

CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE SISTEMAS POLIMÉRICOS NANOPARTICULADOS PARA ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS

Scheila Rezende Schaffazick e Sílvia Stanisquaski Guterres*

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre - RS

Liane de Lucca Freitas e Adriana Raffin Pohlmann

Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970 Porto Alegre - RS

Recebido em 28/10/02; aceito em 27/2/03

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND STABILITY OF THE POLYMERIC NANOPARTICLE SYSTEMS FOR DRUG ADMINISTRATION. Polymeric nanoparticle systems such as nanocapsules and nanospheres present potential applications for the administration of therapeutic molecules. The physico-chemical characteristics of nanoparticle suspensions are important pre-requisites of the success of any dosage form development. The purpose of this review is to present the state of the art regarding the physico-chemical characterization of these drug carriers, in terms of the particle size distribution, the morphology, the polymer molecular weight, the surface charge, the drug content and the *in vitro* drug release profiles. Part of the review is devoted to the description of the techniques to improve the stability of colloidal systems.

Keywords: nanoparticles; polymers; characterization.

INTRODUÇÃO

O controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos, através da utilização de vetores, capazes de permitir a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias, tem sido uma área de intensa pesquisa nos últimos dez anos. Dentre os vetores, incluem-se as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas). As nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, têm atraído maior atenção dos pesquisadores em relação aos lipossomas, devido às suas potencialidades terapêuticas, à maior estabilidade nos fluidos biológicos e durante o armazenamento¹⁻³.

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (Figura 1). As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são

formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido^{2,4,5}.

Estes sistemas têm sido desenvolvidos visando inúmeras aplicações terapêuticas, sendo planejados, principalmente, para administração parenteral, oral ou oftálmica. Uma das áreas mais promissoras na utilização das nanopartículas é a vetorização de fármacos anticancerígenos^{2,6-8} e de antibióticos^{9,10}, principalmente através de administração parenteral, almejando uma distribuição mais seletiva dos mesmos e, assim, um aumento do índice terapêutico. Com relação à administração oral de nanopartículas, as pesquisas têm sido direcionadas especialmente à: a) diminuição dos efeitos colaterais de certos fármacos, destacando-se os antiinflamatórios não-esteróides (diclofenaco^{11,12}, indometacina¹³⁻¹⁵), os quais causam freqüentemente irritação à mucosa gastrointestinal e b) proteção de fármacos degradáveis no trato gastrointestinal, como peptídeos^{16,17}, proteínas^{8,18} e/ou hormônios¹⁹, aumentando a biodisponibilidade dos mesmos. Outro grande interesse nas nanopartículas é sua administração oftálmica²⁰⁻²³, visando o controle da liberação, o aumento da biodisponibilidade ocular e/ou a diminuição dos efeitos colaterais devido à absorção sistêmica de certos fármacos.

Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas, os quais podem ser, de uma forma geral, classificados em métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (cianoacrilato de alquila)²⁴⁻²⁸ ou na precipitação de polímeros pré-formados^{11,29-33}, tais como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e, ainda, os copolímeros do ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico. A Figura 2 apresenta as principais etapas dos diferentes métodos de preparação de nanopartículas³⁴⁻³⁶. Independentemente do método de preparação os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas. Entretanto, durante o tempo de armazenamento, pode ocorrer a agregação das nanopartículas no meio, resultando na formação de precipitados^{37,38}. Além disso, problemas de estabilidade química do polímero ou das demais matérias-primas, incluindo o fármaco, podem ocorrer³⁹⁻⁴¹. A consequência de uma estabilidade físico-química limitada, em função do tempo, constitui um obstáculo para a aplicabilidade industrial das sus-

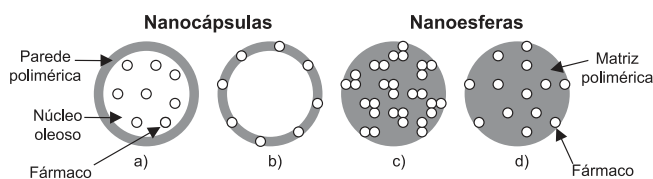


Figura 1. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas)

*e-mail: nanoc@farmacia.ufrgs.br

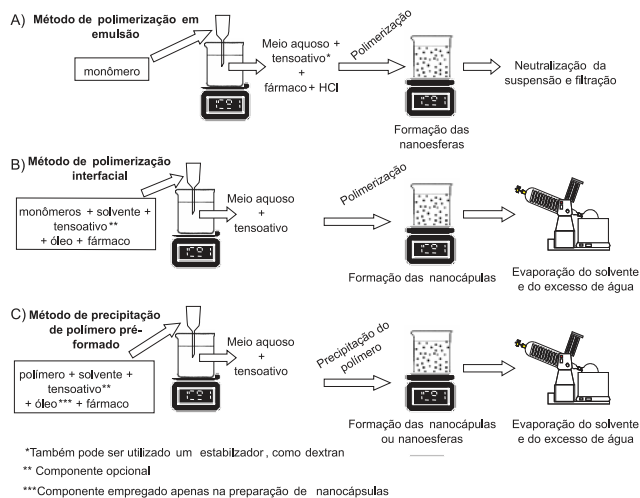


Figura 2. Métodos usuais, empregados na preparação de nanopartículas poliméricas, baseados na utilização de monômeros dispersos (A³⁴, B³⁵) ou na precipitação de polímeros pré-formados (C³⁶)

pensões aquosas de nanopartículas. Neste sentido, o interesse pelo desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas de nanopartículas é um ponto de convergência das pesquisas. Os problemas de estabilidade limitada podem ser minimizados através da secagem das suspensões^{42,43}. A sublimação (liofilização) tem sido bastante utilizada para a desidratação de sistemas coloidais, principalmente lipossomas⁴⁴⁻⁴⁷ e nanoesferas^{38,41,48}, empregando-se um crioprotetor ou lioprotetor, geralmente um carboidrato, para evitar a agregação das partículas durante o congelamento das suspensões. Recentemente, o nosso grupo de pesquisa desenvolveu um método de secagem por aspersão (nebulização) para a obtenção de pós nebulizados contendo nanopartículas poliméricas^{49,50}, utilizando como adjuvante o dióxido de silício (Aerosil 200®). Os produtos secos podem ser utilizados na obtenção de formas farmacêuticas sólidas, tais como cápsulas e comprimidos, o que é interessante sob o ponto de vista tecnológico e industrial.

Em função de sua natureza coloidal, dificuldades técnicas são encontradas na caracterização físico-química das nanopartículas. A caracterização das suspensões engloba a avaliação morfológica, a distribuição de tamanho de partícula, a distribuição de massa molar do polímero, a determinação do potencial zeta e do pH, a determinação da quantidade de fármaco associado às nanoestruturas, a cinética de liberação do fármaco e, ainda, a avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento^{51,52}. O conjunto de informações obtidas pela caracterização destes sistemas pode conduzir à proposição de modelos que descrevam a organização das nanopartículas em nível molecular, que será dependente da composição quali-quantitativa das formulações.

Na literatura, estão disponíveis alguns artigos de revisão referentes a nanopartículas, os quais são direcionados principalmente aos diferentes métodos de preparação^{1,2,4,5,8,29,53} e às potencialidades terapêuticas destes sistemas^{1,2,8,9,17,52,54}. Um artigo de revisão consistente sobre caracterização de nanopartículas foi publicado por Maghenhein e Benita⁵¹ e outros artigos de revisão^{1,52,55} abordam alguns aspectos da caracterização físico-química, embora estes não sejam o foco principal dos mesmos. Desta forma, artigos de revisão atualizados, direcionados especificamente à caracterização físico-química e, principalmente, voltados à proposição das formas de associação de fármacos a nanocápsulas e a nanoesferas poliméricas não são encontrados na literatura.

Este artigo tem como objetivo revisar as principais metodologias empregadas para a caracterização físico-química de nanopartículas poliméricas, visando a compreensão do comportamento físico-químico destes sistemas. As proposições das formas de associação e os perfis de liberação do fármaco, a partir das estruturas coloidais poliméricas, serão enfocados. Além disto, também serão abordados estudos referentes à secagem das suspensões de nanopartículas, empregando-se liofilização ou nebulização, como estratégia para aumentar a estabilidade físico-química destes sistemas.

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Avaliação morfológica

As microscopias eletrônicas de varredura⁵⁶⁻⁶⁰ (MEV) ou de transmissão^{59,61,62} (MET) têm sido muito empregadas na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas. A MET pode permitir também a diferenciação entre nanocápsulas e nanoesferas, possibilitando, inclusive, a determinação da espessura da parede das nanocápsulas^{63,64}. A técnica de criofratura também tem sido empregada para auxiliar a análise morfológica destes sistemas^{10,60,63,65-67}.

Um trabalho que exemplifica a utilização da MET, associada à técnica de criofratura, é o realizado por Rollot e colaboradores⁶³, o qual demonstrou que nanoesferas apresentam forma esférica, com estrutura polimérica sólida, ao passo que, as nanocápsulas são formadas por um fino (cerca de 5 nm) invólucro polimérico ao redor do núcleo oleoso. A utilização de microscopia eletrônica, também associada à técnica de criofratura, permitiu evidenciar a organização morfológica de nanocápsulas de poli(cianoacrilato de etila), nas quais o óleo, um triacilglicerol (Miglyol 812®), está circundado por uma parede polimérica⁶⁵.

Gouvender e colaboradores⁶⁸, através de MET, mostraram que a incorporação de quantidades baixas ou elevadas de fármaco não alterou a morfologia de nanopartículas formadas por PLA-bloco-poli(óxido de etileno). Santos-Magalhães e colaboradores³³, através de MEV, verificaram a presença de uma segunda população de partículas, com cerca de 2 µm de diâmetro, em uma suspensão de nanocápsulas de PLGA, após 3 meses da preparação, a qual apresentava diâmetro inicial de 180 ± 52 nm.

Outra técnica que tem sido empregada para caracterizar a morfologia de superfície das nanopartículas é a microscopia de força atômica⁶⁹⁻⁷², a qual fornece informações com alta resolução em três dimensões, em escala nanométrica, sendo capaz ainda de resolver detalhes de superfície em nível atômico⁷². Feng e colaboradores⁶⁹ empregaram esta técnica visando um estudo morfológico mais detalhado de nanoesferas de PLGA, preparadas empregando-se diferentes emulsificantes. Através do estudo, foi verificada uma topografia complexa na superfície das partículas e, mediante a análise seccional das amostras, foi revelada a presença de pequenas cavidades e de poros.

Distribuição de tamanho de partícula

De uma forma geral, as nanopartículas obtidas através de diferentes métodos, após a preparação, apresentam uma distribuição unimodal, com um baixo índice de polidispersão^{22,73,74}. Os métodos usuais para a determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas consistem em espectroscopia de correlação de fótons e MEV ou MET⁵². Dependendo da formulação, podem ser verificadas diferenças de tamanho de partículas conforme o método empregado na sua determinação, uma vez que a microscopia eletrônica fornece uma imagem da partícula isolada do meio, enquanto a espectroscopia

de correlação de fótons possibilita a determinação do raio hidrodinâmico das partículas em suspensão⁷⁵.

Vários estudos^{10,23,39,57,63,76-78} (Tabela 1) têm sido desenvolvidos para a avaliação dos principais fatores que afetam o diâmetro das partículas de sistemas nanoestruturados. Geralmente, as nanopartículas, mesmo preparadas através de diferentes métodos, apresentam diâmetros médios entre 100 e 300 nm^{37,50,75-81}, no entanto, partículas com diâmetros em torno de 60 a 70 nm⁶⁸ ou mesmo inferiores a 50 nm podem ser obtidas⁷⁷. A composição quali-quantitativa⁵⁷ e o método de preparação das nanopartículas são fatores determinantes do diâmetro médio e da polidispersão das partículas. No caso das nanocápsulas, um fator importante, que influencia o diâmetro das partículas, é a natureza do óleo utilizado como núcleo. Os resultados são atribuídos às diferenças de viscosidade⁸², hidrofobicidade²³ ou tensão interfacial⁶⁴ das substâncias empregadas.

Outra observação relevante é que a adição de monômero à emulsão⁶³ (método de polimerização interfacial) ou, ainda, a presença do polímero²³ (método de deposição de polímero pré-formado) podem conduzir à diminuição de tamanho de partícula em relação à emulsão devido, provavelmente, à redução da energia livre interfacial do sistema, no primeiro caso, ou mediante um efeito estabilizador do polímero ao redor das gotículas, no segundo.

Empregando-se o método de polimerização *in situ*, a presença do fármaco no meio pode alterar¹⁰ ou não⁷⁷ o diâmetro médio das partículas, uma vez que esse, assim como o tipo de tensoativo em-

pregado, podem interferir ou não na síntese e deposição das cadeias oligoméricas formadas⁷⁸. A presença do fármaco no meio reacional influencia o processo de nucleação, conduzindo a partículas maiores com ampla distribuição de tamanho¹⁰. Em alguns estudos^{7,10,76,78}, quando o fármaco foi adicionado após o término da polimerização, o tamanho destas não foi alterado pela sua associação. Utilizando-se o método de precipitação de polímeros pré-formados, a presença do fármaco na fase orgânica, antes da precipitação do polímero em meio aquoso, também pode⁷³ ou não^{39,37} influenciar o diâmetro médio de partículas.

É importante mencionar que a tendência à agregação e sedimentação das nanopartículas dispersas, em função do tempo, pode ser monitorada pela determinação de mudanças na distribuição de tamanho de partículas^{22,38,39}.

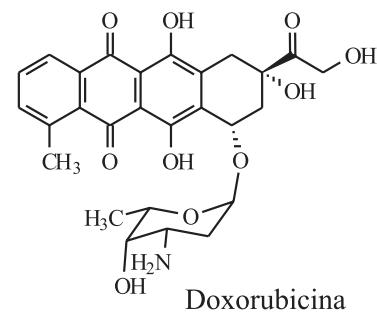
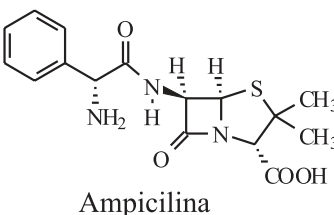
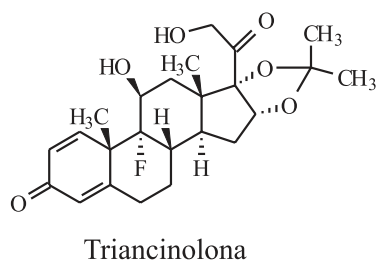
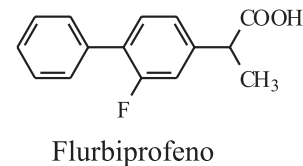
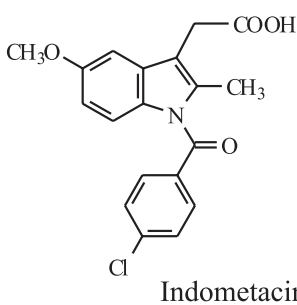
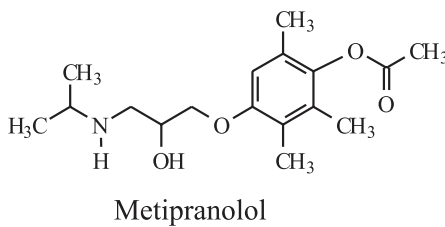
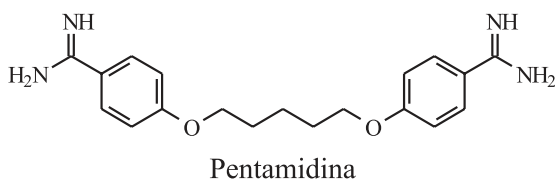
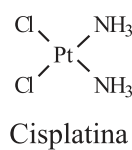
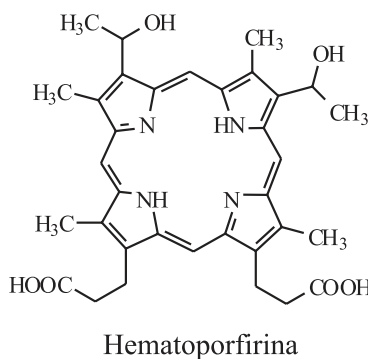
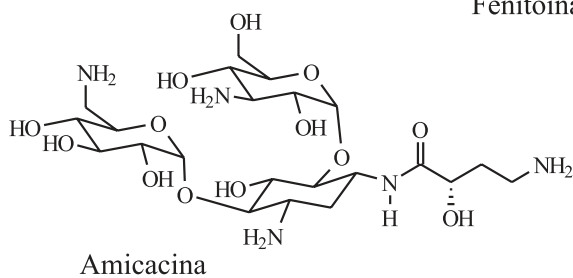
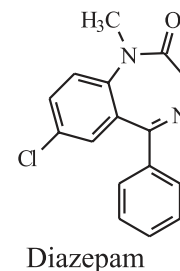
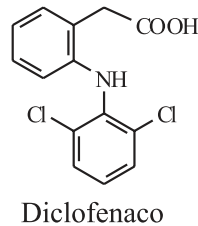
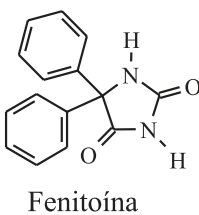
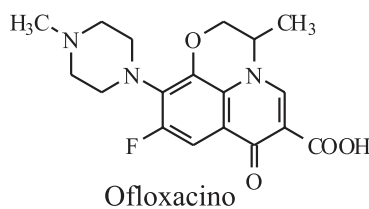
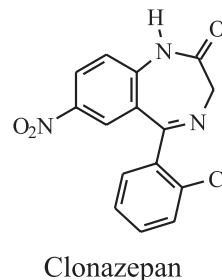
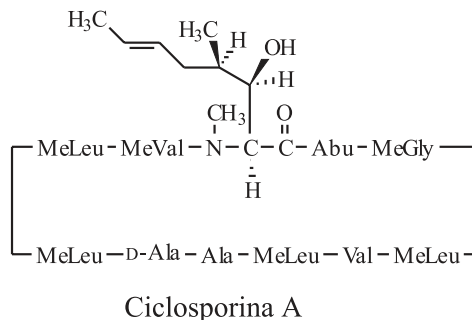
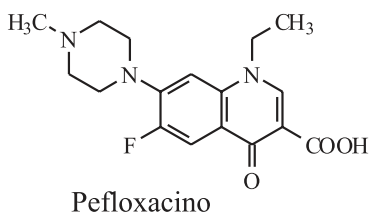
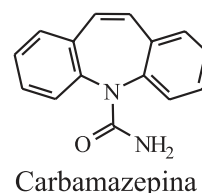
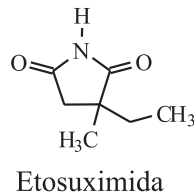
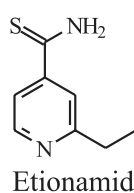
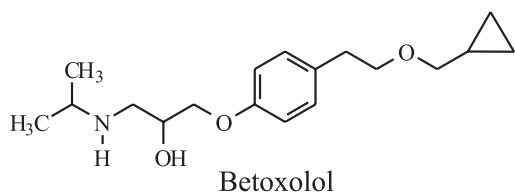
Massa molar e distribuição de massa molar do polímero

A determinação da distribuição de massa molar do polímero, após preparação, pode fornecer informações em relação à influência de componentes da formulação sobre o processo de polimerização¹⁰, sobre a ocorrência de reações químicas entre o fármaco e o polímero⁷⁷ e, ainda, sobre a degradação do polímero, em função do tempo³⁹. A técnica comumente utilizada para a determinação da distribuição de massa molar do polímero é a cromatografia de exclusão de tamanho^{39,83,84}. Outra técnica que pode ser empregada é o espalhamento

Tabela 1. Parâmetros que influenciam o diâmetro médio de nanocápsulas e de nanoesferas preparadas através de diferentes métodos

| Fármaco | Polímero* | Método de preparação | Resultados | Ref. |
|---------------------------------------|----------------|---|---|------|
| Mesilato de pefloxacino ou Ofloxacino | PECA | polimerização em emulsão | - a presença do ofloxacino no meio de polimerização aumentou o diâmetro das NS em comparação às formulações sem fármaco, preparadas com Triton X10 [®] , Tween 80 [®] ou Pluronic F68 [®] como tensoativos - a presença do pefloxacino no meio de polimerização aumentou o diâmetro das NS apenas no caso da formulação preparada com Pluronic F68 [®] | 10 |
| Metipranolol | PCL PIBCA | precipitação de polímero pré-formado polimerização interfacial | - para ambos os métodos, as NC preparadas com Labrafil [®] apresentaram diâmetro menor que as preparadas com Miglyol 840 [®] e a concentração de óleo não influenciou o diâmetro das partículas | 23 |
| Diclofenaco | PLA | precipitação de polímero pré-formado | - as concentrações de óleo e de fármaco não influenciaram o diâmetro das NC | 39 |
| - | PLA | emulsificação-difusão | - aumento da concentração do polímero ocasionou aumento do diâmetro das NS - o aumento da velocidade de agitação e aumento da concentração do tensoativo ocasionaram redução do diâmetro das partículas | 57 |
| - | PIBCA | polimerização interfacial | - diâmetro das NC menor que o diâmetro das gotículas da nanoemulsão correspondente | 63 |
| Cloridrato de betoxolol | PIBCA | polimerização em emulsão | - adição do fármaco após a formação das NS não alterou o diâmetro | 76 |
| - | PIBCA PIHCA | polimerização em emulsão | - o aumento da concentração de HCl ou do tensoativo diminuiu o diâmetro das NS - aumento da concentração de monômero ocasionou o aumento do diâmetro das NS | 77 |
| Sulfato de amicacina | PIBCA | polimerização em emulsão | - o aumento da concentração do fármaco ocasionou o aumento do diâmetro das NS | 78 |

*PIBCA: poli(cianoacrilato de *iso*-butila); PECA: poli(cianoacrilato de etila); PIHCA: poli(cianoacrilato de *iso*-hexila); PLA: poli(ácido láctico); PCL: poli(ϵ -caprolactona); NC: nanocápsulas; NS: nanoesferas.



de luz estático, mediante a análise da intensidade de luz espalhada pelas partículas^{10,85}.

Através da comparação da distribuição de massa molar entre nanoesferas de poli(cianoacrilato de *iso*-butila) contendo ou não ampicilina, um antibiótico β -lactâmico, não foram observadas mudanças significativas neste parâmetro, após a adição do fármaco no meio reacional, levando os autores a concluir que não houve interações químicas entre a ampicilina e a macromolécula em formação⁷⁷. Por outro lado, Alonso e colaboradores⁷⁸ verificaram que a presença de sulfato de amicacina, um antibiótico aminoglicosídeo, no meio de polimerização, conduziu à obtenção de cadeias de poli(cianoacrilato de butila) com maior massa molar, em relação àquelas preparadas sem o fármaco. Fresta e colaboradores¹⁰ verificaram que ofloxacino, um antibiótico fluorquinolônico, funciona como um iniciador da polimerização, conduzindo a cadeias poliméricas com menor massa molar, enquanto que o mesilato de pefloxacino foi capaz de levar à formação de cadeias poliméricas de maior massa molar, em relação às partículas obtidas na ausência destes fármacos.

Reich⁸⁶ verificou, através de estudos de distribuição de massa molar, que a estabilidade química das nanopartículas de PLA, em fluidos gástrico e intestinal artificiais, foi dependente das características do polímero e do pH do meio. E, ainda, que a distribuição de massa molar foi levemente influenciada pela presença de enzimas e/ou do tensoativo (poloxamer 188) adsorvido.

Potencial zeta

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão^{51,64}. Este parâmetro é determinado utilizando-se técnicas de eletroforese^{75,78,87}.

Os fosfolipídeos (lecitinas), os poloxamers (copolímeros dos óxidos de etileno e de propileno) e os polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta. Especialmente os poliésteres, como o PLA, e as lecitinas fornecem um potencial negativo à interface, enquanto que, os poloxamers (tensoativos não-iônicos) tendem a reduzir o valor absoluto deste parâmetro⁵². Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes.

As características de superfície das partículas também podem alterar a resposta biológica do fármaco associado. Quando se administram intravenosamente sistemas de nanopartículas convencionais, estes são rapidamente removidos da circulação sanguínea pela ação de células do sistema fagocitário mononuclear, dificultando a chegada do fármaco ao sítio de ação. Diferentes estratégias têm sido propostas para modificar a distribuição *in vivo* das nanopartículas, baseadas principalmente na redução da hidrofobicidade da superfície das partículas através da adsorção física de um polímero hidrofílico [poli(etilenoglicol)]^{1,88,89}.

Calvo e colaboradores⁸⁷ prepararam nanoemulsões e nanocápsulas de PCL, nas quais quitosana (um polissacarídeo catiônico) foi incorporada às formulações para fornecer potencial de superfície positivo às partículas ($\zeta = +37$ mV a $\zeta = +61$ mV), objetivando facilitar a interação destas com as membranas biológicas fosfolipídicas, além de prevenir a desestabilização das nanoestruturas de poliéster devido à adsorção de cátions e proteínas catiônicas presentes nos fluidos biológicos.

A determinação do potencial zeta também pode ser útil na

elucidação do mecanismo de associação de fármacos às nanopartículas^{40,78}. Um exemplo desta abordagem é o trabalho de Alonso e colaboradores⁷⁸, em que o potencial zeta de nanoesferas de poli(cianoacrilato de butila) foi determinado para se inferir sobre o mecanismo pelo qual o fármaco, sulfato de amicacina, e este polímero interagem. Desta forma, foi verificado que, quando o fármaco foi adicionado às nanopartículas em quantidades crescentes, a redução, em módulo, do potencial zeta foi concordante com o aumento da taxa de associação do fármaco. Os autores sugeriram que ocorre uma interação eletrostática entre o fármaco e o polímero.

Estudos comparativos entre nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão foram realizados para a proposição de modelos descritivos da organização destas nanopartículas. Calvo e colaboradores²² observaram os efeitos da composição das diferentes formulações sobre os valores do potencial zeta. Foi verificado que a presença da fase oleosa, nas nanocápsulas e nanoemulsões, conferiu a estas um potencial zeta mais negativo ($\zeta = -41,94$ mV e $\zeta = -42,32$ mV, respectivamente) em relação às nanoesferas ($\zeta = -16,33$ mV). Tendo em vista a semelhança dos resultados obtidos para nanocápsulas e nanoemulsões, os autores sugeriram que a camada polimérica ao redor das gotículas de óleo seria um delgado filme polimérico. Com o mesmo objetivo, Losa e colaboradores²³ determinaram valores de potencial zeta similares para nanocápsulas e nanoemulsões, concluindo que a camada polimérica ao redor das gotículas de óleo poderia não ser contínua. Por outro lado, Mosqueira e colaboradores⁶⁴ não observaram alteração do valor do potencial zeta em função da natureza do núcleo oleoso (triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico, succinato de diglicerila dos ácidos cáprico e caprílico, dicaprilato/dicaprato de propilenoglicol, oleato de etila, óleo mineral, dodecano, óleo de soja) utilizado para a preparação de nanocápsulas de PLA, concluindo que o óleo deveria estar completamente encapsulado pelo polímero. Além disto, sugeriram, através de comparações dos valores de potencial zeta de diferentes formulações, que a lecitina, utilizada como tensoativo, poderia estar localizada na superfície externa do polímero ou misturada com o filme polimérico ao redor do núcleo oleoso.

pH das suspensões

Informações relevantes sobre a estabilidade de suspensões nanoparticuladas podem ser obtidas mediante o monitoramento do pH, em função do tempo. Por exemplo, a alteração do pH pode ser indicio de degradação do polímero^{39,90}. Em um trabalho realizado por Calvo e colaboradores²² foi verificada uma diminuição da massa molar da PCL em suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas, após 6 meses de armazenamento, com conseqüente diminuição do pH destas formulações.

No entanto, a diminuição dos valores de pH de suspensões coloidais poliméricas, em um curto período de tempo, pode ser atribuída tanto à ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero, quanto à hidrólise, dependendo da hidrofobicidade do poliéster. Suspensões de nanopartículas preparadas com PCL apresentaram redução dos valores de pH, num período de 3,5 meses³⁷. Este fato foi atribuído à exposição de maior número de grupos ácidos carboxílicos terminais, em função do tempo, promovida pela relaxação das cadeias poliméricas. Em outro trabalho do nosso grupo de pesquisa⁹¹, a diminuição do pH de suspensões de nanocápsulas de poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metila) (Eudragit S90[®]), monitorado durante os primeiros 45 dias após a preparação, foi também atribuída à dissociação dos grupos carboxílicos, presentes como grupos pendentos no polímero, que, em função do tempo, se posicionam na interface partícula/água devido à relaxação das cadeias poliméricas.

Determinação da taxa de associação e da forma de associação do fármaco

A determinação da quantidade de fármaco associada às nanopartículas é especialmente complexa devido ao tamanho reduzido destas, que dificulta a separação da fração de fármaco livre da fração associada^{1,51}. Uma técnica de separação bastante utilizada é a ultracentrifugação^{33,76,78,92}, na qual a concentração de fármaco livre, presente na suspensão, é determinada no sobrenadante, após a centrifugação. A concentração total de fármaco, por sua vez, é geralmente determinada pela completa dissolução das nanopartículas em um solvente adequado. Por conseguinte, a concentração de fármaco associada às nanoestruturas é calculada pela diferença entre as concentrações de fármaco total e livre. Outra técnica que também tem sido empregada é a ultrafiltração-centrifugação^{23,39,37,52}, na qual uma membrana (10 kDa) é empregada para separar parte da fase aquosa dispersante da suspensão coloidal. A concentração livre do fármaco é determinada no ultrafiltrado e a fração de fármaco associada às nanoestruturas é calculada também pela subtração das concentrações total e livre.

A Tabela 2 exemplifica alguns valores de taxas de associação de diversos fármacos^{22,37-39,50,77,87,90,91,93,94} a nanocápsulas ou a nanoesferas preparadas com diferentes polímeros. De acordo com os estudos publicados, diversos fatores são capazes de influenciar a quantidade de fármaco associada aos sistemas nanoestruturados, dentre os quais destacam-se as características físico-químicas do fármaco^{22,39}, o pH do meio^{7,73,93,94}, as características da superfície das partículas ou a natureza do polímero¹⁸, a quantidade de fármaco adicionada à formulação⁷, a ordem de adição do fármaco na formulação, ou seja, antes (incorporação) ou após (incubação) à formação das nanoestruturas^{10,95}, a natureza do óleo utilizado²³ (no caso das nanocápsulas) e o tipo de tensoativo adsorvido à superfície polimérica^{76,96}.

Modificando-se as características de superfície das partículas, é possível obter diferentes taxas de associação do fármaco por adsorção, para uma mesma concentração inicial do mesmo. Este parâmetro é provavelmente muito importante para determinar a capacidade de prolongar o tempo de ação do fármaco⁷⁶. Portanto, é relevante determinar a isoterma de adsorção de fármacos à superfície das nanopartículas, uma vez que a mesma fornece informações de como o fármaco está distribuído na superfície das partículas e, ainda, sobre a capacidade de associação do mesmo. Experimentalmente⁷⁶, em uma dada temperatura, diferentes quantidades de fármaco são adicionadas a um determinado volume de suspensão. Após estabelecido o equilíbrio, pela distribuição do fármaco entre a fase fluida e o adsorvente (nanopartículas), uma alíquota de cada mistura é ultracentrifugada e a concentração do fármaco é determinada no

sobrenadante. A isoterma de adsorção, que expressa a variação da concentração de equilíbrio no adsorvente, é obtida plotando-se os valores de concentração de equilíbrio contra os valores de fármaco adsorvido. Além disso, uma pequena variação nas quantidades adsorvidas pode induzir a grandes diferenças no perfil de liberação do fármaco, principalmente para aqueles fracamente ligados às nanopartículas^{1,95,97}.

Em relação às nanoesferas, diferentes formas de associação do fármaco são descritas, sendo relatado que este pode estar dissolvido ou disperso dentro da matriz polimérica, ou ainda que pode estar adsorvido ao polímero^{4,5}. No entanto, até o presente momento, não está clara a diferença entre a adsorção do fármaco à matriz polimérica e a sua dispersão molecular na partícula. Por outro lado, nas nanocápsulas, as quais foram desenvolvidas para aumentar a eficiência de associação de fármacos lipofílicos, estes deveriam estar encapsulados pela membrana polimérica, ou seja, dissolvidos no núcleo oleoso. Entretanto, alguns artigos relatam a possibilidade da adsorção do fármaco à parede polimérica das nanocápsulas^{4,5,52,53,98,99}. Segundo Fresta e colaboradores¹⁰, os fármacos, quando associados pelo processo de incorporação, estariam dissolvidos, dispersos, adsorvidos ou quimicamente ligados à matriz polimérica. Por outro lado, utilizando-se o método de incubação, dependendo da natureza química do fármaco e do polímero, esse poderia estar adsorvido às nanoestruturas⁹¹.

Em vista disto, outro ponto que merece destaque, é a proposição da forma de associação do fármaco às nanopartículas, a qual é bastante complexa, uma vez que os métodos disponíveis apenas determinam a concentração de fármaco associada aos sistemas, ou seja, não são capazes de diferenciar se o fármaco está adsorvido ou retido na matriz polimérica das nanoesferas, ou se está dissolvido no óleo das nanocápsulas e/ou adsorvido à parede polimérica. Neste contexto, os pesquisadores têm feito inferências a respeito da associação do fármaco às nanopartículas através de estudos comparativos de potencial zeta^{40,78}, de perfis de liberação^{91,94}, de distribuição de massa molar do polímero⁷⁷, de estudos de adsorção e/ou de taxa de associação do fármaco às nanoestruturas^{7,10,76,94,95,100}, ou, ainda, através do uso de sondas fluorescentes²⁸. A Tabela 3 apresenta alguns exemplos de trabalhos nos quais foram obtidas algumas informações a respeito da provável forma de associação de fármacos^{7,28,77,91,94,95,100} às nanoestruturas, incluindo oligonucleotídeos ou peptídeos como a insulina.

Outro interessante trabalho, que objetivou a quantificação de uma fração de fármaco adsorvida à superfície das nanopartículas, foi desenvolvido por Gref e colaboradores¹⁰¹. Neste estudo, através da utilização de espectroscopia eletrônica para análise química, foi possível determinar a quantidade de ciclosporina A, um imunossupressor, presente na superfície de nanopartículas de PLA (16%) e de PLA-bloco-poli(etilenoglicol) (8%).

Tabela 2. Taxas de associação de alguns fármacos a nanopartículas poliméricas

| Fármaco | Polímero* | Sistema | Método de análise | Taxa de associação (%) | Ref. |
|----------------|-------------------------|---------|--------------------|------------------------|------------|
| Indometacina | PCL, PLA | NC, NS | ultrafiltração | 94-100 | 22, 93 |
| Diclofenaco | PLA, PCL, Eudragit S90® | NC, NS | ultrafiltração | 100 | 37, 39, 50 |
| Ciclosporina A | PCL | NS | ultracentrifugação | 90-98 | 38 |
| Ampicilina | PIBCA | NS | ultracentrifugação | 75 | 77 |
| Diazepam | PCL | NC | ultracentrifugação | 92-94 | 87 |
| Pentamidina | PLA | NS | ultrafiltração | 48-75 | 90 |
| Etionamida | Eudragit S90® | NC, NS | ultrafiltração | 39-62 | 91 |
| Insulina | Quitosana | NS | ultracentrifugação | 87-96 | 94 |

*PIBCA: poli(cianoacrilato de *iso*-butila); PLA: poli(ácido láctico); PCL: poli(ϵ -caprolactona); NC: nanocápsulas; NS: nanoesferas.

Tabela 3. Forma de associação de diferentes fármacos a nanocápsulas ou a nanoesferas poliméricas

| Fármaco | Polímero* | Método de preparação | Método de análise | Forma de associação | Ref. |
|------------------|----------------|--------------------------------------|--|---|------|
| Hematoporfirina | PIBCA PIHCA | polimerização em emulsão | isotermas de adsorção - ultracentrifugação | - adsorção do fármaco na superfície das NS | 7 |
| Oligonucleotídeo | PIBCA | polimerização interfacial | sonda fluorescente | - dissolução do fármaco no núcleo aquoso das NC | 28 |
| Ampicilina | PIBCA | polimerização em emulsão | liberação - ultracentrifugação | - retenção do fármaco pela matriz polimérica das NS | 77 |
| Etionamida | Eudragit S90® | precipitação de polímero pré-formado | liberação - ultrafiltração | - interação eletrostática do fármaco com as NC e NS | 91 |
| Insulina | Quitossana | geleificação ionotrópica | incubação - liberação - ultrafiltração | - interação eletrostática do fármaco com as NS | 94 |
| Doxorrubicina | PIBCA | polimerização em emulsão | isotermas de adsorção - centrifugação | - forte adsorção do fármaco nas NS | 95 |
| Oligonucleotídeo | MMA/EMA | polimerização radicalar | incubação - quantificação | - interação do fármaco por pares iônicos com as NS | 100 |

*PIBCA: poli(cianoacrilato de *iso*-butila); PIHCA: poli(cianoacrilato de *iso*-hexila); MMA/EMA: copolímero de metacrilato de metila e metacrilato de monometilaminoetila; NC: nanocápsulas; NS: nanoesferas.

Calorimetria exploratória diferencial, difração de raios X e espectroscopia no infravermelho

Outras técnicas empregadas para a determinação da forma de associação do fármaco a nanopartículas incluem a calorimetria exploratória diferencial, a difração de raios X e/ou a espectroscopia no infravermelho. A seguir, serão descritos alguns exemplos do emprego destas técnicas.

Os métodos termo-analíticos, tais como calorimetria exploratória diferencial (DSC), são de grande utilidade para a análise de polímeros¹⁰², e têm sido utilizados também para investigar interações entre os polímeros e os fármacos em diversas formulações de microesferas¹⁰³ e nanopartículas^{22,79}. Deste modo, informações úteis podem ser obtidas a respeito da morfologia do polímero cristalino e sobre o estado de dispersão sólida ou molecular do fármaco associado a estes sistemas poliméricos^{51,103}. Análises através de DSC têm sido utilizadas também para estudar as interações intermoleculares entre fármacos e adjuvantes, sendo de grande utilidade em estudos de pré-formulação, na medida em que podem ser obtidas informações sobre potenciais incompatibilidades físicas ou químicas entre o fármaco e os adjuvantes¹⁰⁴. Também é possível investigar reações químicas, como polimerização, depolimerização e degradação¹⁰².

A caracterização do estado físico de indometacina associada a nanocápsulas e a nanoesferas de PCL, realizada por DSC e difração de raios X, indicou que o fármaco está disperso molecularmente na matriz polimérica²². Adicionalmente, através do uso de espectroscopia no infravermelho, foi verificada a ausência de reações químicas entre a indometacina e o polímero. Empregando-se DSC, raios X e espectroscopia no infravermelho também foi verificado que o diclofenaco sódico estaria disperso molecularmente em nanoestruturas preparadas com uréia-formaldeído¹⁰⁵. Ainda, através de DSC e raios X¹⁰⁶, foi verificado que um fármaco anti-hipertensivo dihidropiridínico estaria molecularmente disperso na matriz de nanoesferas, preparadas com PCL, PLA ou PLGA.

Além do emprego de DSC na elucidação da forma de associação dos fármacos às nanoestruturas, esta técnica também pode ser aplicada na obtenção de informações a respeito da organização de outros componentes das formulações nestes sistemas. Assim, análises por DSC¹⁰⁷ permitiram propor que o monoestearato de sorbitano,

um tensoativo, estaria dissolvido no núcleo oleoso (triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico) das nanocápsulas de PCL. No caso das nanoesferas, foi proposto um sistema bifásico polímero-tensoativo, onde o monoestearato de sorbitano estaria disperso na matriz polimérica.

CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO FÁRMACO

Segundo Soppimath e colaboradores¹, a liberação dos fármacos a partir de sistemas nanoparticulados poliméricos depende de diferentes fatores: a) da desorção do fármaco da superfície das partículas; b) da difusão do fármaco através da matriz das nanoesferas; c) da difusão através da parede polimérica das nanocápsulas; d) da erosão da matriz polimérica ou e) da combinação dos processos de difusão e erosão. Métodos como a difusão em sacos de diálise^{22,23,76} e a separação baseada na ultracentrifugação^{77,96,101}, na filtração a baixa pressão¹⁰⁸ ou na ultrafiltração-centrifugação^{91,95} têm sido utilizados para este fim.

Li e colaboradores¹⁰⁹ verificaram que a albumina, utilizada como proteína modelo, associada a nanopartículas de PLGA ou de PLGA-bloco-poli(etilenoglicol) apresentou uma rápida liberação inicial, a qual pode estar relacionada com uma fração da proteína adsorvida à superfície das partículas. Numa segunda etapa, o perfil de liberação apresentou forma sustentada, atribuída à difusão da proteína através da matriz polimérica e à erosão desta. De forma semelhante, Fresta e colaboradores¹⁰ verificaram uma liberação bifásica de mesilato de pefloxacino ou ofloxacino a partir de nanoesferas de poli(cianoacrilato de etila), com uma liberação rápida inicial, seguida por uma fase de liberação muito lenta, com uma cinética de primeira ordem. A velocidade de liberação de cisplatina, um anticancerígeno, a qual também apresentou-se bifásica, foi afetada pela composição das nanopartículas. A diminuição da razão PLGA/poli(etilenoglicol) aumentou a velocidade de liberação do fármaco⁷⁴.

Bapat e Boroujerdi⁹⁵ sugeriram que a liberação de doxorrubicina, uma antraciclina antineoplásica, incorporada a nanopartículas de poli(cianoacrilato de *iso*-butila), pode ser controlada e dependente da taxa de erosão da partícula. Em outro estudo, a cinética de liberação de doxorrubicina conjugada quimicamente ao grupo carboxílico

terminal do PLGA, através de uma ligação éster, foi sustentada, podendo ser controlada pela massa molar do polímero⁶.

A liberação de clonazepam, utilizado como fármaco modelo, associado a nanoesferas, constituídas pelo tribloco PCL-bloco-poli(etilenoglicol)-bloco-PCL seguiu aproximadamente uma cinética de pseudo ordem zero¹⁰. Quanto maior a massa molar do tribloco, mais lenta foi a cinética de liberação do fármaco, sendo esta controlada predominantemente por um mecanismo de difusão do que pela degradação do copolímero.

Em um trabalho realizado em nosso laboratório⁹¹, suspensões de nanocápsulas ou de nanoesferas de Eudragit S90[®] contendo etionamida, um tuberculostático, preparadas pela adição do fármaco antes (incorporação) ou depois (incubação) da formação das nanopartículas, tiveram seus perfis de liberação avaliados para se determinar o mecanismo de associação do fármaco aos colóides. Foi observada a liberação rápida e total do fármaco a partir das formulações obtidas por incubação e liberação de 80% e de 90% a partir das nanopartículas preparadas por incorporação. Desta forma, esta comparação levou à proposição de que o fármaco estaria majoritariamente adsorvido à superfície das partículas. Esta adsorção seria decorrência da formação de um sal entre o ácido conjugado da etionamida e os ânions carboxilatos do polímero.

Tendo em vista os estudos realizados, a cinética de liberação de fármacos a partir de nanoesferas apresenta-se, geralmente, na forma de uma exponencial (primeira ordem), provavelmente devido à difusão do fármaco da matriz polimérica para o meio e/ou à erosão da matriz polimérica, liberando o fármaco^{1,10,108,109,111}.

No caso das nanocápsulas, o fármaco, teoricamente dissolvido no núcleo oleoso, seria liberado desta estrutura vesicular mediante a sua difusão através da parede polimérica, podendo apresentar cinética de ordem zero¹. Neste sentido, Fresta e colaboradores⁶⁶ verificaram que os perfis de liberação de carbamazepina, etosuximida e fenitoína (anticonvulsivantes), associadas a nanocápsulas de poli(cianoacrilato de etila), seguiram aproximadamente uma cinética de ordem zero. Desta forma, o mecanismo de liberação destes fármacos corresponderia, principalmente, à difusão dos mesmos a partir do núcleo oleoso em direção à parede polimérica. Além disto, a rápida liberação inicial dos fármacos poderia, segundo os autores, ser atribuída a uma pequena quantidade destes adsorvida à superfície das partículas. Watnasirichaikul e colaboradores¹¹² também estimaram que a cinética de liberação de insulina a partir de nanocápsulas de poli(cianoacrilato de etila) segue uma cinética de ordem zero.

Por outro lado, Calvo e colaboradores²², com base na similaridade entre os perfis de liberação de indometacina, associada a nanocápsulas de PCL e à nanoemulsão, sugeriram que a parede polimérica das nanocápsulas não influencia o processo de liberação, sendo este afetado somente pela partição do fármaco entre as gotículas de óleo e o meio aquoso externo. Comparando estes resultados com o perfil de liberação da indometacina a partir de nanoesferas, a rápida liberação deste fármaco foi interpretada pelos autores como decorrente da difusão desta através da matriz polimérica. Losa e colaboradores²³, estudando a liberação de metipranolol, um β -bloqueador antiglaucoma, a partir de nanocápsulas e nanoemulsão, verificaram que não houve influência significativa da parede polimérica na liberação do fármaco, sugerindo que o passo limitante do processo de liberação do fármaco é a partição do mesmo entre as fases oleosa e aquosa. Por outro lado, Valero e colaboradores¹¹³ verificaram diferenças significativas entre a suspensão de nanocápsulas de poli(cianoacrilato de *iso*-butila) e a emulsão controle, quanto aos perfis de liberação da triancinolona, principalmente durante as primeiras 10 h. Além disto, a liberação de triancinolona a partir das nanocápsulas apresentou-se bifásica, com uma rápida liberação inicial, seguida por uma fase de liberação muito lenta de primeira ordem.

ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As suspensões coloidais normalmente não possuem tendência à separação de fases, até alguns meses após a preparação, pois o processo de sedimentação é lento para partículas submicrométricas, sendo minimizado pelo movimento Browniano. No entanto, com o tempo, pode ocorrer a aglomeração das partículas e, conseqüentemente, a sedimentação. Vários fatores influenciam a estabilidade das suspensões coloidais como, por exemplo, a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas e a presença de tensoativos adsorvidos. Além disto, a avaliação da estabilidade química dos polímeros formadores dos colóides, sob diferentes condições de armazenagem, é de fundamental importância^{38,51}. O tamanho de partícula, o potencial zeta, a distribuição da massa molar do polímero, o teor de fármaco e o pH são geralmente os parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados para monitorar a estabilidade das suspensões coloidais poliméricas^{22,23,36,39,114}. Poucos estudos referentes à estabilidade de nanopartículas contendo diferentes fármacos são encontrados na literatura^{22,23,37,38,114,115} (Tabela 4).

A aplicabilidade industrial de nanopartículas dispersas em meio aquoso pode ser limitada, devido aos problemas de baixa estabilidade físico-química, em períodos de armazenamento prolongados. As principais limitações são a agregação das partículas, a estabilidade química do polímero, do fármaco ou de outras matérias-primas e, ainda, a liberação prematura da substância ativa^{37,39-41,51}. Além disto, é importante enfatizar que formas farmacêuticas líquidas são propensas à proliferação microbiana, havendo a necessidade de adição de conservantes¹¹⁶. Apesar disto, poucos trabalhos, relacionados a suspensões de nanopartículas, têm se preocupado em avaliar a adição de tais componentes às formulações^{117,118}.

Tendo em vista que estes problemas físico-químicos e microbiológicos possam ser retardados ou evitados através de uma operação de secagem⁴², vêm crescendo o interesse pelo desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas de nanopartículas, ampliando as perspectivas para a utilização clínica destes sistemas carreadores de fármacos^{43,50,107,119,120}. A desidratação das suspensões de nanopartículas tem sido realizada através das operações de sublimação (liofilização)^{40,41} ou de aspersão ("spray-drying" ou nebulização)^{50,107}.

Liofilizados de nanopartículas

A liofilização consiste na remoção da água (gelo) através de sublimação¹²¹⁻¹²³ e tem sido amplamente empregada para a secagem de suspensões de nanoesferas^{38,40,41,89,124-126}. Entretanto, no caso das suspensões de nanocápsulas, poucos trabalhos, utilizando esta operação, têm sido desenvolvidos^{87,99,127,128}.

Este método foi empregado para a secagem de suspensões de nanocápsulas, contendo indometacina, preparadas com PLA e benzoato de benzila como núcleo das vesículas^{127,128}. Entretanto, após a re-hidratação dos produtos liofilizados, armazenados à temperatura ambiente, mais de 50% do fármaco associado foi liberado. Gürsoy e colaboradores¹²⁸ atribuíram estes resultados a mudanças na estrutura da parede das nanocápsulas, e Chasteigner e colaboradores¹²⁷ sugeriram que, durante o estágio de congelamento, as tensões provocadas pela cristalização da água poderiam "quebrar" as nanocápsulas, ocasionando a perda do conteúdo das mesmas para a fase aquosa.

Em trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa¹²⁹, experimentos de inchamento/dissolução mostraram que filmes poliméricos de PCL ou de PLA foram rapidamente dissolvidos pelo benzoato de benzila, sugerindo que, quando são empregadas estas matérias-primas, as nanopartículas formadas seriam micelas e não nanocápsulas.

Tabela 4. Estudos de estabilidade de suspensões de nanopartículas poliméricas, em função do tempo de armazenamento

| Fármaco | Polímero* | Sistema | Condições de armazenagem | Resultados | Ref. |
|----------------|----------------------|---------|--------------------------|--|------|
| Indometacina | PCL | NC, NS | t.a. 6 meses | - taxa de associação inalterada - diminuição do pH - discreta redução do potencial zeta (NC) | 22 |
| Metipranolol | PIBCA PCL | NC | 4 °C 3 meses | - potencial zeta inalterado - aumento do diâmetro médio - diminuição da taxa de associação | 23 |
| Diclofenaco | PCL Eudragit S90® | NC, NS | t.a. 3,5 meses | - redução do teor do fármaco - redução do pH - precipitação | 37 |
| Ciclosporina A | PCL | NS | 8 / 25 °C 3 meses | - taxa de associação inalterada - após 4 meses formação de agregados | 38 |
| Flurbiprofeno | PCL | NS | 4 / 25 / 40 °C 6 meses | - agregação após 60 dias das formulações de pH 2,67 - redução do pH e do teor de fármaco após 60 dias das formulações de pH 7,0 | 114 |
| Indometacina | PCL PLA | NC, NS | t.a. / 50 °C 3 meses | - discreta redução do teor do fármaco à t.a. - acentuada redução do teor do fármaco à 50 °C | 115 |

*PIBCA: poli(cianoacrilato de *iso*-butila); PCL: poli(ϵ -caprolactona); PLA: poli(ácido láctico); NC: nanocápsulas; NS: nanoesferas; t.a.: temperatura ambiente.

Portanto, as mudanças na estrutura da parede polimérica das nanocápsulas, propostas por Gürsoy e colaboradores¹²⁸, ocorreriam antes da etapa de congelamento, devido à dissolução do polímero pelo benzoato de benzila e as tensões provocadas pela cristalização da água, propostas por Chasteigner e colaboradores¹²⁷, ocorreriam em estruturas micelares, não ocasionando a quebra de nanocápsulas. Conseqüentemente, a operação de liofilização não pode ser rejeitada para a secagem de suspensões de nanocápsulas, quando o óleo não dissolve o polímero e a estrutura das partículas corresponde a uma vesícula.

A caracterização dos liofilizados de nanopartículas geralmente é feita após a ressuspensão do produto em água e pode envolver a observação visual do efeito Tyndall e da presença de grumos, a determinação do diâmetro de partícula, da taxa de associação do fármaco e do pH^{38,40,41,48,87,124-126}. Além disto, alguns trabalhos empregam DSC⁴¹ e microscopia eletrônica⁹⁹ para caracterizar estes sistemas.

Em artigos recentes, têm sido relatado que a presença de um crioprotetor é fundamental para a desidratação de suspensões de nanopartículas através de liofilização. Os crioprotetores mais comuns, citados na literatura são os carboidratos (glicose, sacarose, manitol, frutose), sendo os mono- e dissacarídeos os mais efetivos na manutenção das características iniciais de tamanho das partículas^{38,40,41,48,87,124-126}. Este efeito crioprotetor ou lioprotetor dos açúcares é atribuído à formação de uma matriz amorfa ao redor das nanopartículas, promovendo um espaçamento entre as mesmas, evitando, assim, a agregação durante o congelamento, tornando-as ressuspendíveis^{41,48}.

A seleção dos carboidratos mais adequados para atuarem como crioprotetores, na liofilização de nanopartículas, tem sido feita pelo índice de redispersão, o qual é obtido pela relação entre os diâmetros médios de partícula após a ressuspensão dos liofilizados e antes da secagem. Para um adequado efeito protetor, geralmente, é necessário adicionar quantidades elevadas de carboidrato. O produto apresenta um aspecto de sólido aglomerado^{38,40,41,48,87,124-126}. Cabe ressal-

tar que, quando estas formulações são planejadas para a administração parenteral, a manutenção do tamanho médio das partículas é um fator crítico.

Em um de nossos trabalhos⁹⁹ foram obtidos pós liofilizados de micropartículas contendo nanocápsulas ou nanoesferas, destinados à administração oral, empregando-se o dióxido de silício coloidal (3% m/v) como adjuvante. Análises através de MEV dos pós liofilizados evidenciaram micropartículas não esféricas, as quais, em aumentos maiores, apresentaram-se nanorrevestidas (Figura 3). A operação de retirada da água das suspensões causa a formação das micropartículas pela deposição das nanopartículas orgânicas sobre as nanopartículas do dióxido de silício.

Nebulizados de nanopartículas

A operação de secagem por nebulização consiste na passagem da solução ou da suspensão, através de um orifício atomizador, para a câmara de secagem sob a forma de gotículas, em co-corrente, contracorrente ou fluxo misto de ar quente, que promove a rápida secagem das gotículas. As partículas sólidas secas são, então, separadas e recolhidas, podendo apresentar-se sob a forma de pós finos, granulados ou aglomerados^{123,130}.

Freitas e Müller¹³¹ empregaram a nebulização como uma alternativa à liofilização, objetivando aumentar a estabilidade de nanopartículas formadas por lipídeos sólidos, utilizando como adjuvante carboidratos (manitol, lactose, trealose, sorbitol, glicose e manose). Recentemente, nosso grupo de pesquisa⁴⁹ descreveu, pela primeira vez, o uso da nebulização para a secagem de suspensões de nanopartículas poliméricas, com intuito de implementar a estabilidade destes sistemas. Utilizando esta metodologia, a partir de suspensões aquosas de nanopartículas pode-se obter produtos pulverulentos. Esta característica torna estes produtos interessantes como intermediários no desenvolvimento de formas farmacêuticas compartimentadas como cápsulas e comprimidos^{50,107,129} de ampla

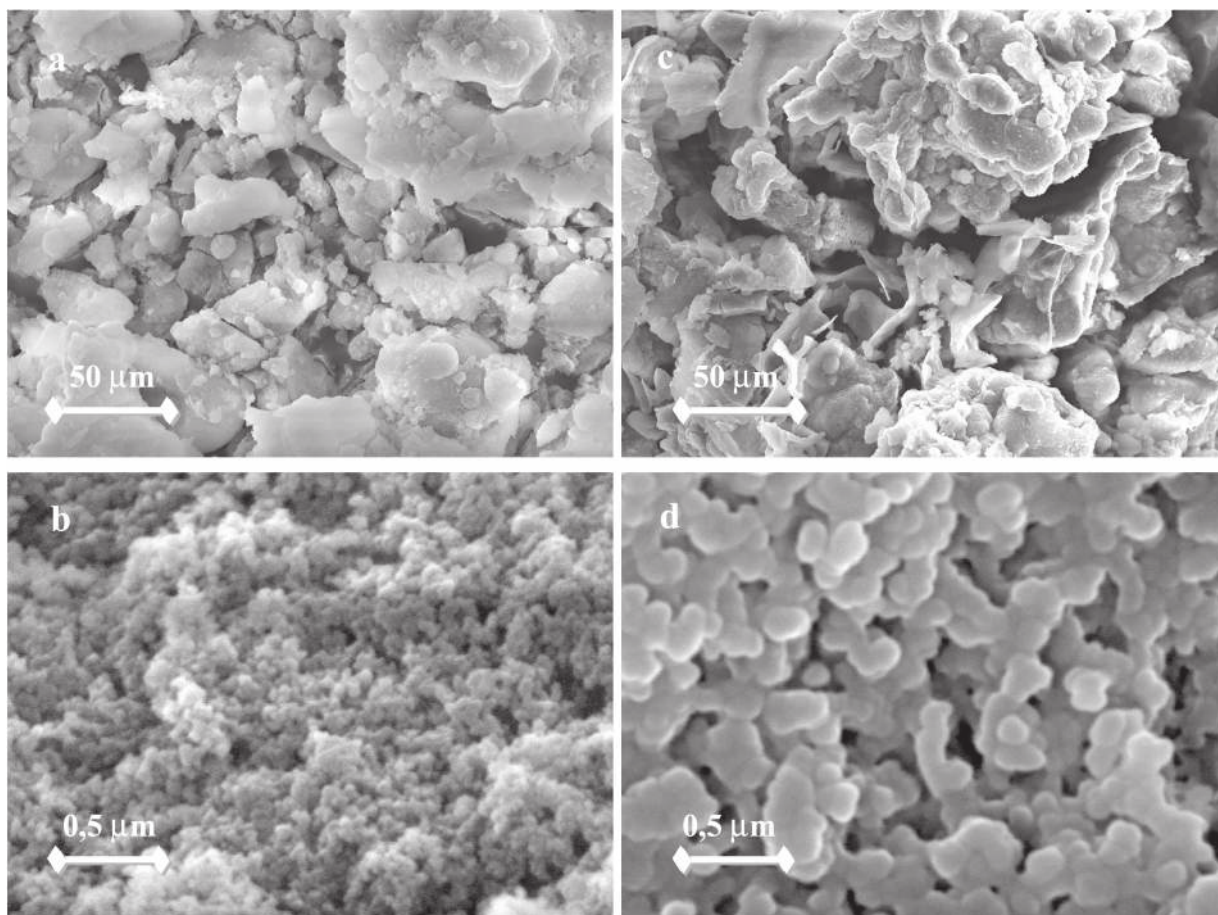


Figura 3. Fotomicrografias: comparação do liofilizado da dispersão aquosa do dióxido de silício puro (a e b) com o liofilizado de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) preparado na presença de dióxido de silício (c e d)

aplicação industrial. Os pós nebulizados têm sido caracterizados através de MEV, da determinação do teor de fármaco, do rendimento da nebulização, da umidade residual^{15,50,107,129}, da liberação *in vitro* dos fármacos associados¹⁵ e, ainda, mediante análises através de DSC¹⁰⁷. Além da caracterização físico-química, estudos farmacocinéticos¹² e avaliação da tolerância gastrointestinal^{12,15}, em ratos, de antiinflamatórios não-esteróides associados a nanopartículas nebulizadas, têm sido realizados. A MEV tem sido empregada para a observação de nanopartículas adsorvidas à superfície do adjuvante de secagem (dióxido de silício coloidal), após a secagem das suspensões através de nebulização (“spray-drying”)^{50,107,129}. Foi possível evidenciar a presença de micropartículas de dióxido de silício revestidas por nanocápsulas, preparadas com PCL ou Eudragit S90® e Miglyol 810® (óleo), cujos diâmetros apresentavam-se semelhantes aos das partículas em suspensão aquosa, antes da secagem⁵⁰. Por outro lado, para pós nebulizados de nanoesferas de PCL não foram observadas nanopartículas, com tamanho semelhante às suspensões de origem, adsorvidas à superfície do dióxido de silício, sugerindo que a operação de secagem por “spray-drying” causou uma alteração na organização das nanoesferas de PCL^{107,115}. Estes estudos mostram a possibilidade de preparação de forma controlada de pós microparticulados nanorevestidos⁴⁹.

CONCLUSÃO

A compreensão do comportamento físico-químico das nanopartículas poliméricas é objeto de inúmeras pesquisas, sendo que as principais dificuldades encontradas, para a caracterização dos

mesmos, são conseqüências do tamanho reduzido destas partículas. A caracterização físico-química desses sistemas só é possível mediante a combinação de diversas técnicas de análise. Um dos maiores desafios, que ainda persiste, é a elucidação da forma de associação dos fármacos a estas nanopartículas, visando a otimização da taxa de associação e a compreensão dos fatores que influenciam o perfil de liberação dos fármacos. Entretanto, algumas generalizações podem ser assumidas com base na análise dos resultados específicos, produzidos pela ampla gama de trabalhos publicados empregando diferentes fármacos, composição de adjuvantes e tipos de sistemas coloidais. Ainda que, de uma forma geral, as nanopartículas poliméricas apresentem uma distribuição unimodal com baixo índice de polidispersão, seus diâmetros médios podem ser fundamentalmente dependentes da composição quali-quantitativa dos sistemas, bem como do método e condições operacionais de preparação. Estes mesmos fatores, somados à solubilidade e partição do fármaco nos sistemas, influenciam os teores e as taxas de associação. As formas de associação dos fármacos dependem do tipo de interações destes com o polímero e o óleo, no caso de nanocápsulas, não sendo estritamente dependente do coeficiente de partição do fármaco entre a fase oleosa e a aquosa. Quando interações iônicas entre o fármaco e o polímero podem se estabelecer, mesmo que o primeiro seja lipofílico, a adsorção parece ser a forma de associação preferencial. Diversos avanços têm sido alcançados, tanto no acúmulo de informações relativas aos fenômenos físico-químicos envolvidos, quanto em relação ao desenvolvimento de formulações de nanopartículas mais estáveis, o que têm ampliado as perspectivas de emprego clínico destes sistemas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPERGS, à PROPESQ-UFRGS e ao CNPq/MCT.

REFERÊNCIAS

- Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E.; *J. Controlled Release* **2001**, *70*, 1.
- Puisieux, F.; Barrat, G.; Couarraze, G.; Couvreur, P.; Devissaguet, J-P.; Dubernet, C.; Fattal, E.; Fessi, H.; Vauthier, C.; Benita, S. Em *Polymeric Biomaterials*; Dumitriu, S., ed.; Marcel Dekker: New York, 1994. cap. 16.
- Benoit, J. P.; Couvreur, P.; Devissaguet, J. P.; Fessi, H.; Puisieux, F.; Roblot-Treupel, L.; *J. Pharm. Belg.* **1986**, *41*, 319.
- Vauthier-Holtzschcher, C.; Benabbou, S.; Spenlehauer, G.; Veillard, M.; Couvreur, P.; *S.T.P. Pharma Sci.* **1991**, *1*, 109.
- Allémann, E.; Gurny, R.; Doelker, E.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1993**, *39*, 173.
- Yoo H. S.; Lee K. H.; Oh J. E.; Park T. G.; *J. Controlled Release* **2000**, *68*, 419.
- Brasseur, N.; Brault, D.; Couvreur, P.; *Int. J. Pharm.* **1991**, *70*, 129.
- Couvreur, P.; Dubernet, C.; Puisieux, F.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1995**, *41*, 2.
- Pinto-Alphandary, H.; Andreumont, A. Couvreur, P.; *Int. J. Antimicrob. Agents* **2000**, *13*, 155.
- Fresta, M.; Puglisi, G.; Giammona, G.; Cavallaro, G.; Micali, N.; Furneri, P. M.; *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 895.
- Guterres, S. S.; Fessi, H.; Barratt, G.; Puisieux, F.; Devissaguet, J-P.; *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 1.
- Guterres, S. S.; Muller, C. R.; Michalowski, C. B.; Pohlmann, A. R.; Dalla Costa, T.; *S.T.P. Pharma Sci.* **2001**, *11*, 229.
- Ammoury, N.; Dubrasquet, M.; Fessi, H.; Devissaguet, J-Ph.; Puisieux, F.; Benita, S.; *Clinical Materials* **1993**, *13*, 121.
- Ammoury, N.; Fessi, H.; Devissaguet, J-Ph.; Dubrasquet, M.; *S. T. P. Pharma Sci.* **1989**, *5*, 537.
- Obach, E. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2002.
- Jung, T.; Kamm, W.; Breitenbach, A.; Kaiserling, E.; Xiao, J. X.; Kissel, T.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 147.
- Allémann, E.; Leroux, J-C.; Gurny, R.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *34*, 171.
- Vila, A.; Sánchez, A.; Tobío, M.; Calvo, P.; Alonso, M. J.; *J. Controlled Release* **2002**, *78*, 15.
- Hillery, A.M.; Toth, I.; Florence, A. T.; *J. Controlled Release* **1996**, *42*, 65.
- Ding, S.; *PSTT* **1998**, *1*, 328.
- Le Boulrais, C. A.; Treupel-Acar, L.; Rhodes, C. T.; Sado, P. A.; Leverge, R.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1995**, *21*, 19.
- Calvo, P.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J.; *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 530.
- Losa, C.; Marchal-Heussler, L.; Orallo, F.; Vila Jato, J. L.; Alonso, M. J.; *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 80.
- Gallardo, M. M.; Couarraze, G.; Denizot, B.; Treupel L.; Couvreur, P.; Puisieux, F.; *Int. J. Pharm.* **1993**, *100*, 55.
- Chouinard, F.; Buczkowski, S.; Lenaerts, V.; *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 869.
- Lenaerts, V.; Labib, A.; Choinard, F.; Rousseu, J.; Ali, H.; van Lier, J.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1995**, *41*, 38.
- Sakuma, S.; Suzuki, N.; Kikuchi, H.; Hiwatari, K-I.; Arikawa, K.; Kishida, A.; Akashi, M.; *Int. J. Pharm.* **1997**, *149*, 93.
- Lambert, G.; Fattal, E.; Pinto-Alphandary, H.; Gulik, A.; Couvreur P.; *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 707.
- Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, *24*, 1113.
- Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Doelker, E.; Fessi, H.; *Colloid Polym. Sci.* **1997**, *275*, 640.
- Marchais, H.; Benali, S.; Irache, J. M.; Tharasse-Bloch, C.; Lafont, O.; Orecchioni, A. M.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, *24*, 883.
- Espuelas, M. S.; Legrand, P.; Irache, J. M.; Gamazo, C.; Orecchioni, A. M.; Devissaguet, J-Ph.; Ygartua, P.; *Int. J. Pharm.* **1997**, *158*, 19.
- Santos-Magalhães, N. S.; Pontes, A.; Pereira, V. M. W.; Caetano, M. N. P.; *Int. J. Pharm.* **2000**, *208*, 71.
- Couvreur, P.; Roland, M.; Speiser, P.; *US pat.* 4,329,332 **1982**.
- Al Khouri-Fallouh, N.; Roblot-Treupel, L.; Fessi, H.; Devissaguet, J-Ph.; Puisieux, F.; *Int. J. Pharm.* **1986**, *28*, 125.
- Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J-Ph.; Ammoury, N.; Benita, S.; *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*, r1.
- Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; De Lucca Freitas, L.; Guterres, S. S.; *Acta Farm. Bonaerense* **2002**, *21*, 99.
- Molpeceres, J.; Aberturas, M. R.; Chacon, M.; Berges, L.; Guzman, M.; *J. Microencapsulation* **1997**, *14*, 777.
- Guterres, S. S.; Fessi, H.; Barratt, G.; Devissaguet, J-Ph.; Puisieux, F.; *Int. J. Pharm.* **1995**, *113*, 57.
- Chasteigner, S.; Cavé, G.; Fessi, H.; Devissaguet, J-Ph.; Puisieux, F.; *Drug Dev. Res.* **1996**, *38*, 116.
- Saez, M.; Guzman, M.; Molpeceres, J.; Aberturas, M. R.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 379.
- Franks, F. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, *45*, 221.
- Schmidt, C.; Bodmeier, R.; *J. Controlled Release* **1999**, *57*, 115.
- Ausborn, M.; Schreier, H.; Brezesinski, G.; Fabian, H.; Meyer, H. W.; Nuhn, P.; *J. Controlled Release* **1994**, *30*, 105.
- Bendas, G.; Schubert, K.; Nuhn, P.; *Pharmazie* **1998**, *53*, 43.
- Zingel, C.; Sachse, A.; Robling, G. L.; Muller, R. H.; *Int. J. Pharm.* **1996**, *140*, 13.
- Suzuki, T.; Komatsu, H.; Miyajima, K.; *Biochimica et Biophysica Acta* **1996**, *1278*, 176.
- Konan, Y.; Gurny, R.; Allémann, E.; *Int. J. Pharm.* **2002**, *233*, 239.
- Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.; Dalla Costa, T.; Bassani, V.; Müller, C. R.; *Br PI 9906081-7* **1999**.
- Muller, C. R.; Bassani, V. L.; Pohlmann, A. R.; Michalowski, C. B.; Petrovick, P. R.; Guterres, S. S.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2000**, *26*, 343.
- Magenheim, B.; Benita, S.; *S.T.P. Pharma Sci.* **1991**, *1*, 221.
- Legrand, P.; Barratt, G.; Mosqueira, V.; Fessi, H.; Devissaguet, J-Ph.; *S.T.P. Pharma Sci.* **1999**, *9*, 411.
- Montasser, I.; Briançon, S.; Lieto, J.; Fessi, H.; *J. Pharm. Belg.* **2000**, *55*, 155.
- Brannon-Peppas, L.; *Int. J. Pharm.* **1995**, *116*, 1.
- Roblot-Treupel, L.; Couvreur, P.; Puisieux, F.; *Chimicaoggi* **1988**, *37*.
- Horisawa, E.; Kubota, K.; Tuboi, I.; Sato, K.; Yamamoto, H.; Takeuchi, H.; Kawashima, Y.; *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 132.
- Quintanar-Guerrero, D.; Fessi, H.; Allémann E.; Doelker, E.; *Int. J. Pharm.* **1996**, *143*, 133.
- Berton, M.; Allémann, E.; Stein, C. Y. A.; Gurny, R.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **1999**, *9*, 163.
- Jeon, H-J.; Jeong, Y-I.; Jang, M-K.; Park, Y-H.; Nah, J-W.; *Int. J. Pharm.* **2000**, *207*, 99.
- Watanasirichaikul, S.; Davies, N. M.; Rades, T.; Tucker, I. G.; *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 684.
- Skiba, M.; Nemati, F.; Puisieux, F.; Duchêne, D.; Wouessidjewe, D.; *Int. J. Pharm.* **1996**, *145*, 241.
- Yoo, H. S.; Oh, J. E.; Lee, K. H.; Park, T. G.; *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1114.
- Rollot, J. M.; Couvreur, P.; Roblot-Treupel, L.; Puisieux, F.; *J. Pharm. Sci.* **1986**, *75*, 361.
- Mosqueira, V. C. F.; Legrand, P.; Pinto-Alphandary, H.; Puisieux, F.; Barratt, G.; *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 614.
- Palumbo, M.; Russo, A.; Cardile, V.; Renis, M.; Paolino, D.; Puglisi, G.; Fresta, M.; *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 71.
- Fresta, M.; Cavallaro, G.; Giammona, G.; Wehrli, E.; Puglisi, G.; *Biomaterials* **1996**, *17*, 751.
- Puglisi, G.; Fresta, M.; Giammona, G.; Ventura, C. A.; *Int. J. Pharm.* **1995**, *125*, 283.
- Govender, T.; Riley, T.; Ehtezazi, T.; Garnett, M. C.; Stolnik, S.; Illum, L.; Davis, S. S.; *Int. J. Pharm.* **2000**, *199*, 95.
- Feng, S-S.; Huang, G.; *J. Controlled Release* **2001**, *71*, 53.
- Ferdous, A. J.; Stembridge, N. Y.; Singh, M.; *J. Controlled Release* **1998**, *50*, 71.
- Olbrich, C.; Bakowsky, U.; Lehr, C-M.; Müller, R. H.; Kneuer, C.; *J. Controlled Release* **2001**, *77*, 345.
- Mu, L.; Feng, S-S.; *J. Controlled Release* **2002**, *80*, 129.
- Govender, T.; Stolnik, S.; Garnett, M. C.; Illum, L.; Davis, S. S.; *J. Controlled Release* **1999**, *57*, 171.
- Avgoustakis, K.; Beletsi, A.; Panagi, Z.; Klepetsanis, P.; Karydas, A. G.; Ithakissios, D. S.; *J. Controlled Release* **2002**, *79*, 123.
- Hoffmann, F.; Cinatl Jr., J.; Kabicková, H.; Cinatl, J.; Kreuter, J.; Stieneker, F.; *Int. J. Pharm.* **1997**, *157*, 189.
- Marchal-Heussler, L.; Maicent, P.; Hoffman, M.; Spittler, J.; Couvreur, P.; *Int. J. Pharm.* **1990**, *58*, 115.
- Seijo, B.; Fattal, E.; Treupel, L. R.; Couvreur, P.; *Int. J. Pharm.* **1990**, *62*, 1.
- Alonso, M. J.; Losa, C.; Calvo, P.; Vila-Jato, J. L.; *Int. J. Pharm.* **1991**, *68*, 69.
- Gamisans, F.; Lacoulonche, F.; Chauvet, A.; Espina, M.; Garcia, M. L.; Egea, M. A.; *Int. J. Pharm.* **1999**, *179*, 37.

80. De Jaeghere, F.; Allémann, E.; Kubel, F.; Galli, B.; Cozens, R.; Doelker, E.; Gurny, R.; *J. Controlled Release* **2000**, *68*, 291.
81. Araujo, L.; Sheppard, M.; Löbenberg, R.; Kreuter, J.; *Int J. Pharm.* **1999**, *176*, 209.
82. Yu, W.; Tabosa do Egito, E. S.; Barratt, G.; Fessi, H.; Devissaguet, J-Ph.; Puisieux, F.; *Int. J. Pharm.* **1993**, *89*, 139.
83. Soma, C. E.; Dubernet, C.; Bentolila, D.; Benita, S.; Couvreur, P.; *Biomaterials* **2000**, *21*, 1.
84. Breton, P.; Guillon, X.; Roy, D.; Lescure, F.; Riess, G.; Bru, N.; Roques-Carnes, C.; *Biomaterials* **1998**, *19*, 271.
85. Puglisi, G.; Giammona, G.; Fresta, M.; Carlisi, B.; Micali, N.; Villari, A.; *J. Microencapsulation* **1993**, *10*, 353.
86. Reich, G.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1997**, *23*, 1191.
87. Calvo, P.; Remunan-Lopez, C.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J.; *Colloid Polym. Sci.* **1997**, *275*, 46.
88. Calvo, P.; Gouritin, B.; Chacun, H.; Desmaële, D.; D'Angelo, J.; Noel, J-P.; Georgin, D.; Fattal, E.; Andreux, J. P.; Couvreur, P.; *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 1157.
89. De Jaeghere, F.; Allemann, E.; Leroux, J-C.; Stevels, W.; Feljen, J.; Doelker, E.; Gurny, R.; *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 859.
90. Paul, M.; Fessi, H.; Laatiris, A.; Boulard, Y.; Durnad, R.; Deniau, M.; Astier, A.; *Int. J. Pharm.* **1997**, *159*, 223.
91. Lopes, E. C.; Pohlmann, A. R.; Bassani, V.; Guterres, S. S.; *Pharmazie* **2000**, *55*, 527.
92. Tiyaaboonchai, W.; Woiszwilllo, J.; Middaugh, R.; *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 902.
93. Weiss, V.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2001.
94. Fernández-Urrusuno, R.; Calvo, P.; Remunán-López, C.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J.; *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1576.
95. Bapat, N.; Boroujerdi, M.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1992**, *18*, 65.
96. Fontana, G.; Pitarresi, G.; Tomarchio, V.; Carlisi, B.; San Biagio, P. L.; *Biomaterials* **1998**, *19*, 1009.
97. Benoit, E.; Prot, O.; Maincent, P.; Bessière, J.; *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 585.
98. Barichello, J. M.; Morishita, M.; Takayama, K.; Nagai, T.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1999**, *25*, 471.
99. Schaffazick, S. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2001.
100. Zobel, H-P.; Junghans, M.; Maienschein, V.; Werner, D.; Gilbert, M.; Zimmermann, H.; Noe, C.; Kreuter, J.; Zimmer, A.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *49*, 203.
101. Gref, R.; Quellec, P.; Sanchez, A.; Calvo, P.; Dellacherie, E.; Alonso, M. J.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2001**, *51*, 111.
102. Gedde, U. W.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1990**, *16*, 2465.
103. Barkai, A.; Pathak, Y. V.; Benita, S.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1990**, *16*, 2057.
104. Venkataram, S.; Khohlokwane, M.; Wallis, S. H.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1995**, *21*, 847.
105. Kulkarni, A. R.; Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; *J. Microencapsulation* **2000**, *17*, 449.
106. Verger, M. L. L.; Fluckiger, L.; Kim, Y-I.; Hoffman, M.; Maincent, P.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, *46*, 137.
107. Muller, C. R.; Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; Lucca Freitas, L.; Pesce da Silveira, N.; Dalla Costa, T.; Guterres, S. S.; *Pharmazie* **2001**, *56*, 864.
108. Magenheimer, B.; Levy, M. Y.; Benita, S.; *Int. J. Pharm.* **1993**, *94*, 115.
109. Li, Y-P.; Pei, Y-Y.; Zhang, X-Y.; Gu, Z-H.; Zhou, Z-H.; Yuan, W-F.; Zhou, J-J.; Zhu, J-H.; Gao, X-J.; *J. Controlled Release* **2001**, *71*, 203.
110. Ryu, J-G.; Jeong, Y-II.; Kim, I-S.; Lee, J-H.; Nah, J-W.; Kim, S-H.; *Int. J. Pharm.* **2000**, *200*, 231.
111. Radwan, M. A.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1995**, *21*, 2371.
112. Watnasirichaikul, S.; Rades, T.; Tucker, I. G.; Davies, N. M.; *Int. J. Pharm.* **2002**, *235*, 237.
113. Valero, J.; Egea, M. A.; Espina, M.; Gamisans, F.; Garcia, M. L.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1996**, *22*, 167.
114. Lacoulonche, F.; Gamisans, F.; Chauvet, A.; Garcia, M. L.; Espina, M.; Egea, M. A.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1999**, *25*, 983.
115. Pohlmann, A. R.; Weiss, V.; Mertins, O.; Pesce da Silveira, N.; Guterres, S. S.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, *16*, 305.
116. Le Hir, A.; *Pharmacie Galénique: Bonnes pratiques de fabrication des médicaments*, 7^{ème} ed., Masson: Paris, 1997.
117. Masson, V.; Maurin, F.; Devissaguet, J-Ph.; Fessi, H.; *Int. J. Pharm.* **1996**, *139*, 113.
118. Schöler, N.; Zimmermann, E.; Katzfey, U.; Hahn, H.; Müller, R. H.; Liesenfeld, O.; *Int. J. Pharm.* **2000**, *196*, 235.
119. Murakami, H.; Kobayashi, M.; Takeuchi, H.; Kawashima, Y.; *J. Controlled Release* **2000**, *67*, 29.
120. Pinto, J. F.; Müller, R. H.; *Pharmazie* **1999**, *54*, 506.
121. Lachman, L.; Lieberman, H. A.; Kanig, J. L. K.; *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, 3rd ed., Lea & Febiger: Philadelphia, 1986.
122. Adams, G. D. J.; *Drying Technology* **1991**, *9*, 891.
123. Pombeiro, A. J. L. O.; *Técnicas e operações unitárias em química laboratorial*, 3^a ed., Calouste Gulbenkian: Lisboa, 1998.
124. Quintanar-Guerrero, D.; Ganem-Quintanar, A.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E.; *J. Microencapsulation* **1998**, *15*, 107.
125. Schwarz, C.; Mehnert, W.; *Int. J. Pharm.* **1997**, *157*, 171.
126. Zimmermann, E.; Müller, R. H.; Mäder, K.; *Int. J. Pharm.* **2000**, *196*, 211.
127. Chasteigner, S.; Fessi, H.; Cavé, G.; Devissaguet, J-Ph.; Puisieux, F.; *S.T.P. Pharma Sci.* **1995**, *5*, 242.
128. Gürsoy, A.; Eroglu, L.; Ulutin, S.; Tasyurek, M.; Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J-Ph.; *Int. J. Pharm.* **1989**, *52*, 101.
129. Guterres, S. S.; Weiss, V.; Lucca Freitas, L.; Pohlmann, A. R.; *Drug Delivery* **2000**, *7*, 195.
130. Broadhead, J.; Rouan, S. K. E.; Rhodes, C. T.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1992**, *18*, 1169.
131. Freitas, C.; Muller, R. H.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, *46*, 145.