

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Dalila Pinto Malaquias

**NANOESEFERAS DE BLENDS DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)/ POLI- ϵ -
CAPROLACTONA CONTENDO SINVASTATINA: DESENVOLVIMENTO E
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA**

**Diamantina-MG
2015**

Dalila Pinto Malaquias

**NANOESEFERAS DE BLENDA DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)/ POLI- ϵ -
CAPROLACTONA CONTENDO SINVASTATINA: DESENVOLVIMENTO E
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientadora Profa. Dra. Elaine Amaral Leite
Coorientador Prof. Dr. Álvaro Dutra de
Carvalho Júnior

**Diamantina –MG
2015**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

M237n	<p>Malaquias, Dalila Pinto Nanoesferas de blendas de poli(3-hidroxi-butirato)/ poli-ε-caprolactona contendo sinvastatina: desenvolvimento e caracterização físico-química / Dalila Pinto Malaquias. – Diamantina 2016. 104 p. : il.</p> <p>Orientador: Elaine Amaral Leite Coorientador: Álvaro Dutra de Carvalho Júnior</p> <p>Dissertação (Mestrado Profissional – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p>1. Nanoesferas. 2. Blendas PHB/PCL. 3. Sinvastatina. I. Título II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p>
	CDD 615

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dalila Pinto Malaquias

**NANOESEFERAS DE BLENDA DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)/ POLI- ϵ -
CAPROLACTONA CONTENDO SINVASTATINA: DESENVOLVIMENTO E
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Amaral Leite

Data de aprovação 06/11/2015

Prof. Dr. Rodrigo Moreira Verly

Prof. Dr. Juan Pedro Bretas Roa

Prof. Dr. Álvaro Dutra de Carvalho Júnior

Prof. Dra. Elaine Amaral Leite

Diamantina

AGRADECIMENTOS

À Deus por me acompanhar em cada passo, concedendo maravilhas em minha vida.

Agradeço aos meus pais, Lília e Epitácio, meus maiores exemplos de educadores. Obrigada por caminharem junto a mim, acreditando em cada sonho, fornecendo todo suporte e apoio para que consigamos realizá-los. E por sempre, nos momentos de dificuldades, me encorajar a continuar. Foi por vocês cada esforço, e sempre será!

Aos meus irmãos Daniel e Davi, por todo amor, preocupação e companheirismo. Vocês trazem leveza à minha vida, em cada etapa é fundamental tê-los ao meu lado, muito obrigada!

Aos meus queridos avós por todo carinho e precioso incentivo.

Ao Sânzio pela compreensão nos momentos de ausência e por todo apoio. Agradeço por ouvir minhas preocupações e torcer por esta conquista.

À Elaine agradeço a oportunidade concedida, por me acolher quando pensei em desistir. Obrigada pela orientação sempre acompanhada de preciosos ensinamentos, paciência, dedicação e confiança. Sinto-me honrada em poder trabalhar com alguém de extrema competência, que une seriedade e delicadeza, sendo um exemplo profissional e pessoal a seguir.

Ao Álvaro por me fazer conhecer e interessar pela Tecnologia Farmacêutica, muito obrigada pela oportunidade e por me confiar este trabalho. Agradeço todo apoio, conhecimentos transmitidos e por cada conselho que muito contribuem no meu crescimento profissional.

Aos professores da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFVJM por todo conhecimento transmitido durante as disciplinas.

Ao professor Juan por fornecer os polímeros e por toda disponibilidade no decorrer do trabalho.

Aos colegas da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo companheirismo e aprendizado.

À Isabella agradeço a amizade e a valiosa contribuição dada diariamente. Obrigada pela parceria, pelo incentivo, consolo e orações.

À Lays e Letícia por todo apoio e colaboração.

À Mari pelo carinho, preocupação e amizade que muito me ajudou neste período.

Ao Marcos pelos conselhos, ensinamentos e sugestões.

À Carol, por me ajudar em diversas etapas deste trabalho, sempre com muita paciência e boa vontade. Agradeço todos ensinamentos e amizade.

À Liziane pela ajuda com o DSC e por todas as vezes que prontamente me ajudou.

À Lívia, Délia e Marcela, obrigada pela preocupação, carinho e palavras sempre gentis.

Aos colegas do LTF, Lívia, Marina, Délia, Carol, Marcela, Liziane, Ana, Ju, Flávia, Fernanda, Nayara, Mayara, Lília, Sávia, Lucas, Gabriel, agradeço por todo apoio e conhecimentos compartilhados.

À professora Mônica pela colaboração em vários momentos deste trabalho.

À professora Ângela pela colaboração com a análise fatorial.

Ao Ernani e Vinícius por toda prestatividade.

Ao Vilela e Guilherme, pela receptividade no CETEC e realização das análises no AFM. Agradeço todas as conversas, sugestões e ensinamentos.

A todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Sistemas de liberação controlada são capazes de modificar a taxa de liberação de fármacos e direcioná-los aos locais de ação específicos, tornando-os mais eficazes além de reduzir a ocorrência de efeitos adversos, o que aumenta a aceitabilidade do tratamento pelo paciente. Polímeros biocompatíveis, seus copolímeros e blendas têm apresentado vantagens na formação destes sistemas mostrando resposta positiva quanto ao aprimoramento da terapêutica. O presente estudo visou desenvolver nanoesferas a partir de blendas de poli-(3-hidroxi-butirato) (PHB) e poli-(ϵ -caprolactona) (PCL) e avaliar o seu potencial como carreadoras de sinvastatina. Para tanto, parâmetros físico-químicos como tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, quantidade de fármaco encapsulada, liberação *in vitro* e morfologia foram avaliados. As nanoesferas contendo sinvastatina foram preparadas pela técnica emulsão/evaporação do solvente, variando-se a quantidade de sinvastatina adicionada na formulação. O doseamento foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência, após validação prévia do método analítico. A formulação que obteve maior quantidade de fármaco associado apresentou diâmetro médio 265 ± 10 nm com polidispersão média de $0,091 \pm 0,026$. Esses valores revelam um sistema nanométrico, com uma distribuição estreita de tamanho e uma homogeneidade das nanoesferas. O potencial zeta médio foi de $-31,8 \pm 3,59$ mV, sugestivo de predomínio de forças repulsivas, as quais previnem agregações em função da colisão entre as partículas. Os resultados de DSC e liberação *in vitro* sugerem transporte por difusão e a maior parte do fármaco estar associada à superfície da esfera. Os testes de estabilidade preliminar não indicam degradação dos componentes e aglomeração das partículas. A análise morfológica das nanoesferas, realizada por microscopia de força atômica demonstrou a presença de partículas esféricas e de superfície rugosa. Dessa forma, os dados sugerem que a preparação de nanoesferas utilizando a blenda PHB-PCL é um sistema promissor para carrear a sinvastatina.

Palavras-chave: Nanoesferas. Blenda PHB/PCL. Sinvastatina.

ABSTRACT

Controlled release systems are able to modify the release rate of pharmaceuticals and direct them to specific sites of action, making them more effective and reducing the occurrence of adverse effects, which increases the acceptability of treatment by the patient. Biocompatible polymers, their copolymers and blends have shown advantages in the formation of these systems, presenting positive response regarding the improvement of therapy. This study aimed to develop nanospheres from blends of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) and poly (ϵ -caprolactone) (PCL) and evaluate their potential as simvastatin carriers. Therefore, physical and chemical parameters such as size, polydispersity index, zeta potential, the amount of encapsulated pharmaceutical, in vitro release and morphology were evaluated. The nanospheres containing simvastatin were prepared by the emulsion/evaporation technique of the solvent, by varying the amount of simvastatin added to the formulation. The dosing was performed by high-performance liquid chromatography, after prior validation of the analytical method. The formulation that obtained a higher amount of associated pharmaceutical presented an average diameter of 265 ± 10 nm with an average of 0.091 ± 0.026 polydispersity. These values show a nanometric system with a narrow distribution size and an uniformity of nanospheres. The average zeta potential was -31.8 ± 3.59 mV, suggesting the predominance of repulsive forces, which prevent aggregation due to the collision between the particles. The DSC results and in vitro release suggest transport by diffusion and the fact that most of the pharmaceutical is linked to the sphere surface. Preliminary stability tests do not show degradation of the components and agglomeration of the particles. Morphological analysis of nanospheres, performed by atomic force microscopy demonstrated the presence of spherical particles and rough surface. Therefore, the data suggest that the preparation of nanospheres using the PHB-PCL blend is a promising system for carrying simvastatin.

Keywords: Nanosphere. PHB/PCL blend. Simvastatin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fluxograma do desenvolvimento de sistemas de liberação modificados para aplicação clínica.....	21
Figura 2 - Estrutura química do PHB.....	24
Figura 3 - Representação esquemática da biossíntese de PHB.	24
Figura 4 - Estrutura química do PCL.	26
Figura 5 - Processo de polimerização in situ de monômeros.	30
Figura 6 - Representação esquemática das etapas de preparação de nanoesferas a partir de emulsão.....	30
Figura 7 - Mecanismo de liberação do fármaco: (A) difusão através de poros, (B) difusão através do polímero, (C) bomba osmótica e (D) erosão.....	32
Figura 8 - Esquema evidenciando a dupla camada elétrica que rodeia uma partícula em meio aquoso.	34
Figura 9 - Ilustração do princípio de funcionamento do microscópio de varredura por força atômica (A) e relação de força que atua entre a agulha e a amostra (B).....	36
Figura 10 – Estrutura molecular do fármaco sinvastatina.....	37
Figura 11 - Sobreposição dos perfis cromatográficos obtidos para solução de sinvastatina e formulação de nanoesferas brancas.	47
Figura 12 - Curva analítica média (círculo branco) e fator de resposta (círculo preto) obtidos na faixa de concentração de 6,0 a 48,0 µg/mL para o doseamento de sinvastatina por CLAE.	49
Figura 13 - Representação esquemática do preparo das NE-BR.....	61
Figura 14 - Representação esquemática do preparo das NE-SV.....	62
Figura 15 - Avaliação do efeito da interação entre os fatores proporção de polímero e presença do copolímero sobre o diâmetro das partículas (A) e o PDI (B).	70
Figura 16 - Distribuição do diâmetro das NE-BR obtidas a partir de blendas PHB/PCL 20/80 sem copolímero (A), 80/20 sem copolímero (B), 20/80 com copolímero (C) e 80/20 com copolímero (D).....	71
Figura 17 - Avaliação do efeito da interação entre os fatores proporção de polímero e presença do copolímero sobre o potencial zeta.....	72
Figura 18 - Dados de diâmetro médio e índice de polidispersão das NE-SV obtidos mediante variação da concentração de sinvastatina na formulação.....	73

Figura 19 - Dados de potencial zeta das NE-SV obtidos mediante variação da concentração de sinvastatina adicionada na formulação.....	74
Figura 20 - Dados de teor de sinvastatina associada às nanoestruturas obtido em função da variação da concentração de fármaco adicionada inicialmente na formulação.	76
Figura 21 - Curvas de DSC obtidas sob atmosfera de nitrogênio e razão de aquecimento de 10°C/min após análise da a) sinvastatina; b) blenda PHB/PCL 20/80; c) mistura física da blenda e do fármaco (2:1); d) nanoesferas de PHB/PCL 20/80 contendo sinvastatina.	78
Figura 22 - Perfil de liberação in vitro das NE-SV e do fármaco livre a 37°C em tampão fosfato pH 7,4, evidenciando os primeiros 180 minutos de ensaio.	80
Figura 23 - Dados de diâmetro médio e índice de polidispersão das NE-SV obtidos durante o estudo de estabilidade preliminar.	83
Figura 24 - Variação da quantidade de sinvastatina associada às nanoesferas durante 30 dias.	84
Figura 25 - Variação do pH da preparação de NE-SV avaliado durante o período de armazenamento de 30 dias.	85
Figura 26 - Variação do potencial zeta da preparação de NE-SV avaliado durante 30 dias de armazenamento.	85
Figura 27 - Imagem da NE-BR (A) e NE-SV (B) obtida por AFM em visão tridimensional.	87
Figura 28 - Imagem topográfica NE-SV mostrando a presença de uma superfície irregular.	88
Figura 29 - Perfil topográfico das NE-BR demonstrando o diâmetro (A) e a altura (B).	88
Figura 30 - Perfil topográfico das NE-SV demonstrando o diâmetro (A) e a altura (B).	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistemas nanoparticulados à base de polímeros e lipídeos utilizados em entrega de fármacos.	20
Tabela 2 - Resultados da precisão intra-dia e inter-dias para a determinação de sinvastatina por CLAE, em triplicata.	50
Tabela 3 - Resultados da exatidão do método aplicado à determinação de sinvastatina na suspensão de nanoesferas 20/80 por CLAE, em triplicata.	51
Tabela 4 - Resultados obtidos para robustez do método aplicado à determinação de sinvastatina da concentração de trabalho (30µg/mL), por CLAE.	52
Tabela 5 - Caracterização do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações de nanoesferas brancas.	69
Tabela 6 - Valores do coeficiente de correlação linear referente à cinética de liberação/dissolução da sinvastatina em PBS determinados após a aplicação dos modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem e Higuchi.	82

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1 Nanocarreadores	19
3.2 Nanocarreadores poliméricos	22
3.3 Poli(3-hidroxibutirato)	23
3.4 Poli- ϵ -caprolactona.....	26
3.5 Blendas PHB-PCL.....	27
3.6 Técnicas de preparo de nanoesferas poliméricas	29
3.7 Caracterização físico-química	32
3.8 Sinvastatina	36
CAPÍTULO 1 - VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO UTILIZANDO A CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA O DOSEAMENTO DE SINVASTATINA EM NANOESFERAS DE BLENDA DE PHB/PCL.....	39
1 INTRODUÇÃO.....	41
2 MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1 Materiais	43
2.1.1 Reagentes	43
2.1.2 Equipamentos	43
2.2 Métodos.....	43
2.2.1 Especificidade	43
2.2.2 Linearidade.....	44
2.2.3 Precisão	45

2.2.4 Exatidão	45
2.2.5 Robustez.....	46
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1 Especificidade.....	47
3.2 Linearidade.....	48
3.3 Precisão	49
3.4 Exatidão	50
3.5 Robustez.....	51
4 CONCLUSÃO.....	53
CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE FORMULAÇÕES DE NANOESFERAS DE BLENDA DE PHB/PCL CONTENDO SINVASTATINA	55
1 INTRODUÇÃO.....	57
2 MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1 Materiais	59
2.2 Métodos.....	59
2.2.1 Preparo da blenda	59
2.2.2 Desenvolvimento farmacotécnico das formulações de nanoesferas sem o fármaco (NE-BR) a partir de blendas de PHB/PCL	59
2.2.3 Desenvolvimento farmacotécnico das formulações de nanoesferas contendo sinvastatina (NE-SV) a partir de blendas de PHB/PCL.	60
2.2.4 Caracterização físico-química	62
2.2.4.1 Diâmetro médio e distribuição	62
2.2.4.2 Determinação do potencial zeta.....	63
2.2.4.3 Determinação da encapsulação de sinvastatina	63
2.2.5 Análises térmicas.....	63
2.2.6 Avaliação da cinética de liberação <i>in vitro</i>	64
2.2.7 Estudo da estabilidade preliminar.....	65

2.2.8 Análise morfológica.....	65
2.2.9 Análise Estatística.....	65
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
3.1 Desenvolvimento farmacotécnico das formulações de NE-BR a partir de blendas de PHB/PCL	68
3.2 Desenvolvimento farmacotécnico das formulações de NE-SV a partir de blendas de PHB/PCL	72
3.3 Análises térmicas.....	76
3.4 Estudos de liberação <i>in vitro</i>	78
3.5 Estudo de estabilidade preliminar	82
3.6 Análise morfológica	86
6 CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS.....	93