents of 1 and 2.5%. These formulations had a particle size between 140-360 nm. The limit of P4 incorporation into the lipid mixture was between 0.5-1.0  $\text{g}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Lipid}}^{-1}$ . Encapsulation efficiencies were above 93%. FTIR analyzes indicated that the MEG/Crodamol formulation may favor P4 solubilization in the particles compared to the stearic acid/Crodamol system. Changes in lipid type and P4/lipid ratio produced different permeation profiles in diffusion cell. Formulations with MEG/Crodamol and lower P4/lipid ratio had slower release profiles. In this case, coefficients obtained with the application of the Weibull model were correlated with Fick's diffusion mechanism.

**Keywords:** PMMA nanoparticles, P(MMA-co-AA), lipid nanoparticles, microemulsion, method validation, progesterone.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural da progesterona. ....	35
Figura 2 – Estrutura do monômero metacrilato de metila (MMA) e o respectivo homopolímero polimetacrilato de metila (PMMA) .....	42
Figura 3 – Estrutura do poli(ácido acrílico) (PAA) em meio ácido e básico. ....	44
Figura 4 – Sistemas de Winsor para microemulsões (O: fase oleosa; M: microemulsão; W: fase aquosa). ....	49
Figura 5 – Estruturas de nanopartículas lipídicas: NLS e estruturas de CLN. ....	58
Figura 6 – Espectros de absorção UV: a) progesterona (P4); b) nanoesferas de PMMA com e sem progesterona <sup>2</sup> ; c) nanocápsulas de PMMA com e sem progesterona <sup>3</sup> . ....	69
Figura 7 – Curva padrão para quantificação da progesterona em clorofórmio. .	70
Figura 8 – Estrutura química: a) lecitina (R1 e R2 são grupos alifáticos lineares com C15-C20 e até 4 ligações duplas); b) triglicerídeos de cadeia média composto de ácidos cáprico e caprílico. ....	78
Figura 9 – Diâmetro médio (Dg) e índice de polidispersão (PDI) de nanogotas com e sem P4 determinados em miniemulsão a 70°C com formulação de nanocápsulas (Exp. 1 e 2) e nanoesferas (Exp. 3 e 4). ....	87
Figura 10 – Diâmetro médio (Dp) e índice de polidispersão (PDI) de nanopartículas durante a polimerização em miniemulsão para formação de nanocápsulas (Exp. 5) e nanoesferas (Exp. 6). ....	88
Figura 11 – a) Conversão (X <sub>g</sub> ) e b) taxa de reação (Rp) durante a polimerização em miniemulsão para formação de nanocápsulas (Exp. 5) e nanoesferas (Exp. 6). ....	91
Figura 12 – Dp, PDI e Conversão para NC com 6 mg <sub>P4</sub> .g <sub>Látex</sub> <sup>-1</sup> (Exp. 16). ....	95
Figura 13 – Micrografias de MET de nanoesferas (NS): (a) PMMA (Exp. 18 Ref); (b) PMMA com 20 mg <sub>P4</sub> .g <sub>Látex</sub> <sup>-1</sup> (Exp. 18 P4). ....	97
Figura 14 – Micrografias de MET de nanocápsulas (NC): (a) PMMA (Exp. 20 Ref); (b) PMMA com 20 mg <sub>P4</sub> .g <sub>Látex</sub> <sup>-1</sup> (Exp. 20 P4). ....	98
Figura 15 – Distribuição das massas molares em nanopartículas de PMMA com P4. ....	101
Figura 16 – (a) Curva de DSC para P4 pura; (b) curvas de DSC para nanopartículas de PMMA com P4 em diferentes concentrações. ....	103
Figura 17 – FTIR de nanopartículas (NS) de PMMA e P4. ....	104
Figura 18 – Liberação <i>in vitro</i> de P4 encapsulada em nanopartículas de PMMA (12 mg <sub>P4</sub> .g <sub>Látex</sub> <sup>-1</sup> ). ....	106
Figura 19 – Avaliação do Dp (nm), PDI e pH do látex com P4 (20 mg <sub>P4</sub> .g <sub>Látex</sub> <sup>-1</sup> ) ao longo do tempo. ....	109
Figura 20 – Diâmetro médio (Dp) e índice de polidispersão (PDI) de partículas de P(MMA-co-AA) referência (Ref.) e com 12 mg <sub>P4</sub> .g <sub>Látex</sub> <sup>-1</sup> . ....	114
Figura 21 – Distribuição de tamanho de partículas de P(MMA-co-AA). ....	115
Figura 22 – Conversão (X <sub>g</sub> ) e taxa de reação (Rp) durante polimerização em miniemulsão para formação de nanoesferas de P(MMA-co-AA) com 12 mg <sub>P4</sub> .g <sub>Látex</sub> <sup>-1</sup> . ....	116

Figura 23 – Diâmetro médio (Dp) e índice de polidispersão (PDI) de nanopartículas de P(MMA-co-AA) referência (Ref.) e com 20 mg <sub>P4.g<sub>Látex</sub><sup>-1</sup></sub> ...	117
Figura 24 – Conversão (X <sub>g</sub> ) e taxa de reação (R <sub>p</sub> ) durante a polimerização em miniemulsão para formação de nanoesferas de P(MMA-co-AA) com 20 mg <sub>P4.g<sub>Látex</sub><sup>-1</sup></sub> .....	118
Figura 25 – Tamanho de partícula (Dp) de P(MMA-co-AA) com P4 (20 mg <sub>P4.g<sub>Látex</sub><sup>-1</sup></sub> ) em função do pH. ....	120
Figura 26 – Fração de cargas ácidas tituladas em látex de P(MMA-co-AA)...	121
Figura 27 – Imagens obtidas em MET de partículas P(MMA-co-AA).....	123
Figura 28 – Imagens obtidas em MET de partículas P(MMA-co-AA) com P4 (20 mg <sub>P4.g<sub>Látex</sub><sup>-1</sup></sub> ).....	124
Figura 29 – Distribuição da massa molar em nanopartículas de P(MMA-co-AA) com P4.....	125
Figura 30 – FTIR de nanopartículas de P(MMA-co-AA) e P4.....	126
Figura 31 – DSC de nanopartículas de P(MMA-co-AA) com P4.....	127
Figura 32 – Liberação <i>in vitro</i> da P4 encapsulada em nanopartículas de P(MMA-co-AA) (12 mg <sub>P4.g<sub>Látex</sub><sup>-1</sup></sub> ).....	128
Figura 33 – Nanopartículas de P(MMA-co-AA) e a liberação de progesterona. ....	129
Figura 34 – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema água, Crodamol e Tween 80/1-butanol (2:1) indicando a região de formação de microemulsão (ME) e escolha das formulações de trabalho (FO38 e FO46). ....	140
Figura 35 – Condutividade obtida para as formulações do diagrama de fase pseudoternário com aplicação do modelo quadrático (O: Crodamol; T: Tween 80/butanol; A: água).....	143
Figura 36 – Distribuição do tamanho de gotas: a) FO38; b) FO38 P4 24 mg.g <sup>-1</sup> . ....	145
Figura 37 – Distribuição do tamanho de gotas: a) FO46; b) FO46 P4 50 mg.g <sup>-1</sup> . ....	145
Figura 38 – Variação da tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) como função da taxa de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ) para: a) FO38; b) FO46 com e sem P4 nas temperaturas de 20 e 37°C.....	147
Figura 39 – Perfil de permeação de P4 incorporada em: a) Crodamol; b) microemulsão (FO38 e FO46).....	149
Figura 40 – Imagens obtidas em MET de nanopartículas lipídicas sólidas de MEG/Crodamol.....	162
Figura 41 – FTIR de progesterona, ácido esteárico e NLS (ácido esteárico 1%). ....	163
Figura 42 – FTIR de NLS (MEG/Crodamol 1% e 2,5%) e P4. ....	164
Figura 43 – DSC de P4, ácido esteárico e NLS com 1% de lipídeos.....	165
Figura 44 - DSC de P4, MEG e NLS com 1% de lipídeos. ....	166
Figura 45 – Perfil de permeação de P4 encapsulada em NLS preparada com ácido esteárico/Crodamol (NLS 1 e NLS 2).....	167
Figura 46 – Perfil de permeação da P4 encapsulada em NLS preparada com MEG/Crodamol (NLS 3 e NLS 4).....	169



Figura 47– Curva padrão para quantificação da progesterona em SDS 5%.....	204
Figura 48 – FTIR da mistura física de nanopartículas (NS) de PMMA Ref. com progesterona nas proporções de 6, 9 e 16% .....	207
Figura 49 – DSC (1° rampa de aquecimento) de: a) P4; b) NS PMMA Ref.; c) NS PMMA c/ 12 mg <sub>P4</sub> .g <sub>Látex</sub> <sup>-1</sup> (6% de P4 em sólidos); d) NS PMMA c/ 36 mg <sub>P4</sub> .g <sub>Látex</sub> <sup>-1</sup> (16% de P4 em sólidos); e) mistura física NS PMMA Ref. e P4 (6% de P4); f) mistura física NS PMMA Ref. e P4 (16% de P4). .....	208
Figura 50 – FTIR da mistura física de nanopartículas (NS) de P(MMA-co-AA) Ref. com P4 na proporção de 6%.....	209
Figura 51 – DSC (1° rampa de aquecimento): a) NS PMMA-co-AA Ref.; b) NS PMMA-co-AA c/ 12 mg <sub>P4</sub> .g <sub>Látex</sub> <sup>-1</sup> (6% de P4 em sólidos); c) mistura física NS PMMA-co-AA Ref. e P4 (6% de P4). .....	209
Figura 52 – FTIR da mistura física de lipídeos sólidos (ácido esteárico; MEG) e progesterona na proporção de 0,5g <sub>P4</sub> .g <sub>Lipídeo</sub> .....	210
Figura 53 – DSC (1° rampa de aquecimento) de: a) mistura física de ácido esteárico e P4 0,5g <sub>P4</sub> .g <sub>Lipídeo</sub> (2:1); b) mistura física de MEG e P4 0,5g <sub>P4</sub> .g <sub>Lipídeo</sub> (2:1). .....	210
Figura 54 – Dados da titulação potenciométrica da fase aquosa com NaOH 0,087 M para a amostra 1. ....	216
Figura 55 – Dados da titulação potenciométrica da fase aquosa com NaOH 0,087 M para a amostra 2. ....	217
Figura 56 – Dados da titulação potenciométrica da fase aquosa com NaOH 0,087 M para a amostra 3. ....	218
Figura 57 – Dados da titulação potenciométrica da fase polimérica (nanopartículas) com HCl 0,129 M para a amostra 1. ....	219
Figura 58 – Dados da titulação potenciométrica da fase polimérica (nanopartículas) com HCl 0,129 M para a amostra 2. ....	220
Figura 59 – Dados da titulação potenciométrica da fase polimérica (nanopartículas) com HCl 0,129 M para a amostra 3. ....	221
Figura 60 – Dados da titulação condutimétrica da fase aquosa com NaOH 0,087 M. ....	222
Figura 61 – Dados da titulação condutimétrica da fase polimérica (nanopartículas) com HCl 0,129 M. ....	223



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Formulações das miniemulsões utilizadas na síntese de nanopartículas de PMMA. ....	64
Tabela 2 - Análise de Variância para o teste de linearidade. ....	71
Tabela 3 - Avaliação da repetibilidade do método em três níveis de concentração. ....	71
Tabela 4 – Resultados da avaliação de precisão intermediária do método. ....	73
Tabela 5 – Teste t de <i>Student</i> para os dados de média na avaliação da precisão intermediária. ....	73
Tabela 6 – Resultados da avaliação da reprodutibilidade do método. ....	74
Tabela 7 – Teste t de <i>Student</i> para os dados de média na avaliação da reprodutibilidade. ....	74
Tabela 8 – Resultados de robustez para análises com diferentes marcas do solvente. ....	75
Tabela 9 – Recuperação de progesterona em nanopartículas de PMMA. ....	76
Tabela 10 – Parâmetros do CG utilizados nas análises de monômero residual. ....	81
Tabela 11 – Formulações para avaliação da estabilidade e cinética de polimerização de miniemulsão destinada ao preparo de nanocápsulas (Experimentos 1, 2 e 5) e nanoesferas (Experimentos 3, 4 e 6) de PMMA com P4. ....	86
Tabela 12 – Potencial Zeta (mV) determinado em miniemulsão (nanogotas) e látex (nanopartículas) com formulação de nanocápsulas (Exp. 1, 2 e 5) e nanoesferas (Exp. 3, 4 e 6). ....	90
Tabela 13 – Formulações de miniemulsão para avaliação da eficiência de encapsulação com diferentes concentrações de P4. ....	92
Tabela 14 – Diâmetro médio das nanogotas ( $D_g$ , $t = 0$ min) e nanopartículas ( $D_p$ , $t = 280$ min), índice de polidispersão (PDI), conversão ( $X_g$ ) e eficiência de encapsulação (EE) para formulação de nanoesfera com diferentes concentrações de P4. ....	93
Tabela 15 – Diâmetro médio das nanogotas ( $D_g$ , $t = 0$ min) e nanocápsulas ( $D_p$ , $t = 280$ min), índice de polidispersão (PDI), conversão ( $X$ ) e eficiência de encapsulação (EE) para formulação de nanocápsula com diferentes concentrações de P4. ....	94
Tabela 16 – Diâmetro médio das nanogotas ( $D_g$ , $t = 0$ min) e nanopartículas ( $D_p$ , $t = 280$ min), índice de polidispersão (PDI), conversão ( $X_g$ ) e eficiência de encapsulação (EE) para formulações com 20 e 36 $\text{mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$ . ....	96
Tabela 17 – Teor de monômero residual obtido por cromatografia gasosa ao término das reações ( $t = 280$ min). ....	99
Tabela 18 – Massa molar média ponderal ( $M_w$ ), numérica ( $M_n$ ) e dispersividade ( $\bar{D}$ ) de nanopartículas de PMMA com diferentes concentrações de P4. ....	100
Tabela 19 – Coeficientes obtidos na aplicação das equações Lei de Potência e Weibull aos dados de liberação da progesterona. ....	107

Tabela 20 - Coeficientes obtidos na aplicação das equações Lei de Potência e Weibull aos dados de liberação de P4 em P(MMA-co-AA).....	129
Tabela 21 – Formulações avaliadas para construção do diagrama de fases pseudoternário: proporções mássicas entre os componentes. ....	135
Tabela 22 – Incorporação de P4 nas microemulsões FO38 e FO46 e solubilidade nos componentes puros.....	141
Tabela 23 – Análise de variância (ANOVA) dos modelos aplicados aos dados de condutividade e coeficientes (componentes originais) para o modelo quadrático. ....	143
Tabela 24 – Valores médios <sup>1</sup> de Transmitância (T), pH, condutividade, Dg e PDI para as microemulsões FO38 e FO46 com e sem P4. ....	144
Tabela 25 – Viscosidades ( $\eta$ ) das microemulsões FO38 e FO46, com e sem P4, nas temperaturas de 20 e 37°C, e dos componentes Crodamol e Tween 80. ...	148
Tabela 26 – Parâmetros obtidos com a aplicação dos modelos de Higuchi e Lei de Potência aos dados de permeação <i>in vitro</i> .....	150
Tabela 27 – Fluxo ( $J$ ) e coeficiente de permeabilidade ( $K_p$ ) da P4. ....	151
Tabela 28 – Diâmetros de partículas (Dp) e índice de polidispersão (PDI) para NLS preparadas com diferentes lipídeos. ....	159
Tabela 29 – Formulações de NLS e relação P4/lipídeo. ....	160
Tabela 30 – Diâmetros de partículas (Dp), índice de polidispersão para NLS e eficiência de encapsulação (EE). ....	161
Tabela 31 - Coeficientes obtidos com a aplicação das equações Lei de Potência e Weibull aos dados de liberação da P4 encapsulada em NLS. ....	168
Tabela 32 – Quantidade acumulada de P4 liberada, constante de fluxo ( $J$ ) e coeficiente de permeabilidade ( $K_p$ ).....	170
Tabela 33 - Análise de Variância para o teste de linearidade. ....	204
Tabela 34 - Avaliação da repetibilidade e exatidão do método em três níveis de concentração. ....	205
Tabela 35 – Avaliação de precisão intermediária e reprodutibilidade do método. Resultados expressos em desvio padrão relativo (DPR, %) (n = 6).....	205
Tabela 36 – Padronização de solução de NaOH. ....	213
Tabela 37 – Padronização de solução de HCl.....	213
Tabela 38 – Quantidade total de unidades de ácido acrílico por grama de látex .....	214
Tabela 39 – Quantidade de unidades de ácido acrílico presente na amostra ...	214
Tabela 40 – Estimativa teórica da fração de H <sup>+</sup> ionizado no látex diluído devido à constante de ionização. ....	215
Tabela 41 – Determinação de grupos ácidos e estimativa da fração molar de ácido acrílico na fase aquosa. ....	224
Tabela 42 – Determinação de grupos ácidos e estimativa da fração molar de ácido acrílico na fase polimérica. ....	224

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Acrílico
AIBN	2,2'-azo-bis-isobutironitrila
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
A/O	Água/óleo
CG	Cromatografia Gasosa
CLN	Carreadores lipídicos nanoestruturados
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DP	Desvio padrão
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EHL	Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico
EQA	Departamento de Engenharia Química e Alimentos/UFSC
EUA	Estados Unidos da América
Exp.	Experimento
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FO	Formulação
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
GL	Graus de liberdade
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
GRAS	<i>Generally Regarded as Safe</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IPM	Miristato de isopropila
LCP	Laboratório de Controle e Processos de Polimerização/EQA/UFSC
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
m	Massa
ME	Microemulsão
MEG	Monoestearato de glicerila
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MMA	Metacrilato de metila
n	Número de repetições
NC	Nanocápsula
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
NS	Nanoesfera
O/A	Óleo/água
P4	Progesterona
PCL	Poli(e-caprolactona)

PLA	Poli(ácido lático)
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
PMMA	Polimetacrilato de metila
P(MMA-co-AA)	Copolímero de metacrilato de metila de ácido acrílico
Ref	Referência
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SANS	Espalhamento de Neutrons a Baixo Ângulo
SAXS	Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo
TCM	Triglicerídeo de cadeia média
THF	Tetrahidrofurano
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UV	Ultravioleta
Vis	Visível

## LISTA DE SÍMBOLOS

A	-	Assíntota superior – Equação de Weibull
a	-	Constante cinética de liberação - Equação de Weibull
Abs	-	Absorbância
B	-	Assíntota inferior - Equação de Weibull
b	-	Expoente que caracteriza o mecanismo de liberação - Equação de Weibull
C	mg.L <sup>-1</sup>	Concentração
$\bar{C}$	mg.L <sup>-1</sup>	Concentração média
C <sub>0</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	Constante de concentração na solução doadora (célula de difusão)
C <sub>P4</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	Concentração de progesterona determinada por espectrofotometria
C <sub>1P4</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	Concentração de progesterona determinada na fase aquosa da 1ª centrifugação de NLS
C <sub>2P4</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	Concentração de progesterona determinada na fase aquosa da 2ª centrifugação de NLS (lavagem)
C <sub>P4O</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	Concentração de progesterona não encapsulada (livre)
C <sub>P4E</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	Concentração de progesterona encapsulada
C <sub>P4t</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	Concentração de progesterona determinada por espectrofotometria no tempo t de liberação
C <sub>P4T</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	Concentração de progesterona total (com base na massa adicionada)
D	cm <sup>2</sup> .h <sup>-1</sup>	Coefficiente de difusão
Dg	nm	Diâmetro médio de gotas
Dp	nm	Diâmetro médio de partículas
DPR	%	Desvio Padrão Relativo
EE	%	Eficiência de encapsulação
FD	-	Fator de diluição
F <sub>m</sub>	-	Fração de monômero alimentada no reator
F <sub>p</sub> (t)	-	Fração mássica de polímero
F <sub>snp</sub>	-	Fração de sólidos não polimerizados
F <sub>P4</sub>	-	Fração de progesterona no látex
h	cm	Espessura da membrana
J	mg.cm <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup>	Constante de fluxo
k	mg.cm <sup>-2</sup>	Constante cinética de liberação
K	-	Coefficiente de partição entre as soluções na interface da membrana.
K <sub>P</sub>	cm.h <sup>-1</sup>	Coefficiente de permeabilidade
K <sub>ij</sub>	-	Constante cinética da reação entre os monômeros i e j
K <sub>a</sub>	-	Constante de ionização

m(t)	mg.cm <sup>-2</sup>	Massa acumulada que passa por unidade de área da membrana em função do tempo (t)
Mn	g.mol <sup>-1</sup>	Massa molar média numérica
Mw	g.mol <sup>-1</sup>	Massa molar média ponderal
M <sub>hq</sub>	g	Massa hidroquinona
M <sub>lt</sub>	g	Massa de látex
M <sub>m</sub>	g	Massa de monômero
M <sub>p4</sub>	g	Massa de progesterona adicionada à formulação
M <sub>p4T</sub>	g	Massa total de progesterona contida na alíquota de látex adicionada ao meio de liberação
M <sub>r</sub>	g	Massa do meio reacional
M <sub>rec</sub>	g	Massa de progesterona recuperada
M <sub>rs</sub>	g	Massa de resíduo seco
M <sub>snp</sub>	g	Massa de sólidos não polimerizados
n	-	Expoente que caracteriza o mecanismo de transporte – Lei de Potência
PDI	-	Índice de polidispersão para tamanho de partícula
pH	-	Potencial hidrogeniônico
r <sub>i</sub>	-	Razão de reatividade
R <sup>2</sup>	-	Coefficiente de determinação
R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>	-	Coefficiente de determinação ajustado
R <sub>p</sub>	mol.min <sup>-1</sup>	Taxa de reação de polimerização
Rec	%	Recuperação
s	mg.mL <sup>-1</sup>	Desvio padrão da concentração
S	-	Inclinação da curva
t	h	Tempo
T <sub>g</sub>	°C	Temperatura de transição vítrea
T <sub>m</sub>	°C	Temperatura de fusão
V <sub>m</sub>	mL	Volume do meio de liberação
V	mL	Volume
X <sub>g</sub>	-	Conversão gravimétrica
y (t)	%	Liberação em função do tempo (t)
σ	-	Desvio padrão do intercepto com o eixo Y
Đ	-	Dispersividade da massa molar (Mw/Mn)
γ	s <sup>-1</sup>	Taxa de cisalhamento
τ	Pa	Tensão de cisalhamento
γ <sub>i</sub>	dina/cm	Tensão interfacial
η	mPa.s	Viscosidade
ΔG <sub>f</sub>	J	Energia livre de formação da microemulsão



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>29</b>
1.1	OBJETIVOS	33
1.1.1	Objetivo Geral	33
1.1.2	Objetivos Específicos	33
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>35</b>
2.1	PROGESTERONA – ASPECTOS GERAIS E APLICAÇÕES	35
2.2	POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO E ENCAPSULAÇÃO DE PROGESTERONA EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	38
2.2.1	Técnica de Polimerização em Miniemulsão	38
2.2.2	Polimetacrilato de Metila – Aplicações na Liberação de Fármacos e Toxicidade	41
2.2.3	Polímeros Sensíveis ao pH e Aplicações na Liberação de Fármacos	44
2.2.4	Encapsulação e Liberação de Progesterona em Partículas Poliméricas	46
2.3	MICROEMULSÕES	48
2.3.1	Conceitos e Definições	48
2.3.2	Aplicações de Microemulsão na Liberação de Fármacos	52
2.4	NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS	57
2.4.1	Definições e Características Estruturais	57
2.4.2	Preparação de Nanopartículas Lipídicas	59
2.4.3	Aplicações de Partículas Lipídicas na Liberação de Fármacos	60
<b>3</b>	<b>VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE PROGESTERONA EM NANOPARTÍCULAS DE PMMA POR ESPECTROFOTOMETRIA UV .....</b>	<b>63</b>
3.1	INTRODUÇÃO	63
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	63
3.2.1	Materiais	63
3.2.2	Síntese e Caracterização de Nanopartículas de PMMA	64
3.2.3	Validação do Método Analítico	64
3.2.4	Análise de Recuperação da Progesterona em Nanopartículas de PMMA	67
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
3.3.1	Especificidade	68
3.3.2	Linearidade e Limites de Quantificação (LQ) e Detecção (LD)	70
3.3.3	Precisão e Exatidão	71
3.3.4	Robustez	75
3.3.5	Determinação de Progesterona em Nanopartículas de PMMA	75
3.4	CONCLUSÕES	76

<b>4 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PMMA POR POLIMERIZAÇÃO RADICALAR EM MINIEMULSÃO E ENCAPSULAÇÃO DE PROGESTERONA .....</b>	<b>77</b>
4.1 INTRODUÇÃO	77
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	77
4.2.1 Materiais	77
4.2.2 Preparo da Miniemulsão e Reações de Polimerização	77
4.2.3 Caracterização	78
4.2.4 Determinação da Eficiência de Encapsulação (EE)	82
4.2.5 Ensaios de Liberação <i>in vitro</i>	83
4.2.6 Determinação da Estabilidade Física do Látex	85
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
4.3.1 Avaliação Preliminar da Estabilidade da Miniemulsão e Cinética de Polimerização	86
4.3.2 Caracterização e Eficiência de Encapsulação	92
4.3.3 Liberação <i>in vitro</i>	105
4.3.4 Estabilidade Física do Látex	108
4.4 CONCLUSÕES	110
<b>5 ENCAPSULAÇÃO E LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE PROGESTERONA EM NANOPARTÍCULAS DE P(MMA-co-AA) .....</b>	<b>111</b>
5.1 INTRODUÇÃO	111
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	111
5.2.1 Materiais	111
5.2.2 Preparo de Nanopartículas de P(MMA-co-AA)	112
5.2.3 Caracterização e Eficiência de Encapsulação	112
5.2.4 Ensaios de Liberação <i>in vitro</i>	113
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	113
5.3.1 Caracterização de P(MMA-co-AA) e Encapsulação de Progesterona	113
5.3.2 Liberação <i>In Vitro</i>	127
5.4 CONCLUSÕES	130
<b>6 OBTENÇÃO DE MICROEMULSÃO COM TENSOATIVO NÃO IÔNICO PARA LIBERAÇÃO DE PROGESTERONA .....</b>	<b>133</b>
6.1 INTRODUÇÃO	133
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS	133
6.2.1 Materiais	133
6.2.2 Preparo da Microemulsão	133
6.2.3 Construção do Diagrama de Fases	134
6.2.4 Incorporação de Progesterona na Microemulsão	134
6.2.5 Caracterização	135
6.2.6 Estudo de Permeação <i>In Vitro</i>	137
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	139
6.3.1 Diagrama de Fases Pseudoternário	139
6.3.2 Incorporação de Progesterona na Microemulsão	141

<b>6.3.3 Caracterização</b>	<b>142</b>
<b>6.3.4 Permeação <i>in vitro</i></b>	<b>148</b>
<b>6.4 CONCLUSÕES</b>	<b>152</b>
<b>7 ENCAPSULAÇÃO E LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE PROGESTERONA EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS .....</b>	<b>155</b>
7.1 INTRODUÇÃO	155
7.2 MATERIAIS E MÉTODOS	155
7.2.1 Materiais	155
7.2.2 Preparação das Nanopartículas Lipídicas Sólidas	155
7.2.3 Caracterização	156
7.2.4 Estabilidade Física	157
7.2.5 Determinação da Eficiência de Encapsulação	157
7.2.6 Estudo de Permeação <i>In Vitro</i>	158
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	159
7.3.1 Caracterização de Nanopartículas Lipídicas Sólidas e Eficiência de Encapsulação	159
7.3.2 Permeação <i>In Vitro</i>	166
7.4 CONCLUSÕES	171
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>173</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>177</b>
<b>APÊNDICE I.....</b>	<b>203</b>
<b>Validação de Método para Determinação de Progesterona em Estudos de Liberação <i>In Vitro</i></b>	<b>203</b>
<b>APÊNDICE II .....</b>	<b>207</b>
<b>Dados de FTIR e DSC da Mistura Física de Partículas Poliméricas/P4 e Lipídeos/P4</b>	<b>207</b>
<b>APÊNDICE III.....</b>	<b>211</b>
<b>Cálculo Teórico da Incorporação de Comonômero</b>	<b>211</b>
<b>APÊNDICE IV .....</b>	<b>213</b>
<b>Determinação da Distribuição da Fração Molar de Ácido Acrílico no Látex de P(MMA-co-AA)</b>	<b>213</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A progesterona é um hormônio esteroide com funções essenciais à reprodução. Fármacos com progesterona/progestinas são utilizados em humanos para proteção do endométrio, hemorragia disfuncional, tratamentos em períodos pré ou pós-menopausa, manutenção de gravidez em tratamentos de reprodução assistida, gravidez tardia, e prevenção de parto prematuro (RUAN; MUECK, 2014).

A progesterona natural é rapidamente inativada quando administrada por via oral, devido ao seu rápido metabolismo no fígado e intestino. Por isso, foram desenvolvidos derivados sintéticos, como os grupos 17 $\alpha$ -hidroxi-progesterona, 19-norprogesterona e 19-nortestosterona, para melhorar a biodisponibilidade. Esses derivados sintéticos são chamados de progestinas e tentam mimetizar o efeito da progesterona. Há um grande número desses compostos disponíveis, a maioria derivados da testosterona e progesterona. Pequenas alterações na estrutura da molécula originam progestinas com diferenças consideráveis na atividade e nas propriedades farmacológicas, assim como nos efeitos colaterais, muitos ainda em discussão (POSACI et al., 2000; VIGO; LUBIANCA; CORLETA, 2011). O valor terapêutico das progestinas é muitas vezes limitado devido à associação com câncer de mama (BERAL et al., 2003; FOURNIER et al., 2005; BAKKEN et al., 2011) e aumento do risco de tromboembolismo venoso (ROACH et al., 2012; ARCHER; OGER, 2012).

Diante disso, esforços têm sido lançados para melhorar a biodisponibilidade da progesterona natural e tornar viável seu uso terapêutico. A administração parenteral (intramuscular e subcutânea) pode ser uma alternativa, já que a administração oral de progesterona natural necessita de elevadas doses para atingir níveis plasmáticos satisfatórios (RUAN; MUECK, 2014). O acúmulo de progesterona no tecido pode funcionar como um depósito, mantendo elevada a concentração do fármaco no sangue por mais tempo se comparado com outras formas de administração. Contudo, apesar de exigir doses com menor concentração, podem ser necessárias administrações diárias de injeções dependendo da finalidade, o que é inconveniente e pode causar inflamação e dor no local (TAVANIOTOU et al., 2000). A incorporação da progesterona em uma matriz nanométrica, como partículas poliméricas, partículas lipídicas ou microemulsão, pode prolongar a liberação do fármaco, diminuindo o número de injeções e a administração de concentrações excessivas.

A aplicação da progesterona tem sido intensa também na saúde animal, especialmente em gado, onde é usada na indução de puberdade em novilhas e em protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), visando à sincronização do estro em fêmeas e melhorias nos índices de fertilização. O uso de métodos de controle do ciclo estral, além de facilitar o manejo de rebanhos, permite expandir o uso da inseminação artificial, acelerando o melhoramento genético e trazendo melhorias na produção de carne e leite. A aplicação de progesterona inibe o cio e ovulação, fazendo com que o corpo lúteo dos animais tratados sofra regressão. A sincronia do estro ocorre de 2 a 5 dias após a remoção do tratamento. Esse método pode trazer benefícios na sincronização do estro de vacas e novilhas, além de induzir a sincronização de fêmeas em anestro (distúrbio caracterizado pela ausência da manifestação do cio) (ODDE, 1990; ISLAM, 2011).

Existem diversos produtos comerciais e em estudo que incorporam progestógenos em protocolos de IAFT. Muitos desses produtos comerciais utilizam dispositivos intravaginais ou subcutâneos (auriculares) que devem ser retirados após alguns dias para cessar a liberação dos compostos (ODDE, 1990; BARUSELLI et al., 2004; ISLAM, 2011). Esses dispositivos podem trazer inconvenientes e pouca praticidade no manejo dos animais. Por isso, buscam-se formas injetáveis que, com uma única aplicação, promovam a liberação de progesterona nos tempos apropriados e em quantidades suficientes para proporcionar a ciclicidade do estro.

A encapsulação da progesterona em nanopartículas pode promover a liberação controlada e manter concentrações adequadas no sangue por mais tempo. No entanto, esses sistemas devem ser biocompatíveis a fim de promover a liberação no tempo desejado e não causar efeitos colaterais. Partículas resistentes podem retardar muito a liberação desnecessariamente, e partículas com alta biodegradabilidade podem promover a rápida liberação, em tempo não suficiente para atingir os objetivos de cada tratamento. Além da utilização de materiais biocompatíveis, nanosuspensões destinadas ao uso parenteral e tópico devem apresentar características físicas e químicas apropriadas, estabilidade e elevada solubilidade ao fármaco.

Considerando os diversos usos da progesterona e as limitações das formas de liberação convencionais, neste trabalho foram avaliados quatro sistemas nanoestruturados para liberação de progesterona: nanopartículas poliméricas de PMMA, P(MMA-co-AA), microemulsão e nanopartículas lipídicas sólidas.

As nanopartículas poliméricas de PMMA e P(MMA-co-AA) foram preparadas por polimerização em miniemulsão. Esta técnica é adequada à encapsulação de compostos hidrofóbicos, pois permite a incorporação destes na fase orgânica durante o preparo da miniemulsão em sistema isento de solvente orgânico (LANDFESTER, 2006).

Apesar de diversos relatos da encapsulação de fármacos hidrofóbicos utilizando esta técnica, tais como indometacina (RAJOT et al., 2003), paclitaxel (HUANG; CHEN; LEE, 2007) e tamoxifeno (MOREIRA et al., 2014), poucos são os estudos que relatam a encapsulação de progesterona em nanopartículas poliméricas sintetizadas por polimerização em miniemulsão. Destacam-se os trabalhos de Leimann (2011) e Leimann et al. (2015), com a encapsulação de progesterona em polímeros biodegradáveis PHBV, PLLA, PCL e blendas poliméricas derivadas destes; e o trabalho de Steinmacher (2010), o qual aborda a encapsulação de progesterona em nanoesferas e nanocápsulas de poli(acetato de vinila) preparadas por polimerização em miniemulsão. Estes trabalhos foram desenvolvidos no âmbito do grupo de pesquisa de Polimerização em Miniemulsão do LCP/UFSC.

Tratando-se de nanopartículas de P(MMA-co-AA), as quais apresentam potencial de liberação dependente do pH, estas podem trazer vantagens para algumas aplicações, pois permitem modular a liberação conforme o pH do meio. O estudo apresentado traz aspectos preliminares da síntese do copolímero em miniemulsão, mas que podem ser aprofundados para aplicações em progesterona e outros fármacos.

Os sistemas microemulsionados despertam grande interesse no transporte de fármacos, além de exibirem vantagens como estabilidade termodinâmica, transparência, possibilidade de filtração, facilidade de preparação, baixa viscosidade causando menos dor após a injeção, permitem também aumentar a biodisponibilidade, solubilidade e proteger o fármaco contra uma possível degradação. As gotículas da microemulsão podem agir como pequenos reservatórios, e dependendo da forma de administração, podem diminuir a taxa de liberação do fármaco (LAWRENCE, 1994; BAGWE et al., 2001). Alguns estudos realizados nas últimas décadas abordam a incorporação de progesterona em microemulsões (NANDI; BARI; JOSHI, 2003; LAND; LI; BUMMER, 2006; BIRUSS; VALENTA, 2008; HOSMER et al., 2009; MAGHRABY, 2012; REN et al., 2012). Destes, muitos utilizam a progesterona apenas como um modelo de fármaco hidrofóbico.

Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são constituídos de materiais biodegradáveis geralmente já utilizados em produtos farmacêuticos e cosméticos. Os

lipídeos são glicerídeos ou ácidos graxos de ampla utilização e aceitação (WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004). Apresentam grande potencial para encapsulação e liberação de fármacos hidrofóbicos. E também há poucos relatos da aplicação desses sistemas na liberação de progesterona (CAVALLI et al., 1999; CORTESI et al., 2002; YUAN et al., 2007).

Considerando o exposto, este trabalho teve por objetivo obter, caracterizar e avaliar a incorporação de progesterona em nanopartículas poliméricas de PMMA, P(MMA-co-AA), microemulsão à base de tensoativos não iônicos e nanopartículas lipídicas sólidas. Espera-se conhecer os perfis de liberação/permeação *in vitro*, as limitações e potencialidades de cada sistema, assim como fornecer subsídios à escolha do mais apropriado para cada aplicação.



## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo obter, caracterizar, avaliar a incorporação e liberação de progesterona em nanopartículas poliméricas de PMMA, P(MMA-co-AA), microemulsão à base de tensoativos não iônicos e nanopartículas lipídicas sólidas.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- 1) Validar metodologia para quantificação de progesterona em nanopartículas de PMMA por espectrofotometria UV.
- 2) Avaliar a estabilidade de miniemulsão para síntese de nanocápsulas e nanoesferas de PMMA com a inclusão de progesterona em diferentes concentrações.
- 3) Caracterizar nanopartículas de PMMA, determinar a eficiência de encapsulação de progesterona e perfil de liberação *in vitro*.
- 4) Sintetizar nanopartículas de P(MMA-co-AA) por polimerização em miniemulsão, caracterizar e determinar eficiência de encapsulação de progesterona.
- 5) Verificar alterações no perfil de liberação *in vitro* da progesterona encapsulada em P(MMA-co-AA) em função do pH.
- 6) Obter e caracterizar microemulsão com tensoativos não iônicos, avaliar a incorporação de progesterona e perfil de permeação em célula de difusão.
- 7) Obter e caracterizar nanopartículas lipídicas com diferentes lipídeos sólidos, determinar a eficiência de encapsulação e limite de incorporação de progesterona na formulação.
- 8) Avaliar o perfil de permeação em célula de difusão da progesterona encapsulada em nanopartículas lipídicas sólidas.



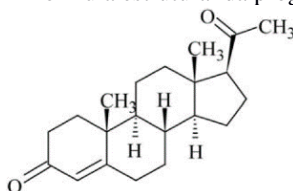
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, será apresentada a revisão bibliográfica, a qual aborda os principais conceitos adotados para o desenvolvimento do trabalho. Inicialmente serão apresentados aspectos gerais sobre a progesterona e suas aplicações. Em seguida, será tratado sobre o preparo de nanopartículas poliméricas por meio de polimerização em miniemulsão, síntese de PMMA e aplicações de nanopartículas poliméricas na liberação de progesterona, além da aplicação de polímeros sensíveis ao pH como P(MMA-co-AA). A terceira e quarta parte da revisão abordam conceitos e definições sobre microemulsão e nanopartículas lipídicas, respectivamente, com aplicações na liberação de fármacos, e destaca aos estudos envolvendo progesterona.

### 2.1 PROGESTERONA – ASPECTOS GERAIS E APLICAÇÕES

A progesterona (Pregn-4-ene-3,20-diona, abreviação P4) é um hormônio esteroide que foi isolado inicialmente de extratos do corpo lúteo em diversos estudos paralelos realizados nas primeiras décadas do século 20. Recebeu nomes como progestina e luteosterone, e posteriormente, a denominação foi acordada como “Progesterona” (RUAN; MUECK, 2014). Sua estrutura química contém quatro cadeias cíclicas interligadas, que a caracteriza como um esteroide, além dos grupos funcionais cetona e metila (Figura 1). A progesterona comercial pura se apresenta na forma de pó cristalino branco ou ligeiramente amarelado, inodoro e estável ao ar. Possui massa molar de 314,46 g/mol ( $C_{21}H_{30}O_2$ ), faixa de fusão entre 126 e 131°C, é praticamente insolúvel em água, solúvel em etanol, acetona, dioxana, e pouco solúvel em óleos vegetais (FARMACOPÉIA, 2010).

**Figura 1** – Fórmula estrutural da progesterona.



Fonte: Farmacopéia (2010).

É fundamental esclarecer a terminologia, pois “progesterona” é frequentemente utilizado como nome genérico para progestógenos naturais e diferentes tipos sintéticos. Tal designação não é adequada, pois a progesterona natural possui propriedades distintas das progestinas sintéticas. “Progesterona” só pode ser usada para designar o hormônio de cadeia idêntica ao produzido naturalmente pelo corpo lúteo do ovário após ovulação, na placenta durante a gravidez e nas glândulas supra-renais. O termo “progestógeno” corresponde a uma definição funcional e refere-se a esteroides naturais ou sintéticos que, como a progesterona, possuem atividades gestacionais: preparação e manutenção do útero para gravidez. Com relação ao termo “progestina”, apesar de haver divergências entre alguns autores, é mais utilizado para designar progestógenos produzidos sinteticamente, incluindo os derivados de testosterona (derivados de 19-nortestosterona) e derivados de progesterona (derivados de 17 $\alpha$ -hidroxi-progesterona e 19-norprogesterona) (SCHUMACHER et al., 2007).

A progesterona é essencial para a função reprodutiva feminina. De um modo geral, as principais funções fisiológicas da progesterona nos mamíferos são: 1) útero e ovários: liberação de ócitos maduros, facilitação de implantação e manutenção da gravidez, devido à promoção do crescimento uterino e supressão da contrabilidade no miométrio; 2) glândulas mamárias: desenvolvimento lobular, preparação para secreção do leite, supressão da síntese das proteínas do leite antes do parto; 3) cérebro: atua levando à liberação de sinais neuroquímicos essenciais ao comportamento sexual (GRAHAM; CLARKE, 1997). Há indícios de que progesterona apresenta efeito neuroprotetor, pois há maior incidência de doenças como Alzheimer no período pós-menopausa, quando os níveis desse hormônio são reduzidos. Inclusive, descobertas recentes indicam a capacidade de neurônios e células gliais converterem precursores de esteroides circulantes para esteroides neuroativos, e também sintetizá-los a partir do colesterol (SCHUMACHER et al., 2007; SINGH; SU, 2013).

Vários medicamentos com progesterona ou progestinas já foram aprovados pelos órgãos regulamentadores e muitos já são utilizados em humanos para diferentes finalidades, como o caproato de 17- $\alpha$ -hidroxi-progesterona, que é aprovado nos EUA para uso em mulheres com histórico de parto prematuro espontâneo. A administração oral de progestógenos é utilizada para proteção do endométrio, hemorragia disfuncional e em mulheres em períodos pré e pós-menopausa. A administração parenteral na forma de injeção intramuscular de progestógenos em óleo e o uso de dispositivos intravaginais apresentam resultados eficazes para manutenção da gravidez em tratamentos de

reprodução assistida, manutenção da gravidez tardia e prevenção de parto prematuro espontâneo em mulheres com gestação única e histórico do problema. As dosagens variam de 25 a 600 mg/dia dependendo do tratamento, forma de administração e medicamento. Para administração parenteral são indicados 50 – 100 mg/dia intramuscular. Os resultados para administração transdérmica, geralmente apresentada na forma de cremes, não são comprovados até o momento para tratamentos sistêmicos (RUAN; MUECK, 2014).

A aplicação da progesterona ocorre também no setor de saúde animal, principalmente no controle e aprimoramento dos métodos de reprodução bovina. A duração média do estro em bovinos é de aproximadamente 12 horas. A ovulação ocorre de 12 a 16 horas após o término do cio. Quando não ocorre a fecundação, o intervalo médio entre dois ciclos consecutivos é de 21 dias, o chamado ciclo estral. Este ciclo pode ser dividido em duas fases: folicular e luteínica. Na primeira, ocorre o desenvolvimento do folículo, estrutura que contém o óvulo, e a liberação deste. Na segunda fase, ocorre o desenvolvimento do corpo lúteo, formada após o rompimento do folículo. Essa estrutura produz progesterona, que é responsável pela manutenção da gestação. Caso o óvulo não tenha sido fertilizado, terá início uma nova fase folicular (VALLE, 1991).

A atividade de criação de gado é intensa em regiões tropicais devido à adaptação ao clima e sistemas de gestão. Contudo, a reprodução desses animais é muitas vezes afetada negativamente pelo anaestro, definido como um período de inatividade sexual e ausência de manifestação de estro no animal. A inserção de protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) aplicados à reprodução bovina auxilia na melhoria dos índices de fertilização. Os tratamentos hormonais têm sido utilizados para induzir a evolução e ciclicidade em fêmeas bovinas. A maioria dos tratamentos hormonais é baseada em dispositivos de liberação de progestógenos, associados a estradiol ou GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) (BARUSELLI et al., 2004).

O aprimoramento dos protocolos para sincronização do estro em bovinos vem sendo realizado há décadas (ODDE, 1990). O tratamento deve manter o sistema com elevados níveis de progesterona, mesmo após a regressão do corpo lúteo. A sincronização ocorre de 2 a 5 dias após a remoção do hormônio. Alguns produtos comerciais que se enquadram nessa categoria são Acetato de Melengestrol (administração via oral), Syncro-Mate-B® (implante na orelha) e CDIR® (dispositivo intravaginal). O tempo de manutenção de níveis elevados de progesterona varia de

acordo com o protocolo. O CDIR<sup>®</sup>, por exemplo, mantém a concentração de progesterona no sangue em pelo menos 2 ng.mL<sup>-1</sup>, por até 10 dias. Em geral, quanto maior o tempo de administração do progestógeno, melhor será a sincronização. No entanto, a taxa de fertilização tende a ser menor nos animais sincronizados (ISLAM, 2011).

O controle do estro e a indução da puberdade em novilhas também vêm sendo estudado com aplicações da nanotecnologia, especialmente com uso de micro e nanopartículas para liberação de esteroides, como progesterona e estradiol (WHISNANT; BURNS, 2002; OLIVEIRA et al., 2013). O uso de injeções de suspensão contendo nanopartículas pode facilitar a administração do fármaco, além de permitir a modulação da cinética de liberação conforme protocolo desejado.

## 2.2 POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO E ENCAPSULAÇÃO DE PROGESTERONA EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

### 2.2.1 Técnica de Polimerização em Miniemulsão

Na síntese de nanopartículas poliméricas, a polimerização em miniemulsão é uma técnica que se destaca entre as demais, pois permite diversas aplicações, entre elas: produção de látex com alto teor de sólidos e baixa viscosidade, partículas poliméricas híbridas, polimerização em meio não aquoso, polimerização em etapas em meio aquoso, produção de polímeros com baixo peso molecular em meio aquoso, incorporação de monômeros hidrofóbicos, encapsulação de sólidos inorgânicos, encapsulação de fármacos, entre outras (ASUA, 2002).

O processo de polimerização em miniemulsão pode ser dividido em duas etapas. Primeiro ocorre a preparação da miniemulsão, que é formada por sistema que contém pequenas gotas com tamanhos entre 30-500 nm, obtido por meio da aplicação de energia cisalhante em uma emulsão contendo a fase dispersa, fase contínua, emulsificante e um agente coestabilizador. Na segunda etapa, as gotas formadas na miniemulsão são polimerizadas sem alterar sua identidade (LANDFESTER, 2006).

Na miniemulsão direta a fase dispersa é a fase orgânica, a qual contém o monômero, o coestabilizador e, dependendo da aplicação, outros compostos de características hidrofóbicas poderão fazer parte da formulação (ex. fármaco a ser encapsulado). O iniciador também é adicionado à fase orgânica se for organossolúvel. A fase contínua é

composta pela água. Emulsificantes, que podem ser iônicos ou não iônicos, são solubilizados na fase orgânica ou aquosa dependendo do valor do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL). Emulsificantes naturais não iônicos, como a lecitina, são utilizados preferencialmente em formulações destinadas a aplicações biomédicas (EL-AASSER; SUDOL, 2004; ROMIO et al., 2009a; STEINMACHER et al., 2010; LEIMANN, 2011; LEIMANN et al. 2015).

Após a formação da miniemulsão, é esperado um sistema em estado metaestável, que se encontra entre as emulsões convencionais, consideradas instáveis, e a microemulsão, que é estável termodinamicamente. Esse pseudoequilíbrio pode durar horas ou dias, dependendo da formulação e forma de preparo, mas é suficiente para realização da polimerização e formação do látex (EL-AASSER; SUDOL, 2004). Dois fenômenos de degradação podem tornar a miniemulsão instável e aumentar o tamanho das gotas: a coalescência, causada pela colisão de gotas devido ao movimento Browniano, forças de Van der Waals e agitação; e a degradação por difusão monomérica (degradação de Ostwald), que muitas vezes é o mecanismo mais relevante para o aumento das gotas de monômero. A coalescência pode ser reduzida pelo ajuste na concentração de emulsificante e a degradação difusional é minimizada pela ação do coestabilizador (ASUA, 2002).

A escolha do coestabilizador deve levar em consideração alguns requisitos para que a ação seja efetiva na diminuição da degradação difusional: elevada solubilidade no monômero; baixa solubilidade em água; e baixo peso molecular. Exemplos de coestabilizadores utilizados incluem alcanos, como o hexadecano; polímeros, que podem ser adicionados para formação de partículas híbridas e atuar na diminuição da degradação; ácidos graxos e óleos essenciais, que além de atuar como coestabilizador podem constituir o núcleo das partículas e ter propriedades de interesse para uso em produtos farmacêuticos ou cosméticos (SCHORK et al, 2005; STEINMACHER et al, 2010; CARDOSO; ARAÚJO; SAYER, 2013).

Na polimerização em sistemas heterogêneos, três mecanismos de nucleação de partículas devem ser considerados: nucleação micelar, nucleação homogênea e nucleação de gotas. Devido à elevada área superficial das gotas, praticamente todo o emulsificante estará adsorvido na superfície destas, restando pouco emulsificante disponível para a formação de micelas, o que torna a nucleação das gotas o principal mecanismo de polimerização (SCHORK et al., 2005).

É pouco provável a ocorrência do mecanismo de nucleação micelar em polimerizações em miniemulsão. No entanto, pode ocorrer se a

concentração de emulsificante estiver acima da concentração micelar crítica. Neste caso, o radical entra na micela, que é inchada por monômero, e reage dando início a cadeia polimérica. Outras micelas servirão de depósitos de monômero, o qual passa a se difundir para o *locus* da polimerização. Esse mecanismo é comum em sistemas de polimerização em microemulsão. Outro mecanismo indesejável é a nucleação homogênea, onde as cadeias poliméricas são iniciadas a partir de oligômeros presentes na fase aquosa. A reação é alimentada pela difusão de monômero presente nas gotas. A ocorrência desse mecanismo depende da concentração total de iniciador e da solubilidade do monômero na fase aquosa. O mecanismo a ser favorecido na miniemulsão é o da nucleação das gotas, onde a polimerização ocorre por meio de um radical que entra nas gotas formadas na miniemulsão e reage com o monômero ali presente, sem necessidade de difusão a partir de outros reservatórios. Para um sistema de miniemulsão ideal, esse é o mecanismo preferido, pois cada gota é nucleada e o número de partículas não se altera durante a polimerização (BECHTHOLD; LANDFESTER, 2000).

A formação morfológica de nanopartículas poliméricas pode ser explicada por dois modelos teóricos. A teoria termodinâmica (TORZA; MASON, 1970) relaciona a formação de partículas casca-núcleo (nanocápsulas), partículas meio-esfera (parcialmente encapsulada) ou partículas sólidas (nanoesfera) com a tensão interfacial entre as fases, por meio do parâmetro chamado coeficiente de espalhamento. A teoria cinética (GONZÁLEZ-ORTIZ; ASUA, 1995; 1996a; 1996b) analisa modelos dinâmicos por meio do balanço de forças de van der Waals e forças viscosas para prever o desenvolvimento da morfologia de partículas durante a polimerização.

O desenvolvimento de nanopartículas poliméricas para usos na liberação de fármacos deve atentar para a biocompatibilidade e biodegradabilidade dos componentes. Sendo assim, o uso de polímeros biodegradáveis, emulsificantes não iônicos e óleos ou ácidos graxos tem sido comum.

Bathfield, Graillat e Hamaide (2005) realizaram a encapsulação de triglicérides de ácidos graxos cáprico e caprílico (Miglyol<sup>®</sup>) utilizando o processo de polimerização em miniemulsão com acetato de vinila e estireno. Foi utilizado surfactante não iônico (Pluronic F68) e iniciador organossolúvel 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN). O estudo demonstrou a possibilidade de obter nanopartículas não iônicas com materiais biocompatíveis e encapsulação de quantidades Miglyol de até 50% da fase orgânica. O uso do Miglyol não alterou consideravelmente a distribuição do tamanho das partículas em relação ao hexadecano, que é



frequentemente utilizado como coestabilizador em miniemulsão. Nas reações de polimerização de acetato de vinila, foram obtidas conversões elevadas (acima de 80%) após 4 horas de reação nas formulações com 10 e 30% de fase orgânica e 50 e 20% de coestabilizador, respectivamente. Foi observado que o aumento na concentração de hidrofóbico de 10 para 50%, proporcionou a elevação no tamanho das partículas de 165 para 219 nm, com índice de polidispersão (PDI) de 0,22 e 0,17, respectivamente.

A síntese de nanopartículas não iônicas adequadas à encapsulação de fármacos hidrofóbicos foi investigada por Rajot et al. (2003), o qual realizou polimerização em miniemulsão de acetato de vinila avaliando macromonômero oligocaprolactona, benzoato de benzila e Miglyol como coestabilizador para aplicações na encapsulação de indometacina. O estudo demonstrou a obtenção de nanopartículas com diâmetro entre 200 e 300 nm, índice de polidispersividade inferior a 0,2 e conversões acima de 80%, em formulações com até 60% de Miglyol na fase orgânica. O diâmetro nas nanopartículas aumentou com a elevação na concentração de coestabilizador e diminuiu com o aumento na concentração de emulsificante.

Romio et al. (2009a) obtiveram nanocápsulas utilizando lecitina como emulsificante e Neobee M5<sup>®</sup> como coestabilizador hidrofóbico, ambos com características apropriadas para aplicações farmacêuticas. O monômero utilizado foi metacrilato de metila e as reações de polimerização resultaram em disperções de nanocápsulas com diâmetro entre 200 e 500 nm, sendo este parâmetro influenciado pela concentração do emulsificante lecitina.

### **2.2.2 Polimetacrilato de Metila – Aplicações na Liberação de Fármacos e Toxicidade**

O polimetacrilato de metila (PMMA) ou polimetil metacrilato (Figura 2) é um homopolímero formado a partir do monômero metacrilato de metila (MMA) de massa molecular  $100,21 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Se a polimerização ocorrer em emulsão, a massa molecular do polímero pode atingir a ordem dos milhões e a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) fica em torno de  $105^\circ\text{C}$ . É um termoplástico altamente estável a temperatura ambiente, por isso, apresenta cadeias com maior rigidez, com presença de grupos laterais. O acrílico comercial é composto por PMMA atático, portanto amorfo, e como consequência possui elevada transparência (BECKER et al., 2011).

**Figura 2** – Estrutura do monômero metacrilato de metila (MMA) e o respectivo homopolímero polimetacrilato de metila (PMMA)



Fonte: Odian (2004).

O FDA (*Food and Drug Administration*), órgão governamental dos Estados Unidos da América, responsável pela avaliação e controle de alimentos, fármacos, cosméticos e dispositivos médicos, já considerou seguro diversos produtos feitos à base de PMMA, como lentes intraoculares, cimento ósseo, preenchimento dérmico e material odontológico. Os dados de segurança obtidos para esses dispositivos também colaboram na investigação de outras aplicações para o polímero, como em cosméticos, onde há registros de utilização em mais de 800 produtos. O PMMA utilizado em cosmético geralmente está na forma de pó fino com partículas inferiores a 16 µm, dependendo da aplicação. Além do homopolímero PMMA, constam aplicações de produtos biomédicos utilizando agentes de reticulação, como dimetacrilato glicol (BECKER et al., 2011).

A síntese de partículas poliméricas a partir de metacrilato de metila pode ser realizada por processos como a polimerização em miniemulsão, emulsão e suspensão. O processo em miniemulsão permite a síntese de partículas mais estáveis e homogêneas, além de facilitar a encapsulação de compostos ativos. Contudo, quando utilizado este processo com monômeros de características hidrofílicas, como o MMA, deve-se prevenir a nucleação secundária na fase contínua, que pode ser conseguido com a utilização de iniciador solúvel em óleo (LANDFESTER, 2006).

Devido aos dados de segurança obtidos com PMMA indicando uma possível biocompatibilidade em diversos sistemas, um número crescente de pesquisas vem sendo realizadas utilizando partículas desse polímero na encapsulação de compostos orgânicos e inorgânicos. Resultados toxicológicos satisfatórios foram obtidos por Lekshmi et al. (2010), cujo trabalho avaliou a liberação *in vitro* e toxicidade *in vivo* de repaglinida, fármaco utilizado no tratamento de diabetes mellitus, encapsulada em nanopartículas de PMMA. As partículas, preparadas pela técnica de evaporação do solvente, apresentaram tamanho médio de 108,3 nm com PDI 0,194. A eficiência de encapsulação chegou a 90,4%. A toxicidade foi avaliada em 3 grupos de ratos albinos, que receberam 1;

2 e 5 mg.kg<sup>-1</sup> de nanopartículas, respectivamente, por 21 dias. Os autores não detectaram nenhuma alteração com relação aos parâmetros comportamentais, hematológicos e bioquímicos, quando comparados ao grupo controle. Os exames anatomopatológicos revelaram que rim, fígado, baço e cérebro também não apresentaram alterações após a administração oral de nanopartículas carregadas com fármaco.

PMMA também tem demonstrado baixa toxicidade em testes *in vitro* com culturas de células. Nanopartículas de PMMA com tamanho em torno de 90 nm, sintetizadas por polimerização em miniemulsão, foram testadas em concentrações até 1500 µg.mL<sup>-1</sup> quanto à toxicidade em células leucêmicas humanas K562, e não mostraram qualquer efeito adverso sobre a viabilidade celular (MENDES et al., 2012).

Contudo, a toxicidade de nanopartículas de PMMA pode estar relacionada com o meio em que elas se encontram ou método utilizado na preparação. Em testes *in vitro*, realizados com células mononucleares de sangue periférico humano e nanopartículas casca/núcleo de biossurfactante (*Rhamnolipids, surfactin ou trehalose*)/PMMA, com tamanho inferior a 100 nm, a taxa de sobrevivência celular ficou acima de 80%, mas diminuiu significativamente com o aumento da concentração de nanopartículas no intervalo de 0,1 - 0,4 g.L<sup>-1</sup>. O biossurfactante auxiliou na diminuição da citotoxicidade, pois amostras controle de PMMA polimerizado em massa apresentaram considerável redução no número de células, viabilidade inferior a 30% com 0,7 g.L<sup>-1</sup>. Ensaio de hemólise também demonstraram que as nanopartículas de PMMA com biossurfactantes são menos tóxicas e apresentam maior hemocompatibilidade (< 2%) se comparado com o PMMA controle (*bulk*). Este apresentou hemólise de até 4,3%, considerado alto para aplicações em biomedicina, cujo padrão aceitável é até 2% pelas normas da ASTM (HAZRA et al., 2014).

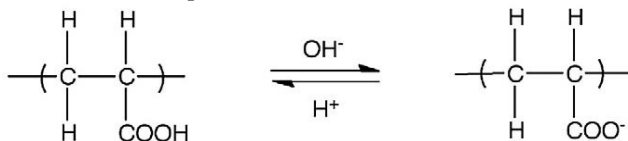
Além das aplicações de nanopartículas de PMMA como carreadores de fármacos, em especial para moléculas orgânicas, o polímero pode ser utilizado na síntese de materiais nanocompósitos orgânico-inorgânico. Alguns exemplos incluem síntese de nanopartículas magnéticas contendo Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> no núcleo e material polimérico na superfície (BACH et al., 2012); microesferas de PMMA-Ni, com a adsorção de níquel na superfície polimérica (LIN et al., 2013); microencapsulação de Al(OH)<sub>3</sub> com PMMA (GEURTS; VAN HERK; GERMAN, 2001).

### 2.2.3 Polímeros Sensíveis ao pH e Aplicações na Liberação de Fármacos

A IUPAC recomenda a definição de funcionalização de polímeros como a “introdução de grupos químicos desejados em moléculas poliméricas para criar propriedades químicas, físicas, farmacológicas entre outras, específicas” (HORIE et al., 2004). A síntese de polímeros funcionalizados em miniemulsão pode ocorrer por: copolimerização de um ou vários monômeros funcionais; ou modificação de polímeros presentes na fase dispersa. Neste caso a funcionalização pode ocorrer pela reação ou inclusão de pequenas moléculas no polímero, por “*grafting*” de macromoléculas, ou por degradação do polímero (CRESPY; LANDFESTER, 2010).

Polímeros sensíveis (responsivo) ao pH contêm geralmente grupos ácidos ou básicos fracos, os quais perdem ou recebem prótons em resposta ao pH do meio. Por exemplo, poli(ácido carboxílico) (PAA) contém grupos carboxílicos que perdem prótons em pH elevado. Acima da constante de dissociação ( $pK_a$  4,5), o grupo carboxílico se torna ionizado, levando à repulsão eletrostática entre cadeias que podem então associar-se com água causando inchamento. Esse processo é reversível e pode ser revertido com a diminuição do pH, conforme Figura 3 (SWIFT et al., 2016; CHAN et al., 2013).

**Figura 3** – Estrutura do poli(ácido acrílico) (PAA) em meio ácido e básico.



Fonte: Chan et al. (2013).

Um dos primeiros sistemas poliméricos responsivos ao pH estudado foi PS-*b*-PAA, o qual a um pH baixo torna-se insolúvel em água e com o aumento do pH, a neutralização do PAA transforma-o em um polieletrólito (DAI; RAVI; TAM, 2008). Outros monômeros clássicos podem originar polímeros com essas propriedades, além do ácido acrílico, como ácido metacrílico (MAAc), anidrido maleico (MA), metacrilato de N, N-dimetilaminoetilo (DMAEMA) e derivados do ácido fosfórico (SCHMALJOHANN, 2006).

Uma série de copolímeros denominada Eudragit® foi desenvolvida por Röhm GmbH & Co. KG para aplicações na liberação sustentada de

fármacos no sistema gastrointestinal (OLIVEIRA et al., 2009; MOUSTAFINE; ZAHAROV; KEMENOVA, 2006). Os copolímeros de Eudragit® são divididos em duas classes principais de acordo com sua estrutura química e aplicação, sendo: dependente do pH e independente do pH. A primeira classe inclui copolímeros com unidades que tornam o polímero solúvel em determinados órgãos do sistema gastrointestinal, como por exemplo polications que são solúveis no estômago (Eudragit® E) ou poliânions solúveis no intestino (Eudragit® L, S, FS). A liberação localizada é devido à presença de comonômeros solúveis em ácido, como dimetilaminometacrilato (DMAEMA), e monômeros acrílicos não ionizados em meio ácido, como ácido metacrílico (MMA), nos tipos L, S e FS. A diferença de solubilidade é controlada pela quantidade de grupos carboxílicos presente na composição do copolímero. A segunda classe é composta de copolímeros que são insolúveis no trato gastrointestinal, tornando a liberação lenta (MOUSTAFINE 2011).

Estudos recentes reportaram a síntese de copolímero aleatório de P(MMA-co-AA) por polimerização em massa via radicais livres (GYUROVA; HALACHEVA; MILEVA, 2017; YONCHEVA et al., 2015; HALACHEVA et al., 2014). Essa técnica de polimerização é relativamente simples, porém pode dificultar a encapsulação de fármacos, pois em geral torna-se necessário a síntese do polímero e a posterior preparação de partículas com o polímero pré-formado por técnicas como evaporação do solvente. Neste sentido, a copolimerização em miniemulsão pode ser mais apropriada à referida aplicação (LANDFESTER, 2006).

A síntese de partículas funcionais ocorre mais facilmente em miniemulsão inversa, uma vez que a presença de grupos funcionais tais como amino, hidroxila ou ácido carboxílico tendem a aumentar a hidrofiliabilidade do polímero. Quando for utilizada miniemulsão direta, normalmente é requerido a presença de um segundo monômero hidrofóbico (CRESPY; LANDFESTER, 2010). Apesar do metacrilato de metila (MMA) não possuir alta hidrofobicidade, há relatos de copolimerização em miniemulsão direta com comonômeros funcionais, tais como e ácido acrílico (WU; SCHORK; GOOCH, 1999; CAMPOS; FERRAZ; PINTO, 2016) e ácido vinilfosfórico (ZIEGLER; LANDFESTER; MUSYANOVYCH, 2009).

Polímeros ionizáveis com um valor de  $pK_a$  compreendido entre 3 e 10 são candidatos a sistemas de liberação de fármacos sensíveis ao pH, isso porque podem direcionar a resposta a um determinado órgão, tecido ou mesmo compartimento celular, como por exemplo: sangue (pH

7,35-7,45); estômago (pH 1,0-3,0); duodeno (pH 4,8-8,2); cólon (pH 7,0-7,5); lisossoma (pH 4,5-5,0); Golgi (pH 6,4); tumor (extracelular) (7,2-6,5); tecido inflamado (pH 5,4-7,4) e vagina (3,8-4,5) (SCHMALJOHANN, 2006; KOETTING et al., 2015).

O uso desses sistemas no trato gastrointestinal pode ser amplamente explorado devido às variações de pH nos órgãos, podendo direcionar a liberação conforme desejado. A administração intravaginal pode fazer uso de sistemas sensíveis ao pH, como por exemplo microbicidas destinados à prevenção de HIV e outras doenças sexualmente transmissíveis, que podem explorar a diferença entre o pH da vagina (pH 4-5) e do sêmen (pH ~7,5) (FELBER; DUFRESNE; LEROUX, 2012; ZHANG; STURGIS; YOUAN, 2011). Outra forma de controlar a liberação intravaginal é considerar variações no pH decorrentes da presença de patógenos bacterianos, que podem elevar o pH entre 5-6,5, ou redução dos níveis hormonais que ocorre geralmente na menopausa, o que eleva o pH entre 6-7,5 (CAILLOUETTE et al., 1997; AL-MALIKI et al., 2009).

#### **2.2.4 Encapsulação e Liberação de Progesterona em Partículas Poliméricas**

De modo geral, o uso de veículos hidrofílicos para transporte de fármacos é preferível aos óleos, no entanto, a utilização é restrita aos fármacos hidrofílicos. Injeções intramusculares de progesterona em óleo asseguram uma absorção confiável com obtenção de concentrações elevadas do fármaco no sangue. Embora bem sucedida sob esse aspecto, possui baixa adesão de uso devido à utilização de óleo como veículo. A injeção diária de progesterona durante semanas (no caso da utilização como suporte para manutenção da gravidez) pode levar a ações inflamatórias e dores locais (TAVANIOTOU et al., 2000; SALEM, 2010).

Sistemas utilizando partículas poliméricas em escala micro e nanométricas vêm sendo propostos para a encapsulação de fármacos, incluindo hormônios como a progesterona, visando à liberação prolongada, a redução no número de doses necessárias e a facilitação da administração.

Muitas técnicas utilizadas para formação de partículas poliméricas voltadas à encapsulação de fármacos partem de polímeros pré-formados, como poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) e poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL). Essas técnicas, em geral, são regidas por processos físicos que conferem morfologia, diâmetro e

incorporação do fármaco às partículas conforme as especificidades dos métodos empregados. Exemplos de técnicas que utilizam polímeros pré-formados são: evaporação do solvente, nanoprecipitação e as que utilizam fluido supercrítico (RAO; GECKELER, 2011). Alguns estudos envolvendo a microencapsulação de progesterona utilizando polímeros pré-formados são citados a seguir.

Im e Sah (2009) realizaram a encapsulação de progesterona em microesferas de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) utilizando a técnica “*Ammonolysis*”, obtendo partículas com tamanho em torno de 140  $\mu\text{m}$  e eficiência de encapsulação de até 97%. Testes *in vitro*, realizados em solução de SDS 5% a 37 °C, indicaram liberação de 89.9% da progesterona em 5 dias.

Utilizando o processo de evaporação do solvente, Jang e Sah (2011) microencapsularam progesterona em PLGA utilizando formiato de isopropila em substituição aos solventes halogenados frequentemente usados nessa técnica. A eficiência de encapsulação ficou entre 75,1 e 92,6%. O diâmetro das partículas apresentou elevado índice de polidispersividade, os diâmetros variaram de 4,9 a 266  $\mu\text{m}$ . Os autores observaram também, por meio de calorimetria exploratória diferencial (*Differential Scanning Calorimetry* - DSC), que a progesterona sofreu transição polimófica durante a microencapsulação.

O processo de miniemulsificação/evaporação de solvente foi utilizado por Leimann et al. (2015) para encapsulação de progesterona em polímeros biodegradáveis PHBV, PLLA, PCL e blendas poliméricas derivadas destes. O PLLA foi sintetizado via polimerização por abertura de anel. Foram obtidas elevadas eficiências de encapsulação (até 99,5%) e partículas com estreita distribuição de tamanhos.

A utilização de PLA na encapsulação de progesterona também é relatada no estudo de Oliveira et al. (2013). Neste trabalho os autores investigaram a liberação de progesterona encapsulada em nanofibras de PLA obtidas pelo processo de fiação por sopro em solução (*solution blow spinning*, SBS). As nanofibras apresentaram tamanhos entre 289 e 398 nm. As análises de caracterização do material indicaram alta miscibilidade e interação entre o grupo éster do PLA e os grupos cetona da progesterona. A liberação *in vitro* foi realizada em etanol 62,5%, a qual apresentou cinética de primeira ordem, com liberação de aproximadamente 90% do conteúdo em 15 horas de teste.

Além das técnicas baseadas na utilização de polímeros pré-formados, a formação de partículas poliméricas e encapsulação de fármacos pode ocorrer por meio de reações de polimerização partindo de um monômero, utilizando técnicas como a polimerização em

miniemulsão, microemulsão e interfacial (RAO; GECKELER, 2011). As reações de polimerização podem conferir características específicas aos sistemas nanoparticulados, inclusive proporcionando a liberação do agente sob determinados estímulos físicos (temperatura, luz, estresse mecânico, ultrassom, eletricidade), químicos (pH, força iônica) ou biológico (enzimas, biomoléculas) (KIM et al., 2009). Fármacos ou agentes de reconhecimento podem ser inseridos covalentemente na estrutura de polímeros biodegradáveis, envolvidos por estruturas micelares obtidas de copolímeros anfifílicos em blocos, ou ainda simplesmente encapsulados por nanopartículas poliméricas por afinidade química no momento de síntese. A distribuição de tamanho, carga da superfície e hidrofobicidade da nanopartícula pode determinar a aplicação (KAWASHIMA, 2001).

Poucos estudos abordaram a encapsulação da progesterona simultaneamente às reações de polimerização para síntese de micro ou nanopartículas. A polimerização em miniemulsão é uma técnica interessante para encapsulação de compostos hidrofóbicos, pois permite a incorporação destes na fase orgânica durante o preparo da miniemulsão (LANDFESTER, 2006). Destaca-se o trabalho de Leimann (2011), no qual progesterona foi encapsulada em nanopartículas híbridas de PHVB com PS e P(S-co-MAA) preparadas via polimerização em miniemulsão. O estudo demonstrou que não houve alterações na cinética de reação com a inclusão do fármaco e foram obtidas eficiências de encapsulação de até 99% com PHBV/P(S-co-MAA). As maiores eficiências foram obtidas em partículas estabilizadas por lecitina.

Alguns trabalhos utilizaram a progesterona como modelo de fármaco hidrofóbico, à exemplo, Silveira et al. (1998), que observou um aumento de até 50 vezes na incorporação de progesterona em nanopartículas de poli(isobutilcianocrilato) quando a reação de polimerização aniônica foi conduzida na presença de ciclodextrina, que foi justificado pelo aumento de sítios lipofílicos nas partículas, possibilitando maior agregação de fármacos hidrofóbicos.

## 2.3 MICROEMULSÕES

### 2.3.1 Conceitos e Definições

Microemulsão consiste em um sistema isotropicamente translúcido ou transparente, de baixa viscosidade, termodinamicamente estável, constituído de dois líquidos imiscíveis estabilizados por tensoativos. O

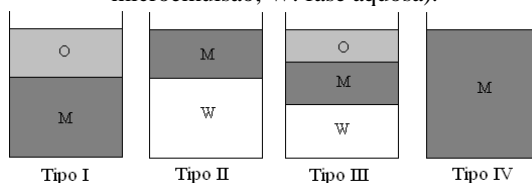


conceito foi introduzido no início da década de 1940 em estudos pioneiros como o de Hoar e Schulman (1943). No entanto, o termo “microemulsão” foi citado posteriormente (SCHULMAN; STOECKENIUS; PRINCE, 1959), e continua sendo utilizado até hoje para descrever dispersões com tais características, apesar da definição ter sofrido transformações ao longo do tempo (LAWRENCE; REES, 2012).

Devido a essas divergências na definição de “microemulsão” que foram geradas nos diversos estudos publicados nas últimas décadas, no presente texto será utilizada a definição descrita por Danielsson e Lindman (1981), a qual estabelece que “*microemulsion is defined as a system of water, oil and amphiphile which is a single optically isotropic and thermodynamically stable liquid solution.*” Ou seja, microemulsão é definida como uma solução líquida composta de água, óleo e anfifílico, opticamente isotrópica e termodinamicamente estável. Assim, o conceito de microemulsão abrange solução micelar aquosa de surfactante contendo lipídeo solubilizado (microemulsão O/A); solução micelar lipofílica de surfactante contendo água solubilizada (microemulsão A/O); sistemas com transição contínua entre a fase aquosa e a fase lipofílica (microemulsão bicontínua).

Os sistemas microemulsionados podem ser classificados de acordo com Winsor (1948), que descreve a possibilidade da microemulsão atingir o equilíbrio com a fase aquosa ou oleosa. Winsor (1948) estabeleceu quatro tipos de sistemas possíveis: 1) ocorre o equilíbrio entre a fase emulsionada e a fase oleosa em excesso, a qual se posiciona acima da emulsão por diferença de densidade; 2) ocorre o equilíbrio entre a fase emulsionada e a fase aquosa em excesso. Neste caso a emulsão se posiciona acima da fase aquosa por possuir menor densidade; 3) ocorre equilíbrio entre as 3 fases, óleo, emulsão e água. O óleo se posiciona na fase superior, a emulsão na intermediária e a fase aquosa na inferior; 4) o sistema é visualmente monofásico, composto da fase emulsionada. Os sistemas estão representados na Figura 4.

**Figura 4** – Sistemas de Winsor para microemulsões (O: fase oleosa; M: microemulsão; W: fase aquosa).



Fonte: Adaptado de WINSOR (1948).

A principal diferença entre emulsão ou miniemulsão comparadas à microemulsão é a estabilidade. As emulsões apresentam apenas estabilidade cinética, podendo ocorrer separação de fase com o tempo, já microemulsões são estáveis termodinamicamente. Outro fator que as diferencia são os métodos de preparação, frequentemente emulsões requerem aplicação de grande quantidade de energia, enquanto a formação de microemulsões é espontânea. Estas são formadas de pequenas gotículas, geralmente com tamanho inferior a 150 nm, o que torna o sistema coloidal ópticamente transparente, pois não há espalhamento da luz (DATE; NAGARSENKER, 2008a; LAWRENCE; REES, 2012).

Os componentes que geralmente formam a base da microemulsão incluem a fase hidrofílica (geralmente água), fase lipofílica (óleo), tensoativo e cotensoativo. Por isso, microemulsões são tratadas como sistemas ternários ou pseudoternários, quando o terceiro componente é a mistura tensoativo+cotensoativo. O agente tensoativo deve ser capaz de reduzir a tensão interfacial a um valor muito pequeno para facilitar a dispersão durante a preparação. Deve possuir propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, sendo caracterizado pelo valor EHL (Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico). Tensoativos com  $EHL > 10$  são predominantemente hidrofílicos e favorecem a formação de microemulsões O/A, enquanto valores baixos de EHL indicam maior hidrofobicidade da molécula, sendo mais adequado à formação de microemulsões A/O (NARANG; DELMARRE; GAO, 2007).

O uso de cotensoativos é comum em microemulsões, pois muitas vezes apenas o surfactante é incapaz de reduzir a tensão interfacial entre óleo-água suficientemente. Esses agentes garantem maior fluidez e flexibilidade da película interfacial permitindo a curvatura necessária à formação da microemulsão. Álcoois de cadeia curta e média (C2-C8) são frequentemente utilizados como cotensoativos (TALEGAONKAR et al., 2008; LAWRENCE; REES, 2012).

Existem três abordagens para explicar a formação e estabilidade de microemulsões: teoria da tensão interfacial; teoria da solubilização e teoria termodinâmica. O aprofundamento da pesquisa bibliográfica acerca dessas teorias foge ao escopo deste trabalho, mas pode ser encontrado em publicações tais como Prince (1967), Shinoda; Friberg (1975) e Ruckenstein; Chi (1975), respectivamente.

A preparação de microemulsão pode ocorrer basicamente por três métodos: inversão de fases, titulométrico e simples mistura. A inversão de fases ocorre com adição de excesso da fase dispersa ou em resposta à temperatura. Nesse processo podem ocorrer alterações físicas, incluindo

mudanças no tamanho de gotas. Sistemas que utilizam tensoativos não iônicos podem fazer uso de alterações na temperatura, forçando a transição a partir de uma microemulsão O/A em baixas temperaturas para uma microemulsão A/O em temperaturas elevadas. Durante o resfriamento o sistema passa pelo ponto de curvatura zero e tensão superficial mínima, promovendo a formação de gotículas de óleo finamente dispersas. Esse ponto é conhecido como Temperatura de Inversão de Fases (TALEGAONKAR et al., 2008; TIAN et al., 2012).

O método mais utilizado na preparação da microemulsão é o titulométrico. Neste, geralmente a mistura de tensoativo/cotensoativo e óleo, em proporções previamente estabelecidas, são titulados com água mantendo o sistema em agitação. Após, o sistema é avaliado quanto à formação ou não de microemulsão. Os resultados podem ser representados com auxílio de diagramas de fase, que são úteis na compreensão e identificação das regiões de equilíbrio de fase. A variação na proporção da mistura dos componentes pode gerar outras dispersões além da microemulsão, tais como emulsões com diferentes viscosidades, líquidos cristalinos, micelas, géis. O diagrama ternário ou quaternário permite mapear a formação dessas dispersões (BIRUSS; VALENTA, 2008; HOSMER et al., 2009; NAOULI; ROSANO, 2009; REN et al., 2012).

Semelhante ao método titulométrico, a simples mistura em proporções adequadas da fração aquosa com a lipofílica, mantendo agitação suave e constante à temperatura ambiente, pode ser um método de preparo de microemulsão (MORENO; FRUTOS; BALLESTEROS, 2001; PODLOGAR et al., 2004; WU et al., 2014). Apesar do preparo da microemulsão não requerer aplicação de grandes quantidades de energia como ocorre na miniemulsão, é possível fazer uso de homogeneizadores como do tipo rotor-estator (ex. Ultra-turrax<sup>®</sup>) para reduzir e uniformizar o tamanho das gotas (CHO et al., 2008).

A caracterização de microemulsões pode ser feita visualmente avaliando a transparência/translucidez e a consistência da amostra quanto ao aumento da viscosidade ou formação de gel. O uso de microscopia de luz polarizada pode auxiliar na observação visual, sendo que microemulsão deve ser translúcida ou transparente com aparência isotrópica sob a luz polarizada do microscópio. Enquanto líquidos cristalinos são sistemas semissólidos que exibem birrefringência sob o microscópio de luz polarizada devido a sua propriedade de dupla refração. Emulsões grosseiras não exibem birrefringência, mas apresentam estruturas de gotículas sob o microscópio de contraste de fase (REN et al., 2012; WU et al., 2014). A morfologia das nanoestruturas que compõem a

microemulsão pode ser estudada por técnicas de microscopia eletrônica, como Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (ACHARYA; HARTLEY, 2012).

O uso de técnicas espectrofotométricas como determinação da turbidez (CHO et al., 2008) e transmitância (NAOULI; ROSANO, 2009) também podem auxiliar a identificação do sistema microemulsionado. Outras análises e medições são frequentes na caracterização de microemulsões, tais como tamanho de gotas, condutividade, pH, potencial zeta, reologia e viscosidade. A Calorimetria diferencial de Varredura (*Differential Scanning Calorimetry* – DSC) pode ser utilizada para fornecer informações sobre a possível interação entre os componentes da amostra (PODLOGAR et al., 2004; NARANG; DELMARRE; GAO, 2007).

Uma das técnicas mais utilizadas para estimar o tamanho das gotas é o Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering* – DLS). Esta técnica é rápida e requer um equipamento relativamente simples. Permite analisar o tamanho das gotas por meio da Equação Stokes-Einstein, que determina o diâmetro hidrodinâmico obtido pela medida da constante de difusão das gotículas da fase dispersa devido ao movimento Browniano. Outras técnicas de espalhamento utilizadas para determinar o tamanho e forma das nanogotas de microemulsão são Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (*Small-angle X-Ray Scattering* - SAXS) e Espalhamento de Neutrons a Baixo Ângulo (*Small-angle Neutron Scattering* - SANS) (ACHARYA; HARTLEY, 2012).

### **2.3.2 Aplicações de Microemulsão na Liberação de Fármacos**

Os sistemas microemulsionados despertam grande interesse no transporte de fármacos, pois além de exibirem vantagens como estabilidade termodinâmica, transparência, possibilidade de serem filtrados, facilidade de preparação, baixa viscosidade (causando menos dor após a injeção), permitem também aumentar a biodisponibilidade, solubilidade e proteger o fármaco contra possíveis degradações, como hidrólise enzimática (LAWRENCE, 1994). A liberação prolongada do fármaco deve-se às gotículas que agem como pequenos reservatórios, que dependendo da forma de administração, promovem a liberação lenta. Em geral, a presença do tensoativo aumenta a permeabilidade na membrana celular, permitindo uma fácil absorção. Microemulsões bicontínuas podem solubilizar quantidades elevadas de ambos os fármacos, hidrofóbicos e hidrofílicos (BAGWE et al., 2001).

As microemulsões têm baixa tensão superficial e gotículas com pequeno diâmetro, que resulta em alta absorção e permeação. As propriedades físicas e químicas favoráveis desses sistemas ampliaram as aplicações em fármacos para além da via de administração oral convencional. Considerando que a formulação da microemulsão deve ser biocompatível para aplicações biomédicas, a escolha dos componentes e a respectiva concentração é a etapa fundamental do processo de desenvolvimento, especialmente porque, na maioria das vezes, elevada quantidade de tensoativo é necessária para formação da microemulsão, o que não é desejado devido à possível toxicidade (TALEGAONKAR et al., 2008; WU et al., 2010). Microemulsões podem ser ideais como carreadores de fármacos pouco solúveis em água, como hormônios, diuréticos e antibióticos. Contudo, a concentração de tensoativos e cotensoativos deve ser minimizada para reduzir efeitos indesejados. Para administração parenteral, especialmente a intravenosa, o controle da toxicidade da formulação deve ser ainda mais rigoroso (BAGWE et al., 2001).

Na literatura, há relatos de estudo de microemulsões para aplicações em diversas vias de administração, como tópica, oral, oftálmica, nasal, periodontal e parenteral. Em uso tópico, as microemulsões podem aumentar significativamente a absorção cutânea de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, em comparação com formulações convencionais como soluções aquosas, óleos, soluções micelares, emulsões e lipossomas. Os efeitos favoráveis à microemulsão devem-se possivelmente aos elevados gradientes de concentração fornecidos pelo aumento da solubilidade do fármaco e ao efeito de penetração dos constituintes da formulação. A taxa de liberação do fármaco também é alterada pela mobilidade deste na fase interna da formulação, que é determinada pela estrutura da microemulsão e afinidade com os componentes (KREILGAARD, 2002; TSAI et al., 2010; HATHOUT et al., 2010).

O estudo de microemulsões envolve aplicações como a liberação de anestésicos periodontal, em sistema contendo os fármacos lidocaína e prilocaína (SCHERLUND et al., 2000); e liberação oftálmica, onde o desafio é aumentar a biodisponibilidade, pois há perdas devido à secreção lacrimal e a barreira hemato-ocular (VANDAMME, 2002; HEGDE; VERMA; GHOSH, 2013). Shinde; Jindal; Devarajan (2011) destacam que microemulsões e nanoemulsões tipo O/A e A/O têm potencial para aumentar a biodisponibilidade oral e parentérica de fármacos, com perspectivas de aplicações em terapias de distúrbios cerebrais. Neste caso, preferem-se microemulsões e nanoemulsões do tipo O/A com

destaque aos componentes da formulação que podem ser funcionais, melhorando o transporte do fármaco pela barreira hematoencefálica.

A administração parentérica de fármacos é de extrema importância em casos de emergência, onde a ação precisa ser rápida, e para compostos que são fracamente absorvidos por via oral, como por exemplo, os fármacos hidrofóbicos anfotericina B e paclitaxel. Essa via de administração também é fundamental para a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos (DATE; NAGARSENKER, 2008a). Emulsões lipídicas injetáveis também são utilizadas em nutrição parenteral, auxiliando no fornecimento de energia, ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis a pacientes hospitalizados (HIPALGAONKAR; MAJUMDAR; KANSARA, 2010).

A liberação de fármacos hidrofóbicos por via parenteral ainda é muito limitada, seja utilizando abordagens convencionais como veículos oleosos, cosoventes, ou mesmo utilizando tecnologias mais recentes como micelas, lipossomos ou complexação com ciclodextrina. A concepção de sistemas de entrega parenteral de fármacos é uma tarefa crítica e exigente, pois o número de excipientes aprovados é consideravelmente baixo. O desenvolvimento de formulações para fármacos hidrofóbicos é ainda mais difícil, e considera-se que até 40% das novas substâncias descobertas pela indústria farmacêutica são pouco solúveis em água ou compostos lipofílicos, sendo difícil incorporar dosagem adequada para avaliação pré-clínica (DATE; NAGARSENKER, 2008a).

Além da dor e danos aos tecidos como resultado da irritação ou resposta imune ocasionada pelos componentes da formulação e características físicas, como a viscosidade, um problema frequente na pós-administração de formulações convencionais é a precipitação do fármaco no local da injeção, que ocorre devido à baixa solubilidade do fármaco no meio aquoso do organismo (WU et al., 2010).

Diante dos obstáculos técnicos relativos à entrega parenteral de compostos hidrofóbicos, microemulsões O/A têm despertado interesse de pesquisadores, pois podem proporcionar formulações com concentrações relativamente elevada desses compostos e maior estabilidade física no plasma (TALEGAONKAR et al., 2008). A patente proposta por Yiv; Tustian (2001) refere-se a uma microemulsão O/A para liberação de fármacos por injeção intravenosa. A formulação possui um componente fosfolipídico; propileno glicol ou polietileno glicol; tensoativo de elevado EHL (mínimo 12); componente oleoso; água; e agentes antifúngicos derivados de equinocandinas e clotrimazol. A proposta é utilizar a formulação como veículo para administração de vários agentes ativos, na

forma concentrada ou diluída, especialmente aqueles lipofílicos ou de solubilidade fraca a moderada em água. Os modos de administração incluem injeção intravenosa, intra-arterial, intramuscular, injeção subcutânea.

Park e Kim (1999) avaliaram microemulsão para liberação parenteral (intravenosa) de flurbiprofeno, um fármaco pouco solúvel em água que tem ação analgésica e anti-inflamatória. A microemulsão O/A foi preparada utilizando oleato de etila como fase oleosa; Tween 20 como emulsificante; e fase aquosa contendo sais, glicerol, sorbitol e dextrose. A microemulsão permitiu solubilizar  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  de flurbiprofeno, um aumento de 8 vezes se comparado com uma solução tampão PBS. Testes de farmacocinética em ratos, com administração intravenosa de  $2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  de flurbiprofeno, revelaram que não há diferença significativa entre a microemulsão e a solução tampão. Porém o uso da microemulsão permitiu injeções de volumes menores e obtenção do mesmo perfil de concentração plasmática do fármaco.

Para emulsões injetáveis, e que por analogia podem se estender à microemulsões, o tamanho da gota tem impacto direto sobre a toxicidade e estabilidade do sistema. Gotas com mais de  $5 \mu\text{m}$  podem ser retidas nos pulmões e causar embolia pulmonar. O aumento do tamanho da gota também pode representar problemas de estabilidade na emulsão. Por isso, a distribuição e tamanho das gotas devem ser cuidadosamente avaliados em emulsões injetáveis (HIPALGAONKAR; MAJUMDAR; KANSARA, 2010).

Em experimentos realizados com ratos foi avaliado a farmacocinética das substâncias antitumorais *rhizoxin* e *palmitoyl-rhizoxin* incorporadas em emulsões injetáveis por via intravenosa. Verificou-se que emulsões com gotículas maiores que  $200 \text{ nm}$  inibiram a penetração do fármaco na medula óssea e intestino delgado, assim como a concentração no plasma foi reduzida, indicando que o tamanho das gotas pode controlar o processo de disposição do fármaco no organismo (KURIHARA et al., 1996). Embora a solubilização completa do fármaco não seja um pré-requisito para injeções extravasculares, tais como administrações subcutâneas e intramusculares, e suspensões e micropartículas estarem disponíveis comercialmente, o controle do tamanho da partícula pode um obstáculo no desenvolvimento de uma formulação, principalmente em processos de fabricação em larga escala (REN et al., 2012).

Poucos estudos envolvendo a incorporação de progesterona em microemulsões são relatados na literatura (NANDI; BARI; JOSHI, 2003; LAND; LI; BUMMER, 2006; BIRUSS; VALENTA, 2008; HOSMER et

al., 2009; MAGHRABY, 2012; REN et al., 2012). Destes, muitos tratam da incorporação de progesterona em microemulsões com aplicações dérmicas ou utilizam a progesterona apenas como um modelo de fármaco hidrofóbico.

A progesterona pode apresentar elevada solubilidade em microemulsões, especialmente aquelas com elevado teor de óleo. Em estudo realizado por Nandi; Bari e Joshi (2003), formulação A/O contendo miristato de isopropila (IPM) (36,3%), isobutanol (4,5%), Tween 80 (20,5), Span 20 (20,5%) e água (18,2%), a solubilidade da progesterona foi de 23,1 mg.mL<sup>-1</sup>. Já em formulação O/A com IPM (8,6%), isobutanol (5,3%), Tween 40 (34,5%) e água (51,6%), a solubilidade foi de 8,5 mg.mL<sup>-1</sup>. Álcoois de baixo peso molecular alteram a energia interfacial nas camadas de tensoativos e podem auxiliar na formação da microemulsão. O estudo revela que alcoóis de 3 a 5 carbonos (propanol a pentanol) facilitam a formação da microemulsão permitindo a incorporação de um maior teor de água na formulação. A incorporação de água foi proporcional ao teor de álcool na mistura óleo-tensoativo. Metanol e etanol mostraram baixo ou nenhum efeito na incorporação de água (NANDI; BARI; JOSHI, 2003).

Microemulsões em contato com o meio aquoso do organismo podem sofrer transição de fase e conseqüentemente alterações estruturais, formando líquidos cristalinos ou mesmo emulsões grosseiras. Ren et al. (2012) realizou estudo desses efeitos na liberação *in vitro* de progesterona incorporada em microemulsões à base de Miglyol 812N, Solutol HS 15, Span 80, etanol e água. Com variações na formulação desses componentes foi possível identificar regiões de formação de microemulsões, emulsões e líquidos cristalinos. Para avaliação da transição de fase, foram selecionadas duas formulações de microemulsões, uma com potencial de formar líquido cristalino e outra de formar emulsão em contato com a água. Por meio de estudos com cintilografia de raios gama e células de difusão de Franz, os autores demonstraram que microemulsões com potencial de formar líquidos cristalinos apresentam perfil de liberação mais lento. Indicando que, para injeções extravasculares, a liberação do fármaco pode ser modulada de acordo com as características estruturais e de viscosidade da mistura resultante entre a microemulsão e o líquido aquoso corpóreo.



## 2.4 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

### 2.4.1 Definições e Características Estruturais

Nanopartículas à base de lipídeos sólidos foram desenvolvidas para ser uma alternativa a outros modelos convencionais de liberação de fármacos como emulsões, nanopartículas poliméricas e lipossomos. Em geral, esses sistemas são constituídos de uma matriz lipídica sólida na qual é incorporado o fármaco. Agentes tensoativos são utilizados como estabilizantes da dispersão. O tamanho de partículas fica geralmente entre 150 e 300 nm, contudo dependendo do sistema podem ser obtidos tamanhos desde 50 nm até 1000 nm (MÜHLEN; SCHWARZ; MEHNERT, 1998; YOON; PARK; YOON, 2013).

O desenvolvimento mais intenso de nanopartículas lipídicas ocorreu a partir da década de 90, quando esses sistemas passaram a combinar as vantagens de outros modelos de transportes inovadores, como estabilidade física, incorporação e proteção de fármacos contra possíveis degradações, liberação controlada, excelente tolerância pelo organismo receptor (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004).

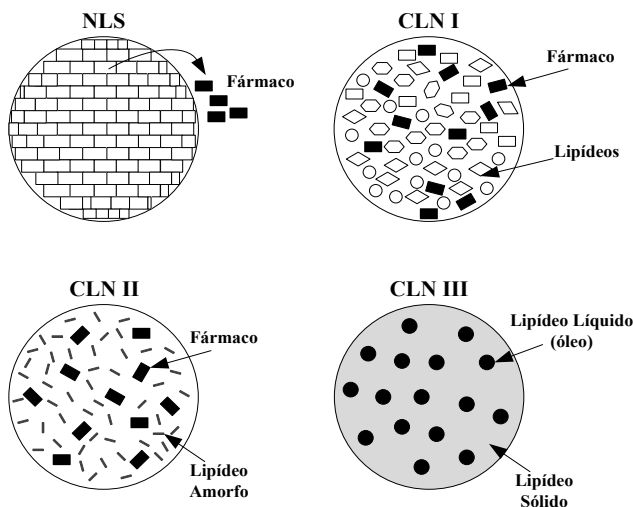
Apesar de diversos sistemas coloidais envolverem o uso de lipídeos, tais como lipossomas, nanoemulsão, microemulsão, nanocápsulas lipídicas, esta revisão trata apenas de nanopartículas à base de lipídeos sólidos, que podem ser classificadas em: nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). De acordo com Mehnert e Mäder (2012), NLS preparadas exclusivamente a partir de lipídeos sólidos à temperatura ambiente podem apresentar limitações na encapsulação do fármaco e, devido à complexidade do estado físico do lipídeo, podem causar problemas no armazenamento e administração, como gelatinização, aumento do tamanho de partícula e expulsão do fármaco. Esses fatores levaram ao desenvolvimento de uma nova geração de nanopartículas lipídicas denominadas carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), que em contraste à geração anterior, passaram a incorporar, de forma controlada, lipídeos líquidos em sua formulação (WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004).

A expulsão do fármaco da matriz lipídica ocorre porque, durante o armazenamento, o lipídeo passa por modificações em sua estrutura, a qual se torna altamente ordenada. Essa transformação, também denominada modificação  $\beta$ , é caracterizada pela formação de uma estrutura cristalina quase perfeita, portanto, com pouco espaço para acomodação do fármaco

no interior da partícula. CLN mostram uma capacidade de incorporação de fármacos mais elevada se comparada à NLS. A incorporação de diferentes lipídeos e a mistura de componentes líquidos e sólidos torna a matriz lipídica menos organizada, permitindo a acomodação do fármaco em sua estrutura (WEBER; ZIMMER; PARDEIKE, 2014).

Na Figura 5 estão representadas as principais diferenças estruturais nas nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados. As NLS são caracterizadas pelo elevado grau de cristalinidade da matriz lipídica, proporcionada por estruturas organizadas, especialmente quando utilizado lipídeos sólidos purificados. Três abordagens distintas podem ser usadas na classificação de CLN. Na estrutura tipo I, diferentes lipídeos líquidos e sólidos são misturados. A diferença na organização dos lipídeos e no processo de cristalização conduz a baixa ordenação das cadeias e consequentemente, a estrutura da matriz lipídica torna-se imperfeita, proporcionando espaços no interior das partículas para os aglomerados de fármacos (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; SELVAMUTHUKUMAR; VELMURUGAN, 2012).

**Figura 5** – Estruturas de nanopartículas lipídicas: NLS e estruturas de CLN.



Fonte: Adaptado de Müller; Radtke e Wissing (2002).

Devido ao fato do processo de cristalização causar a expulsão do fármaco das nanopartículas, levou-se a necessidade de produzir CLN sólidos, mas não cristalinos, os quais foram obtidos com o uso de misturas

de lipídeos sólidos e líquidos, que resultou em estrutura amorfa (estrutura tipo II). De modo geral, a solubilidade de fármacos é mais elevada em lipídeos líquidos. Isso deve ser considerado no processo de produção de nanopartículas lipídicas, pois a quantidade de fármaco solúvel no lipídeo fundido pode ser maior do que nas nanopartículas sólidas ao final do processo. Por isso, concentrações elevadas de fármaco na formulação inicial podem levar à expulsão imediata durante o resfriamento ou diluição em água fria. Com base nesse conceito, CLN com estruturas do tipo III foram desenvolvidos, estes possuem compartimentos de óleo líquido na matriz sólida da nanopartícula (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; SELVAMUTHUKUMAR; VELMURUGAN, 2012).

## **2.4.2 Preparação de Nanopartículas Lipídicas**

Diversos métodos podem ser utilizados na preparação de nanopartículas lipídicas, os principais geralmente envolvem homogeneização em alta pressão, ultrassonificação, microemulsão, emulsificação/evaporação ou difusão do solvente e dupla emulsificação.

Na preparação de nanopartículas lipídicas por homogeneização em altas pressões à quente, o fármaco é solubilizado no lipídeo em temperatura entre 5 e 10°C acima do ponto de fusão. Após a fusão do lipídeo contendo o fármaco, a mistura é dispersada em solução aquosa contendo o agente tensoativo na mesma temperatura. A pré-emulsão obtida é colocada em homogeneizador de pistão à vácuo. A nanoemulsão O/A quente é resfriada à temperatura ambiente, quando ocorre a recristalização dos lipídeos e a formação de nanopartículas lipídicas sólidas. Esta técnica pode ser aplicada mesmo em compostos com relativa sensibilidade térmica, pois o tempo de exposição a temperaturas elevadas é curto (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000). A técnica possui vantagens, tais como estabilidade e facilidade de ampliação de escala. As principais desvantagens referem-se ao uso intensivo de energia, alto índice de polidispersividade e uso de temperaturas relativamente elevadas quando realizado com a técnica de homogeneização à quente (YOON; PARK; YOON, 2013).

A ultrassonificação é semelhante à homogeneização em altas pressões, difere ao final quando a mistura de lipídeo derretido e fase aquosa com tensoativo são submetidas à homogeneização com alta taxa de cisalhamento, geralmente por meio de ultrassom, para obtenção da nanoemulsão. Muitas vezes a quantidade de tensoativo necessária para estabilizar o sistema é elevada, sendo considerada uma desvantagem. Apesar de a técnica utilizar equipamento relativamente simples, há

possibilidade de contaminação metálica da amostra no processo de ultrassom e pode não produzir partículas com distribuição de tamanho estreito (DAS; CHAUDHURY, 2011; NASERI; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2015).

As vantagens de microemulsões, como estabilidade termodinâmica, possibilidade de incorporação de elevada quantidade de fármaco e baixa demanda de energia, também foram exploradas na preparação de nanopartículas lipídicas. O desenvolvimento e otimização desta técnica teve grande contribuição do grupo de pesquisa de Gasco e colaboradores (AQUILANO; CAVALLI; GASCO, 1993; CAVALLI; CAPUTO; GASCO, 1993; MOREL et al., 1996).

A microemulsão contendo lipídeo sólido, tensoativo, cotensoativo e água, é preparada previamente em temperatura acima do ponto de fusão do lipídeo. Essa microemulsão aquecida é então dispersa em água fria (2 a 4°C) mantendo o sistema em agitação mecânica. A proporção entre microemulsão e água é variável, geralmente são estudados sistemas com proporções entre 1:5 e 1:50 (v/v, microemulsão:água). O processo é fortemente influenciado por fatores como composição da microemulsão, dispositivo de dispersão ou gotejamento, temperatura. As principais desvantagens desse processo é o uso excessivo de tensoativos na formulação de microemulsão e a dificuldade uniformizar e estabilizar o tamanho de partículas (WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004; LIN et al., 2007; FADDA et al., 2013; MOJAHEDIAN et al., 2013).

### **2.4.3 Aplicações de Partículas Lipídicas na Liberação de Fármacos**

Aplicações de nanopartículas lipídicas na liberação de fármacos em diferentes vias de administração têm sido estudadas, como parenteral (JOSHI et al., 2008; ATHAWALE et al., 2014), oral (LIU et al., 2010; ZHANG et al., 2014a), dermal (LAUTERBACH; MÜLLER-GOYMANN, 2015; CHAROENPUTTAKUN; LI; NGAWHIRUNPAT, 2015), ocular (FANGUEIRO, et al., 2014; HOU, et al., 2016) e direcionadas ao cérebro (KOZIARA et al., 2003; BONDI et al., 2010; YASIR; SARA, 2014).

Estudos indicam que nanopartículas lipídicas podem ser injetadas por via intravenosa, intramuscular, subcutânea e serem usadas no direcionamento de fármacos para órgãos específicos. Como as demais partículas coloidais, quando administradas por via intravenosa são eliminadas da circulação pelo fígado e pelo baço. Devido ao tamanho inferior a 1 µm, podem ser utilizadas para distribuição sistêmica no corpo, com risco reduzido de coagulação do sangue, que conduziriam à

processos de embolia. Quando administradas na via subcutânea podem agir como um depósito, liberando o fármaco de forma sustentada (WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004).

NLS e CLN possuem todos os pré-requisitos para entrar no mercado mais rapidamente do que outros veículos coloidais, isso porque são compostos de materiais biodegradáveis e que já estão em utilização em produtos farmacêuticos e cosméticos. Os lipídeos são glicerídeos ou ácidos graxos de ampla utilização. Os tensoativos podem apresentar maior toxicidade, por isso devem possuir *status GRAS* (*generally regarded as safe*), como por exemplo, lecitina, Tween 80, Poloxamer 188, Span 85 e glicolato de sódio (WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004; DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2014).

Nanopartículas lipídicas apresentam potencial para encapsulação e liberação de fármacos hidrofóbicos. Contudo, poucos são os trabalhos aplicados em progesterona. Cavalli et al. (1999) incorporaram complexos de hidrocortisona e progesterona formados com  $\beta$ -ciclodextrina ou 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina em nanopartículas lipídicas sólidas. As NLS foram preparadas pelo método da microemulsão contendo ácido esteárico ou a mistura de Imwitor 900:ácido esteárico como lipídeo. A quantidade de fármaco adicionada foi de 1% da massa da microemulsão. A dispersão da microemulsão quente (70°C) na água fria (2 - 3°C) ocorreu na proporção 1:10 (v/v, microemulsão:água). Na presença do complexo, o tamanho das nanopartículas ficou abaixo de 100 nm. Análises de DSC mostraram que os fármacos ficaram dispersos na NLS em um estado amorfo. Os autores discutem que esse efeito pode ser decorrente do método de preparação e já havia sido observado em trabalhos anteriores com outros fármacos.

A dificuldade em administrar progesterona natural, devido às suas características hidrofóbicas, levou Salem (2010) a desenvolver uma injeção intramuscular com liberação prolongada, baseada em gel termosensível e nanosuspensão lipídica. A nanosuspensão foi preparada pela mistura do fármaco com ácido esteárico e etanol, pelo método da precipitação em solvente. As nanopartículas lipídicas formadas foram adicionadas ao gel termosensível à base de Pluronic F127 e metil celulose. Atingindo concentração final de progesterona de 6 mg.mL<sup>-1</sup>. Testes farmacocinéticos realizados em fêmeas de ratos indicaram que a concentração plasmática de progesterona se manteve mais elevada ao longo de 36 h nos animais tratados com a nanosuspensão em gel, se comparado aos animais controle que receberam injeções de progesterona em PBS.

Cortesi et al. (2002) produziram micropartículas lipídicas a partir de triglicerídeos e monoglicerídeos por meio das técnicas de evaporação do solvente e dupla emulsão. Acetato de retinol e progesterona foram utilizados como modelos de fármacos hidrofóbicos na avaliação da liberação *in vitro* e encapsulação, a qual chegou a 70%.

Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) foram produzidos por Yuan et al. (2007) para liberação controlada de progesterona. A técnica de preparo foi baseada na emulsificação do lipídeo fundido com o fármaco em solução de tensoativo a 70°C e posterior ultrassonificação. A miniemulsão formada foi rapidamente imersa em banho de gelo mantendo agitação constante. Foram utilizados monoestearina e ácido esteárico como lipídeos sólidos e, ácido oleico como lipídeo líquido. A adição de lipídeo líquido elevou a eficiência de encapsulação, porém, aumentou a taxa de liberação *in vitro* do fármaco. Para a formulação com 20% de ácido oleico a eficiência de encapsulação foi de 81,32% e a carga de fármaco incorporada foi de 3,87% (m/m). O diâmetro médio das nanopartículas ficou entre 300 e 500 nm com PDI entre 0,200 e 0,400.

### **3 VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE PROGESTERONA EM NANOPARTÍCULAS DE PMMA POR ESPECTROFOTOMETRIA UV**

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

Diversos estudos tratam da extração e quantificação de progesterona em sistemas nanoestruturados utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) associada a um detector UV. No entanto, poucos trabalhos realizaram a quantificação utilizando espectrofotometria UV direta (JAMEELA et al., 1998; CHANG et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2013; SALMORIA et al., 2013), especialmente se o fármaco estiver incorporado em excipientes diversos ou encapsulado em nanopartículas poliméricas, onde a presença de interferentes pode comprometer os resultados da quantificação. Nestes casos, a validação do método de quantificação seguindo normativas internacionais é essencial para garantir a precisão e exatidão dos resultados.

A quantificação de progesterona em nanopartículas de PMMA deve levar em consideração o uso de solvente cuja solubilidade do polímero seja elevada. Soluções alcoólicas de metanol (MALIWAL et al., 2009; WU et al., 2000; CHANG et al., 2005) e propanol (PUCCI et al., 2003), frequentemente utilizadas em protocolos de determinação de progesterona, não são adequadas, pois não favorecem a dissolução de cadeias poliméricas de PMMA. Clorofórmio dissolve facilmente PMMA e pode ser um solvente adequado na extração do fármaco. Considerando esses fatores, o presente capítulo tem por objetivo validar a metodologia de determinação de progesterona em nanopartículas de PMMA utilizando espectrofotometria UV e clorofórmio como solvente de extração.

#### **3.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

##### **3.2.1 Materiais**

Os reagentes e materiais utilizados foram iniciador 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN,  $\geq 98\%$ ), monômero metacrilato de metila (MMA,  $\geq 99,5\%$ ), progesterona ( $\geq 99\%$ ) e clorofórmio ( $\geq 99\%$ ) adquiridos da Sigma-Aldrich (Vetec). Lecitina de soja (Alpha Aesar) utilizada como emulsificante. Crodamol GTCC<sup>®</sup> (triglicerídeos de cadeia média composto de ácidos cáprico e caprílico), adquirido da Alpha

Química, utilizado como coestabilizador. Água deionizada. Todos os reagentes e solventes são de pureza analítica. O iniciador AIBN foi previamente recristalizado em metanol, filtrado e secado à vácuo.

### 3.2.2 Síntese e Caracterização de Nanopartículas de PMMA

As nanopartículas de PMMA foram produzidas pela técnica de polimerização em miniemulsão a partir do monômero MMA, utilizando iniciador hidrofóbico AIBN, lecitina como tensoativo e Crodamol como coestabilizador. As formulações são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1** – Formulações das miniemulsões utilizadas na síntese de nanopartículas de PMMA.

Formulação	Água (%)	AIBN (%)	Lecitina (%)	Crodamol (%)	MMA (%)
Nanoesferas (NS)	79,5	0,2	0,3	2,0	18,0
Nanocápsulas (NC)	79,5	0,2	0,3	10,0	10,0

A descrição detalhada das reações de polimerização, com e sem progesterona, assim como a caracterização das nanopartículas, será abordada no Capítulo 4.

### 3.2.3 Validação do Método Analítico

A validação do método espectrofotométrico foi realizada por meio de ensaios laboratoriais tendo como parâmetros a linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez conforme os critérios estabelecidos pela Conferência Internacional de Padronização de Requerimentos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos de Uso Humano (*International Conference on Harmonisation-ICH of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) (ICH, 2005).

As análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Processos (LCP/EQA) da Universidade Federal de Santa Catarina, utilizando Espectrofotômetro Hitachi modelo U-1900 com as seguintes especificações: largura de banda espectral 4nm; exatidão do comprimento de onda  $\pm 0,5$  nm; repetibilidade do comprimento de onda  $\pm 0,3$  nm; exatidão fotométrica  $\pm 0,002$  Abs; repetibilidade fotométrica 0,001 Abs.



### 3.2.3.1 Especificidade

Expressa a capacidade de o método avaliar de forma inequívoca o analito na presença de outros componentes frequentemente presentes na amostra. A especificidade proporciona a indicação correta sobre a identidade ou teor da substância a ser analisada (ICH, 2005). A avaliação da especificidade do método foi realizada por meio da comparação dos espectros de absorção da progesterona e de nanopartículas (com e sem progesterona) solubilizadas em clorofórmio. A escolha do clorofórmio deu-se em função da elevada solubilidade do polímero PMMA neste solvente.

Para obtenção do espectro de absorção das nanopartículas poliméricas, o látex (com e sem progesterona) foi submetido à secagem em estufa de circulação forçada de ar a 60°C até massa constante. As amostras secas foram solubilizadas em clorofórmio e diluídas até atingir absorvância próxima a 1 em 253 nm. Foi aplicada a mesma diluição às amostras referência (sem fármaco). Posteriormente, foram submetidas à varredura na faixa de comprimento de onda de 200 a 300 nm.

### 3.2.3.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de um procedimento apresentar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra em um determinado intervalo de valores (ICH, 2005; USP, 2016). Para o estudo da linearidade foram obtidas três repetições autênticas de curvas construídas em dias diferentes. Em cada curva, uma solução padrão de progesterona foi preparada em clorofórmio e posteriormente diluída em oito concentrações diferentes, variando de 2 a 50 mg.L<sup>-1</sup> (n = 24). Cada concentração foi determinada em triplicada, considerou-se a média dessas leituras. A análise foi realizada utilizando espectrofotometria UV com leituras em 253 nm. A linearidade foi avaliada por meio de regressão linear e a qualidade do ajuste do modelo foi verificada por análise de variância (ANOVA).

### 3.2.3.3 Limite de Detecção (LD)

Representa a menor quantidade de analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, em determinadas condições (USP, 2016). O limite de detecção foi obtido com base no desvio padrão do intercepto com o eixo Y das curvas de calibração ( $\sigma$ ) e na inclinação da curva de calibração (S), conforme Equação (1) (ICH, 2005).

$$LD = \frac{3,3 \sigma}{S} \quad (1)$$

### 3.2.3.4 Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitável sob as condições experimentais preestabelecidas (USP, 2016). É expresso como unidade de concentração na amostra e foi obtido com base no desvio padrão do intercepto com o eixo Y das curvas de calibração ( $\sigma$ ) e inclinação da curva de calibração ( $S$ ), conforme Equação (2).

$$LQ = \frac{10 \sigma}{S} \quad (2)$$

### 3.2.3.5 Precisão

É o grau de concordância entre os resultados dos testes individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente em várias amostragens de uma amostra homogênea (USP, 2016). A precisão foi avaliada com base no Desvio Padrão Relativo ( $DPR$ ) de uma série de medidas, conforme Equação (3).

$$DPR = \frac{s}{\bar{C}} * 100 \quad (3)$$

Onde:

$s$ : desvio padrão da concentração medida ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

$\bar{C}$ : concentração média ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

A precisão levou em consideração a repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (ICH, 2005). A repetibilidade foi realizada com a repetição do procedimento analítico em 3 níveis de concentrações, abrangendo os mínimos e máximos do teste de linearidade. Cada concentração foi analisada com 7 repetições, no mesmo dia, pelo mesmo analista e equipamento. A precisão intermediária foi avaliada com a repetição do procedimento analítico em 3 concentrações diferentes, com 7 repetições cada, executadas no mesmo equipamento, porém em dias e por analistas diferentes. De forma semelhante, a reprodutibilidade foi avaliada com a reprodução das análises do nível intermediário de concentração em um segundo laboratório em dois dias distintos. A reprodutibilidade foi executada no Laboratório de Química

da Universidade Federal da Fronteira Sul/*Campus* Chapecó, em espectrofotômetro Rayleigh, modelo UV-2601, com as seguintes especificações: largura de banda espectral 2 nm; exatidão do comprimento de onda  $\pm 0,3$  nm; repetibilidade do comprimento de onda  $\pm 0,15$  nm; exatidão fotométrica  $\pm 0,002$  Abs; repetibilidade fotométrica 0,001 Abs.

### 3.2.3.6 Exatidão

A exatidão expressa o grau de concordância entre o valor que é aceito como verdadeiro ou referência e o valor encontrado pelo procedimento analítico em estudo. Pode ser inferida uma vez que a precisão, linearidade e especificidade foram estabelecidas para o método (ICH, 2005). A exatidão foi avaliada com base nos dados de recuperação (Equação (4)) obtidos de análises de amostras com 3 níveis de concentrações conhecidas, e 7 repetições para cada nível.

$$Rec = \frac{\bar{C}}{C} * 100 \quad (4)$$

Onde  $C$  é a concentração padrão ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) da amostra (teórica) e  $\bar{C}$  é a concentração média experimental ( $\text{mg.L}^{-1}$ ).

### 3.2.3.7 Robustez

É a medida da capacidade do procedimento analítico de permanecer inalterado quando submetido a pequenas variações nos parâmetros do processo. Assim, foram avaliadas duas marcas de solventes (grau analítico) e a possível interferência deste na quantificação do fármaco. Uma solução padrão de progesterona com  $520 \text{ mg.L}^{-1}$  foi preparada. Alíquotas de  $250 \mu\text{L}$  desta solução foram diluídas para 5 mL de clorofórmio da Marca A e 5 mL da Marca B, obtendo-se concentrações de  $26 \text{ mg.L}^{-1}$ . As amostras foram analisadas com 5 repetições para cada marca.

## 3.2.4 Análise de Recuperação da Progesterona em Nanopartículas de PMMA

Nanopartículas de PMMA foram preparadas com diferentes concentrações de progesterona (2, 4, 6 e  $20 \text{ mg}_{\text{P4}}.\text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$ ) para avaliação

de possíveis interferências da matriz polimérica e demais componentes da formulação na recuperação do fármaco. O teor de sólidos foi de aproximadamente 20,5% em todas as formulações. Após a reação de polimerização, amostras de 1,5 mL de látex (com e sem progesterona) foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 60°C até massa constante. Cada formulação foi avaliada em triplicata. A fração polimérica seca foi solubilizada em 10 mL de clorofórmio e posteriormente alíquotas diluídas até a obtenção de absorbância entre 0,3 e 1,1. Amostras de látex sem progesterona foram submetidas à tratamento idêntico às demais e serviram de referência (branco) nas leituras espectrofotométricas. A concentração de progesterona na amostra foi calculada por meio da curva padrão em  $\text{mg.L}^{-1}$ , considerando o fator de diluição, e posteriormente transformado em  $\text{mg}_{\text{P4}}.\text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  (mg de P4 por g de látex).

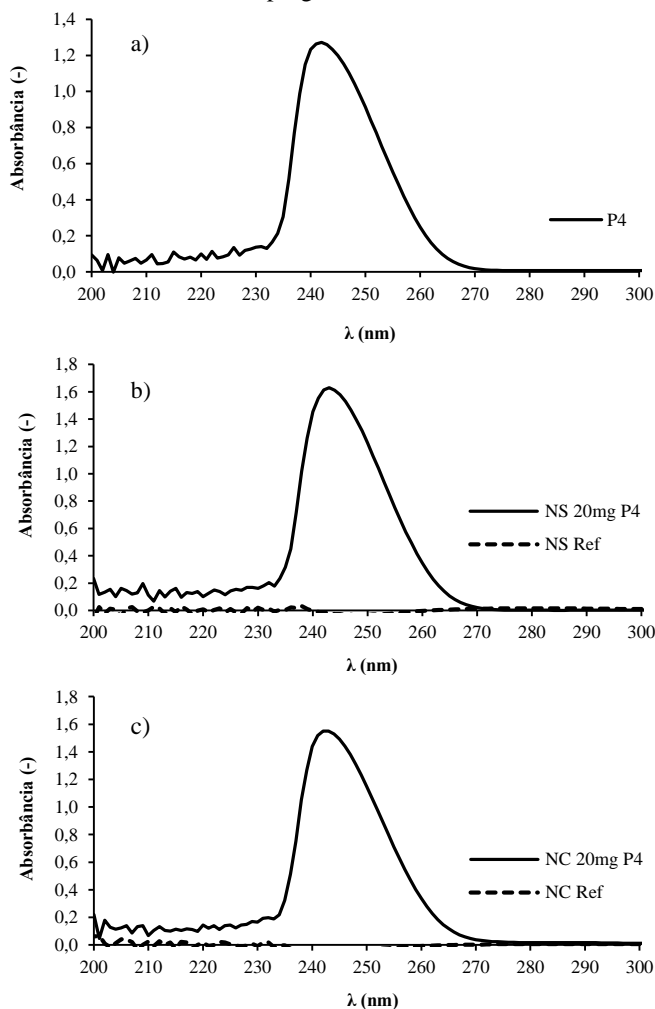
### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Especificidade

Em testes de quantificação, os resultados de especificidade devem garantir que o procedimento não é afetado pela presença de impurezas ou excipientes (USP, 2016). Avaliou-se, portanto, o espectro de absorção da progesterona pura (P4) e de nanopartículas de PMMA com e sem progesterona. Todas as amostras foram solubilizadas em clorofórmio. As composições das nanopartículas (nanoesferas e nanocápsulas) são descritas na Tabela 1 e os espectros de absorção são apresentados na Figura 6.

Na região do ultravioleta, a progesterona apresentou único pico de absorção situado entre os comprimentos de onda de 230 e 270 nm, facilitando sua identificação e quantificação por técnicas espectrofotométricas. A absorção máxima ocorre entre 241 e 243 nm (Figura 6a), porém, o “*cut off*” do solvente (comprimento de onda no qual a absorbância do solvente é maior que 1 unidade de absorção) é 245 nm, tornando inviável a quantificação do analito em comprimentos de onda inferiores a este (KATZ et al., 1998). Por isso, optou-se por validar o método em 253 nm, onde a absorção do fármaco é elevada e a interferência do solvente é reduzida consideravelmente.

**Figura 6** – Espectros de absorção UV: a) progesterona (P4); b) nanoesferas de PMMA com e sem progesterona<sup>2</sup>; c) nanocápsulas de PMMA com e sem progesterona<sup>3</sup>.



<sup>1</sup> P4: progesterona pura solubilizada em clorofórmio;

<sup>2</sup> NS Ref: nanoesferas sem progesterona, utilizando clorofórmio como branco; NS 20mg P4: nanoesfera com  $20\text{mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$ , utilizando NS Ref como branco;

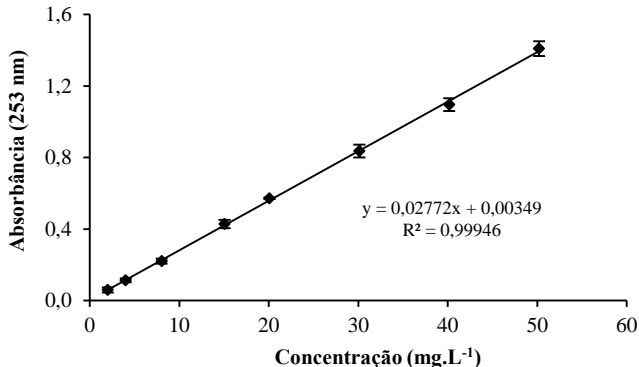
<sup>3</sup> NC Ref: nanocápsulas sem progesterona, utilizando clorofórmio como branco; NC 20mg P4: nanoesfera com  $20\text{mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$ , utilizando NC Ref como branco.

Os componentes da formulação das nanopartículas não apresentaram absorvância expressiva na faixa de comprimento de onda avaliada. Observa-se tanto para a formulação de nanoesfera, quanto para nanocápsulas, cujo teor de coestabilizador é maior, que a absorvância fica próxima de zero na região do espectro avaliada (Figura 6b e Figura 6c). Desta forma, demonstra-se que o método é seletivo à progesterona frente aos componentes das nanopartículas de PMMA (polímero, emulsificante, coestabilizador).

### 3.3.2 Linearidade e Limites de Quantificação (LQ) e Detecção (LD)

O teste de linearidade para quantificação de P4 (Figura 7) considerou a média de três curvas obtidas por repetições autênticas com oito níveis de concentração ( $n = 24$ ). A curva padrão resultante apresentou coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9995, indicando elevado índice de proporcionalidade entre concentração e absorvância na faixa de 2 e 50  $\text{mg.L}^{-1}$ .

Figura 7 – Curva padrão para quantificação da progesterona em clorofórmio.



A análise de variância (ANOVA) dos resultados (Tabela 2) confirmou que a regressão linear foi significativa ( $F_{\text{calculado}} \gg F_{\text{crítico}}$ ). O modelo também não apresentou sinais de falta de ajuste, uma vez que o valor de  $F_{\text{crítico}}$  neste caso foi maior que o  $F_{\text{calculado}}$  para um nível de significância de 0,05.

**Tabela 2** - Análise de Variância para o teste de linearidade.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valores de F	
				F <sub>calculado</sub>	F <sub>crítico</sub> <sup>a</sup>
Regressão	4,971063	1	4,971063	8100,492	4,30
Resíduos	0,013501	22	0,000614		
Falta de Ajuste	0,002676	6	0,000446	0,659173	2,74
Erro puro	0,010825	16	0,000677		
Total	4,984564	23			

<sup>a</sup>Valores críticos de F para o teste ANOVA unilateral ( $p < 0,05$ ).

Com base nos dados de linearidade e por meio das Equações (1) e (2) foi possível estimar os valores de LD e LQ, os quais foram 0,3 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. O método demonstrou ser apto a detectar e quantificar pequenas concentrações do analito na amostra. Considerando uma faixa ideal de trabalho entre 10 e 40 mg.L<sup>-1</sup>, o LQ corresponde a 10% do menor valor dessa faixa, sendo, portanto, aceitável para o método.

### 3.3.3 Precisão e Exatidão

A determinação da precisão do método avaliou a repetibilidade (intracorrida), precisão intermediária (intercorridas) e reprodutibilidade (interlaboratorial). Na Tabela 3 são apresentados os dados de repetibilidade, os quais foram medidos em três níveis de concentração com sete repetições cada. Os níveis de concentração correspondem a valores próximos aos máximos e mínimos do teste de linearidade e um valor intermediário.

**Tabela 3** - Avaliação da repetibilidade do método em três níveis de concentração.

Amostra	C (mg.L <sup>-1</sup> )	C (mg.L <sup>-1</sup> )	C (mg.L <sup>-1</sup> )
Padrão	52,0	26,0	2,1
1	53,6	26,8	2,3
2	54,3	27,1	2,2
3	52,4	27,0	2,4
4	53,5	27,4	2,3
5	53,3	27,1	2,3
6	52,8	27,4	2,1
7	53,7	27,0	2,4
Média (mg.L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	53,4 ± 0,6	27,1 ± 0,2	2,3 ± 0,1
DPR (%) <sup>2</sup>	1,194	0,781	4,564
Rec. (%) <sup>3</sup>	102,62	104,3	109,38

<sup>1</sup> Média ± desvio padrão; <sup>2</sup> Desvio padrão relativo; <sup>3</sup> Recuperação.

De acordo com a Resolução nº899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), que estabelece um guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, o limite máximo aceitável para o desvio padrão relativo (DPR) em ensaios de precisão é 5%. Observa-se na Tabela 3, que os valores obtidos para os três níveis de concentração são inferiores a este parâmetro. O valor do DPR mais elevado para concentração 2,1 mg.L<sup>-1</sup> já era esperado, pois neste nível de concentração, pequenas variações podem representar proporções elevadas em torno da média.

A precisão intermediária levou em consideração fatores que permitem comparar resultados em um mesmo laboratório, realizando análises em dias diferentes e por analistas diferentes. As análises foram realizadas em três níveis de concentração e com sete repetições. Os resultados de média, desvio padrão, desvio padrão relativo e recuperação são apresentados na Tabela 4.

Os resultados de DPR ficaram inferiores a 5% na avaliação da precisão intermediária, inclusive para as concentrações máximas e mínimas avaliadas. Para a concentração intermediária o maior valor de DPR foi de 2,9%. Através do teste *t* de *Student* foi possível comparar as médias e verificar se estas apresentam diferença estatística. Os valores de *t*, calculados e críticos, são apresentados na Tabela 5.

Em todas as comparações possíveis, as médias encontradas para a concentração máxima e intermediária não apresentaram diferença ao nível de confiança de 95%, ou seja, o método não apresentou resultados estatisticamente diferentes se realizado em dias diferentes ou por analistas diferentes. Para a concentração mínima, a comparação entre as médias de “Dia 1/Analista A vs Dia 2/Analista A” e “Dia 1/Analista A vs Dia 2/Analista B” apresentaram diferença estatística para o referido nível de confiança. Contudo, variações são esperadas e aceitáveis para valores de concentração próximos ao limite de quantificação.

Deve-se considerar também as especificações técnicas do equipamento que, de acordo com o fabricante, possui exatidão fotométrica de  $\pm 0,002$  Abs e a repetibilidade fotométrica de  $\pm 0,001$  Abs. O desvio de repetibilidade inerente ao equipamento corresponde a aproximadamente 2% dos valores de absorvância medidos na concentração de 2 mg.L<sup>-1</sup>. Portanto, as limitações técnicas do equipamento já começam a influenciar os resultados nesse nível de concentração.



**Tabela 4** – Resultados da avaliação de precisão intermediária do método.

C Padrão (mg.L <sup>-1</sup> )	Média (mg.L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>		DPR (%) <sup>2</sup>		Rec. (%) <sup>3</sup>		Média (mg.L <sup>-1</sup> )		DPR (%)		Rec. (%)	
	Dia 1/Analista A		Dia 1/Analista B		Dia 1/Analista A		Dia 2/Analista A		Dia 2/Analista B		Dia 2/Analista A	
52,0	53,4 ± 0,6	1,2	102,6	52,6 ± 0,7	1,4	101,2						
26,0	27,1 ± 0,2	0,8	104,3	27,2 ± 0,6	2,1	104,7						
2,1	2,3 ± 0,1	4,6	109,4	2,4 ± 0,1	4,8	116,1						
	Dia 1/Analista B			Dia 2/Analista B								
52,0	53,3 ± 1,3	2,4	102,5	52,8 ± 1,0	1,8	101,5						
26,0	27,7 ± 0,8	2,9	106,6	27,5 ± 0,5	1,9	105,9						
2,1	2,3 ± 0,1	3,7	111,4	2,4 ± 0,1	2,7	114,8						

<sup>1</sup> Média ± desvio padrão (n=7); <sup>2</sup> Desvio padrão relativo; <sup>3</sup> Recuperação.

**Tabela 5** – Teste t de Student para os dados de média na avaliação da precisão intermediária.

C Padrão (mg.mL <sup>-1</sup> )	Variações	t <sub>calculado</sub>				t <sub>crítico*</sub>
		Dia 2/Analista A	Dia 1/Analista B	Dia 1/Analista A	Dia 2/Analista B	
52,0	Dia 1/Analista A	2,0602	0,1509		1,3276	2,1788
	Dia 2/Analista A	-	1,1865		0,3760	2,1788
	Dia 1/Analista B	-	-		0,8118	2,1788
26,0	Dia 1/Analista A	0,4608	1,9513		2,0063	2,1788
	Dia 2/Analista A	-	1,3445		1,0677	2,1788
	Dia 1/Analista B	-	-		0,5282	2,1788
2,1	Dia 1/Analista A	2,3680	0,8122		2,4494	2,1788
	Dia 2/Analista A	-	1,8034		0,5138	2,1788
	Dia 1/Analista B	-	-		1,7828	2,1788

\* valor de t para o teste bilateral (p < 0,05; GL = 12).

Os resultados obtidos para reprodutibilidade em um segundo laboratório (Lab. B) são apresentados na Tabela 6. As médias de sete repetições realizadas em dois dias distintos apresentaram DPR inferior a 5%, portanto aceitável.

**Tabela 6** – Resultados da avaliação da reprodutibilidade do método.

<b>C Padrão (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Variação</b>	<b>Média (mg.L<sup>-1</sup>)<sup>1</sup></b>	<b>DPR (%)</b>	<b>Rec. (%)</b>
<b>26,0</b>	Dia 1/ Lab. B	26,9 ± 0,8	3,1	103,3
	Dia 2/ Lab. B	27,2 ± 1,2	4,5	104,6

<sup>1</sup> Média ± desvio padrão (n=7)

A comparação de médias interlaboratoriais foi realizada pelo teste *t* de *student* e os resultados dos valores de *t* calculado e *t* crítico são apresentados na Tabela 7. De acordo com os dados, não há diferença estatística nas médias ao nível de confiança de 95% para todas as comparações possíveis, ou seja, os resultados obtidos para o Lab. B em dias diferentes não diferem entre si e também não diferem das médias obtidas no Lab. A.

**Tabela 7** – Teste *t* de *Student* para os dados de média na avaliação da reprodutibilidade.

	<b>t<sub>calculado</sub></b>			<b>t<sub>crítico</sub><sup>*</sup></b>
	<b>Dia 2/ Lab. A</b>	<b>Dia 1/ Lab. B</b>	<b>Dia 2/ Lab. B</b>	
Dia 1/ Lab. A	0,460862	0,758094	0,334817	2,1788
Dia 2/ Lab. A	-	0,921832	0,119142	2,1788
Dia 1/ Lab. B	-	-	0,697063	2,1788

\* valor de *t* para o teste bilateral ( $p < 0,05$ ; GL = 12).

A exatidão do método foi avaliada por meio dos resultados de recuperação (Rec.) obtidos pela Equação (4). Nas Tabela 3 e Tabela 4, observa-se que a diferença entre valores recuperados e teóricos, para as concentrações intermediárias e máximas, foi inferior a 7%. Valores mais elevados, de até 16%, foram obtidos para o nível de concentração mínimo. Para as análises realizadas no Lab. B essa diferença foi inferior a 5% (Tabela 6). Portanto, de modo geral, os dados de recuperação foram satisfatórios e compatíveis com o método proposto.

### 3.3.4 Robustez

A robustez foi avaliada considerando a possibilidade de aquisição de solventes de diferentes marcas comerciais. Na Tabela 8 são apresentados os resultados da comparação das análises realizadas com solventes de dois fornecedores distintos.

**Tabela 8** – Resultados de robustez para análises com diferentes marcas do solvente.

Amostra	Marca A	Marca B
	C (mg.L <sup>-1</sup> )	C (mg.L <sup>-1</sup> )
1	25,1	25,0
2	26,6	25,4
3	26,9	25,3
4	27,1	26,5
5	27,1	26,2
<b>Média (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>	26,6 ± 0,8 <sup>a</sup>	25,7 ± 0,6 <sup>a</sup>
<b>DPR (%)</b>	3,2	2,5
<b>Rec.(%)</b>	102,3	98,8

<sup>a</sup>Não há diferença significativa entre as médias pelo teste *t* de Student ( $p < 0,05$ ).

Os resultados demonstraram que o uso de solventes de grau analítico de fornecedores diferentes não interferiu na análise. A comparação das médias não apresentou diferença estatística ao nível de significância de 0,05 para o teste *t* de Student. E também não apresentaram diferença estatística com relação à concentração padrão de 26 mg.L<sup>-1</sup>.

### 3.3.5 Determinação de Progesterona em Nanopartículas de PMMA

Conforme verificado na Figura 6, o método mostrou-se seletivo com relação aos componentes da formulação, mesmo em diferentes proporções de polímero e coestabilizador. Para verificar a recuperação de progesterona em nanopartículas de PMMA, reações de polimerização foram realizadas com as formulações apresentadas na Tabela 1, variando apenas a concentração de progesterona adicionada. O ensaio de recuperação não avalia a eficiência de encapsulação, pois não ocorre a separação do polímero da fase aquosa por centrifugação previamente à análise, apenas procede-se a secagem e a determinação da progesterona presente para fins de comparação com a quantidade inicial adicionada. Na Tabela 9 são apresentadas a concentração de progesterona calculada com

base na massa adicionada à formulação, a concentração obtida por meio da análise espectrofotométrica e o percentual de recuperação.

**Tabela 9** – Recuperação de progesterona em nanopartículas de PMMA.

<b>Formulação*</b>	<b>P4 (mg.g<sup>-1</sup>)**</b>	<b>P4 Rec.(mg.g<sup>-1</sup>***</b>	<b>Rec. (%)</b>
NS 2mg P4	1,99	2,04 ± 0,08	102,6
NS 4mg P4	4,29	4,46 ± 0,13	104,0
NS 6mg P4	5,98	6,39 ± 0,71	106,9
NS 20mg P4	20,36	18,17 ± 0,83	89,3
NC 20mg P4	19,99	20,19 ± 1,67	101,0

\*Formulações de nanoesferas (NS) e nanocápsulas (NC) preparadas conforme Tabela 1, exceto pela concentração de progesterona (P4); \*\*concentração de P4 com base na massa adicionada; \*\*\*concentração de P4 recuperada calculada por meio da curva padrão.

Os índices de recuperação em análises com nanopartículas poliméricas ficaram dentro do esperado e compatíveis com os testes de precisão e exatidão (Tabelas 3 e 4), revelando que o método mostra-se robusto com relação aos componentes da formulação, os quais não apresentaram influências na quantificação do fármaco.

### 3.4 CONCLUSÕES

Os ensaios demonstraram que o método é seletivo, preciso, exato e robusto para a determinação de progesterona em nanopartículas poliméricas de PMMA. Em todos os testes relativos à precisão, o DPR foi inferior a 5%. Com relação à exatidão, a diferença percentual máxima obtida entre a progesterona adicionada e recuperada foi de 7% para a concentração intermediária de trabalho (26 mg.L<sup>-1</sup>). Os ensaios realizados com nanopartículas apresentaram resultados satisfatórios, indicando que a matriz polimérica e seus componentes, quando solubilizados em clorofórmio, não interferem na quantificação da progesterona.

## 4 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PMMA POR POLIMERIZAÇÃO RADICALAR EM MINIEMULSÃO E ENCAPSULAÇÃO DE PROGESTERONA

### 4.1 INTRODUÇÃO

Baseado nos estudos desenvolvidos no grupo de pesquisa voltados à síntese de nanopartículas biocompatíveis de PMMA para a liberação de fármacos (ROMIO et al., 2009a, STEINMACHER et al., 2010; BERNARDY et al., 2010; FEUSER et al., 2014), este trabalho tem por objetivo investigar a aplicação deste polímero na encapsulação de progesterona, avaliando os efeitos da presença do fármaco na cinética de polimerização, nas características estruturais das partículas, interações do fármaco com a matriz polimérica, além da eficiência de encapsulação e liberação *in vitro*.

### 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.2.1 Materiais

Os reagentes e materiais utilizados foram metacrilato de metila (MMA,  $\geq 99,5\%$ ) como monômero, iniciador 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN,  $\geq 98\%$ ), progesterona ( $\geq 99\%$ ), clorofórmio ( $\geq 99\%$ ) e dodecil sulfato de sódio (SDS,  $\geq 99\%$ ) adquiridos da Sigma-Aldrich. Lecitina de soja (Alpha Aesar) utilizada como emulsificante. Tetrahidrofurano (THF,  $\geq 99,9\%$ , Merck). Crodamol GTCC<sup>®</sup> (triglicerídeos de cadeia média composto de ácidos cáprico e caprílico), adquirido da Alpha Química, utilizado como coestabilizador. Hidroquinona 1% (Nuclear). Água deionizada. Todos os reagentes e solventes são de pureza analítica. O iniciador AIBN foi previamente recristalizado em metanol, filtrado e secado à vácuo.

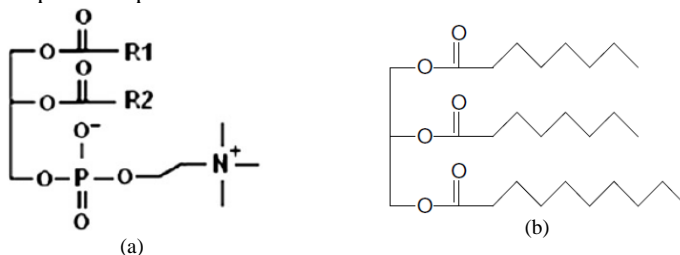
#### 4.2.2 Preparo da Miniemulsão e Reações de Polimerização

A metodologia de preparo da miniemulsão, assim como a escolha dos componentes das formulações, foi realizada de acordo com os trabalhos de Romio et al. (2009a; 2009b), Steinmacher et al. (2010) e Bernardy et al. (2010). A fase orgânica que compõe a miniemulsão foi preparada a partir do monômero (MMA), emulsificante (lecitina),

coestabilizador (Crodamol GTCC) (Figura 8), iniciador hidrofóbico (AIBN) e o fármaco progesterona quando especificado. Esses componentes foram homogeneizados com agitação magnética por 10 minutos, e em seguida, misturados à água, permanecendo por mais 40 minutos em agitação. A emulsão formada foi submetida ao processo de redução do tamanho das gotas por meio de ultrassonificação com sonda da marca Fisher Scientific, Sonic Dismembrator Model 500, 400 W. A sonificação teve duração de 4 minutos em amplitude de 60%, utilizando o modo “*pulse on*” por 10 segundos e “*pulse off*” por 5 segundos. O recipiente contendo a emulsão foi imerso em banho de gelo para evitar a elevação de temperatura e ativação do iniciador.

A miniemulsão preparada foi dividida igualmente em tubos de vidro, os quais foram preenchidos com nitrogênio gasoso para eliminação do oxigênio do meio. Os tubos foram fechados e imersos em banho termostático a 70°C para início da reação de polimerização.

**Figura 8** – Estrutura química: a) lecitina (R1 e R2 são grupos alifáticos lineares com C15-C20 e até 4 ligações duplas); b) triglicerídeos de cadeia média composto de ácidos cáprico e caprílico.



Fonte: Romio et al. (2009b)

### 4.2.3 Caracterização

A caracterização das amostras de miniemulsão e do produto originado das reações de polimerização foi realizada no Laboratório de Controle de Processos (LCP), do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA) da UFSC, exceto quando especificado. A caracterização envolveu análise dos seguintes parâmetros:

#### 4.2.3.1 Tamanho Médio das Partículas ( $D_p$ )

Ao longo da reação de polimerização amostras foram retiradas em tempos predefinidos para acompanhamento do tamanho médio das

partículas, o qual foi determinado por Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dinamic Light Scattering – DLS*), utilizando equipamento Zetasizer, Nano Series (Malvern Instruments). Previamente à leitura, as amostras foram diluídas na proporção aproximada de 1:20 com água saturada de monômero.

#### 4.2.3.2 Potencial Zeta

Foi determinado em amostras selecionadas utilizando equipamento Zetasizer, Nano Series da Malvern Instruments em pH normal do látex ( $4,6 \pm 0,5$ ) e temperatura ambiente ( $24 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

#### 4.2.3.3 Conversão Gravimétrica ( $X_g$ )

A conversão gravimétrica foi obtida por meio da razão entre massa do polímero presente no reator e a massa de monômero alimentada. Para determinação da fração polimérica formada, amostras de látex foram submetidas à secagem em estufa com convecção forçada na temperatura de  $60^\circ\text{C}$ . Para interromper a reação de polimerização no momento da retirada da amostra, foi adicionado solução aquosa de hidroquinona 1% ao látex. O cálculo de  $X_g$  foi realizado conforme Equação (5).

$$X_g = \frac{F_p(t)}{F_m} \quad (5)$$

$F_m$  é a fração de monômero alimentada no reator.

$F_p(t)$  é a fração mássica de polímero determinada pela Equação (6):

$$F_p(t) = \frac{(M_{rs} - M_{hq})}{M_{lt}} - F_{snp} \quad (6)$$

Onde:

$M_{rs}$ : massa de resíduo seco (g);

$M_{hq}$ : massa hidroquinona (g);

$M_{lt}$ : massa de látex (g);

$F_{snp}$ : fração de sólidos não polimerizados.

A fração de sólidos não polimerizados ( $F_{snp}$ ) é determinada pela Equação (7) e corresponde aos componentes da formulação que não reagem, mas permanecem no polímero formado.

$$F_{snp} = \frac{M_{snp}}{M_r} \quad (7)$$

Onde:

$M_{snp}$ : massa de sólidos não polymerizados (iniciador, coestabilizador, emulsificante e fármaco);

$M_r$ : massa do meio reacional.

A fração de monômero alimentada no reator  $F_m$  é determinada pela Equação (8):

$$F_m = \frac{M_m}{M_r} \quad (8)$$

Onde  $M_m$  é a massa de monômero utilizada.

#### 4.2.3.4 Distribuição de Massa Molar

A distribuição de massa molar do polímero foi determinada por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) utilizando Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) modelo LC-20A (Shimadzu) e três colunas Shim Pack GPC 800 Series 300 x 8 mm (GPC 801, GPC 804 e GPC 807) da marca Shimadzu. O equipamento conta com detector de índice de refração RID-10A e injetor automático SIL-20A. Tetrahydrofurano (THF) foi utilizado como fase móvel a uma vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup> e temperatura de 35°C. As amostras foram preparadas com 0,02 g de polímero seco solubilizadas em 4 mL de THF, e posteriormente filtradas em filtro de teflon com 0,45 µm de diâmetro de poro. As distribuições de massas molares e massas molares médias foram determinadas com base na curva de calibração elaborada a partir de padrões de poliestireno com massas molares entre 580 g.mol<sup>-1</sup> e 9,835 x 10<sup>-6</sup> g.mol<sup>-1</sup>.

#### 4.2.3.5 Teor de Monômetro Residual no Látex

O teor de monômero residual foi determinado em amostras selecionadas de látex ao término das reações de polimerização. A análise foi realizada por Cromatografia Gasosa (CG), em equipamento Shimadzu GC-2010AF com Forno Headspace Shimadzu AOC-5000 e detector de



ionização de chama, usando a técnica de evaporação total da fração volátil da amostra. Os parâmetros do equipamento utilizados nas análises e na elaboração da curva de calibração são apresentados na Tabela 10.

A curva de calibração foi preparada com amostras padrão de miniemulsão contendo o monômero a ser medido, analisadas em triplicata. A relação linear entre massa de monômero no vial ( $M_m$ ), dada em gramas, e área do pico integrado ( $A$ ) apresentou coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,993 e é dada pela Equação (9).

$$A = 6,2438 \times 10^{-9} M_m \quad (9)$$

Para determinar o teor de monômero presente nas amostras, 5  $\mu\text{L}$  de látex obtido ao término da reação de polimerização foi adicionado ao vial e submetido à análise.

**Tabela 10** – Parâmetros do CG utilizados nas análises de monômero residual

Parâmetro	Descrição
Coluna capilar	RTX-5 (sílica fundida 5% difenil/95% dimetilpolisiloxano), Restek (30m x 0,25mm di x filme 0,25 $\mu\text{m}$ )
Gás de arraste	Nitrogênio
Fluxo do gás de arraste	1,39 mL.min <sup>-1</sup>
Temperatura detector	300 °C
Temperatura injeção	280 °C
Modo de injeção	Split (1:10)
Temperatura do forno HeadSpace	110°C por 4min
Programação de temperatura do forno	60 °C até 230 °C com uma taxa de aquecimento de 20 °C.min <sup>-1</sup>
Temperatura seringa	120°C
Volume de injeção	1 $\mu\text{L}$

#### 4.2.3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Análises em TEM foram realizadas para caracterização da morfologia de nanopartículas poliméricas com e sem fármaco. Gotas de amostra (látex) diluídas em água à 0,05% foram pingadas em grade de cobre de 300 mesh cobertas com Formvar. Após a secagem, as amostras foram recobertas com filme de carbono para minimizar a degradação do polímero sob o feixe de elétrons. As análises foram realizadas a 100 kV.

#### 4.2.3.7 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A técnica de DSC foi utilizada para verificar a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do polímero e possíveis interações deste com o fármaco. As análises foram realizadas em equipamento Perkin-Elmer (Jade DSC), no Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos (PROFI) da UFSC. Amostras de 5 mg foram analisadas em faixa de temperatura de 25 a 180°C, com rampa constante de aquecimento/resfriamento de 20°C.min<sup>-1</sup>, em atmosfera de nitrogênio com vazão de 20 mL.min<sup>-1</sup>. Foram realizados dois ciclos de aquecimento/resfriamento. Considerou-se o segundo ciclo para cálculo da  $T_g$ .

#### 4.2.3.8 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas em espectrômetro Agilent Technologies (Cary 600 Series). Para obtenção dos espectros, amostras de nanopartículas secas a 60°C foram incorporadas em KBr, seguido da compressão para formação de pastilhas. As análises foram conduzidas com varreduras na faixa de 4000 - 400 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 2 cm<sup>-1</sup>.

### 4.2.4 Determinação da Eficiência de Encapsulação (EE)

A Eficiência de Encapsulação (EE, %) foi determinada por meio da relação entre a massa de progesterona recuperada na fração polimérica precipitada e a massa de progesterona adicionada à formulação. O procedimento foi adaptado de Steinmacher (2010). Foram preparadas amostras referência com a mesma formulação, porém sem progesterona, as quais serviram de branco nas leituras espectrofotométricas.

O preparo das amostras de látex com e sem progesterona foi simultâneo e ambas foram submetidas ao mesmo tratamento. A fase orgânica foi preparada em quantidade suficiente para as duas reações, sendo que após a homogeneização do meio, esta foi dividida em duas porções com massas iguais e em apenas uma delas foi adicionada a progesterona. Esta amostra foi agitada por mais 10 minutos, enquanto a amostra referência era sonificada para redução do tamanho das gotas. Após as duas amostras terem passado pelo ultrassom, a reação prosseguiu conforme item 4.2.2.

Para determinação da eficiência de encapsulação amostras de 1,5 mL látex foram centrifugadas em centrífuga Eppendorf 4515R a

13528 xg por 45 min. O sobrenadante foi separado e o tubo contendo o precipitado foi colocado em estufa com circulação de ar à 60 °C até massa constante. O resíduo seco no tubo eppendorf foi dissolvido em 10 mL de clorofórmio e filtrado em filtro de teflon (PTFE) com 0,2 µm de abertura de poro. A absorvância das amostras foi medida em 253 nm. Os resultados foram expressos em mg de progesterona por mL de solução, conforme curva padrão obtida no Capítulo 3.

O cálculo da eficiência de encapsulação foi realizado conforme a Equação (10).

$$EE (\%) = \frac{M_{rec}}{F_{P4} * M_{lt}} * 100 \quad (10)$$

$M_{lt}$  é massa de látex adicionada ao tubo eppendorf,  $M_{rec}$  é a massa de progesterona recuperada no resíduo seco e  $F_{P4}$  é a fração de progesterona no látex, sendo estes últimos determinados pelas Equações (11) e (12), respectivamente.

$$M_{rec}(g) = \frac{C_{P4} * V * FD}{1000} \quad (11)$$

$$F_{P4} = \frac{M_{P4}}{M_r} \quad (12)$$

Onde:

$C_{P4}$ : concentração de progesterona na amostra determinada por meio da curva de calibração (mg.L<sup>-1</sup>);

$V$ : volume de clorofórmio utilizado na solubilização da amostra (mL);

$FD$ : fator de diluição;

$M_{P4}$ : massa de progesterona adicionada à formulação (g)

$M_r$ : massa do meio reacional (g).

#### 4.2.5 Ensaios de Liberação *in vitro*

Os ensaios foram realizados de acordo com Im e Sah (2009). Alíquotas de 250 µl de látex foram diluídas em 4,75 mL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 5% (pH = 7,3; condut. = 5,7 mS.cm<sup>-1</sup>; T = 20 °C). As amostras foram homogeneizadas em vortex e incubadas a 37°C sob agitação orbital de 160 rpm.

Ao longo do ensaio, amostras referência e com progesterona foram retiradas da incubadora para determinação da progesterona liberada. As amostras referência passaram pelo mesmo tratamento das demais e serviram como branco nas leituras espectrofotométricas. Para separação da fração sólida (polimérica), as amostras foram centrifugadas em 4025 xg por 45 min. Alíquotas do sobrenadante foram diluídas com SDS 5% a um fator conhecido e posteriormente filtradas em filtro de teflon (PTFE) com 0,2 µm de abertura de poro. O líquido filtrado foi submetido à leitura espectrofotométrica em 253 nm. O resultado da absorbância foi convertido para concentração (mg.L<sup>-1</sup>) por meio de curva de calibração realizada com progesterona pura em solução de SDS 5%. Os resultados da validação de método para quantificação de progesterona em SDS 5% são apresentados no Apêndice I. A porcentagem de progesterona liberada foi calculada conforme Equação (13).

$$\text{Liberação (\%)} = \frac{C_{P4t} - C_{P4O}}{C_{P4E}} * 100 \quad (13)$$

Onde  $C_{P4t}$  é a concentração (mg.L<sup>-1</sup>) de progesterona determinada na amostra no tempo t.  $C_{P4O}$  é a concentração (mg.L<sup>-1</sup>) de progesterona livre (não encapsulada) determinada por meio da Equação (14).  $C_{P4E}$  é a concentração de progesterona total encapsulada (mg.L<sup>-1</sup>), calculada pela Equação (15).

$$C_{P4O} = \frac{M_{P4T}(1 - EE)}{V_m} * 1000 \quad (14)$$

$$C_{P4E} = \frac{M_{P4T} * EE}{V_m} * 1000 \quad (15)$$

$EE$  é a eficiência de encapsulação.  $V_m$  é o volume (mL) do meio de liberação e  $M_{P4T}$  é a massa (g) total de progesterona contida na alíquota de látex adicionada ao meio de liberação, determinada conforme Equação (16).

$$M_{P4T} = F_{P4} * M_{lt} \quad (16)$$

Onde  $F_{P4}$  é a fração de progesterona no látex, determinada pela Equação (12) e  $M_{lt}$  é a massa de látex adicionada ao meio de liberação.

Os dados de liberação foram tratados com regressão não linear no programa OriginPro 8 SPR (OriginLab Corporation, 2007) utilizando os modelos matemáticos Primeira Ordem, Higuchi, Lei de Potência (modelo Peppas) e Weibull, representados pelas Equações (17) a (20), respectivamente, adaptados de Papadopoulou et al. (2006) e Costa e Lobo (2001).

$$y(t) = y_0 e^{-kt} \quad (17)$$

$$y(t) = k\sqrt{t} \quad (18)$$

$$y(t) = kt^n \quad (19)$$

$$y(t) = A - (A - B)\exp(-at^b) \quad (20)$$

Onde:

$y(t)$ : liberação em função do tempo (t);

$y_0$ : liberação inicial

$k$ : constante cinética;

$n$ : expoente que caracteriza o mecanismo de transporte na equação

Lei de Potência;

$A$ : assíntota superior (liberação final);

$B$ : assíntota inferior (liberação inicial);

$a$ : constante cinética;

$b$ : expoente que caracteriza o mecanismo de transporte na equação de Weibull.

As equações Primeira Ordem, Higuchi e Lei de Potência foram aplicadas aos dados iniciais até 60% da liberação máxima, enquanto a equação de Weibull foi aplicada em toda extensão da curva, de acordo com Kosmidis et al. (2003a) e Papadopoulou et al. (2006).

#### 4.2.6 Determinação da Estabilidade Física do Látex

Foi realizado estudo de avaliação da estabilidade física do látex ao longo do tempo. Para tal, amostras foram armazenadas em refrigerador a 4°C por um período de 6 meses. Foram monitorados os parâmetros pH, Dp, PDI e alterações aparentes como formação de precipitado e separação de fases.

## 4.3 RESULTADOS E DICUSSÃO

### 4.3.1 Avaliação Preliminar da Estabilidade da Miniemulsão e Cinética de Polimerização

Previamente à avaliação da eficiência de encapsulação, avaliou-se a estabilidade da miniemulsão na presença do fármaco. A proporção entre os componentes foi mantida constante, exceto pela presença ou não de progesterona. Os exp. 1, 2, 3 e 4, apresentados na Tabela 11, foram realizados sem a presença de iniciador. Após o preparo da miniemulsão, as amostras foram colocadas em banho a 70°C e o diâmetro médio das gotas (Dg) foi monitorado.

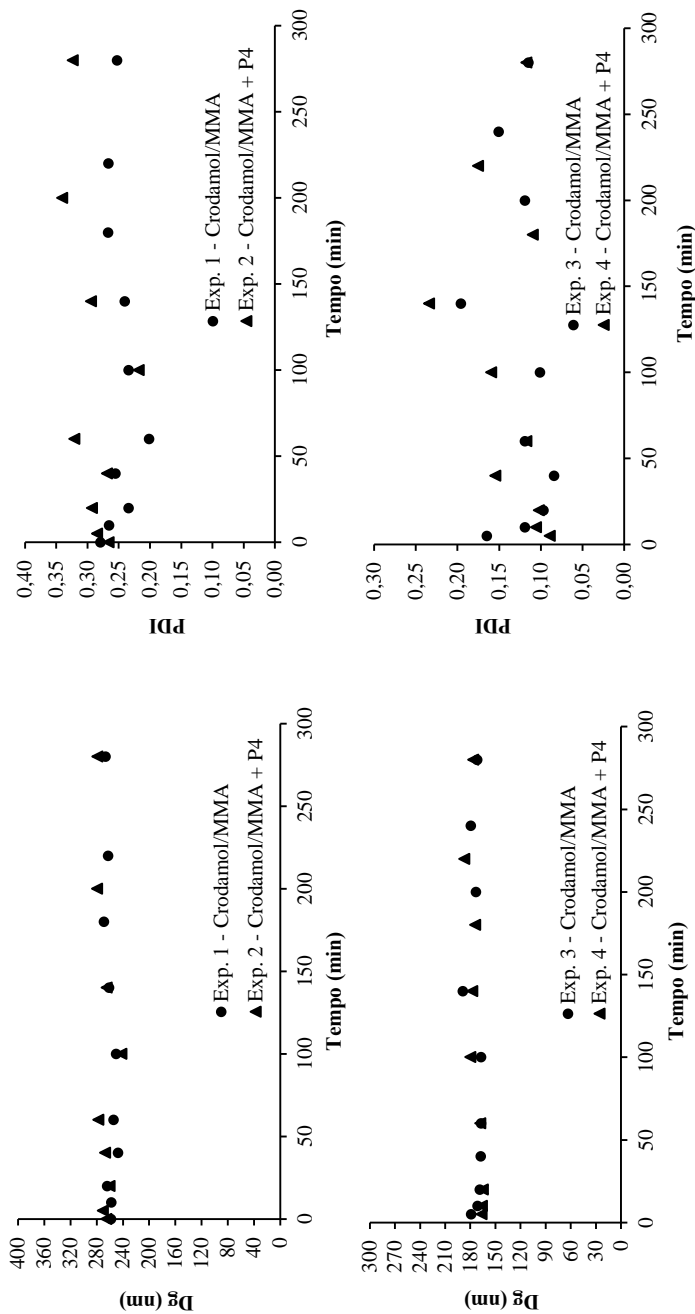
**Tabela 11** – Formulações para avaliação da estabilidade e cinética de polimerização de miniemulsão destinada ao preparo de nanocápsulas (Experimentos 1, 2 e 5) e nanoesferas (Experimentos 3, 4 e 6) de PMMA com P4.

Exp.	Fase Aquosa			Fase Orgânica		
	Água (g)	AIBN (g)	Lecitina (g)	Crodamol (g)	MMA (g)	P4 (mg <sub>P4</sub> ·g <sub>Látex</sub> <sup>-1</sup> )
1	24,0170	-	0,0918	3,0183	3,0755	-
2	24,0014	-	0,0902	3,0039	3,0185	1,12
3	24,0563	-	0,0955	0,6146	5,4220	-
4	24,0384	-	0,0912	0,6090	5,4030	1,15
5	48,0820	0,1404	0,1822	6,0301	6,0257	1,12
6	48,0829	0,1406	0,1819	1,2532	10,8832	1,08

A miniemulsão é um sistema metaestável, com pseudoequilíbrio que pode durar desde horas até dias, dependendo da formulação e modo de preparo (EL-AASSER; SUDOL, 2004). O emulsificante (lecitina) e o coestabilizador (Crodamol) evitam a desestabilização das gotículas. O primeiro evita a degradação das gotas causada pela coalescência, já o segundo, inibe a degradação difusional (ASUA, 2002).

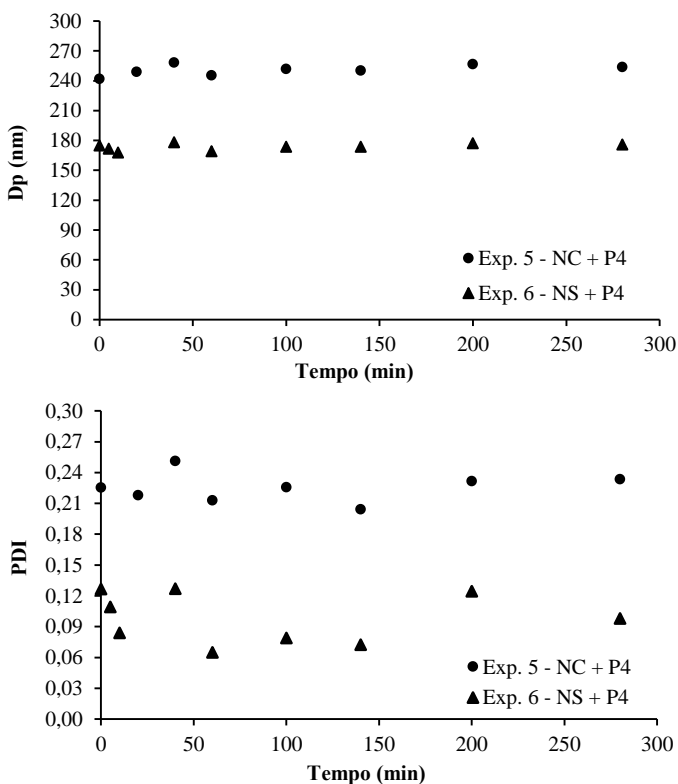
Na Figura 9 são apresentados os resultados de Dg e PDI para os Exp. 1, 2, 3 e 4. Observa-se que as formulações apresentaram elevada estabilidade. Mesmo submetidas ao aquecimento, simulando condições reacionais de polimerização, o diâmetro das gotas não sofreu alterações consideráveis. A adição de 1 mg<sub>P4</sub>·g<sub>Látex</sub><sup>-1</sup> elevou ligeiramente o índice de polidispersão para a formulação do Exp. 2 e não apresentou nenhum efeito nos parâmetros avaliados para a formulação do Exp. 4.

**Figura 9** – Diâmetro médio (Dg) e índice de polidispersão (PDI) de nanogotas com e sem P4 determinados em miniemulsão a 70°C com formulação de nanocápsulas (Exp. 1 e 2) e nanoesferas (Exp. 3 e 4).



Verificada a estabilidade da miniemulsão, as mesmas formulações foram repetidas, porém com a adição do iniciador hidrofóbico AIBN na fase orgânica (Exp. 5 e 6). Considerando que o monômero MMA apresenta certa solubilidade em água ( $150 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), a utilização de iniciador hidrofóbico é aconselhável para evitar nucleação secundária e a formação de partículas de PMMA puro na fase aquosa (TIARKS; LANDFESTER; ANTONIETTI, 2001). O diâmetro médio e PDI das nanopartículas ao longo das reações de polimerização são apresentados na Figura 10.

**Figura 10** – Diâmetro médio (Dp) e índice de polidispersão (PDI) de nanopartículas durante a polimerização em miniemulsão para formação de nanocápsulas (Exp. 5) e nanoesferas (Exp. 6).





Na formulação do Exp. 5, o coestabilizador está em quantidade elevada, por isso, também irá compor o núcleo hidrofóbico das partículas no modelo casca-núcleo denominado nanocápsulas (NC). Já a formulação do Exp. 6, possui elevada quantidade de monômero, que ao reagir produzirá nanopartículas com uma matriz polimérica sólida, denominadas nanoesferas (NS).

As nanocápsulas apresentaram Dp entre 240 e 260 nm, e PDI entre 0,20 e 0,25. As nanoesferas apresentaram Dp entre 160 e 185 nm. Estas possuem estreita distribuição de tamanho, com PDI abaixo de 0,13. Ambas as formulações foram submetidas às mesmas quantidades de energia no preparo da miniemulsão (mesma amplitude e tempo de ultrassom), contudo, a viscosidade do Crodamol é maior que a do MMA, dificultando o cisalhamento das gotas.

Os dados de Dp e PDI obtidos na síntese de nanopartículas com P4 refletem a estabilidade da miniemulsão. A relação Dp/Dg foi de 1,05 para nanocápsulas e 1,01 para nanoesferas. Portanto, o aumento no tamanho médio das partículas foi insignificante, indicando a ausência ou não relevância de fenômenos de degradação (coalescência e difusional) e a nucleação das gotas como principal mecanismo reacional (SCHORK et al., 2005).

O potencial zeta representa o potencial eletrostático decorrente das cargas presente nas camadas superficiais das partículas. O valor deste parâmetro é resultado das interações entre o meio dispersante e os componentes da formulação que possuem grupos funcionais ou cargas iônicas. Em geral, suspensões coloidais com valores elevados (negativos ou positivos) de potencial zeta, possuem alta estabilidade física devido às forças eletrostáticas repulsivas entre as partículas (AUDONNET; MALAQUIN; VIOVY, 2011; SCHAFFAZICK et al., 2003). Os valores de potencial zeta registrados na Tabela 12 confirmam a estabilidade da miniemulsão.

Em alguns casos, pode ocorrer interação eletrostática entre fármaco e polímero, alterando o potencial na superfície das partículas. Alonso et al. (1991) observaram a diminuição (em módulo) do potencial zeta em nanopartículas de PBCA com o aumento da concentração de fármaco hidrofílico sulfato de ampicilina, sugerindo a neutralização de cargas superficiais devido à adsorção do fármaco. A P4 possui caráter hidrofóbico e mais afinidade em permanecer no interior das gotas, o que pode ser observado na Tabela 12, onde as miniemulsões preparadas com e sem fármaco (Exp. 1 e 2; 3 e 4) não apresentaram diferenças no potencial zeta para a concentração avaliada. Portanto, a P4 permaneceu

inerte à formulação, não interagindo com os demais componentes presentes nas camadas externas das gotas.

**Tabela 12** – Potencial Zeta (mV) determinado em miniemulsão (nanogotas) e látex (nanopartículas) com formulação de nanocápsulas (Exp. 1, 2 e 5) e nanoesferas (Exp. 3, 4 e 6).

Formulação	Exp.	Potencial Zeta (mV)*	
		t = 0 min	t = 280 min
NC	1	-35,7 ± 4,0	-38,5 ± 2,6
	2	-34,1 ± 1,4	-36,6 ± 2,6
	5	-37,3 ± 0,6	-39,8 ± 2,7
NS	3	-44,2 ± 1,1	-43,4 ± 1,6
	4	-44,7 ± 5,3	-46,3 ± 1,1
	6	-45,3 ± 2,5	-38,8 ± 2,0

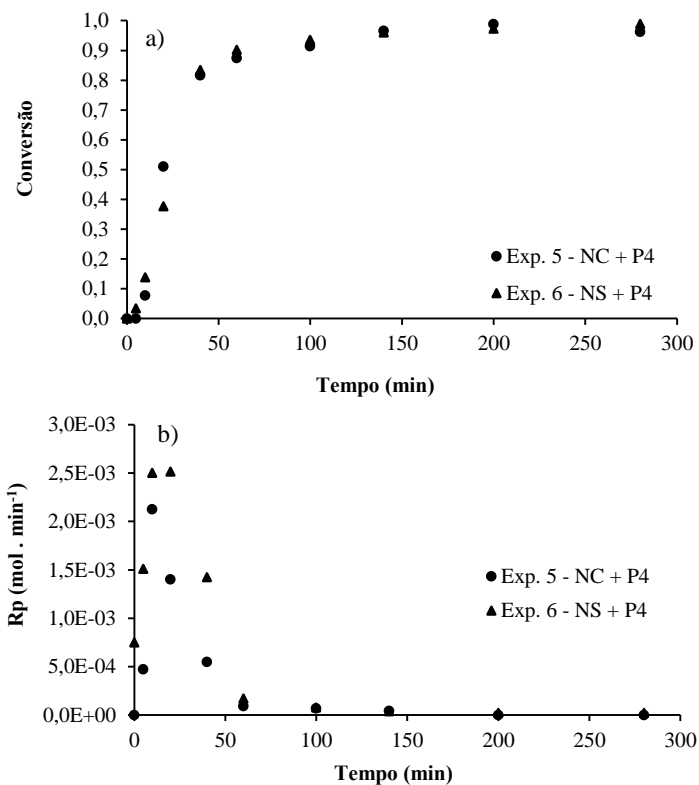
\*Média ± desvio padrão (n = 3); pH = 4,6 ± 0,5.

Em módulo, todas as formulações apresentaram valores de potencial elevados, favorecendo a estabilidade das miniemulsões. Após a polimerização (Exp. 5 e 6), o potencial zeta de ambas as formulações convergiram para valores próximos, indicando que as nanopartículas formadas possuem características superficiais semelhantes eletrostaticamente, possivelmente devido à formação da camada polimérica externa nas nanocápsulas. A completa encapsulação do óleo e a formação de uma camada polimérica contínua na superfície externa das nanopartículas podem levar a resultados de potencial semelhantes entre nanocápsulas e nanoesferas. Em estudo realizado por Mosqueira et al. (2000), não foram encontradas alterações no potencial zeta decorrente do uso de diferentes núcleos oleosos (Miglyol, oleato de etila, óleo de soja, óleo mineral e dodecano) na formação de nanocápsulas com PLA, sugerindo que os resultados eram devido à completa encapsulação do óleo.

Devido à baixa volatilidade do Crodamol, que é constituído de triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico, portanto, um triglicerídeo de cadeia média (TCM), este foi considerado como sólido não polimerizado e incluído no cálculo da conversão gravimétrica. Na Figura 11 é apresentado a evolução da conversão gravimétrica e taxa de reação para os Exp. 5 e 6. O comportamento na cinética de polimerização para formação de nanocápsulas e nanoesferas na presença de 1 mg<sub>P4</sub>.g<sub>Látex</sub><sup>-1</sup> foi muito semelhante. Mais de 90% do polímero é formado em até 100 min

de reação. A taxa de reação máxima é atingida entre 10 e 20 min em ambos os casos. Aos 280 min de reação a conversão atingida para nanocápsulas foi de  $97,6 \pm 2,0\%$  e para nanoesferas  $98,1 \pm 1,1\%$ .

**Figura 11** – a) Conversão ( $X_g$ ) e b) taxa de reação ( $R_p$ ) durante a polimerização em miniemulsão para formação de nanocápsulas (Exp. 5) e nanoesferas (Exp. 6).



A redução na taxa de reação ( $R_p$ ) para nanocápsulas observada na Figura 11b não prejudicou a conversão polimérica e pode ser decorrente do menor número de partículas no sistema (maior  $D_p$ ), o que leva conseqüentemente ao aumento da relação número de radicais por partículas e à elevação da probabilidade de terminações.

De modo geral, os Exp. 1 a 6 demonstram que as formulações avaliadas apresentam estabilidade e cinética de polimerização favorável à encapsulação de P4. Os dados de PDI e potencial zeta indicam que a

formulação de nanoesfera (Exp. 3 e 4) apresentou maior estabilidade e homogeneidade nos resultados, o que era esperado em decorrência do menor teor de óleo.

### 4.3.2 Caracterização e Eficiência de Encapsulação

Com base nos resultados da seção anterior (4.3.1), foram definidas as formulações para síntese de nanocápsulas e nanoesferas de PMMA, as quais estão dispostas na Tabela 13. Desta forma, a próxima etapa é a avaliação da eficiência de encapsulação e quantidade de P4 que é possível incorporar nestes sistemas sem alterar as características estruturais e morfológicas das nanopartículas.

**Tabela 13** – Formulações de miniemulsão para avaliação da eficiência de encapsulação com diferentes concentrações de P4.

Formulação	Água (%)	AIBN (%)	Lecitina (%)	Crodamol (%)	MMA (%)
Nanoesfera	79,5	0,200	0,300	2,00	18,0
Nanocápsula	79,5	0,200	0,300	10,0	10,0

Inicialmente são apresentados os Exp. 7 a 14 (Tabela 14), nos quais são avaliados os parâmetros diâmetro médio das gotas ( $D_g$ , inicial) e partículas ( $D_p$ , final), índice de polidispersão (PDI), conversão gravimétrica ( $X_g$ ) e eficiência de encapsulação (EE) para a formulação de nanoesfera com diferentes concentrações de P4. Em cada experimento, reações poliméricas chamadas Referência (Ref.) foram realizadas paralelamente. Estas possuem a mesma proporção entre os componentes que a reação principal, porém, sem o fármaco.

Avaliando cada experimento, observa-se que até a concentração de  $12 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  não há sinais de instabilidade na miniemulsão. Todas as reações demonstraram valores de  $D_g$  e  $D_p$  próximos. Os baixos valores de PDI indicam que as partículas possuem estreita distribuição de tamanho, com exceção dos Exp. 7P4 e 12P4. Porém, nestas reações o  $D_p$  e PDI relativamente elevados não são resultados das reações de polimerização, e sim, de fatores experimentais no preparo da miniemulsão, pois são aproximados aos valores de  $D_g$  e seus respectivos PDI.

**Tabela 14** – Diâmetro médio das nanogotas (Dg, t = 0min) e nanopartículas (Dp, t = 280 min), índice de polidispersão (PDI), conversão (X<sub>g</sub>) e eficiência de encapsulação (EE) para formulação de nanoesfera com diferentes concentrações de P4.

Exp.	P4 (mg.g <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	Dg (nm)	PDI (Dg)	Dp (nm)	PDI (Dp)	X <sub>g</sub> (%)	EE (%)
7Ref	0,0	161 ± 0,9	0,16 ± 0,01	177 ± 1,9	0,15 ± 0,01	89,5 ± 4,0	-
7P4	1,0	194 ± 0,1	0,25 ± 0,00	205 ± 2,4	0,22 ± 0,01	84,5 ± 0,2	94,4 ± 0,9
8Ref <sup>2</sup>	0,0	179 ± 4,2	0,15 ± 0,04	183 ± 1,9	0,15 ± 0,02	92,4 ± 6,0	-
8P4 <sup>2</sup>	1,0	192 ± 1,2	0,22 ± 0,01	176 ± 2,6	0,10 ± 0,01	98,9 ± 4,4	105,3 ± 1,7
9Ref	0,0	161 ± 1,6	0,10 ± 0,02	168 ± 1,7	0,10 ± 0,03	86,8 ± 0,1	-
9P4	3,0	169 ± 3,3	0,13 ± 0,04	169 ± 1,1	0,10 ± 0,03	88,2 ± 0,9	95,4 ± 8,5
10Ref	0,0	157 ± 0,3	0,10 ± 0,02	182 ± 0,0	0,19 ± 0,01	90,1 ± 1,5	-
10P4	4,0	161 ± 0,6	0,10 ± 0,01	171 ± 0,4	0,07 ± 0,03	94,6 ± 0,3	98,1 ± 0,2
11Ref	0,0	158 ± 1,1	0,10 ± 0,02	162 ± 2,5	0,16 ± 0,02	80,1 ± 0,1	-
11P4	6,0	170 ± 0,2	0,10 ± 0,01	174 ± 1,6	0,07 ± 0,01	84,7 ± 1,1	103,9 ± 4,3
12Ref	0,0	191 ± 2,3	0,18 ± 0,07	200 ± 3,1	0,16 ± 0,08	88,1 ± 1,9	-
12P4	9,0	207 ± 1,2	0,21 ± 0,02	235 ± 2,8	0,23 ± 0,01	86,8 ± 0,2	92,1 ± 0,9
13Ref	0,0	158 ± 1,2	0,10 ± 0,01	166 ± 0,7	0,10 ± 0,01	86,0 ± 0,4	-
13P4	12,0	173 ± 0,3	0,10 ± 0,01	175 ± 4,7	0,12 ± 0,04	75,0 ± 0,9	107,6 ± 0,6
14Ref <sup>2</sup>	0,0	156 ± 1,5	0,10 ± 0,06	169 ± 0,9	0,10 ± 0,03	91,8 ± 0,5	-
14P4 <sup>2</sup>	12,0	167 ± 1,4	0,10 ± 0,01	182 ± 0,7	0,10 ± 0,01	90,3 ± 1,9	99,2 ± 0,1

<sup>1</sup>Os experimentos 8 e 14, são repetições dos exp. 7 e 13, respectivamente, porém, realizados com o dobro da massa de cada componente;

<sup>2</sup>Concentração de P4 com relação à massa total de látex.

Os testes realizados com nanocápsulas (Tabela 15) também demonstraram elevada eficiência de encapsulação (> 80%) para concentrações até 12 mg<sub>P4</sub>.g<sub>Látex</sub><sup>-1</sup>. Conforme relatado na seção anterior, os dados de diâmetro médio das partículas para nanocápsulas apresentam maior dispersão se comparado às nanoesferas. Contudo, o mesmo ocorre para reações com e sem P4 e essas variações não são consideráveis a ponto de comprometer o produto ou indicar desestabilização do sistema.

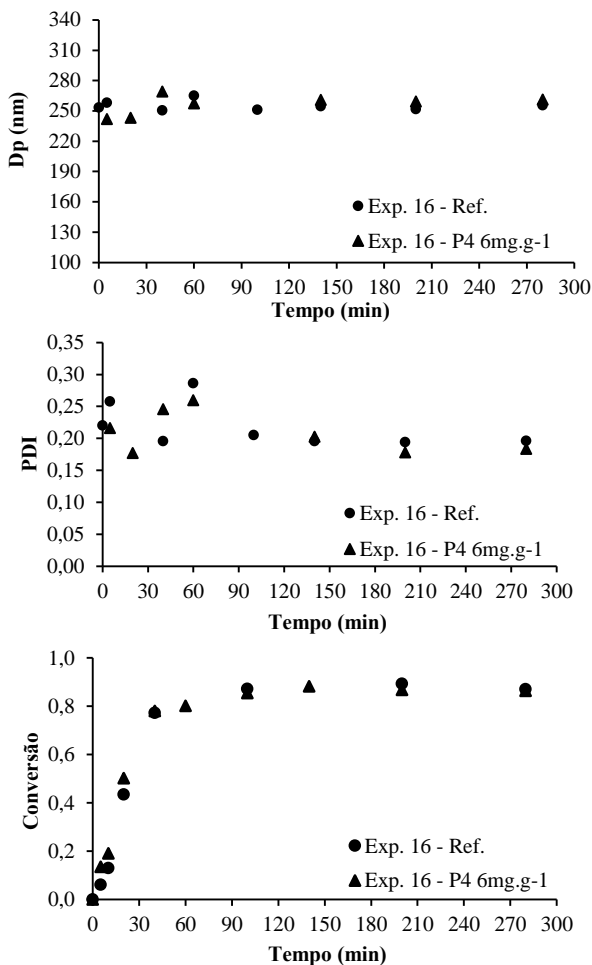
**Tabela 15** – Diâmetro médio das nanogotas (Dg, t = 0min) e nanocápsulas (Dp, t = 280 min), índice de polidispersão (PDI), conversão (X) e eficiência de encapsulação (EE) para formulação de nanocápsula com diferentes concentrações de P4.

Exp.	P4 (mg.g <sup>-1</sup> )	Dg (nm)	PDI (Dg)	Dp (nm)	PDI (Dp)	X <sub>g</sub> (%)	EE (%)
15Ref	0,0	278 ± 3,6	0,27 ± 0,01	254 ± 1,3	0,19 ± 0,00	86,3 ± 0,9	-
15P4	4,0	245 ± 3,3	0,18 ± 0,01	268 ± 1,4	0,20 ± 0,00	89,7 ± 0,3	92,1 ± 2,4
16Ref	0,0	253 ± 8,6	0,22 ± 0,09	252 ± 0,8	0,19 ± 0,02	88,2 ± 1,5	-
16P4	6,0	220 ± 0,1	0,12 ± 0,01	259 ± 1,0	0,18 ± 0,01	87,1 ± 1,0	100,6 ± 3,0
17Ref	0,0	228 ± 1,8	0,12 ± 0,01	267 ± 0,7	0,21 ± 0,01	86,4 ± 1,7	-
17P4	12,0	235 ± 0,3	0,15 ± 0,02	278 ± 0,6	0,22 ± 0,01	91,0 ± 0,6	80,2 ± 2,4

Comparativamente, os dados de eficiência de encapsulação obtidos por Leimann et al. (2015) foram superiores a 98% em estudo com blendas poliméricas biodegradáveis formadas a partir de PHBV, PCL e PLLA. Steinmacher (2010) também obteve EE próxima a 100% em trabalho realizado com nanoesferas e nanocapsulas de acetato de polivinila (PVAc) com aproximadamente 5 mg<sub>P4</sub>.g<sub>Látex</sub><sup>-1</sup>. Desta forma, verifica-se que o caráter hidrofóbico do fármaco eleva o potencial de incorporação em diferentes nanopartículas poliméricas suspensas em meios aquosos.

Para fins de verificação do comportamento das nanocápsulas com P4, os parâmetros Dp, PDI e X<sub>g</sub> foram monitorados ao longo da reação (Exp. 16) e são apresentados na Figura 12.

**Figura 12** – Dp, PDI e Conversão para NC com  $6 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  (Exp. 16).



Considerando que o propósito do trabalho, é importante elevar ao máximo o teor do fármaco nas nanopartículas para reduzir o volume de administração e atingir a dose clínica desejada. Sendo assim, confirmado a adequação das nanocápsulas e nanoesferas para encapsulação de até  $12 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$ , buscou-se aumentar essa concentração e avaliar os efeitos na cinética de reação e estabilidade do látex. Os resultados são apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16** – Diâmetro médio das nanogotas (Dg, t = 0min) e nanopartículas (Dp, t = 280 min), índice de polidispersão (PDI), conversão ( $X_g$ ) e eficiência de encapsulação (EE) para formulações com 20 e 36 mg<sub>P4.g<sub>Látex</sub><sup>-1</sup></sub>.

Exp.*	P4 (mg.g <sup>-1</sup> )	Dg (nm)	PDI (Dg)	Dp (nm)	PDI (Dp)	Dp/Dg	X <sub>g</sub> (%)	EE (%)
18 Ref	0,0	156 ±	0,10 ±	164 ±	0,10 ±	1,05	89,1	-
		1,0	0,01	1,6	0,01		± 0,1	
18 P4	20,0	172 ±	0,10 ±	188 ±	0,14 ±	1,09	88,2	68,7 ±
		1,4	0,01	1,5	0,01		± 0,2	8,3
19 Ref	0,0	148 ±	0,10 ±	159 ±	0,10 ±	1,08	87,5	-
		0,6	0,02	1,3	0,01		± 2,2	
19 P4	36,0	169 ±	0,10 ±	175 ±	0,10 ±	1,04	88,4	87,9 ±
		1,7	0,02	1,1	0,01		± 1,6	11,4
20 Ref	0,0	236 ±	0,22 ±	265 ±	0,24 ±	1,12	81,6	-
		2,2	0,01	1,7	0,01		± 0,2	
20 P4	20,0	242 ±	0,20 ±	287 ±	0,23 ±	1,19	85,0	83,7 ±
		0,8	0,01	2,2	0,01		± 0,1	8,7
21 Ref	0,0	225 ±	0,15 ±	261 ±	0,20 ±	1,16	80,1	-
		2,4	0,09	4,7	0,02		± 2,1	
21 P4	36,0	232 ±	0,16 ±	279 ±	0,23 ±	1,20	76,0	31,1 ±
		0,7	0,02	2,6	0,01		± 1,2	16,2

\* NS: Exp.18 e 19; NC: Exp.20 e 21.

Considerando os experimentos 7 a 21, a conversão média para amostras referência foi de  $86,9 \pm 4,0$  % e para amostras com P4 foi de  $87,2 \pm 6,0$  %. As médias não apresentaram diferença significativa pelo teste *t-student* ( $p > 0,05$ ). Para Dg e Dp referência, as médias foram  $190 \pm 43$  nm e  $202 \pm 44$  nm, respectivamente. Para amostras com P4, os valores médios foram  $197 \pm 31$  nm e  $215 \pm 47$  nm, respectivamente. As médias de Dg e Dp não apresentaram diferença significativa pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ). Portanto, a variabilidade nos dados de amostras referência é semelhante às amostras com P4 em diferentes concentrações.

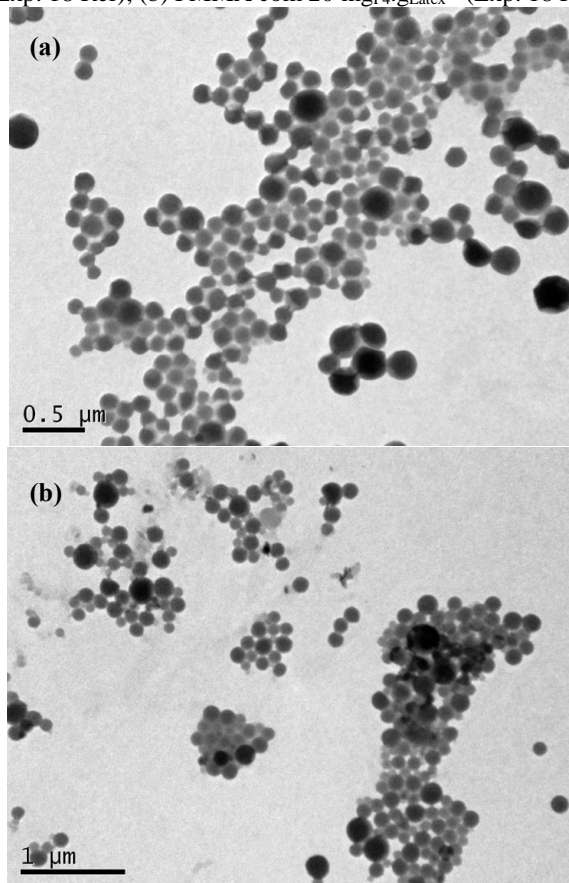
Comparando as EE apresentadas na Tabela 16 com a Tabela 14 e Tabela 15, em ambas as estruturas (NS e NC) foi observado aumento considerável no desvio padrão das médias (maior variabilidade) em amostras com mais de  $20 \text{ mg}_{P4.g_{Látex}^{-1}}$ , possivelmente devido à quantidade de fármaco incorporada. Ainda, com relação a NC, uma pequena fração de partículas menos densas podem não precipitar durante a centrifugação em consequência da elevada relação óleo/PMMA em sua composição, isso pode subestimar os índices de EE ou causar variabilidade na resposta, pois a recuperação do fármaco é realizada na fração polimérica precipitada.

Por meio dos dados apresentados, verificou-se que é possível obter nanocápsulas e nanoesferas com até  $20 \text{ mg}_{P4.g_{Látex}^{-1}}$  mantendo elevada eficiência de encapsulação e estabilidade das nanopartículas. Com isso,

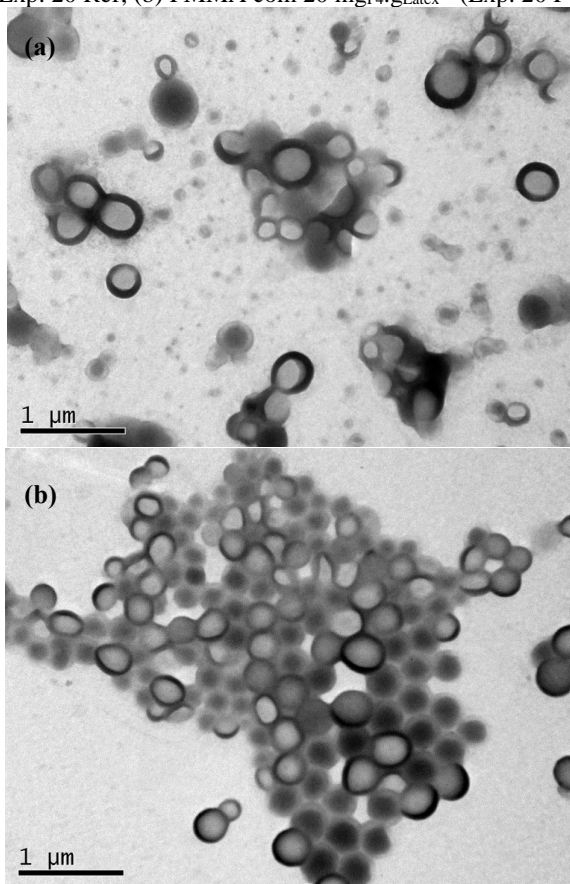


decidiu-se avaliar a morfologia das nanopartículas com essa concentração de fármaco por meio de microscopia eletrônica. As imagens para NS são apresentadas na Figura 13, e para NC na Figura 14.

**Figura 13** – Micrografias de MET de nanoesferas (NS): (a) PMMA (Exp. 18 Ref); (b) PMMA com  $20 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  (Exp. 18 P4).



**Figura 14** – Micrografias de MET de nanocápsulas (NC): (a) PMMA (Exp. 20 Ref; (b) PMMA com  $20 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  (Exp. 20 P4).



Conforme verificado nos trabalhos de Romio et al. (2009a; 2009b) e Bernardy et al., (2010), a proporção de 1:9 e 1:1 entre MMA:Crodamol favorecem, respectivamente, a formação de partículas com morfologia de nanoesferas e nanocápsulas. Na Figura 13 são observadas partículas esféricas sólidas com menor dispersão de tamanhos. Na Figura 14, as partículas são formadas por um núcleo (Crodamol) e uma camada externa (polímero) de coloração mais escura, característico de nanocápsulas. Estas apresentam maior dispersão de tamanhos, confirmando os dados

obtidos por DLS. A incorporação de 20 mg<sub>P4.g<sub>Látex</sub><sup>-1</sup></sub> nas nanopartículas não revelou alterações na morfologia.

A presença de monômero residual nas amostras de látex é indesejada, pois pode elevar a toxicidade da formulação. Neste sentido, foram realizadas análises em cromatografia gasosa para medir o teor de monômero na formulação após o término das reações. Os resultados são apresentados na Tabela 17. Os dados indicam que o teor de monômero na amostra é baixa, inferior a 0,6%. Esses resultados concordam com os obtidos por Feuser et al. (2016), o qual não detectou monômero residual em amostras de PMMA sintetizado em miniemulsão com formulação semelhante.

**Tabela 17** – Teor de monômero residual obtido por cromatografia gasosa ao término das reações (t = 280 min).

Formulação	P4 (mg <sub>P4.g<sub>Látex</sub><sup>-1</sup></sub> )	Monômero Residual (%)
NS	-	0,60
NS	20	0,20
NC	-	0,10
NC	20	0,20

À exemplo do que ocorre com a taxa de reação, já relatado anteriormente, a diminuição do diâmetro médio das partículas pode elevar a massa molar do polímero. Sistemas com número maior de partículas (menor Dp) possuem menor relação de número de radicais/partículas, o que diminui a probabilidade de reações de terminação, permitindo o crescimento da cadeia e a elevação do Mw. Tal fato pode ser verificado na Tabela 18, onde observamos que as nanoesferas (Dp menor) possuem Mw e Mn maior que as nanocápsulas. Estes resultados estão de acordo com Tiarks; Landfester e Antonietti (2001) que observaram o aumento de Dp e redução de massa molar com o aumento da concentração de hexadecano em nanocápsulas de PMMA.

Outro fator que pode ocasionar diminuição da massa molar são reações de transferência de cadeia para o óleo. O aumento do teor de hidrofóbico na partícula pode elevar a taxa de reações de transferência de cadeia para o óleo e a consequente terminação do radical monomérico, limitando o aumento da massa molar. Esse efeito é mais pronunciado com óleos que possuem insaturações na cadeia (GUO; SCHORK, 2008), não sendo o caso do Crodamol, que é composto de ácidos graxos de cadeias saturadas (ácidos cáprico e caprílico). Contudo, resultados em que o aumento da quantidade do hidrofóbico baseado em triglicerídeos de cadeia média leva à diminuição da massa molar, foram obtidos por

Bathfield, Graillat, Hamaide (2005) e Steinmacher et al. (2010) com nanopartículas de poliacetato de vinila (PVAc) sintetizadas em miniemulsão.

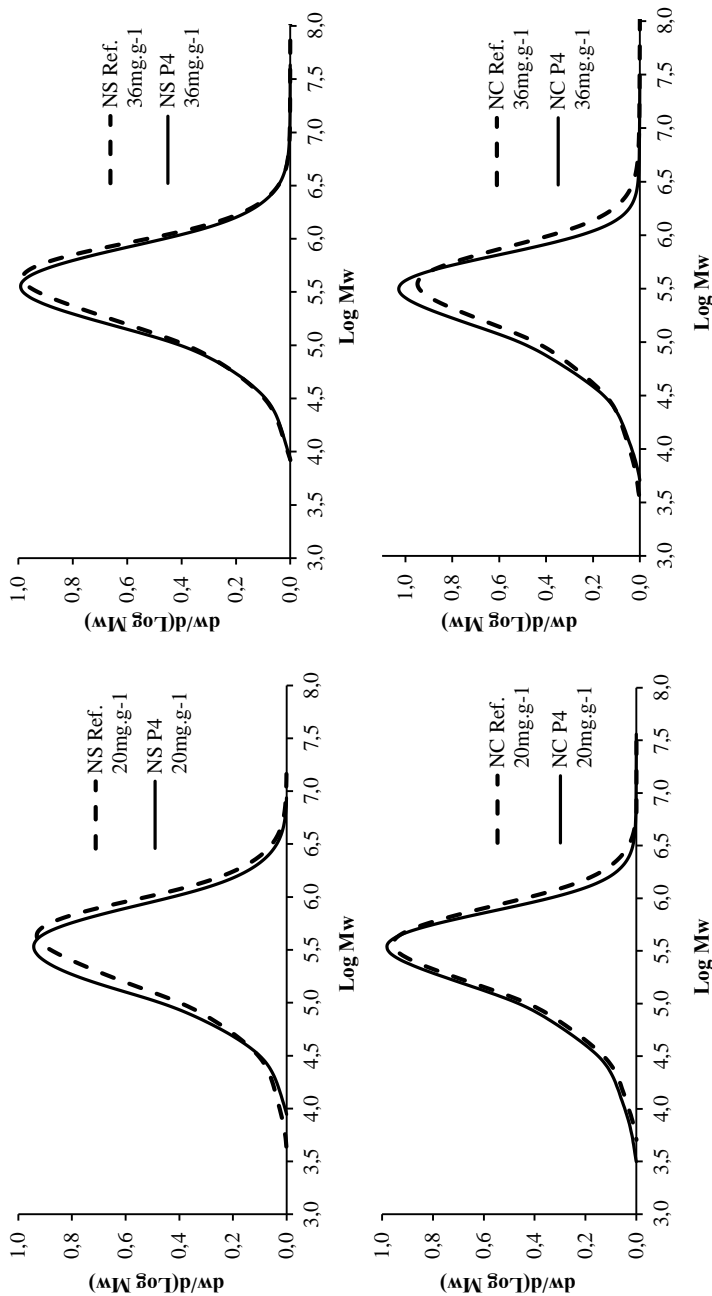
**Tabela 18** – Massa molar média ponderal (Mw), numérica (Mn) e dispersividade (Đ) de nanopartículas de PMMA com diferentes concentrações de P4.

Formulação	P4 ( $\text{mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$ )	P4 (%)*	Mw (kDa)	Mn (kDa)	Đ
NS	0,0	0,0	671,1	196,7	3,4
	4,0	2,0	507,5	195,0	2,6
NS	0,0	0,0	501,3	149,9	3,3
	12,0	6,0	444,6	146,2	3,0
NS	0,0	0,0	511,5	151,9	3,4
	20,0	9,0	444,8	164,1	2,7
NS	0,0	0,0	544,9	176,5	3,1
	36,0	16,0	483,7	174,8	2,8
NC	0,0	0,0	436,1	137,4	3,2
	20,0	9,0	378,2	110,3	3,4
NC	0,0	0,0	477,7	113,1	4,2
	36,0	16,0	339,5	119,5	2,8

\*Concentração percentual (m/m) de P4 em relação à fração de sólidos no látex.

Apesar da massa molar média numérica (Mn) não indicar influência da P4 neste parâmetro, a média ponderal (Mw) do polímero com P4 foi inferior ao polímero referência em todas as medidas. Analisando a distribuição de massa molar para as amostras com 20 e 36  $\text{mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  (Figura 15), observa-se essa diminuição de massa molar com um leve deslocamento das curvas para a esquerda (menor Log Mw). A molécula de P4 é relativamente estável (FAYAD et al., 2013; VIDALES et al., 2014) e é relatado a possibilidade de formação de radicais apenas na presença de UV (GETOFF et al., 2008; GETOFF et al., 2011). Portanto, reações de transferência de cadeia para o fármaco não é um mecanismo considerado para o processo nas condições avaliadas. Apesar da diminuição de Mw não ter alterado o produto final, sugere-se estudo adicional para melhor elucidar o comportamento de Mw na presença de P4.

Figura 15 – Distribuição das massas molares em nanopartículas de PMMA com P4.

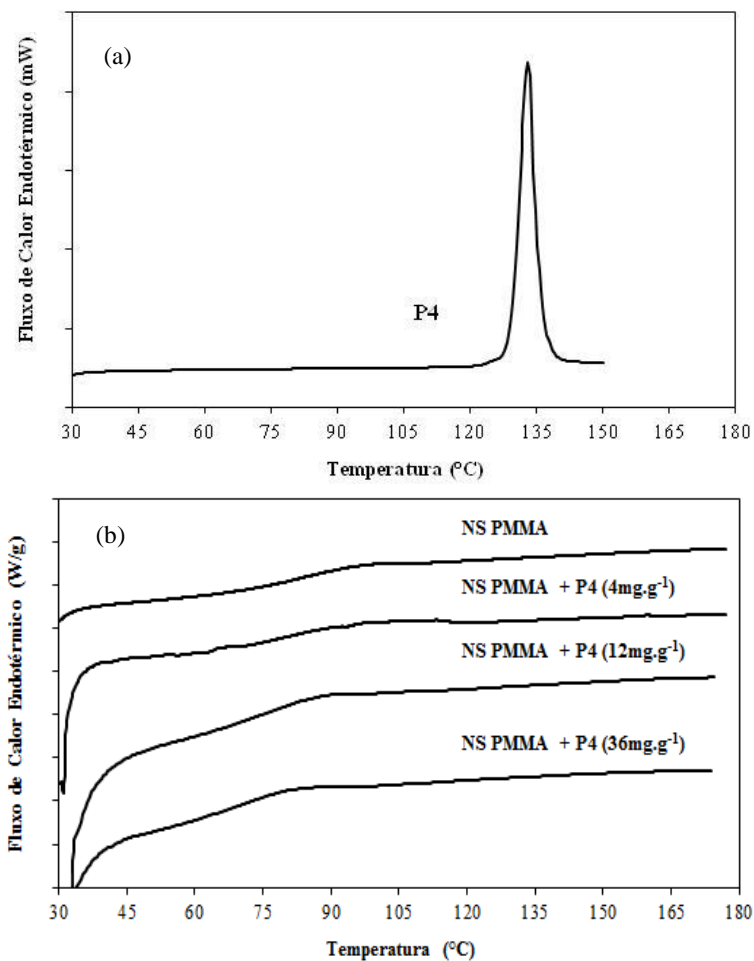


Amostras de nanoesferas de PMMA com P4 foram analisadas em DSC para verificar possíveis interações do fármaco com o polímero e os efeitos na temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). Na Figura 16a é apresentada a varredura para a P4 pura na primeira rampa de aquecimento. Observa-se a ocorrência de um único evento endotérmico em 128°C, o qual corresponde à fusão do composto. Na segunda rampa de aquecimento (dados não apresentados), a análise apresentou pico semelhante, porém iniciando em 121°C. Considerando que a P4 pode existir em diferentes formas cristalográficas no estado sólido, ou seja, apresenta polimorfismo, os valores estão próximos aos esperados. São conhecidos dois estados polimórficos para a P4: a forma I é estável termodinamicamente e se funde a aproximadamente 129°C; a forma II pode ser obtida após a fusão e arrefecimento do composto na forma I, possui estado metaestável e temperatura de fusão em torno de 122°C (LEGENDRE; FEUTELAIS; DEFOSSEMONT, 2003; DEFOSSEMONT; RANDZIO; LEGENDRE, 2004). Conclui-se que o estado predominante de P4 na amostra em estudo refere-se à forma I.

O PMMA apresenta, geralmente, estrutura amorfa com  $T_g$  próximo de 100°C. A degradação térmica do polímero ocorre em torno de 400°C e não há pico referente à temperatura de fusão ( $T_m$ ), pois o polímero é amorfo (LUCAS, SOARES; MONTEIRO, 2001). Na Figura 16b constam as curvas de DSC (2ª rampa de aquecimento) para as nanopartículas de PMMA com e sem P4. Na faixa de temperatura entre 30 e 180°C, visualiza-se um único evento endotérmico característico da transição vítrea.

A amostra de nanoesferas de PMMA sem fármaco apresentou curva característica para esse polímero com  $T_g$  estimada em 87°C, valor inferior ao citado na literatura para o PMMA puro devido a composição das partículas que possui aproximadamente 10% do teor de sólidos em Crodamol. O fármaco promoveu a diminuição da  $T_g$  das nanopartículas. Amostras com 4, 12 e 36 mg<sub>P4</sub>.g<sub>Látex</sub><sup>-1</sup> apresentaram, respectivamente,  $T_g$  de 83; 77 e 71°C. Esse efeito também foi relatado por Im; Sah (2009), onde a P4 fez diminuir o valor de  $T_g$  de microsferas de PLGA. Os autores verificaram a redução da  $T_g$  em concentrações de P4 de até 17%. Jang e Sah (2011) chegaram à mesma conclusão, porém em concentrações de até 23,1%. Em concentrações mais elevadas o decréscimo não é significativo, por isso, ambos sugerem que a P4 pode agir como um plastificante e seu efeito atinge um limite, uma vez que a matriz é saturada pelo fármaco.

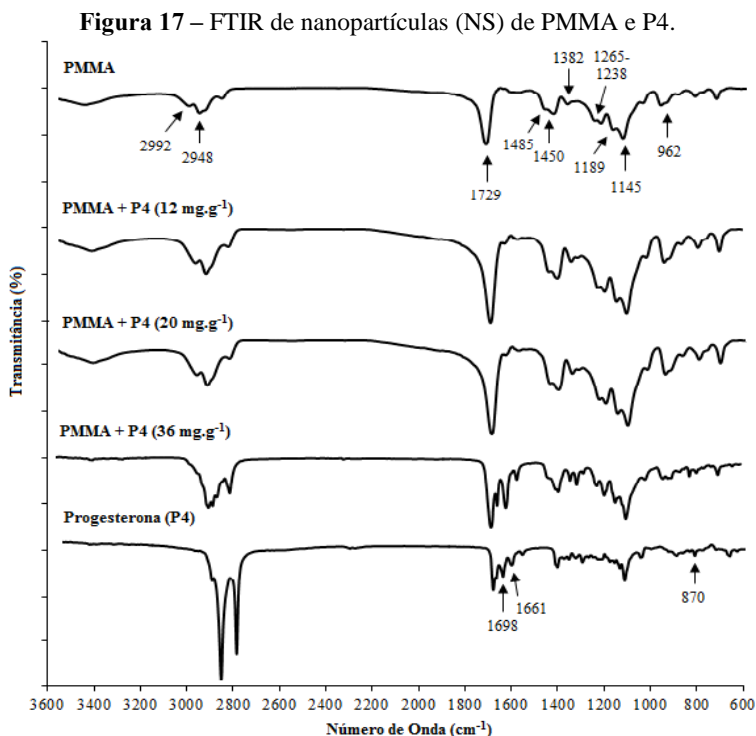
**Figura 16** – (a) Curva de DSC para P4 pura; (b) curvas de DSC para nanopartículas de PMMA com P4 em diferentes concentrações.



Análises em DSC da mistura física de NS PMMA Ref. e P4 nas proporções de 6 e 16%, simulando amostras com 12 e 36  $\text{mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  em condições onde o fármaco não foi encapsulado, são apresentadas no Apêndice II (Figura 49). Na avaliação da 1ª rampa de aquecimento dessas amostras, a fusão da P4 livre foi observada no intervalo entre 120 e 133°C. Em amostras de NS com 12 e 36  $\text{mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  encapsulada, esse evento esteve ausente, indicando que a P4 se encontra completamente dispersa no polímero. Jang e Sah (2011) observaram que em microesferas de

PLGA, o pico referente à fusão da P4 ficou ausente até a concentração de 14,5%, indicando a completa solubilidade do fármaco na matriz polimérica. Em 35,2%, o pico de fusão ficou visível indicando a ocorrência de formação da mistura de polímeros cristalinos de P4 (forma I e II) na microesfera.

As interações da P4 com as partículas foram analisadas por meio de espectros obtidos em FTIR, apresentados na Figura 17. Em NS de PMMA, assim como em P4 pura, ocorreram bandas de absorção na região entre 3000 - 2800  $\text{cm}^{-1}$  decorrentes do estiramento nas ligações  $-C-H$ ;  $-C-CH_3$  e  $-O-CH_3$  (STUART, 2004). Progesterona possui ainda bandas características do estiramento das ligações  $-C=O$  no carbono ligado ao radical metila (1698  $\text{cm}^{-1}$ ) e da cadeia cíclica (1661  $\text{cm}^{-1}$ ) (ZOPPETI et al., 2007; LEIMANN et al. 2015), além de absorção em 870  $\text{cm}^{-1}$  referente à deformação fora do plano do hidrogênio ligado ao carbono  $sp^2$  (ARAYA-SIBAJA et al., 2013).





Partículas de PMMA apresentam absorção pronunciada em  $1729\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento nas ligações  $\text{-C=O}$ , além de outras bandas decorrentes da deformação das ligações  $\text{-CH}_2$  ( $1485$ ;  $1145\text{ cm}^{-1}$ ), ligações  $\text{-O-CH}_3$  ( $1450 - 1434\text{ cm}^{-1}$ ), ligações  $\text{-C-CH}_3$  ( $1382$ ;  $962\text{ cm}^{-1}$ ), ligações  $\text{-C-O-C}$  ( $1189\text{ cm}^{-1}$ ) e estiramento de  $\text{-C-C-O-}$  ( $1265 - 1238\text{ cm}^{-1}$ ) (STUART, 2004).

O espectro das partículas de PMMA, apresentado na Figura 17, não é alterado com a encapsulação de P4 até concentrações até  $20\text{ mg}_{\text{P4.gLátex}^{-1}}$ , provavelmente devido à completa dispersão do fármaco no interior das partículas poliméricas (ELSAID ALI; TAHER; MOHAMED, 2013; BUTANI; YEWALE; MISRA, 2016; PUCEK; LEWIŃSKAB; WILKA, 2016). Para concentração de  $36\text{ mg}_{\text{P4.gLátex}^{-1}}$ , há diminuição da intensidade de bandas relativas ao PMMA e o aparecimento de bandas referentes à progesterona ( $1698$ ,  $1661$  e  $870\text{ cm}^{-1}$ ). Neste nível de concentração parte do fármaco pode estar exposto na superfície das partículas. Esses resultados foram confirmados com a análise a mistura física de NS PMMA Ref. com fármaco (dados apresentados no Apêndice II - Figura 48), onde as bandas relativas à P4 foram detectadas nas misturas com 6 e 9% de P4 (simulando formulações de 12 e  $20\text{ mg}_{\text{P4.gLátex}^{-1}}$ ).

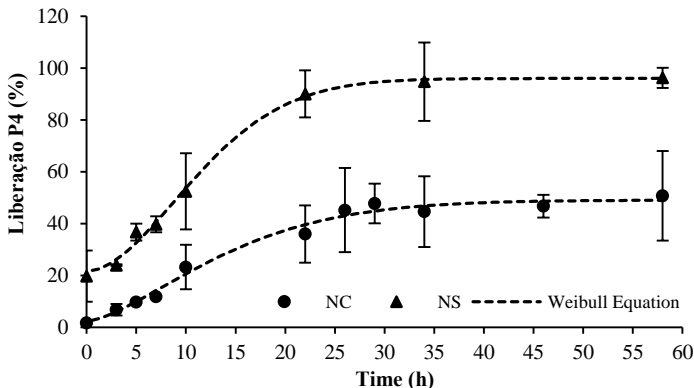
### 4.3.3 Liberação *in vitro*

Ensaio de liberação *in vitro* foram realizados para obtenção de informações acerca da resistência imposta pela matriz polimérica à difusão do fármaco em um meio completamente favorável à solubilização deste. Os resultados são apresentados na Figura 18. A P4 apresentou solubilidade em SDS 5% de  $9,6\text{ mg.mL}^{-1}$ , concordando com o valor determinado por Im e Sah (2009). Com isso, o meio garante a condição de solubilidade completa do fármaco presente na amostra (condição “*sink*”) e se mostrou inerte às nanopartículas poliméricas.

O contato das partículas com a solução promove a liberação imediata da P4 que se encontra aderida à superfície. Para NS, a liberação inicial foi de aproximadamente 20% da quantidade encapsulada, enquanto para NC esse valor foi inferior a 2%. Esse comportamento se dá em virtude das interações que ocorrem entre fármaco/partícula/meio de liberação. Fármacos hidrofóbicos como a P4 tendem a ficar solubilizados no núcleo oleoso das NC, aumentando o tempo de liberação. Enquanto em NS, parte do fármaco fica adsorvido na camada superficial das

partículas, causando efeito *burst* (MEMISOGLU-BILENSOY et al., 2006; BAZYLIŃSKA et al., 2014; CRUZ et al., 2006).

**Figura 18** – Liberação *in vitro* de P4 encapsulada em nanopartículas de PMMA ( $12 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$ ).



A transferência da P4 das NC para o meio de liberação ocorreu de forma mais lenta se comparada às NS, ficando limitada a um máximo de 50% em todo o tempo avaliado. Possivelmente a fração não liberada ao longo do teste pode ser decorrente do grau de solubilização da progesterona no Crodamol GTCC<sup>®</sup>, estimado em  $36,2 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  (LAND; LI; BUMMER, 2005) e presente em maior quantidade no núcleo dessas partículas.

A cinética de liberação foi avaliada com a aplicação dos modelos Primeira Ordem, Higuchi, Lei de Potência e Weibull (Tabela 19). A equação de Higuchi descreve a liberação como um processo de difusão baseado na Lei de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo. Tanto Higuchi quanto a Lei de Potência são válidas para tempos relativamente curtos, por isso, geralmente limitam-se a explicar os primeiros 60% da curva de liberação (KOSMIDIS et al., 2003a; PAPADOPOULOU et al., 2006). Na Lei de Potência,  $k$  é a constante cinética e  $n$  é o expoente que caracteriza o mecanismo de liberação. Para geometrias esféricas,  $n = 0,43$  quando a difusão de Fick é o mecanismo que controla a liberação e  $n = 0,85$  (ou  $n = 1$  para filme) quando a cinética é de ordem zero (*Case-II transport*) e o processo é controlado pelo intumescimento do polímero. Valores de  $n$  entre 0,43 e 0,85 indicam a sobreposição de ambos os fenômenos, também chamado de transporte anômalo (SIEPMANN; PEPPAS, 2012). Contudo, a análise da liberação por meio desse modelo

não foi conclusiva visto que o ajuste não se mostrou adequado considerando os valores de  $R^2_{\text{adj}}$  (Tabela 19).

**Tabela 19** – Coeficientes obtidos na aplicação das equações Lei de Potência e Weibull aos dados de liberação da progesterona.

Eq. Primeira Ordem: $y(t) = y_0 \text{Exp}(-kt)$		
Coeficientes	NS	NC
	Valor (erro)	Valor (erro)
$y_0$	20,143 (1,847)	7,216 (2,085)
$k$	0,097 (0,012)	0,075 (0,015)
$R^2_{\text{adj}}$	0,949	0,838

Eq. Higuchi: $y(t) = k\sqrt{t}$		
Coeficientes	NS	NC
	Valor (erro)	Valor (erro)
$k$	15,785 (2,030)	6,535 (0,692)
$R^2_{\text{adj}}$	0,398	0,858

Eq. Lei de Potência: $y(t) = kt^n$		
Coeficientes	NS	NC
	Valor (erro)	Valor (erro)
$k$	12,815 (2,114)	2,853 (0,885)
$n$	0,608 (0,0829)	0,827 (0,112)
$R^2_{\text{adj}}$	0,954	0,944

Eq. Weibull: $y(t) = A - (A - B)\text{Exp}(-at^b)$		
Coeficientes	NS	NC
	Valor (erro)	Valor (erro)
$A$	96,040 (2,264)	49,062 (2,260)
$B$	21,664 (4,781)	2,357 (5,320)
$b$	1,818 (0,332)	1,483 (0,385)
$a$	0,073 (0,006)	0,062 (0,009)
$R^2_{\text{adj}}$	0,991	0,973

A equação empírica de Weibull já foi alvo de críticas quando utilizada para explicar processos de dissociação/liberação, devido principalmente à falta de fundamentos cinéticos e natureza não-física dos parâmetros (COSTA; LOBO, 2001). Porém, devido às evidências experimentais que comprovam o uso bem-sucedido deste modelo na cinética de liberação, estudos posteriores validaram, por meio de simulações computacionais e pressupostos teóricos, a utilização da equação Weibull como uma forma geral para estudos de liberação de fármacos. Inclusive, verificaram que a expansão em série do termo exponencial revelou que, quando o produto  $at^b$  é pequeno, a equação de

Weibull se aproxima da Lei de Potência (KOSMIDIS et al. 2003b; 2003c).

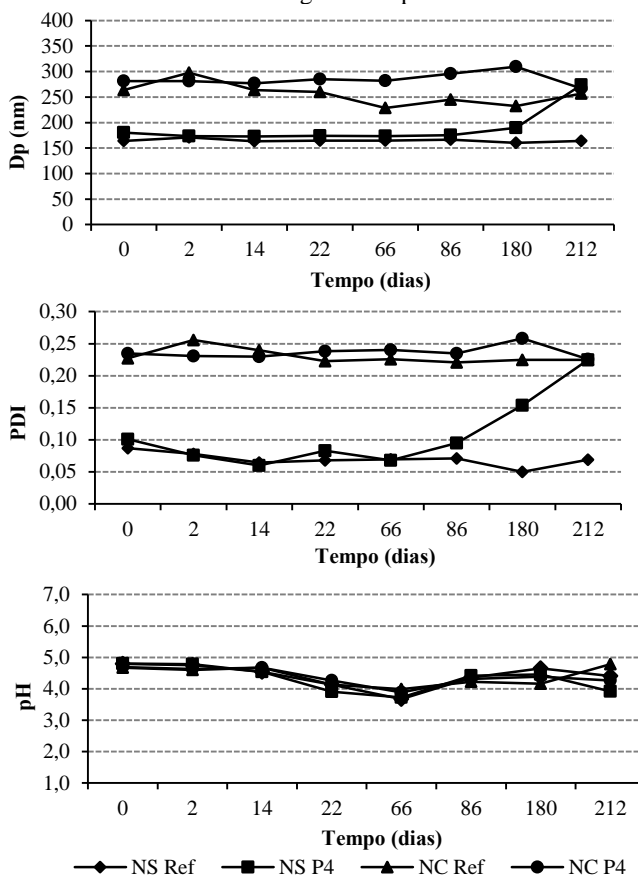
Os valores do expoente  $b$  foram associados aos mecanismos de liberação por Papadopoulou et al. (2006). Segundo os autores, para  $b < 0,75$  a liberação segue a difusão de Fick. Quando  $0,75 < b < 1$  a liberação ocorre por mecanismos combinados (difusão de Fick e intumescimento). Por fim, quando  $b > 1$  a curva exhibe forma sigmoidal e o processo de liberação não é explicado pela difusão de Fick ou intumescimento. Neste caso, os autores denominam o processo de “mecanismo complexo” e sugerem que esse comportamento é frequente em fármacos hidrofóbicos, onde os aspectos de solubilidade são relevantes na cinética de liberação.

Esse comportamento foi verificado na liberação da P4 com NS e NC de PMMA, cujo valor de  $b$  foi 1,82 e 1,48 para os respectivos modelos de partículas (Tabela 19). A presença de outros agentes hidrofóbicos nas partículas, como o Crodamol, também pode influenciar na difusão do fármaco. Ressalta-se que a aplicação da equação de Weibull para tempos inferiores a 60 horas, como por exemplo 30 horas, conduz a resultados semelhantes, com coeficientes  $b > 1$ . Portanto, conforme discutido por Papadopoulou et al. (2006) e Kosmidis et al. (2003b; 2003c), a aplicação deste modelo pode ser dada em toda a extensão da curva e não apenas à fração inicial como indicado para a Lei de Potência.

#### 4.3.4 Estabilidade Física do Látex

Partículas poliméricas em miniemulsão apresentam estabilidade física variável de acordo com a formulação, forma de preparo e armazenamento, podendo durar de horas até meses (EL-AASSER; SUDOL, 2004). Considerando esse aspecto, buscou-se avaliar o diâmetro de partículas, PDI e pH ao longo do tempo, para verificar possíveis fenômenos de degradação como coalescência e difusão. Observou-se também o aspecto macroscópico visual do látex. Na Figura 19 são apresentadas as medições realizadas.

**Figura 19** – Avaliação do Dp (nm), PDI e pH do látex com P4 ( $20 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$ ) ao longo do tempo.



Os resultados indicaram que o látex com progesterona apresentou excelente estabilidade física quando conservado em refrigeração por até 6 meses após o preparo. Próximo a esse período começam a ser observados pequenos grumos nas bordas do frasco e em 7 meses observou-se o princípio de sedimentação, indicando possível separação de fases. Esses resultados ocorreram apenas no látex contendo P4 e foram mais perceptíveis na formulação de NC. Contudo, observou-se a elevação do Dp e PDI em ambas as formulações após 6 meses. O látex sem P4 seguiu estável e sem alterações visuais no período avaliado. O pH também permaneceu constante, confirmando a estabilidade química do polímero.

#### 4.4 CONCLUSÕES

As formulações avaliadas foram adequadas à incorporação de até  $20 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  de progesterona e se mantiveram estáveis por 6 meses. As nanoesferas apresentaram diâmetro médio entre 150 e 200 nm, e as nanocápsulas entre 250 e 300 nm. Nas concentrações avaliadas, a progesterona não influenciou o tamanho médio de partículas, cinética de reação e conversão final do monômero. A distribuição de massa molar do polímero em partículas com fármaco não sofreu alteração considerável. A EE para concentrações de até  $12 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  ficaram acima de 90%. Contudo, em amostras com mais de  $20 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  esse parâmetro apresentou maior variabilidade nos resultados.

O fármaco possui ação plastificante sobre o polímero, verificado por meio da diminuição da temperatura de transição vítrea de amostras com concentrações crescentes de progesterona. As análises em FTIR mostraram que o espectro de absorção das partículas não foi alterado com a incorporação de até  $20 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  de progesterona, porém com  $36 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  houve diminuição da intensidade de bandas relativas ao polímero e aparecimento de bandas referentes ao fármaco. Este resultado associado às variações nos dados de eficiência de encapsulação desta formulação pode estar relacionado à não encapsulação completa do fármaco no interior do polímero.

Na liberação *in vitro* em nanoesferas, aproximadamente 20% da progesterona encapsulada foi liberada instantaneamente ao meio. Esse efeito é devido ao fármaco estar adsorvido em camadas superficiais das partículas. Em nanocápsulas apenas 2% foi liberado instantaneamente, demonstrando que esse modelo de partícula apresentou maior potencial de retenção do fármaco hidrofóbico em decorrência da solubilização no núcleo oleoso das partículas. Em termos de mecanismos de transporte, ambos os casos apresentaram perfil sigmoidal, não estando relacionado apenas com difusão de Fick ( $b > l$ ), essa condição pode ser devido às características de solubilidade do fármaco na matriz polimérica e meio de liberação.

## 5 ENCAPSULAÇÃO E LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE PROGESTERONA EM NANOPARTÍCULAS DE P(MMA-co-AA)

### 5.1 INTRODUÇÃO

A inserção de grupos carboxílicos na cadeia de PMMA, provenientes da copolimerização com ácido acrílico (AA), pode tornar o polímero responsivo ao pH. Apesar do metacrilato de metila (MMA) não possuir alta hidrofobicidade, há relatos de copolimerização em miniemulsão direta com ácido acrílico (WU; SCHORK; GOOCH, 1999; CAMPOS; FERRAZ; PINTO, 2016), a qual é benéfica para aplicações biomédicas, pois permite a síntese de partículas em meio livre de solventes orgânicos. Desta forma, este capítulo aborda a encapsulação e posterior liberação *in vitro* de progesterona em nanopartículas de P(MMA-co-AA) preparadas por polimerização em miniemulsão direta.

### 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 5.2.1 Materiais

Os reagentes e materiais utilizados foram metacrilato de metila (MMA,  $\geq 99,5\%$ ) e ácido acrílico (AA,  $\geq 99,5\%$ ) como monômeros, iniciador 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN,  $\geq 98\%$ ), progesterona ( $\geq 99\%$ ), clorofórmio ( $\geq 99\%$ ), dodecil sulfato de sódio (SDS,  $\geq 99\%$ ), citrato de sódio (99%), ácido cítrico (99%), hidróxido de sódio (NaOH, 99%), ácido clorídrico (HCl, 37%), cloreto de sódio (NaCl, 99,5%), hidrogenoftalato de potássio (99,9%), fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 99%) e fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 99%) adquiridos da Sigma-Aldrich. Lecitina de soja (Alpha Aesar) utilizada como emulsificante. Tetrahydrofurano (THF,  $\geq 99,9\%$ , Merck). Crodamol GTCC<sup>®</sup> (triglicerídeos de cadeia média composto de ácidos cáprico e caprílico), adquirido da Alpha Química, utilizado como coestabilizador. Hidroquinona 1% (Nuclear). Água deionizada. Todos os reagentes e solventes são de pureza analítica. O iniciador AIBN foi previamente recristalizado em metanol, filtrado e secado à vácuo.

## 5.2.2 Preparo de Nanopartículas de P(MMA-co-AA)

As reações de polimerização de P(MMA-co-AA) seguiram o mesmo protocolo descrito no item 4.2.2. A formulação para síntese de nanoesferas seguiu as proporções descritas na Tabela 13, porém, a fração monomérica foi composta de MMA e AA com proporções molares de 8,66:1,34 (9:1; m/m), respectivamente, adaptado de Campos; Ferraz e Pinto (2016) e Peixoto (2013).

## 5.2.3 Caracterização e Eficiência de Encapsulação

Os parâmetros de caracterização das partículas de P(MMA-co-AA) foram: tamanho médio; potencial zeta; conversão gravimétrica; microscopia eletrônica de transmissão (MET); distribuição de massa molar; calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). As análises foram realizadas de acordo com os métodos já descritos no item 4.2.3. A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada de acordo com o protocolo descrito no item 4.2.4.

A determinação de grupos carboxílicos nas partículas foi realizada por titulação potenciométrica conforme método adaptado de Zhang et al. (2014b), utilizando pHmetro Hanna HI 3221. Primeiramente, amostras de 2 g de látex foram dispersas em 15 mL de água deionizada fervida (condutividade  $0,05 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ; isenta de  $\text{CO}_2$ ) e agitadas em vórtex. Posteriormente foram centrifugadas por 1 h a 6000 rpm (3743 xg) em temperatura de  $20^\circ\text{C}$ . A centrifugação foi suficiente para separação da fase polimérica. A fase aquosa (sobrenadante) apresentou aspecto límpido e foi titulada com NaOH 0,1 M a um fluxo de  $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  para determinação das cargas ácidas livres. A cada volume adicionado, pH e condutividade eram monitorados. A análise foi realizada em triplicata. O preparo e padronização das soluções foram realizados conforme Apêndice IV.

Para determinação dos grupos carboxílicos presentes na superfície das partículas, a fase polimérica (precipitado) foi suspensa com 20 mL de solução de NaCl 0,5 M e 5 mL de NaOH 0,1 M. A quantidade de base adicionada excede o necessário para neutralizar todas as cargas ácidas decorrentes do ácido acrílico contido na formulação (aprox.  $5 \times 10^{-4}$  mols). A mistura foi deixada em agitação magnética por uma noite para atingir o equilíbrio de ionização. Os íons hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ) não reagidos com o ácido da amostra foram titulados potenciometricamente com HCl 0,1 M em fluxo de  $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .



Medidas de condutividade foram realizadas concomitantemente para confirmação do ponto estequiométrico. Com essa determinação foi possível quantificar as cargas ácidas das partículas decorrentes da ionização de grupos carboxílicos expostos (superficiais) à fase aquosa, considerando desprezível a degradação de partículas.

A estimativa dos grupos carboxílicos não ionizados (cadeias poliméricas internas) foi realizada pela diferença entre o número de mol total de AA presente na amostra (quantidade adicionada à formulação) menos a quantidade presente na fase aquosa e na superfície das partículas. Considerou-se que todo ácido presente na amostra é decorrente da ionização do AA.

#### **5.2.4 Ensaios de Liberação *in vitro***

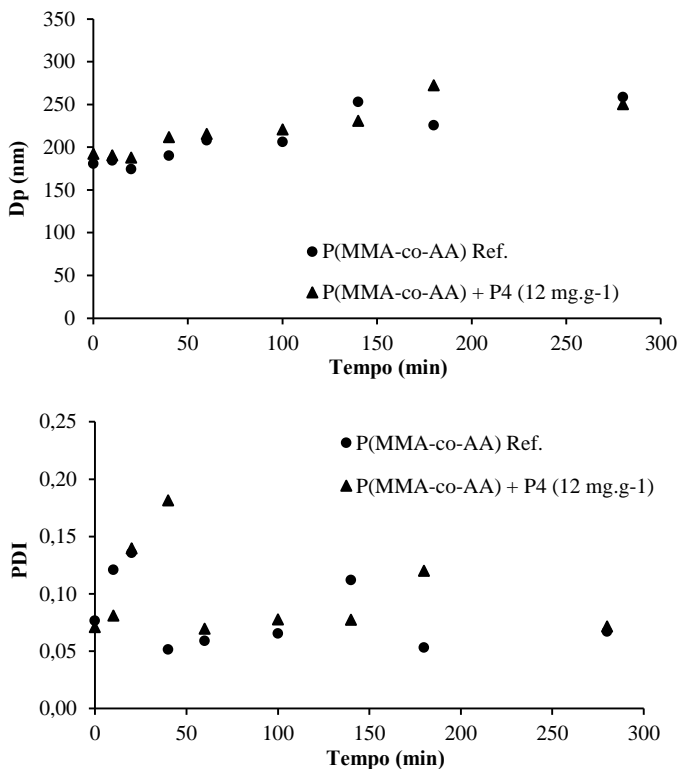
Os ensaios de liberação foram realizados em soluções tampões pH  $3 \pm 0,2$ ;  $6 \pm 0,2$  e  $8 \pm 0,2$  preparados em solução de SDS 5%. O meio de liberação pH  $3 \pm 0,2$  foi preparado com tampão citrato, formado pela mistura de 93 mL de ácido cítrico 0,1 M e 7 mL de citrato de sódio 0,1 M. O meio pH  $6 \pm 0,2$  foi preparado com tampão fosfato formado por 92 mL de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 M e 8 mL de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  0,2 M. O meio pH  $8 \pm 0,2$  foi preparado com tampão fosfato formado de 5,3 mL de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 M e 94,7 mL de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  0,2 M. Todos os tampões foram preparados em solução de SDS 5% e o pH aferido antes do início dos testes. O restante do procedimento e tratamento de dados seguiu o protocolo já relatado no item 4.2.5.

### **5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

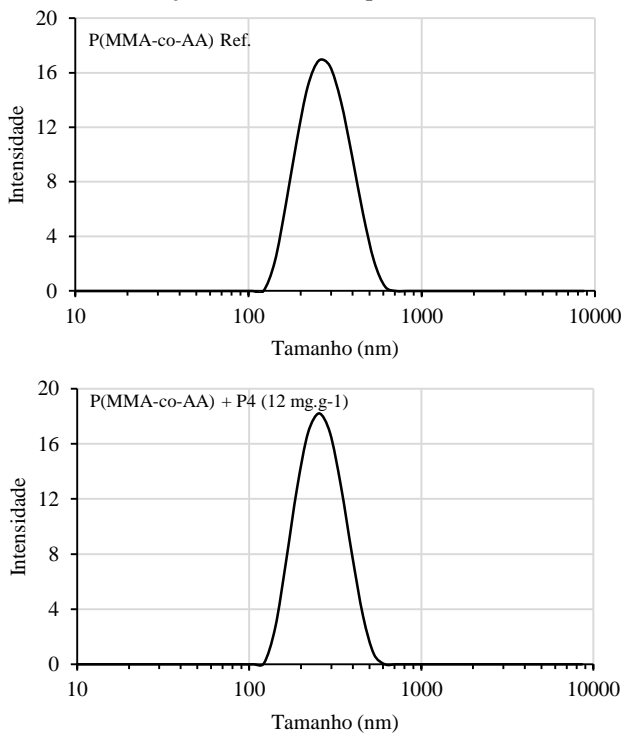
#### **5.3.1 Caracterização de P(MMA-co-AA) e Encapsulação de Progesterona**

As reações de síntese do copolímero P(MMA-co-AA) com iniciador hidrofóbico AIBN permitiram a produção de partículas com diâmetros entre 200 e 300 nm. A inclusão de  $12 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  na formulação não alterou o tamanho de partícula, tampouco o PDI, conforme observado na Figura 20.

**Figura 20** – Diâmetro médio ( $D_p$ ) e índice de polidispersão (PDI) de partículas de P(MMA-co-AA) referência (Ref.) e com 12 mg<sub>P4</sub>.g<sub>Latex</sub><sup>-1</sup>.



Em ambas as reações, a evolução de  $D_p$  foi semelhante. As gotas apresentavam inicialmente tamanho de 190 nm, o qual foi elevado com a formação das partículas para aproximadamente 250 nm. Contudo, considerando que o tamanho estabilizou após 140 min de reação e o PDI não apresentou tendência de elevação, ficando inferior a 0,2 em todas as medições, essa elevação no  $D_p$  não caracteriza instabilidade no sistema devido à coalescência ou degradação difusional. A distribuição de tamanho das partículas da reação pode ser observada na Figura 21.

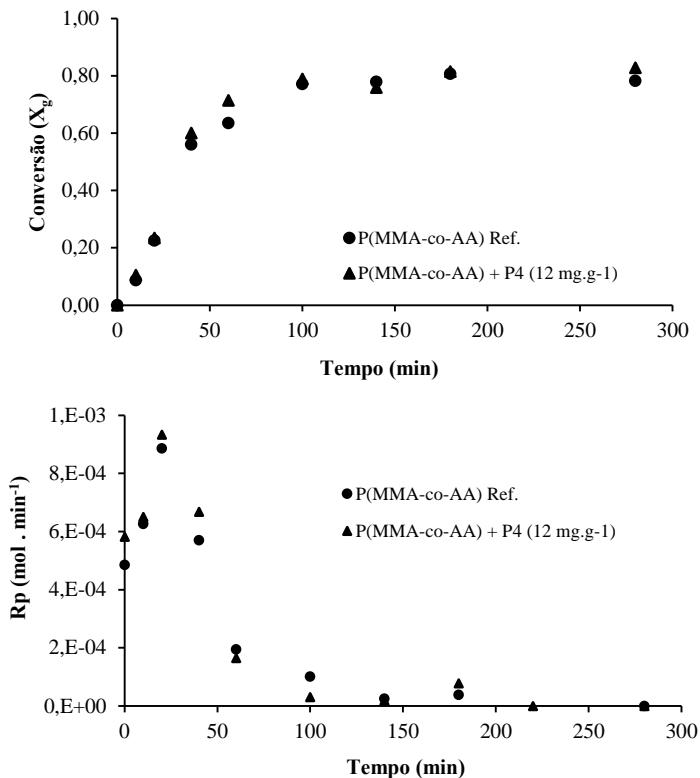
**Figura 21** – Distribuição de tamanho de partículas de P(MMA-co-AA).

A reação de polimerização foi processada em meio ácido decorrente da ionização do próprio ácido acrílico com o propósito de evitar o inchamento das partículas durante a polimerização, pois pretende-se avaliar a liberação do fármaco com o aumento de pH. Possivelmente o aumento de  $D_p$  ao longo da reação é decorrente da interação do ácido poliacrílico hidrofílico, presente na superfície das partículas, com água e outros sítios hidrofílicos presentes no meio. Os grupos carboxílicos promovem a formação de camada filamentosa (inchamento) em torno das partículas. O ácido acrílico polimeriza rapidamente em meio ácido. O aumento do teor desse comonômero também pode elevar o tamanho de partículas devido a formação de blocos poliacrílicos mais longos na formação do copolímero localizado na interface partícula-água (HOLZAPFEL et al. 2005)

A conversão gravimétrica ( $X_g$ ) foi crescente em até 100 min de reação, onde estabilizou em aproximadamente 80% (Figura 22). A taxa

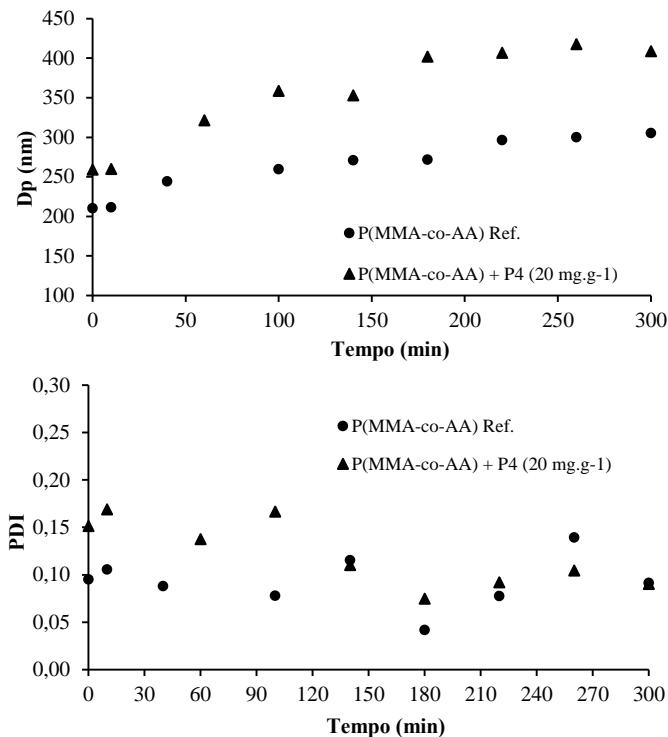
de reação ( $R_p$ ) apresentou valor máximo em 20 min. Em ambos os parâmetros não houve influência relevante da P4.

**Figura 22** – Conversão ( $X_g$ ) e taxa de reação ( $R_p$ ) durante polimerização em miniemulsão para formação de nanoesferas de P(MMA-co-AA) com  $12 \text{ mg}_{P4} \cdot \text{g}_{\text{Latex}}^{-1}$ .



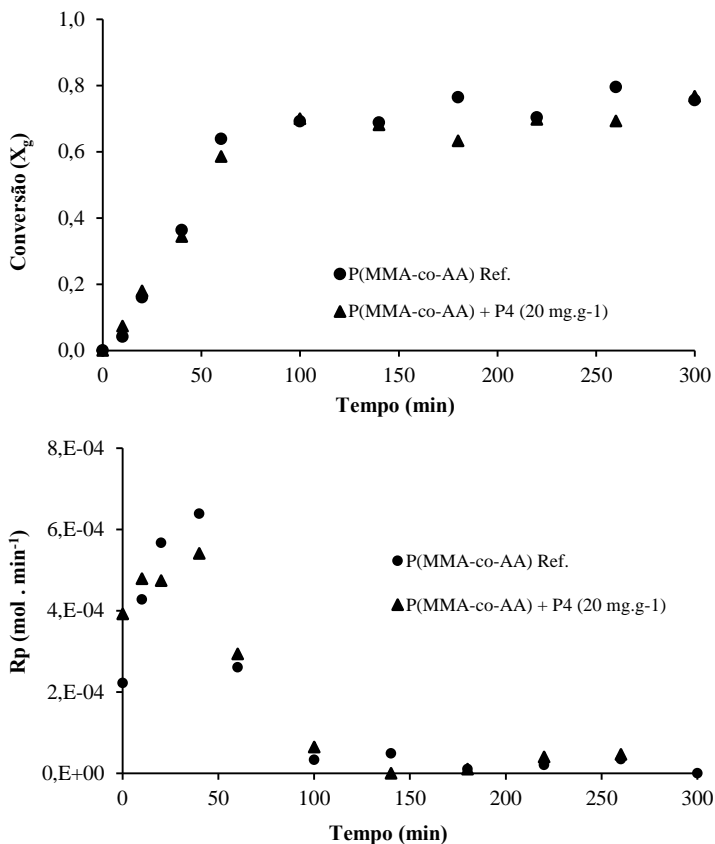
O aumento do teor de P4 para  $20 \text{ mg}_{P4} \cdot \text{g}_{\text{Latex}}^{-1}$  causou elevação no tamanho das partículas, cuja formulação com gotas de aproximadamente 260 nm produziu partículas com 404 nm (Figura 23). Neste caso, houve a estabilização do crescimento das partículas após 200 min de reação e o PDI ficou abaixo de 0,2 sem tendência de elevação.

**Figura 23** – Diâmetro médio (Dp) e índice de polidispersão (PDI) de nanopartículas de P(MMA-co-AA) referência (Ref.) e com 20 mg<sub>P4</sub>.g<sub>Látex</sub><sup>-1</sup>.



Amostras com e sem P4 apresentaram curvas de conversão gravimétrica e taxas de reação semelhantes (Figura 24). A eficiência de encapsulação foi de  $90,6 \pm 5,9$  % para amostras com  $12 \text{ mg}_{\text{P4}}.\text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  e  $60,2 \pm 6,9$  % para amostras com  $20 \text{ mg}_{\text{P4}}.\text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$ . Os valores foram compatíveis aos testes com o homopolímero PMMA apresentados no Cap. 4.

**Figura 24** – Conversão ( $X_g$ ) e taxa de reação ( $R_p$ ) durante a polimerização em miniemulsão para formação de nanoesferas de P(MMA-co-AA) com  $20 \text{ mg P}_4 \cdot \text{g Látex}^{-1}$ .



Os resultados indicam uma desaceleração da reação na presença da AA. A taxa de reação para o homopolímero PMMA apresentado no Cap. 4 alcançou  $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1}$ , enquanto as reações de copolimerização do P(MMA-co-AA) apresentaram máximos entre  $6$  e  $9 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1}$ . Essa redução na taxa pode ter refletido na conversão final do polímero que ficou entre  $75 - 85\%$ , inferior ao PMMA que em geral apresentou conversões acima de  $85\%$ . A diminuição da taxa de reação decorrente do aumento da concentração de monômeros carboxílicos em reações de copolimerização também foi observada por Araújo et al. (2006).

Reações com monômeros hidrofílicos como é o caso do AA, ficam suscetíveis à nucleação homogênea, onde as cadeias poliméricas são iniciadas a partir de oligômeros presentes na fase aquosa. A utilização de iniciador hidrofóbico (AIBN) em concentrações adequadas tende a reduzir esse fenômeno, elevando a migração de moléculas de AA solubilizadas na fase aquosa para os sítios de polimerização nas partículas. O efeito do iniciador foi verificado por Campos, Ferraz e Pinto (2016) em estudo de copolimerização em miniemulsão de MMA e AA, no qual estimaram que a incorporação de AA com iniciador hidrofóbico (BPO) chegou a 10% em mol, enquanto para reações com iniciador hidrofílico (KPS) foi de apenas 1%.

O fato das partículas produzidas serem monodispersas ( $PDI < 0,2$ ; Figura 20, 21 e 23) corrobora como indicativo da não ocorrência ou não relevância da nucleação na fase aquosa. Outro fator a colaborar na estabilidade do sistema é o potencial zeta, que ficou entre  $-40$  e  $-45$  mV, o que é favorável para repulsão eletrostática entre partículas.

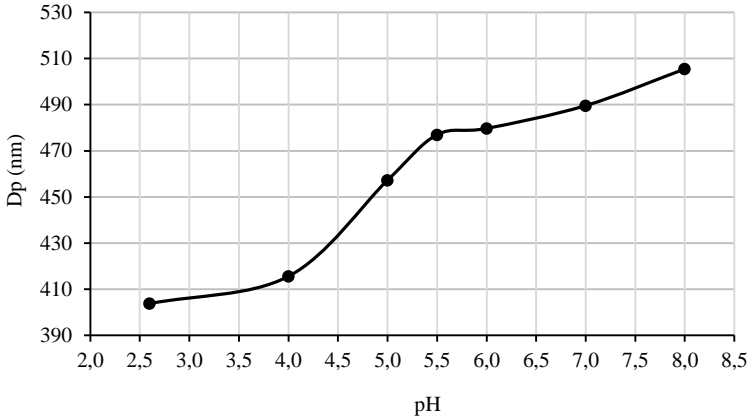
Em reações de copolimerização em estado estacionário é possível estimar teoricamente a composição do polímero por meio da cinética estabelecida no modelo terminal de copolimerização. Para um sistema com dois monômeros (MMA e AA), as razões de reatividade são definidas como  $r_I = K_{11}/K_{12}$  e  $r_{II} = K_{22}/K_{21}$ , onde  $K_{ij}$  é a constante cinética de reação (ODIAN, 2004). Sendo 1=MMA e 2 = AA, os valores de  $r$  obtidos da literatura a  $25$  °C para polimerização em massa são:  $r_I = 0,418$ ;  $r_{II} = 1,73$  (BRANDRUP; IMMERGUT; GRULKE, 2003).

Por meio da equação de copolimerização (ver Apêndice III), a incorporação teórica de AA no polímero seria de aproximadamente 25% (em cada 100 meros na cadeia polimérica, 25 seriam de AA). Considerando as concentrações de monômeros alimentadas, é uma estimativa relativamente alta e decorre da afinidade reativa entre monômero e comonômero. A razão de reatividade reflete a preferência entre homopolimerização e copolimerização. Sendo assim, temos neste caso  $r_I < 1$ , logo a reação do radical MMA\* ocorre preferencialmente com AA.

Conforme relatado anteriormente, o aumento do pH promove a neutralização de cargas ácidas do meio e, conseqüentemente, a ionização dos grupos carboxílicos elevando o tamanho das partículas devido ao aumento da camada filamentosa superficial causado pelas interações com moléculas de água (inchamento). Esse efeito pode ser observado na Figura 25, em testes realizados com a solubilização do látex (1:20) em tampões com diferentes pHs. O tamanho das partículas ao término da reação de síntese era de 404 nm em pH 2,6 e teve um aumento de

aproximadamente 100 nm com a elevação do pH até 8 em função da ionização dos grupos carboxílicos e inchamento das partículas.

**Figura 25** – Tamanho de partícula (Dp) de P(MMA-co-AA) com P4 ( $20 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$ ) em função do pH.



Deve-se salientar que o comportamento observado na Figura 25 é válido somente para as condições estabelecidas neste trabalho. Alterações no método de síntese e variações nas proporções de comonômeros podem produzir comportamentos distintos. Em estudo realizado por Barba et al. (2009) com copolimerização radicalar em massa de MMA e AA, variando teores entre monômeros de 25 a 75%, os autores identificaram relação linear proporcional entre pH de dissolução e intumescimento e proporção de monômero hidrofóbico (MMA). Enquanto o copolímero com 60% (v/v) de MMA dissolve em pH 6,2 e intumescer em pH 5,6, o copolímero com 75% de MMA não apresentou dissolução na faixa de pH de 4 a 8, apenas intumescimento em pH 6,5. Os autores não avaliaram o tamanho de partícula, pois realizaram o estudo com a adição do polímero em pó em solução tampão.

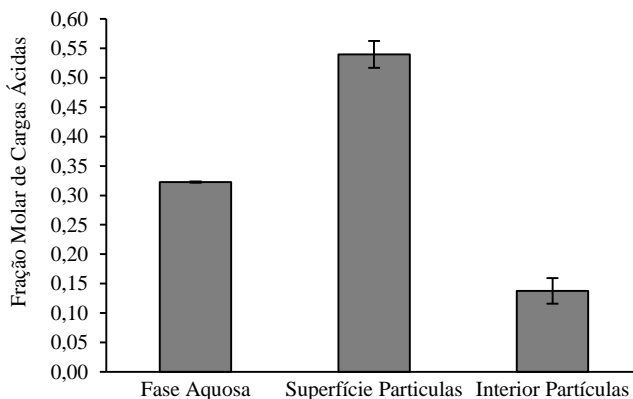
O comportamento de partículas frente às mudanças no pH é dependente da morfologia e estrutura das mesmas, as quais são determinadas no processo de síntese. Halacheva et al. (2014) sintetizou P(MMA-co-AA) (>27% AA em mol) por polimerização radicalar em massa e produziu micropartículas na faixa de 1 a 5  $\mu\text{m}$  por meio da técnica de evaporação do solvente. Os autores verificaram diminuição no tamanho das partículas com o aumento do pH de 6 a 10. Esse efeito foi atribuído à dissociação gradual de grandes partículas em agregados



menores, decorrentes da ionização de grupos COOH e enfraquecimento de ligações hidrofóbicas, aumentando, portanto, a solvatação das partículas. Tal comportamento difere do observado na Figura 25 em virtude da síntese de partículas em miniemulsão, em baixo pH (previne intumescimento) e com concentração relativamente baixa de AA e de sólidos (previne dissociação das partículas com aumento do pH e formação de gel). Neste caso, ocorreu polimerização das nanogotas em meio aquoso, estabilizadas pelo emulsificante não iônico, com a maior concentração do comonômero hidrofílico (AA) na camada externa das partículas.

A confirmação da presença de grupos carboxílicos na superfície das partículas e conseqüentemente a incorporação de AA no copolímero foi realizada por meio de titulação potenciométrica e condutimétrica, cujos resultados e cálculos são apresentados no Apêndice IV. Na Figura 26 são apresentados os resultados da fração de cargas ácidas distribuídas na fase aquosa, superfície e interior das partículas (amostras sem fármaco).

**Figura 26** – Fração de cargas ácidas tituladas em látex de P(MMA-co-AA).



Devido à hidrofilicidade do AA, é esperado encontrar grupos ácidos distribuídos entre a fase aquosa e polimérica, especialmente na superfície das partículas. Desta forma, o látex foi diluído e centrifugado para separação destas fases. A centrifugação foi suficiente para obtenção de sobrenadante límpido, o qual foi titulado com NaOH e revelou fração molar ácida de  $0,323 \pm 0,001$ , significando que do total de mols de AA adicionados à formulação, aproximadamente 32% estão solúveis na fase aquosa, seja na forma monomérica ou ligada a oligômeros que não

precipitaram durante a centrifugação. Deve-se considerar também, que o ácido acrílico é um ácido fraco, por isso, estima-se que aproximadamente 4,3% do  $H^+$  presente no meio aquoso pode ser decorrente da constante de ionização (cálculos no Apêndice IV), podendo ter sido dissociado das camadas mais externas das partículas (pontas filamentosas) durante a solubilização do látex em água deionizada.

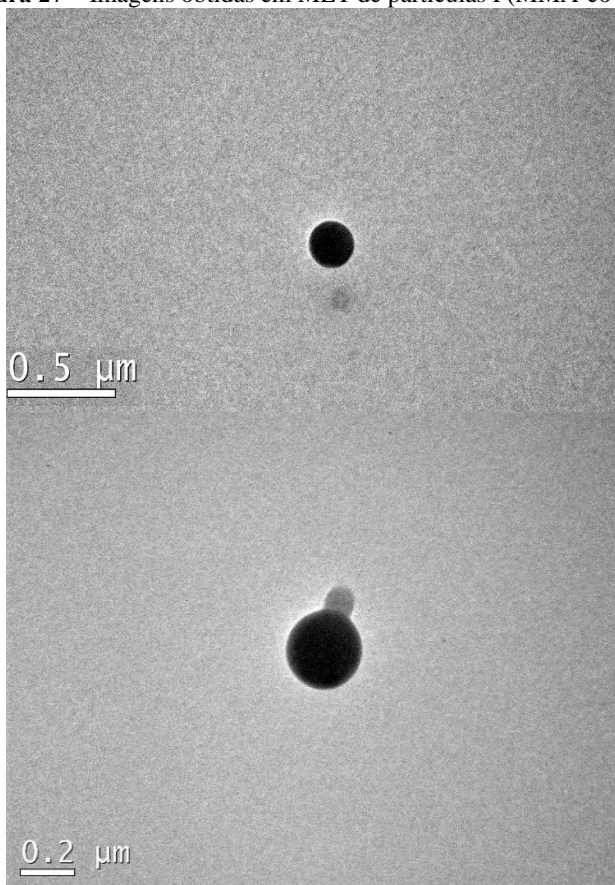
A fase polimérica foi ressuspensa em solução básica e após atingir o equilíbrio, os íons  $OH^-$  remanescentes foram titulados. A solução foi preparada com NaCl para aumentar a força iônica do meio e o potencial de ionização. Com base nos íons  $OH^-$  adicionados e titulados, foi estimado a fração de  $H^+$  presente na fase polimérica exposta ao meio aquoso, cujo valor foi  $0,540 \pm 0,023$ .

Desta forma, considerando que todo AA adicionado à formulação se manteve no látex, seja no meio aquoso ou incorporado ao copolímero, estimou-se por diferença, a fração de  $H^+$  no interior das nanopartículas, em áreas não expostas, por isso não titulado. Essa fração foi de  $0,138 \pm 0,022$ , logo, a fração molar total de AA estimado nas partículas poliméricas em relação à quantidade adicionada é de  $0,677 \pm 0,001$  (AA superficial + no interior das partículas). Considerando que a composição monomérica de alimentação continha 13,4% de AA (em mol), a quantidade incorporada foi de aproximadamente 9%, valor compatível com os resultados obtidos com iniciador hidrofóbico por Campos, Ferraz e Pinto (2016).

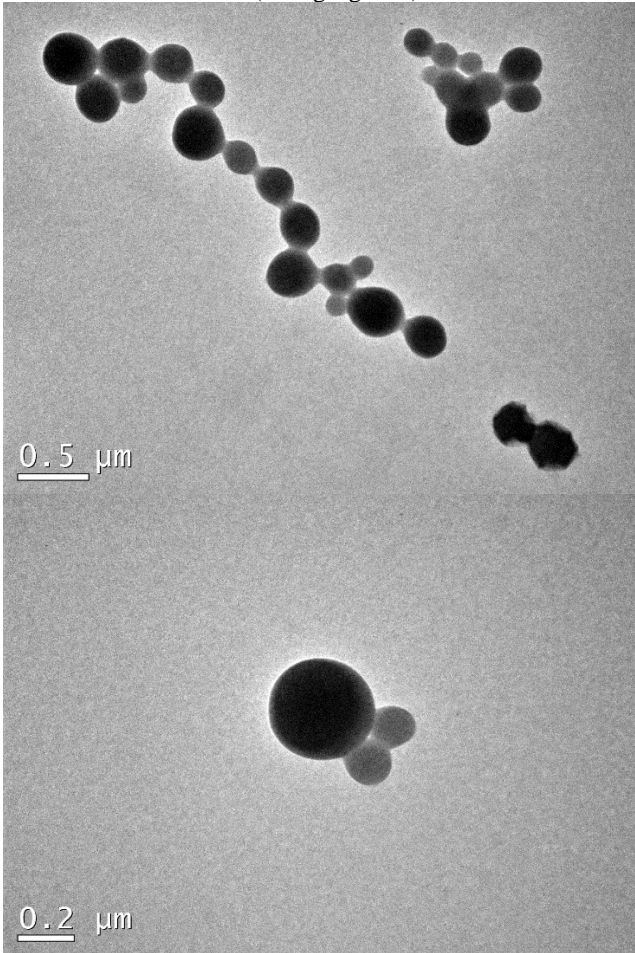
A elevada fração de COOH obtida na superfície das partículas está de acordo com estudo realizado por Araújo et al. (2006), no qual observou que em reações de copolimerização de acetato de vinila e acrilato de butila com monômeros carboxílicos AA e MAA, partículas com AA apresentaram maior concentração de grupos COOH na superfície, enquanto no copolímero de MAA havia maior fração de grupos enterrados.

Na Figura 27 são apresentadas micrografias das partículas de P(MMA-co-AA) obtidas em MET. As partículas apresentaram morfologia típica de nanoesferas, com aspecto homogêneo e sólido. Na Figura 28 são apresentadas micrografias de partículas com P4. É possível observar que partículas menos densas tendem a formar aglomerados devido à intensidade do feixe de elétrons. Esse fenômeno é comum na análise de nanopartículas poliméricas e lipídicas em microscopia eletrônica de transmissão. Não foi possível identificar alterações na morfologia das partículas quando comparadas amostras com e sem P4.

**Figura 27** – Imagens obtidas em MET de partículas P(MMA-co-AA).

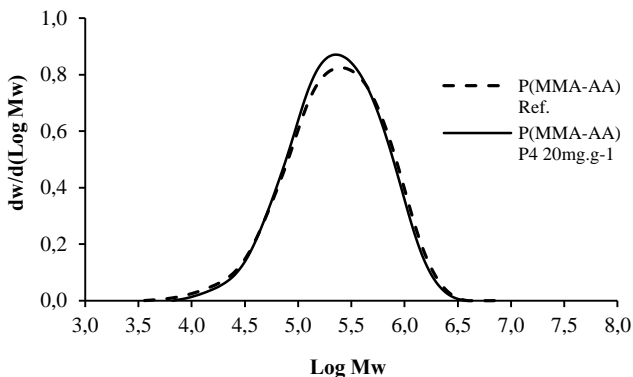


**Figura 28** – Imagens obtidas em MET de partículas P(MMA-co-AA) com P4 ( $20 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$ ).



Na análise de massa molar, a amostra referência apresentou  $M_w$  de 373,3 kDa e  $M_n$  de 122,0 kDa. Os valores foram próximos às amostras com  $20 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$ , que apresentaram  $M_w$  de 354,6 kDa e  $M_n$  de 132,4 kDa. Sendo assim, não houve influência do fármaco no crescimento da cadeia polimérica, o que é confirmado na análise da distribuição de massa molar apresentada na Figura 29.

**Figura 29** – Distribuição da massa molar em nanopartículas de P(MMA-co-AA) com P4.



Comparado aos dados do homopolímero PMMA apresentados na Tabela 18, verificou-se que o copolímero apresentou menor massa molar, provavelmente devido à inclusão de meros AA nas cadeias poliméricas, que possuem menor massa molar, mas também pode ser decorrente da dificuldade de desorção dos radicais para o meio aquoso devido a camada filamentosa na superfície das partículas, aumentando a probabilidade de terminação radical e impedindo o crescimento das cadeias, conforme relatado por Peixoto (2013).

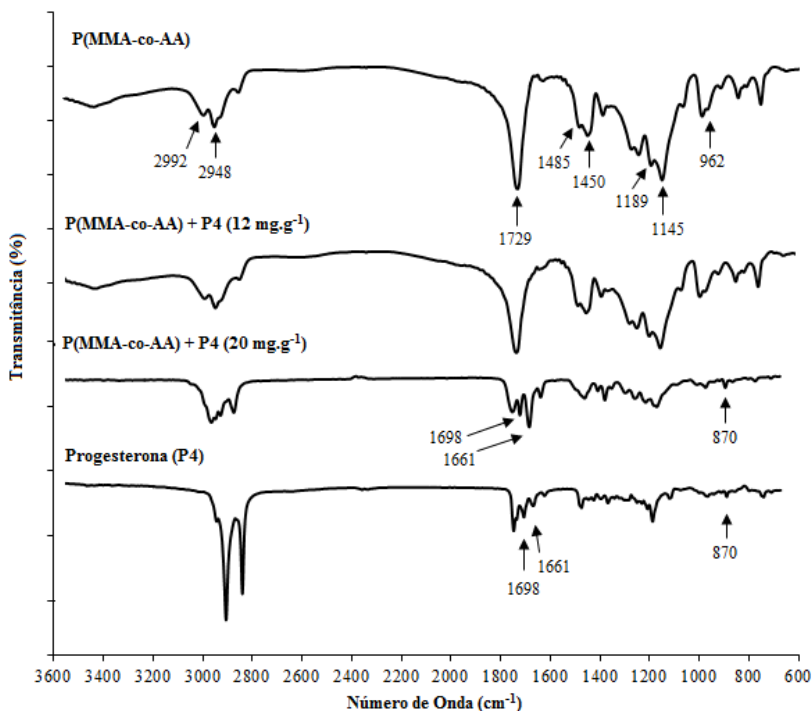
Foram realizadas análises em FTIR para verificação das interações da matriz que compõe as nanopartículas com o fármaco encapsulado. As cadeias poliméricas de P(MMA-co-AA) possuem grupos hidroxila e redução proporcional de grupos metilas se comparado ao homopolímero PMMA. Contudo, conforme observado na Figura 30, ambos apresentam estiramento nas ligações  $-C-H$ ,  $-C-CH_3$  e  $-C-CH_3$  ( $3000 - 2800\text{ cm}^{-1}$ ) (STUART, 2004). Outras bandas comuns no PMMA também estão presentes no P(MMA-co-AA), como é o caso da absorção pronunciada em  $1729\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento nas ligações  $-C=O$ ; deformação das ligações  $-CH_2$  ( $1485$ ;  $1145\text{ cm}^{-1}$ ), ligações  $-O-CH_3$  ( $1450 - 1434\text{ cm}^{-1}$ ), ligações  $-C-CH_3$  ( $1382$ ;  $962\text{ cm}^{-1}$ ), ligações  $-C-O-C$  ( $1189\text{ cm}^{-1}$ ) e estiramento de  $-C-C-O-$  ( $1265 - 1238\text{ cm}^{-1}$ ) (STUART, 2004).

Por meio da análise do FTIR de partículas com P4, verifica-se que o espectro de infravermelho não é alterado com a incorporação de P4 na concentração de  $12\text{ mg}_{P4}.\text{g}_{L\acute{a}t\text{e}x}^{-1}$ . Não há sinais de ocorrência de interações químicas entre fármaco e polímero. A ausência de bandas referente ao fármaco indica sua completa dispersão na matriz que compõe

as partículas (ELSAID ALI; TAHER; MOHAMED, 2013; BUTANI; YEWALE; MISRA, 2016; PUCEK; LEWIŃSKAB; WILKA, 2016). Esse resultado foi confirmado com a análise da mistura física de NS P(MMA-co-AA) Ref. com 6% de P4, que representa a proporção de P4 em sólidos na formulação com  $12 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$ . Os resultados da análise são apresentados no Apêndice II (Figura 50) e as bandas referentes a P4 são detectadas na mistura física nesta proporção.

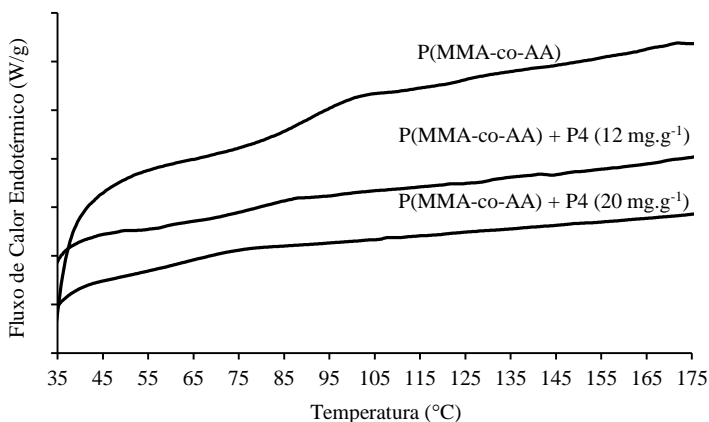
Com  $20 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  há diminuição da intensidade de absorção de bandas relativas ao polímero e o aparecimento de bandas referentes à P4 ( $1698$ ,  $1661$  e  $870 \text{ cm}^{-1}$ ). Neste nível de concentração, o fármaco altera o espectro de absorção das partículas. Conforme verificado na análise de FTIR do PMMA, apresentada no Cap. 4, essa alteração no espectro devido ao fármaco só foi observada em  $36 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$ . Possivelmente, por possuir maior número de grupos metilas, o PMMA confere maior hidrofobicidade às partículas, favorecendo a solubilização da P4.

**Figura 30** – FTIR de nanopartículas de P(MMA-co-AA) e P4.



Para verificar os efeitos da progesterona na estrutura do polímero, especialmente na temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), foram realizadas análises de DSC, as quais são apresentadas na Figura 31.

**Figura 31** – DSC de nanopartículas de P(MMA-co-AA) com P4.



Na faixa de temperatura entre 35 e 175°C, visualiza-se um único evento endotérmico característico da transição vítrea. A amostra de partículas referência analisada apresentou  $T_g$  estimada em 85°C. De modo semelhante ao que ocorre com PMMA (Figura 16b), o fármaco promove a diminuição da  $T_g$  das nanopartículas de P(MMA-co-AA). Com 12 mg<sub>P4.g<sub>Látex</sub></sub><sup>-1</sup> de P4 a  $T_g$  estimada foi de 75°C e com 20 mg<sub>P4.g<sub>Látex</sub></sub><sup>-1</sup> foi reduzida para 64°C.

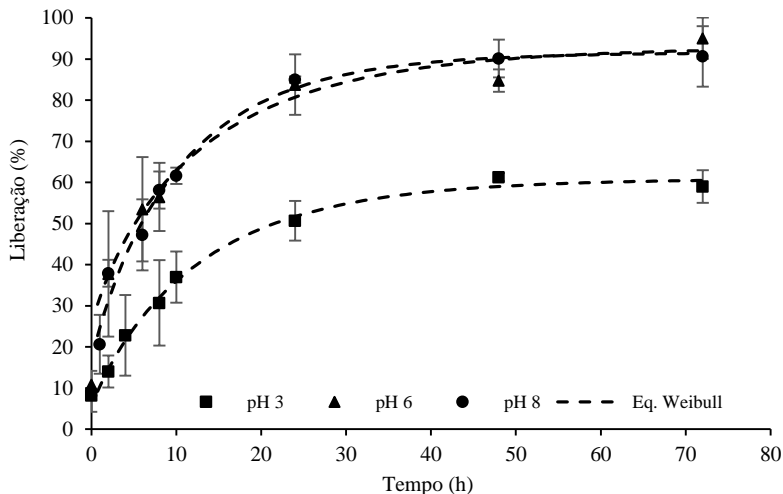
### 5.3.2 Liberação *In Vitro*

Testes de liberação *in vitro* de P4 encapsulada em P(MMA-co-AA) foram realizados em diferentes pHs. O meio foi composto de tampão preparado em solução de SDS 5%, onde a P4 apresentou solubilidade estimada em 9,6 mg.mL<sup>-1</sup>, considerada elevada e suficiente para garantir a condição “*sink*” do sistema.

Os perfis de liberação são apresentados na Figura 32. Com a solubilização do látex no meio de liberação, a P4 fracamente adsorvida na superfície das partículas foi prontamente liberada. As amostras nos pHs 3; 6 e 8 apresentaram, respectivamente, valores iniciais de liberação de 8; 11 e 9%. O cálculo da fração liberada considera a P4 não

encapsulada, a qual foi estimada por meio da eficiência de encapsulação da amostra utilizada nos testes.

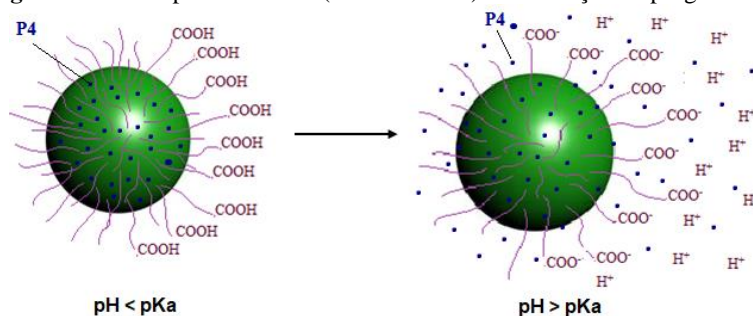
**Figura 32** – Liberação *in vitro* da P4 encapsulada em nanopartículas de P(MMA-co-AA) (12 mg<sub>P4</sub>.g<sub>látex</sub>).



A liberação em pH 6 e 8 ocorreu de forma mais rápida se comparado ao pH 3. Em 24 horas de teste, as amostras em pH 6 e 8 já haviam liberado 85% da P4 encapsulada, enquanto a amostra em pH 3 havia liberado aproximadamente 50%. Conforme discutido anteriormente, acima do  $pK_a$  do polímero ( $\sim 4,5$ ) começa a ocorrer a ionização dos grupos carboxílicos presentes nas cadeias poliméricas, causando o inchamento das partículas devido a interação com a água e outras moléculas hidrofílicas presentes no meio. Como a fase aquosa é rica em SDS, a P4 é liberada mais facilmente das partículas (Figura 33) (HOLZAPFEL et al., 2005; DAI; RAVI; TAM, 2008).



**Figura 33** – Nanopartículas de P(MMA-co-AA) e a liberação de progesterona.



Os modelos de Weibull e Lei de Potência foram aplicados aos dados de liberação, os coeficientes são apresentados na Tabela 20. Conforme já discutido no item 4.3.3, na Lei de Potência  $n$  é o expoente que caracteriza o mecanismo de liberação. Esse modelo é válido para tempos relativamente curtos, por isso foi aplicado aos dados iniciais em até 60% (normalizados) da curva de liberação (KOSMIDIS et al., 2003a; PAPADOPOULOU et al., 2006). A qualidade do ajuste para este modelo não foi satisfatória ( $R^2_{\text{adj}} < 0,95$ ), por isso não é possível concluir sobre o mecanismo de liberação apenas por meio análise de  $n$ . Os desvios nos resultados, inerentes aos testes de liberação em suspensão, podem dificultar a aplicação precisa de modelos e elevar o erro associado a cada parâmetro estimado.

**Tabela 20** - Coeficientes obtidos na aplicação das equações Lei de Potência e Weibull aos dados de liberação de P4 em P(MMA-co-AA).

Equação Lei de Potência: $y(t) = kt^n$			
Coeficientes	pH 3	pH 6	pH 8
	Valor (erro)	Valor (erro)	Valor (erro)
k	11,691 (2,534)	29,479 (4,872)	24,591 (4,298)
n	0,468 (0,082)	0,326 (0,064)	0,400 (0,089)
$R^2_{\text{adj}}$	0,917	0,944	0,918

Equação Weibull: $y(t) = A - (A - B)\text{Exp}(-at^b)$			
Coeficientes	pH 3	pH 6	pH 8
	Valor (erro)	Valor (erro)	Valor (erro)
A	60,861 (2,376)	92,933 (6,857)	91,558 (4,100)
B	5,371 (7,337)	24,442 (20,598)	16,619 (10,397)
b	0,921 (0,251)	0,845 (0,495)	0,922 (0,327)
a	0,078 (0,012)	0,079 (0,032)	0,096 (0,018)
$R^2_{\text{adj}}$	0,987	0,952	0,970

A correlação do mecanismo de liberação com o modelo de Weibull, por meio do expoente  $b$ , já abordada no item 4.3.3 do Cap. 4, é aplicada também neste caso. Os valores são apresentados na Tabela 20 ficaram entre 0,845 e 0,922, portanto, mecanismos combinados estão presentes na liberação (intumescimento/difusão).

Polímeros com sítios hidrofílicos e baixa cristalinidade, como é o caso do P(MMA-co-AA), são mais susceptíveis ao intumescimento. Liberações que ocorrem inteiramente por esse processo são de ordem zero, possuindo taxas independentes do tempo. Neste caso, o processo seria controlado pela absorção do meio de liberação (geralmente água), que causa o inchamento do sistema. No caso do P(MMA-co-AA), esse processo pode ser relevante, pois grupos de ácido carboxílico e carbonila presentes no polímero, além da baixa cristalinidade, favorecem ligações de hidrogênio com a água e o relaxamento das macromoléculas, podendo levar ao inchamento da partícula e consequentemente liberação do fármaco.

## 5.4 CONCLUSÕES

Partículas de P(MMA-co-AA) produzidas por polimerização em miniemulsão apresentaram tamanho entre 200-300 nm com  $12 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  de progesterona. O aumento do teor de progesterona para  $20 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  causou elevação no tamanho, atingindo aproximadamente 400 nm. Em todos os casos o tamanho de partículas ( $t = 280 \text{ min}$ ) foi maior que o tamanho de gotas ( $t = 0 \text{ min}$ ), essa elevação está associada possivelmente às interações de grupos carboxílicos com água e outros sítios hidrofílicos presentes no meio. Amostras com e sem progesterona apresentaram curvas de conversão gravimétrica semelhantes, com índices de conversão próximos a 80%. Verificou-se na análise titulométrica do látex que aproximadamente 32% das cargas ácidas decorrentes do AA estão na fase aquosa, 54% estão aderidas à superfície das partículas e 14% estão sob a forma não exposta no interior das partículas.

A eficiência de encapsulação foi de  $90,6 \pm 5,9 \%$  para amostras com  $12 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  de progesterona e de  $60,2 \pm 6,9 \%$  para amostras com  $20 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$ . O fármaco não influenciou a distribuição de massa molar. As amostras referência apresentaram  $M_w$  de 373,3 kDa, semelhante às amostras com  $20 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  de progesterona, cujo valor foi 354,6 kDa.

A progesterona atua como plastificante em P(MMA-co-AA), porém de modo mais intenso se comparado ao PMMA. A  $T_g$  das nanopartículas referência estimada em  $85^\circ\text{C}$  foi reduzida para  $64^\circ\text{C}$  com

20  $\text{mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  de fármaco. Na análise em FTIR, a formulação com 20  $\text{mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  apresentou bandas referentes à progesterona. Neste caso, uma fração da P4 pode não estar completamente encapsulada no interior das partículas.

A liberação *in vitro* ocorreu de forma mais rápida em pH 6 e 8 se comparado ao pH 3, possivelmente devido à ionização dos grupos carboxílicos e inchamento das partículas. Em 24 horas de teste, as amostras em pH 6 e 8 já haviam liberado 85% da progesterona encapsulada, enquanto a amostra em pH 3 havia liberado aproximadamente 50%. A presença do processo de intumescimento na liberação foi confirmada com a aplicação da equação de Weibull aos dados, cujos coeficientes indicaram mecanismos combinados de transporte (intumescimento e difusão).



## **6 OBTENÇÃO DE MICROEMULSÃO COM TENSOATIVO NÃO IÔNICO PARA LIBERAÇÃO DE PROGESTERONA**

### **6.1 INTRODUÇÃO**

Microemulsões apresentam potencial para liberação de fármacos nas diferentes vias, seja transdérmica ou parenteral. Esses sistemas podem apresentar elevada solubilidade para fármacos hidrofóbicos, baixa viscosidade e alta estabilidade, o que os torna atrativos para administração intramuscular e subcutânea. Contudo, para formulações injetáveis o número de excipientes torna-se mais restrito, sendo um desafio aliar as potencialidades da microemulsão com componentes de baixa toxicidade. A progesterona com forma idêntica à natural é de difícil solubilização em formulações aquosas. Quando incorporada em óleo, a aplicação pode ser dificultada devido à viscosidade e o perfil de liberação pode não ser sustentado. Considerando o exposto, esta etapa do trabalho teve por objetivo obter e caracterizar microemulsão com tensoativo não iônico, com elevada solubilidade para progesterona, além avaliar o perfil de permeação deste fármaco em célula de difusão.

### **6.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **6.2.1 Materiais**

Crodamol GTCC® (triglicerídeos de cadeia média composto de ácidos cáprico e caprílico), adquirido da Alpha Química foi utilizado como fase oleosa. Progesterona (> 99%), Polisorbato 80 (Tween 80®), 1-butanol, dodecil sulfato de sódio (SDS, ≥ 99%) adquiridos da Sigma-Aldrich. Água deionizada foi utilizada nas formulações.

#### **6.2.2 Preparo da Microemulsão**

A microemulsão foi preparada pelo método titulométrico de água conforme Chen et al. (2004). O óleo, tensoativo e cotensoativo foram misturados e homogeneizados com agitação magnética por 5 minutos. Água foi adicionada à fase orgânica por meio de titulação conforme proporção estabelecida no diagrama ternário. A mistura foi mantida em agitação magnética por 20 minutos à temperatura ambiente (24°C).

Posteriormente, foi deixada em repouso para atingir o equilíbrio e avaliada quanto à formação de microemulsão, emulsão ou gel. A caracterização desses sistemas foi feita visualmente, observando aspectos como transparência/translucidez, opacidade, separação de fases e formação de gel (formulações que não apresentam mudanças no menisco com inclinação a um ângulo de 90°), além de leituras espectrofotométricas para medidas de transmitância em 520, 600 e 700 nm e observações em microscópio de luz polarizada se necessário. Foram consideradas microemulsões as formulações que apresentaram translucidez (visual e transmitância média acima de 90%), fluidez e que não apresentaram separação de fases.

### **6.2.3 Construção do Diagrama de Fases**

O diagrama de fases pseudoternário (óleo, tensoativos e água) foi construído conforme as proporções estabelecidas na Tabela 21, considerando massa total de 4 g para cada amostra. Em todas as formulações o tensoativo corresponde à mistura Tween 80/1-butanol na proporção 2:1. Inicialmente foram avaliadas as formulações de 1 a 36 com limites de 10 a 80% de cada componente para identificação da região de formação de microemulsão no diagrama. Com base nos dos resultados obtidos nesta primeira etapa, foram adicionadas mais 10 formulações (37 a 46) para melhor delimitação da região de fronteira entre microemulsão e emulsão.

### **6.2.4 Incorporação de Progesterona na Microemulsão**

A incorporação da progesterona foi avaliada em formulações selecionadas de microemulsão. Fármaco foi adicionado à fase orgânica, o frasco foi vedado e a mistura submetida à agitação magnética intensa por 30 minutos em temperatura ambiente (24°C). O restante do procedimento de preparo e caracterização da microemulsão seguiu conforme descrito anteriormente (6.2.2). Após 24 horas de repouso a amostra foi caracterizada novamente e verificado a ocorrência de precipitado ou separação se fases. Amostras com quantidades crescentes de progesterona foram avaliadas até identificação do ponto de saturação (formação de precipitado).

**Tabela 21** – Formulações avaliadas para construção do diagrama de fases pseudoternário: proporções mássicas entre os componentes.

FO*	Óleo**	Tensoativo***	Água	FO	Óleo	Tensoativo	Água
1	0,10	0,80	0,10	24	0,30	0,20	0,50
2	0,10	0,70	0,20	25	0,40	0,20	0,40
3	0,20	0,70	0,10	26	0,50	0,20	0,30
4	0,10	0,60	0,30	27	0,60	0,20	0,20
5	0,20	0,60	0,20	28	0,70	0,20	0,10
6	0,30	0,60	0,10	29	0,10	0,10	0,80
7	0,10	0,50	0,40	30	0,20	0,10	0,70
8	0,20	0,50	0,30	31	0,30	0,10	0,60
9	0,30	0,50	0,20	32	0,40	0,10	0,50
10	0,40	0,50	0,10	33	0,50	0,10	0,40
11	0,10	0,40	0,50	34	0,60	0,10	0,30
12	0,20	0,40	0,40	35	0,70	0,10	0,20
13	0,30	0,40	0,30	36	0,80	0,10	0,10
14	0,40	0,40	0,20	37	0,05	0,45	0,50
15	0,50	0,40	0,10	38	0,10	0,45	0,45
16	0,10	0,30	0,60	39	0,15	0,45	0,40
17	0,20	0,30	0,50	40	0,20	0,45	0,35
18	0,30	0,30	0,40	41	0,25	0,45	0,30
19	0,40	0,30	0,30	42	0,25	0,50	0,25
20	0,50	0,30	0,20	43	0,25	0,55	0,20
21	0,60	0,30	0,10	44	0,30	0,55	0,15
22	0,10	0,20	0,70	45	0,35	0,60	0,05
23	0,20	0,20	0,60	46	0,35	0,55	0,10

\*FO: formulação; \*\*Óleo: Crodamol GTCC®; \*\*\*Tensoativo: mistura de Tween 80®/1-butanol (2:1).

## 6.2.5 Caracterização

### 6.2.5.1 Determinação de pH e condutividade

A condutividade elétrica da microemulsão e dos componentes da formulação (água, Crodamol e mistura tensoativo/cotensoativo) foi

medida em equipamento Gehaka CG 1800. O pH foi medido em equipamento MS Tecnoyon mPA210. Ambas as leituras foram realizadas em temperatura ambiente (24°C). Estes parâmetros foram determinados em todas as formulações do diagrama.

Os dados de condutividade foram analisados com planejamento de mistura utilizando delineamento axial (CORNELL, 2002) com as composições apresentadas na Tabela 21. Os pontos no interior do espaço simplex são equidistantes (variações de 0,1 para componentes originais no intervalo de 0,1 a 0,8), exceto para as formulações 37 a 46, que foram acrescentadas para investigar a região de fronteira da microemulsão. A análise considerou as seguintes restrições nas formulações:  $0,1 \leq O \leq 0,8$ ;  $0,1 \leq T \leq 0,8$ ;  $0,1 \leq A \leq 0,8$ . Onde O, T e A representam, respectivamente, as frações mássicas dos componentes óleo, tensoativo e água. Das 46 formulações apresentadas na Tabela 21, 44 foram analisadas. As formulações 37 e 45 não atendem a restrição estabelecida, por isso não foram consideradas. As frações originais dos componentes (0,1 a 0,8) foram codificadas em intervalos de 0 a 1 (pseudocomponentes), por meio da relação apresentada na Equação (21).

$$x_i^* = \frac{x_i - L_I}{\sum x_i - \sum L_I} \quad (21)$$

Onde:

$x_i^*$  = fração do pseudocomponente i ( $0 \leq x_i^* \leq 1$ );

$x_i$  = fração do componente original i ( $0,1 \leq x_i \leq 0,8$ );

$L_I$  = restrição inferior para o componente i ( $0,1$ );

$\sum x_i$  = soma das frações da mistura ( $1$ );

$\sum L_I$  = soma das restrições inferiores de todos os componentes ( $0,3$ ).

A análise dos resultados foi realizada no programa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., 2004) por meio de modelos de regressão (linear, quadrático, cúbico especial e cúbico completo). Análise de variância (ANOVA) foi aplicada para verificação da adequação dos modelos e significância dos coeficientes com intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).



### 6.2.5.2 Análise da Distribuição de Tamanho

O diâmetro das gotas foi determinado em amostras selecionadas por Dispersão Dinâmica de Luz (*Dynamic light scattering* – DLS) utilizando instrumento Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Antes das leituras, as amostras foram filtradas em filtro com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$ . O índice de polidispersão (PDI) foi utilizado como medida da homogeneidade e distribuição do tamanho das gotas. Cada medida foi realizada em triplicata.

### 6.2.5.3 Reologia e Viscosidade

Reômetro HAAKE MARS, equipado com programa MARS II, foi utilizado para avaliar as propriedades reológicas de amostras selecionadas de microemulsão. As análises foram realizadas com 5,5 mL de amostra. A taxa de cisalhamento aplicada foi de 0 a 600  $\text{s}^{-1}$ . As medidas foram realizadas em temperaturas de  $20 \pm 0,5$  e  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . O comportamento reológico foi avaliado pela relação entre tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) e taxa de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ). Sistemas que mostraram proporcionalidade entre estes parâmetros ( $R^2 \geq 0,99$ ) foram considerados fluidos Newtonianos e tiveram a viscosidade ( $\eta$ ) determinada.

## 6.2.6 Estudo de Permeação *In Vitro*

Os experimentos de liberação *in vitro* foram adaptados de Ren et al. (2012) e conduzidos em células de difusão tipo Franz com área superficial de 1,65  $\text{cm}^2$ . O compartimento receptor foi preenchido completamente (13 mL) com solução de SDS 5% e conectado em banho termostático com temperatura de  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . A solução receptora foi mantida em agitação utilizando barra magnética. O compartimento doador foi carregado com 2 mL de amostra e separado do meio receptor por membrana de celulose (Axiva Cat. No. 160047GXI; 0,45  $\mu\text{m}$ ). Antes da montagem da célula, a membrana permaneceu por 20 min imersa no meio de liberação.

Alíquotas de 0,5 mL foram retiradas em tempos predeterminados e volume igual de SDS 5% foi adicionado ao compartimento receptor após cada amostragem, mantendo a condição *sink* do sistema. As amostras foram diluídas e analisadas em espectrofotômetro UV-Vis a 253 nm. A concentração de progesterona foi calculada por meio de curva de calibração (Apêndice I). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os dados de liberação foram tratados com regressão não linear no programa OriginPro 8 SPR (OriginLab Corporation, 2007) com modelos cinéticos de Higuchi e Lei de Potência, já mencionado no capítulo 4, definidos pelas Equações (18) e (19) (HIGUCHI, 1961; SIEPMANN; PEPPAS, 2012). Contudo, neste caso  $y(t)$  é substituído por  $m(t)$ , que expressa a massa acumulada que passa por unidade de área da membrana ( $\text{mg.cm}^{-2}$ ) em função do tempo ( $t$ ).

O sistema experimental emprega uma membrana separando dois compartimentos e assume que o gradiente de concentração entre eles opera em condições *sink*, ou seja, a concentração no compartimento doador é muito maior que no compartimento receptor. Medindo a massa acumulada de fármaco ( $m$ ) que passa por unidade de área da membrana em função do tempo, pode-se obter em estado estacionário a região linear da curva, cuja inclinação corresponde à constante de fluxo  $J$ , definido a partir da primeira lei de Fick, conforme Equação (22) (AULTON, 2005).

$$\frac{dm}{dt} = J = \frac{D * C_o * K}{h} \quad (22)$$

Onde:

$D$ : coeficiente de difusão;

$C_o$ : constante de concentração do fármaco na solução doadora;

$K$ : coeficiente de partição entre as soluções nas interfaces da membrana;

$h$ : espessura da membrana.

Muitas vezes não é possível separar os valores de  $D$  e  $K$ , e a determinação de  $h$  pode não ser precisa devido à tortuosidade dos canais presentes na membrana. Desta forma, define-se o coeficiente de permeabilidade  $K_p$ , expresso pela Equação (23).

$$K_p = \frac{D * K}{h} \quad (23)$$

Sendo assim, a constante de fluxo  $J$  pode ser simplificada conforme a Equação (24).

$$J = K_p * C_o \quad (24)$$

## 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.3.1 Diagrama de Fases Pseudoternário

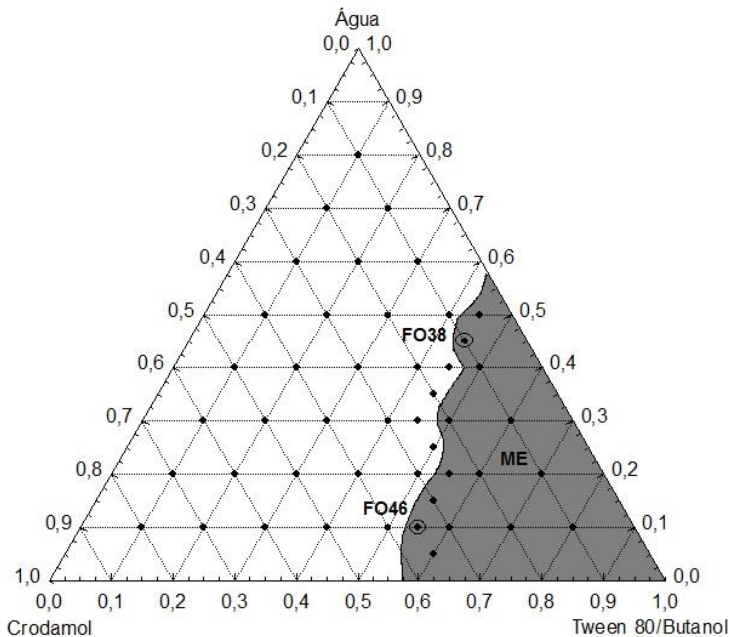
Neste estudo, formulações de microemulsão foram avaliadas como alternativa para a solubilização e liberação de P4. Sistemas para uso parenteral devem utilizar somente componentes biocompatíveis, injetáveis, esterilizáveis, não pirogênicos, não irritantes para os nervos e não hemolítico (DATE; NAGARSENKER, 2008a). Sendo assim, o sistema avaliado possui como fase oleosa um triglicerídeo de cadeia média (Crodamol GTCC) e como tensoativo não iônico o polisorbato 80 (Tween 80), ambos apropriados para formulações farmacêuticas de uso parenteral, por apresentarem boa compatibilidade e baixa toxicidade (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009a). O Polisorbato 80 é considerado seguro para uso parenteral pela FDA (*U. S. Food and Drug Administration*), licenciado para medicamentos parenteral no Reino Unido e está na lista de ingredientes aceitáveis do Canadá (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009b).

Devido à necessidade de cotensoativo para formação da microemulsão, este trabalho avaliou o uso de butanol por se tratar de um álcool de cadeia média e em geral ampliar a área de formação de microemulsão se comparado com alcoóis de cadeias menores, como o etanol (HO; HSIAO; SHEU, 1996; NANDI; BARI; JOSHI, 2003). Formulações de microemulsão contendo butanol e destinadas ao uso parental podem ser encontradas nos trabalhos de Nornoo; Osborne e Chow (2008) e Nornoo e Chow (2008). De acordo com o FDA, butanol é considerado um solvente de menor toxicidade e risco à saúde humana (Classe 3), estando na mesma classe do etanol. Essa categoria engloba solventes que não apresentam riscos significativos quando utilizados em produtos farmacêuticos em níveis aceitáveis (U.S.FDA, 2012). O uso de etanol é mais comum em formulações injetáveis. Apesar de alguns produtos conterem até 50% de etanol na composição, o uso de concentrações elevadas pode provocar dor no local da injeção intramuscular e degeneração de nervos se for aplicada próxima a este (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009c).

O diagrama de fase pseudoternário (Figura 34) foi elaborado seguindo as composições da Tabela 21 acrescidas de pontos na região de interface entre emulsão/microemulsão para melhor delimitação. Por meio do diagrama verificou-se a possibilidade de obtenção de microemulsões com uma ampla faixa de variação entre os componentes (região demarcada com cor). Sendo possível utilizar até 40% de fase oleosa ou

até 50% de água. O teor mínimo necessário de Tween80/1-butanol encontra-se próximo a 45%.

**Figura 34** – Diagrama de fase pseudoternário para o sistema água, Crodamol e Tween 80/1-butanol (2:1) indicando a região de formação de microemulsão (ME) e escolha das formulações de trabalho (FO38 e FO46).



A ampla região do diagrama não demarcada formou emulsões homogêneas opacas com diferentes níveis de viscosidade ou sistemas bi e trifásicos que não eram de interesse neste trabalho. Todas as formulações obtidas na região de microemulsão apresentaram transmitância média (520, 600 e 700 nm) acima de 90% e transmitância em 700 nm acima de 95%.

A adição de água na fase orgânica previamente preparada com Tween 80, butanol e Crodamol, formou microemulsão após poucos minutos de agitação, não sendo necessário solubilizar o Tween 80 em água conforme descrito para outros sistemas que utilizam esse tensoativo na formulação (CHEN et al., 2004)

Dentre as formulações obtidas com características de microemulsão, foram selecionadas duas para realização de testes de incorporação da progesterona e caracterização. Para a escolha das

formulações de trabalho, priorizaram-se as que possuem os menores teores de tensoativo. Assim, foram escolhidos os pontos FO38 e FO46. O primeiro possui proporção entre Crodamol/tensoativo/água de 10:45:45, e o segundo 35:55:10.

### 6.3.2 Incorporação de Progesterona na Microemulsão

A partir dos dados obtidos no diagrama pseudoternário, avaliou-se a incorporação de P4 nas formulações selecionadas (FO38 e FO46). Os dados são apresentados na Tabela 22, juntamente com a solubilidade da P4 obtida na literatura para os componentes puros. A incorporação da P4 foi avaliada com a adição previa do fármaco na fase orgânica. Verificou-se que solubilidade da P4 adicionada na microemulsão pronta é consideravelmente inferior (dados não apresentados), devido à dificuldade de incorporação na matriz formada pelos componentes óleo/tensoativo/água.

**Tabela 22** – Incorporação de P4 nas microemulsões FO38 e FO46 e solubilidade nos componentes puros.

Componente	Solubilidade P4 (mg.mL <sup>-1</sup> )		Fonte		
Crodamol	36,2		Land; Li e Bummer (2005)		
Tween 80	11,9		Nandi; Bari e Joshi (2003)		
Isobutanol	35,6		Nandi; Bari e Joshi (2003)		
Água	0,007		Nandi; Bari e Joshi (2003)		
Amostra	Crodamol (%)	Tween 80 (%)	1-Butanol (%)	Água (%)	Incorporação P4 (mgP4.gME <sup>-1</sup> )
FO38	10,0	30,0	15,0	45,0	24,7
FO46	35,0	36,7	18,3	10,0	52,5

Cosiderando que a FO38 possui 45% de água, foi possível incorporar quantidade consideravel de P4 na formulação. Em termos percentuais, foram incorporados 2,4% (m/m) de P4 na microemulsão. Em estudos de liberação transdérmica é comum o uso de 1% (m/m) de P4 (BIRUSS; KAHLIG; VALENTA, 2007; BIRUSS; VALENTA, 2008). Hosmer et al. (2009) utilizou 1% de P4 em duas formulações com proporções de óleo/tensoativo/água de 20:47:33 e 14:63:23. Neste caso, foi utilizado como tensoativo a mistura Tween 80/glicerídeos de cadeia média/propileno glicol (1:1:1) e óleo Myvacet como fase oleosa. Ren et al. (2012), avaliando microemulsão para administração parenteral (subcutânea) à base de Miglyol 812N, água e mistura de tensoativos

Solutol HS15/Span 80/etanol, também utilizou P4 como modelo de fármaco hidrofóbico na concentração de 1% (m/m).

Devido ao maior teor de Crodamol e tensoativo, a FO46 proporcionou elevada solubilidade à P4 ( $52,5 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{ME}}^{-1}$ ). Este valor é considerado elevado para este fármaco que é de difícil solubilização, sendo superior aos valores obtidos na literatura para o Crodamol puro e isobutanol (Tabela 22). Em microemulsão com maior teor de tensoativo contendo Tween 80/propileno glicol/ácido oleico/água (56:14:15:15), Maghraby (2012) determinou a solubilidade da P4 de  $21,7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , conseguindo aumentar para  $48,7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  somente com a adição de 20% de etanol.

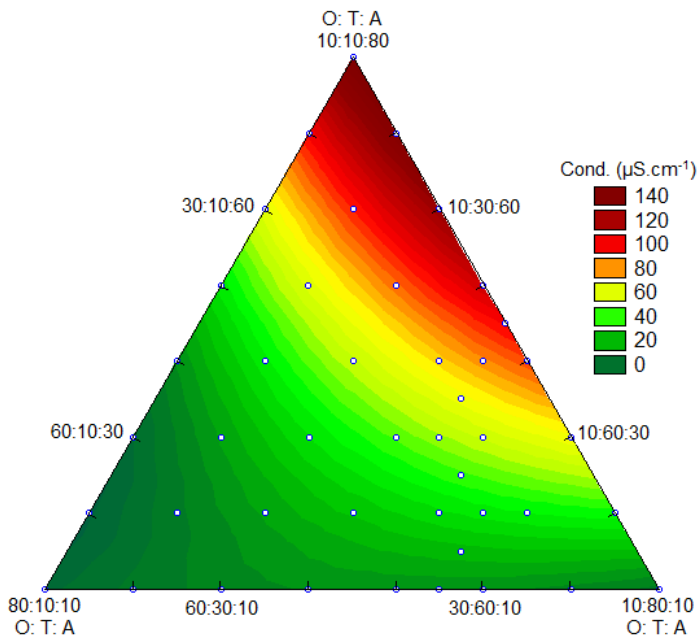
### 6.3.3 Caracterização

A elucidação precisa da estrutura interna da microemulsão e determinação dos limites de transição entre microemulsão O/A, A/O e bicontínua é uma tarefa complexa e envolve diversas técnicas de análises complementares (MOULIK; PAUL, 1998; ACHARYA; HARTLEY, 2012).

A condutividade elétrica está correlacionada com a estrutura interna da formulação, por isso é um parâmetro que auxilia na identificação do tipo de microemulsão formada. Sistemas A/O apresentam valores extremamente baixos, enquanto microemulsões O/A possuem condutividade semelhante a um meio aquoso normal (MOULIK; PAUL, 1998). Neste trabalho, a condutividade dos componentes isolados que formam a microemulsão é inferior a  $1,5 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ , inclusive a água deionizada utilizada, que apresentou  $0,05 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Contudo, após a mistura verificou-se a elevação da condutividade em amostras com maior teor de água, o que era esperado em decorrência da transição da água para a fase contínua e a solubilidade de eletrólitos. Formulações com mais de 25% de água e menos de 25% de Crodamol apresentaram elevação considerável na condutividade ( $> 60 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), indicando uma possível região de transição entre microemulsão A/O e O/A.

Na Figura 35 é apresentada a evolução da condutividade das amostras do diagrama pseudoternário. O modelo quadrático foi significativo ( $p < 0,01$ ;  $R^2 = 0,910$ ;  $R^2_{\text{ajustado}} = 0,898$ ) e os fatores relacionados ao teor de água (linear e quadrático) e tensoativo foram os mais relevantes, conforme observado na análise de variância (ANOVA) e efeitos da Tabela 23.

**Figura 35** – Condutividade obtida para as formulações do diagrama de fase pseudoternário com aplicação do modelo quadrático (O: Crodamol; T: Tween 80/butanol; A: água).



**Tabela 23** – Análise de variância (ANOVA) dos modelos aplicados aos dados de condutividade e coeficientes (componentes originais) para o modelo quadrático.

ANOVA					
Modelo	Valor de F	<i>p</i> -value	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado	
Linear	78,159	< 0,05	0,792	0,782	
Quadrático	16,651	< 0,05	0,910	0,898	
Cúbico Especial	0,197	0,660	0,911	0,896	
Cúbico	2,054	0,125	0,924	0,904	
Efeitos Modelo Quadrático (Componentes Originais)					
Fator	Coefficientes	Erro Padrão	<i>p</i> -value	Limite Confiança (-95%)	Limite Confiança (+95%)
Crodamol (O)	4,219	19,750	0,831	-35,764	44,201
Tween 80/Butanol (T)	-51,212	20,045	< 0,05	-91,792	-10,632
Água (A)	194,313	19,717	< 0,05	154,396	234,230
OT	85,776	72,531	0,244	-61,055	232,608
OA	-401,999	75,302	< 0,05	-554,442	-249,556
TA	240,280	68,839	< 0,05	100,922	379,637

Como a definição de microemulsão considera essencialmente formulações com três componentes (óleo, tensoativo e fase aquosa), a condutividade foi analisada no intervalo restrição de 10 a 80% para cada um deles, onde O, T e A corresponde a fração mássica de Crodamol, tensoativo e água, respectivamente. O modelo quadrático, considerando os coeficientes para os componentes originais (decodificados), é apresentado na Equação (25).

$$\text{Condutividade} = (4,219 * O) - (51,212 * T) + (194,313 * A) + (85,77 * O * T) - (401,999 * O * A) + (240,280 * T * A) \quad (25)$$

Os valores médios de transmitância, pH, condutividade, diâmetro médio das gotas (Dg) e índice de polidispersão (PDI) para as microemulsões FO38 e FO46 são apresentados na Tabela 24. Considerando todas as amostras do diagrama, as leituras de pH não apresentaram variações significativas. De modo geral, ficaram em torno da neutralidade, entre 5,5 e 7,5; o que é apropriado em formulações injetáveis para evitar efeitos adversos. Para administração intramuscular são aceitáveis valores de pH entre 2 -12, já para a via subcutânea a faixa é reduzida para 3 -9, pois a taxa de diluição é menor, resultando em maior potencial de irritação no local de injeção. Em ambos os casos poderá causar ardor se for administrado formulações nesses extremos de pH (STRICKLEY, 2004).

**Tabela 24** – Valores médios<sup>1</sup> de Transmitância (T), pH, condutividade, Dg e PDI para as microemulsões FO38 e FO46 com e sem P4.

Amostra	T (%)	pH	Condut. (μS.cm <sup>-1</sup> )	Dg (nm)	PDI
FO 38	92,3 ± 2,6	6,42 ± 0,29	96,1 ± 3,3	4,5 ± 0,9	0,66 ± 0,02
FO38 P4 24mg	94,6 ± 3,2	6,38 ± 0,36	84,0 ± 4,2	4,2 ± 0,9	0,59 ± 0,01
FO46	94,6 ± 1,1	7,50 ± 0,44	6,5 ± 1,9	9,3 ± 2,5	0,33 ± 0,04
FO46 P4 50mg	94,5 ± 3,6	7,20 ± 0,25	7,8 ± 2,1	8,4 ± 1,7	0,34 ± 0,05

<sup>1</sup>Média ± DP (n = 3).

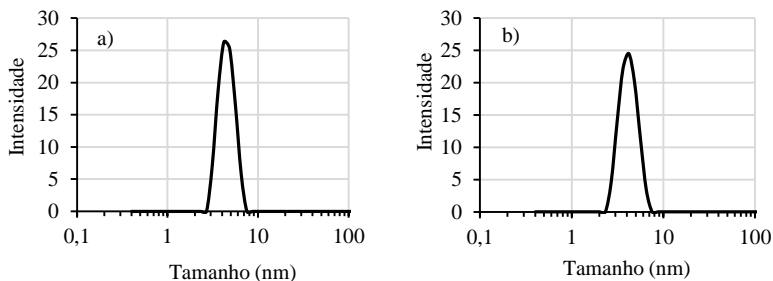
A adição de P4 em valores próximos aos limites de saturação não alterou de forma expressiva os parâmetros avaliados na Tabela 24. Devido ao baixo teor de fase dispersa nas formulações selecionadas, o tamanho médio das gotas ficou inferior a 10 nm, se aproximando de uma estrutura micelar. Contudo, micelas diferem estruturalmente de microemulsões, pois não possuem necessariamente três componentes definidos como fase



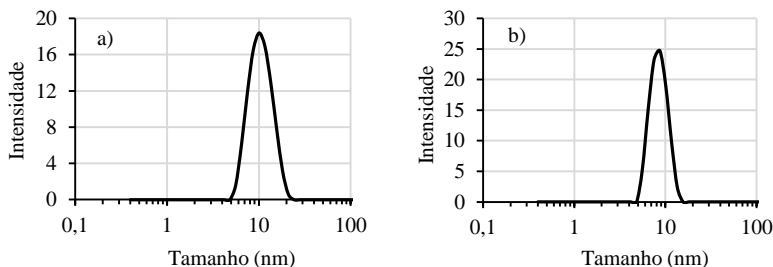
dispersa, fase contínua e tensoativos (TRIVEDI; KOMPELLA, 2010). Não há um limite definido na literatura para o tamanho das gotas em microemulsão, apenas o consenso de que estas devem ser pequenas o suficiente para garantir que o sistema seja translúcido à luz visível. Date e Nagarsenker (2008a) sugerem tamanhos inferiores a 150 nm. Enquanto Talegaonkar et al. (2008) indicam que usualmente a faixa de tamanho obtida fica entre 20 – 200 nm. Em estudo de microemulsão contendo ácido oleico, Tween 80, propileno glicol e água, Chen et al. (2004) encontraram tamanhos que variaram de 12,7 a 81,5 nm, sendo que o menor diâmetro foi obtido para a concentração de 1,5% de óleo e 68,5% de água.

O índice de polidispersão (PDI) é uma medida adimensional da amplitude da distribuição de tamanho de partículas ou gotas no caso de emulsões. Os valores apresentados na Tabela 24 são relativamente elevados, contudo, comuns para sistemas de microemulsão onde há formação de nanogotas sem o uso de homegeizadores de alta pressão ou ultrassom. Ainda, deve-se considerar que o pequeno diâmetro das gotas pode superestimar o valor deste parâmetro. Neste caso, torna-se mais apropriado avaliar a distribuição de tamanho, a qual é apresentada nas Figuras 36 e 37.

**Figura 36** – Distribuição do tamanho de gotas: a) FO38; b) FO38 P4 24 mg.g<sup>-1</sup>.



**Figura 37** – Distribuição do tamanho de gotas: a) FO46; b) FO46 P4 50 mg.g<sup>-1</sup>.



Observando a Figura 36, o tamanho das gotas da FO38 ficou entre 2 e 10 nm. Para a FO46 (Figura 37) ficaram entre 4 e 30 nm. Essas proporções também podem ser confirmadas pelos dados de transmitância da luz visível, que ficaram acima de 90% em todas as amostras. Dados semelhantes foram obtidos por Hathout et al. (2010), com microemulsão composta de ácido oleico, Tween 20, Transcutol® e água para liberação transdérmica de testosterona, cujos diâmetros médios ficaram entre 10 e 13 nm, e PDI de 0,25 a 0,89. Date e Nagarsenker (2008b) obtiveram diâmetros médios entre 10 e 30 nm com PDI de 0,40 a 0,90 em diversas formulações à base de água e Solutol HS 15, para liberação parenteral do anestésico propofol.

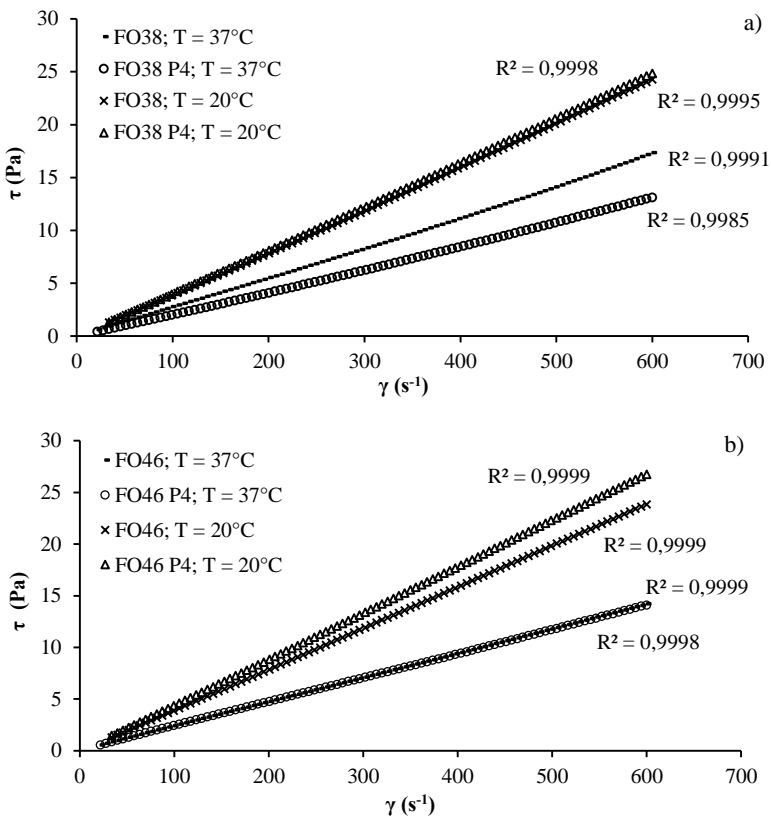
Uma das principais vantagens da microemulsão em formulações injetáveis está na possibilidade de solubilizar elevadas quantidades do fármaco e apresentar baixas viscosidades (LEE et al., 2002). Comportamento reológico newtoniano e baixas viscosidades também são parâmetros de estabilidade da formulação (MORENO; BALLESTEROS; FRUTOS, 2003). Em composições cuja fração volumétrica da fase dispersa é relativamente baixa, as gotículas de água ou óleo possuem tamanho nanométrico. Se estas gotículas não apresentarem interações, a viscosidade resultante da microemulsão será baixa, podendo ser adequada à administração parentérica, oral, pulmonar ou ocular. Para liberação tópica de fármacos, sistemas mais viscosos são preferidos (LAWRENCE; REES, 2012).

Na Figura 38 é apresentada a variação da tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) como função da taxa de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ) para FO38 (Figura 38a) e FO46 (Figura 38b), nas temperaturas de 20 e 37°C. Para ambas as formulações se observa uma relação linear entre as variáveis ( $R^2 > 0,999$ ), indicando comportamento Newtoniano em ampla faixa de cisalhamento. A presença de 24 mg<sub>P4</sub>.g<sub>ME</sub><sup>-1</sup> na FO38 e 50 mg<sub>P4</sub>.g<sub>ME</sub><sup>-1</sup> na FO46 não alterou o comportamento reológico das amostras.

As propriedades reológicas de microemulsões dependem das características físicas de cada componente, bem como das interações entre eles. Mudanças microestruturais que levam à transição de um sistema bicontínuo para descontínuo são, muitas vezes, refletidas na reologia. Microemulsões bicontínuas podem exibir comportamento Newtoniano (viscosidade constante) em baixas e médias taxas de cisalhamento e comportamento pseudoplástico em altas taxas. Já microemulsões descontínuas, apresentam comportamento Newtoniano em ampla faixa de cisalhamento. Contudo, deve-se considerar que a reologia, por ser uma propriedade macroscópica, pode não ser sensível suficientemente para

detectar mudanças microestruturais discretas (FANUN et al., 2001; ACHARYA; HARTLEY, 2012).

**Figura 38** – Variação da tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) como função da taxa de cisalhamento ( $\gamma$ ) para: a) FO38; b) FO46 com e sem P4 nas temperaturas de 20 e 37°C.



Na Tabela 25, observa-se que todas as formulações apresentaram viscosidades baixas (40,1–44,6 mPa.s à  $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) se for considerando o teor de Tween 80 nas amostras e sua elevada viscosidade (375–480 mPa.s). Como o Crodamol possui baixa viscosidade, a FO46 não apresentou diferenças consideráveis em relação à FO38.

**Tabela 25** – Viscosidades ( $\eta$ ) das microemulsões FO38 e FO46, com e sem P4, nas temperaturas de 20 e 37°C, e dos componentes Crodamol e Tween 80.

Amostra	$\eta$ (mPa.s)		
	T = 20°C	T = 25°C	T = 37°C
Crodamol	28-32*	-	-
Tween 80	-	375 - 480**	-
FO38	40,1	-	28,2
FO38 P4 24mg	41,1	-	21,4
FO46	39,6	-	23,6
FO46 P4 50mg	44,6	-	23,5

Dados obtidos de: \*Rowe; Sheskey e Quinn (2009a); \*\*Fabricante.

Em 37°C as viscosidades foram reduzidas quase à metade dos valores em 20°C. Considerando a temperatura corporal, essa redução é benéfica, pois pode facilitar ainda mais a aplicação intramuscular ou subcutânea. Contudo, deve-se avaliar o efeito de diluição e o comportamento da microemulsão ao entrar em contato com água presente nos tecidos. O perfil de liberação do fármaco também depende desses fatores. Inclusive, alguns estudos buscam formulações que sofram transição de fase de microemulsão para cristal líquido após a aplicação e assim, promover a liberação lenta do fármaco (REN et al., 2012; WU et al., 2014).

Outras microemulsões em estudo para administração de fármacos apresentaram viscosidades maiores. Wu et al. (2014) determinaram viscosidade entre 280–300 mPa.s a 20°C e comportamento Newtoniano de microemulsão para uso subcutâneo contendo triglicerídeos de cadeias médias como fase oleosa, água, Solutol HS 15, Span 80 e etanol. Jain; Fernandes e Patravale (2010), em microemulsão para administração intravenosa de etoposida, um inibidor de tumores, composta de Capmul®, PEG 400/Tween 80/Epikuron®135F e água, obtiveram viscosidade de 107 mPa.s.

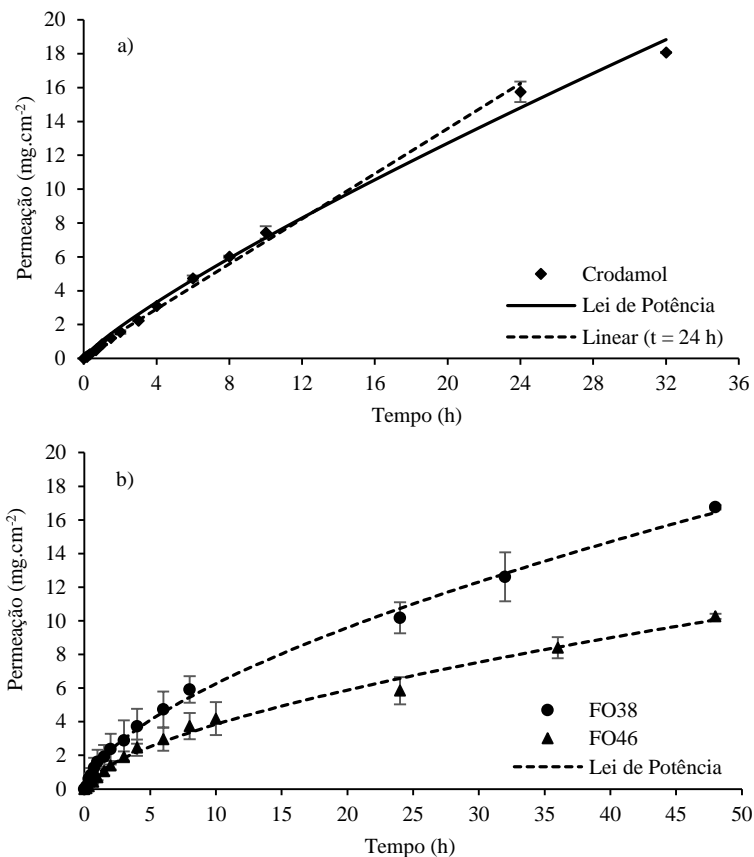
### 6.3.4 Permeação *in vitro*

Considerando as características da microemulsão, que impossibilita realização de testes de liberação em suspensão, foram realizados ensaios de permeação utilizando célula de difusão do tipo Franz para avaliar a difusividade da P4 incorporada na microemulsão. Estudos de permeabilidade e liberação *in vitro* são úteis como etapa preliminar à testes clínicos, pois permitem conhecer a dinâmica de transporte do fármaco sem interferências de fatores biológicos. O fármaco deve ser solúvel na solução receptora para garantir a condição *sink*, por

isso foi utilizado solução de SDS 5%, na qual a P4 possui elevada solubilidade ( $9,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), conforme discutido nos itens 4.3.3 e 5.3.2.

Na Figura 39 são apresentados os dados acumulativos de massa de P4 permeada por unidade de área ao longo do tempo para amostras de Crodamol (controle) e microemulsão (FO38 e FO46).

**Figura 39** – Perfil de permeação de P4 incorporada em: a) Crodamol; b) microemulsão (FO38 e FO46).



Observa-se que a liberação em Crodamol é rápida, seguindo uma trajetória linear até 24 h. A P4 incorporada em microemulsão permeou mais lentamente, em especial a formulação FO46, cujo montante em 48 h foi de  $10,3 \text{ mg.cm}^{-2}$ , enquanto a FO38 liberou  $16,8 \text{ mg.cm}^{-2}$ . Em ambos

os casos, essas quantidades são inferiores à amostra de Crodamol, que em 32 h permeou 18,1 mg.cm<sup>-2</sup> de P4.

Na Tabela 26 são apresentados os parâmetros obtidos com a aplicação dos modelos não lineares aos dados. A equação de Higuchi considera a proporcionalidade entre a quantidade cumulativa de fármaco liberado e a raiz quadrada do tempo, como indicador para a liberação controlada por difusão. Contudo, a equação deve ser usada com cautela, pois deriva de pressupostos pseudo-estacionários que dificultam sua aplicação em sistemas reais. As hipóteses que devem ser consideradas são: concentração do fármaco no sistema muito superior à solubilidade; difusão unidimensional; as partículas são muito menores que a espessura do sistema; intumescimento (inchaço) das partículas desprezível; difusividade constante; condição *sink* (SIEPMANN; PEPPAS, 2012). Considerando a hipótese de aceitação desses pressupostos para o sistema em estudo, observa-se por meio dos valores de R<sup>2</sup><sub>adj</sub> (Tabela 26), que a equação de Higuchi não foi adequada aos dados de permeação.

**Tabela 26** – Parâmetros obtidos com a aplicação dos modelos de Higuchi e Lei de Potência aos dados de permeação *in vitro*.

<b>Equação de Higuchi: <math>m(t) = k\sqrt{t}</math></b>			
Coeficientes	Crodamol	FO38	FO46
	Valor (erro)	Valor (erro)	Valor (erro)
k <sub>Hg</sub>	2,663 (0,206)	2,191 (0,066)	1,342 (0,046)
R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>	0,882	0,977	0,968

<b>Equação Lei de Potência: <math>m(t) = kt^n</math></b>			
Coeficientes	Crodamol	FO38	FO46
	Valor (erro)	Valor (erro)	Valor (erro)
k	1,039 (0,082)	1,515 (0,065)	0,938 (0,075)
n	0,836 (0,024)	0,616 (0,013)	0,613 (0,024)
R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>	0,995	0,997	0,991

A lei de potência é um modelo mais abrangente, cujo expoente  $n$  pode indicar o mecanismo predominante de liberação. A equação de Higuchi é a solução para um caso específico desta lei, aplicada à porção inicial dos dados, quando  $n = 0,5$ . Considerando que a liberação ocorre a partir de um filme fino, quando  $n = 0,5$  há predominância da difusão no transporte. Quando  $n = 1$ , a taxa de liberação independe do tempo e a cinética torna-se de ordem zero. Neste caso o mecanismo é conhecido como transporte de caso II (*case-II transport*), o qual indica liberação controlada por intumescimento ou erosão (SIEPMANN; PEPPAS, 2012).

Para os ensaios realizados com Crodamol e microemulsão, a lei de potência aplicada em toda extensão dos resultados apresentou ajuste adequado aos dados, com  $R^2_{adj} > 0,99$  e baixos desvios. Nas três formulações apresentadas na Tabela 26 foram obtidos  $0,5 < n < 1,0$ , correlacionados com transporte anômalo, ou seja, há presença dos mecanismos de difusão e erosão. Conforme Papadopoulos et al. (2006), para esses casos, a Lei de Potência pode ser aplicável em toda extensão dos resultados. E de fato quando aplicada apenas a porção inicial dos dados (60%) produziu coeficientes semelhantes para Crodamol ( $n = 0,965$ ;  $R^2_{adj} = 0,999$ ); FO38 ( $n = 0,592$ ;  $R^2_{adj} = 0,993$ ) e FO46 ( $n = 0,576$ ;  $R^2_{adj} = 0,970$ ).

O maior valor de  $n$  foi observado para a amostra controle ( $n = 0,836$ ). Neste caso a P4 está dissolvida em Crodamol puro, onde não há barreiras impostas ao transporte além da membrana e viscosidade do óleo, o que pode acelerar os mecanismos difusivos, tendendo a uma cinética de ordem zero. Isso ocorre inicialmente, onde a velocidade de liberação parece ser controlada exclusivamente por erosão. Quando aplicada a lei de potência nas primeiras 24 h, temos  $n = 0,898 \pm 0,011$  ( $R^2_{adj} = 0,999$ ), e no período até 10 h,  $n = 0,965 \pm 0,013$  ( $R^2_{adj} = 0,999$ ). Essa relação linear pode ser verificada na Figura 39, representado pela linha tracejada.

As amostras com progesterona incorporada em microemulsão apresentaram  $n \sim 0,61$  para toda extensão dos resultados e valores ainda menores para a porção inicial da curva ( $n < 0,60$ ). Possivelmente a estrutura nanométrica propiciada pelos tensoativos auxilia na manutenção do sistema e retarda a liberação do fármaco, atuando como barreira ao fluxo difusivo, o qual é reduzido e passa a controlar a velocidade de permeação do fármaco.

Conforme apresentado na Equação (22), quando em estado estacionário a curva de permeação apresentou comportamento linear, onde o fluxo ( $J$ ) passa a ser constante. Na Tabela 27 é apresentada a constante de fluxo obtida para cada formulação, assim como o coeficiente de permeabilidade, definido pela Equação (23) e calculado pela Equação (24).

**Tabela 27** – Fluxo ( $J$ ) e coeficiente de permeabilidade ( $Kp$ ) da P4.

Formulação	$J$ (mg.cm <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> )	$Kp \times 10^3$ (cm.h <sup>-1</sup> )
Crodamol	0,65	20,4
FO38	0,29	12,8
FO46	0,17	3,0

Em regime estacionário, o fluxo de fármaco obtido para FO38 foi quase 2 vezes menor que a amostra controle, enquanto o fluxo da FO46 foi aproximadamente 3,8 vezes menor. Esse comportamento era esperado em virtude da barreira difusiva imposta pela microemulsão, tornando-a mais adequada à liberação sustentada se comparada ao Crodamol puro, pois permitiu incorporação de quantidade expressiva de P4 e apresentou baixo fluxo, ou seja, aumento da capacidade de retenção.

É comum a utilização de formulações com o fármaco em sua atividade termodinâmica máxima visando manter o fluxo elevado e constante, e conseqüentemente, prolongar a eficácia clínica. Nessas condições, as moléculas em solução saturada estão em equilíbrio com o sólido puro não dissolvido (AULTON, 2005). Considerando esse aspecto, os testes de permeação foram realizados com as formulações contendo a concentração máxima possível de P4, conforme testes de incorporação apresentados na Tabela 22.

O fluxo é dependente da concentração de fármaco na solução doadora, a qual pode mudar de uma formulação para outra, por isso, calcula-se o coeficiente de permeabilidade que normaliza esses efeitos. Os valores de  $Kp$  apresentados na Tabela 27, foram próximos aos obtidos em estudo de permeação realizado por Biruss; Kählig e Valenta (2007), com pele abdominal suína e P4 incorporada em diferentes microemulsões a base de lauril éter de polioxietileno, etanol, óleo de eucalipto e água, cujos coeficientes de permeabilidade ficaram entre  $8,4 \times 10^{-3}$  e  $14,4 \times 10^{-3} \text{ cm.h}^{-1}$ .

A microemulsão FO46 permite a incorporação de elevada quantidade de progesterona, aproximadamente o dobro da FO38, esse fato somado ao baixo fluxo, levou a um  $Kp$  de apenas  $3 \times 10^{-3} \text{ cm.h}^{-1}$ . Outra consideração a ser destacada é com relação à FO38, que incorpora menos progesterona que o Crodamol puro devido ao teor de água na formulação, porém o  $Kp$  foi inferior a solução controle. Sendo assim, a análise do coeficiente de permeabilidade confirma que as formulações de microemulsão podem ter ação sustentada na liberação de progesterona.

## 6.4 CONCLUSÕES

Os componentes avaliados possibilitaram a formação de microemulsão em ampla região do diagrama de fases. Foram selecionadas duas formulações para caracterização: FO38 e FO46. A primeira possui teor de água de 45% e 10% de Crodamol e foi possível incorporar



24,7 mg<sub>P4</sub>.g<sub>ME</sub><sup>-1</sup>. A FO46, com 10% de água e 35% de Crodamol, permitiu incorporar até 52,5 mg<sub>P4</sub>.g<sub>ME</sub><sup>-1</sup>.

A condutividade das formulações que compõem o diagrama de fases pode ser explicada por modelo quadrático, cujos efeitos significativos foram relacionados ao teor de água e tensoativo. A análise deste parâmetro em toda extensão do diagrama permitiu melhor conhecer a estrutura interna da microemulsão. A condutividade foi significativamente crescente para formulações com mais de 25% de água e menos de 25% de Crodamol. Nessa região, possivelmente a água encontra-se na fase contínua da microemulsão. O pH das formulações FO38 e FO46 ficou entre 6,4 e 7,5, sendo apropriado para administração parenteral. As gotas apresentaram tamanho inferior a 30 nm.

A análise reológica revelou que ambas as formulações apresentaram comportamento Newtoniano em ampla faixa de cisalhamento (0 – 600 s<sup>-1</sup>). As viscosidades foram inferiores a 44,6 mPa.s à 20°C. Em todos os parâmetros, as formulações FO38 e FO46 não apresentaram alterações consideráveis na presença de progesterona. De modo geral e sob os aspectos avaliados, a progesterona apresentou elevada solubilidade nas microemulsões formuladas, as quais possuem estabilidade e potencial de compatibilidade para prosseguir com testes necessários ao desenvolvimento de produto injetável ou transdérmico. Contudo, deve-se ressaltar a necessidade de estudos de toxicidade da formulação devido à elevada concentração de tensoativos.

Nos ensaios realizados em célula de difusão verificou-se que a progesterona incorporada apenas em Crodamol (controle) apresentou rápida permeação e perfil linear até 24 h. A quantidade liberada acumulada em 32 h foi 18,1 mg.cm<sup>-2</sup>. As microemulsões apresentaram permeação mais lenta, especialmente a formulação FO46, cuja quantidade acumulada em 48 h foi 10,3 mg.cm<sup>-2</sup>, enquanto a FO38 liberou 16,8 mg.cm<sup>-2</sup>. A análise da liberação com o modelo lei de potência revelou que a amostra controle apresentou perfil tendendo a ordem zero ( $n \sim 1$ ) até 24 h, neste caso o processo é controlado por erosão, já que não há barreiras difusivas além do óleo. Nas amostras de microemulsão, a influência do mecanismo difusivo foi considerável ( $n \sim 0,61$ ). Possivelmente a estrutura nanométrica apropriada pelos tensoativos auxilia na manutenção do sistema e retarda a liberação do fármaco, atuando como barreira ao fluxo difusivo, o qual é reduzido e passa controlar a velocidade de permeação do fármaco.



## **7 ENCAPSULAÇÃO E LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE PROGESTERONA EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS**

### **7.1 INTRODUÇÃO**

Nanopartículas à base de lipídeos sólidos foram desenvolvidas para ser uma alternativa a outros modelos convencionais de liberação de fármacos como emulsões, nanopartículas poliméricas e lipossomos. Em geral, esses sistemas são constituídos de uma matriz lipídica sólida na qual é incorporado o fármaco. Geralmente, NLS são constituídas de materiais biodegradáveis e que já são utilizados em produtos farmacêuticos e cosméticos. Considerando o potencial de utilização de NLS como carreador de fármacos hidrofóbicos, este capítulo aborda a produção de NLS a partir de lipídeos sólidos (ácido láurico, ácido esteárico e monoestearato de glicerila) e líquido (Crodamol GTCC®) para encapsulação de progesterona. São avaliados aspectos de estrutura, estabilidade, limites de incorporação e eficiência de encapsulação da progesterona, além de ensaios de permeação em célula de difusão.

### **7.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **7.2.1 Materiais**

Crodamol GTCC® (triglicerídeos de cadeia média composto de ácidos cáprico e caprílico), adquirido da Alpha Química utilizado como lipídeo líquido. Pluronic® F-127 utilizado como tensoativo não iônico, dodecil Sulfato de Sódio (SDS, 99 %); ácido láurico ( $C_{12}H_{24}O_2$ ; p.f. 43 - 44°C); monoestearato de glicerila ( $C_{21}H_{42}O_4$ ; p.f. 56 - 60°C); ácido esteárico ( $C_{18}H_{36}O_2$ ; p.f. 67 - 71°C) adquiridos da Sigma-Aldrich. Água deionizada foi utilizada nas formulações.

#### **7.2.2 Preparação das Nanopartículas Lipídicas Sólidas**

O procedimento de preparo das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foi realizado conforme Meneses (2016) e Das et al. (2011), as quais foram obtidas a partir de um lipídeo sólido e um lipídeo líquido (Crodamol GTCC). Solução de Pluronic F-127 de concentração 0,2 % (m/m) em água foi utilizada como tensoativo não iônico. Realizou-

se estudo preliminar com a avaliação de três lipídeos sólidos: ácido láurico, monoestearato de glicerila e ácido esteárico. Foram avaliados os seguintes teores de lipídeo em solução: 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0% ( $m_{\text{lipídeo (total)}}/V_{\text{Pluronic 0,2\%}}$ ). Em todas as formulações a proporção entre lipídeo sólido e Crodamol foi 2:1.

Inicialmente o lipídeo líquido e sólido foram misturados e aquecidos em temperatura 10°C acima de seu respectivo ponto de fusão, mantendo agitação por 10 min. A amostra foi resfriada a temperatura ambiente e então foi adicionada progesterona em quantidade previamente estabelecida. Novamente a mistura foi aquecida para completa fusão dos lipídeos mantendo a agitação por mais 10 min. A solução de Pluronic F-27 foi aquecida à mesma temperatura e adicionada na fase orgânica para formação da emulsão, a qual ficou sob agitação por 30 min em temperatura constante.

A emulsão foi submetida a ultrassom (Fischer Scientific, Ultrasonic Dismembrator Model 500, 400 W) por 1 min (30 s *on* e 10 s *off*) em amplitude 50% para redução do tamanho das gotas. Por fim, as partículas lipídicas sólidas foram formadas com o resfriamento da nanodispersão em banho de gelo (2 – 4°C) por 10 min. Agitação magnética foi mantida durante o processo de ultrassom e resfriamento.

### 7.2.3 Caracterização

#### 7.2.3.1 Análise da Distribuição de Tamanho

O tamanho das partículas ( $D_p$ ) e o índice de polidispersão (PDI) foi determinado em triplicata por Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering – DLS*), utilizando equipamento Zetasizer, Nano Series da Malvern Instruments. As amostras foram devidamente diluídas em água deionizada e posteriormente as medidas foram realizadas em temperatura ambiente (24°C).

#### 7.2.3.2 Determinação do Potencial Zeta

Foi determinado em amostras selecionadas utilizando equipamento Zetasizer, Nano Series da Malvern Instruments em pH  $4,7 \pm 0,2$  e temperatura ambiente (24 °C).

### 7.2.3.3 *Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)*

As análises de FTIR foram realizadas em espectrômetro Agilent Technologies (Cary 600 Series). Para obtenção dos espectros, amostras liofilizadas de NLS foram incorporadas em KBr, seguido da compressão para formação de pastilhas. As análises foram conduzidas com varreduras na faixa de 4000 - 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ .

### 7.2.3.4 *Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)*

As análises foram realizadas em equipamento Perkin-Elmer (Jade DSC). Amostras liofilizadas de NLS foram analisadas em faixa de temperatura de 10 a 160°C, com rampa constante de aquecimento/resfriamento de 20°C.min<sup>-1</sup>, em atmosfera de nitrogênio com vazão de 20 mL.min<sup>-1</sup>. Foram realizados dois ciclos de aquecimento/resfriamento. Considerou-se o segundo ciclo de aquecimento para determinação da temperatura de fusão.

### 7.2.3.5 *Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)*

Análises em TEM (JEM-1011 - 100 kV) foram realizadas para caracterização morfológica das partículas com e sem fármaco. Amostras de NLS foram diluídas em água deionizada à 0,5% e pingadas em grade de cobre de 300 mesh cobertas com Formvar. Após a secagem, as amostras foram recobertas com filme de carbono para minimizar os efeitos de degradação do feixe de elétrons.

## 7.2.4 **Estabilidade Física**

Foi realizada avaliação da estabilidade física da suspensão de nanopartículas lipídicas ao longo do tempo. Para tal, amostras foram armazenadas em refrigerador a 4°C por um período de 60 dias e monitorados os parâmetros Dp, PDI e EE, além de alterações aparentes como formação de precipitado e separação de fases.

## 7.2.5 **Determinação da Eficiência de Encapsulação**

O protocolo de determinação da eficiência de encapsulação (EE) foi adaptado de Meneses (2016). O processo consiste na separação do fármaco não encapsulado por meio de ultrafiltração e centrifugação.

Amostras em duplicatas de 500  $\mu\text{L}$  da dispersão de NLS foram colocadas em dispositivo de ultrafiltração AMICON® ultra, ultracel – 100 kDa (Millipore) e centrifugadas a 9168  $\times g$  (10000 rpm) por 30 min em centrífuga Sigma modelo 3-16 KL. Alíquotas de 250  $\mu\text{L}$  do permeado foram diluídas em solução de SDS 5% e a absorbância medida em 253 nm usando espectrofotômetro UV-Vis Rayleigh, modelo UV-2601. A concentração de P4 ( $C_{1P4}$ ) foi determinada por meio da curva de calibração (Apêndice I), considerando o devido fator de diluição.

Posteriormente, a fase orgânica retida no filtro foi lavada com a adição de 400  $\mu\text{L}$  de SDS 5% e centrifugada a 9168  $\times g$  por 30 min. Novamente, alíquotas do permeado foram diluídas em solução de SDS 5%, a absorbância foi medida em 253 nm para obtenção da concentração na P4 na solução de lavagem ( $C_{2P4}$ ).

Para o cálculo da EE, considerou-se a concentração total ( $C_{P4T}$ ) de P4, calculada com base na massa adicionada no preparo da dispersão de NLS e a concentração de P4 livre (não encapsulada), obtida pelo somatório de  $C_{1P4}$  e  $C_{2P4}$ , conforme a Equação (26)

$$EE (\%) = \frac{C_{P4T} - (C_{1P4} + C_{2P4})}{C_{P4T}} \times 100 \quad (26)$$

### 7.2.6 Estudo de Permeação *In Vitro*

Os experimentos de liberação *in vitro* foram adaptados de Ren et al. (2012) e conduzidos em células de difusão tipo Franz seguindo o protocolo já descrito no Cap. 6, item 6.2.6. Os dados de liberação foram tratados com regressão não linear no programa OriginPro 8 SPR (OriginLab Corporation, 2007) utilizando modelos cinéticos da Lei de Potência (modelo Peppas) e Weibull, representados pelas Equações (19) e (20). A constante de fluxo ( $J$ ), definida a partir da primeira lei de Fick, conforme Equação (22), foi estimada a partir da região linear da curva e o coeficiente de permeabilidade ( $K_p$ ) calculado por meio da Equação (24), ambas apresentadas no Cap. 6.

### 7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 7.3.1 Caracterização de Nanopartículas Lipídicas Sólidas e Eficiência de Encapsulação

Um estudo preliminar foi realizado para avaliação da produção de NLS com lipídeos que apresentam diferentes pontos de fusão: ácido láurico (C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>; p. f. 43 – 44°C), monoestearato de glicerila (C<sub>21</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub>; p. f. 56 – 60°C) e ácido esteárico (C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>; p. f. 67 – 71°C). Os valores de tamanho de partículas e PDI nas diferentes concentrações são apresentados na Tabela 28.

**Tabela 28** – Diâmetros de partículas (Dp) e índice de polidispersão (PDI) para NLS preparadas com diferentes lipídeos.

Lípido Sólido	Teor de Lípido (%)*	Dp (nm)	PDI
Ácido Láurico	0,5	130 ± 1	0,32 ± 0,04
	1	144 ± 1	0,23 ± 0,02
	2,5	197 ± 5	0,28 ± 0,05
	5	241 ± 6	0,29 ± 0,05
Ácido Esteárico	0,5	352 ± 2	0,25 ± 0,01
	1	341 ± 1	0,20 ± 0,01
	2,5	344 ± 5	0,17 ± 0,04
	5	> 1000	> 0,40
Monoestearato de Glicerila (MEG)	0,5	146 ± 1	0,14 ± 0,02
	1	243 ± 2	0,22 ± 0,02
	2,5	232 ± 4	0,19 ± 0,01
	5	353 ± 9	0,39 ± 0,07

\*Teor total de lipídeo ( $m_{\text{Lípido}}/V_{\text{solução}}$ ) na formulação (lipídeo sólido + Crodamol).

Dentre os lipídeos avaliados, o ácido láurico é o que possui menor cadeia de carbono, conseqüentemente, menor ponto de fusão, o qual é reduzido ainda mais com a inclusão de Crodamol na formulação. Para a mesma condição de preparo, os menores diâmetros de partículas foram obtidos com ácido láurico. Contudo, o sistema não apresentou homogeneidade e mesmo em baixas concentrações, uma fração considerável do lipídeo não foi incorporada nas partículas. A utilização deste lipídeo requer o estudo de outros tensoativos que aumentem a estabilidade do sistema ou de inclusão de processo de filtração para retenção do lipídeo não disperso.

Um dos objetivos desse estudo preliminar foi verificar o teor máximo que lipídeo que é possível incorporar na solução mantendo a estrutura adequada das nanopartículas e estabilidade do sistema, pois isso permite, conseqüentemente, elevar o teor de fármaco em solução. Em

todos os casos as formulações com 5,0% de lipídeo apresentaram instabilidade, elevado tamanho de partícula e PDI. Sendo assim, essas formulações também foram descartadas para estudos posteriores.

Os testes realizados com ácido esteárico nas concentrações de 0,5 a 2,5% indicaram estabilidade e uniformidade, principalmente nas concentrações de 0,5 e 1,0%. Amostras com concentração de 2,5% possuem Dp e PDI compatível com o esperado, porém, a homogeneização adequada da mistura lipídica na fase aquosa e o controle da etapa de ultrassom é essencial para manter a estabilidade do sistema e incorporação de todo o lipídeo nas partículas.

Formulações com MEG apresentaram tamanhos de partículas cerca de 100 nm inferiores às NLS de ácido esteárico. Apresentaram estabilidade nas concentrações de 0,5 a 2,5%, porém as mesmas ressalvas elencadas anteriormente para a concentração de 2,5%. A formulação com 0,5% formou NLS com Dp < 200 nm e PDI < 0,2, contudo estimou-se que, devido ao baixo teor de lipídeo, a quantidade de P4 a ser incorporada seria baixa, o que limitaria aplicações desse sistema *in vivo*.

Sendo assim, os estudos posteriores de caracterização e incorporação de P4 foram realizados com as formulações de ácido esteárico e MEG, com concentrações lipídicas de 1,0 e 2,5%. Na Tabela 29 são apresentadas as massas utilizadas e as concentrações de P4 correspondente. Foram realizados testes com 5 e 10 mg.mL<sup>-1</sup> de fármaco (mg P4 por mL de suspensão).

**Tabela 29** – Formulações de NLS e relação P4/lipídeo.

Amostra	C <sub>P4</sub> (mg.mL <sup>-1</sup> )	Sol. Pluronic (mL)	Lipídeo Sólido (g)	Crodamol (g)	P4 (g)	P4/Lipídeo (g <sub>P4</sub> .g <sub>Lipídeo</sub> <sup>-1</sup> )
NLS 1%	5,0	25,0	0,167	0,083	0,125	0,50
NLS 1%	10,0	25,0	0,167	0,083	0,250	1,00
NLS 2,5%	5,0	25,0	0,417	0,208	0,125	0,20
NLS 2,5%	10,0	25,0	0,417	0,208	0,250	0,40

Não foi possível incorporar 10 mg.mL<sup>-1</sup> de P4 nas formulações com 1% de lipídeo. Neste caso, a quantidade de lipídeo não foi suficiente para solubilizar a P4, com isso a fase orgânica não formou uma emulsão homogênea após a adição da fase aquosa. Sendo assim, identificou-se que a relação de 1 g<sub>P4</sub>.g<sub>Lipídeo</sub><sup>-1</sup> está acima do limite de incorporação de fármaco no sistema.



Com as demais relações de concentração ( $\leq 0,5 \text{ g}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Lipídeo}}^{-1}$ ) foi possível formar NLS mantendo a estabilidade do sistema. Os dados de potencial zeta ficaram na faixa de -15 a -5 mV. Os resultados de tamanho de partícula, PDI e eficiência de encapsulação (EE) medidos no dia de preparo e após 60 dias, são apresentados na Tabela 30.

**Tabela 30** – Diâmetros de partículas (Dp), índice de polidispersão para NLS e eficiência de encapsulação (EE).

Amostra*	C <sub>P4</sub> (mg.mL <sup>-1</sup> )	Dp (nm)		PDI		EE (%)	
		1 dia	60 dias	1 dia	60 dias	1 dia	60 dias
NLS 1	5	266±1	338±1	0,13	0,13	93,8±0,1	92,1±1,9
NLS 2	10	374±10	370±1	0,23	0,19	98,3±0,1	95,0±1,5
NLS 3	5	190±1	185±1	0,20	0,15	95,4±0,6	92,7±0,1
NLS 4	10	237±1	252±4	0,21	0,28	97,2±1,4	93,4±1,1

\* NLS 1: Ác. est./Crodamol 1%; NLS 2: Ác. est./Crodamol 2,5%; NLS 3: MEG/Crodamol 1%; NLS 4: MEG/Crodamol 2,5%.

Na observação visual macroscópica das amostras apresentadas na Tabela 30, não foi identificado a formação de precipitado ou separação de fases após 60 dias de conservação das amostras sob refrigeração à 4°C. Tampouco houve alterações consideráveis nos tamanhos de partículas e PDI nesse período.

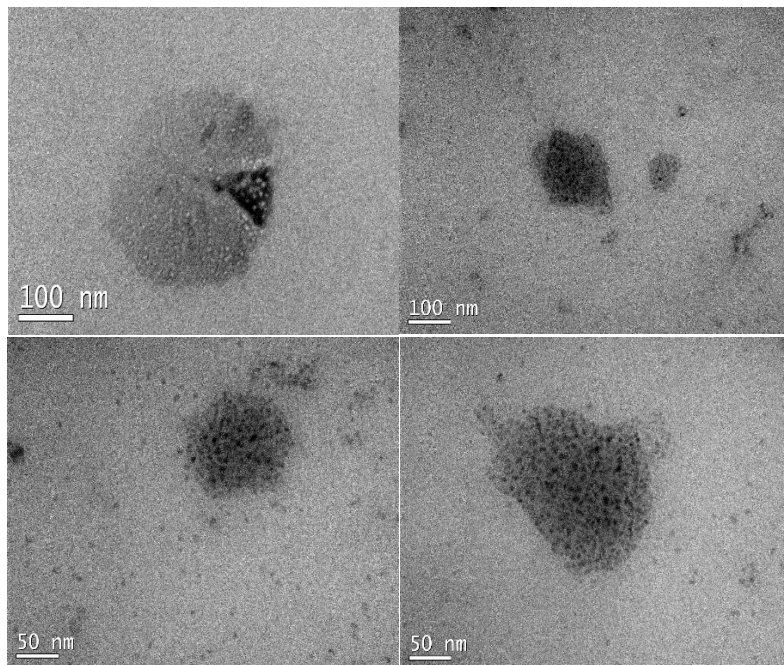
A inclusão de Crodamol nas formulações pode ter auxiliado na manutenção da estabilidade, considerando que NLS preparadas exclusivamente a partir de lipídeos sólidos podem sofrer processos de gelatinização e aumento do tamanho de partícula no armazenamento (MEHNERT; MÄDER, 2012).

Outro fator favorável à inclusão de Crodamol é a elevada solubilidade de P4 neste óleo e a prevenção de modificação  $\beta$  nas partículas, caracterizada pela formação de estrutura cristalina quase perfeita que leva à expulsão do fármaco da matriz lipídica (WEBER; ZIMMER; PARDEIKE, 2014). A manutenção da P4 nas partículas pode ser verificada nos dados de EE na Tabela 30, onde após o período de armazenamento a redução neste parâmetro foi inferior a 4%. A incorporação de componentes líquidos no sistema torna a matriz lipídica menos organizada, permitindo a acomodação do fármaco em sua estrutura (WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004).

Na Figura 40 são apresentadas micrografias de NLS obtidas em MET. Devido ao baixo ponto de fusão da mistura lipídica (MEG e

Crodamol), tornou-se difícil a obtenção de imagens sem degradar as partículas simultaneamente.

**Figura 40** – Imagens obtidas em MET de nanopartículas lipídicas sólidas de MEG/Crodamol.



A incidência do feixe de elétrons do MET inicia rapidamente um processo de deformação das partículas. Como pode ser observado, inicialmente as partículas apresentam morfologia esférica, porém, logo sofrem deformações com a exposição.

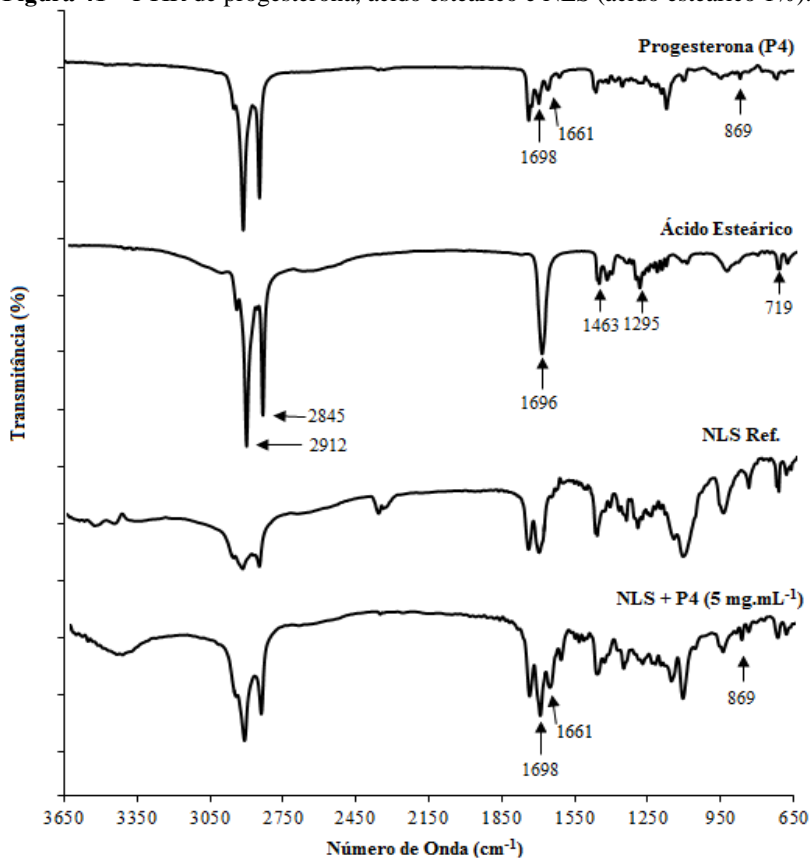
Na Figura 41 é apresentada a caracterização em FTIR de NLS de ácido esteárico 1% com  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de P4. Conforme discutido no item 4.3.2 (Cap. 4), a P4 possui bandas características do estiramento das ligações  $\text{-C=O}$  no carbono ligado ao radical metila ( $1698 \text{ cm}^{-1}$ ) e da cadeia cíclica ( $1661 \text{ cm}^{-1}$ ) (ZOPPETI et al., 2007; LEIMANN et al. 2015), além de absorção em  $870 \text{ cm}^{-1}$  referente à deformação fora do plano do hidrogênio ligado ao carbono  $sp^2$  (ARAYA-SIBAJA et al., 2013).

Fortes bandas de absorção na região entre  $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$  ocorrem para a P4 e ácido esteárico, as quais correspondem estiramento nas ligações  $\text{-C-H}$ ;  $\text{-C-CH}_3$  e  $\text{-O-CH}_3$  (STUART, 2004).

Especificamente para o ácido esteárico, a absorção próxima a  $2912\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento nas ligações  $-CH_2$  (PUDNEY; MUTCH; ZHU, 2009). De acordo com Albuquerque et al. (2003), ácidos graxos e triglicerídeos apresentam vibrações entre  $2960 - 2840\text{ cm}^{-1}$  decorrentes do estiramento da ligação  $C-H$  dos grupos metil ( $-CH_3$ ) e metileno ( $-CH_2$ ).

O ácido esteárico possui ainda bandas características em:  $1697\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento no grupo carboxila ( $-C=O$ ) (PUDNEY; MUTCH; ZHU, 2009; ALBUQUERQUE et al., 2003; LEE; KIM, 1998);  $1462 - 1471\text{ cm}^{-1}$  atribuída à deformação angular simétrica no plano (tesoura) nas ligações  $-CH_2$ ; e  $1295\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento na ligação  $-C-OH$  (PUDNEY; MUTCH; ZHU, 2009).

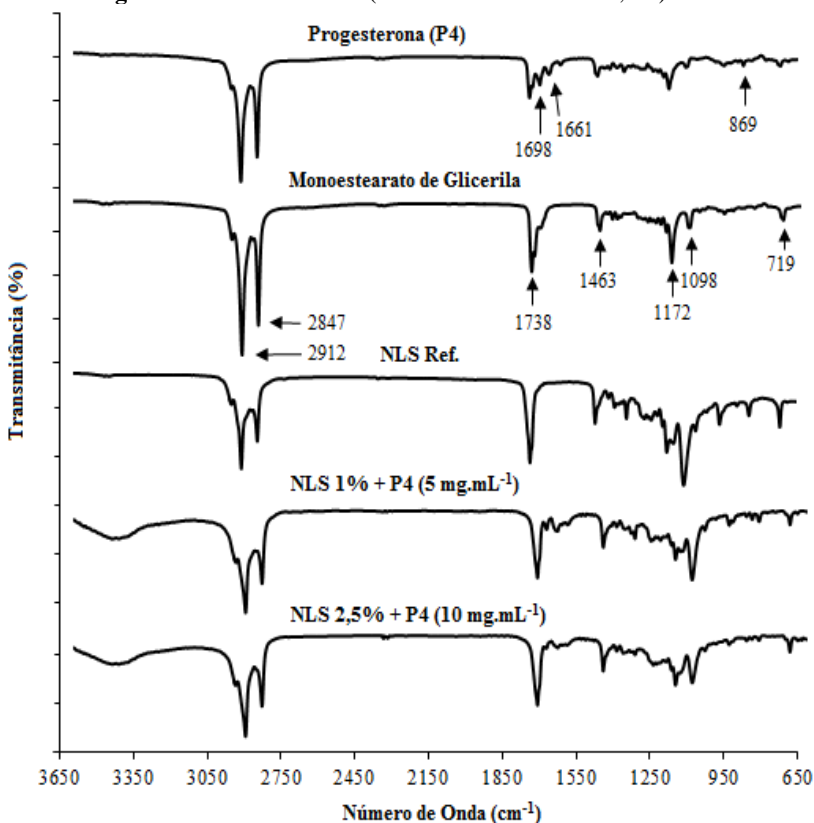
**Figura 41** – FTIR de progesterona, ácido esteárico e NLS (ácido esteárico 1%).



Na análise de NLS com 1% de lipídeos (ácido esteárico e Crodamol), houve a sobreposição de alguns picos e atenuação de outros devido a diluição dos componentes. Contudo, na amostra com fármaco as bandas referentes à absorção da P4 ( $1661$  e  $869\text{ cm}^{-1}$ ) ficaram evidentes quando comparadas com o espectro da amostra NLS Ref. A relação P4/lipídeo é elevada ( $0,5\text{ g}_{\text{P4}}.\text{g}_{\text{Lipídeo}}^{-1}$ ) e pode ter dificultado a completa solubilização molecular do fármaco no interior da matriz lipídica.

Análises em FTIR foram realizadas com MEG e NLS formadas a partir desse lipídeo, os resultados são apresentados na Figura 42.

**Figura 42** – FTIR de NLS (MEG/Crodamol 1% e 2,5%) e P4.



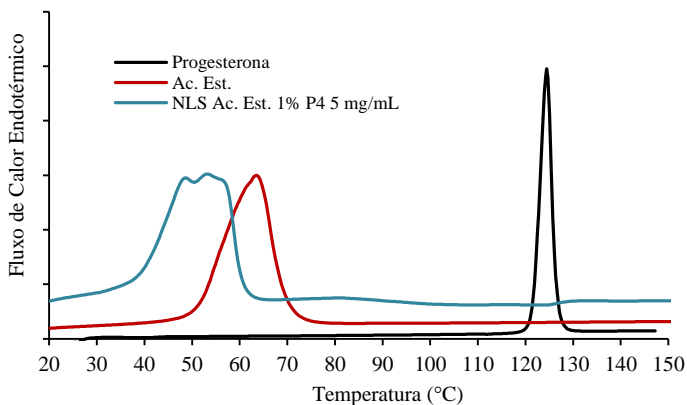
O MEG, quando analisado isoladamente, possui bandas de absorção em:  $2912$  e  $2845\text{ cm}^{-1}$ , comuns em ácidos graxos e triglicerídeos devido ao estiramento nas ligações  $-\text{CH}_2$ ;  $1738\text{ cm}^{-1}$  devido ao

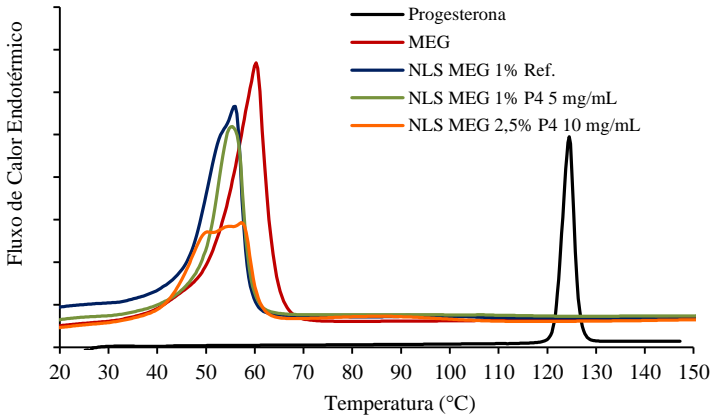
estiramento no grupo carbolixa, ligação  $-C=O$ ;  $1463$  e  $719\text{ cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento das ligações  $-C-H$  ao longo da cadeia alifática;  $1172\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento nas ligações  $-C-OH$ ; e em  $1098\text{ cm}^{-1}$  ligada ao estiramento no grupo  $-C-O-C$  (PUDNEY; MUTCH; ZHU, 2009; PATEL et al., 2014).

Se comparado à Figura 41, a análise de partículas de MEG contendo 1% de lipídeos e  $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de P4 ( $0,5\text{ g}_{\text{P4}}\cdot\text{g}_{\text{Lipídeo}}^{-1}$ ) indicou uma melhor dispersão do fármaco nas partículas, pois as bandas de absorção da P4 apresentaram baixa intensidade. A amostra de NLS com 2,5% de lipídeo e  $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de P4 apresentou bandas do fármaco ainda mais fracas, neste caso a relação P4/lipídeo é menor ( $0,4\text{ g}_{\text{P4}}\cdot\text{g}_{\text{Lipídeo}}^{-1}$ ). A ausência das bandas referente ao fármaco indica a completa encapsulação na matriz lipídica (BUTANI; YEWALE; MISRA, 2016; PUCEK; LEWINSKAB; WILKA, 2016). Esses resultados foram confirmados com análise da mistura física de MEG/P4 (2:1) (dados apresentados no Apêndice II - Figura 52), onde as bandas de absorção da P4 ficaram evidentes e com intensidade relativamente alta devido a não encapsulação do fármaco.

Na Figura 43 são apresentados os resultados obtidos em DSC para P4, ácido esteárico puro e NLS contendo 1% de lipídeos e  $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de progesterona. Na Figura 44 são apresentados os resultados em DSC para partículas com MEG/Crodamol

**Figura 43** – DSC de P4, ácido esteárico e NLS com 1% de lipídeos.



**Figura 44 - DSC de P4, MEG e NLS com 1% de lipídeos.**

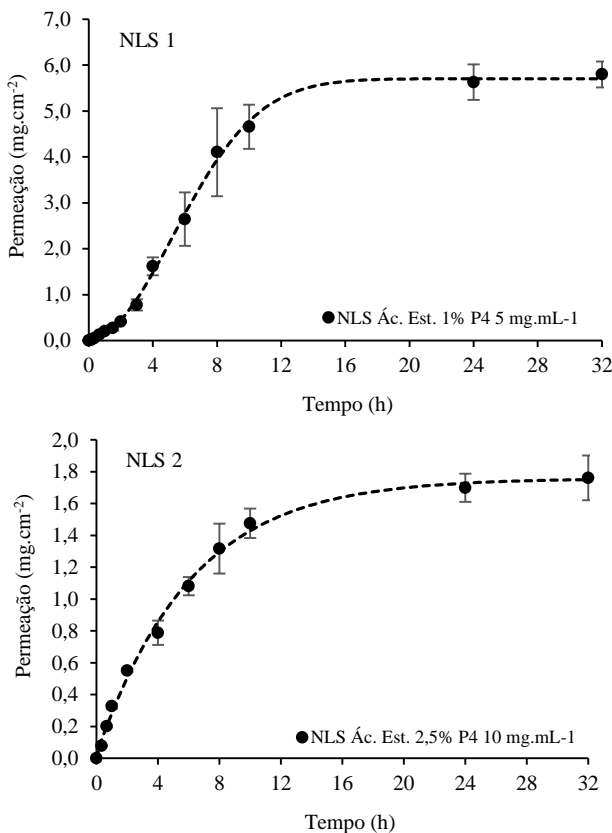
Como era previsto, o evento térmico relativo à fusão das partículas ocorre em temperatura inferior à fusão do lipídeo sólido puro, em decorrência da presença de Crodamol na formulação. Além da diminuição da temperatura de fusão, ocorrem deformações nos picos em virtude da mistura de componentes.

As fusões dos lipídeos ocorrem em temperaturas inferiores à fusão da P4, isso pode promover a solubilização e incorporação do fármaco no lipídeo durante a realização da análise em DSC, mesmo quando não encapsulado. Essa limitação foi confirmada com medidas realizadas na mistura física de lipídeo/P4 na proporção de 2:1 (dados apresentados no Apêndice II – Figura 53), nas quais não foi possível identificar a fusão da P4 misturada ao lipídeo (não encapsulada).

### 7.3.2 Permeação *In Vitro*

Foram realizados ensaios em célula de difusão para avaliar o perfil de permeação *in vitro* da P4 encapsulada nas diferentes formulações de NLS. Na Figura 45 são apresentados os resultados obtidos para NLS preparada a partir de ácido esteárico nas concentrações lipídicas de 1 e 2,5%, com 5 e 10 mg.mL<sup>-1</sup> de P4, respectivamente.

**Figura 45** – Perfil de permeação de P4 encapsulada em NLS preparada com ácido esteárico/Crodamol (NLS 1 e NLS 2).



As curvas obtidas para NLS 1 e NLS 2 apresentam perfis de liberação distintos, indicando que o teor de lipídeo e fármaco na formulação pode influenciar o transporte para o meio receptor. Amostras com 1% de lipídeos e 5 mg.mL<sup>-1</sup> de P4 (NLS 1) apresentaram comportamento sigmoidal, com um período inicial de latência (2 h), mas com aumento intenso e quase constante da taxa de fluxo nas horas seguintes até atingir a assíntota superior em aproximadamente 12 h, quando a taxa cai expressivamente em virtude da diminuição da concentração do fármaco no compartimento doador.

Conforme apresentado na Tabela 31, a equação de Weibull apresentou ajuste adequado aos dados ( $R^2_{\text{adj}} > 0,99$ ) e  $b > 1$ , indicando

mecanismo de liberação não ocorre apenas por difusão de Fick para NLS 1 (PAPADOPOULOU et al., 2006). Os resultados foram confirmados com a aplicação da Lei de Potência que apresentou  $n > 1$ , indicando que a liberação não pode ser explicada apenas pela difusão de Fick (SHAH et al. 2009; COSTA; LOBO, 2001)

**Tabela 31** - Coeficientes obtidos com a aplicação das equações Lei de Potência e Weibull aos dados de liberação da P4 encapsulada em NLS.

<b>Eq. Lei de Potência: <math>m(t) = kt^n</math></b>				
<b>Coeficientes</b>	<b>NLS 1</b>	<b>NLS 2</b>	<b>NLS 3</b>	<b>NLS 4</b>
<i>k</i>	0,170 (0,018)	0,304 (0,018)	0,462 (0,031)	0,155 (0,003)
<i>n</i>	1,533 (0,055)	0,707 (0,034)	0,556 (0,047)	0,585 (0,009)
$R^2_{adj}$	0,996	0,994	0,975	0,998

<b>Eq. Weibull: <math>m(t) = A - (A - B)Exp(-at^b)</math></b>				
<b>Coeficientes</b>	<b>NLS 1</b>	<b>NLS 2</b>	<b>NLS 3</b>	<b>NLS 4</b>
<i>A</i>	5,701 (0,079)	1,758 (0,044)	2,020 (0,118)	2,735 (2,136)
<i>B</i>	0,042 (0,057)	0,030 (0,071)	0,000 (0,000)	0,000 (0,000)
<i>b</i>	1,989 (0,106)	1,019 (0,130)	0,624 (0,116)	0,591 (0,127)
<i>a</i>	0,135 (0,003)	0,164 (0,012)	0,157 (0,028)	0,009 (0,016)
$R^2_{adj}$	0,998	0,994	0,985	0,994

NLS 1: 1% de lipídeos (Ác. Esteárico + Crodamol) com 5 mg.mL<sup>-1</sup> de P4;

NLS 2: 2,5% de lipídeos (Ác. Esteárico + Crodamol) com 10 mg.mL<sup>-1</sup> de P4;

NLS 3: 1% de lipídeos (MEG + Crodamol) com 5 mg.mL<sup>-1</sup> de P4;

NLS 4: 2,5% de lipídeos (MEG + Crodamol) com 10 mg.mL<sup>-1</sup> de P4.

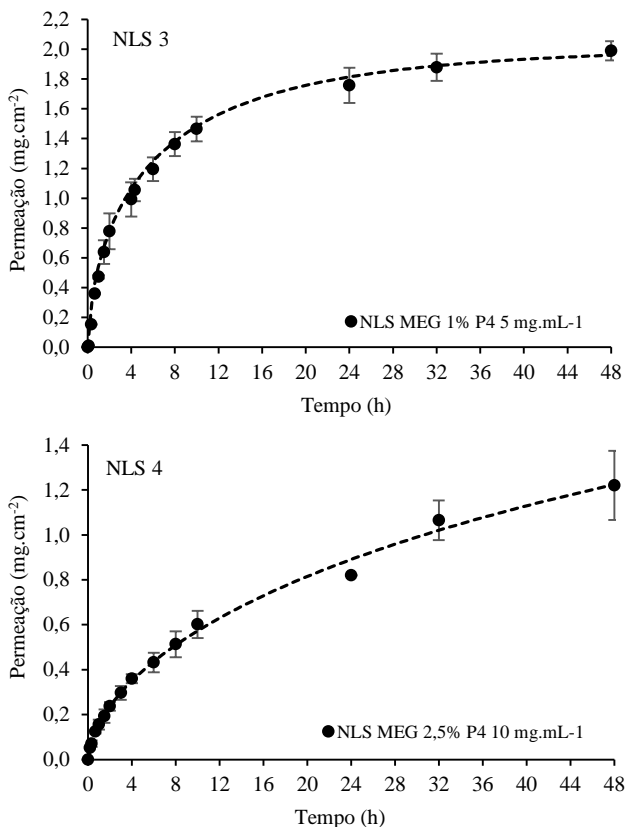
Enquanto a formulação com 1% de lipídeos (NLS 1) apresentou montante acumulado de liberação de aproximadamente 5,80 mg.cm<sup>-2</sup> após 32 h, a formulação com 2,5% (NLS 2) liberou 1,76 mg.cm<sup>-2</sup> neste tempo. Deve-se considerar que no primeiro caso a relação P4/lipídeo é maior, com isso há maior tendência à difusão para o meio menos concentrado. A formulação NLS 2 apresentou  $b=1,0$ , compatível com liberação de primeira ordem. Neste caso a constante *a* controla a cinética de liberação e o gradiente de concentração e a solubilidade determinam fração final liberada. A Lei de Potencia ( $n = 0,707$ ) indicou a presença de transporte anômalo (presença dos mecanismos de difusão e erosão), porém com predominância da erosão. De acordo com Papadopoulou et al. (2006), para valores de  $b=1,0$ , é frequente *n* estar entre 0,6 e 0,8.

Os testes de liberação com NLS preparada com MEG são apresentados na Figura 46 (NLS 3 e NLS 4). Comparativamente aos dados da Figura 45, a liberação nas partículas de MEG foi mais lenta. Por isso a avaliação foi realizada em 48 horas. O montante de permeação



acumulado em todo o teste foi de  $1,99 \text{ mg.cm}^{-2}$  para NLS 3 e de  $1,22 \text{ mg.cm}^{-2}$  para NLS 4. Conforme verificado nos ensaios de FTIR, a P4 parece ser melhor dispersa no interior de partículas formadas por MEG e isso pode auxiliar na retenção do fármaco.

**Figura 46** – Perfil de permeação da P4 encapsulada em NLS preparada com MEG/Crodamol (NLS 3 e NLS 4).



Para os ensaios da Figura 46, os coeficientes apresentados na Tabela 31 para NLS 3 e NLS 4, obtidos com a aplicação do modelo de Weibull estão correlacionados ao mecanismo de difusão de Fick ( $b < 0,75$ ). O expoente  $n$  da lei de potência aplicada nas primeiras horas de liberação ficou entre 0,5 e 0,6; indicando que o mecanismo erosivo não pode ser desprezado no início da liberação e pode estar atuando

juntamente com a difusão. A presença de erosão em pequenas proporções pode ser explicada pela alta concentração de tensoativo no meio de liberação, que pode solubilizar cadeias lipídicas nas camadas externas das partículas.

O mecanismo difusional de liberação *in vitro* de partículas formadas a partir de MEG já foi identificado por outros autores. Kawish et al. (2017) avaliou a liberação de nabumetona, fármaco hidrofóbico com ação anti-inflamatória, em carreadores lipídicos nanoestruturados (tamanho aprox. 127 nm) formados a partir de MEG e ácido oleico. A liberação *in vitro* foi correlacionada com o mecanismo difusional de Fick, por meio do modelo Lei de Potência, o qual apresentou  $n$  de 0,3924. Hou et al. (2016) relacionou a liberação de cloridrato de betaxolol encapsulado em NLS formada de MEG com o mecanismo difusional por meio da aplicação dos modelos de Weibull e Lei de Potência. Estes modelos também foram empregados por Meng et al. (2016) na análise da liberação *in vitro* de curcumina encapsulada em NLS formadas por lipídeos sólidos diversos e TCM. A equação de Weibull apresentou melhor ajuste com  $b > 1$ .

Com o teste de permeação *in vitro*, verificou-se que é possível alterar a velocidade de liberação com mudanças na concentração de fármaco e na matriz lipídica, que conseqüentemente altera o mecanismo de liberação. Na Tabela 32 é apresentada a quantidade de P4 permeada acumulada ao final dos ensaios, a constante de fluxo ( $J$ ) e coeficiente de permeabilidade ( $K_p$ ) estimados da porção linear das curvas de permeação.

**Tabela 32** – Quantidade acumulada de P4 liberada, constante de fluxo ( $J$ ) e coeficiente de permeabilidade ( $K_p$ ).

Código	P4/Lipídeo ( $\frac{\mu\text{g P4}}{\text{g Lipídeo}}^{-1}$ )	Qtd Lib. Acumulada ( $\text{mg.cm}^{-2}$ )	$J$ ( $\text{mg.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ )	$K_p \times 10^3$ ( $\text{cm.h}^{-1}$ )
NLS 1	0,5	$5,80 \pm 0,40$	0,6195	127,7
NLS 2	0,4	$1,76 \pm 0,20$	0,1188	12,3
NLS 3	0,5	$1,99 \pm 0,09$	0,0969	19,5
NLS 4	0,4	$1,22 \pm 0,22$	0,0441	4,4

Avaliando a quantidade cumulativa de fármaco permeada e o coeficiente de permeabilidade ( $K_p$ ), temos a seguinte sequência em ordem crescente: NLS 4 < NLS 2 < NLS 3 < NLS 1. Comparativamente aos dados de ácido esteárico/Crodamol, as formulações de MEG/Crodamol apresentam perfil de permeação mais lento, provavelmente devido à melhor solubilidade do fármaco nas partículas. Formulações com maior

teor de lipídeos e com menor relação P4/lipídeos também apresentam perfis de liberação mais lento, o que se deve possivelmente a diminuição do gradiente de concentração entre meio doador e receptor.

#### 7.4 CONCLUSÕES

O sistema ácido láurico/Crodamol apresentou pouca homogeneidade e nem toda massa lipídica foi convertida em nanopartículas. Todas as formulações testadas com 5,0% de lipídeo apresentaram instabilidade, além de elevado tamanho de partícula e PDI.

As formulações com ácido esteárico/Crodamol e MEG/Crodamol nos teores de 0,5 a 2,5% apresentaram estabilidade, uniformidade de tamanho (100 - 400 nm) e eficiências de encapsulação acima de 93%. Esses resultados persistiram por até 60 dias de armazenamento. O limite de incorporação de progesterona na mistura lipídica encontra-se entre  $0,5 - 1,0 \text{ gP4.gLipídeo}^{-1}$ .

As análises de FTIR indicaram que a formulação MEG/Crodamol pode favorecer a dispersão da progesterona no interior das partículas se comparadas ao sistema ácido esteárico/Crodamol. Os ensaios de permeação em célula de difusão indicaram que alterações na matriz lipídica e relação progesterona/lipídeos produzem diferentes perfis de liberação. As formulações com MEG/Crodamol e com menor relação progesterona/lipídeos apresentaram perfis de liberação mais lentos, possivelmente em decorrência da melhor dispersão do fármaco no interior dessas partículas e da diminuição do gradiente de concentração com o meio receptor. Avaliando a quantidade cumulativa de fármaco permeada e o coeficiente de permeabilidade ( $K_p$ ), a sequência em ordem crescente foi NLS 4 < NLS 2 < NLS 3 < NLS 1. A aplicação de modelo de Weibull aos dados obtidos com MEG/Crodamol indicou a presença predominante do mecanismo difusional de Fick na liberação do fármaco ( $b < 0,75$ ).



## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho abordou a incorporação e liberação *in vitro* de progesterona (P4) em sistemas nanoestruturados. O Cap. 3 validou método espectrofotométrico para determinação da progesterona encapsulada em nanopartículas de polimetacrilato de metila (PMMA). No Cap. 4 foram apresentados os resultados de síntese, caracterização, eficiência de encapsulação e liberação *in vitro* referentes às nanopartículas deste polímero. Foram sintetizadas, via polimerização em miniemulsão, partículas com morfologias de nanocápsulas e nanoesferas com tamanhos entre 150 e 300 nm, com as quais foram realizados testes de incorporação de progesterona em concentrações de até  $36 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$ . A EE para concentrações de até  $12 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  ficaram acima de 90%. Contudo, em amostras com mais de  $20 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  esse parâmetro apresentou maior variabilidade nos resultados. Nos ensaios de liberação *in vitro*, nanoesferas apresentaram efeito *burst* com liberação inicial de 20% do fármaco encasulado. Nanocápsulas apresentaram perfil de liberação mais lento, possivelmente em decorrência da solubilização da progesterona no núcleo oleoso das partículas. Em ambos os modelos de partícula, os dados de liberação não podem ser explicados apenas por difusão de Fick. Este comportamento pode estar relacionado à hidrofobicidade do fármaco e sua interação com as partículas.

No Cap. 5, partículas de PMMA foram funcionalizadas com grupos carboxílicos sensíveis ao pH por meio de copolimerização em miniemulsão de metacrilato de metila (MMA) e ácido acrílico (AA). A eficiência de encapsulação neste caso também ficou acima de 60%, porém as partículas de P(MMA-co-AA) apresentaram aumento de tamanho com  $20 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Látex}}^{-1}$  e alterações no espectro de FTIR. Por titulometria verificou-se que as superfícies das partículas concentram aproximadamente 54% dos grupos carboxílicos, 14% encontram-se no interior das partículas e 32% solubilizados na fase aquosa. Verificou-se que há uma aceleração da liberação em  $\text{pH} > 6$ . Acima do  $\text{pK}_a$  do polímero ocorre a ionização dos grupos carboxílicos e consequentemente o inchamento das partículas. A liberação por intumescimento foi confirmada neste modelo de partícula com a aplicação do modelo de Weibull, cujos coeficientes obtidos foram correlacionados com mecanismos combinados de liberação (intumescimento/difusão).

O Cap. 6 tratou da produção de microemulsão (ME) a partir de tensoativo não iônico e posterior incorporação de progesterona. A base da microemulsão foi formada por polisorbato 80 (Tween 80), 1-butanol,

triglicerídeos de cadeia média (Crodamol GTCC) e água. Por meio de diagrama de fases identificou-se a região de formação de microemulsão, na qual foram selecionadas duas formulações: FO38 (10% óleo; 45% tensoativo; 45% água) e FO46 (35% óleo; 55% tensoativo; 10% água). Nestas composições foi possível incorporar  $24,7 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{ME}}^{-1}$  e  $52,5 \text{ mg}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{ME}}^{-1}$ , respectivamente. Por meio de ensaios de permeação realizados em célula de difusão, verificou-se que ambas as formulações retardam a liberação do fármaco se comparado ao controle (Crodamol puro). Enquanto a amostra controle apresentou perfil de permeação característico de erosão, na microemulsão a permeação foi correlacionada com mecanismos difusivos/erosivos. Possivelmente a estrutura nanométrica propiciada pelos tensoativos auxilia na manutenção do sistema e retarda a liberação do fármaco. Os aspectos de liberação somados à estabilidade, comportamento reológico Newtoniano, baixa viscosidade ( $<44,6 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ) e elevada solubilidade para a progesterona, tornam as microemulsões obtidas aptas a prosseguir com testes para desenvolvimento de produto injetável ou transdérmico.

Por fim, o Cap. 7 abordou carreadores lipídicos sólidos (NLS), avaliando a influência do tipo e do teor de lipídeos em suspensão na encapsulação de progesterona, bem como na permeação *in vitro*. Dentre as formulações avaliadas, as que apresentaram maior potencial para incorporação de quantidades relevantes de progesterona foram: ácido esteárico/Crodamol (2:1) e monoestearato de glicerila (MEG)/Crodamol (2:1), ambas com concentração lipídica em suspensão de 1 e 2,5% (m/v). Estes sistemas apresentaram tamanhos de partículas entre 200 e 360 nm e eficiências de encapsulação acima de 93%. O limite de incorporação de progesterona ficou entre  $0,5 - 1,0 \text{ g}_{\text{P4}} \cdot \text{g}_{\text{Lipídeo}}^{-1}$ . Por meio de ensaios de permeação em célula de difusão, verificou-se que o tipo de lipídeo e a relação progesterona/lipídeos resultam em diferentes perfis de liberação. Formulações com MEG/Crodamol e com menor relação progesterona/lipídeos apresentaram perfis de permeação mais lentos. Estes resultados podem ser decorrentes da melhor solubilização do fármaco nas partículas. Neste caso, os coeficientes obtidos com a aplicação do modelo de Weibull estão correlacionados ao mecanismo de transporte por difusão de Fick.

Considerando os sistemas nanoestruturados apresentados neste estudo, todos possuem potenciais específicos para entrega de progesterona em diferentes aplicações, porém necessitam de pesquisas complementares, as quais são apresentadas abaixo, como sugestões de trabalhos futuros:

- PMMA: sugere-se estudo de liberação *in vitro* com formulações de nanocápsulas e nanoesferas contendo diferentes concentrações de progesterona.
- P(MMA-co-AA): sugere-se a realização de estudos de estabilidade do látex a longo prazo; realização de reações de copolimerização com diferentes concentrações de AA e análise do efeito na distribuição de grupos carboxílicos, encapsulação e liberação de P4, efeitos na viscosidade do látex e formação de gel; análise da composição do copolímero por meio de Espectroscopia RMN.
- Microemulsão: sugere-se avaliação de outros cotensoativos, além de 1-butanol, que permitam reduzir a concentração deste agente na formulação e conseqüentemente reduzir o potencial tóxico da ME. Sugere-se também realizar estudos de microscopia confocal para verificar o comportamento da ME quando em contato com a pele ou fase aquosa, simulando condições de liberação *in vivo*.
- NLS: por ser um sistema relativamente diluído, sugere-se o estudo de outras técnicas de preparo de partículas lipídicas sólidas, como por exemplo a partir de microemulsão, visando elevar o teor de progesterona em solução.
- Caracterização de partículas poliméricas e lipídicas: sugere-se aprofundar a caracterização utilizando técnicas como Difração de Raios-X (DRX) e espectros de Reflexão Total Atenuada no infravermelho (ATR-FTIR).
- Estudos de citotoxicidade: este trabalho priorizou a utilização de componentes biocompatíveis, porém é necessário aprofundar estudos de citotoxicidade *in vitro* com nanopartículas de PMMA, P(MMA-co-AA), NLS e ME.
- Toxicologia *in vivo*: sugere-se realizar estudo toxicológico abrangente com os sistemas nanoestruturados em questão.
- Liberação *in vivo* e eficácia clínica: após os devidos estudos toxicológicos sugere-se avaliar o perfil de liberação *in vivo*, assim como a eficácia clínica para o propósito a que se destina.





## REFERÊNCIAS

- ACHARYA, D. P.; HARTLEY, P. G. Progress in microemulsion characterization. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.17, p.274–280, 2012.
- ALBUQUERQUE, M. L. S.; GUEDES, I.; ALCANTARA Jr, P.; Moreira, S. G. C. Infrared absorption spectra of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil. **Vibrational Spectroscopy**, v.33, p.127–131, 2003.
- AL-MALIKI, R. S.; KHAKI, I. A.; AL-NAJAR, S. Comparison between bacterial vaginosis and Candidiasis in relation to estradiol level and vaginal pH in some infertile iraqi women. **Iraqi J Med Sci.**, v.7, n.3, p.24–31, 2009.
- ALONSO; M. J.; LOSA, C.; CALVO, P.; VILA-JATO, J. L. Approaches to improve the association of amikacin sulphate to poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.68, p.69-76, 1991.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003.
- AQUILANO, D.; CAVALLI, R.; GASCO, M. R. Solid lipospheres obtained from hot microemulsions in the presence of different concentrations of cosurfactant: the crystallization of stearic acid polymorphs. **Thermochimica Acta**, v.230, p.29-37, 1993.
- ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C.; CALDAS, E.; SANTOS, A. F.; FORTUNY, M. Investigation of Stabilization and Kinetics in the Semi-Continuous Emulsion Copolymerization of Vinyl Acetate and Butyl Acrylate using Carboxylic Monomers. **Macromol. Symp.**, v.245–246, p.61–67, 2006.
- ARAYA-SIBAJA, A. M.; PAULINO, A. S.; RAUBER, G. S.; CAMPOS, C. E. M.; CARDOSO, S. G.; MONTI, G. A.; HEREDIA, V.; BIANCO, I.; BELTRANO, D.; CUFFINI, S. L. Dissolution properties, solid-state transformation and polymorphic crystallization: progesterone case study. **Pharm Dev Technol**, v. 19, n.7, p.779–788, 2014.

ARCHER, D. F.; OGER, E. Estrogen and progesterone effect on venous thromboembolism in menopausal women. **Climacteric**, v.15, p.235–240, 2012.

ASUA, J. M. Miniemulsion polymerization. **Prog. Polym. Sci.**, v.27, p.1283-1346, 2002.

ATHAWALE, R. B.; JAIN, D. S.; SINGH, K. K.; GUDE, R. P. Etoposide loaded solid lipid nanoparticles for curtailing B16F10 melanoma colonization in lung. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.68, p.231–240, 2014.

AUDONNET, V.; MALAQUIN, L.; VIOVY, J-L. Polymeric coatings on micro- and nanometric particles for bioapplications. **Bioanal Rev.**, v.3, p.41–66, 2011.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 677p.

BACH, L. G.; ISLAM, MD. R.; KIM, J. T.; SEO, S. Y.; LIM, K. T. Encapsulation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles with poly(methyl methacrylate) via surface functionalized thiol-lactam initiated radical polymerization. **Applied Surface Science**, v.258, p.2959–2966, 2012.

BAGWE, R. P.; KANICKY, J. R.; PALLA, B. J.; PATANJALI, P. K.; SHAH, D. O. Improved drug delivery using microemulsions: rationale, recent progress, and new horizons. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System**, v.18, n.1, p.77-140, 2001.

BAKKEN, K., et al. Menopausal hormone therapy and breast cancer risk: impact of different treatments. The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. **Int. J. Cancer**, v.128, p.144–156, 2011.

BARBA, A. A.; DALMORO, A.; SANTIS, F.; LAMBERTI G. Synthesis and characterization of P(MMA-AA) copolymers for targeted oral drug delivery. **Polym. Bull.**, v.62, p.679–688, 2009.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82–83, p.479–486, 2004.

BATHFIELD, M.; GRAILLAT, C.; HAMAIDE, T. Encapsulation of high biocompatible hydrophobe contents in nonionic nanoparticles by miniemulsion polymerization of vinyl acetate or styrene: influence of the hydrophobe component on the polymerization. **Macromol. Chem. Phys.**, v.206, p.2284–2291, 2005.

BAZYLIŃSKA, U.; LEWIŃSKA, A.; LAMCH, Ł.; WILK, K. A. Polymeric nanocapsules and nanospheres for encapsulation and long-sustained release of hydrophobic cyanine-type photosensitizer. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v.442, p.42–49, 2014.

BECHTHOLD, N.; LANDFESTER, K. Kinetics of miniemulsion polymerization as revealed by calorimetry. **Macromolecules**, v.33, n.13, p.4682-4689, 2000.

BECKER, L. C.; HILL, R. A.; SHANK, R. C.; BERGFELD W. F.; KLAASSEN, C. D.; SLAGA, T. J.; BELSITO, D. V.; LIEBLER, D. C.; SNYDER, P. W.; MARKS JR, J. G.; ANDERSEN, F. A. Final report of the cosmetic ingredient review expert panel safety assessment of polymethyl methacrylate (PMMA), methyl methacrylate crosspolymer, and methyl methacrylate/glycol dimethacrylate crosspolymer. **International Journal of Toxicology**, v.30, p.54S-65S, 2011.

BERAL, V.; MILLION WOMEN STUDY COLLABORATORS. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. **The Lancet**, v.362, p.419-427, 2003.

BERNARDY, N. **Estudo cinético da polimerização em miniemulsão visando a nanoencapsulação da quercetina**. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

BERNARDY, N.; ROMIO, A. P.; BARCELOS, E. I.; PIZZOL, C. D.; DORA, C. L.; LEMOS-SENNA, E.; ARAUJO, P. H. H.; SAYER, C. Nanoencapsulation of quercetin via miniemulsion polymerization. **J. Biomed. Nanotechnol.**, v.6, n.2, p.1-6, 2010.

BIRUSS, B.; KÄHLIG, H.; VALENTA, C. Evaluation of an eucalyptus oil containing topical drug delivery system for selected steroid hormones. **International Journal of Pharmaceutics**, v.328, p.142–151, 2007.

BIRUSS, B.; VALENTA, C. The advantage of polymer addition to a non-ionic oil in water microemulsion for the dermal delivery of progesterone. **International Journal of Pharmaceutics**, v.349, p.269–273, 2008.

BONDÌ, M. L.; CRAPARO, E. F.; GIAMMONA, G.; DRAGO, F. Brain-targeted solid lipid nanoparticles containing riluzole: preparation, characterization and biodistribution. **Nanomedicine**, v.5, n.1, p.25–32, 2010.

BRANDRUP, J.; IMMERGUT, E.H.; GRULKE E.A. **Polymer Handbook**. 4 ed. JOHN WILEY: New York, 2003.

BUTANI, D.; YEWALE, C.; MISRA, A. Topical amphotericin B solid lipid nanoparticles: design and development. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.139, p.17-24, 2016.

CAILLOUETTE, J. C.; SHARP, C. F.; ZIMMERMAN, G. J.; ROY, S. Vaginal pH as a marker for bacterial pathogens menopausal status. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 176, p.1270-1277, 1997.

CAMPOS, I. M. F.; FERRAZ, H. C.; PINTO, J. C. Production and functionalization of P(MMA-co-AA) nanoparticles by miniemulsion polymerization. **Macromol. Symp.** v.368, p.70–77, 2016.

CARDOSO, P. B.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Encapsulation of jojoba and andiroba oils by miniemulsion polymerization: effect on molar mass distribution. **Macromolecular Symposia**, v.324, p.114-123, 2013.

CAVALLI, R.; CAPUTO, O.; GASCO, M. R. Solid lipospheres of doxorubicin and idarubicin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.89, p.R9-R12, 1993.

CAVALLI, R.; PEIRA, E.; CAPUTO, O.; GASCO, M. R. Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with  $\beta$ -cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v.182, p.59–69, 1999.

CHAN, A.; ORME, R. P.; FRICKER, R. A.; ROACH, P. Remote and local control of stimuli responsive materials for therapeutic applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.65, p.497–514, 2013.

CHANG, H.-I.; WILLIAMSON, M. R.; PERRIE, Y.; COOMBES A. G. A.. Precipitation casting of drug-loaded microporous PCL matrices: Incorporation of progesterone by co-dissolution. **Journal of Controlled Release**, v.106, p.263–272, 2005.

CHAROENPUTTAKUN, P.; LI, S. K.; NGAWHIRUNPAT, T. Iontophoretic delivery of lipophilic and hydrophilic drugs from lipid nanoparticles across human skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.495, p.318–328, 2015.

CHEN, H.; CHANG, X.; WENG, T.; ZHAO, X.; GAO, Z.; YANG, Y.; XU, H.; YANG, X. A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide. **Journal of Controlled Release**, v.98, p.427–436, 2004.

CHO, Y. H.; KIM, S.; BAE, E. K.; MOK, C. K.; PARK, J. Formulation of a cosurfactant-free O/W microemulsion using nonionic surfactant mixtures. **Journal of Food Science**, v.73, n.3, p.115-121, 2008.

CORNELL, J. **Experiments with mixtures: designs, models, and the analysis of mixture data**. 3ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 657p, 2002.

CORTESI, R.; ESPOSITOA, E.; LUCAB, G.; NASTRUZZI, C. Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds. **Biomaterials**, v.23, p.2283–2294, 2002.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.13 p.123–133, 2001.

CRESPY, D.; LANDFESTER, K. Miniemulsion polymerization as a versatile tool for the synthesis of functionalized polymers. **Beilstein J. Org. Chem.**, v.6, p.1132–1148, 2010.

CRUZ, L.; SOARES, L. U.; COSTA, T. D.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Diffusion and

mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.313, p.198–205, 2006.

DAI, S.; RAVI, P.; TAM, K. C. pH-Responsive polymers: synthesis, properties and applications. **Soft Matter**, v.4, p.435–449, 2008.

DANIELSSON, I.; LINDMAN, B. The definition of a microemulsion. **Colloids and Surfaces**, v.3, p.391–392, 1981.

DAS, S.; CHAUDHURY, A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. **AAPS PharmSciTech**, v.12, n.1, p.62-76, 2011.

DAS, S.; NG, W. K.; KANAUIA, P.; KIM, S.; TAN, R. B. H.. Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: effects of process variables. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.88, p.483–489, 2011.

DATE, A. A.; NAGARSENKER, M. S. Parenteral microemulsions: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v.355, p.19–30, 2008a.

DATE, A. A.; NAGARSENKER, M. S. Design and evaluation of microemulsions for improved parenteral delivery of propofol. **AAPS PharmSciTech**, v.9, n.1, p.138-145, 2008b.

DEFOSSEMONT, G.; RANDZIO, S. L.; LEGENDRE, B. Contributions of calorimetry for  $C_p$  determination and of scanning transitionometry for the study of polymorphism. **Crystal Growth & Design**, v.4, n.6, p.1169-1174, 2004.

DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E. B.; SILVA, A. M. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: a systematic review of *in vitro* data. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.87, p.1–18, 2014.

EL-AASSER, M. S.; SUDOL, E. D. Miniemulsions: overview of research and applications. **JCT Research**, v.1, n.1, p.21-31, 2004.

ELSAID ALI, A. A.; TAHER, M.; MOHAMED, F. Microencapsulation of alpha-mangostin into PLGA microspheres and optimization using response surface methodology intended for pulmonary delivery. **J. Microencapsul.**, v.30, n.8, p.728–740, 2013.

FADDA, P.; MONDUZZI, M.; CABOI, F.; PIRAS, S.; LAZZARI, P. Solid lipid nanoparticle preparation by a warm microemulsion based process: influence of microemulsion microstructure. **International Journal of Pharmaceutics**, v.446, p.166–175, 2013.

FANGUEIRO, J. F. Design of cationic lipid nanoparticles for ocular delivery: Development, characterization and cytotoxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v.461, p.64–73, 2014.

FANUN, M.; WACHTEL, E.; ANTALEK, B.; ASERIN, A.; GARTI, N. A study of the microstructure of four-component sucrose ester microemulsions by SAXS and NMR. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.18, p.173–186, 2001.

FARMACOPÉIA Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**: volume 2. Brasília: Anvisa, 2v/II, 2010, 904p.

FAYAD, P. B.; ZAMYADI, A.; BROSEUS, R.; PRÉVOST, M.; SAUVÉ, S. Degradation of progestagens by oxidation with potassium permanganate in wastewater effluents. **Chemistry Central Journal**, v.7, n.84, p.2-11, 2013.

FELBER, A. E.; DUFRESNE, M.; LEROUX, J. pH-sensitive vesicles, polymeric micelles, and nanospheres prepared with polycarboxylates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, p.979–992, 2012.

FEUSER, P. E.; GASPAR, P. C.; JACQUES, A. V.; TEDESCO, A. C.; SILVA, M. C. S.; RICCI-JÚNIOR, E.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H. Synthesis of ZnPc loaded poly(methyl methacrylate) nanoparticles via miniemulsion polymerization for photodynamic therapy in leukemic cells. **Materials Science and Engineering C**, v.60, p.458–466, 2016.

FEUSER, P. E.; GASPAR, P. C.; RICCI-JÚNIOR, E.; SILVA, M. C. S.; NELE, M.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H. Synthesis and characterization of poly(methyl methacrylate) and evaluation of

cytotoxicity for biomedical application. **Macromol. Symp.**, v.343, p.65–69, 2014.

FOURNIER, A.; BERRINO, F.; RIBOLI, E.; AVENEL, V.; CLAVEL-CHAPELON, F. Breast cancer risk in relation to different types of hormone replacement therapy in the E3N-EPIC cohort. **Int. J. Cancer**, v.114, p.448-454, 2005.

GETOFF, N.; HARTMANN, J.; HUBER, J. C.; QUINT, R. M. Photo-induced electron emission from 17 $\beta$ -estradiol and progesterone and possible biological consequences. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.92 p.38–41, 2008.

GETOFF, N.; SCHITTL, H.; GERSCHPACHER, M.; HARTMANN, J.; DANIELOVA, I.; QUINT, R-M. The effect of progesterone on the electron emission and degradation of testosterone. **Gynecological Endocrinology**, v.27, n.12, p.1077–1083, 2011.

GEURTS, F. L. S.; VAN HERK, A. M.; GERMAN, A. L. Encapsulation of aluminium hydroxide fillers with polymethyl-methacrylate. **J. microencapsulation**, v.18, n.4, p.533–543, 2001.

GONZÁLEZ-ORTIZ, L. J.; ASUA, J. M. Development of particle morphology in emulsion polymerization: 1. Cluster dynamics. **Macromolecules**, v.28, p.3135-3145, 1995.

GONZÁLEZ-ORTIZ, L. J.; ASUA, J. M. Development of particle morphology in emulsion polymerization: 2. Cluster dynamics in reacting systems. **Macromolecules**, v.29, p.383-389, 1996a.

GONZÁLEZ-ORTIZ, L. J.; ASUA, J. M. Development of particle morphology in emulsion polymerization: 3. Cluster nucleation and dynamics in polymerizing systems. **Macromolecules**, v.29, p.4520-4527, 1996b.

GRAHAM, J. D.; CLARKE, C. L. Physiological action of progesterone in target tissues. **Endocrine Reviews**. v.18, n.4, 1997.

GUO, J.; SCHORK, F. J. Hybrid miniemulsion polymerization of acrylate/oil and acrylate/fatty acid systems. **Macromol. React. Eng.**, v.2, p.265–276, 2008.



GYUROVA, A. Y.; HALACHEVA, S.; MILEVA E. Aqueous solutions of random poly(methyl methacrylate-co-acrylic acid): effect of the acrylic acid content. **RSC Adv.**, v.7, p.13372–13382, 2017.

HALACHEVA, S. S.; ADLAM, D. J.; HENDOW, E. K.; FREEMONT, T. J.; HOYLAND, J.; SAUNDERS, B. R. Injectable biocompatible and biodegradable pH-responsive hollow particle gels containing poly(acrylic acid): the effect of copolymer composition on gel properties. **Biomacromolecules**, v.15, p.1814–1827, 2014.

HATHOUT, R. M.; WOODMAN, T. J.; MANSOUR, S.; MORTADA, N. D.; GENEIDI, A. S.; GUY, R. H. Microemulsion formulations for the transdermal delivery of testosterone. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, p.188–196, 2010.

HAZRA, C.; KUNDU, D.; CHATTERJEE, A.; CHAUDHARI, A.; MISHRA, S. Poly(methyl methacrylate) (core)–biosurfactant (shell) nanoparticles: size controlled sub-100 nm synthesis, characterization, antibacterial activity, cytotoxicity and sustained drug release behavior. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v.449, p.96–113, 2014.

HEGDE, R. R.; VERMA, A.; GHOSH, A. Microemulsion: new insights into the ocular drug delivery. **ISRN Pharmaceutics**, v.2013, p.1-11, 2013.

HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspensions, **J. Pharm. Sci.**, v. 50, p. 874–875, 1961.

HIPPALGAONKAR, K.; MAJUMDAR, S.; KANSARA, V. Injectable lipid emulsions-advancements, opportunities and challenges. **AAPS PharmSciTech**, v.11, n.4, p.1526-1540, 2010.

HO, H. O.; HSIAO, C. C.; SHEU, M. T. Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.85, n. 2, p.138-143, 1996.

HOAR, T.P.; SCHULMAN, J.H. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro-micelle. **Nature**, v.152, p.102–103, 1943.

HOLZAPFEL, V.; MUSYANOVYCH, A.; LANDFESTER, K.; LORENZ, M. R.; MAILÄNDER, V. Preparation of fluorescent carboxyl and amino functionalized polystyrene particles by miniemulsion polymerization as markers for cells. **Macromol. Chem. Phys.**, v.206, p.2440–2449, 2005.

HORIE, K., et al. Definitions of terms relating to reactions of polymers and to functional polymeric materials. **Pure Appl. Chem.**, v. 76, No. 4, pp. 889–906, 2004.

HOSMER, J.; REED, R.; BENTLEY, M. V.; NORNOO, A.; LOPES, L. B. Microemulsions containing medium-chain glycerides as transdermal delivery systems for hydrophilic and hydrophobic drugs. **AAPS PharmSciTech**, v.10, n. 2, 2009.

HOU, D.; HU, S.; HUANG, Y.; GUI, R.; ZHANG, L.; TAO, Q.; ZHANG, C.; TIAN, S.; KOMARNENI, S.; PING, Q. Preparation and in vitro study of lipid nanoparticles encapsulating drug loaded montmorillonite for ocular delivery. **Applied Clay Science**, v.119, p.277–283, 2016.

HUANG, C. Y.; CHEN, C. M.; LEE, Y. D. Synthesis of high loading and encapsulation efficient paclitaxel-loaded poly(n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v.338, p.267–275, 2007.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**, 2005, 17p.

IM, H. Y.; SAH, H. Ammonolysis-based microencapsulation technique using isopropyl formate as dispersed solvent. **International Journal of Pharmaceutics**, v.382, p.130–138, 2009.

ISLAM, R. Synchronization of estrus in cattle: a review. **Veterinary World**, v.4, n.3, p.136–141, 2011.

JAMEELA, S. R.; KUMARY, T. V.; LAL, A. V.; JAYAKRISHNAN, A. Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable

controlled delivery system. **Journal of Controlled Release**, v.52, p.17–24, 1998.

JAIN, J.; FERNANDES, C.; PATRAVALE, V. Formulation development of parenteral phospholipid-based microemulsion of etoposide. **AAPS PharmSciTech**, v.11, n.2, p.826-831, 2010.

JANG, J.; SAH, H. Nonhalogenated solvent-based solvent evaporation process useful in preparation of PLGA microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v.28, n.6, p.490–498, 2011.

JOSHI, M.; PATHAK, S.; SHARMA, S.; PATRAVALE, V. Design and *in vivo* pharmacodynamic evaluation of nanostructured lipid carriers for parenteral delivery of artemether: Nanoject. **International Journal of Pharmaceutics**, v.364, p.119–126, 2008.

KATZ, E.; EKSTEEN, R.; SCHOENMAKERS, P.; MILLER, N. **Handbook of HPLC**. Marcel Dekker: Nova Iorque, 1998, 991p.

KAWASHIMA, Y. Nanoparticulate systems for improved drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p.1–2, 2001.

KAWISH, S.M.; AHMED, S.; GULL, A.; ASLAM, M.; PANDIT, J.; AQIL, M.; SULTANA, Y. Development of nabumetone loaded lipid nano-scaffold for the effective oral delivery; optimization, characterization, drug release and pharmacodynamic study. **Journal of Molecular Liquids**, v.231, p.514–522, 2017.

KIM, S.; KIM, J. H.; JEON, O.; KWON, I. C.; PARK, K. Engineered polymers for advanced drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.71, p.420–430, 2009.

KOETTING, M. C.; PETERS, J. T.; STEICHEN, S. D.; PEPPAS, N. A. Stimulus-responsive hydrogels: theory, modern advances, and applications. **Materials Science and Engineering R**, v.93, p.1–49, 2015.

KOSMIDIS, K.; RINAKI, E.; ARGYRAKIS, P.; MACHERAS, P. Analysis of Case II drug transport with radial and axial release from cylinders. **International Journal of Pharmaceutics**, v.254, p.183–188, 2003a.

KOSMIDIS, K.; ARGYRAKIS, P.; MACHERAS, P. A reappraisal of drug release laws using Monte Carlo simulations: the prevalence of the Weibull function. **Pharmaceutical Research**, v.20, n. 7, p.988-995, 2003b.

KOSMIDIS, K.; ARGYRAKIS, P.; MACHERAS, P. Fractal kinetics in drug release from finite fractal matrices. **J. Chem. Phys.**, v.119, n.12, p.6373-6377, 2003c.

KOZIARA, J. M.; LOCKMAN, P. R.; ALLEN, D. D.; MUMPER, R. J. *In situ* blood-brain barrier transport of nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v.20, n.11, p.1772-1778, 2003.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, p.S77-S98, 2002.

KRONENBERG, H. M.; MELMED, S.; LARSEN, P. R.; POLONSKY, K. S. Princípios de endocrinologia. In: KRONENBERG, H. M., et al. **Williams: tratado de endocrinologia**. 11ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, pg. 2-10.

KURIHARA, A.; SHIBAYAMA, Y.; MIZOTA, A.; YASUNO, A.; IKEDA, M.; HISAOKA, M. Pharmacokinetics of highly lipophilic antitumor agent palmitoyl rhodoxin incorporated in lipid emulsions in rats. **Biol. Pharm. Bull.**, v.19, n.2, p.252-258, 1996.

LAND, L. M.; LI, P.; BUMMER, P. M. The influence of water content of triglyceride oils on the solubility of steroids. **Pharmaceutical Research**, v.22, n.5, p.784-788, 2005.

LAND, L. M.; LI, P.; BUMMER, P. M. Mass transport properties of progesterone and estradiol in model microemulsion formulations. **Pharmaceutical Research**, v.23, n.10, p.2482-2490, 2006.

LANDFESTER, K. Synthesis of collidal particles in miniemulsions. **Annu. Rev. Mater. Res.**, v.36, p.231-279, 2006.

LAUTERBACH, A.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Applications and limitations of lipid nanoparticles in dermal and transdermal drug delivery via the follicular route. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.97, p.152-163, 2015.

LAWRENCE, M. J. Surfactant systems: microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. **European Journal of Drug Metabouism and Pharmacokinetics**, n. 3, p. 257-269, 1994.

LAWRENCE, M. J.; RESS, D. G. Microemulsion-based as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v.64, p.175-193, 2012.

LEE, J. M.; PARK, K. M.; LIM, S. J.; LEE, M. K.; KIM, C. K. Microemulsion formulation of clonixic acid: solubility enhancement and pain reduction. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.54, p.43-49, 2002.

LEE, S. J.; KIM, K. Diffuse reflectance infrared spectra of stearic acid self-assembled on fine silver particles. **Vibrational Spectroscopy**, v.18, p.187-201, 1998.

LEGENDRE, B.; FEUTELAIS, Y.; DEFOSSEMONT, G. Importance of heat capacity determination in homogeneous nucleation: application to progesterone. **Thermochemica Acta.**, v.400, p.213-219, 2003.

LEKSHMI, U. M. D.; POOVI, G.; KISHORE, N.; P. REDDY, N. *In vitro* characterization and in vivo toxicity study of repaglinide loaded poly (methyl methacrylate) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.396, p.194-203, 2010.

LEIMANN, F. V.; BIZ, M. H.; KAUFMANN, K. C.; MAIA, W. J.; GONÇALVES, O. H.; CARDOZO FILHO, L.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H. Characterization of progesterone loaded biodegradable blend polymeric nanoparticles. **Ciência Rural**, v.45, n.11, p.2082-2088, 2015.

LEIMANN, F. V. **Nanopartículas híbridas de polímero natural (PHVB)/polímero sintético**. 2011. 133 f.. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

LIN, K. J.; WU, H. M.; YU, Y. H.; HO, C.Y.; WEI, M. H.; LU, F. H.; TSENG, W. J. Preparation of PMMA-Ni core-shell composite particles by electroless plating on polyelectrolyte-modified PMMA beads. **Applied Surface Science**, v.282, p.741-745, 2013.

LIN, X.; LI, X.; ZHENG, L.; YU, L.; ZHANG, Q.; LIU, W. Preparation and characterization of monoprater nanostructured lipid carriers.

**Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v.311, p.106–111, 2007.

LIU, C.; LIU, D.; BAI, F.; ZHANG, J.; ZHANG, N. *In vitro* and *in vivo* studies of lipid-based nanocarriers for oral N3-o-toluyyl-fluorouracil delivery. **Drug Delivery**, v.17, n.5, p.352–363, 2010.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de polímeros**: determinação de peso molecular e análise térmica. Rio de Janeiro: E-papers, 2001, 366p.

MAGHRABY, G. M. E. Occlusive and non-occlusive application of microemulsion for transdermal delivery of progesterone: mechanistic studies. **Sci Pharm.**, v.80, p.765–778, 2012.

MALIWAL, D.; JAIN, P.; JAIN, A.; PATIDAR, V. Determination of progesterone in capsules by High-Performance Liquid Chromatography and UV- Spectrophotometry. **J. Young Pharm.**, v.4, p.371-374, 2009.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, p.83–101, 2012.

MEMISOGLU-BILENSOY, E.; SEN, MURAT; HINCAL, A. A. Effect of drug physicochemical properties on *in vitro* characteristics of amphiphilic cyclodextrin nanospheres and nanocapsules. **Journal of Microencapsulation**, v.23, n.1, p.59–68, 2006.

MENDES, N.; HUBBER, I.; SIQUEIRA, M.; BARBOSA, G. M.; MOREIRA, D. L.; HOLANDINO, C.; PINTO, J. C.; NELE, M. Preparation and cytotoxicity of poly(methyl methacrylate) nanoparticles for drug encapsulation. **Macromol. Symp.**, v.319, p.34–40, 2012.

MENESES, A. C. **Encapsulação de óleo de cravo em nanopartículas lipídicas e poliméricas em sistema livre de solvente**. 2010. 117 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MENG, F.; ASGHAR, S.; XU, Y.; WANG, J.; JIN, X.; WANG, Z.; WANG, J.; PING, Q.; ZHOU, J.; XIAO, Y. Design and evaluation of lipoprotein resembling curcumin-encapsulated protein-free

nanostructured lipid carrier for brain targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, v.506, p.46–56, 2016.

MOJAHEDIAN, M. M.; DANESHAMOUI, S.; SAMANI, S. M.; ZARGARAN, A. A novel method to produce solid lipid nanoparticles using n-butanol as an additional co-surfactant according to the o/w microemulsion quenching technique. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.174, p. 32–38, 2013.

MOREIRA, T. S.; OLIVEIRA, M. A. M.; ROCHA e LIMA, L. M. T.; SOUZA, M. N.; PINTO, J. C. C. S. Synthesis of nanoparticles loaded with tamoxifen by in situ miniemulsion RAFT polymerization. **Macromol. Symp.**, v.344, p.101–107, 2014.

MOREL, S.; UGAZIO, E.; CAVALLI, R.; GASCO, M. R. Thymopentin in solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.132, p.259-261, 1996.

MORENO, M. A.; FRUTOS, P.; BALLESTEROS, M. P. Lyophilized lecithin based oil-water microemulsions as a new and low toxic delivery system for amphotericin B. **Pharmaceutical Research**, v.18, n.3, 2001.

MORENO, M. A.; BALLESTEROS M. P.; FRUTOS, P. Lecithin-based oil-in-water microemulsions for parenteral use: pseudoternary phase diagrams, characterization and toxicity studies. **J. Pharmaceutical Sciences**, v.92, n.7, p.1428–1437, 2003.

MORITA, T.; ASSUMPTIÇÃO, R. M. V. **Manual de solução, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação**. São Paulo: Edgard Blucher, 2005. 629 p.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; HUGUETTE, P-A.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L-Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. **J. Pharmaceutical Sciences**, v.89, n.5, 2000.

MOULIK, S. P.; PAUL, B. K. Structure, dynamics and transport properties of microemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.78, p.99–195, 1998.

MOUSTAFINE, R. I. Interpolymer combinations of chemically complementary grades of Eudragit® copolymers: a new direction in the desing of peroral solid dosage forms of drug delivery systems with controlled release. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v.45, n.5, p.285-295, 2011

MOUSTAFINE; R. I.; ZAHAROV, I. M.; KEMENOVA, V. A. Physicochemical characterization and drug release properties of Eudragit® E PO/Eudragitw L 100-55 interpolyelectrolyte complexes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.63, p.26–36, 2006.

MÜHLEN, A. Z.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.45, p.149–155, 1998.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.50, p.161–177, 2000.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.242, p.121–128, 2002.

NANDI, I.; BARI, M.; JOSHI, H. Study of isopropyl myristate microemulsion systems containing cyclodextrins to improve the solubility of 2 model hydrophobic drugs. **AAPS PharmSciTech**, v.4, n.1, p.1-9, 2003.

NAOULI, N.; ROSANO, H. L. Nonionic microemulsion: mechanism of formation and percolation. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 30, p.370–378, 2009.

NARANG, A. S.; DELMARRE, D.; GAO, D. Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, p.9–25, 2007.



NASERI, N.; VALIZADEH, H.; ZAKERI-MILANI, P. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application. **Adv Pharm Bull.**, v.5, n.3, p.305–313, 2015.

NORNOO, A. O.; CHOW, D. S.-L.. Cremophor-free intravenous microemulsions for paclitaxel II. stability, in vitro release and pharmacokinetics. **International Journal of Pharmaceutics**, v.349, p.117–123, 2008.

NORNOO, A. O.; OSBORNE, D. W.; CHOW, D. S.-L.. Cremophor-free intravenous microemulsions for paclitaxel I: formulation, cytotoxicity and hemolysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v.349, p.108–116, 2008.

ODDE, K. G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p.817-830, 1990.

ODIAN, G. **Principles of Polymerization**, 4 ed, John Wiley & Sons: New Jersey, USA, 2004, p.465-475.

OLIVEIRA, H. P.; ALBUQUERQUE Jr., J. J. F.; NOGUEIRAS, C.; RIEUMONT, J. Physical chemistry behavior of enteric polymer in drug release systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v.366, p.185–189, 2009.

OLIVEIRA, J. E.; MEDEIROS, E. S.; CARDOZO, L.; VOLL, F.; MADUREIRA, E. H.; MATTOSO, L. H. C.; ASSIS, O. B. G. Development of poly(lactic acid) nanostructured membranes for the controlled delivery of progesterone to livestock animals. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p.844–849, 2013.

PAPADOPOULOU, V.; KOSMIDIS, K.; VLACHOU, M.; MACHERAS, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v.309, p.44–50, 2006.

PARK, K. M., KIM, C. K. Preparation and evaluation of flurbiprofen-loaded microemulsion for parenteral delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.181, p.173–179, 1999.

PATEL, M. N.; LAKKADWALA, S.; MAJRAD, M. S.; INJETI, E. R.; GOLLMER, S. M.; SHAH, Z. A.; BODDU, S. H. S.; NESAMONY, J. Characterization and evaluation of 5-fluorouracil-loaded solid lipid nanoparticles prepared via a temperature-modulated solidification technique. **AAPS PharmSciTech**, v.15, n.6, 2014.

PEIXOTO, A. C. B. **Funcionalização de nanopartículas poliméricas para liberação de medicamentos sítio-dirigida**. 2013. 193 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

PODLOGAR, F.; GAŠPERLIN, M.; TOMŠIĆ, M.; JAMNIK, A.; ROGAC, M. B. Structural characterisation of water–Tween 40/Imwitor 308 – isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v.276, p.115–128, 2004.

POSACI, C.; SMITZ, J.; CAMUS, M.; OSMANAGAOGLU, K.; DEVROEY, P. Progesterone for the luteal support of assisted reproductive technologies: clinical options. **Human Reproduction**, v.15, p.129-148, 2000.

PRINCE, L.M. A theory of aqueous emulsion: I. Negative interfacial tension at the oil/water interface. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 23, p. 165–173, 1967.

PUCCI, V.; BUGAMELLI, F.; MANDRIOLI, R.; LUPPI, B.; RAGGI, M. A. Determination of progesterone in commercial formulations and in non conventional micellar systems. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.30, p.1549-1559, 2003.

PUCEK, A.; LEWIŃSKAB, A.; WILK, K. A. Co-encapsulating solid lipid nanoparticles for multifunctional therapeutics: preparation and characterization. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v.510, p.11–21, 2016.

PUDNEY; P. D. A.; MUTCH, K. J.; ZHU, S. Characterising the phase behaviour of stearic acid and its triethanolamine soap and acid–soap by infrared spectroscopy. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v.11, p.5010–5018, 2009.

RAJOT I.; BÔNE S.; GRAILLAT C.; HAMAIDE T. Nonionic nanoparticles by miniemulsion polymerization of vinyl acetate with oligocaprolactone macromonomer or miglyol as hydrophobe: application to the encapsulation of indomethacin. **Macromolecules**, v.36, p.7484–90, 2003.

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

REN, X.; SVIRSKIS, D.; ALANY, R. G.; ZARGAR-SHOSHTARI, S.; WU, Z. In-situ phase transition from microemulsion to liquid crystal with the potential of prolonged parenteral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 431, p.130–137, 2012.

ROACH, R. E. J.; LIJFERING, W. M.; HELMERHORST, F. M.; CANNEGIETER, S. C.; ROSENDAAL, F. R.; Vlieg, A. V. H. The risk of venous thrombosis in women over 50 years old using oral contraception or postmenopausal hormone therapy. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.11, p.124–131, 2012.

ROMIO, A. P.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H.; AL-HAYDARI, M.; WU, L.; ROCHA, S. R. P. Nanocapsules by miniemulsion polymerization with biodegradable surfactant and hydrophobe. **Macromol. Chem. Phys.**, v.210, p.747–751, 2009a.

ROMIO, A. P.; BERNARDY, N.; SENNA, E. L.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Polymeric nanocapsules via miniemulsion polymerization using redox initiation. **Materials Science and Engineering C**, v.29, p.514–518, 2009b.

ROWE; R. C; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. Medium-chain Triglycerides. p. 429. In: **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6ed. Pharmaceutical Press: London, 2009a.

ROWE; R. C; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. Polyoxyethylene Sorbitan Fatty Acid Esters. p. 549. In: **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6ed. Pharmaceutical Press: London, 2009b.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. Alcohol. p. 17. In: **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6ed. Pharmaceutical Press: London, 2009c.

RUAN, X.; MUECK, A. O. Systemic progesterone therapy: oral, vaginal, injections and even transdermal. **Maturitas**, v.79, p.248–255, 2014.

RUCKENSTEIN, E.; CHI, J. C. Stability of microemulsions. **J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2**, v.71, p.1690-1707, 1975.

SALEM, H. F. Sustained-release progesterone nanosuspension following intramuscular injection in ovariectomized rats. **Int. J. Nanomedicine**, v.5, p.943–954, 2010.

SALMORIA, G. V.; KLAUSS, P.; ZEPON, K. M.; KANIS, L. A. The effects of laser energy density and particle size in the selective laser sintering of polycaprolactone/progesterone specimens: morphology and drug release. **Int. J. Adv. Manuf. Technol.**, v.66, p.1113–1118, 2013.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, v.26, n.5, p.726-737, 2003.

SCHERLUND, M.; MALMSTEN, M.; HOLMQVIST, P.; BRODIN, A. Thermosetting microemulsions and mixed micellar solutions as drug delivery systems for periodontal anesthesia. **International Journal of Pharmaceutics**, v.194, p.103–116, 2000.

SCHMALJOHANN, D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.58, p.1655–1670, 2006.

SCHORK, F. J.; LUO, Y.; SMULDERS, W.; RUSSUM, J. P.; BUTTÉ, A.; FONTENOT, K. Miniemulsion polymerization. **Adv. Polym. Sci.**, v.175, p.129-255, 2005.

SCHULMAN, J.H.; STOECKENIUS, W.; PRINCE, L.M. Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. **J. Phys. Chem.**, v.63, p.1677–1680, 1959.

SCHUMACHER, M.; GUENNOUN, R.; GHOUMARI, A.; MASSAAD, C.; ROBERT, F.; EL-ETR, M.; AKWA, Y.; RAJKOWSKI, K.; BAULIEU, E. E. Novel perspectives for progesterone in hormone replacement therapy, with special reference to the nervous system. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 4, p.387–439, 2007.

SELVAMUTHUKUMAR, S.; VELMURUGAN, R. Nanostructured lipid carriers: a potential drug carrier for cancer chemotherapy. **Lipids in Health and Disease**, v.11, n.159, p.2-8, 2012.

SHAH, S. N. H.; ASGHAR, S.; CHOUDHRY, M. A.; AKASH, M. S. H.; REHMAN, N.; BAKSH, S.. Formulation and evaluation of natural gum-based sustained release matrix tablets of flurbiprofen using response surface methodology. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.35, n.12, p.1470–1478, 2009.

SHINDE, R. L.; JINDAL, A. B.; DEVARAJAN, P. V. Microemulsions and nanoemulsions for targeted drug delivery to the brain. **Current Nanoscience**, v.7, p.119-133, 2011.

SHINODA, K.; FRIBERG, S. Microemulsions: colloidal aspects. **Advances in Colloid and interface Science**, v. 4, p.281-300, 1975.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, p.163–174, 2012.

SILVEIRA, A. M.; PONCHEL G.; POISIEUX, F.; DUCHÊNE, D. Combined poly(isobutylcyanoacrylate) and cyclodextrins nanoparticles for enhancing the encapsulation of lipophilic drugs. **Pharmaceutical research**, v. 15, n.7, p.1051-1055, 1998.

SINGH, M.; SU, C. Progesterone and neuroprotection. **Hormones and Behavior**, v. 63, p.284–290, 2013.

STEINMACHER, F. R.; BERNARDY, N.; MORETTO, J. B.; BARCELOS, E. I.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Kinetics of MMA and VAc miniemulsion polymerizations using miglyol and castor oil as hydrophobe and liquid core. **Chem. Eng. Technol.**, v.33, n.11, p.1877–1887, 2010.

STEINMACHER, F. R. **Síntese de nanopartículas de poli(acetato de vinila) via polimerização em miniemulsão**. 2010. 171 f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

STRICKLEY, R. G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. **Pharmaceutical Research**, v.21, n.2, p.201-230, 2004.

STUART, B. **Infrared spectroscopy: fundamentals and applications**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 203p.

SWIFT, T.; SWANSON, L.; GEOGHEGAN, M.; RIMMER, S. The pH-responsive behaviour of poly(acrylic acid) in aqueous solution is dependent on molar mass. **Soft Matter**, v.12, p.2542-2549, 2016.

TALEGAONKAR, S.; AZEEM, A.; AHMAD, F. J.; KHAR, R. K.; PATHAN, S. A.; KHAN, Z. I. Microemulsions: a novel approach to enhanced drug delivery. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 2, p.238-257, 2008.

TAVANIOTOU, A.; SMITZ, J.; BOURGAIN, C.; DEVROEY, P. Comparison between different routes of progesterone administration as luteal phase support in infertility treatments. **Human Reproduction Update**, v.6, n. 2, p.139-148, 2000.

TIAN, Q.; REN, F.; XU, Z.; XIE, Y.; ZHANG, S. Preparation of high solubilizable microemulsion of naproxen and its solubilization mechanism. **International Journal of Pharmaceutics**, v.426, p.202–210, 2012.

TIARKS, F.; LANDFESTER, K.; ANTONIETTI, M. Preparation of polymeric nanocapsules by miniemulsion polymerization. **Langmuir**, v.17, p.908-918, 2001

TORZA, S.; MASON, S. G. Three-phase interactions in shear and electrical fields. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.33, n.1, p.67-83, 1970.

TRIVEDI, R.; KOMPELLA, U. B. Nanomicellar formulations for sustained drug delivery: strategies and underlying principles. **Nanomedicine**, v.5, n.3, p.485–505, 2010.

TSAI, Y. H.; LEE, K. F.; HUANG, Y. B.; HUANG, C. T.; WU, P. C. In vitro permeation and in vivo whitening effect of topical hesperetin microemulsion delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v.388, p.257–262, 2010.

U.S.FDA. Food and Drug Administration. **Guidance for industry: Q3C** tables and list. Silver Spring: U.S. Department of Health and Human Services, 2012, 8p.

USP. United States Pharmacopeia Convention. **Herbal medicines compendium: validation of compendial methods**, 1225. Disponível em: <https://hmc.usp.org/about/general-chapters>. Acessado em: 19 fev. 2016.

VALLE, E. R. **O ciclo estral de bovinos e métodos de controle**. Campina Grande: Embrapa – CNPGC, 1991, 24p.

VANDAMME, Th. F. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. **Progress in Retinal and Eye Research**, v.21, p.15–34, 2002.

VIDALES, M. J. M.; BARBA, S.; SÁEZ, C.; CANIZARES, P.; RODRIGO, M. A. Coupling ultraviolet light and ultrasound irradiation with Conductive-Diamond Electrochemical Oxidation for the removal of progesterone. **Electrochimica Acta**, v.140, p.20–26, 2014.

VIGO, F.; LUBIANCA, J. N.; CORLETA, H. V. E. Progestógenos: farmacologia e uso clínico. **Femina**, v.39, n.3, p.127-137, 2011.

WEBER, S.; ZIMMER, A.; PARDEIKE, J. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for pulmonary application: a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.86, p.7–22, 2014.

WHISNANT, C. S.; BURNS, P. J. Evaluation of steroid microspheres for control of estrus in cows and induction of puberty in heifers. **Theriogenology**, v. 58, p. 1229 – 1235, 2002.

WINSOR, P.A. Hydrotropy, solubilisation and related emulsification processes. **J. Chem. Soc. Faraday Trans.** v. 44, n 1, p. 376–398, 1948.

WISSING, S.A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.1257–1272, 2004.

WU, X. Q.; SCHORK, F. J.; GOOCH, J. W. Hybrid miniemulsion polymerization of acrylic/alkyd systems and characterization of the resulting polymers. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v.37, p.4159–4168, 1999.

WU, Z.; ALANY, R. G.; TAWFEEK, N.; FALCONER, J.; ZHANG, W.; HASSAN, I. M.; RUTLAND, M.; SVIRSKI, D. A study of microemulsions as prolonged-release injectables through in-situ phase transition. **Journal of Controlled Release**, v.174, p.188–194, 2014.

WU, Z.; TUCKER, I. G.; RAZZAK, M.; MCSPORRAN, K.; MEDLICOTT, N. J. Tissue compatibility and pharmacokinetics of three potential subcutaneous injectables for low-pH drug solutions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.62, p. 873–882, 2010.

WU, Z.; ZHANG, C.; YANG, C.; ZHANG, X.; WU, E. Simultaneous quantitative determination of norgestrel and progesterone in human serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. **Analyst**, v.125, p.2201–2205, 2000.

YASIR, M.; SARA, U. V. S. Solid lipid nanoparticles for nose to brain delivery of haloperidol: in vitro drug release and pharmacokinetics evaluation. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v.4, n.6, p.454–463, 2014.

YIV, S. H.; TUSTIAN, A. K. **Drug delivery compositions suitable for intravenous injection**. Patent Application Publication US 6245349. 23 fev. 1996; 12 jun. 2001.

YONCHEVA, K.; KONDEVA-BURDINA, M.; TZANKOVA, V.; PETROV, P.; LAOUANI, M.; HALACHEVA, S. Curcumin delivery from poly(acrylic acid-co-methyl methacrylate) hollow microparticles prevents dopamine-induced toxicity in rat brain synaptosomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v.486, p.259–267, 2015.

YOON, G.; PARK, J. W.; YOON, I. S. Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs): recent advances in drug



delivery. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v.43, p.353–362, 2013.

YUAN, H.; WANG, L.; DU, Y.; YOU, J.; HU, F.; ZENG, S. Preparation and characteristics of nanostructured lipid carriers for control-releasing progesterone by melt-mulsification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.60, p.174–179, 2007.

ZHANG, C.; PENG, F.; LIU, W.; WAN, J.; WAN, C.; XU, H.; LAM, C. W.; YANG, X. System for triptolide: induced changes in pharmacokinetics profile associated with reduced toxicity in male rats. **International Journal of Nanomedicine**, v.9, p.1049–1063, 2014a.

ZHANG, X.; BOISSON, F.; COLOMBANI, O.; CHASSENIEUX, C.; CHARLEUX, B. Synthesis of amphiphilic poly(acrylic acid)-b-poly(n-butyl acrylate-co-acrylic acid) block copolymers with various microstructures via RAFT polymerization in water/ethanol heterogeneous media. **Macromolecules**, v.47, p.51–60, 2014b.

ZHANG, T.; STURGIS, T. F.; YOUAN, B. C. pH-responsive nanoparticles releasing tenofovir intended for the prevention of HIV transmission. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.79, p.526–536, 2011.

ZIEGLER, A.; LANDFESTER, K.; MUSYANOVYCH, A. Synthesis of phosphonate-functionalized polystyrene and poly(methyl methacrylate) particles and their kinetic behavior in miniemulsion polymerization. **Colloid Polym Sci.**, v.287, p.1261–1271, 2009.

ZOPPETTI, G.; PUPPINI, N.; OSPITALI, F.; FINI, A. Solid state characterization of progesterone in a freeze dried 1:2 progesterone/HPBCD mixture. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.96, p.1729–1736, 2007.



## APÊNDICE I

### Validação de Método para Determinação de Progesterona em Estudos de Liberação *In Vitro*

#### *Validação do Método Analítico*

A validação de método para quantificação de progesterona em protocolos de liberação *in vitro* seguiu os critérios estabelecidos pela Conferência Internacional de Padronização de Requerimentos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos de Uso Humano (*International Conference on Harmonisation-ICH of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) (ICH, 2005), já abordados no Capítulo 3.

Os ensaios foram realizados de modo a avaliar a linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). As análises foram realizadas na UTFPR *Campus* Campo Mourão/PR, no Laboratório do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, utilizando Espectrofotômetro Ocean Optics modelo USB-650-UV-VIS Red Tide com largura de banda espectral 3 nm e exatidão do comprimento de onda  $\pm 1,5$  nm.

Para o estudo da linearidade foram obtidas três curvas construídas em dias diferentes. Em cada curva, solução padrão de progesterona contendo  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  foi preparada em SDS 5% e posteriormente diluída em cinco concentrações diferentes, variando de 1 a  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $n = 15$ ). Cada concentração foi determinada em triplicada, considerou-se a média desses pontos. A análise foi realizada utilizando espectrofotometria UV com leituras em 253 nm. A linearidade foi avaliada por meio de regressão linear e a qualidade do ajuste do modelo foi verificada por análise de variância (ANOVA).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram definidos nos itens 3.2.3.3 e 3.2.3.4 (Cap. 3), respectivamente e calculados por meio das Equações (1) e (2). A Recuperação, definida pela Equação (4), foi utilizada para estimar a exatidão por meio de análises em 3 níveis de concentrações com 6 repetições cada.

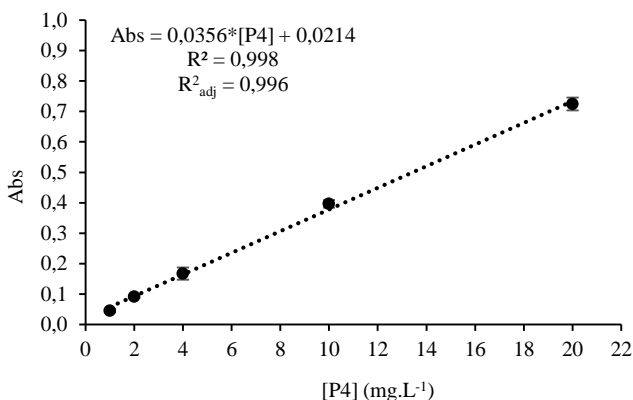
A precisão foi avaliada com base no Desvio padrão relativo (DPR) (Equação (3)), conforme definido no item 3.2.3.5 (Cap. 3). A precisão intermediária foi realizada com a repetição do procedimento analítico em 3 níveis de concentrações com 6 repetições cada, com procedimento realizado no mesmo dia e pelo mesmo analista e equipamento. A reprodutibilidade interlaboratorial foi avaliada com a reprodução das

análises no Laboratório de Análise Instrumental da UTFPR *Campus* Campo Mourão/PR, com espectrofotômetro Ocean Optics modelo USB-650-UV-VIS Red Tide.

*Resultados de Linearidade, Limites de Quantificação (LQ) e Detecção (LD)*

Na Figura 47 é apresentada a curva padrão obtida no teste de linearidade. A análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 33, confirmou que a regressão linear foi significativa ( $F_{\text{calculado}} \gg F_{\text{crítico}}$ ). O modelo também não apresentou sinais de falta de ajuste, uma vez que o valor de  $F_{\text{crítico}}$  foi maior que o  $F_{\text{calculado}}$  para um nível de significância de 0,05.

**Figura 47**– Curva padrão para quantificação da progesterona em SDS 5%.



**Tabela 33** - Análise de Variância para o teste de linearidade.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valores de F	
				$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{crítico}}^a$
Regressão	0,940831	1	0,940831	3188,772	4,67
Resíduos	0,003836	13	0,000295		
Falta de Ajuste	0,001772	3	0,000591	2,863090	3,71
Erro puro	0,002063	10	0,000206		
Total	0,944667	14			

<sup>a</sup>Valores críticos de F para o teste ANOVA unilateral ( $p < 0,05$ ).

- Limite de detecção (LD) = 0,377 mg.L<sup>-1</sup>

- Limite de quantificação (LQ) = 1,143 mg.L<sup>-1</sup>

### Resultados de Precisão e Exatidão

Os resultados de repetibilidade e exatidão são apresentados na Tabela 34. As análises de precisão intermediária (intralaboratorial) e reprodutibilidade (interlaboratorial) são apresentadas na Tabela 35, por meio do desvio padrão relativo (DPR).

**Tabela 34** - Avaliação da repetibilidade e exatidão do método em três níveis de concentração.

Amostra	C (mg.L <sup>-1</sup> )	C (mg.L <sup>-1</sup> )	C (mg.L <sup>-1</sup> )
Padrão	1,5	4,0	20,0
1	1,3	4,1	19,4
2	1,2	4,0	19,4
3	1,4	3,9	19,4
4	1,1	4,0	19,3
5	1,3	4,1	19,3
6	1,3	4,1	19,2
Média (mg.L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	1,3 ± 0,1	4,0 ± 0,1	19,3 ± 0,1
DPR (%) <sup>2</sup>	7,3	2,1	0,5
Rec. (%) <sup>3</sup>	84,8 ± 6,2	100,9 ± 2,1	96,7 ± 0,4

<sup>1</sup> Média ± desvio padrão; <sup>2</sup> Desvio padrão relativo; <sup>3</sup> Recuperação.

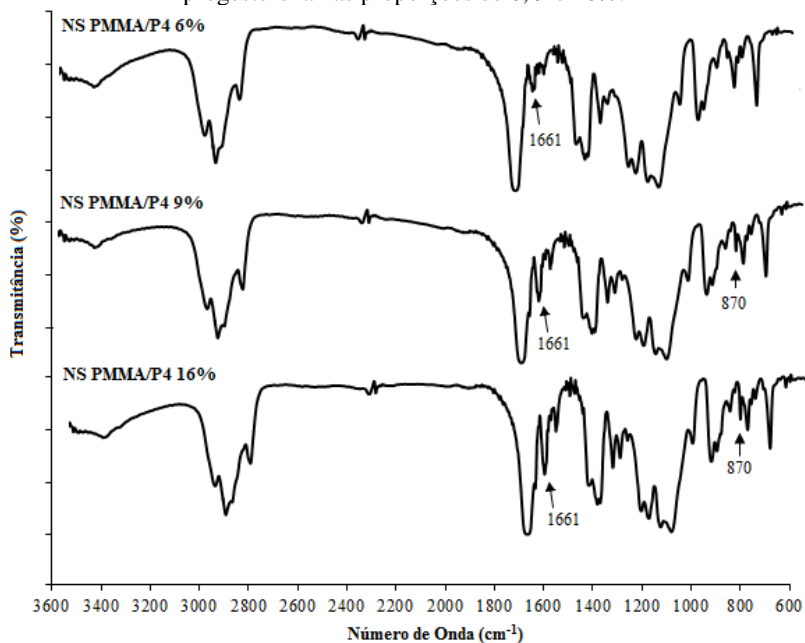
**Tabela 35** – Avaliação de precisão intermediária e reprodutibilidade do método. Resultados expressos em desvio padrão relativo (DPR, %) (n = 6).

C Padrão (mg.L <sup>-1</sup> )	Dia 1/Analista A/Lab. I	Dia 2/Analista A/Lab. I	Analista B/Lab. I	Lab. II
1,5	7,35	6,97	9,97	9,87
4,0	3,02	2,13	5,47	5,56
20,0	0,60	0,45	1,02	1,49

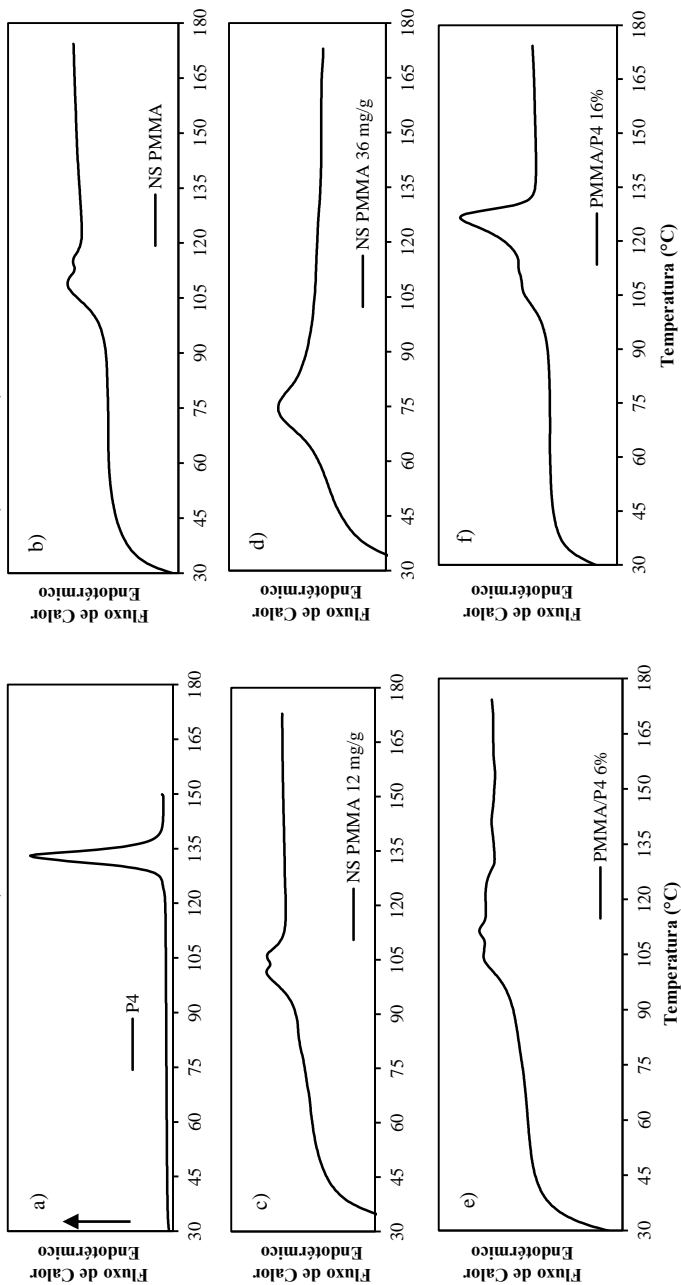
De acordo com a Resolução n°899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), que estabelece um guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, o limite máximo aceitável para o desvio padrão relativo (DPR) em ensaios de precisão é 5%. Esse parâmetro foi obtido para concentrações acima de 1,5 mg.L<sup>-1</sup> nos ensaios de repetibilidade. Amostras com concentração próxima ao limite de quantificação podem apresentar maiores desvios.



## APÊNDICE II

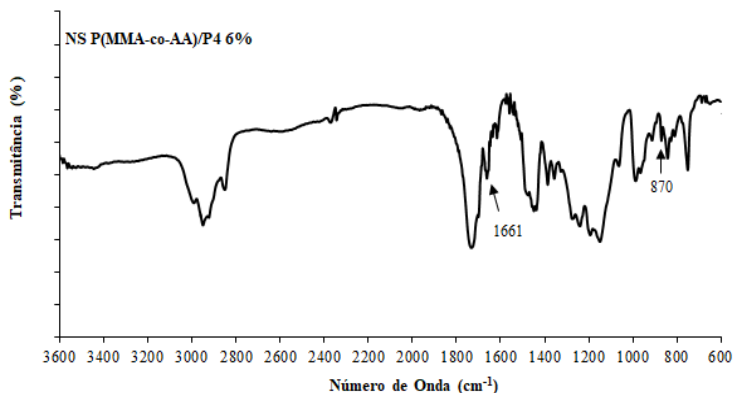
**Dados de FTIR e DSC da Mistura Física de Partículas Poliméricas/P4 e Lipídeos/P4****Figura 48**– FTIR da mistura física de nanopartículas (NS) de PMMA Ref. com progesterona nas proporções de 6, 9 e 16%.

**Figura 49**– DSC (1<sup>o</sup> rampa de aquecimento) de: a) P4; b) NS PMMA Ref.; c) NS PMMA c/ 12 mg<sub>P4</sub>·g<sub>átex</sub><sup>-1</sup> (6% de P4 em sólidos); d) NS PMMA c/ 36 mg<sub>P4</sub>·g<sub>átex</sub><sup>-1</sup> (16% de P4 em sólidos); e) mistura física NS PMMA Ref. e P4 (6% de P4); f) mistura física NS PMMA Ref. e P4 (16% de P4).

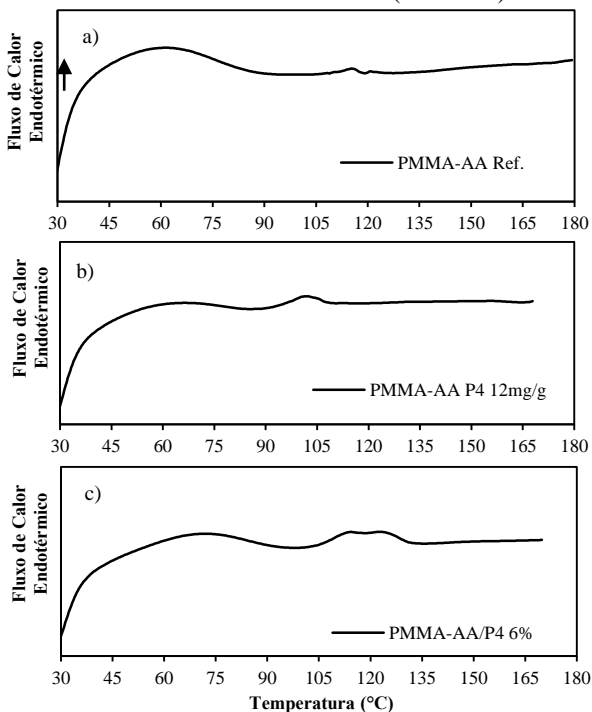




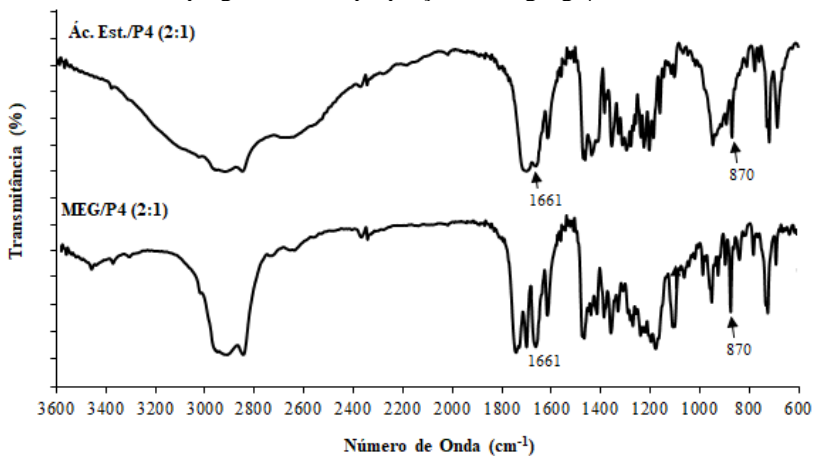
**Figura 50**– FTIR da mistura física de nanopartículas (NS) de P(MMA-co-AA) Ref. com P4 na proporção de 6%.



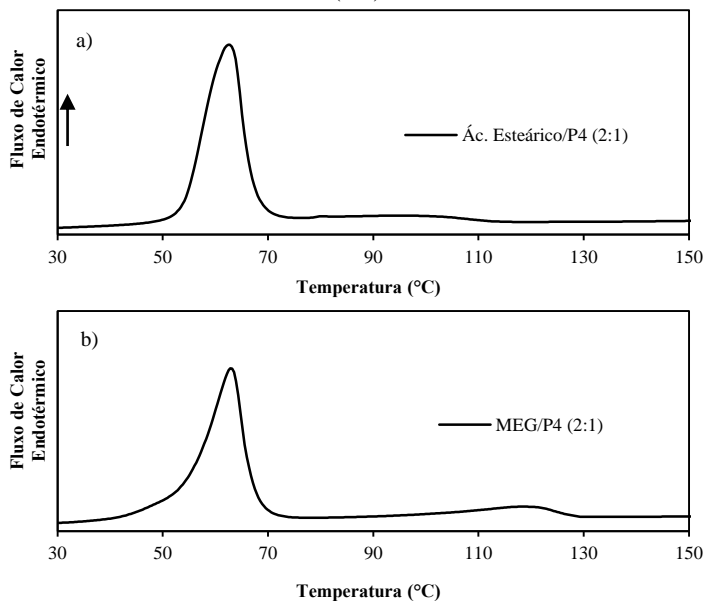
**Figura 51**– DSC (1° rampa de aquecimento): a) NS PMMA-co-AA Ref.; b) NS PMMA-co-AA c/ 12 mg<sub>P4</sub>·g<sub>Látex</sub><sup>-1</sup> (6% de P4 em sólidos); c) mistura física NS PMMA-co-AA Ref. e P4 (6% de P4).



**Figura 52**– FTIR da mistura física de lipídeos sólidos (ácido esteárico; MEG) e progesterona na proporção de 0,5g<sub>P4</sub>.g<sub>Lipídeo</sub>.



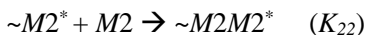
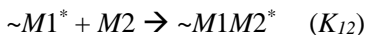
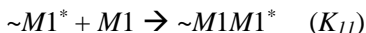
**Figura 53**– DSC (1<sup>o</sup> rampa de aquecimento) de: a) mistura física de ácido esteárico e P4 0,5g<sub>P4</sub>.g<sub>Lipídeo</sub> (2:1); b) mistura física de MEG e P4 0,5g<sub>P4</sub>.g<sub>Lipídeo</sub> (2:1).



## APÊNDICE III

### Cálculo Teórico da Incorporação de Comonômero

As reações abaixo representam o modelo terminal de copolimerização (ou modelo Markov de primeira ordem) para dois monômeros (ODIAN, 2004):



Onde:

$\sim M1\cdot$  = Cadeia em crescimento cujo último monômero incorporado foi 1;

$\sim M2\cdot$  = Cadeia em crescimento cujo último monômero incorporado foi 2;

$K_{ij}$  = constante cinética da reação

As razões de reatividade são definidas por:

$$r_I = \frac{K_{11}}{K_{12}}$$

$$r_{II} = \frac{K_{22}}{K_{21}}$$

$r$  = razão de reatividade (preferência entre homopolimerização e copolimerização).

Sendo 1 = MMA; 2 = AA, os valores das razões de reatividade a 25 °C são  $r_I = 0,418$  e  $r_{II} = 1,73$  (BRANDRUP; IMMERGUT; GRULKE (2003). Em estado estacionário, define-se a equação de composição do copolímero como (ODIAN, 2004):

$$F_o = \frac{d[m_1]}{d[m_2]} = \frac{M_1 \times (r_1 \times M_1 + M_2)}{M_2 \times (r_2 \times M_2 + M_1)}$$

Onde:

$F_o$  = razão molar entre os dois monômeros no copolímero

$M_i$  = concentração molar do monômetro  $i$

$[m_i]$  = concentração molar do mero  $i$  no copolímero

Sendo  $M_1 = 1,62 \text{ mol.L}^{-1}$  (MMA) e  $M_2 = 0,25 \text{ mol.L}^{-1}$  (AA), temos que:

$$\frac{[m_1]}{[m_2]} = 2,93$$

Logo:

$$\frac{[m_2]}{[m_1]} = 0,342 = 34,2\% \text{ de AA em relação a MMA}$$

A estimativa teórica da composição para uma cadeia de copolímero com 100 meros seria:

$$[m_1] + [m_2] = 100$$

$$2,93 * [m_2] + [m_2] = 100$$

$$[m_2] = 25,4 \text{ meros de AA}$$

Ou seja, aproximadamente 25% de AA na cadeia polimérica. Em cada 100 unidades na cadeia polimérica, 25 são de AA.

## APÊNDICE IV

### Determinação da Distribuição da Fração Molar de Ácido Acrílico no Látex de P(MMA-co-AA)

#### *Padronização de Soluções*

A solução foi preparada com 2,0408 g de NaOH em 500 mL de água deionizada (condutividade 0,05  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). A padronização foi realizada com hidrogenoftalato de potássio ( $\text{MM} = 204,22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), conforme Morita; Assumpção (2005). Na Tabela 36 são apresentados os resultados da padronização.

**Tabela 36** – Padronização de solução de NaOH.

Rep.	Hidrog. de Potássio (g)	nº mols	Vol. NaOH (mL)	M NaOH (mol.L <sup>-1</sup> )
1	0,1731	0,0008476	9,7	0,0874
2	0,2076	0,0010166	11,6	0,0876
3	0,2014	0,0009862	11,5	0,0858
<b>Média</b>				<b>0,087</b>
<b>Desvio Padrão</b>				<b>0,001</b>

A solução de HCl foi padronizada com a solução de NaOH padronizada, conforme Tabela 37.

**Tabela 37** – Padronização de solução de HCl.

Rep.	Vol. Sol. HCl	Vol. NaOH 0,087 M	M HCl (mol.L <sup>-1</sup> )
1	10	14,8	0,129
2	10	14,9	0,130
3	10	14,9	0,130
<b>Média</b>			<b>0,129</b>
<b>SD</b>			<b>0,001</b>

#### *Teor de Ácido Acrílico na Amostra de Análise*

Com base na massa do monômero ácido acrílico adicionado à formulação foi possível estimar o número de mols total contido em 1 g de

de látex. Essa estimativa refere-se à quantidade teórica total de unidades carboxílicas de AA presentes em amostra de látex, independente da forma que se encontra, se livre (não reagido), em oligômeros solúveis ou inserido no polímero que forma as nanopartículas.

**Tabela 38** – Quantidade total de unidades de ácido acrílico por grama de látex

<b>Massa AA amostra (g)</b>	1,1119
<b>Massa meio reacional (g)</b>	60,3600
<b>AA (g/glátex)</b>	0,0184
<b>AA (mol/glátex)</b>	<b>2,557E-04</b>

Com base no número de mols de AA presente em 1 g de látex, apresentado na Tabela 39, estima-se a quantidade na amostra de análise realizada em triplicata:

**Tabela 39** – Quantidade de unidades de ácido acrílico presente na amostra

<b>Amostra</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Massa látex (g)</b>	2,0649	2,0071	2,0436
<b>Mols AA (amostra)</b>	5,279E-04	5,131E-04	5,225E-04

### *Ionização do Ácido Acrílico Devido a Constante de Ionização*

Assumindo o  $pK_a$  do copolímeros P(MMA-co-AA) igual ao do PAA (4,5) (SWIFT et al., 2016), e sendo  $pK_a = -\log K_a$ , a constante de ionização ( $K_a$ ) é 3,1622E-05. Sendo  $K_a$  definido por:

$$K_a = \frac{[H^+][AA^-]}{[AA]}$$

Quando a amostra é diluída em água deionizada e atinge o equilíbrio, a quantidade de íons  $H^+$  é estequiometricamente igual aos íons  $AA^-$ , logo:

$$[H^+] = \sqrt{K_a * [AA]}$$

Dado o  $n^\circ$  de mols total de cada amostra na Tabela 39, a estimativa do  $n^\circ$  de mols ionizados na amostra foi apresentada na Tabela 40 abaixo:

**Tabela 40** – Estimativa teórica da fração de H<sup>+</sup> ionizado no látex diluído devido à constante de ionização.

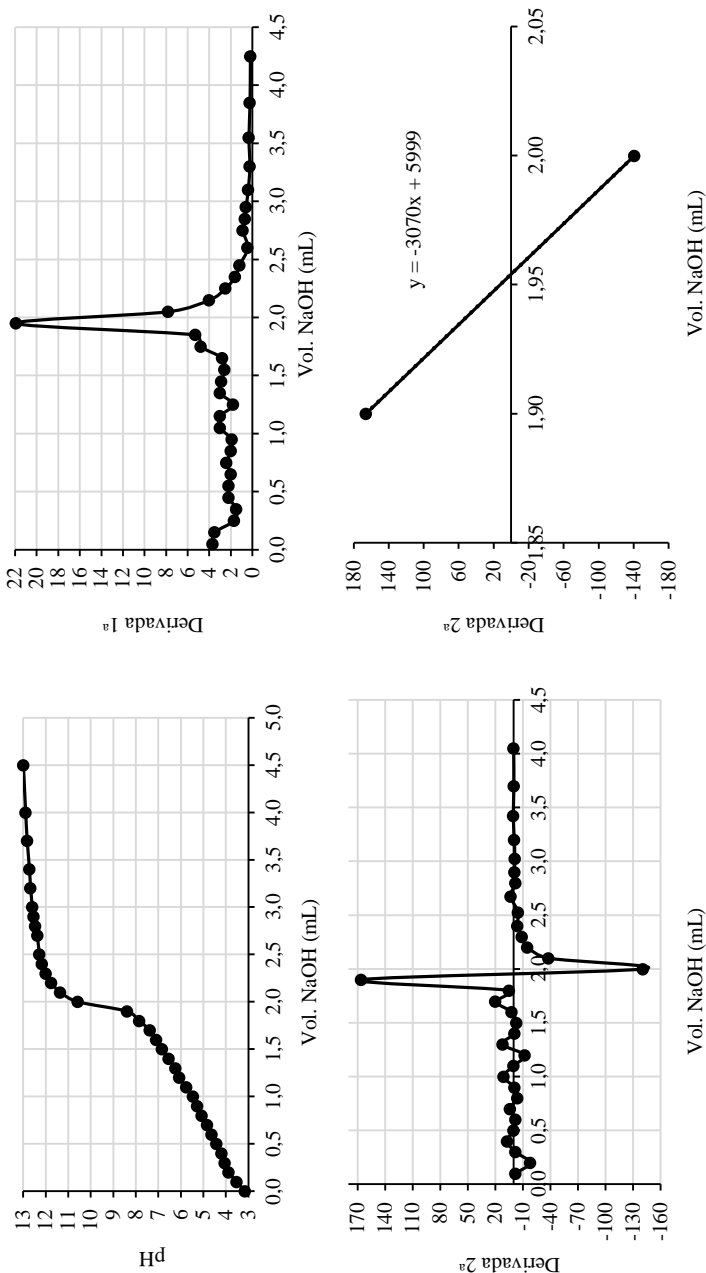
<b>Amostra</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Mols AA (amostra)</b>	5,279E-04	5,131E-04	5,225E-04
<b>Vol. Diluído (mL)</b>	17	17	15
<b>[AA] (mol.L<sup>-1</sup>)</b>	0,0311	0,0302	0,0307
<b>[H<sup>+</sup>] ionizado (mol.L<sup>-1</sup>)</b>	9,910E-04	9,770E-04	9,858E-04
<b>pH = -log [H<sup>+</sup>]</b>	3,00	3,01	3,01
<b>H<sup>+</sup> ionizado (mol)</b>	1,685E-05	1,661E-05	1,676E-05
<b>Fração H<sup>+</sup> ionizado</b>	0,032	0,032	0,032

A estimativa teórica da fração de H<sup>+</sup> ionizado na amostra de látex diluído foi de 3,2% do total de AA presente. Logo, essa fração está incluída no total de cargas ácidas tituladas na fase aquosa.

*Resultados da Análise de Grupos de Ácido Carboxílico por Titulação Potenciométrica*

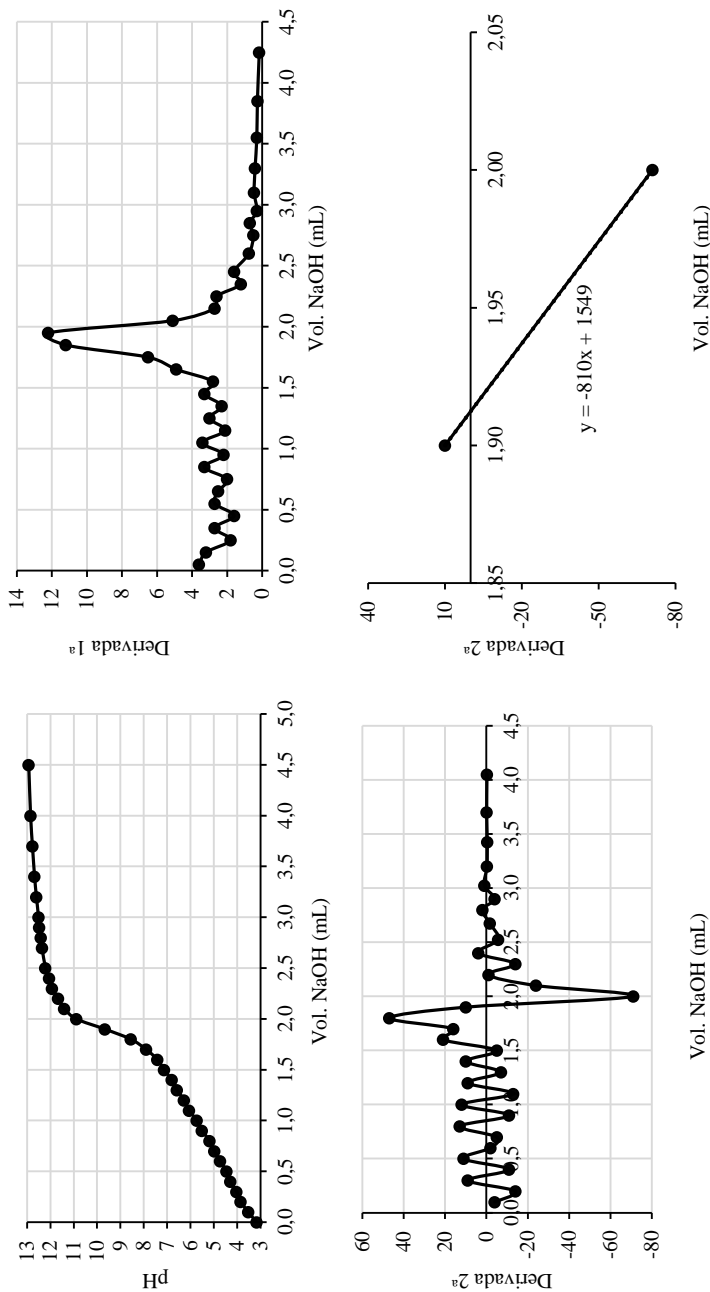
As análises por titulometria foram realizadas conforme procedimento descrito no item 5.2.3, adaptado de Zhang et al. (2014b), porém com alterações. Os dados da titulação da fase aquosa são apresentados nas Figura 54, Figura 55, Figura 56, para as amostras 1, 2 e 3, respectivamente. As titulações da fase polimérica (nanopartículas) são apresentadas nas Figura 57, Figura 58, Figura 59.

**Figura 54**– Dados da titulação potenciométrica da fase aquosa com NaOH 0,087 M para a amostra 1.

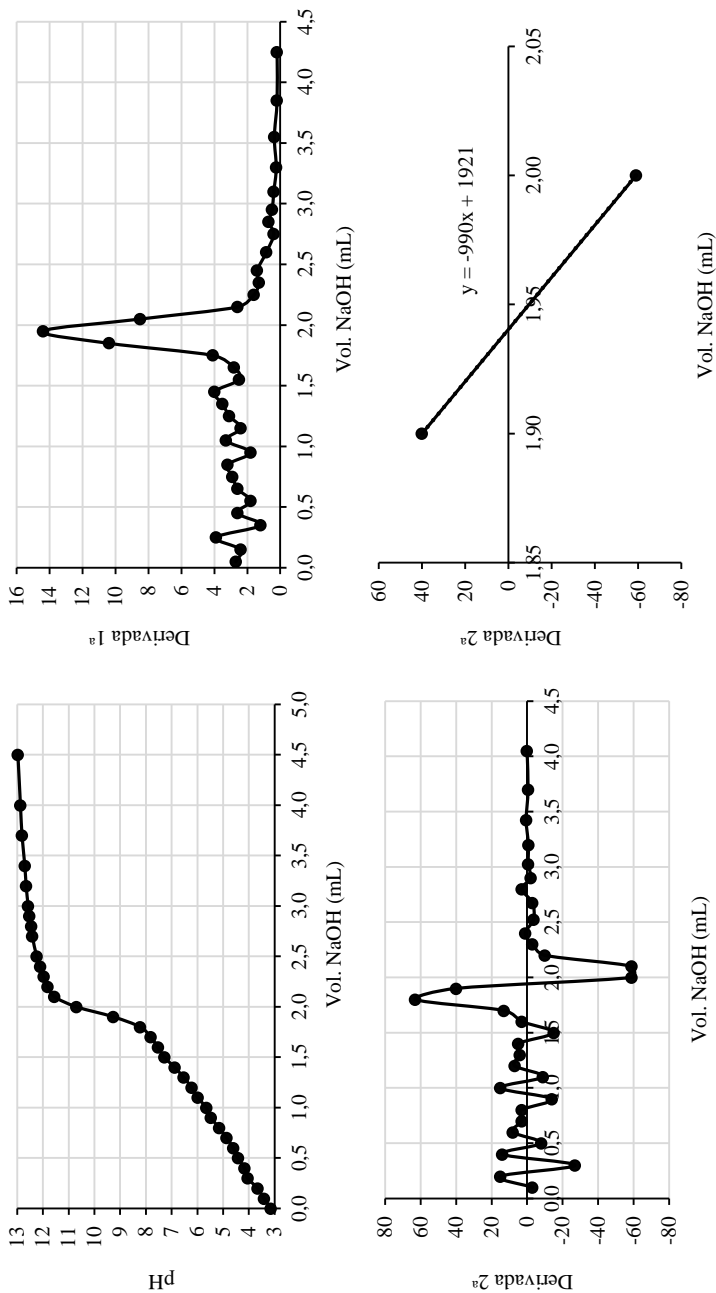




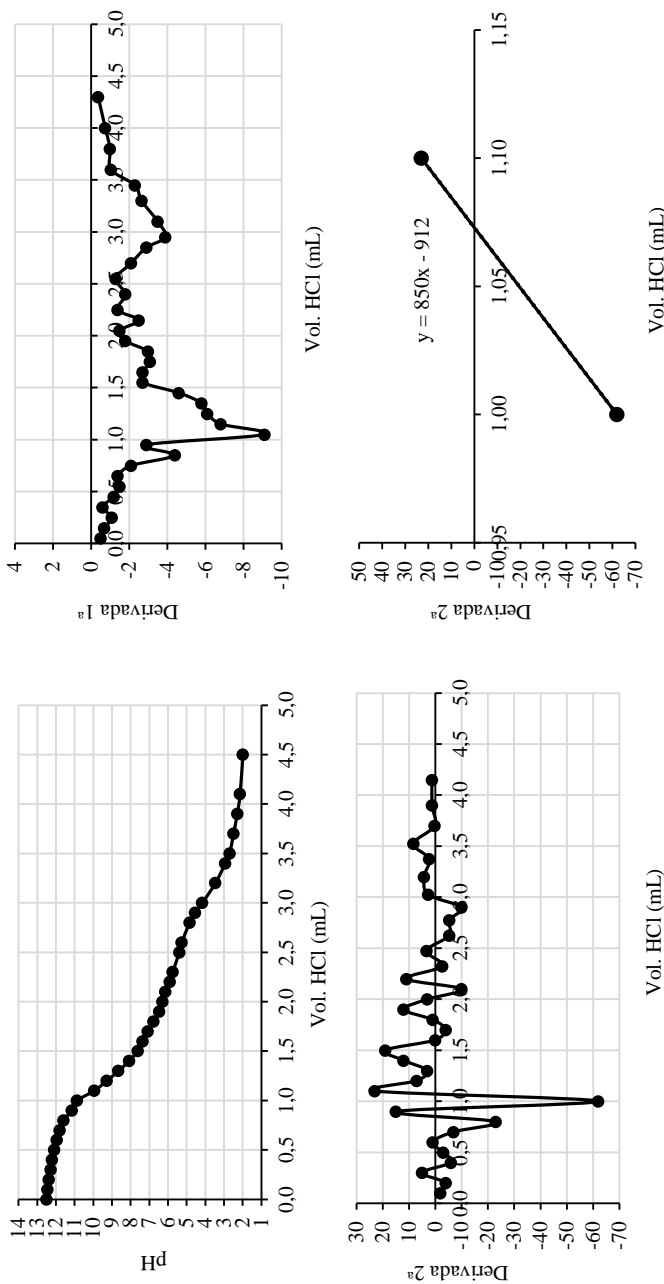
**Figura 55**– Dados da titulação potenciométrica da fase aquosa com NaOH 0,087 M para a amostra 2.



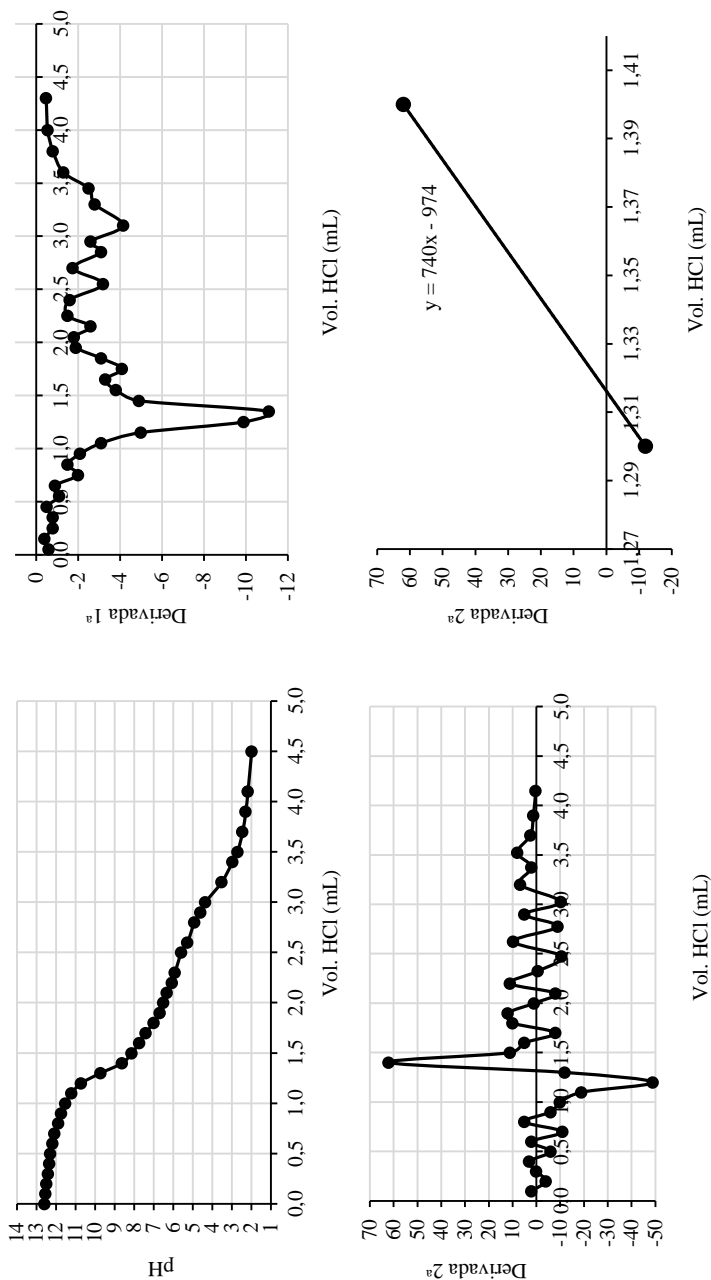
**Figura 56**– Dados da titulação potenciométrica da fase aquosa com NaOH 0,087 M para a amostra 3.



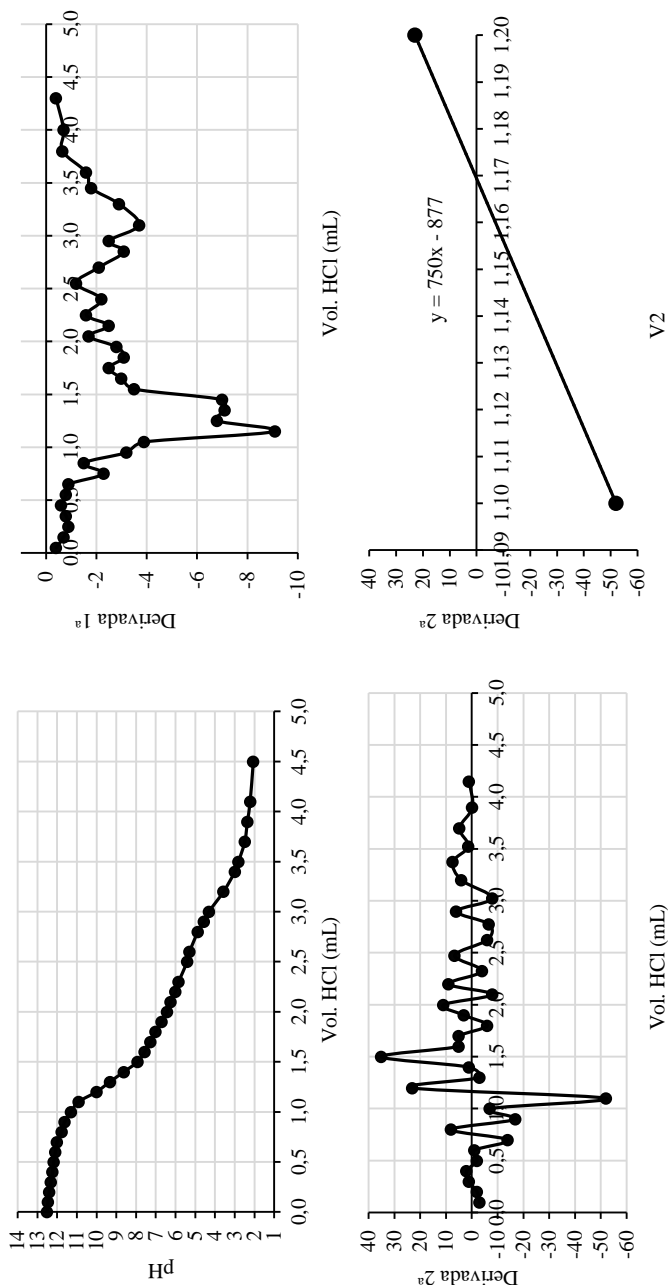
**Figura 57**– Dados da titulação potenciométrica da fase polimérica (nanopartículas) com HCl 0,129 M para a amostra 1.



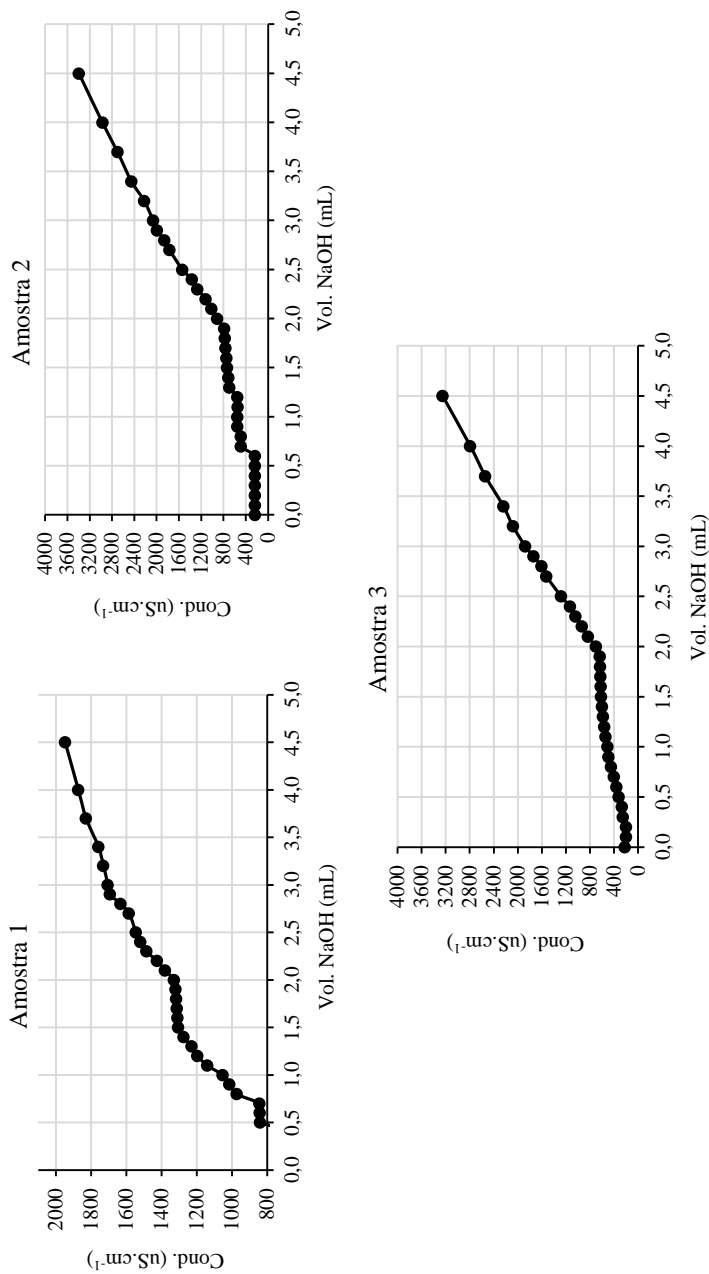
**Figura 58**– Dados da titulação potenciométrica da fase polimérica (nanopartículas) com HCl 0,129 M para a amostra 2.



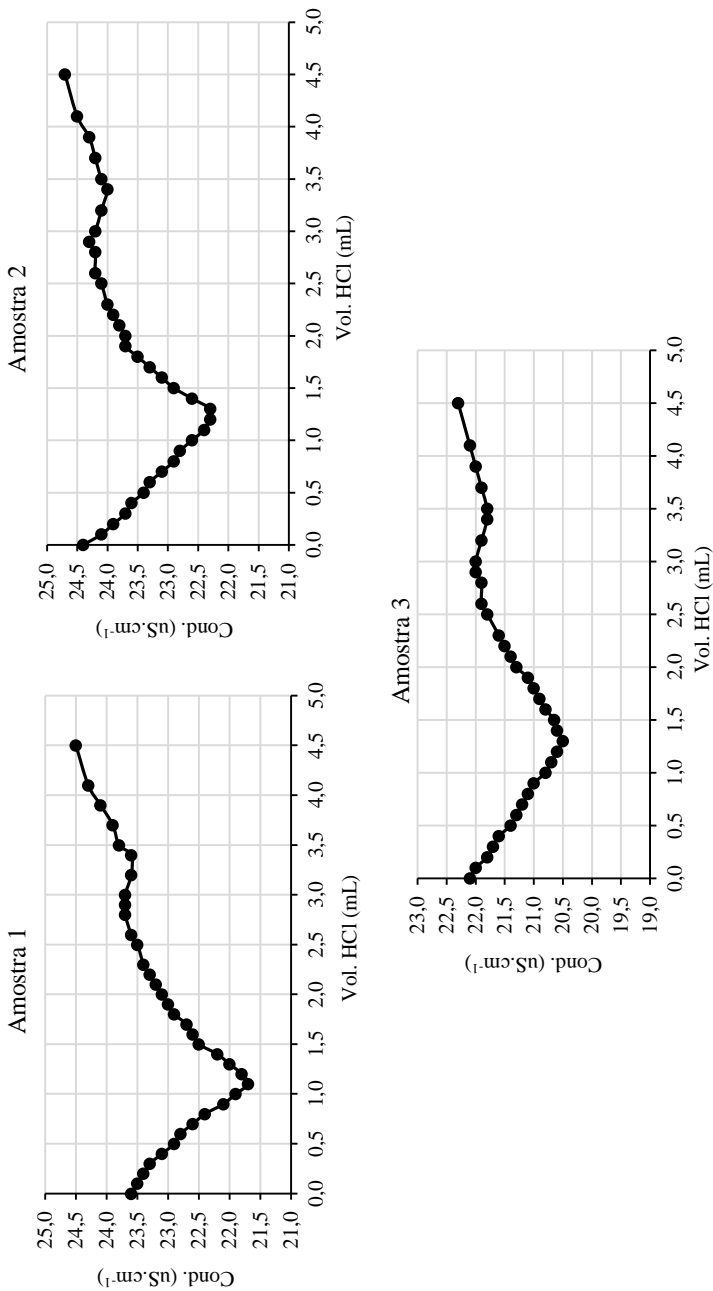
**Figura 59**– Dados da titulação potenciométrica da fase polimérica (nanopartículas) com HCl 0,129 M para a amostra 3.



**Figura 60**– Dados da titulação condutimétrica da fase aquosa com NaOH 0,087 M.



**Figura 61** – Dados da titulação condutimétrica da fase polimérica (nanopartículas) com HCl 0,129 M.



O ponto de equivalência foi determinado por meio da 1ª e 2ª derivada nos dados de titulação potenciométrica. Na Tabela 41 são apresentados os resultados obtidos para a titulação na fase aquosa (AA solúvel) e a Tabela 42 para as titulações na fase polimérica (AA presente nas partículas – cargas expostas).

**Tabela 41** – Determinação de grupos ácidos e estimativa da fração molar de ácido acrílico na fase aquosa.

<b>Amostra</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Vol. NaOH (0,087 M) gasto (mL)	1,954	1,912	1,940
Grupos ácidos na fase aquosa (mol)	1,70E-04	1,66E-04	1,69E-04
<b>Fração de AA estimada (mol/mol)*</b>	<i>0,322</i>	<i>0,324</i>	<i>0,323</i>
<b>Média ± Desvio Padrão</b>			<b>0,323 ± 0,001</b>

\* Estimativa considerado que todo grupo ácido titulado na fase aquosa é decorrente de uma unidade de ácido acrílico, podendo estar na forma monomérica, associado a oligômeros solúveis na fase aquosa ou H<sup>+</sup> ionizado de meros de ácido acrílico ligados às cadeias poliméricas em camadas mais externas (expostas) das partículas.

**Tabela 42** – Determinação de grupos ácidos e estimativa da fração molar de ácido acrílico na fase polimérica.

<b>Amostra</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
NaOH adicionado (mol)	4,35E-04	4,35E-04	4,35E-04
Vol. HCl (0,129 M) gasto (mL)	1,073	1,316	1,169
NaOH excedente (titulado por HCl)	1,70E-04	1,51E-04	1,51E-04
NaOH consumidos pelo H <sup>+</sup> provenientes de meros de AA	2,96E-04	2,65E-04	2,84E-04
<b>Fração de AA na superfície das partículas (mol/mol)*</b>	<i>0,561</i>	<i>0,516</i>	<i>0,543</i>
<b>Média ± Desvio Padrão</b>			<b>0,540 ± 0,023</b>
<b>Fração AA no interior das partículas (mol/mol)**</b>	<i>0,118</i>	<i>0,161</i>	<i>0,135</i>
<b>Média ± Desvio Padrão</b>			<b>0,138 ± 0,022</b>
<b>Fração de AA total nas Partículas***</b>	<i>0,678</i>	<i>0,676</i>	<i>0,677</i>
<b>Média ± Desvio Padrão</b>			<b>0,677 ± 0,001</b>

\* Estimativa considerando que todo grupo ácido neutralizado na fase polimérica (suspensão de nanopartículas) encontra-se exposto na superfície das partículas.

\*\*Estimado por meio da diferença entre a quantidade de ácido acrílico adicionado à formulação e as quantidades determinadas na fase aquosa e polimérica.

\*\*\*Soma das quantidades determinadas na superfície das partículas e interior das partículas.