

Nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona carregadas com hidrocortisona: preparação usando planejamento fatorial e sua avaliação

Nayara A. Cazo^a, Edenir R. Pereira-Filho^a, Maria F. G. Fernandes da Silva^a, João Batista Fernandes^a, Paulo Cezar Vieira^a, Ana C. Puhl^b, Igor Polikarpov^b, Moacir Rossi Forim^{a*}

^aDepartamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luiz, Km. 235, Caixa Postal 676, CEP 13.565-905, São Carlos, SP, Brasil

^bInstituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense, 400, CEP 13.566-590, São Carlos, SP, Brasil

Received: 30 January 2012; revised: 13 April 2012; accepted: 20 June 2012. Available online: 07 July 2012.

ABSTRACT: Polymeric-nanoparticle systems such as nanocapsules and nanospheres have a great potential in applications for nanoencapsulation of corticosteroids which show low solubility in water. The physicochemical characteristics of nanoparticle suspensions are important pre-requisites for the successful development of new dosage form. In this study, hydrocortisone-loaded poly- ϵ -caprolactone nanoparticles have been prepared by the interfacial deposition method. A 3-factor 2-level factorial design was used to study and optimize nanoparticles formulation. This factorial design was used to study the contrasts and effects of independent variables on particle size distribution, morphology, surface charge, drug content, entrapment efficiency and in vitro drug release profiles. The screened independent variables were: the concentration of hydrocortisone, poly- ϵ -caprolactone and isodecyl oleate. A High Performance Liquid Chromatography method was developed and validated for hydrocortisone quantification. Special attention was given to both absolute recovery and entrapment efficiency. The results of optimized formulations showed a narrow size distribution with a polydispersity index near to 0.200. The particle sizes were on average 109.2 and 236.5nm to nanospheres and nanocapsules, respectively. In the best formulations the zeta potential was higher than 30 mV (in module) and the absolute recovery and entrapment efficiency were higher 82% and nearly 60%, respectively. The main variables were the quantity of the polymer and of the oil. Nanoparticles observed by the Scanning Electron Microscope depicted extremely spherical shape. In vitro release studies were performed through dialysis with continuous stream. Nanocapsules and nanospheres showed a similar pure diffusion release mechanism according to Korsmeyer-Peppas's model.

Keywords: polymeric nanoparticles; hydrocortisone; factorial design; kinetic release

* Corresponding author. E-mail: mrforim@ufscar.br

Introdução

Corticosteróides como a hidrocortisona (HC – Figura 1) possuem um amplo espectro de ação terapêutica com efeitos antiinflamatórios, imunossupressores, entre outros [1-4]. Entretanto, tratamentos realizados com estes compostos frequentemente apresentam efeitos colaterais. Além disso, geralmente possuem baixa solubilidade em água comprometendo sua biodisponibilidade [4]. O corticosteróide hidrocortisona escolhido para este estudo possui uma baixa solubilidade em água com sua estabilidade afetada por mudanças nos valores de pH (solubilidade igual a $1,08 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).³ A solução destas deficiências são alguns dos principais objetivos dos estudos com sistemas de liberação de fármacos os quais vêm sendo facilmente superados. Desde a introdução terapêutica dos corticosteróides, diversos grupos de pesquisa têm concentrado esforços para maximizar seus benefícios e minimizar os efeitos colaterais. Como resultado, diversos trabalhos demonstram técnicas para alteração estrutural do núcleo esteroidal básico e de seus grupos laterais, formulações específica, ou mais recente, descrevem técnicas de encapsulamento em sistemas de liberação controlada [5-8].

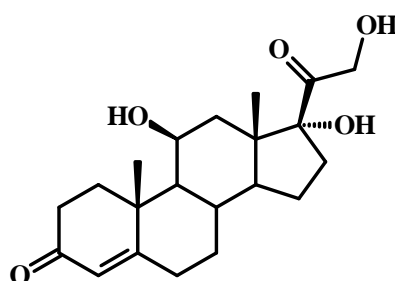


Figura 1. Estrutura da hidrocortisona.

Os sistemas de liberação podem ser subdivididos em micro ou nanopartículas. Não obstante, partículas submicrométricas oferecem uma série de vantagens sobre micropartículas incluindo a superior capacidade intracelular de captação do fármaco em relação às micropartículas [9]. Nanoencapsulação de fármacos envolve a formação de partículas carregadas em escala submicro podendo ou não ser biodegradadas [9]. O termo nanopartículas é o nome coletivo usado para nanocápsulas (NC) e nanoesferas (NS) quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. Nanoesferas referem-se a partículas formadas por uma matriz polimérica onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido. As nanocápsulas são partículas constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso [9-10].

Nanopartículas preparadas por polímeros sintéticos ou naturais tem encontrado aplicações em vários segmentos tecnológicos e biomédicos decorrente da facilidade de controle das estruturas químicas, funcionalidades de superfície e do diâmetro de partícula [11]. A importância das técnicas de encapsulamento em sistemas de liberação para

fármacos com os corticosteróides pode ser avaliada observando a diversidade de técnicas descritas na literatura. Kristmundsdóttir e col. propuseram um complexo de inclusão de hidrocortisona em hidroxipropil- β -ciclodextrina com avaliação clínica em tratamentos orais [12]. Os autores destacam neste trabalho o aumento na solubilidade da hidrocortisona com a formação do complexo, a ausência de efeitos colaterais não notificados por pacientes, fácil uso e eficácia clínica comparada com outras preparações mais potentes. Filipović-Grčić e col. descrevem o preparo de complexos de inclusão do acetato de hidrocortisona em hidroxipropil- β -ciclodextrina por *Spray-Drying* qual resultou em microesferas [4]. Este complexo de microesferas originou um sistema com maior dispersão em água que o acetato de hidrocortisona não encapsulado.

Num outro trabalho, Jensen e col. descrevem um promissor sistema de liberação de corticosteróides para administração tópica de nanopartículas lipídicas sólidas [8]. Foi verificado o ganho na eficiência de encapsulamento e o perfil de liberação para as nanopartículas lipídicas sólidas. Cevc e Blume desenvolveram um carreador lipossomático para glucocorticosteroides de aplicação tópica quais, mesmo com a redução nas dosagens, asseguraram a eficácia terapêutica resultando num ganho de eficiência [6]. Nanosuspensões coloidais com hidrocortisona para aplicação ocular foram desenvolvidas por Ali e col. [13]. Diversos outros trabalhos descrevendo sistemas específicos para carreadores de corticosteróides podendo ser encontrados na literatura [8-15].

Desde a década de setenta, tem sido cada vez mais evidente que somente o desenvolvimento de novos fármacos não é suficiente para assegurar o progresso da terapia medicamentosa. Algumas razões para o insucesso da terapia convencional incluem: a) insuficiente concentração do fármaco resultado da pobre absorção, rápido metabolismo e eliminação ou distribuição do fármaco em tecidos não alvo com elevada toxicidade e b) baixa solubilidade dos fármacos que exclui administração de soluções aquosas [16].

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo preparar e caracterizar nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona (PCL) carregadas com o corticóide hidrofóbica hidrocortisona. Nanopartículas contendo HC foram preparadas por deposição polimérica interfacial seguida pelo deslocamento do solvente, conhecido como nanoprecipitação, sendo um método inicialmente proposto por Fessi e col. [17]. Entre as novidades do trabalho se destaca o baixo custo e simplicidade de preparação de nanopartículas (formulação) contendo moléculas como, por exemplo, a hidrocortisona (composto alvo), alta capacidade de encapsulamento e dispersão em meio aquoso de moléculas pouco polares, elevada estabilidade das dispersões coloidais, as nanopartículas podem ser facilmente convertidas em pó solúveis, o polímero e o óleo empregados são biocompatíveis e biodegradáveis, etc. A formulação contendo hidrocortisona pode ser

facilmente escalonado para o setor industrial. Além disso, o presente trabalho destaca um método cromatográfico validado que pode ser aplicado em diversos ensaios quantitativos de hidrocortisona.

Resumidamente, este método envolve a precipitação de um polímero presente inicialmente numa fase orgânica, num meio aquoso contendo um surfactante. O polímero é dissolvido em um solvente miscível em água de polaridade intermediária (fase orgânica) juntamente com o composto ativo, outro surfactante e um óleo (somente para NC). A precipitação ocorre após a introdução e difusão da fase orgânica no meio aquoso, mantida sob agitação mecânica. A deposição polimérica ocorre na interface entre a água e o solvente orgânico causada pela rápida difusão do solvente, levando a formação instantânea da suspensão coloidal [9, 17, 18]. O desenvolvimento das formulações foi realizado através do planejamento fatorial 2^3 com três experimentos no ponto central, avaliando o efeito dos fatores selecionados sobre parâmetros físico-químicos e quantitativos.

Material e Métodos

Reagentes e padrões

A hidrocortisona foi adquirida da Sigma (lote nº. 103K06241). O polímero poli- ϵ -caprolactona (PCL) de peso molecular ponderal médio 65.000, monoestearato de sorbitano-60 (Span[®]60), polissorbato 80 (Tween[®]80) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Oleato de isodecila foi obtido da Importadora Química Delaware Ltda. (Porto Alegre, Brasil). Os solventes grau CLAE, bem como o ácido fosfórico e os sais NaCl, KCl, Na₂HPO₄ e KH₂PO₄ foram fornecidos pela J. T. Baker (Ecatepec, Mexico). Água ultra pura (18 Ω) foi obtida por osmose reversa num sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Preparo das nanopartículas em suspensão coloidal

Todas as nanopartículas, nanocápsulas e nanoesferas, foram preparadas pela técnica de nanoprecipitação de polímeros pré-formado (deposição interfacial) proposto por Fessi e col. [17]. Resumidamente, uma fase orgânica preparada pela dissolução do polímero, hidrocortisona, tensoativo de baixo equilíbrio hidrofílico-lipofílico (Span[®]60) e oleato de isodecila (somente em nanocápsulas) em acetona a 45 °C, foi vertida lentamente com o auxílio de uma bomba peristáltica (PumpPro TPM 600 55RPM, Waton-Marlow, Wilmington, Reino Unido), operada a 10% de sua capacidade, sobre uma fase aquosa contendo o Tween[®]80 sob agitação magnética moderada. As nanopartículas foram imediatamente formadas após difusão do solvente orgânico. O sistema foi mantido em agitação magnética por 10 min e em repouso durante 30 min. Após este período, o solvente orgânico e parte da fase aquosa foram removidos sob pressão reduzida

ajustando o volume final da dispersão coloidal em 50 mL.

Planejamento fatorial 2³

Nanopartículas poliméricas contendo hidrocortisona foram obtidas com base no planejamento fatorial 2³. A concentração de hidrocortisona (x_1), quantidade de polímero (x_2) e óleo (x_3) foram selecionados como variáveis independentes (Tabela 1). Os níveis das variáveis independentes foram estabelecidos de acordo com estudos prévios para desenvolvimento de nanopartículas com PCL. Cada variável foi analisada em dois diferentes níveis, inferior e superior transformados em valores (-1) e (+1), respectivamente. Definindo todas as possíveis combinações entre as variáveis independentes o planejamento fatorial completo resultou $2^3 = 8$ experimentos. A repetibilidade experimental foi investigada avaliando a dispersão dos resultados no ponto central (nível 0 para as variáveis, $n = 3$). O volume do solvente, fase aquosa e dos tensoativos utilizados na preparação foram mantidos constantes conforme valores descritos na Tabela 1. A avaliação dos efeitos foi realizada pelo *software* Microsoft Office Excel®2007 (Microsoft Corporation, EUA). Valores de pH, diâmetro de partículas (DP), potencial zeta (PZ), recuperação absoluta (Rec%) e eficiência de encapsulamento (EE%) foram os parâmetros de resposta ou as variáveis dependente. A descrição dos experimentos para o planejamento fatorial 2³ e resultados obtidos correspondentes as variáveis dependente são descritos na Tabela 2.

O *software* OriginPro®8.0 foi utilizado para gerar e avaliar o planejamento experimental estatístico. Com a finalidade de otimizar o planejamento, os efeitos das variáveis independentes sobre as respostas obtidas foram modeladas usando um modelo linear matemático para descrever as variáveis independentes e suas interações com as várias respostas medidas que foram geradas pelo planejamento fatorial 2³ sendo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1.x_1 + \beta_2.x_2 + \beta_3.x_3 + \beta_4.x_1.x_2 + \beta_5.x_1.x_3 + \beta_6.x_2.x_3 + \beta_7.x_1.x_2.x_3 + \varepsilon \text{ (Eq.1)}$$

onde Y são as variáveis dependentes, enquanto β_i são os parâmetros do modelo (β_0 do intercepto e $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5, \beta_6$ e β_7 são coeficientes de regressão) e ε o erro aleatório; x_1, x_2 e x_3 são as variáveis independentes; $x_1.x_2, x_1.x_3, x_2.x_3$ e $x_1.x_2.x_3$ são as interações entre as variáveis. Análise de variância (ANOVA) foi usada para investigação dos dados para obter a interação entre as variáveis processadas e as respostas. A qualidade do ajuste polinomial foi expressa pelo coeficiente de determinação (R^2) e sua significância estatística foi avaliada pelo Teste F no mesmo programa. Os termos do modelo foram avaliados para um valor de P (probabilidade) com um nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$).

Caracterização físico-química das nanopartículas

Quantificação da hidrocortisona

O conteúdo de hidrocortisona no sistema coloidal foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo a líquido Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) configurado com degaseificador G1322A, bomba quaternária G1311A, autoinjeter G1329A, forno de coluna G1316A e detector de ultravioleta G1314B. Foi utilizado uma coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB[®]C18 (150 x 4,6 mm d.i., 5 µm diâmetro de partícula, P. N. 993967-902 Agilent, EUA) acoplada com uma pré-coluna de segurança Phenomenex[®] C18 (4x3 mm i.d., 5 µm particle size, Torrance, CA, EUA). O controle do equipamento CLAE, aquisição e processamento dos dados foram realizados pelo *software* Agilent Technologies EZCrom SI (G6702AA, s.n.08021502300).

As análises cromatográficas foram realizadas no modo de eluição isocrático. A fase móvel consiste de uma mistura de acetonitrila:água (70:30, v/v) com uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. A temperatura da coluna foi mantida em 30 °C e o volume de injeção de 20 µL. Todos os experimentos foram realizados operando o detector de UV-Vis em 217 nm.

Preparo das amostras padrões e validação do método analítico

Uma solução estoque de 1,00 mg mL⁻¹ de hidrocortisona foi preparada dissolvendo 10,0 mg de HC em metanol num balão volumétrico de 10,0 mL. A solução de trabalho (100 µg mL⁻¹) foi obtida após diluição da solução estoque. Sete soluções padrões (5,00; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100 µg mL⁻¹) foram preparadas diluindo a solução de trabalho com quantidades exatas de metanol ($n = 3$). As soluções padrões foram utilizadas para: construção da curva de calibração por padronização externa, estabelecer a faixa linear de trabalho e determinar os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) do método analítico. De modo similar, três outras soluções de validação (6,00; 50,0; e 95,0 µg mL⁻¹) foram preparadas ($n = 5$) e analisadas em três dias não consecutivos ($n = 3$) estabelecendo a exatidão e precisão do método. A linearidade foi determinada pelo cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados após construção do gráfico da área do sinal analítico de todas as soluções padrão *versus* a concentração individual de cada uma. A linearidade também foi avaliada analisando o fator de resposta, isto é, dividindo a área da banda cromatográfica pela concentração individual de cada solução padrão.

A exatidão foi determinada calculando a porcentagem de recuperação da concentração média de HC e a precisão pode ser estabelecida através do cálculo do Desvio Padrão Relativo (DPR). Os limites de detecção e quantificação foram calculados através da relação entre o desvio padrão (dp) da curva de calibração e sua inclinação (S), utilizando o cálculo sugerido pela ICH standard [19]. Os LD e LQ foram calculados através das equações 02 e 03, respectivamente:

$$\text{LOD} = \left(\frac{3.3 \times dp}{S} \right) \quad (\text{Equação 2}) \quad \text{LOQ} = \left(\frac{10 \times dp}{S} \right) \quad (\text{Equação 3})$$

Pré-tratamento e análises de hidrocortisona em matrizes poliméricas

Inicialmente foi necessário desenvolver dois diferentes pré-tratamentos para análises quantitativas de hidrocortisona: um específico para determinação do teor total em suspensão coloidal e outro para determinar a quantidade associada às nanopartículas. A Rec% foi determinada após nanopartículas em suspensão coloidal serem submetidas ao seguinte procedimento: 0,9 mL de acetona foram adicionados e homogeneizados a 0,1 mL da suspensão coloidal mantendo posteriormente a solução em repouso por duas horas. Após dissolução do polímero, a solução foi centrifugada (Centrifuge 5810 R, Eppendorf®, Hamburg, Alemanha) a 14.000 rpm por 30 minutos a 25 °C. Em seguida, 0,5 mL do sobrenadante foram secos utilizando um *Speed vac* (Savant Speed vac Plus SC10A, Farmingdale, EUA). O extrato seco foi solubilizado em metanol e o teor total de HC determinado por CLAE.

A eficiência de encapsulamento nas nanopartículas foi determinada quantificando a concentração do composto livre no meio de dispersão (fase aquosa) da suspensão coloidal. Uma quantidade da suspensão coloidal (0,5 mL) foi filtrada usando tubos Corning® com filtros de acetato de celulose de poros 0,22 µm (Costar®Spin-X®, Corning Inc.) por centrifugação a 4.000 rpm por 20 min a 15 °C. As nanopartículas ficaram retidas no filtro sendo o filtrado, contendo a HC livre, posteriormente coletado. Uma quantidade de 0,3 mL do filtrado foi então seco e ressuspensionado em 0,2 mL de metanol para análise por CLAE. A EE% foi calculada pela equação 04:

$$\text{EE (\%)} = \left(\frac{\text{Quantidade total de hidrocortisona} - \text{Quantidade livre de hidrocortisona}}{\text{Quantidade total de hidrocortisona}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 04})$$

Caracterização das suspensões coloidais

Diâmetro de partícula e potencial zeta

As análises físico-químicas das nanopartículas foram realizadas imediatamente após a preparação das suspensões coloidais. Os parâmetros investigados foram: valor de pH usando um potenciômetro (B474 Micronal, São Paulo, Brasil); análise do diâmetro de partícula (DP) em nanômetros pela análise da difusão dinâmica da luz (PCS). As medidas de PCS foram obtidas a temperatura ambiente num ângulo fixo de 90°. Esta técnica possibilitou obter o diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas e o índice de polidispersividade; investigação do potencial zeta (ζ) em milivolts. O diâmetro de partícula e potencial zeta foram determinados após diluir 0,1 mL de cada suspensão coloidal em 10 mL de água ultrapura e 10 mM NaCl, respectivamente, utilizando um

Zetatrac controlado pelo *software* Microtrac Flex V.10.5.0, ambos da Microtrac Inc., EUA.

Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura

As nanopartículas foram secas sobre suportes metálicos de alumínio, posteriormente recobertos com uma fina camada de ouro e sua morfologia examinada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Philips XL 30 FEG, Holanda) a 5 kV com ampliações de até 50.000 vezes.

Estudos de liberação *in vitro* das nanopartículas

Os estudos de liberação *in vitro* das nanopartículas em suspensão coloidal foram realizados pela técnica de difusão de bolsas de diálise proposta por Levy e Benita [20]. Bolsas de diálise (Dialysis tubing cellulose membrane, 1,0 cm largura, Sigma) com 1,0 mL da suspensão coloidal foram seladas e adicionadas em 1,0 L de tampão fosfato (PBS) num pH = 7,4. Esta solução foi mantida em constante agitação. O tampão PBS foi preparado dissolvendo as seguintes quantidades dos sais: 8,00 g NaCl; 0,20 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄·2H₂O e 0,24 g de KH₂PO₄ para cada litro de água. O sistema foi mantido a 35 °C com um fluxo contínuo de 3,0 mL min⁻¹ controlado por uma bomba peristáltica (PumpPro TPM 600 55RPM, Waton-Marlow, Wilmington, Reino Unido). Em intervalos de tempo específicos, uma bolsa de diálise era retirada do meio e o conteúdo de HC e analisado por CLAE. A cinética de liberação foi determinada após o cálculo do valor de *n* (ordem de cinética) proposto por Korsmeyer-Peppas [21] pela seguinte equação empírica:

$$M_t/M_\infty = K.t^n \text{ (Equação 05)}$$

onde M_t/M_∞ é a fração de liberação no tempo *t*, *n* é o expoente de liberação e *K* a constante de liberação.

Resultados e Discussão

Significantes esforços têm sido gastos nos últimos anos com pesquisas em nanotecnologia para disponibilizar meios de vetorização de pequenas moléculas como hormônios, antitumorais, antimicrobianos, bem como macromoléculas como polissacarídeos, proteínas e peptídeos para entrega em tecidos ou alvos celulares específicos [22-25].

Diversos grupos vêm produzindo micro e nanopartículas contendo corticosteroides como a HC em sistemas lipossomais, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), β-ciclodextrinas e derivados, etc. Neste trabalho, pela primeira vez é apresentado o uso de PCL e o uso do método de nanoprecipitação para o preparo de nanopartículas contendo HC. Entre as vantagens, quando comparado às demais técnicas, destaca o baixo custo, maior estabilidade da suspensão coloidal, em geral um menor diâmetro de partícula (exceto

quando comparado a sistemas produzidos com derivados de β -ciclodextrinas), maior estabilidade no encapsulamento em suspensão coloidal etc. [4-6, 12, 13, 38].

Assim, o objetivo deste estudo foi formular e aperfeiçoar processos e parâmetros para nanoencapsulamento da HC em PCL baseado num planejamento fatorial 2^3 . Esta é a primeira vez que o polímero PCL e o oleato de isodecila são empregados no preparo de nanopartículas contendo um corticóide como a hidrocortisona. A repetibilidade da técnica de preparo das nanopartículas em suspensão coloidal foi avaliada preparando três amostras idênticas no ponto central, sendo a quantidade de HC, do polímero e do oleato de isodecila iguais a 15, 100 e 300 mg, respectivamente. A dispersão dos resultados representado pelo DPR das variáveis dependentes pH, DP, PZ, Rec% e EE% foram 2,0%, 5,4%, 6,3%, 3,2% e 4,4%, respectivamente. Com exceção do DPR obtido para a variável pH, estes dados demonstram uma satisfatória repetibilidade no processo de preparo das nanopartículas. Além da dispersão dos resultados investigado pelo DPR, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) obtendo conclusões similares.

De fato, a técnica de nanoprecipitação aplicada se mostrou satisfatória no preparo de nanopartículas. Imediatamente após adicionar a fase orgânica sobre a fase aquosa, todas as formulações se tornaram opacas como leite, sendo uma característica originada no efeito Tyndall que resulta da reflexão de luz pela formação das nanopartículas [10]. Através do uso da técnica de nanoprecipitação proposta por Fessi e col. foi possível produzir nanoesferas e nanocápsulas submicrômetras, carregadas com hidrocortisona utilizando PCL com polímero biodegradável [17]. A técnica de preparação se mostrou simples e facilmente reproduzível. Dentro dos limites de concentração de hidrocortisona avaliados neste trabalho (Tabela 1) foi possível preparar sistemas coloidais em meio aquoso com uma quantidade superior de 27% sobre a solubilidade máxima deste corticosteróide no meio de dispersão. Esta é uma importante característica obtida para o sistema contendo HC obtido neste trabalho. Considerando a eficiência de encapsulamento, por exemplo, de 59,6% obtida no experimento 7 (Tabela 2), a capacidade de dispersão da HC em meio aquoso pode ser ampliada à 53%, precisando apenas reduzir pela metade do volume final da dispersão coloidal.

O polímero poli- ϵ -caprolactona é um poliéster largamente utilizado na aplicação de sistemas de liberação de fármacos sendo escolhido por suas propriedades de biocompatibilidade e biodisponibilidade, alta permeabilidade e falta de toxicidade [26, 27]. O PCL é um polímero resistente à hidrólise química e não possui centros heterogêneos, características que limitariam a possibilidade de modulação através da configuração estrutural das cadeias poliméricas [27]. Ele é um polímero hidrofóbico cristalino que degrada lentamente na ausência de enzimas [26, 28].

Contudo, sua degradação é acelerada na presença de enzimas como, por exemplo, lipases [27, 29].

Tabela 1. Variáveis investigadas na preparação de nanopartículas poliméricas de PCL carregadas com HC

Variáveis independentes	Nível inferior (-1)	Nível superior (+1)
x_1 , Hidrocortisona	5,0 mg (0,01 %, m/v)	25,0 mg (0,05 %, m/v)
x_2 , Polímero, PCL	30,0 mg (0,01 %, m/v)	170,0 mg (0,34 %, m/v)
x_3 , Oleato de Isodecila	0,0 mg	600,0 mg (1,2 %, m/v)
Variáveis Fixadas		
Volume acetona	27,0 mL	
Span®60	80,0 mg (0,16 %, m/v)	
Volume fase aquosa	54,0 mL	
Tween®80	80,0 mg (0,16 %, m/v)	

Tabela 2. Descrição dos experimentos das variáveis independentes e respostas das variáveis dependentes observadas para o planejamento fatorial 2^3

Exp	Variáveis independentes			Variáveis dependentes ^b				
	x_1	x_2	x_3	pH	DP (nm)	PZ (mV)	(Rec%)	(EE%)
01	-1	-1	-1	6,73±0,10	67,2±2,02	-6,8±0,3	101,6±1,41	35,4±0,49
02	+1	-1	-1	6,67±0,14	56,4±1,50	-26,8±1,3	92,6±0,88	41,4±0,76
03	-1	+1	-1	6,39±0,08	149,8±5,97	-26,9±0,9	96,5±0,93	39,8±0,61
04	+1	+1	-1	6,49±0,17	163,6±12,5	-16,5±1,0	82,5±1,85	31,0±0,27
05	-1	-1	+1	6,66±0,11	254,2±6,45	-36,5±2,0	90,9±1,82	52,5±1,26
06	+1	-1	+1	6,71±0,06	235,7±4,69	-28,8±0,7	89,7±0,67	43,0±0,69
07	-1	+1	+1	6,45±0,07	228,2±11,9	-31,5±2,1	90,9±0,55	59,6±0,18
08	+1	+1	+1	6,53±0,10	227,3±9,06	-27,9±1,3	100,5±1,78	54,7±0,97
09^a	0	0	0	6,48±0,13	211,8±6,67	-31,5±1,6	95,6±2,52	47,2±0,38
10^a	0	0	0	6,52±0,15	189,6±5,60	-30,8±1,7	91,4±0,91	44,2±0,42
11^a	0	0	0	6,47±0,16	201,3±4,19	-28,9±2,0	89,8±1,36	43,0±0,85

^a Indica o ponto central do planejamento fatorial; DP, diâmetro de partícula; PZ, Potencial zeta; REC%, recuperação; EE%, eficiência de encapsulamento. ^b Réplica das análises representada como média±SD.

Para confirmar a formação de nanopartículas esféricas a morfologia foi avaliada através da microscopia eletrônica de varredura. Para se conseguir boas resoluções de imagens na avaliação morfológica das nanopartículas por MEV, após adicionar as suspensões coloidais sobre os suportes de amostras metálicos, foi necessário remover toda água das dispersões. Este processo promoveu a aglomeração das nanopartículas formando um filme polimérico. Contudo, foi possível observar nanopartículas depositadas sobre o filme polimérico, os quais mostraram uma superfície regular, homogênea e baixa dispersão no diâmetro de partícula médio (Figura 2). As fotomicrografias obtidas não demonstraram a formação de cristais. Cristais podem ocorrer quando o composto a ser nanoencapsulado está presente em excesso no meio de dispersão ou devido a uma grande polidispersão no tamanho das nanopartículas obtidas. A ausência de cristais também foi confirmada pelos resultados da Rec% e EE%.

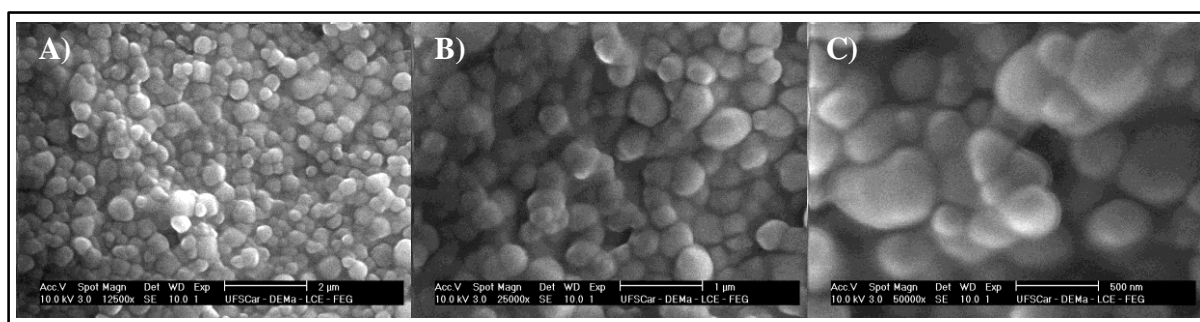


Figura 2. Fotomicroscopia de nanocápsulas de PCL carregadas com 0,05% (m/v) de hidrocortisona, 0,34% (m/v) de PCL e 1,2% de oleato de isodecila. Ampliações: A) 12.500 X; B) 25.000 X e C) 50.000 X.

Validação do método para análises cromatográficas da hidrocortisona

A validação do método analítico foi realizada de acordo com critérios propostos pela ICH (International Conference on Harmonization) [19]. As figuras de mérito investigadas na validação do método foram linearidade, seletividade, exatidão, precisão, recuperação, limites de quantificação e de detecção e repetibilidade.

Preparação das amostras

O pré-tratamento possivelmente é a etapa mais importante para análises quantitativas. Esta é a etapa crítica em análises cromatográficas, usualmente sendo a mais lenta e com maiores possibilidade de perdas analíticas no processo. Esta etapa envolve a extração de compostos ativos e a remoção de interferentes.

Deste modo foi necessário desenvolver métodos de abertura e pré-tratamento das amostras sem comprometer a recuperação. Assim, para a análise da quantidade total de HC em nanopartículas poliméricas em suspensão coloidal foi proposto uma técnica para dissolução do polímero em acetona com posterior separação do polímero e do sobrenadante. De fundamental importância foi à escolha do solvente ideal qual deve ao mesmo tempo dissolver o polímero e solubilizar a HC, contudo, sem que ocorra a saturação do sistema. Após solubilização, separou-se o polímero do sobrenadante por centrifugação. O processo utilizando etapas de secagem das amostras com posterior solubilização da HC em metanol, antes de ser analisado por CLAE, evita que resíduos de polímero comprometam a eficiência de separação e cause uma perda prematura da coluna analítica uma vez que o mesmo não é solúvel em metanol.

O preparo da amostra para análise da eficiência de encapsulamento foi mais simples, uma vez que não há necessidade da remoção do polímero ou abertura da amostra. Foi necessário desenvolver um protocolo para separação da nanopartículas do meio de dispersão sendo utilizado um sistema de filtração por centrifugação controlando-

se o tempo e a força centrífuga aplicada. Uma vez separado o meio e as nanopartículas foi possível quantificar toda HC no meio aquoso de dispersão. As amostras em meio aquoso foram secas e re-suspendidas em metanol para manter constante o coeficiente de absorvidade molar da HC em comparação com as soluções padrões usadas na construção da curva de calibração.

Seletividade analítica e linearidade

A seletividade do método foi avaliada comparando cromatogramas de amostras de nanopartículas preparadas contendo hidrocortisona com relação às nanopartículas isentas de HC denominadas brancos (Figura 3). Nenhum pico interferente foi observado em 5,1 min no cromatograma do branco (tempo de retenção da HC) para o comprimento de onda de trabalho de 217 nm (Figura 3A). Os cromatogramas de amostras utilizadas nos testes de estabilidade de armazenamento e do autoinjeter também não apresentaram nenhum pico interferente no período investigado. Assim, o método pode ser considerado seletivo podendo distinguir a resposta do analito de interesse dos demais componentes da mistura.

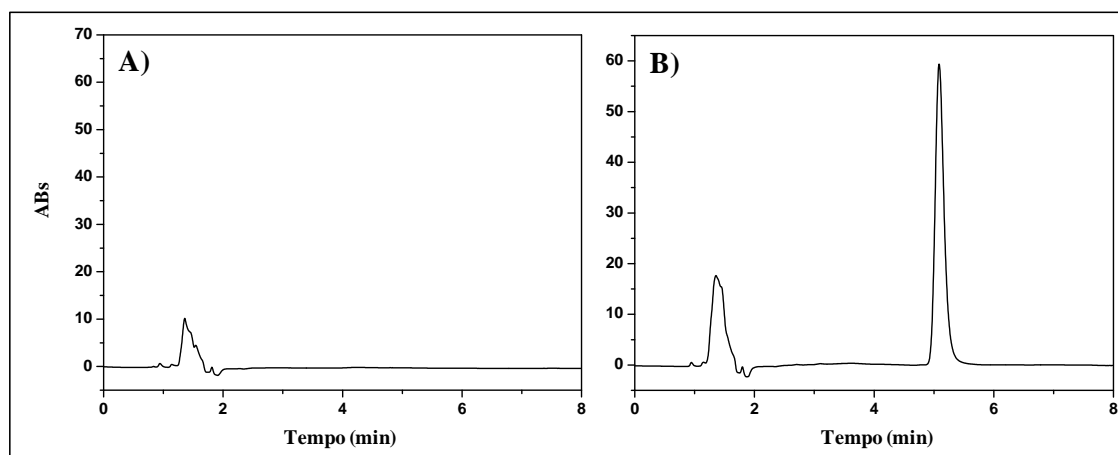


Figura 3. Cromatogramas de nanopartículas em suspensão coloidal (A) isento e (B) com hidrocortisona. As condições cromatográficas foram descritas no procedimento experimental.

A curva de calibração foi linear em toda extensão investigada, de 5,00 a 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mostrando serem os resultados diretamente proporcionais a concentração. A linearidade foi determinada em triplicata pela avaliação visual da curva de calibração externa (Figura 4A) e pelos cálculos da equação de regressão ($A = a.x \pm b$) e do coeficiente de correlação (r^2) usando o método dos mínimos quadrados sendo:

$$A = 16,36(\pm 0,0566). x - 8,486(\pm 3,184); \quad r^2 = 0.9999$$

onde A é a área da banda cromatográfica, x a concentração da amostra investigada, e a e b os coeficientes angular e de intercepto, respectivamente. Os valores do Desvio

Padrão dos coeficientes a e b estão indicados em parênteses. O valor do coeficiente de correlação (r^2) de 0,9999 indica uma boa linearidade para a faixa de trabalho proposta. A linearidade também foi avaliada pela análise do fator de resposta (valor da área da banda cromatográfica dividido pela concentração da solução padrão). A aparência visual do gráfico e o valor da regressão linear do fator de resposta (Figura 4B) mostram uma inclinação de 0,0070 ($\pm 0,0006$) próxima a zero e um DPR de 1,62% confirmando a linearidade da faixa de trabalho.

Exatidão e precisão

A exatidão [Exatidão = (média da concentração/concentração nominal).100%] pode ser avaliada calculando a porcentagem de recuperação da hidrocortisona. Três diferentes soluções de validação (6,00; 50,0; e 95,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), em quintuplicata cada uma, foram cuidadosamente preparadas e analisadas em dias não consecutivos ($n = 3$). As soluções foram escolhidas por abranger toda a faixa linear de trabalho. A recuperação média e DPR encontrados foram 100,2% e 2,46%, respectivamente, mostrando forte concordância entre os dados experimentais e valores nominais teóricos. Resultados detalhados para os três níveis de solução de validação podem ser observados na Tabela 3. A precisão foi determinada calculando o Desvio Padrão Relativo (DPR) para cada solução de validação analisada intra ($n = 5$) e interdias ($n = 15$). Estes resultados são apresentados na Tabela 3. O DPR de cada amostra intra e interdias foram $\leq 2,1\%$ e $\leq 1,3\%$, respectivamente. Estes resultados indicam uma boa precisão para o método analítico.

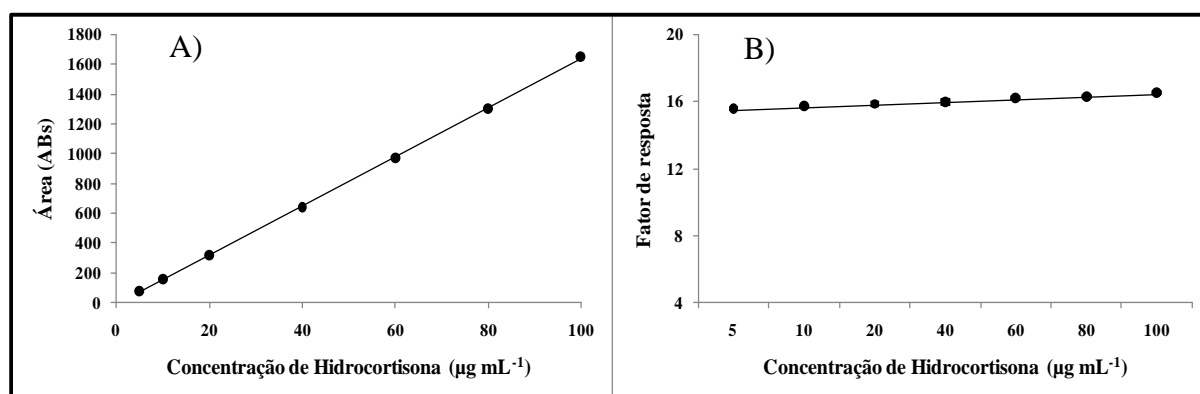


Figura 4. Linearidade do método proposto para quantificação da hidrocortisona por CLAE. (A) Curva de calibração e (B) fator de resposta ($n = 7$).

Tabela 3. Exatidão (%) e precisão (DPR%) em amostras de hidrocortisona usadas na validação do método analítico

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisão				Exatidão ($n = 15$)
	Intra-dia 1 ($n = 5$)	Intra-dia 2 ($n = 5$)	Intra-dia 3 ($n = 5$)	Inter-dia ($n = 15$)	
6,00	2,1	0,8	1,0	1,3	99,0
50,0	0,5	0,5	0,5	0,5	100,5
95,0	0,8	0,5	0,9	0,7	100,9

O Limite de Detecção do método foi estabelecido em $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Eq. 2), enquanto o Limite de Quantificação foi $1,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Eq. 3). A recuperação do método foi determinada pela comparação de resultados do conteúdo total de HC adicionado e quantificado em suspensões [30]. Os resultados de recuperação foram obtidos pela razão entre o conteúdo de HC quantificado e sua concentração nominal expresso em porcentagem. O valor médio calculado para duas diferentes concentrações ($100,0$ e $500,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi $99,7 \pm 4,3\%$ ($n = 6$) mostrando que não houve perda do analito durante as etapas de preparação das nanopartículas, pré-tratamento ou análises cromatográficas.

O método analítico depois de validado se mostrou satisfatório para análises das variáveis dependentes Rec% e EE%, fornecendo dados para investigação das variáveis independentes no preparo de nanopartículas poliméricas carregadas com hidrocortisona.

Caracterização das nanopartículas carregadas com hidrocortisona

O planejamento experimental 2^3 realizado permitiu avaliar os efeitos das variáveis independentes (quantidade de HC, polímero e do oleato de isodecila) sobre os resultados das variáveis dependentes (Tabela 2). A composição qualitativa e quantitativa das formulações foi selecionada após revisão da literatura, outros trabalhos do grupo de pesquisa e avaliação experimental da compatibilidade da formulação com a HC [10, 31].

As variáveis dependentes utilizadas para avaliar a dispersão coloidal foram o pH, DP e PZ. Por outro lado, as variáveis dependentes Rec% e EE% foram aplicadas nos estudos de estabilidade e cinética de liberação da HC.

O efeito de cada variável e suas interações foram calculados de acordo com a seguinte equação: Efeito das variáveis = $\bar{y}_+ - \bar{y}_-$, onde \bar{y}_+ e \bar{y}_- são a média do pH, DP, PZ, Rec% e EE% no nível superior (+1) e inferior (-1), respectivamente. A Figura 5 ilustra os efeitos calculados para os dados normalizados em porcentagem para o planejamento fatorial 2^3 investigado. Na normalização os maiores valores foram tomados como 100 e os demais foram escalados proporcionalmente.

O valor do pH em todas as formulações oscilou entre 6,39 e 6,73. Modificações nos valores das variáveis independentes não apresentaram mudanças significativas no pH das suspensões coloidais. Isto pode ser indicado pela pequena inclinação das setas na Figura 5A e pelos parâmetros estatísticos.

As NS apresentaram diâmetro de partículas entre 56,4 e 163,6 nm sendo o valor médio igual a 109,2 nm. A quantidade de polímero (x_2) utilizado afetou diretamente o DP das nanoesferas. As NS preparadas no maior nível do planejamento experimental da variável PCL ($x_2 = +1$) foram 2,5 vezes maiores que as preparadas no menor nível ($x_2 = -1$). O DP das nanocápsulas variou entre 189,6 e 254,2 nm com um valor médio de

236,5 nm (Tabela 2). Estes resultados estão em conformidade com trabalhos prévios descritos aplicando a técnica de nanoprecipitação, i.e., menores que 300 nm [17, 31]. A diferença entre os tamanhos médios de NC e NS se justifica pela presença do oleato de isodecila nas formulações para preparo das NC. Utilizando o oleato de isodecila, inicialmente ocorre a formação de vesículas com a posterior precipitação do polímero na interface óleo/água conduzindo a nanopartículas de diâmetro médio superior as NS. Esses resultados são condizentes com os cálculos dos efeitos no planejamento experimental, onde se observou que o polímero e o oleato de isodecila contribuíram para um aumento de 15,5 ($\beta_2 = 19,45$) e 50,5% ($\beta_3 = 63,55$) no DP, respectivamente. Todavia, analisando a interação de segunda ordem entra estas variáveis (x_2, x_3), se observa que quando estão num mesmo nível (-1, -1 ou +1, +1) ocorrem uma redução no DP de 22,2% ($\beta_6 = -28,02$). Este efeito pode ser justificado para NC pelo agrupamento entre o PCL e o núcleo oleoso, aumento da tensão da interface nanopartícula/água ou mediante um efeito estabilizador do polímero ao redor das emulsões [10]. Até o momento, oleato de isodecila e o polímero PCL não foram reportados para o preparo de nanopartículas contendo corticosteróides.

Ainda em relação ao tamanho da nanopartículas, tão importante quanto o valor médio do DP é o valor de sua dispersão. Neste trabalho, a homogeneidade no diâmetro de partículas pode ser avaliada pelo índice de polidispersibilidade (IP). A polidispersão, ou índice de polidispersividade, indica a distribuição média do tamanho das nanopartículas sendo valores menores que 0,200, considerados bons indicadores de homogeneidade [32, 33]. Estes valores são desejados para manter a estabilidade da dispersão coloidal sem a formação de micropartículas ou precipitados. As dispersões coloidais preparadas não apresentaram precipitados mesmo após seis meses de armazenamento. Além disso, esta estreita distribuição no DP evita a formação de um gradiente de concentração de HC entre pequenas e grandes nanopartículas, o que poderia acarretar na cristalização de HC, com crescimento de cristais conhecidos como Ostwald Ripening [34]. As NS e NC apresentaram um valor médio do IP de 0,075 e 0,224, respectivamente, mostrando serem as dispersões coloidais de NS mais homogêneas.

Potencial Zeta, da mesma forma PS e PI, é um parâmetro importante para avaliar a estabilidade da suspensão coloidal. Quando as nanopartículas são preparadas em solução, ocorre a formação de uma dupla camada elétrica que cercam as nanopartículas. O potencial eletrostático neste limite "plano de cisalhamento hidrodinâmico" é chamado potencial zeta e está relacionado com a carga de superfície das nanopartículas [35]. Nesse sentido, o PZ indica que o grau de repulsão entre partículas semelhantes numa dispersão [36]. Nanopartículas com PZ entre +10 e -10 mV são considerados aproximadamente neutro. Por outro lado, suspensões coloidais de nanopartículas com ZP

superior +30 mV ou inferior a -30 mV são consideradas muito estáveis no meio de dispersão [34, 35]. O PZ variou entre -6,75 e -36,47 mV sendo os valores médios para

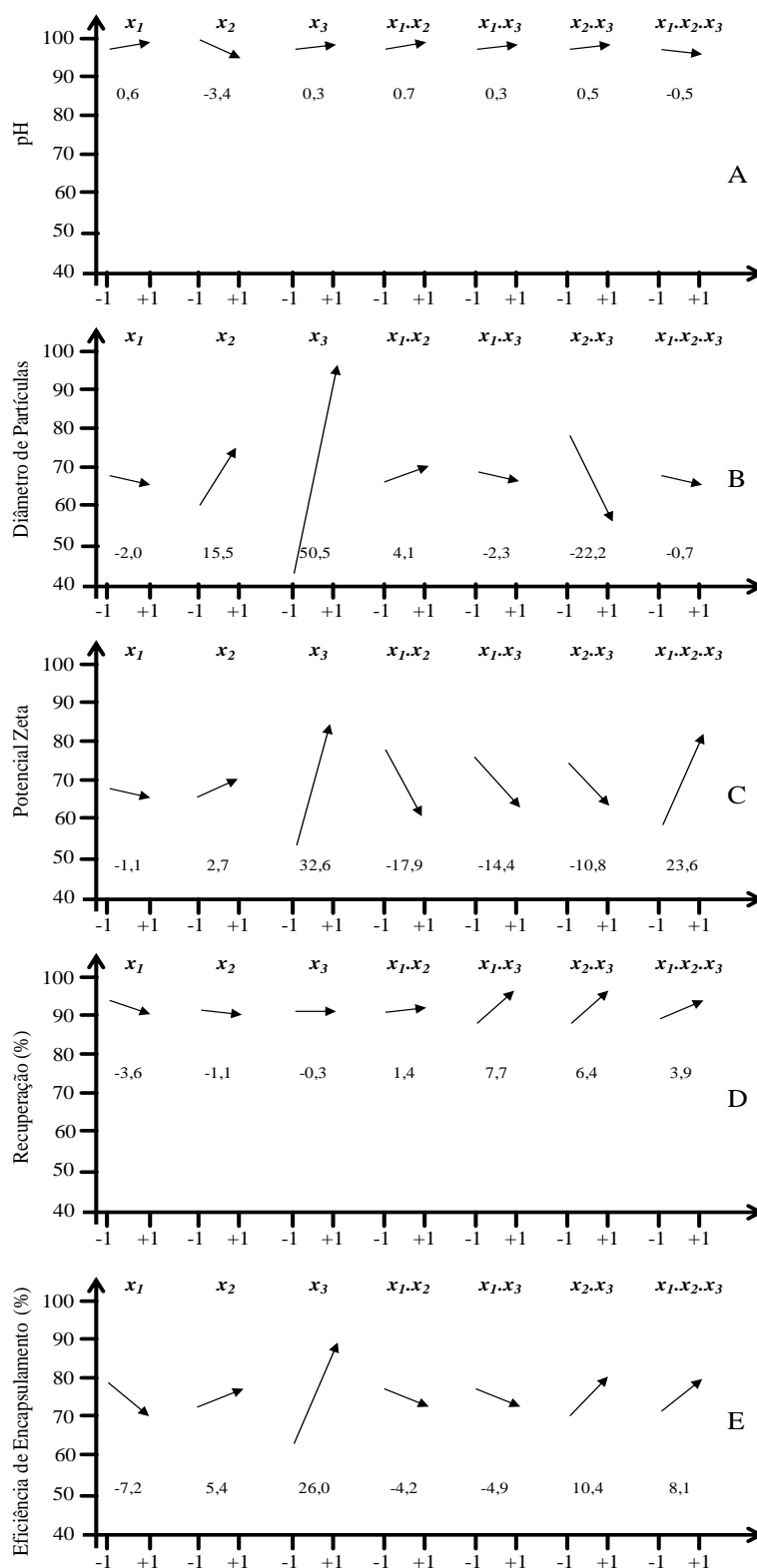


Figura 5. Cálculos dos efeitos para os experimentos realizados pelo planejamento fatorial 2^3 . As setas dentro da figura representam os efeitos calculados em porcentagem após a normalização dos dados. É importante observar que a inclinação das setas indica a amplitude dos efeitos.

NS e NC de $-19,3$ e $-31,2$ mV, respectivamente. Uma forte influência no PZ foi observada no cálculo do efeito para o oleato de isodecila. O oleato de isodecila (x_3) demonstrou um incremento de 32,6%, ou seja, sendo a principal variável responsável pelas NC apresentam uma maior carga de superfície que as NS. O maior PZ para as NC compensa o maior DP e IP, atribuindo as NS e NC, semelhante estabilidade coloidal.

Quando as três variáveis independentes (x_1, x_2, x_3) se encontram num mesmo nível ($-1, -1, +1$; $-1, +1, -1$; $+1, -1, -1$ ou $+1, +1, +1$), numa interação de terceira ordem, o potencial zeta aumentou em 23,6%. Ou seja, melhores estabilidades para a suspensão coloidal pode ser obtidas em quatro das oito principais formulações avaliadas tanto para NC quanto para NS. A análise do efeito das interações de segunda ordem (x_1, x_2 ; x_1, x_3 ; x_2, x_3) revelou decréscimos de $-17,9$, $-14,4$ e $-10,8\%$, respectivamente. A redução da magnitude do PZ pela interação das três variáveis independentes em relação ao efeito individual do oleato de isodecila, de 32,7 para 23,6% colabora com a proposta da formação de uma camada polimérica ao redor do núcleo oleoso [37].

As porcentagens de recuperação nas formulações foram superiores a 82,5% mostrando uma independência com relação às variáveis investigadas. De fato, perdas na recuperação se devem principalmente a etapas de preparação das nanopartículas. A elevada recuperação analítica estabelecida durante a validação do método descarta possíveis perdas por interações irreversíveis ou erros operacionais no preparo de amostra para análises cromatográficas.

A eficiência de encapsulamento alternou entre 31,1 e 59,6% sendo, em média, 42% mais eficiente nos colóides de NC (x_3). A EE% aumentou em todos os cálculos de efeitos que envolveram o oleato de isodecila. Individualmente, o oleato de isodecila contribuiu com um aumento de 26,0% na EE%. O aumento na EE% nas NC pode ser entendido pela preferência da HC, um composto de baixa solubilidade em meio aquoso, pelo núcleo lipofílico oleoso presente nas NC [38].

Outras análises, além das acima já discutidas, de como as variáveis independentes interferem nas propriedades da nanopartículas, bem como as mesmas interagem entre si, não foram argumentadas, pois não apresentaram variações significativas. Em geral a caracterização das nanopartículas foi condizente com resultados previamente descritos na literatura empregando o PCL e a nanoprecipitação, podendo agora ser aplicados para a hidrocortisona [10]. A análise conjunta dos resultados, observando dados de estabilidade coloidal e eficiência de encapsulamento, propõe as melhores formulações para HC como sendo aquelas dos experimentos 07 e 08 ambas preparadas no nível superior das variáveis PCL (x_2) e oleato de isodecila (x_3). As mesmas conclusões foram obtidas através da análise de variância (ANOVA).

Com o propósito de avaliar a influencia de cada variável e suas interações sobre

as respostas, os coeficientes polinomiais da Equação 1 foram determinados. Quanto maior a magnitude de cada coeficiente, maior é o respectivo efeito principal sobre o sistema; um coeficiente positivo indica que ocorre um aumento no nível do parâmetro conduzindo para um acréscimo na média da variável dependente investigada. Avaliando a interação dos coeficientes, a resposta pode ser analisada em termos de como a variação de um fator modula o efeito num outro fator. Por exemplo, o sinal negativo do coeficiente sinaliza para um decréscimo na variável dependente investigada. Os valores dos coeficientes obtidos estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros de resposta para as variáveis dependentes investigadas do planejamento fatorial 2^3

Variáveis Dependentes	Coeficientes de regressão e intercepto							
	β_0	β_1	β_2	β_3	β_4	β_5	β_6	β_7
pH	6,56	0,02	-0,12	0,01	0,02	0,01	0,02	-0,02
DP	180,47	-2,05	19,45	63,55	5,28	-2,80	-28,02	-0,89
PZ	-26,64	0,21	-0,48	-5,94	3,29	2,62	1,96	-4,31
Rec%	92,91	-1,82	-0,56	-0,16	0,73	3,92	3,25	1,97
EE%	44,70	-2,15	1,60	7,77	-1,28	-1,45	3,10	2,41

Para identificar e confirmar a significância dos efeitos e suas interações, a análise de variância (ANOVA) foi aplicada para cada variável dependente investigando o significado estatístico dos modelos de interação. O F -valor, que é uma medida da variância dos dados da média e usado para avaliar a validade do ajuste no modelo, foi determinado com base na razão da média quadrada dos grupos e a média quadrada dos erros [39]. Quanto maior for o valor de F em relação a unidade, maior a certeza que as variáveis designadas (variáveis independentes) adequadamente explicam a variação na média dos dados, ou seja, indica uma boa correlação entre as respostas experimentais e preditas e que o modelo é adequado para descrever as variações nas respostas [39, 40]. Os resultados da ANOVA são apresentados na Tabela 5 para todos os modelos de interações. A tabela ANOVA sumariza a soma e média dos quadrados das regressões e residuais junto com os graus de liberdades correspondentes, valor de F e os coeficientes de determinação. As expressões matemáticas utilizadas para cálculos dos estimadores ANOVA são amplamente apresentados na literatura [39]. De acordo com a tabela ANOVA, com exceção dos dados de pH, os valores de F são elevados com valores de R^2 próximos a unidade, o que é aceitável. Previamente já foi avaliado que não houve variação significativa no valor de pH com modificações nas formulações. Pela análise de variância isto fica evidente, visto que as formulações de controle (ponto central na média) apresentaram uma dispersão nos valores de pH entre 6,29 e 6,66. Todos estes estimadores estatísticos, exceto para o pH, revelam que os modelos fatoriais das interações são aceitos estatisticamente para a predição das duas respostas na escala considerada do planejamento (região válida).

Cinética de liberação

Os perfis da cinética de liberação *in vitro* de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas carregadas com hidrocortisona são mostrados na Figura 6. O sistema projetado em fluxo constante evita a saturação do sistema e, consequentemente, o equilíbrio de solubilidade [41]. Todavia, o sistema descreve resultados relativos comparando a cinética de liberação das nanoformulações (NC e NS) que foram investigadas nas mesmas condições. A velocidade de liberação ser alterada, por exemplo, com a modificação da vazão do tampão PBS. Amostras de 1,0 mL da suspensão coloidal foram retiradas em períodos de tempo pré-estabelecidos. Neste ensaio somente a hidrocortisona não encapsulada (livre ou liberada) possui a capacidade de permear através dos poros da bolsa de diálise. Os tempos necessários para liberação de 100% da HC de NC e NS foram de 6 e 8 horas, respectivamente. Aproximadamente 80% da hidrocortisona foi liberada nas duas primeiras horas (da suspensão coloidal para o meio de dispersão). Na Figura 6 se observa uma liberação inicial acentuada decorrente da saída para o meio de dispersão da HC não encapsulada ou apenas adsorvida na parede externa das nanopartículas. Após uma hora, a liberação assume um perfil mais lento limitado pela difusão da HC. A velocidade de liberação foi maior em NS em função da menor EE%, ou seja, maior taxa de difusão da HC não encapsulada e da capacidade de solubilização da HC no oleato de isodecila utilizado no preparo das NC.

Tabela 5. Parâmetros ANOVA para caracterização dos ajustes da Equação 1

Origem	g.l*	Soma dos quadrados	Média dos Quadrados	F-valor	Prob > F	R ²
pH						
Regressão	7	0,359	0,051	3,403	1,08x10 ⁻²	0,488
Erro (resíduos)	25	0,377	0,015			
Total	32	0,736				
Diâmetro de Partículas						
Regressão	7	125.834,376	17.976,339	63,530	2,42x10 ⁻¹⁴	0,947
Erro (resíduos)	25	7.073,973	282,959			
Total	32	132.908,350				
Potencial Zeta						
Regressão	7	1.816,089	259,441	27,922	2,65x10 ⁻¹⁰	0,887
Erro (resíduos)	25	232,288	9,292			
Total	32	2.048,377				
Recuperação						
Regressão	7	814,993	116,428	27,789	2,79x10 ⁻¹⁰	0,886
Erro (resíduos)	25	104,744	4,190			
Total	32	919,737				
Eficiência de encapsulamento						
Regressão	7	2.081,692	297,385	186,679	0,000	0,981
Erro (resíduos)	25	39,826	1,593			
Total	32	2.121,518				

* g.l. Graus de Liberdade

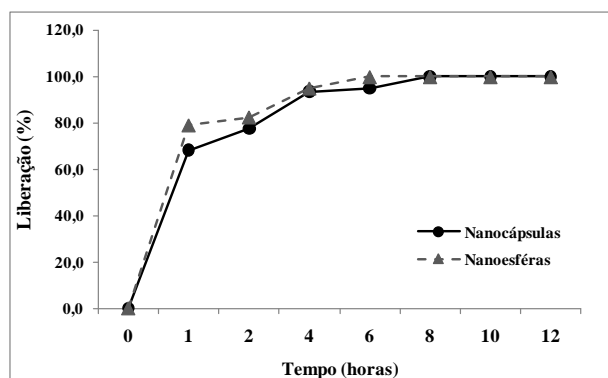


Figura 6. Perfil de liberação *in vitro* de nanopartículas poliméricas carregadas com HC.

O modelo de Korsmeyer-Peppas [21], geralmente usado para análise de mecanismos de liberação não muito bem estabelecidos ou quando há mais de um fenômeno envolvido, leva em consideração mecanismos de liberação de fármacos que não seguem a lei de Fick e segue um comportamento anômalo descrito pela Equação 5 [33, 42]. O valor de n é um parâmetro empírico, relacionado com a forma geométrica do sistema de liberação, e determina o mecanismo de liberação [33,43]. Os valores de n determinados pelos coeficientes angulares dos gráficos $\ln(M_t/M_\infty)$ vs. $\ln(t)$ para a HC em NC e NS foram 0,187 (intervalo 1–8 h) e 0,138 (intervalo 1–6 h), respectivamente. Quando assume valores menores que 0,45 ($n \leq 0,45$) o mecanismo de liberação refere-se ao processo de difusão pura (Fickiana clássica) [10, 43, 44]. As constantes de liberação para NC e NS foram 0,689 e 0,778, respectivamente, condizentes com os perfis de liberação observados.

Conclusões

Os resultados deste trabalho demonstram que nanocápsulas e nanoesferas poliméricas carregadas com hidrocortisona podem ser preparadas utilizando o polímero pré-formado PCL pela técnica de deposição interfacial. O método cromatográfico desenvolvido e validado foi eficiente aos estudos quantitativos da HC neste trabalho. O efeito de diferentes variáveis sobre a preparação de nanopartículas foi investigado. As características físico-químicas destes sistemas foram alteradas dependendo da composição das formulações. Os resultados demonstram que partículas de pequeno diâmetro e com carga negativa de superfície foram obtidas o que confere uma boa estabilidade coloidal. As variáveis independentes PCL e oleato de isodecila foram responsáveis pelas principais alterações no diâmetro de partícula, potencial zeta e eficiência de encapsulamento. A eficiência máxima de encapsulamento foi de 59,6% sendo encontrada para nanocápsulas. A EE% foi em média 42% maior para NC quando comparada com NS. A HC pode ser dispersa em meio aquoso numa concentração 53% maior que sua solubilidade máxima. A análise do perfil de liberação utilizando o modelo de Korsmeyer-Peppas mostrou modelo de cinética condizente com um processo de

difusão pura.

Agradecimentos

À Universidade Federal de São Carlos pela bolsa PADRD e às agências de fomento CNPq, CAPES e Fapesp, pelos auxílios financeiros.

Referências e Notas

- [1] Chapados, I.; Lee, T. F.; Chik, C. L.; Cheung, P. Y. *Eur. J. Pharm.* **2011**, 652, 111. [[CrossRef](#)]
- [2] Heindl, S.; Vahlkamp, K.; Weitz, G.; Fehm, H. L.; Dodt, C. *Steroids* **2006**, 71, 206. [[CrossRef](#)]
- [3] Ogias, D.; Bitencourt, B.; Alvares, E. P.; Gama, P. *Regulatory Peptides* **2006**, 135, 17. [[CrossRef](#)]
- [4] Filipović-Grčić, J.; Voinovich, D.; Moneghini, M.; Bećirević-Laćan, M.; Magarotto, L.; Jalšenjak, I. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, 9, 373. [[CrossRef](#)]
- [5] Cavalli, R.; Peira, E.; Caputo, O.; Gasco, M. R. *Int. J. Pharm.* **1999**, 182, 59. [[CrossRef](#)]
- [6] Cevc, G.; Blume, G. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1663, 61. [[PubMed](#)]
- [7] Manosroi, J.; Saowakhon, S.; Manosroi, A. *Enz. Microbial Technol.* **2007**, 41, 322. [[CrossRef](#)]
- [8] Jensen, L. B.; Magnusson, E.; Gunnarsson, L.; Vermehren, C.; Nielsen, H. M.; Petersson, K. *Int. J. Pharm.* **2010**, 390, 53. [[CrossRef](#)]
- [9] Reis, C. P.; Neufeld, R. J.; Ribeiro, A. J.; Veiga, F. *Nanomedicine: Nanotech. Biol. Med.* **2006**, 2, 8. [[CrossRef](#)]
- [10] Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L.L.; Pohlmann, A. R. *Quim. Nova* **2003**, 26, 726. [[CrossRef](#)]
- [11] Akagi, T.; Baba, M.; Akashi, M. *Polymer* **2007**, 48, 6729. [[CrossRef](#)]
- [12] Kristmundsdóttir, T.; Loftsson, T.; Holbrook, W. P. *Int. J. Pharm.* **1996**, 139, 63. [[CrossRef](#)]
- [13] Ali, H. S. M.; York, P.; Ali, H. M. A.; Blagden, N. J. *Control. Release* **2011**, 149, 175. [[CrossRef](#)]
- [14] Zimmer, A. K.; Maincent, P.; Thouvenot, P.; Kreuter, J. *Int. J. Pharm.* **1994**, 110, 211. [[CrossRef](#)]
- [15] a) Ramanathan, S.; Block, L. H. *J. Control. Release* **2001**, 70, 109. [[CrossRef](#)]; b) Barichello, J. M.; Handa, H.; Kisyuku, M.; Shibata, T.; Ishida, T.; Kiwada, H. *J. Control. Release* **2006**, 115, 94. [[CrossRef](#)]
- [16] a) Mahnert, W.; Mäder, K. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 47, 165. [[CrossRef](#)]; b) Kawashima, Y. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 47, 1. [[CrossRef](#)]
- [17] Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J-P. Ammoury, N.; Benita, S. *Int. J. Pharm.* **1989**, 55, R1. [[CrossRef](#)]
- [18] Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, 24, 1113. [[CrossRef](#)]

- [19] ICH [International Conference on Harmonization, FDA, USA]. Q2B: Validation of analytical procedures: methodology. 1996 (Available under: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM073384.pdf>).
- [20] Levy, M. Y.; Benita, S. *Int. J. Pharm.* **1990**, *66*, 29. [[CrossRef](#)]
- [21] Korsmeyer, R. W.; Gurny, R.; Doelker, E.; Buri, P.; Peppas, N. A. *Int. J. Pharm.* **1983**, *15*, 25. [[CrossRef](#)]
- [22] a) Wang, P. P.; Frazier, J.; Brem, H. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 987. [[CrossRef](#)]; b) Yan, S. S.; Gilbert, J. M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 1497. [[CrossRef](#)]
- [23] Dai, C.; Wang, B.; Zhao, H. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2005**, *41*, 117. [[CrossRef](#)]
- [24] Yamada, Y.; Harashima, H. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1439. [[CrossRef](#)]
- [25] Cassidy, C. M.; Tunney, M. M.; McCarron, P. A.; Donnelly, R. F. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **2009**, *95*, 71. [[CrossRef](#)]
- [26] Pitt, C. G. In: *Bioderadable Polymers as Drug Delivery Systems*. Langer, R.; Chasin, M., eds. New York: Marcel Decker Inc., 1990, 71.
- [27] Chawla, J. S.; Amiji, M. M. *Int. J. Pharm.* **2002**, *249*, 127. [[CrossRef](#)]
- [28] Ponsart, S.; Coudane, J.; Vert, M. *Biomacromolecules* **2002**, *1*, 275. [[CrossRef](#)]
- [29] Fukushima, K.; Abbate, C.; Tabuani, D.; Gennari, M.; Rizzarelli, P.; Camino, G. *Mater. Sci. Eng. C* **2010**, *30*, 566. [[CrossRef](#)]
- [30] Sarmiento, B.; Ribeiro, A.; Veigas, F.; Ferreira, D. *Biomed. Chrom.* **2006**, *20*, 898. [[CrossRef](#)]
- [31] Santos, K. C.; Da Silva, M. F. G. F.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Polikarpov, I.; Zucolotto, V.; Forim, M. R. *Anal. Methods* **2011**, *3*, 1936. [[CrossRef](#)]
- [32] Mohanraj, V. J.; Chen, Y. T. *J. Pharm. Res.* **2006**, *5*, 561.
- [33] de Melo, N. F. S.; Grillo, R.; Rosa, A. H.; Fraceto, L. F.; Dias-Filho, N. L.; de Paula, E.; Araújo, D. R. *Quim. Nova* **2010**, *33*, 65. [[CrossRef](#)]
- [34] Wu, L.; Zhang, J.; Watanabe, W. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 456. [[CrossRef](#)]
- [35] Clogston, J. D.; Patri, A. K. In: *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*. McNeil, S.E., ed. New York: Humana Press. 2011, 63. [[CrossRef](#)]
- [36] Manzanilla-Granados, H. M.; Jiménez-Ángeles, F.; Lozada-Cassou, M. *Colloid Surface A* **2011**, *376*, 59. [[CrossRef](#)]
- [37] Calvo, P.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 530. [[CrossRef](#)]
- [38] Barichello, J. M.; Morishita, M.; Takayama, K.; Nagay, T. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1999**, *25*, 471. [[CrossRef](#)]
- [39] Montgomery, D. C. *Design and Analysis of Experiments*, 5th ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.
- [40] Akhnazarova, S.; Kafarov, V. *Experiment optimization in chemistry and chemical Engineering*. Moscow: Mir Publisher, 1982.
- [41] Alsenz, J.; Kansy, M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 546. [[CrossRef](#)]
- [42] Hayashi, T.; Kanbe, H.; Okada, M.; Suzuki, M.; Ikeda, Y.; Onuki, Y.; Kaneko, T.; Sonobe, T. *Int. J. Pharm.* **2005**, *304*, 91. [[CrossRef](#)]

- [43] Lopes, C. M.; Lobo, J. M. S.; Costa, P. *Rev. Bras. Cien. Farm.* **2005**, *41*, 143. [[CrossRef](#)]
- [44] Li, Z-Z.; Xu, X-A.; Wen, L-X.; Liu, F.; Liu, A-Q.; Wang, Q.; Sun, H-Y.; Yu, W.; Chen, J-F. *J. Control. Release* **2006**, *111*, 81. [[CrossRef](#)]