

FERNANDA LIMA SUBRINHO

Validação de Metodologia Analítica por HPLC para Quantificação de Posaconazol em Nanopartículas de PLGA. Análise do Perfil de Liberação e Caracterização das Partículas Poliméricas.

**BRASÍLIA, DF
2019**

FACULDADE DE CEILÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E
TECNOLOGIAS EM SAÚDE

FERNANDA LIMA SUBRINHO

Validação de Metodologia Analítica por HPLC para Quantificação de Posaconazol em Nanopartículas de PLGA. Análise do Perfil de Liberação e Caracterização das Partículas Poliméricas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde da Universidade de Brasília (Faculdade de Ceilândia) como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências e Tecnologias em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes

BRASÍLIA

2019

Lima Subrinho, Fernanda

F363v Validação de Metodologia Analítica por HPLC para
Quantificação de Posaconazol em Nanopartículas de PLGA.
Análise de Perfil de Liberação e Caracterização das Partículas
Poliméricas. / Fernanda Lima Subrinho; orientador Anderson
de Jesus Gomes. -- Brasília, 2019.

72 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências e
Tecnologias em Saúde) -- Universidade de Brasília, 2019.

1. Nanopartículas. 2. PLGA. 3. Posaconazol. 4. Infecções
Fúngicas. I. de Jesus Gomes, Anderson, orient. II. Título.

FERNANDA LIMA SUBRINHO

Validação de Metodologia Analítica por HPLC para Quantificação de Posaconazol em Nanopartículas de PLGA. Análise do Perfil de Liberação e Caracterização das Partículas Poliméricas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde da Universidade de Brasília (Faculdade de Ceilândia) como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências e Tecnologias em Saúde.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes - UnB/FCE
Presidente

Prof. Dr. Jefferson Bruno Pereira Ribeiro - UCB
Membro Titular Externo

Profa. Dra. Claire Nain Lunadi Gomes - UnB/FCE
Membro Titular Interno

Dr. Diego Juscelino Santos Dias - UnB/FCE
Membro Suplente

Dedico a todos aqueles que, diante das dificuldades, conseguiram se tornar mais fortes.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Anderson de Jesus Gomes por, sem me conhecer, acreditar que eu seria capaz. E, após me conhecer, ajudar a me tornar capaz!

À professora Dra. Claire Nain Lunadi Gomes, por adotar a todos nós como seus filhos científicos.

Às minhas duas famílias que de perto e de longe sempre me forneceram suporte e conforto emocional.

À Suzana Ferreira pela compreensão, companheirismo e, acima de tudo, pelo amor e paciência dedicados a mim ao longo dos anos. Que eles se multipliquem!

À Alessandra Rosa e à Renata Montanini, pela amizade, confiança e flexibilidade que foram essenciais nesta reta final. Muito obrigada!

Ao Maycon Alexandre de Lima, por tudo o que me ensinou sobre HPLC e por ser um grande incentivador do nosso crescimento intelectual.

Aos membros do Laboratório de Fotoquímica, em especial ao doutorando Antônio Oliveira Costa, pelo conhecimento compartilhado.

Aos meus amigos por me proporcionarem o aconchego e os momentos de distração necessários.

A Deus, por me abençoar com tantos motivos para agradecer!

“Deixa estar, que o que for pra ser, vigora”.

Maria Gadú.

RESUMO

Infecções fúngicas invasivas (IFIs) são doenças oportunistas que acometem, em sua maioria, pacientes imunocomprometidos, estando associadas a consideráveis índices de morbidade e mortalidade. Antifúngicos triazólicos de primeira geração como fluconazol e itraconazol são frequentemente usados como agentes profiláticos, no entanto, a ausência de ação sobre determinadas cepas patogênicas e os altos níveis de toxicidade, limitam o seu uso terapêutico. Antifúngicos triazólicos de segunda-geração podem ser uma alternativa eficiente, pois possuem perfil de toxicidade mais favorável e maior espectro de ação contra fungos patogênicos. O posaconazol é um antifúngico triazólico de segunda-geração com amplo espectro de ação, aprovado pela Agência Americana de Vigilância Sanitária (*Food and Drug Administration* - FDA) em setembro de 2006 para tratamento e profilaxia da aspergilose e candidíase em pacientes imunocomprometidos. Está disponível nas formas de suspensão oral, comprimido de liberação prolongada e formulação intravenosa. Entre os principais inconvenientes do uso do posaconazol estão a absorção reduzida nos sistemas biológicos, a variação da biodisponibilidade entre indivíduos e a interação droga-droga. O objetivo deste trabalho foi produzir nanopartículas de PLGA (Ácido poli (D,L-láctico-e-glicólico)) contendo posaconazol, visando desenvolver um sistema de encapsulamento do fármaco para futura aplicação no tratamento das infecções fúngicas. As nanopartículas foram preparadas pelo método de evaporação do solvente e caracterizadas de acordo com seu tamanho e potencial zeta. Para determinação do perfil de liberação, eficiência de encapsulamento e porcentagem de incorporação, foi realizada a validação de uma metodologia desenvolvida por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para quantificação do fármaco. A metodologia demonstrou ser seletiva, exata e precisa, comprovando sua adequação para os estudos de identificação e quantificação de posaconazol. As partículas poliméricas apresentaram boa distribuição de tamanho com diâmetro de 89,95 nm e de potencial zeta de -12,8 mV. As partículas encapsularam eficientemente o fármaco (89,98%) e apresentaram um perfil de liberação com uma cinética que segue o modelo matemático de Weibull. Os resultados deste trabalho confirmaram que as nanopartículas produzidas são estruturas promissoras para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas destinadas ao tratamento das infecções fúngicas.

Palavras-chaves: nanopartículas, PLGA, posaconazol, infecções fúngicas invasivas.

ABSTRACT

Invasive fungal infections (IFIs) are opportunistic diseases that mostly involve immunocompromised patients, being associated with considerable morbidity and mortality rates. First-generation triazole antifungals such as fluconazole and itraconazole are often used as prophylactic agents; however, the lack of action on certain pathogenic strains and the high levels of toxicity limit their therapeutic use. Second-generation triazole antifungals may be an efficient alternative because of more favorable toxicity profile and a broader spectrum of action against pathogenic fungi. Posaconazole is a second generation triazole with a broad spectrum of action, approved by the FDA (Food and Drug Administration) in September 2006 for the treatment and prophylaxis of aspergillosis and candidiasis in immunocompromised patients. It is available in the oral suspension, prolonged-release and intravenous formulation. The main drawbacks of posaconazole use is the reduced absorption in biological systems, the variation of bioavailability between individuals and drug-drug interaction. The objective of this work was to produce PLGA (Poly (D,L-Lactide-co-Glycolide Acid)) nanoparticles containing encapsulated posaconazole, in order to develop a system of encapsulation and targeting of the drug for future application in the treatment of fungal infections. The nanoparticles were prepared by the solvent evaporation method and characterized according to their size and zeta potential. To determine the release profile, encapsulation efficiency and percentage of incorporation, was performed the validation of a methodology developed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for the quantification of the drug. The methodology proved to be selective, exact and accurate, proving its suitability for the studies of identification and quantification of posaconazole. The polymeric particles showed good distribution of size (89,95 nm) and zeta potential (-12.8 mV). The results of encapsulation efficiency (89,98%) and release profile (101,88%) – which showed release kinetics according to Weibull's mathematical model – confirmed that the nanoparticles produced are promising structures for the development of new pharmaceutical forms intended to treatment of fungal infections.

Key words: Nanoparticles, PLGA, posaconazole, invasive fungal infections.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura Química do Posaconazol.	2
Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação do posaconazol.	3
Figura 3. Representação esquemática de uma nanocápsula e de uma nanoesfera	8
Figura 4. Hidrólise do PLGA nos seus componentes monoméricos de ácido láctico e ácido glicólico.	10
Figura 5. Produção de nanopartículas pelo método de emulsificação simples com evaporação do solvente.....	11
Figura 6. Representação esquemática do processo de produção de nanopartículas de PLGA com incorporação do posaconazol pelo método de emulsificação simples com evaporação do solvente.....	21
Figura 7. Cromatogramas de (a) PLGA, mostrando os picos característicos da separação do polímero com tempo de retenção entre 3 e 7 minutos; (b) Posaconazol com tempo de retenção aproximado de 10,9 minutos; (c) Nanopartículas de PLGA contendo o fármaco encapsulado, demonstrando a separação seletiva dos componentes durante a corrida cromatográfica a 260nm.....	29
Figura 8. Espectros ultravioleta obtidos através do detector DAD, mostrando o perfil de absorção do posaconazol a 260 nm (a) e espectro de máxima absorção do posaconazol (b).	31
Figura 9. Espectro de varredura 3D, exibindo os picos característicos de PLGA puro (a) e do posaconazol numa amostra de nanopartículas contendo o fármaco encapsulado (b).	32
Figura 10. Curva de calibração para ensaio de perfil de liberação de posaconazol.	34
Figura 11. Tamanho das partículas de PLGA em função da intensidade. Partículas vazias (a) e posaconazol encapsulado(b).....	36
Figura 12. Potencial zeta das partículas de PLGA com posaconazol encapsulado.....	37
Figura 13. Avaliação do perfil de liberação de posaconazol a partir das nanopartículas de PLGA, durante 15 dias, representada através da média de liberação dos três lotes analisados.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Modelos matemáticos utilizados para avaliação da cinética de liberação do posaconazol das nanopartículas de PLGA.	25
Tabela 2. Resultados da precisão para ensaio de perfil de liberação de posaconazol. ...	35
Tabela 3. Resultados da exatidão para ensaio de perfil de liberação de posaconazol. ...	35
Tabela 4. Medidas de tamanho e índice de polidispersão (PdI) das nanopartículas vazias (NPV) e das nanopartículas contendo posaconazol encapsulado (NP.PZC).....	36
Tabela 5. Potencial zeta das nanopartículas de PLGA.	38
Tabela 6. Porcentagem de posaconazol dispensado, em função das horas, em estudo de perfil de liberação, no período de 15 dias. Onde: Liberação% - representa a porcentagem liberada do fármaco a cada hora. %PZC, é a porcentagem acumulada da liberação do posaconazol.....	40
Tabela 7. Coeficientes de correlação (R^2) dos dados de liberação do posaconazol incorporado nas nanopartículas de PLGA em relação aos modelos matemáticos avaliados.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DAD: *Diode Array Detector* (Detector de Arranjo de Diodos)

DCM: Diclorometano

DLS: *Dynamic Light Scattering* (Espalhamento dinâmico de luz)

DPR: Desvio Padrão Relativo

EE%: Eficiência de Encapsulamento

ELS: *Electrophoretic Light Scattering* (Espalamento Eletroforético de Luz)

EMA: *European Medicine Agency* (Agência Europeia de Medicina)

FDA: *Food and Drug Administration* (Agência Americana de Vigilância Sanitária)

FTIR: *Fourier Transformed Infrared* (Infravermelho por transformada de Fourier)

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

HPMCAS: Hidroxipropilmetilcelulose acetato succinato (Hipromelose acetato succinato)

IFI: Infecção Fúngica Invasiva

NPV: Nanopartícula Vazia

NP.PZC: Nanopartícula com Posaconazol

P.A.: Para análise

PdI: Polydispersity Index (Índice de polidispersividade)

PI%: Porcentagem de Incorporação

PL: Perfil de liberação

PLGA: *Poly (D,L-Lactide-co-Glycolide Acid)* (Ácido poli (D,L-láctico-e-glicólico))

PVA: *Polyvinyl Alcohol* (Álcool polivinílico)

PZC: Posaconazol

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

SNC: Sistema Nervoso Central

TDM: Monitoramento Terapêutico da Droga

UV-vis: Ultravioleta/visível

ZP: *Zeta Potencial* (Potencial Zeta)

LISTA DE SÍMBOLOS

mg: miligrama

mL: mililitro

mg/mL: miligrama por mililitro

nm: nanômetro

pH: potencial hidrogeniônico

rpm: rotações por minuto

R^2 : Coeficiente de correlação da reta

v/v: volume por volume

μm : micrometros (micra)

μL : microlitro

%: percentual

\geq : maior ou igual

\leq : menor ou igual

\pm : mais ou menos

®: marca registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. INFECCÕES FÚNGICAS INVASIVAS	1
1.2. POSACONAZOL	2
1.2.1. Formas Farmacêuticas e Limitações do uso do Posaconazol.....	5
1.2.2. Monitorização Terapêutica.....	6
1.3. SISTEMAS NANOPARTICULADOS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	7
1.3.1. Ácido Poli (D,L-lático-e-glicólico) (PLGA).....	9
1.3.1.1. Métodos de Obtenção de Nanopartículas de PLGA.....	10
1.4. MÉTODOS APLICADOS NA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ENSAIOS DE PERFIL DE LIBERAÇÃO DOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS	12
1.4.1. Medidas de tamanho e de potencial zeta.....	12
1.4.2. Métodos Espectrofotométricos.....	13
1.4.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL.....	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. MATERIAIS	18
3.1.1. Reagentes	18
3.1.2. Equipamentos e Instrumentos	18
3.1.3. Soluções	19
3.2. MÉTODOS.....	20
3.2.1. Produção das nanopartículas	20
3.2.2. Validação do método analítico para quantificação de posaconazol	21
3.2.2.1. Condições cromatográficas	22
3.2.2.2. Preparação das soluções padrão.....	22
3.2.3. Caracterização das nanopartículas	23
3.2.3.1. Tamanho das partículas	23
3.2.3.2. Potencial zeta	23
3.2.3.3. Eficiência de Encapsulamento	24
3.2.3.4. Perfil de liberação	24

3.2.3.5.	Avaliação da cinética de liberação do posaconazol incorporado nas nanopartículas de PLGA	25
3.2.3.6.	Porcentagem de incorporação	26
3.2.4.	Análise de dados.....	26
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.2.	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA	27
4.2.1.	Seletividade	28
4.2.2.	Linearidade.....	33
4.2.3.	Precisão	34
4.2.4.	Exatidão.....	35
4.3.	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	36
4.3.1.	Tamanho das partículas	36
4.3.2.	Potencial zeta.....	37
4.3.3.	Eficiência de encapsulamento e Porcentagem de incorporação.....	38
4.3.4.	Perfil de liberação.....	39
4.4.5.	Avaliação da cinética de liberação do posaconazol incorporado nas nanopartículas de PLGA	42
5.	CONCLUSÃO	46
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS

Infecções fúngicas invasivas (IFIs) são doenças oportunistas que acometem, em sua maioria, pacientes imunocomprometidos, estando associadas a consideráveis índices de morbidade e mortalidade. Candidíase e Aspergilose são exemplos de IFIs responsáveis por cerca de 40 a 50% das mortes em pacientes neutropênicos, e exigem maior dispêndio de cuidados e recursos médicos, embora, um maior índice de mortalidade esteja associado a infecções por *Cryptococcus neoformans*, responsáveis por cerca de 600 mil mortes por ano (HOPE *et al.*, 2013).

A aspergilose invasiva é uma das principais complicações em pessoas imunocomprometidas, e acomete pacientes com neutropenia grave prolongada – diminuição dos glóbulos brancos (células de defesa) aumentando a possibilidade de o indivíduo adquirir infecções fúngicas e bacterianas –, receptoras de transplante de células hematopoiéticas e de órgãos sólidos, especialmente os pulmões, que são os órgãos alvo das infecções por *Aspergillus* (HOPE *et al.*, 2013).

A candidíase pode ser causada por mais de vinte espécies diferentes de *Candida* que, ao originar uma infecção invasiva, se espalha pela corrente sanguínea e pode afetar os principais órgãos do corpo como o coração, o cérebro, os olhos e os ossos (CADTH, 2016). Fatores de risco para infecções por *Candida* estão associados à presença de cateter intravenoso e ao uso de nutrição parenteral total (HOPE *et al.*, 2013).

As drogas antifúngicas proporcionam tratamento para infecções agudas, crônicas e de IFIs recorrentes. No entanto, o maior desafio da terapia antifúngica está nas múltiplas comorbidades a que o paciente está propenso, como por exemplo, infecções causadas por fungos endêmicos tais como histoplamose, blastomicoses, e paracoccidiomicoses, além da toxicidade relativa ao uso dos antifúngicos, às diversas interações droga-droga e ao alto custo desses agentes terapêuticos (HOPE *et al.*, 2013).

Antifúngicos triazólicos de primeira geração como fluconazol e itraconazol são frequentemente usados como agentes profiláticos para o tratamento de pessoas com alto risco de IFIs e tem provado efetividade na redução da morbimortalidade destes

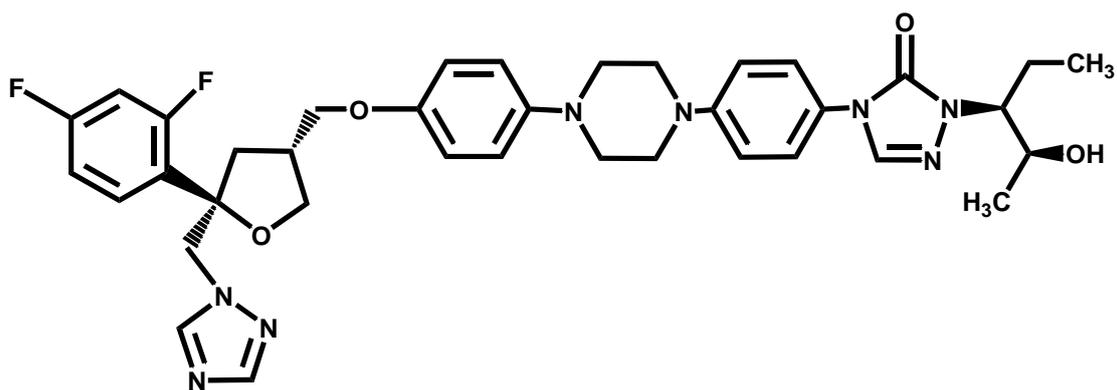
pacientes. No entanto, a ausência de ação sobre determinadas cepas patogênicas e os altos níveis de toxicidade relativa ao tratamento, limitam o seu uso terapêutico (PING *et al.*, 2013).

Neste contexto, antifúngicos triazólicos de segunda-geração podem ser uma alternativa eficiente, pois possuem perfil de toxicidade mais favorável, maior espectro de ação contra fungos patogênicos, reduzem a ocorrência de IFIs e os índices de mortalidade relacionados a essas doenças (PING *et al.*, 2013).

1.2. POSACONAZOL

O posaconazol (Figura 1) é um antifúngico triazólico de segunda-geração, comercializado com o nome de Noxafil® e possui o mais amplo espectro de ação dos azóis (PIGATTO *et al.*, 2009). Foi aprovado pela Agência Americana de Vigilância Sanitária (*Food and Drug Administration* – FDA) em setembro de 2006 para tratamento e profilaxia da aspergilose e candidíase em pacientes sob alto risco de desenvolver infecções fúngicas invasivas devido ao imunocomprometimento grave (LOSCALZO, 2014).

Figura 1. Estrutura Química do Posaconazol.

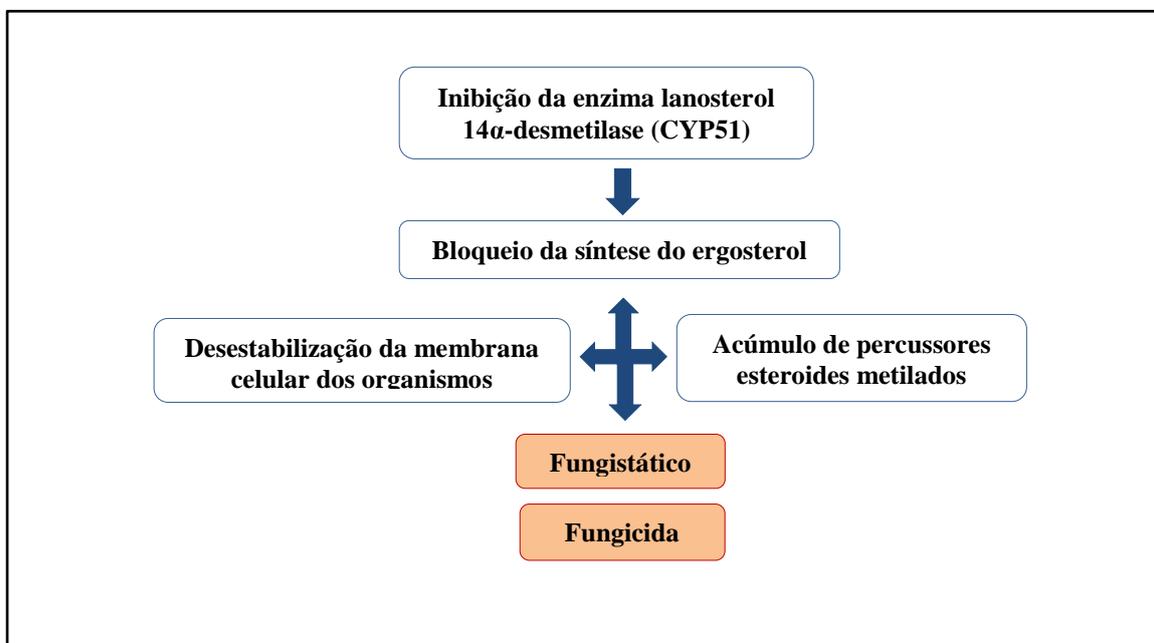


Fonte: Autoria própria (estrutura desenhada utilizando o *software* ChemDraw Ultra 8.0.7)

Seu mecanismo de ação consiste no bloqueio da síntese do ergosterol através da inibição da enzima lanosterol 14 α -desmetilase (CYP51). A depleção do ergosterol que culmina na desestabilização da membrana celular dos organismos, associada ao

acúmulo de precursores esteroides metilados resulta no efeito fungicida – morte da célula fúngica – e fungistático – inibição do crescimento da célula fúngica – da droga (Figura 2)(TORRES *et al.*, 2005).

Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação do posaconazol.



Fonte: Autoria própria

Além da ação comprovada contra *Candida spp* e *Aspergillus spp*, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram a eficácia do posaconazol contra *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium spp* e fungos endêmicos, e afirmam maior êxito no tratamento clínico em comparação com a terapia convencional com antifúngicos triazólicos, como o fluconazol e o itraconazol (LYSENG-WILLIAMSON, 2011).

O posaconazol também foi apontado como um antifúngico oral com atividade clínica no Sistema Nervoso Central (SNC), podendo ser uma alternativa viável para pacientes nos quais a terapia convencional tenha falhado (PITISUTTITHUM *et al.*, 2005). Em estudo realizado por Rüping *et al.* (2008), é levantada a hipótese de que a penetração do posaconazol no SNC pode estar associada a danos na barreira hematoencefálica de alguns pacientes, confirmando que o fármaco pode ser uma opção no tratamento de infecções fúngicas cerebrais, como sugerido anteriormente por Pitisuttithum *et al.* (2005).

O posaconazol tem sido a droga de primeira escolha para a prevenção de IFIs em pacientes transplantados. E a eficácia e segurança do tratamento com posaconazol

durante a fase precoce do transplante de medula óssea, em comparação com a profilaxia primária com itraconazol, foi avaliada por Sanchez-Ortega *et al.* (2011), e demonstrou melhor resultado em pacientes com alto-risco de neutropenia após o transplante.

Em estudo, liderado por Wang *et al.* (2016), foi evidenciado que a profilaxia antifúngica com posaconazol em pacientes transplantados de células hematopoiéticas alogênicas apresentou, durante a fase precoce do enxerto, melhor eficácia na redução da incidência de infecções invasivas fúngicas, melhor tolerância, e segurança semelhante ao fluconazol.

Avaliações farmacoeconômicas em diferentes países da Europa, América do Norte e Austrália confirmam o uso do posaconazol como terapia dominante, no que diz respeito a custo-efetividade, em comparação à terapia padrão, com demais antifúngicos azólicos, em pacientes imunocomprometidos (LYSENG-WILLIAMSON, 2011). Além disso, o comprimido de posaconazol demonstrou ser uma alternativa custo-efetiva na redução do número de IFIs após transplante de células-tronco hematopoiéticas, em comparação com fluconazol, e com a suspensão oral (GRAU *et al.*, 2018).

Devido ao seu mecanismo de ação de inibição da síntese do ergosterol, danificando a membrana plasmática dos organismos, a aplicação posaconazol no tratamento de doenças parasitárias também vem sendo investigada. O grupo composto por Molina e colaboradores estudou os efeitos *in vitro*, *in vivo* e clínicos (em humanos) do posaconazol no combate ao *Trypanosoma cruzi*, (MOLINA *et al.*, 2014; MOLINA *et al.*, 2015) e, embora os estudos clínicos não tenham apresentado as respostas desejadas, os autores destacam o posaconazol como uma alternativa terapêutica eficiente contra os parasitos, com menor índice de toxicidade relacionado ao paciente quando comparado com a terapia convencional, e sugere seu uso potencial em combinação ou em sequência a outra terapia conduzida para o tratamento da Doença de Chagas.

A eficiência do posaconazol também foi avaliada frente à *Leishmania amazonensis* e *Leishmania donovani*, sugerindo sua aplicação no tratamento da leishmaniose e apresentando novas perspectivas para o desenvolvimento de intervenções mais eficazes contra o parasita (DE MACEDO-SILVA *et al.*, 2013; JOICE *et al.*, 2018), enquanto um caso relatado por Mondolfi *et al.* (2011), descreveu o sucesso de um tratamento realizado com a suspensão oral de posaconazol, durante 14 dias para a

cura de lesão cutânea causada por *Leishmania infantum*, apontando o uso do posaconazol como terapia alternativa para a parasitose.

1.2.1. Formas Farmacêuticas e Limitações do uso do Posaconazol

O posaconazol é um antifúngico lipofílico, ligeiramente básico e possui baixa solubilidade em água, o que lhe confere pouca biodisponibilidade e uma taxa de absorção inconstante nos tecidos biológicos (HEIMBECHER E MONTEITH, 2013). Atualmente, está disponível em três formas farmacêuticas distintas: suspensão oral, comprimido de liberação retardada e formulação intravenosa (DEKKERS *et al.*, 2016). As três formas farmacêuticas, mesmo quando dispensadas de maneira adequada e através das vias a que foram destinadas apresentam desvantagens relacionadas à sua utilização.

O uso da suspensão oral, apesar da facilidade de administração, é bastante limitado, pois depende da ingestão concomitante de refeições gordurosas. Estudos quantificaram concentrações subterapêuticas de posaconazol em pacientes incapazes de se alimentar ou que se alimentam por nutrição parenteral (VAN DER ELST *et al.*, 2015; DEKKERS *et al.*, 2016). Além disso, a absorção do posaconazol pode ser reduzida pela co-administração de fármacos inibidores da bomba de prótons como o omeprazol, antagonistas de H₂, como a cimetidina, ou metoclopramida, um bloqueador dopaminérgico, que estimula a motilidade gástrica, comumente indicado para o tratamento da náusea induzida pela quimioterapia. A redução da taxa de absorção do posaconazol se dá devido ao efeito de diminuição na produção de ácido gástrico ou aumento da motilidade intestinal que estes fármacos proporcionam (DEKKERS *et al.*, 2016).

Visando reduzir os inconvenientes relacionados ao uso da suspensão, uma nova formulação farmacêutica foi desenvolvida na forma de comprimido de liberação retardada. O comprimido de posaconazol é revestido por um filme polimérico de hipromelose acetato succinato (HPMCAS) que limita a sua liberação em pH baixo (pH<4,0), como o estomacal. Ao alcançar o intestino, o pH neutro permite a liberação do posaconazol, devido à alta solubilidade do HPMCAS em pH próximo a 6,8 (EMA, 2014).

Quando administrado na forma de comprimido, a exposição ao posaconazol não é comprometida por alterações no pH ou na motilidade gástrica, e é menos dependente da ingestão de comida (KRAFT *et al.*, 2014), no entanto, para pacientes acometidos por disfagias, que se alimentam através de sondas enterais ou para aqueles que possuem capacidade de deglutição comprometida como crianças ou idosos, a suspensão oral continua sendo um opção de tratamento, ou a formulação intravenosa pode se mostrar como melhor alternativa (VAN DER ELST *et al.*, 2015).

Os principais inconvenientes da formulação intravenosa estão relacionados à sua administração, que acontece via cateter venoso central, e à utilização do agente solubilizante sulfobutileter- β -ciclodextrina, que pode se acumular em pacientes com disfunção renal moderada ou severa, levando, ou agravando, um quadro de toxicidade nos rins (LUKE *et al.*, 2010). Pensando em evitar os danos prováveis do tratamento intravenoso, foi publicada uma patente no ano de 2013 com o desenvolvimento de soluções aquosas úteis como agentes solubilizantes para a composição da formulação intravenosa de posaconazol (HEIMBECHER E MONTEITH, 2013).

O posaconazol tem um perfil de efeitos colaterais favorável, pois é seguro e bem tolerado quando comparado com a geração anterior de antifúngicos triazólicos (OTU *et al.*, 2018). Os efeitos colaterais comuns ao uso do posaconazol incluem distúrbios gastrointestinais, náuseas, vômito, diarreia, disfunções hepatobiliares, neurológicas, cutâneas e subcutâneas, hipocalemia e trombocitopenia (MORRIS, 2009; OTU *et al.*, 2018). Porém, estudos recentes tem apontado a presença sintomas não usuais associados ao uso de posaconazol na forma de comprimidos, como fadiga, dispneia (KOSMIDIS *et al.*, 2018), lesão renal aguda (OTU *et al.*, 2018), hipertensão sistêmica, hipocalemia e edema (KURIAKOSE *et al.*, 2018).

1.2.2. Monitorização Terapêutica

A Monitorização Terapêutica da Droga (TDM, do inglês *Therapeutic Drug Monitoring*) tem sido utilizada como ferramenta para otimizar o regime de dosagem de fármacos ou de seus produtos de biotransformação em amostras de plasma ou soro. A TDM tem sido aplicada no monitoramento de fármacos que possuem faixa terapêutica

estreita, alta variabilidade interindividual ou cuja resposta clínica não é instantânea ou é de difícil mensuração (SILVA, 2007).

Para monitorar os efeitos adversos, a variação da biodisponibilidade entre indivíduos e avaliar os efeitos da interação do posaconazol com outros fármacos, a prática da TDM tem sido utilizada para acompanhar os pacientes em tratamento com o antifúngico (DEKKERS *et al.*, 2016). O objetivo do monitoramento é garantir a exposição adequada ao medicamento – evitando níveis subterapêuticos, associados ao risco de infecções fúngicas irruptivas e ao aparecimento de cepas resistentes – e prevenir o aumento da toxicidade relacionada ao uso prolongado do posaconazol (LIPP, 2011).

Vários estudos tratam do desenvolvimento de metodologias por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para monitoramento terapêutico do posaconazol em níveis plasmáticos (KAHLE *et al.*, 2009; NEUBAUER *et al.*, 2009; VERWEIJ-VAN WISSEN *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013; KHALIL *et al.*, 2015; CACERES *et al.*, 2016; CAMPESTRE *et al.*, 2017), demonstrando a efetividade e reprodutibilidade da técnica frente a outras que, apesar do baixo custo, não apresentam rapidez e confiabilidade comparáveis (CENDEJAS-BUENO *et al.*, 2012).

1.3.SISTEMAS NANOPARTICULADOS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

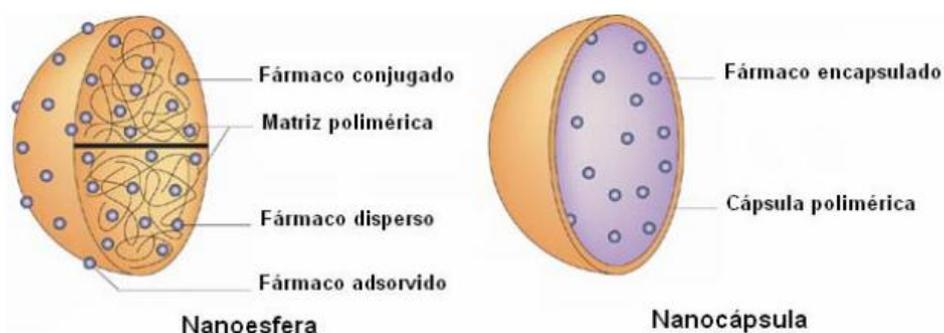
A nanotecnologia representa a miniaturização de objetos, proporcionando o desenvolvimento de nanomateriais com propriedades físicas e químicas bastante diferentes daquelas do material bruto, devido à sua redução à nanoescala (VOLTAN *et al.*, 2016). Seu uso está associado, principalmente, ao desenvolvimento de dispositivos terapêuticos sistemas de liberação de drogas capazes de ampliar a eficácia dos tratamentos atuais (FERREIRA, 2012).

Os sistemas nanoparticulados de liberação vêm sendo desenvolvidos para aumentar a eficácia de várias drogas, pois o seu tamanho reduzido lhes confere capacidade de (I) diminuição dos efeitos colaterais e da toxicidade relativa ao fármaco através da entrega direta da droga ativa no sítio da infecção, (II) de atravessar barreiras biológicas e de (III) aumentar a biodisponibilidade do princípio ativo em áreas específicas (PATEL *et al.*, 2010; CARRARO *et al.*, 2017). Entre os sistemas

nanoparticulados mais utilizados na liberação de fármacos estão os lipossomas, as nanoemulsões e as nanopartículas poliméricas (FERREIRA, 2012).

As nanopartículas poliméricas (Figura 3) são estruturas que possuem o fármaco encapsulado dentro da matriz de um polímero ou adsorvido ou conjugado à sua superfície (PANYAM E LABHASETWAR, 2003). Elas podem ser classificadas como nanoesferas ou nanocápsulas, que diferem entre si de acordo com a composição e organização estrutural que possuem. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso no qual o fármaco pode estar dissolvido e/ou adsorvido à parede polimérica. Já as nanoesferas, não possuem óleo em sua composição e são formadas por uma matriz polimérica compacta, na qual o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (FERREIRA, 2012).

Figura 3. Representação esquemática de uma nanocápsula e de uma nanoesfera



Fonte: FERREIRA, 2012.

O encapsulamento em nanopartículas confere ao agente ativo proteção contra degradação nas condições fisiológicas dos sistemas biológicos e permite a liberação de doses graduais do fármaco para alcançar os níveis terapêuticos (PATEL *et al.*, 2010), também possibilita o transporte de fármacos insolúveis em água e reduz a flutuação das concentrações da droga no plasma (PANYAM E LABHASETWAR, 2003).

Neste âmbito, a nanotecnologia se destaca como ferramenta promissora de potencial utilização na terapia antifúngica, pois, as nanopartículas são capazes de superar os mecanismos de resistência dos fungos, através da liberação de uma maior dose do agente antimicrobiano, especificamente no sítio da infecção, proporcionando menos efeitos adversos ao paciente (VOLTAN *et al.*, 2016). Seu tamanho reduzido

pode possibilitar a transposição de barreiras fisiológicas tais como a barreira-hematoencefálica e as membranas celulares permitindo ao fármaco atingir locais de difícil acesso (DING E ZHU, 2018).

O encapsulamento de antifúngicos vem sendo amplamente investigado e tem demonstrado resultados positivos para evolução da terapia antimicótica (PENG *et al.*, 2008; QIU *et al.*, 2015; MOHAMMADI *et al.*, 2017). Em estudo recente, nanopartículas contendo anfotericina B foram produzidas com o objetivo de reduzir os efeitos adversos que limitam o seu uso clínico, tais como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e anemia hemolítica. Após sete dias de tratamento em ratos, não foi observado nenhum tipo de alteração celular hepática, dano renal ou indução de anemia, apontando as nanopartículas como promissores transportadores para anfotericina B e com potencial aplicação na terapia antifúngica (CARRARO *et al.*, 2017).

1.3.1. Ácido Poli (D,L-lático-e-glicólico) (PLGA)

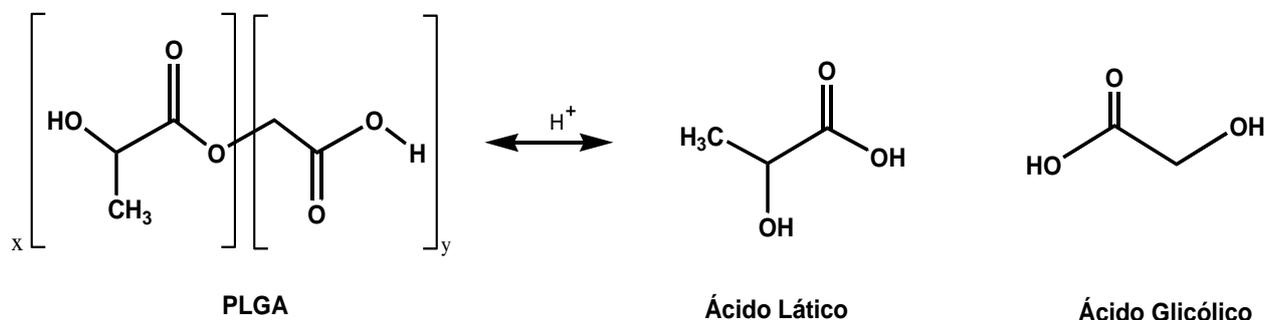
Para a formulação de nanopartículas biodegradáveis, diferentes tipos de polímeros vêm sendo utilizados. Esses biomateriais podem ser classificados em duas classes principais: polímeros naturais e polímeros sintéticos biodegradáveis. Os polímeros naturais envolvem compostos inorgânicos (como a hidroxiapatita) e açúcares complexos (como quitosana e ácido hialurônico). Já os polímeros sintéticos incluem materiais de natureza hidrofóbica como ácidos α -hidroxilados, uma classe que inclui os polianidridos e o ácido poli (D,L-lático-e-glicólico), o PLGA (MIR *et al.*, 2017).

O polímero de PLGA é considerado o mais promissor dos biomateriais, devido a sua biocompatibilidade e excelente perfil de biodegradação *in vivo*, foi aprovado pelo FDA e pela Agência Europeia de Medicina (*European Medicine Agency* – EMA) para sua utilização em sistemas de liberação de drogas e produção de moldes em engenharia tecidual (DING E ZHU, 2018).

A maior vantagem do PLGA frente a outros polímeros é a sua completa degradação em meio aquoso em seus componentes monoméricos de ácido lático e ácido glicólico (Figura 4). Esses dois monômeros endógenos são metabolizados no corpo via Ciclo de Krebs, também conhecido como Ciclo do Ácido Cítrico e não afetam as

funções celulares normais, pois são eliminados como metabólitos comuns ao organismo humano (PANYAM E LABHASETWAR, 2003; DANHIER *et al.*, 2012).

Figura 4. Hidrólise do PLGA nos seus componentes monoméricos de ácido láctico e ácido glicólico.



Fonte: Autoria própria (estrutura desenhada utilizando o *software* ChemDraw Ultra 8.0.7).

Além das características já citadas, o biopolímero de PLGA se destaca frente aos demais polímeros devido a propriedades de (MIR *et al.*, 2017):

- Viabilidade de liberação sustentada das drogas;
- Possibilidade de modificação da superfície polimérica, atribuindo furtividade às nanopartículas e aumentando a eficiência das interações biológicas;
- Proteção da droga contra degradação;
- Facilidade de carreamento de micromoléculas (hidrofílicas ou lipofílicas) e macromoléculas e
- Possibilidade de ação em células ou órgãos específicos.

A aplicação do PLGA no encapsulamento de fármacos antifúngicos vem ganhando bastante atenção no meio científico devido à dificuldade de erradicação de infecções intracelulares. Diferentes antifúngicos como: voriconazol, itraconazol, nistatina e anfotericina B, quando encapsulados em nanopartículas de PLGA, puras ou funcionalizadas, demonstraram maior eficácia *in vivo* e *in vitro* que o fármaco livre (PENG *et al.*, 2008; QIU *et al.*, 2015; CARRARO *et al.*, 2017; MOHAMMADI *et al.*, 2017).

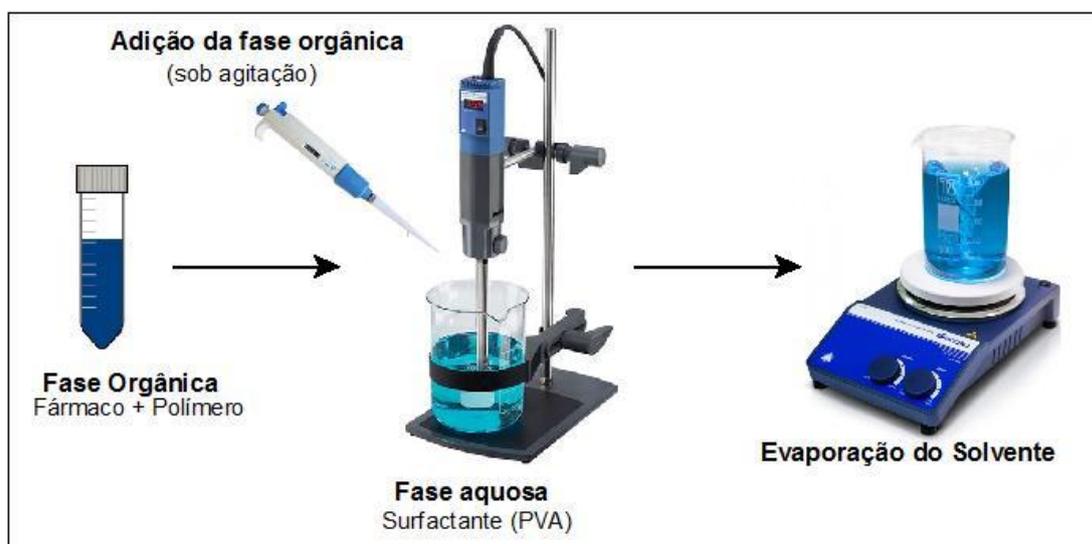
1.3.1.1. Métodos de Obtenção de Nanopartículas de PLGA

As diferentes técnicas para produção de nanopartículas de PLGA são aplicadas de acordo com as propriedades intrínsecas do polímero, propriedades físico-químicas da droga encapsulada e a aplicação pretendida. Entre os métodos mais utilizados estão a emulsificação com evaporação do solvente – que pode ser dividida em emulsificação simples e dupla emulsificação –, a secagem por aspersão (ou *spray drying*), a técnica de separação de fases e a nanoprecipitação (DING E ZHU, 2018).

A emulsificação com evaporação do solvente é o método mais utilizado para a produção de partículas de PLGA, pois permite o encapsulamento tanto de drogas hidrofílicas (dupla emulsificação) como lipofílicas (emulsificação simples), além de possibilitar certo controle sobre o tamanho das partículas produzidas (GOMES *et al.*, 2006; MUNDARGI *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2008; PATEL *et al.*, 2014).

No processo de emulsificação simples, o PLGA é dissolvido em um solvente orgânico volátil imiscível em água (como o diclorometano), onde é incorporado o fármaco hidrofóbico. Essa solução é adicionada por gotejamento a uma fase aquosa, contendo um agente surfactante, geralmente o PVA, sob agitação vigorosa para formação das nanopartículas. O solvente é então evaporado em condições adequadas, de acordo com a aplicação pretendida (DING E ZHU, 2018) (Figura 5).

Figura 5. Produção de nanopartículas pelo método de emulsificação simples com evaporação do solvente.



Fonte: Autoria própria.

1.4. MÉTODOS APLICADOS NA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ENSAIOS DE PERFIL DE LIBERAÇÃO DOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS

Para o estudo e desenvolvimento de sistemas nanoparticulados se faz necessária a avaliação de parâmetros físicos, químicos, morfológicos e de liberação, com o objetivo de caracterizar e prever o comportamento das nanopartículas aplicadas no desenvolvimento de novos produtos e garantir a qualidade, segurança e eficácia dos produtos nanotecnológicos já comercializados.

Os principais métodos utilizados para caracterização físico-química e de perfil de liberação das nanopartículas envolvem o espalhamento dinâmico de luz – para determinação do tamanho das partículas –, a análise eletroforética – aplicada na verificação do potencial zeta – e os métodos cromatográficos e espectrofotométricos utilizados para identificação, quantificação e avaliação do perfil de liberação do fármaco a partir dos sistemas nanoparticulados.

1.4.1. Medidas de tamanho e de potencial zeta

Determinação do tamanho das partículas

O diâmetro é um fator importante para definição e caracterização das partículas, uma vez que vários efeitos biológicos dos sistemas nanoparticulados, como captação celular, toxicidade e dissolução, estão associados a este parâmetro, impactando diretamente na funcionalidade do sistema desenvolvido (BHATTACHARJEE, 2016).

Um método amplamente aplicado nos estudos para determinação do tamanho de sistemas nanoparticulados é o de espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*), que permite avaliar o tamanho das partículas presentes em uma suspensão coloidal a partir da variação na intensidade de luz que se dispersa quando um feixe luminoso incide sobre essa suspensão (DIAS, 2012). Nestas condições, as partículas obedecem a um movimento Browniano, ou seja, randômico e dependente do seu tamanho – quanto maiores as partículas, mais lento será o seu movimento e, conseqüentemente, menor será a variação da luz dispersa, sendo atribuído a elas o diâmetro correspondente ao de uma esfera que se difundiria na mesma velocidade que

as partículas submetidas a medição (DIAS, 2012). Sendo assim, as determinações de tamanho por DLS permitem a obtenção do diâmetro hidrodinâmico (tamanho efetivo) das partículas e, por isso, também podem ser chamadas de medida de tamanho hidrodinâmico ou de raio hidrodinâmico (STETEFELD *et al.*, 2016).

Medidas de potencial zeta

O potencial zeta (ZP), também conhecido como potencial eletrocinético, é a representação do potencial de superfície aparente de um sistema particulado, definido como o potencial de deslizamento/cisalhamento de uma partícula coloidal se movendo num plano sob a ação de um campo elétrico (BHATTACHARJEE, 2016). O estudo deste parâmetro de caracterização das nanopartículas permite prever, *in vitro*, o comportamento de aglomeração, sedimentação e interação das nanopartículas quando expostas às condições *in vivo* (AYALA *et al.*, 2013).

A técnica mais comumente aplicada na determinação do potencial zeta de partículas é a baseada no método de Espalhamento Eletroforético de Luz (ELS, do inglês *Electrophoretic Light Scattering*). Essa técnica permite a determinação do potencial zeta de nanopartículas por meio da aplicação de um campo elétrico a uma suspensão contendo as partículas, induzindo uma eletroforese (VARENNE *et al.*, 2017). O fenômeno da eletroforese acontece quando um campo elétrico é aplicado a uma dispersão coloidal e as partículas carregadas se movem em direção ao eletrodo de carga oposta. Dentro da camada difusa da dispersão existe um plano hipotético que atua como a interface entre as partículas em movimento e a camada de dispersante que as envolve. Este plano é o plano característico de deslizamento / cisalhamento e o potencial zeta é o potencial de agregação das partículas nesta interface fluido-partícula (BHATTACHARJEE, 2016).

1.4.2. Métodos Espectrofotométricos

As técnicas de espectrofotometria têm larga aplicação em diversas linhas de pesquisa e desenvolvimento de fármacos. Entre as principais vantagens dessas técnicas estão simplicidade e a rapidez de execução das análises que faz com que elas sejam amplamente difundidas entre os pesquisadores e utilizadas em estudos para avaliação qualitativa e quantitativa dos compostos estudados (NILAPWAR *et al.*, 2011;

BARHOUM E GARCÍA-BETANCOURT, 2018). No campo da nanomedicina, geralmente são aplicadas nas etapas de caracterização físico-química dos sistemas nanoparticulados, identificação e quantificação de compostos, além de servirem como técnica auxiliar em estudos de liberação de fármacos (NILAPWAR *et al.*, 2011).

Espectroscopia UV-vis

A espectroscopia de UV-vis está fundamentada na medida da diferença das intensidades que um feixe de luz apresenta antes e depois de passar através de uma amostra em solução. A quantidade de luz que atravessa a amostra é medida na forma de transmitância, que por sua vez é utilizada para determinação da absorbância. Essa metodologia pode ser aplicada tanto para análises de identificação quanto para a quantificação de compostos orgânicos. Dentre as principais limitações desta técnica estão: a capacidade de análise limitada apenas para substância que apresentem grupamentos cromóforos e a baixa especificidade para análise de compostos de natureza semelhante (NILAPWAR *et al.*, 2011).

Espectroscopia de Fluorescência

Assim como na espectroscopia de UV-vis, as análises de fluorescência se baseiam nas propriedades de interação dos compostos com a luz, de forma que um feixe luminoso, de comprimento de onda específico (geralmente ultravioleta), é utilizado para excitar as moléculas de um composto, que ao retornarem ao seu estado de menor energia emitem fluorescência em regiões específicas (geralmente visível) e em intensidade proporcional a sua concentração no meio. A espectrofotometria de fluorescência é uma técnica útil para identificação qualitativa de compostos e também pode ser empregada em algumas análises quantitativas. A maior limitação desta técnica reside no fato de sua aplicação ser limitada a análises de compostos com capacidade de emitir fluorescência após excitados por uma fonte de luz. (BARHOUM E GARCÍA-BETANCOURT, 2018).

Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

A técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier Transformed Infrared*) baseia-se na capacidade da luz infravermelha de causar vibrações moleculares específicas em grupos funcionais, gerando bandas de absorção que são características para esses grupamentos químicos. É

uma técnica que possui alto grau de especificidade e sensibilidade, bastante empregada em análises de identificação. Sua utilização permite avaliar modificações estruturais e químicas dos materiais, identificar componentes específicos e confirmar a presença de um determinado composto após um processo de fabricação. As principais limitações da técnica de FTIR estão na capacidade reduzida de análise de misturas complexas – sendo necessária a aplicação de métodos de purificação ou de métodos auxiliares de identificação – à sua difícil aplicação para soluções aquosas, uma vez que a água absorve grande parte da radiação e à dificuldade de interpretação dos espectros (BERTHOMIEU E HIENERWADEL, 2009; KUMAR *et al.*, 2016).

1.4.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) é um importante membro da família das técnicas de separação, uma vez que consegue separar misturas complexas contendo um grande número de compostos similares. A separação cromatográfica consiste num processo físico-químico de separação dos componentes de uma amostra e se baseia na migração diferencial destes analitos em duas fases, imiscíveis, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece imóvel (fase estacionária) enquanto a outra se move através dela (fase móvel) distribuindo os diferentes compostos, que são seletivamente retidos pela fase estacionária. As análises por HPLC são realizadas em equipamentos que podem ser totalmente automatizados, utilizando colunas recheadas com material adsorvente (a fase estacionária), onde a fase móvel é eluída sob altas pressões. (COLLINS *et al.*, 2014).

Metodologias desenvolvidas por HPLC permitem separar e analisar uma grande variedade de substâncias numa escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (ALVES E BRAGAGNOLO, 2002). Esses atributos são alcançados pela combinação de diferentes fases móveis e estacionárias, com a utilização de diversos tipos de detectores, e tornam a HPLC uma técnica versátil que pode ser aplicada para análise de compostos orgânicos, inorgânicos, iônicos, covalentes, quirais, de altos ou baixos pesos moleculares, e provenientes de amostras líquidas ou sólidas. A HPLC também é bem empregada em análises qualitativas onde, além da comparação de tempos de retenção, a confirmação da identidade das amostras pode ser feita através do uso de detectores de arranjo de diodos (com a obtenção de espectros de absorbância) ou

de espectrômetro de massa (para obtenção de espectros de massas) (COLLINS *et al.*, 2014).

O emprego da técnica de HPLC vem sendo bastante difundido no desenvolvimento de sistemas nanoparticulados, pois permite efetuar a identificação e quantificação do fármaco que será utilizado, assim como a separação e caracterização do polímero empregado na preparação. Desta forma, é possível efetuar análises para confirmação da incorporação do fármaco nas nanopartículas, avaliar a eficiência de encapsulamento e desenvolver estudos do perfil de liberação através de uma única técnica, utilizando um mesmo método validado – garantindo a precisão, exatidão e seletividade das análises – e desobrigando o pesquisador da utilização de técnicas complementares que, muitas vezes, apresentam-se menos precisas.

A cromatografia líquida de alta eficiência encontra limitação na análise dos gases, o único tipo de amostra que não pode ser analisado por HPLC, no alto custo de operação (devido aos valores das colunas recheadas e das fases móveis com elevado grau de pureza) e na necessidade de experiência para o manuseio do equipamento (COLLINS *et al.*, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Com base no que foi explanado e tendo em vista que não existe na literatura estudos que descrevam o encapsulamento de posaconazol em nanopartículas poliméricas, o presente trabalho tem como objetivo: produzir e caracterizar nanopartículas de PLGA, contendo o antifúngico posaconazol, visando desenvolver um sistema de encapsulamento que possibilite ampliar a eficiência de liberação do fármaco *in vivo*, reduzindo seus efeitos colaterais e adversos, e que possa ser utilizado para o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar metodologia desenvolvida em HPLC comprovando a sua aplicabilidade para a execução de análises de quantificação do posaconazol;
- Encapsular o posaconazol de maneira eficiente nas nanopartículas de PLGA, pelo método de emulsificação simples com evaporação do solvente;
- Determinar as características de tamanho e potencial zeta das nanoestruturas produzidas;
- Avaliar o perfil de liberação, a eficiência de encapsulamento e a porcentagem de incorporação do posaconazol nas partículas de PLGA através da metodologia validada em HPLC.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Reagentes

- Ácido poli (D,L-láctico-e-glicólico), PLGA, do inglês, *poly(DL-lactide-co-glycolic acid)*, $[C_3H_4O_2]_x[C_2H_2O_2]_y$, proporção 50:50, massa molar entre 40.000,0 – 75.000,0 g/mol, grau de pureza $\geq 99,9\%$, marca Sigma-Aldrich[®];
- Poli (álcool vinílico), PVA, do inglês, *Poly(vinyl alcohol)*, $[-CH_2CHOH-]_n$, massa molar entre 13.0000 – 23.000 g/mol, hidrolisado entre 87,0 – 89,0%, marca Sigma-Aldrich[®];
- Diclorometano (Cloro de metileno) P.A., CH_2Cl_2 , massa molar de 84,93 g/mol, grau de pureza $\geq 99,8\%$, Sigma-Aldrich[®];
- Metanol (Álcool metílico) para HPLC, CH_3OH , massa molar de 32,04 g/mol, grau analítico de pureza $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich[®];
- Água ultra purificada, H_2O , massa molar de 18,01 g/mol, obtida através de ultrapurificador Milli Q[®], Merck Millipore[®].

3.1.2. Equipamentos e Instrumentos

- Agitador magnético da marca IKA[®], modelo Topolino;
- Balança analítica da marca Shimadzu[®], modelo AX200;
- Centrífuga de bancada para microtubos da marca Eppendorf[®], modelo MiniSpin;
- Dispersador de alto desempenho Ultraturrax da marca IKA[®], modelos T25, equipado com o elemento de dispersão S25N-25F;

- Medidor de tamanho e potencial zeta da marca Malvern Instruments Limited[®], modelo Zetasizer Nano ZS;
- Cromatógrafo Líquido da marca Hitachi[®], modelo Elite LaChrom, com auto injetor L-2200, bomba quaternária L-2130, e detector de arranjo de fotodiodos (DAD) L-2455;
- Micropipeta volume variável monocanal de 20-200 µL da marca Lambmate[®] e micropipeta variável monocanal basic de 100-1.000 µL da marca Kasvi[®].

3.1.3. Soluções

- Solução de Álcool Polivinílico (PVA) 2,0%

Solução estoque de PVA: A solução estoque na concentração de 10% (m/v) foi preparada pela adição de 10 g de PVA em um béquer de vidro com adição de 100 mL de água destilada. Essa solução foi agitada e mantida aquecida em banho-maria a 95°C até total homogeneização e, depois de fria foi transferida pra um frasco de vidro e armazenada sob refrigeração.

Solução de PVA 2,0% (v/v): A solução de PVA a 2,0% foi preparada pela transferência de 4,0 mL da solução de PVA 10% para um béquer de vidro, com a adição de 16 mL de água destilada.

- Fase Móvel – Metanol:Água (75:25 v/v)

Para preparação da fase móvel os reagentes foram medidos em provetas graduadas separadas, nas respectivas proporções e, em seguida foram misturados em um béquer de vidro. A fase móvel foi filtrada e armazenada em frasco de vidro tipo *Schott*.

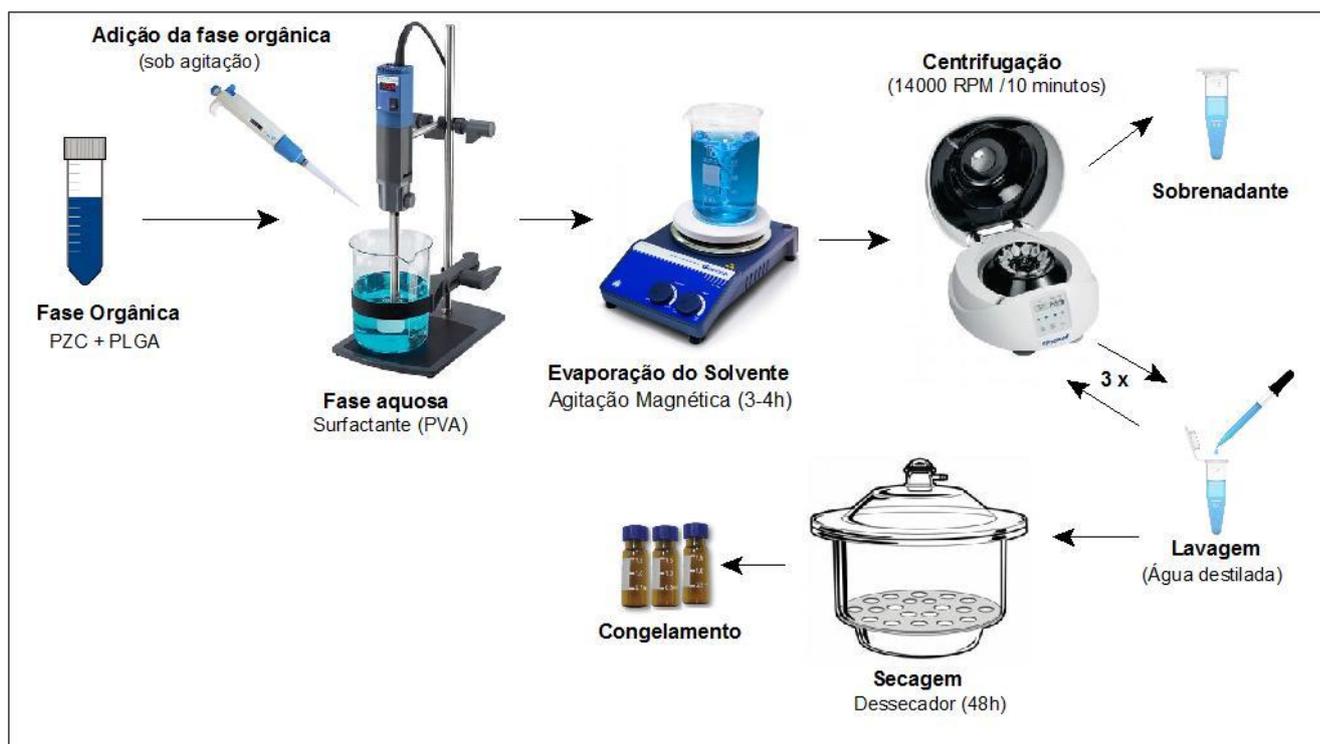
3.2.MÉTODOS

3.2.1. Produção das nanopartículas

Para encapsular o posaconazol nas nanopartículas de PLGA foi utilizado um processo de emulsificação simples óleo/água (o/a) com evaporação do solvente (DING E ZHU, 2018). A fase oleosa foi preparada a partir da solubilização de 50 mg de PLGA em 10 mL de diclorometano, a qual foram acrescentados 10 mg de posaconazol. Esta solução foi adicionada por gotejamento a 20 mL da solução tensoativa de PVA 2,0 % (fase aquosa) sob agitação a 20.000 RPM em agitador mecânico Ultraturrax T-25. Ocorrendo então, uma emulsificação espontânea, com formação de um sistema turvo devido à imiscibilidade de ambas as fases.

A emulsão foi submetida a agitação magnética pelo intervalo de 3 a 4 horas para evaporação do diclorometano, resultando na precipitação das nanopartículas de PLGA no meio aquoso remanescente. Esta solução foi centrifugada a 14.000 RPM durante 10 minutos e o sobrenadante obtido foi coletado e guardado para análise da eficiência de encapsulamento. As nanopartículas precipitadas foram lavadas três vezes pela adição de água destilada e repetição do processo de centrifugação, para a remoção da solução de PVA. A água resultante das lavagens foi descartada e as partículas foram submetidas ao processo de secagem, à temperatura ambiente, em dessecador, por 48 horas, em seguida foram congeladas para determinação do perfil de liberação e da porcentagem de incorporação (Figura 6).

Figura 6. Representação esquemática do processo de produção de nanopartículas de PLGA com incorporação do posaconazol pelo método de emulsificação simples com evaporação do solvente.



Fonte: Autoria própria.

3.2.2. Validação do método analítico para quantificação de posaconazol

Para determinação do posaconazol nas nanopartículas de PLGA foi utilizada a metodologia de quantificação da droga livre e estudos de estabilidade do fármaco, sem a utilização tampões na fase móvel, desenvolvida por Garcia *et al.* (2012). Todas as condições cromatográficas do método original foram respeitadas, com modificação da fase estacionária utilizada - sílica C18 no lugar da sílica C8 - e com a construção de uma nova curva de linearidade para determinação da faixa de trabalho mais adequada à quantificação do posaconazol a partir das nanopartículas.

A validação parcial da metodologia foi realizada segundo parâmetros definidos no Conselho Internacional de Harmonização Tripartite (ICH, 1996) – que trata sobre a validação de procedimentos analíticos –, em concordância com a Farmacopeia Americana – USP 41 (USP, 2018) e a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 166/17

da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que dispõe sobre a validação de métodos analíticos (BRASIL, 2017).

A validação parcial é a demonstração, por meio do teste de alguns parâmetros de validação, de que um método analítico previamente validado tem as características necessárias para obter resultados com a qualidade exigida, nas condições em que é praticado, e deve avaliar, pelo menos, os parâmetros de precisão, exatidão e seletividade (BRASIL, 2017; USP, 2018).

A curva de linearidade foi construída para determinação da faixa de trabalho adequada ao perfil de liberação de posaconazol e cálculo do coeficiente de correlação da reta. A precisão do método foi avaliada a partir de seis replicatas da solução padrão a 100% (1,0 mg/mL) e do cálculo do desvio padrão relativo (DPR) entre as injeções. Para avaliação da exatidão foram realizadas nove determinações contemplando o intervalo linear do método analítico, com a injeção de 3 replicatas em cada concentração de 50%, 100% e 150% e do cálculo da recuperação destas concentrações. A seletividade do método avaliou a capacidade de quantificação do posaconazol na presença de PLGA através dos cromatogramas e espectros obtidos com o detector DAD.

3.2.2.1. Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido, modelo Elite LaChrom, da marca Hitachi[®], com auto injetor L-2200, bomba quaternária L-2130, e detector de arranjo de fotodiodos (DAD) L-2455. A separação cromatográfica se deu através uma coluna analítica Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 250 mm x 5µm) da marca Agilent[®], mantida a 25°C, utilizando um método de separação isocrática, cuja fase móvel era composta de metanol-água (75:25; v/v), com fluxo de 1mL/min. O comprimento de onda configurado foi de 260 nm, com tempo de corrida de 15 minutos. O *software* utilizado para coletar, integrar e analisar os dados cromatográficos foi o EzChrom Elite.

3.2.2.2. Preparação das soluções padrão

A solução estoque de padrão foi preparada pela dissolução de 10 mg de posaconazol em 5 mL de metanol-água (2:1; v/v) (concentração de 2,0 mg/mL). E a curva de calibração foi montada a partir de diluições da solução estoque para obtenção da faixa de concentração de 0,1 – 2,0 mg/mL (0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1,0; 1,2; 1,5; 1,8 e 2,0 mg/mL).

3.2.3. Caracterização das nanopartículas

Para a caracterização das nanopartículas produzidas foram avaliados os parâmetros de tamanho, potencial zeta, eficiência de encapsulamento, porcentagem de incorporação, perfil de liberação e avaliação da cinética de liberação do posaconazol incorporado nas nanopartículas de PLGA.

3.2.3.1. Tamanho das partículas

Para realizar a caracterização dos parâmetros de distribuição de tamanho e potencial zeta foi utilizado um equipamento de espalhamento dinâmico de luz, modelo Zetasizer Nano ZS da Malvern Instruments[®]. O equipamento possui como fonte de luz um laser vermelho de 5 mW, He-Ne, com comprimento de onda de 633,0 nm. As medidas foram realizadas com o detector posicionado no ângulo fixo de 173° em relação ao ângulo de incidência. Para realização das medições, 20 µL da suspensão das partículas foram dispersos em 1000 µL de água em uma cubeta de poliestireno com 1,0 cm de caminho óptico. Para cada amostra preparada foram realizadas três medidas de tamanho e índice de polidispersão (PdI - do inglês, *Poly Dispersity Index*). Os dados foram coletados a 25,0 °C e tratados com o programa Zetasizer 6.20.

3.2.3.2. Potencial zeta

A determinação do potencial zeta das nanopartículas foi utilizado 1000 µL da mesma suspensão coloidal preparada para medida de tamanho das partículas e PdI, foram transferidos para uma célula eletroforética e as medidas foram realizadas utilizando o mesmo aparelho (Zetasizer Nano ZS), alterando a configuração do equipamento do modo *size* para o modo *zeta*. Assim como na análise de tamanho, os dados foram coletados a 25,0 °C e tratados com o programa Zetasizer 6.20[®].

3.2.3.3. Eficiência de Encapsulamento

A determinação da eficiência de encapsulamento foi avaliada a partir da injeção do sobrenadante aquoso obtido na produção das nanopartículas. A 500 µL do sobrenadante foram adicionados 1 mL de metanol, para solubilização da droga livre diretamente no *vial* de HPLC (volume final de 1,5 mL). Injeções de 20 µL foram efetuadas para determinação da eficiência de encapsulamento utilizando a seguinte expressão:

$$100\% - \%PZC,$$

Onde: 100% - Concentração teórica de Posaconazol dentro das partículas

%PZC – Concentração de Posaconazol no sobrenadante

A concentração de posaconazol no sobrenadante foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de PZC} = \frac{\text{Área da Amostra} \times \text{Fator de diluição}}{\text{Área do Padrão } 100\%} \times 100$$

3.2.3.4. Perfil de liberação

As nanopartículas de PLGA contendo posaconazol foram submetidas a um estudo *in vitro* de liberação controlada da droga. Onde 40 mg de cada formulação nanoparticulada foram suspensos em 1,5 mL de água. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente, com agitação manual uma hora antes de cada coleta, para ressuspensão das partículas e liberação do fármaco. Após decantar a suspensão, 500 µL do sobrenadante eram retirados e congelados. A cada coleta, o volume retirado era resposto com água ultra purificada. Foram efetuadas coletas durante 15 dias consecutivos, onde 6 coletas foram realizadas a cada 2 horas no primeiro dia, e nos dias subsequentes foram efetuadas coletas a cada 24 horas. Todas as amostras foram diluídas com 1,0 mL de metanol diretamente no *vial* de HPLC, submetidas a 10 minutos de banho ultrassônico, para solubilização da droga livre, e foram analisadas através do método validado.

3.2.3.5. Avaliação da cinética de liberação do posaconazol incorporado nas nanopartículas de PLGA

Os dados obtidos com o estudo de perfil de liberação das formulações de PLGA foram analisados de acordo com os principais modelos matemáticos aplicados em estudos de perfis de dissolução matricial, difusão e liberação de fármacos.

Em geral, os modelos mais utilizados e que melhor descrevem o fenômeno de liberação de fármacos são os de Higuchi, de cinética de ordem zero, de cinética de primeira ordem e de Korsmeyer-Peppas (ABREU, 2014). A seleção dos modelos aplicados foi realizada com base em seus respectivos conceitos teóricos e de acordo com suas aplicabilidades a sistemas de liberação de fármacos, baseados em nanopartículas e micropartículas poliméricas. A Tabela 1 exibe os resultados de cinco modelos cinéticos avaliados e suas respectivas equações.

Tabela 1. Modelos matemáticos utilizados para avaliação da cinética de liberação do posaconazol das nanopartículas de PLGA.

Modelo	Equação
Ordem zero	$Q = k \cdot t + Q_0$
Primeira Ordem	$Q = Q_0 e^{k \cdot t}$
Higuchi	$Q = k \cdot \sqrt{t}$
Korsmeyer-Peppas*	$Q = k \cdot t^n$
Weibull*	$m = 1 - \exp [-(t)b/a]$

Os modelos de Korsmeyer-Peppas e Weibull foram calculados a partir de regressão não linear e os demais parâmetros foram obtidos a partir de regressão linear. Q = quantidade de fármaco liberado num determinado período de tempo; Q_0 = valor inicial de Q; t = tempo; K = constante do respectivo modelo; n = expoente de liberação; m = quantidade de fármaco liberado ($Q = 100\% \cdot m$); a = constante de tempo; b = parâmetro de forma (*shape parameter*).

As adequações dos modelos estudados foram avaliadas segundo os valores de R^2 obtidos a partir da regressão linear ou não linear dos dados de liberação do posaconazol. O modelo com melhor adequação foi utilizado para elucidar os mecanismos envolvidos no processo de liberação do fármaco incorporado à matriz polimérica das nanopartículas de PLGA.

3.2.3.6. Porcentagem de incorporação

A análise da porcentagem de incorporação permite confirmar a eficiência de encapsulamento através da quantificação do posaconazol de forma direta pela destruição das nanopartículas de PLGA, para isto 20 mg das partículas foram solubilizados numa mistura de metanol-água (2:1 v/v) em banho ultrassônico. Após sonicação, 500 µL da solução foram transferidos para um *vial* e diluídos até o volume final de 1,5 mL com a mesma mistura de solventes.

3.2.4. Análise de dados

Os testes quantitativos desenvolvidos neste estudo foram realizados em triplicata e os dados numéricos apresentados como média aritmética das três medidas \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram efetuadas através dos programas GraphPad Prism 7, Microsoft Excel 2010 e KinetDS 3.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

Considerações sobre o método de análise

No presente trabalho foi avaliada a adequabilidade de um método de quantificação de posaconazol na forma de droga bruta, desenvolvido em HPLC por Garcia *et al.* (2012) para sua aplicação em estudos de perfil de liberação do fármaco a partir de nanopartículas de PLGA. O estudo desenvolvido por Garcia e colaboradores foi escolhido por se tratar de uma metodologia simples e rápida, realizada na forma isocrática, cuja fase móvel é ausente de tampão.

A eluição isocrática é o modo de eluição preferido para o desenvolvimento de metodologias analíticas devido à sua simplicidade, repetibilidade da análise, menor custo e compatibilidade com todos os tipos de detectores para cromatografia líquida. Enquanto que a eluição gradiente fornece cromatogramas com maior ruído da linha de base, não é compatível com todos os tipos de detectores e exige condicionamento da coluna cromatográfica após cada análise, implicando em aumento de tempo e de consumo de fase móvel (COLLINS *et al.*, 2014).

Fases móveis ausentes de tampão são mais seguras para o sistema cromatográfico (coluna e equipamento) e, quando possível, devem ser a primeira escolha no desenvolvimento de metodologias. Pois, o uso de agentes tamponantes pode causar danos ao sistema devido à cristalização do sal utilizado para compor o tampão. Desta forma, são necessários cuidados adicionais que garantam a completa retirada do sal após a análise para manter a integridade do equipamento e da coluna cromatográfica (COLLINS *et al.*, 2014).

Validação parcial do método

A validação parcial do método foi realizada segundo determinações contidas em guias oficiais e legislações vigentes (ICH, 1996; BRASIL, 2017; USP, 2018), que determinam a realização de testes para comprovação da adequabilidade de um método previamente validado ao uso pretendido. A aplicabilidade do método para o estudo de

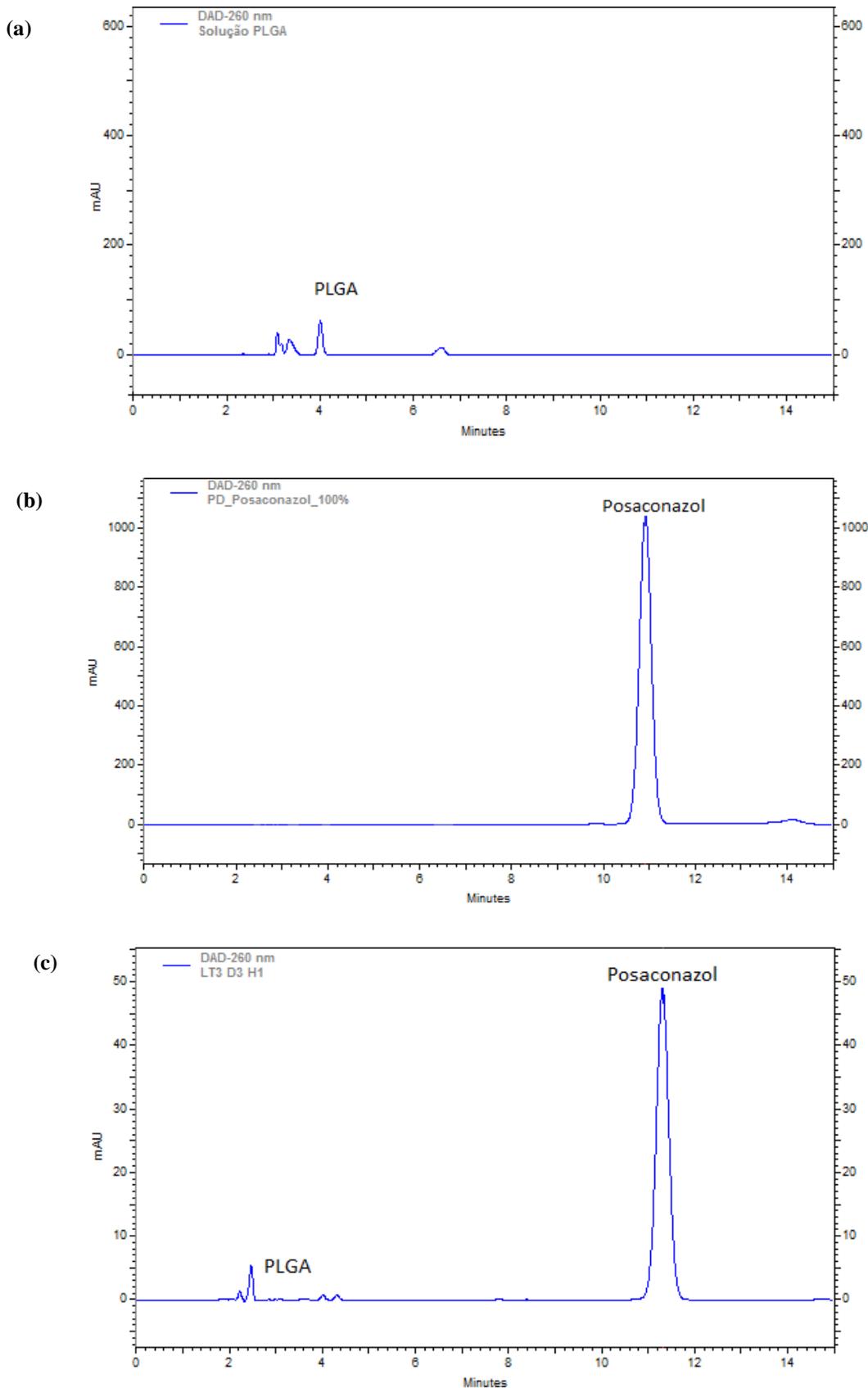
perfil de liberação de posaconazol foi realizada através dos testes de seletividade, linearidade, precisão e exatidão.

4.2.1. Seletividade

A seletividade indica a capacidade do método de identificar ou quantificar o analito de interesse na presença de componentes que podem estar presentes na amostra na forma de impurezas, diluentes ou de componentes da matriz (BRASIL, 2017). A verificação da seletividade do método foi realizada a partir de injeções separadas de uma solução de PLGA, semelhante à utilizada para produção das nanopartículas, da solução de posaconazol na concentração de 1,0 mg/mL (correspondente ao padrão 100%) e de uma solução das nanopartículas contendo o fármaco encapsulado (Figura 7).

A Figura 7 mostra os cromatogramas individuais da solução de PLGA, do posaconazol e de nanopartículas contendo o fármaco encapsulado, no comprimento de onda de 260 nm. Os picos característicos da separação do polímero de PLGA podem ser visualizados entre 3 e 7 minutos de corrida, o tempo de retenção do posaconazol foi de 10,9 minutos, e a injeção das nanopartículas contendo posaconazol mostra a separação dos componentes (posaconazol e PLGA) de maneira seletiva.

Figura 7. Cromatogramas de (a) PLGA, mostrando os picos característicos da separação do polímero com tempo de retenção entre 3 e 7 minutos; (b) Posaconazol com tempo de retenção aproximado de 10,9 minutos; (c) Nanopartículas de PLGA contendo o fármaco encapsulado, demonstrando a separação seletiva dos componentes durante a corrida cromatográfica a 260nm.

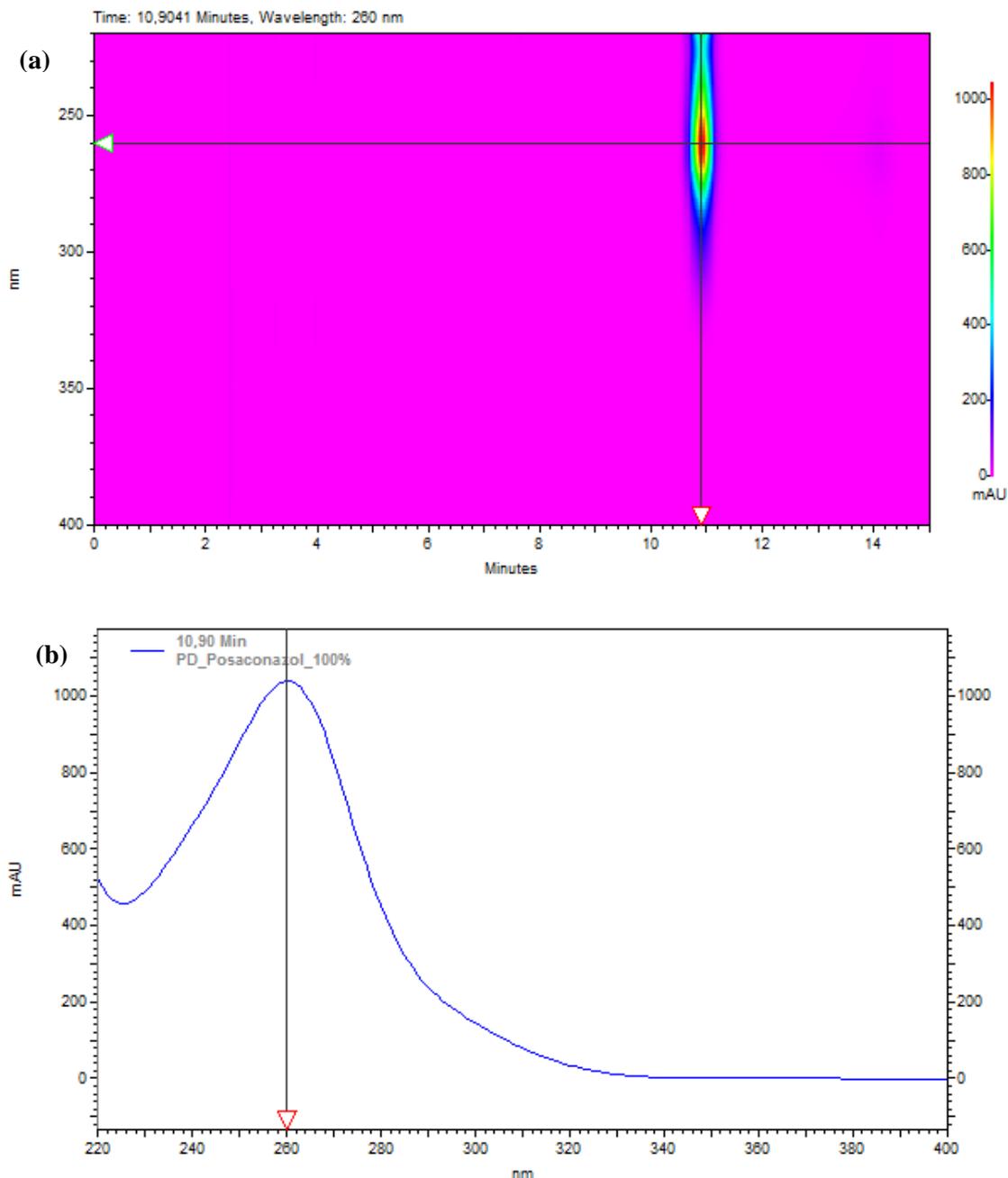


Fonte: Autoria própria (figura desenhada utilizando o *software* EzChrom Elite).

Para o desenvolvimento do método foi utilizado um detector do tipo DAD, que consiste em um detector de absorvância no ultravioleta e no visível, composto por arranjos de diodos, capaz de realizar o escaneamento da amostra, em um curto espaço de tempo, em vários comprimentos de onda simultaneamente (DE SENA *et al.*, 2011). A obtenção de um espectro para cada tempo de retenção permite uma verificação mais completa da seletividade e da pureza cromatográfica, garantindo a eficiência da separação, assim como uma análise mais rápida, onde todos os cromóforos podem ser observados em uma única eluição (RAIMUNDO JR E PASQUINI, 1997).

A Figura 8(a) representa o espectro tridimensional do posaconazol (com vista superior), mostrando a absorvância, comprimento de onda e tempo de retenção do fármaco. Através do espectro tridimensional é possível traçar um espectro de máxima absorvância para o posaconazol, pela convergência entre as linhas horizontal (comprimento de onda) e vertical (tempo de retenção) no centro do espectro (em vermelho). A confluência das variáveis tempo e comprimento de onda na área de máxima absorção do fármaco (representada em vermelho) possibilita a construção do espectro de absorção ótima de posaconazol obtido através da avaliação espectral tridimensional, representado na Figura 8(b).

Figura 8. Espectros ultravioleta obtidos através do detector DAD, mostrando o perfil de absorção do posaconazol a 260 nm (a) e espectro de máxima absorção do posaconazol (b).



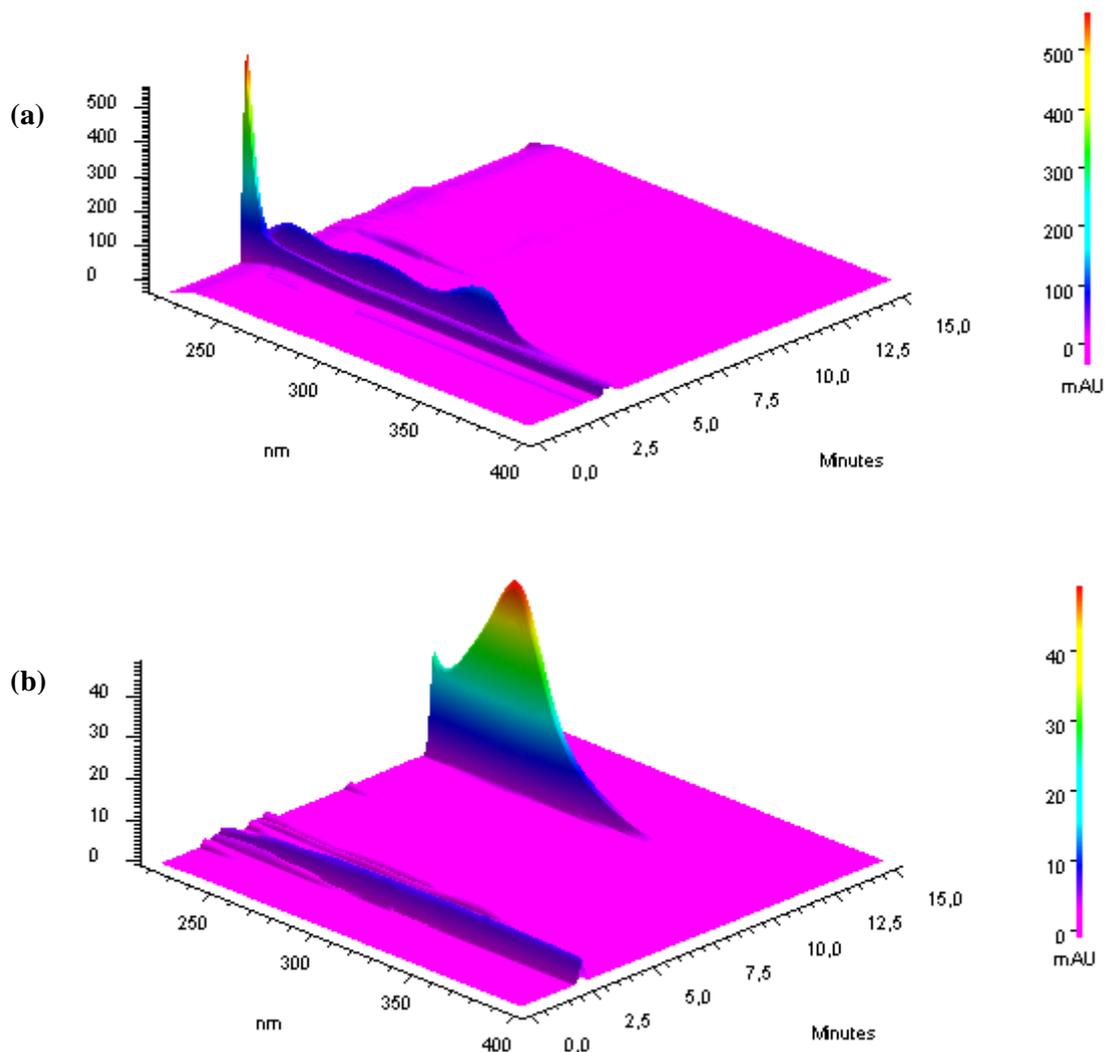
Fonte: Autoria própria (figura desenhada utilizando o *software* EzChrom Elite).

Os espectros de varredura tridimensional de uma amostra de PLGA puro e de uma amostra contendo o posaconazol encapsulado, representados na Figura 9, mostram o tempo de retenção, o comprimento de onda e a intensidade de absorção dos componentes em cada comprimento de onda selecionado.

Assim como na figura avaliada anteriormente, é possível traçar linhas de convergência entre tempo e comprimento de onda para estimar a absorção máxima de

cada componente presente no espectro. Na Figura 9(a) observa-se absorção máxima do PLGA em aproximadamente 221nm num tempo de retenção próximo de 3 minutos, enquanto que para as nanopartículas contendo posaconazol (Figura 9(b)) uma absorção máxima do fármaco em 260 nm é notada no tempo de 10,9 minutos, sem interferência do PLGA.

Figura 9. Espectro de varredura 3D, exibindo os picos característicos de PLGA puro (a) e do posaconazol numa amostra de nanopartículas contendo o fármaco encapsulado (b).



Fonte: Autoria própria (figura desenhada utilizando o *software* EzChrom Elite).

A análise de varredura mostra espectros de absorção do PLGA e do posaconazol bem definidos, nos seus respectivos tempos de retenção e permite confirmar a ausência de interferência da molécula de PLGA na análise do fármaco, indicando que

o método desenvolvido por cromatografia líquida foi seletivo na determinação do posaconazol frente à matriz polimérica das nanopartículas.

4.2.2. Linearidade

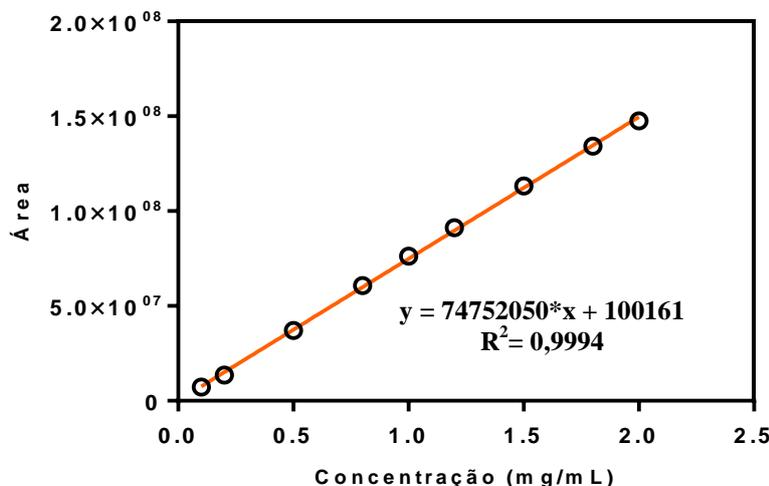
A resposta do instrumento em relação à concentração do analito deve ser conhecida e avaliada dentro de uma faixa especificada. A linearidade demonstra a capacidade do método em obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra e deve ser avaliada em toda a faixa estabelecida para o método (BRASIL, 2017). Sendo assim, foi necessária a construção de nova curva de linearidade, diferente da proposta por Garcia *et al* (2012), que melhor se adequasse aos estudos de liberação do posaconazol a partir das nanopartículas.

De acordo com a RDC 166/17, para a determinação da linearidade deve-se utilizar, no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes da substância química de referência, para as soluções preparadas em, no mínimo triplicata. E o coeficiente de correlação (R^2) deve estar acima de 0,99.

A linearidade do método foi estabelecida pelo cálculo da curva de calibração determinado pelas áreas dos picos de posaconazol em 9 (nove) diferentes concentrações na faixa de 0,1 – 2,0 mg/mL (0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1,0; 1,2; 1,5; 1,8 e 2,0 mg/mL), onde cada amostra foi analisada em triplicata (figura 10).

A equação da curva de calibração e o coeficiente de correlação encontrados foram: $y = 747522050x + 100161$ e $(R^2) = 0,9994$ ($n = 27$), indicando uma ótima linearidade para o método avaliado (BRASIL, 2017; USP, 2018).

Figura 10. Curva de calibração para ensaio de perfil de liberação de posaconazol.



Fonte: Autoria própria (gráfico desenhado utilizando o *software* GraphPad Prism 7.0).

4.2.3. Precisão

O parâmetro de precisão possibilita avaliar a proximidade entre os resultados obtidos quando um procedimento é repetidamente aplicado. É a medida do grau de variação de uma medição (USP, 2018).

A precisão de um método deve ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade, e deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados através do cálculo do desvio padrão relativo (DPR) (BRASIL, 2017).

A análise da precisão foi realizada a partir de seis determinações do padrão a 100% (1,0 mg/mL) para cálculo do valor de desvio padrão relativo (DPR) e determinação da repetibilidade do método. Para determinação da precisão intermediária as mesmas amostras foram analisadas em dois dias diferentes, por analistas distintos.

A reprodutibilidade é aplicável para estudos colaborativos ou na padronização de métodos analíticos para inclusão em compêndios oficiais (BRASIL, 2017), e por isso não foi um parâmetro verificado na validação parcial da metodologia.

Os resultados de precisão foram avaliados conforme parâmetros definidos em guias internacionais de validação de métodos analíticos (FDA, 2001; EMEA, 2011), que determinam que o DPR calculado para precisão não deve ser maior do que 15,0%.

De acordo com os dados mostrados na Tabela 2, os resultados encontrados tanto para repetibilidade quanto para precisão intermediária, demonstram que o método proposto é preciso.

Tabela 2. Resultados da precisão para ensaio de perfil de liberação de posaconazol.

	Repetibilidade	
	Concentração (%)	DPR (%)
Dia 1	97,80	1,0
Dia 2	102,20	0,1
Precisão Intermediária	100,00	3,1
Média de seis determinações		

4.2.4. Exatidão

A exatidão de um método analítico representa a concordância entre os resultados individuais obtidos através de um método em relação ao valor aceito como verdadeiro (BRASIL, 2017).

A exatidão do método foi avaliada pela determinação da porcentagem de recuperação de soluções padrão de posaconazol de concentrações conhecidas. Em obediência à RDC 166/17, três diferentes soluções padrão nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5mg/mL, que correspondem às concentrações de 50%, 100% e 150%, foram preparadas e analisadas.

A Tabela 3 mostra a média de recuperação encontrada e o DPR obtido para cada concentração analisada. A média de recuperação final foi de $97,14 \pm 2,1\%$ e o critério de aceitação para exatidão ($\pm 15,0\%$ da concentração nominal) foi alcançado, demonstrando que o método é exato.

Tabela 3. Resultados da exatidão para ensaio de perfil de liberação de posaconazol.

Concentração do Padrão (mg/mL)	Concentração encontrada (mg/mL)	Média da recuperação* (%)	DPR (%)
0,5	0,48	95,83	3,0
1,0	0,98	98,20	1,3
1,5	1,46	97,38	1,9

* Média de três determinações

4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

4.3.1. Tamanho das partículas

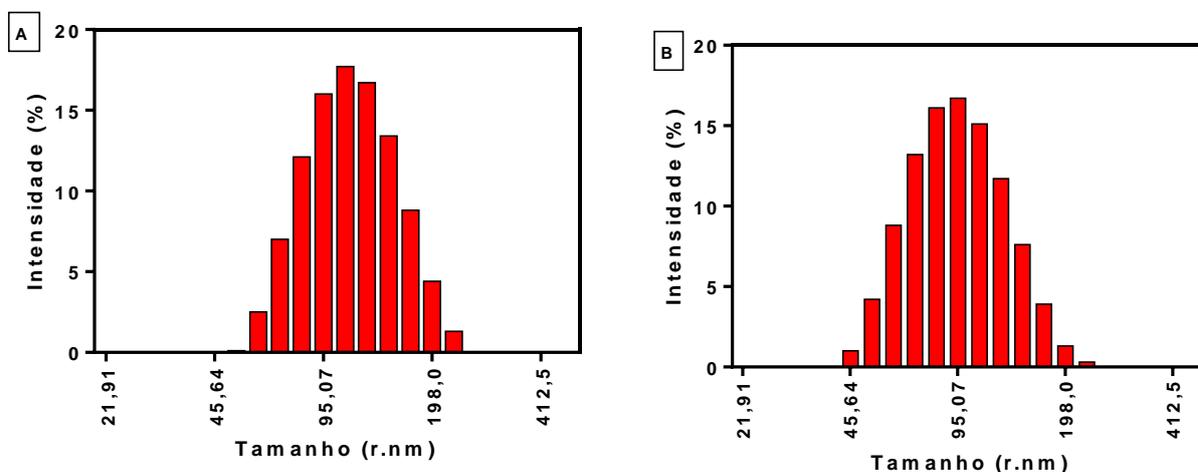
Os resultados das medidas de tamanho obtidos pela análise das formulações nanoparticuladas produzidas podem ser observados na Tabela 4, que apresenta os valores do raio hidrodinâmico e índice de polidispersão (PdI) das nanopartículas, e na Figura 11, que traz os gráficos do tamanho das partículas em função da intensidade.

Tabela 4. Medidas de tamanho e índice de polidispersão (PdI) das nanopartículas vazias (NPV) e das nanopartículas contendo posaconazol encapsulado (NP.PZC)

Amostra	Raio hidrodinâmico (nm)	PdI
NPV	$108,8 \pm 0,56$	0,084
NP.PZC	$89,95 \pm 3,1$	0,169

Média de três determinações

Figura 11. Tamanho das partículas de PLGA em função da intensidade. Partículas vazias (a) e posaconazol encapsulado(b).



Fonte: Autoria própria (gráfico desenhado utilizando o *software* GraphPad Prism 7.0).

As nanopartículas de PLGA vazias apresetaram-se numa faixa de tamanho de $108,8 \pm 0,56$ nm com índice de polidispersão (PdI) de 0,084, enquanto as nanopartículas contendo o fármaco encapsulado mediram cerca de $89,95 \pm 3,1$ nm com PdI de 0,169. A redução do tamanho das partículas após a adição do posaconazol sugere que haja uma

interação eletrostática entre o fármaco e o polímero aumentando as forças atrativas dentro das nanopartículas, levando à diminuição do seu tamanho.

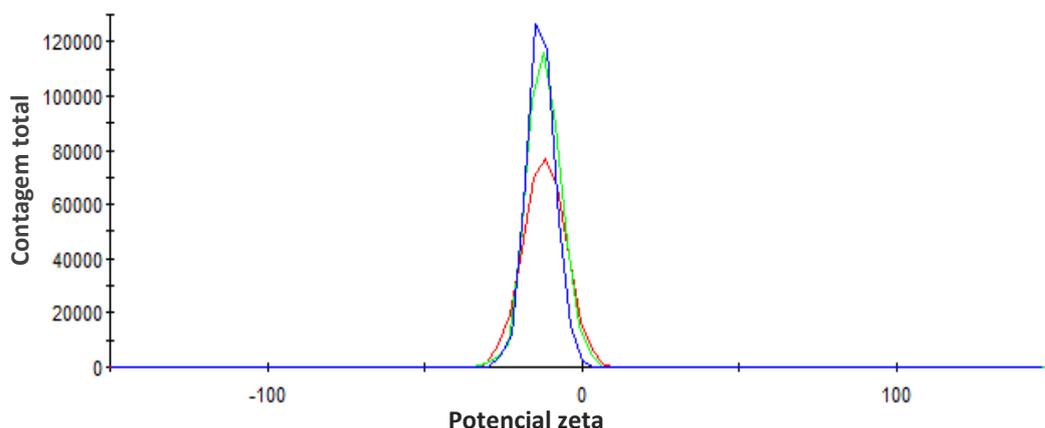
O PDI é um parâmetro que retrata a distribuição do tamanho das partículas, e é calculado a partir da largura de para cada pico e da média de distribuição de tamanho obtida: $(\text{largura}/\text{média})^2$. De acordo com os valores de PDI os sistemas podem se apresentar com alto grau de monodispersão ($\text{PDI} \leq 0,1$), polidispersão moderada (PDI entre 0,1-0,4) e alto grau de polidispersão ($\text{PDI} > 0,4$) (BHATTACHARJEE, 2016).

Os valores reduzidos de PDI indicam uma homogeneidade adequada na distribuição de tamanho, e sua avaliação possibilitou verificar que não houve mudança no modo de dispersão das partículas após encapsulamento do fármaco, apresentando-se como um sistema de polidispersão moderada tanto para as NPV quanto para as NP.PZC.

4.3.2. Potencial zeta

A determinação do potencial zeta para caracterização das nanopartículas foi realizada para as NPV, que apresentaram valor de -9,47 mV, e para as partículas poliméricas com a droga internalizada, cujo valor obtido foi de -12,8 mV (figura 12).

Figura 12. Potencial zeta das partículas de PLGA com posaconazol encapsulado.



Fonte: Autoria própria (gráfico desenhado utilizando o Zetasizer software).

A avaliação da estabilidade físico-química de uma suspensão coloidal depende de um valor de potencial zeta relativamente alto, em módulo. Pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação de nanopartículas adjacentes em função das colisões ocasionais (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Segundo o potencial zeta que apresentam, as dispersões nanoparticuladas podem ser classificadas em (BHATTACHARJEE, 2016):

- Altamente instáveis: $|ZP|= 0-10$ mV;
- Relativamente estáveis: $|ZP|= 10-20$ mV;
- Moderadamente estáveis: $|ZP|= 20-30$ mV;
- Altamente estáveis: $|ZP|= 30$ mV.

A carga negativa encontrada para os valores de ZP é uma característica das nanopartículas de PLGA, cuja carga superficial negativa pode ser atribuída à presença de grupos carboxílicos terminais sobre a superfície do polímero (DIAS, 2017).

O valor do potencial zeta aumentou, em módulo, após a adição do posaconazol (Tabela 5), sugerindo a existência de interações eletrostáticas entre o fármaco e o polímero, em concordância com o comportamento apresentado anteriormente para o tamanho das partículas.

Tabela 5. Potencial zeta das nanopartículas de PLGA.

Amostra	Potencial zeta	DPR%
NPV	-9,47 mV	3,01
NP.PZC	-12,8 mV	4,51
Média de três determinações		

A avaliação do potencial zeta indicou um comportamento relativamente estável das NP.PZC, segundo os parâmetros de classificação definidos por Bhattacharjee (2016). A carga negativa das partículas está intimamente ligada ao fenômeno de mucoadesão – onde partículas carregadas positivamente tendem a ser rapidamente absorvidas, enquanto que as que possuem carga negativa apresentam menor permeabilidade e maior adesão a superfícies mucosas – e sugere a aplicabilidade das NP.PZC em formulação de filmes ou géis destinados ao tratamento de IFIs que atingem as membranas mucosas do corpo do indivíduo (como a candidíase vaginal e orofaríngea)(ABREU, 2014).

4.3.3. Eficiência de encapsulamento e Porcentagem de incorporação

As análises de eficiência de encapsulamento (EE%), Porcentagem de incorporação (PI%) e Perfil de liberação (PL) do fármaco foram avaliadas a partir da produção de três lotes de nanopartículas de PLGA contendo posaconazol, e os resultados serão expostos em função da média e do DPR obtidos para esses lotes.

A eficiência de encapsulamento do posaconazol na matriz polimérica foi de $89,98 \pm 2,47\%$, avaliada a partir do sobrenadante obtido após a produção das nanopartículas, e confirmada pela porcentagem de incorporação do fármaco, que apresentou valor de $89,65 \pm 5,44\%$.

Em estudo semelhante, realizado por Mohammadi *et al.* (2017), a nistatina, um antifúngico poliênico hidrofóbico, foi encapsulada em partículas de PLGA em diferentes proporções Nistatina/PLGA (1:3, 1:4 e 1:5) e apresentou eficiência de encapsulamento entre $46,2\% \pm 2,3\%$ e $56,9\% \pm 1,04\%$ (MOHAMMADI *et al.*, 2017). Outro trabalho que serve como referência para comparação da EE% obtida nas NP.PZC, diz respeito a um estudo recente desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, onde foi realizado o encapsulamento de clorambucil, um fármaco antitumoral, em partículas de PLGA com obtenção de valores entre $87,2\% \pm 0,5\%$ e $88,9\% \pm 0,2\%$ (DIAS, 2017).

Com base nesses resultados, concluímos que o encapsulamento do posaconazol nas nanopartículas foi bastante eficiente (EE%= $89,98\% \pm 2,47\%$), indicando que uma quantidade satisfatória da droga foi encapsulada dentro da matriz polimérica e estava disponível para liberação, apresentando-se como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas para terapia com posaconazol.

4.3.4. Perfil de liberação

O mecanismo de liberação de fármacos a partir das partículas de PLGA é obtido pela combinação dos fenômenos de difusão e erosão, tanto na superfície como no interior da partícula (FREDENBERG *et al.*, 2011). A absorção de água pelo polímero acontece imediatamente após o contato com o meio aquoso ou à administração *in vivo*, levando à criação de poros dentro da matriz de PLGA, que aumentam em número e tamanho em função de tempo, resultando em uma rede porosa que permite a difusão do fármaco a partir da matriz do polímero (MOCHIZUKI *et al.*, 2008).

Isso ocorre devido à clivagem das ligações éster por hidrólise, levando ao decréscimo do peso molecular do PLGA, e produzindo grupos carboxílicos, que catalisam ainda mais a hidrólise local do polímero (SIEPMANN *et al.*, 2005). Este fenômeno auto-catalítico é responsável pela degradação heterogênea dentro das matrizes de PLGA, que acontece de forma mais rápida no centro das partículas do que na superfície (FREDENBERG *et al.*, 2011).

O perfil de liberação *in vitro* do posaconazol encapsulado nas nanopartículas de PLGA foi avaliado através da medida da porcentagem de liberação do fármaco a partir de três lotes distintos de NP.PZC, utilizando o método validado por HPLC.

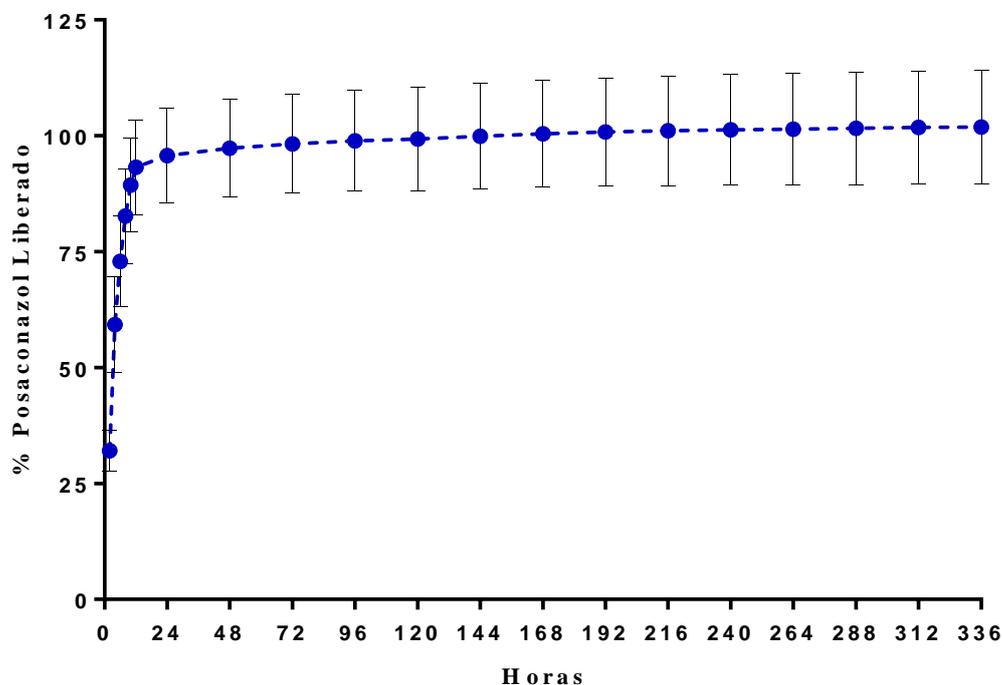
As coletas foram realizadas durante 15 dias sendo que, as alíquotas foram retiradas a cada 2 horas no primeiro dia, e a cada 24 horas nos dias subsequentes, conforme mostrado na Tabela 6, que traz a representação da média de liberação dos três lotes analisados. Esses resultados foram plotados na forma de gráfico para avaliação da cinética do perfil de liberação (Figura 13).

Tabela 6. Porcentagem de posaconazol dispensado, em função das horas, em estudo de perfil de liberação, no período de 15 dias. Onde: Liberação% - representa a porcentagem liberada do fármaco a cada hora. %PZC, é a porcentagem acumulada da liberação do posaconazol.

Dia	Horas	Média de Liberação de três lotes	
		Liberação %	%PZC
1º	2	32,04	32,04
	4	27,19	59,23
	6	13,69	72,92
	8	9,74	82,66
	10	6,69	89,35
	12	3,84	93,19
2º	24	2,49	95,68
3º	48	1,61	97,29
4º	72	0,92	98,22
5º	96	0,65	98,86
6º	120	0,41	99,27
7º	144	0,59	99,86
8º	168	0,57	100,43
9º	192	0,37	100,80
10º	216	0,27	101,07
11º	240	0,20	101,27
12º	264	0,15	101,42
13º	288	0,16	101,58
14º	312	0,21	101,79
15º	336	0,09	101,88

Média de liberação dos três lotes analisados

Figura 13. Avaliação do perfil de liberação de posaconazol a partir das nanopartículas de PLGA, durante 15 dias, representada através da média de liberação dos três lotes analisados.



Fonte: Autoria própria (gráfico desenhado utilizando o *software* GraphPad Prism 7.0).

A liberação do posaconazol a partir das partículas poliméricas foi mais intensa durante as primeiras quatro horas, onde, aproximadamente, 59% do fármaco já havia sido liberado, conforme mostra a Tabela 6, cujos valores são exibidos em função da média de liberação dos três lotes avaliados. Esse comportamento condiz com o perfil de liberação de drogas a partir de partículas de PLGA que, geralmente, exibem um padrão de liberação constituído por três fases (FREDENBERG *et al.*, 2011):

- Fase I: também denominada de efeito *burst*, é caracterizada pela elevada liberação inicial do composto ativo devido à fração da droga que está adsorvida na superfície da partícula ou próxima a ela, e que é facilmente desprendida por hidratação (WANG *et al.*, 2002);
- Fase II: fase de liberação lenta, durante a qual o fármaco se difunde através do polímero por meio da rede de poros formada pela hidratação e degradação do PLGA. Esta etapa resulta da junção de, pelo menos, dois fenômenos: difusão do composto ativo e erosão do polímero. A combinação destes fatores acarreta em

uma velocidade de liberação aproximadamente constante, chegando a se aproximar de uma cinética de ordem zero (MEDEIROS, 2013);

- Fase III: também chamada de segundo *burst*, ocorre apenas quando o composto ativo ainda está presente no interior da partícula no momento em que a estrutura polimérica começa a ser desintegrada. Esta fase é caracterizada pela liberação rápida e completa do fármaco, atribuída à erosão do polímero (DING E ZHU, 2018).

Vale salientar que nem todos os perfis de liberação a partir de nanopartículas de PLGA obedecem ao clássico padrão trifásico, se o *burst* inicial for mais intenso ou se a fase II ocorrer de forma mais acelerada, por exemplo, o perfil de liberação pode ser do tipo bifásico com uma menor liberação durante a fase III (BAE *et al.*, 2009; HAN *et al.*, 2010). As partículas de PLGA com posaconazol apresentaram um perfil de liberação bifásico, onde houve um desprendimento acelerado do fármaco durante as primeiras horas do estudo, evoluindo para uma liberação praticamente constante durante os dias subsequentes.

A liberação cumulativa de posaconazol ao final dos 15 dias de estudo foi de aproximadamente $101,88 \pm 12,1\%$, apresentando um perfil de liberação favorável para este tipo de formulação nanoparticulada e coerente com os resultados encontrados para a EE% (89,9%). O estudo de perfil de liberação também permitiu avaliar a liberação de uma droga lipofílica em meio aquoso, demonstrando o potencial da utilização das nanopartículas de PLGA no desenvolvimento de formulações para liberação controlada de posaconazol.

4.4.5. Avaliação da cinética de liberação do posaconazol incorporado nas nanopartículas de PLGA

A elucidação dos mecanismos envolvidos no processo de liberação de fármacos incorporados à matriz das nanopartículas é importante para a caracterização dos sistemas de liberação, pois fornece informações quanto à cinética do processo, podendo estimar definições de doses e posologia terapêutica com bases nos dados obtidos. Os principais processos envolvidos na liberação dos compostos incorporados à matriz

polimérica das nanopartículas acontecem pela difusão do composto da matriz para o meio, intumescimento e degradação da matriz polimérica (ARIFIN *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos no perfil de liberação das formulações de PLGA contendo o posaconazol encapsulado foram aplicados aos principais modelos matemáticos utilizados no estudo do perfil de difusão e cinética da liberação do fármaco. A Tabela 7 exibe os dados de adequação de cinco modelos avaliados, representados pelos valores de R^2 , obtidos a partir da avaliação de regressão linear e não linear do processo de liberação do posaconazol.

Tabela 7. Coeficientes de correlação (R^2) dos dados de liberação do posaconazol incorporado nas nanopartículas de PLGA em relação aos modelos matemáticos avaliados.

Modelo	Equação	Parâmetro
Ordem zero	$Q = k \cdot t + Q_0$	$R^2 = 0,3179$
Primeira Ordem	$Q = Q_0 e^{k \cdot t}$	$R^2 = 0,2456$
Higuchi	$Q = k \cdot \sqrt{t}$	$k = 1,1841$ $R^2 = -1,2596$
Korsmeyer-Peppas*	$Q = k \cdot t^n$	$k = 5,3554$ $n = 0,1247$ $R^2 = 0,5751$
Weibull*	$m = 1 - \exp[-(t)b/a]$	$a = 3,8424$ $b = 0,8017$ $R^2 = 0,8889$

*Parâmetros obtidos pelo cálculo de regressão não linear. Q = quantidade de fármaco liberado num determinado período de tempo; Q_0 = valor inicial de Q; k = constante do respectivo modelo; t = tempo; n = expoente de liberação; a = constante de tempo; b = parâmetro de forma (*shape parameter*).

O modelo de Weibull apresentou maior valor de R^2 e, portanto, é o que mais se adequa com o perfil de liberação apresentado para o posaconazol incorporado nas nanopartículas de PLGA. Esse modelo é utilizado para descrever sistemas ou eventos que apresentem certo grau de variabilidade, e pode ser aplicado a quase todos os tipos de curvas de dissolução, incluindo sistemas de liberação rápida ou de perfil estendido (BARZEGAR-JALALI *et al.*, 2008).

Para os produtos que seguem este modelo de liberação, o logaritmo da quantidade dissolvida do fármaco *versus* o logaritmo do tempo é linear, e demonstra a fração cumulativa do fármaco em função tempo. O parâmetro **a** determina a escala temporal do processo e **b** caracteriza a forma da curva. Quando a curva apresenta valores de **b** = 1 a

curva é exponencial, valores de $b > 1$ indica curvas de formato sigmoide e $b < 1$ caracteriza a curva como parabólica (SILVA, 2014).

A cinética de ordem zero tem como base a liberação lenta da substância ativa a partir de formas farmacêuticas que não se desagregam. É um modelo ideal para o desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada uma vez que avalia a liberação de quantidades iguais do fármaco por unidade de tempo (DASH *et al.*, 2010). De maneira hipotética, as preparações destinadas a veicular substâncias ativas segundo modelo de liberação prolongada apresentam um perfil de liberação de ordem zero, onde a velocidade de difusão do fármaco é menor que a sua respectiva velocidade de dissolução, formando uma solução saturada no interior da matriz, que permite a cedência constante do fármaco para o exterior. Esta situação de liberação ideal é muito difícil de obter na prática e a sua aplicação apresenta muitas limitações devido à escassez de fatores de ajuste ao modelo (LOPES *et al.*, 2005).

A cinética de primeira ordem é aplicada para formas farmacêuticas cuja liberação é proporcional à quantidade de fármaco que permanece no seu interior, de modo que, a quantidade de fármaco liberada vai diminuindo com o passar do tempo. Esse modelo matemático é aplicável para descrever a dissolução de formas farmacêuticas nas quais uma droga hidrofílica é incorporada a uma matriz porosa (DASH *et al.*, 2010).

O modelo proposto por Higuchi foi o primeiro modelo matemático destinado a descrever a velocidade de liberação controlada de drogas a partir de um sistema matricial. Este modelo matemático – que considera que o mecanismo de difusão da droga acontece de forma unidirecional e constante –, é dependente da raiz quadrada do tempo, e acontece por um processo de difusão baseado na Lei de Fick, onde é estabelecida uma relação entre o tempo de relaxamento do polímero e o tempo de difusão do solvente (LOPES *et al.*, 2005). O modelo de Higuchi é utilizado para descrever a dissolução de fármacos a partir de vários sistemas de liberação modificada. Essa relação, porém, não é aplicável em sistemas intumescentes, pois este tipo de sistema pode estar sujeito à erosão e, uma vez que isto aconteça, se torna preciso levar em conta o atributo do relaxamento das cadeias poliméricas para o transporte do fármaco. Apesar de apresentar limitações na interpretação dos mecanismos de liberação controlada, a equação de Higuchi ainda é mais realista que o modelo de ordem zero, para avaliar os mecanismos de liberação nos sistemas matriciais (LOPES *et al.*, 2005).

A cinética de liberação proposta no modelo de Korsmeyer-Peppas descreve o desprendimento do fármaco a partir de um sistema polimérico, onde k é uma constante cinética, que incorpora características estruturais e geométricas do mecanismo e n é o expoente de liberação que, de acordo com o valor numérico que assume, caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco. Esta equação é utilizada para descrever a liberação do soluto quando o mecanismo que prevalece não é bem conhecido ou consiste na combinação da difusão do fármaco (transporte Fickiano) com o transporte Caso II (não-Fickiano) – controlado pelo intumescimento e relaxamento das cadeias poliméricas (expansão dinâmica) que envolve a transição de um estado semirrígido para outro mais flexível (RITGER E PEPPAS, 1987; LOPES *et al.*, 2005). Valores de n igual a 0,45 indicam que o principal mecanismo envolvido no processo de liberação é a difusão, enquanto que valores de $n > 0,89$ indicam que o processo envolvido na liberação é o intumescimento (ou difusão não-Fickiana), já valores de n entre 0,45 e 0,89 sugerem um comportamento de liberação anômalo, ou seja, uma mistura de difusão e intumescimento. A aplicação do modelo de Korsmeyer-Peppas para cálculo do expoente de liberação do posaconazol a partir das nanopartículas de PLGA resultou em um valor de $n = 0,12$, não sendo possível elucidar o mecanismo de liberação do fármaco através deste modelo. Em todo caso, considera-se que a liberação do posaconazol obedeceu a um processo de difusão não-Fickiana.

Além dos modelos matemáticos exibidos na Tabela 7, também foram avaliados os modelos cinéticos de segunda e terceira ordem e os modelos de Hixson-Crowell e de Baker-Lonsdale que igualmente apresentaram pouca adequação com o perfil de liberação apresentado para o posaconazol incorporado nas nanopartículas de PLGA, pela avaliação de R^2 .

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou a adequabilidade de uma metodologia voltada para quantificação de posaconazol na forma de droga bruta e sua aplicação em estudos de perfil de liberação do fármaco a partir de nanopartículas de PLGA.

O método demonstrou ser seletivo a 260 nm, nas condições cromatográficas em que foi aplicado, mostrando boa resolução entre os picos relativos ao polímero de PLGA e o posaconazol cujo tempo de retenção variou entre 10,9 e 11,3 minutos em diferentes corridas cromatográficas. A metodologia utilizada comprovou ser seletiva, linear ($R^2 = 0,9994$), exata e precisa para quantificação do fármaco.

As partículas poliméricas produzidas apresentaram boa distribuição de tamanho ($89,95 \pm 3,1$ nm) e de potencial zeta (-12,8 mV) indicando um comportamento de relativa estabilidade das NP.PZC. Ambos os testes apontaram para uma possível interação eletrostática entre o fármaco e as partículas poliméricas, que tiveram seu tamanho reduzido e o potencial zeta aumentado, em módulo, em comparação com as NPV. A partir dos resultados obtidos para o potencial zeta das NP.PZC foi possível sugerir uma possível aplicação das NP.PZC na formulação de filmes ou géis destinados ao tratamento das IFIs em superfícies mucosas.

A eficiência de encapsulamento do método foi de $89,98 \pm 2,47\%$ e o perfil de liberação a partir das NP.PZC mostrou uma cinética que se adequa ao modelo matemático de Weibull. A adequação à cinética de Weibull possibilita caracterizar o modo de liberação do fármaco, no entanto, não é possível determinar os mecanismos que mais influenciaram nesta liberação.

Os resultados obtidos indicam a aplicabilidade das NP.PZC em estudos futuros, para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas, que podem ser direcionadas para ampliar a eficiência de liberação do posaconazol nos sistemas biológicos, reduzir os efeitos colaterais e adversos relacionados à utilização do fármaco, aumentar adesão terapêutica e a segurança no tratamento das infecções fúngicas invasivas.

Neste trabalho são apresentadas ferramentas úteis para o desenvolvimento de fármacos inovadores, que podem contribuir para tratamentos mais rápidos e eficientes, contribuindo para saúde pública – tanto na esfera hospitalar quanto do tratamento

humanitário – reduzindo os custos hospitalares com o paciente e proporcionando a reabilitação mais rápida do indivíduo ao seu meio social, através de um tratamento eficiente, seguro e menos invasivo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. C. L. D. **Preparo e avaliação de nanossistemas de liberação modificada de nisina para controle e prevenção de patologias ginecológicas**. 2014. 98 Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

ALVES, A. B.; BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 237-243, 2002. ISSN 1809-4562.

ARIFIN, D. Y.; LEE, L. Y.; WANG, C.-H. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 58, n. 12-13, p. 1274-1325, 2006. ISSN 0169-409X.

AYALA, V. et al. Effect of surface charge on the colloidal stability and in vitro uptake of carboxymethyl dextran-coated iron oxide nanoparticles. **Nanopart Res**, v. 15, n. 8, p. 1874, Aug 1 2013. ISSN 1388-0764 (Print) 1388-0764 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24470787> >.

BAE, S. E. et al. Fabrication of covered porous PLGA microspheres using hydrogen peroxide for controlled drug delivery and regenerative medicine. **Journal of Controlled Release**, v. 133, n. 1, p. 37-43, 2009. ISSN 0168-3659.

BARHOUM, A.; GARCÍA-BETANCOURT, M. L. Physicochemical characterization of nanomaterials: size, morphology, optical, magnetic, and electrical properties. In: (Ed.). **Emerging Applications of Nanoparticles and Architecture Nanostructures**: Elsevier, 2018. p.279-304.

BARZEGAR-JALALI, M. et al. Kinetic analysis of drug release from nanoparticles. **Journal of Pharmacy Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 167-177, 2008. ISSN 1482-1826.

BERTHOMIEU, C.; HIENERWADEL, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Photosynthesis research**, v. 101, n. 2-3, p. 157-170, 2009. ISSN 0166-8595.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential—What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, 2016. ISSN 0168-3659.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada-RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Disponível em: <

http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401] >. Acesso em: 19 de Janeiro de 2019.

CACERES, D. H. et al. [Standardisation and validation of an HPLC method for determining serum posaconazole levels in Colombia]. **Rev Iberoam Micol**, v. 33, n. 4, p. 230-236, Oct - Dec 2016. ISSN 2173-9188 (Electronic) 1130-1406 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27663097> >.

CADTH. **Rapid Response Reports**. Posaconazole for the Treatment or Prophylaxis of Aspergillosis or Candidiasis: A Review of Clinical Effectiveness and Guidelines. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health Copyright (c) 2016 Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health. 2016. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK368249/pdf/Bookshelf_NBK368249.pdf >. Acesso em: 01 de março de 2019.

CAMPESTRE, C. et al. Analysis of imidazoles and triazoles in biological samples after MicroExtraction by packed sorbent. **Enzyme Inhib Med Chem**, v. 32, n. 1, p. 1-11, Dec 2017. ISSN 1475-6374 (Electronic) 1475-6366 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28776447> >.

CARRARO, T. M. M. et al. Assessment of in vitro antifungal efficacy and in vivo toxicity of Amphotericin B-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles. **Journal de mycologie medicale**, v. 27, n. 4, p. 519-529, 2017. ISSN 1156-5233.

CENDEJAS-BUENO, E. et al. HPLC/UV or bioassay: two valid methods for posaconazole quantification in human serum samples. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 12, p. 1229-35, Dec 2012. ISSN 1469-0691 (Electronic) 1198-743X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22192527> >.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, SP: Unicamp, 2014. ISBN 85-268-0704-8.

DANHIER, F. et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. **Control Release**, v. 161, n. 2, p. 505-22, Jul 20 2012. ISSN 1873-4995 (Electronic) 0168-3659 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22353619> >.

DASH, S. et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Pol Pharm**, v. 67, n. 3, p. 217-23, 2010.

DE MACEDO-SILVA, S. T. et al. In vitro activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against *Leishmania amazonensis*. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e83247,

2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24376670> >.

DE SENA, A. R.; DE ASSIS, S. A.; BRANCO, A. Analysis of Theobromine and Related Compounds by Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection: An Update (1992-2011). **Food Technology Biotechnology**, v. 49, n. 4, p. 413, 2011. ISSN 1330-9862.

DEKKERS, B. G. J. et al. Therapeutic Drug Monitoring of Posaconazole: an Update. **Curr Fungal Infect Rep**, v. 10, n. 2, p. 51-61, 2016. ISSN 1936-3761 (Print) 1936-3761 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27358662> >.

DIAS, D. J. S. **Síntese, caracterização físico-química, morfológica e avaliação de viabilidade de células tumorais de mama (MCF-7) submetidas à nanoesferas de PLGA contendo clorambucil.** 2012. 141 Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

_____. **Nanopartículas poliméricas contendo clorambucil funcionalizadas com peptídeo direcionador: produção, caracterização e ensaios biológicos com células tumorais.** 2017. 129 Tese (Doutorado em Nanociências e Nanobiotecnologia) Instituto de ciências biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

DING, D.; ZHU, Q. Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 92, p. 1041-1060, Nov 1 2018. ISSN 1873-0191 (Electronic) 0928-4931 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30184728> >.

EMA. **Committee for Medicinal Products for Human Use. Assessment report noxafil. EMA/159150/2014.** : European Medicines Agency 2014.

EMA. Guideline Bioanalytical method validation. 2011. Disponível em: < http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf >. Acesso em: 03 de março de 2019.

FDA. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. 2001. Disponível em: < <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf> >. Acesso em: 03 de março de 2019.

FERREIRA, D. M. **Estudos de sistemas nanocarreadores para o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) e seu éster derivado (8-ALA) aplicados na Eletroquimioterapia e Terapia Fotodinâmica contra o câncer de pele.** 2012. 93 Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

FREDENBERG, S. et al. The mechanisms of drug release in poly (lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—a review. **International journal of pharmaceuticals**, v. 415, n. 1-2, p. 34-52, 2011. ISSN 0378-5173.

GARCIA, C. V.; COSTA, G. R.; MENDEZ, A. S. Stability-indicating HPLC method for posaconazole bulk assay. **Sci Pharm**, v. 80, n. 2, p. 317-27, Apr-Jun 2012. ISSN 2218-0532 (Electronic) 0036-8709 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22896819> >.

GOMES, A. J. et al. Characterization of PLGA Microparticles as a Drug Carrier for 3-Ethoxycarbonyl-2H-Benzofuro[3,2-f]-1-Benzopyran-2-One. Ultrastructural Study of Cellular Uptake and Intracellular Distribution. **Drug Delivery**, v. 13, n. 6, p. 447-454, 2006/01/01 2006. ISSN 1071-7544. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/10717540600640369> >.

_____. trans-[Ru (NO)(NH₃)₄ (py)](BF₄)₃· H₂O encapsulated in PLGA microparticles for delivery of nitric oxide to B16-F10 cells: Cytotoxicity and phototoxicity. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 102, n. 4, p. 757-766, 2008. ISSN 0162-0134.

GRAU, S. et al. Cost-effectiveness of posaconazole tablets versus fluconazole as prophylaxis for invasive fungal diseases in patients with graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Eur J Health Econ**, v. 19, n. 4, p. 627-636, May 2018. ISSN 1618-7601 (Electronic) 1618-7598 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28569350> >.

HAN, B. et al. Preparation of aclarubicin PLGA nanospheres and related in vitro/in vivo studies. **Journal of applied polymer science**, v. 117, n. 5, p. 2754-2761, 2010. ISSN 0021-8995.

HEIMBECHER, S. K.; MONTEITH, D. **Posaconazole intravenous solution formulations stabilized by substituted beta-cyclodextrin.**: US Patent 2013.

HOPE, W.; NATARAJAN, P.; GOODWIN, L. Invasive fungal infections. **Clin Med (Lond)**, v. 13, n. 5, p. 507-10, Oct 2013. ISSN 1470-2118 (Print) 1470-2118 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24115712> >.

ICH. **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (ICH-Q2B)**. ICH 1996.

JOICE, A. C. et al. Antileishmanial Efficacy and Pharmacokinetics of DB766-Azole Combinations. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 62, n. 1, p. e01129-17, Jan 2018. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29061761> >.

KAHLE, K. et al. Simultaneous determination of voriconazole and posaconazole concentrations in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 7, p. 3140-2, Jul 2009. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19380591> >.

KHALIL, H. A. et al. High Performance Liquid Chromatographic Assay for the Simultaneous Determination of Posaconazole and Vincristine in Rat Plasma. **Int J Anal Chem**, v. 2015, p. 743915, 2015. ISSN 1687-8760 (Print) 1687-8760 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27034675> >.

KOSMIDIS, C. et al. Therapeutic drug monitoring and adverse events of delayed-release posaconazole tablets in patients with chronic pulmonary aspergillosis. **J Antimicrob Chemother**, Dec 26 2018. ISSN 1460-2091 (Electronic) 0305-7453 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30590533> >.

KRAFT, W. K. et al. Posaconazole tablet pharmacokinetics: lack of effect of concomitant medications altering gastric pH and gastric motility in healthy subjects. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 7, p. 4020-5, Jul 2014. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24798274> >.

KUMAR, S. et al. Synthesis and optimization of ceftriaxone-loaded solid lipid nanocarriers. **J Chemistry physics of lipids** v. 200, p. 126-132, 2016. ISSN 0009-3084.

KURIAKOSE, K. et al. Posaconazole-Induced Pseudohyperaldosteronism. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 62, n. 5, p. e02130-17, May 2018. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29530850> >.

LIPP, H. P. Posaconazole: clinical pharmacokinetics and drug interactions. **Mycoses**, v. 54 Suppl 1, p. 32-8, Jan 2011. ISSN 1439-0507 (Electronic) 0933-7407 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21126270> >.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005. ISSN 1809-4562.

LOSCALZO, J. **Pneumologia e Medicina Intensiva de Harrison**. AMGH Editora, 2014. ISBN 8580553660.

LUKE, D. R. et al. Review of the Basic and Clinical Pharmacology of Sulfobutylether- β -Cyclodextrin (SBECD). **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 99, n. 8, p. 3291-3301, 2010. ISSN 0022-3549.

LYSENG-WILLIAMSON, K. A. Posaconazole: a pharmacoeconomic review of its use in the prophylaxis of invasive fungal disease in immunocompromised hosts. **PharmacoEconomics**, v. 29, p. 251+, 2011/03// 2011. ISSN 11707690. Disponível em: <<http://link.galegroup.com/apps/doc/A249605260/AONE?u=capes&sid=AONE&xid=fb7f7d38>>. Acesso em: 27 de fevereiro de 2019.

MEDEIROS, G. R. **Modelagem matemática da liberação de compostos hidrofílicos incorporados por dupla emulsão em micropartículas de PLGA**. 2013. 97 Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos) Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis.

MIR, M.; AHMED, N.; REHMAN, A. U. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 159, p. 217-231, Nov 1 2017. ISSN 1873-4367 (Electronic) 0927-7765 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28797972>>.

MOCHIZUKI, A. et al. Controlled release of argatroban from PLA film—Effect of hydroxyesters as additives on enhancement of drug release. **Journal of applied polymer science**, v. 108, n. 5, p. 3353-3360, 2008. ISSN 0021-8995.

MOHAMMADI, G. et al. Preparation, Physicochemical Characterization and Anti-fungal Evaluation of Nystatin-Loaded PLGA-Glucosamine Nanoparticles. **Pharm Res**, v. 34, n. 2, p. 301-309, Feb 2017. ISSN 1573-904X (Electronic) 0724-8741 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27928646>>.

MOLINA, I. et al. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. **N Engl J Med**, v. 370, n. 20, p. 1899-908, May 15 2014. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24827034>>.

MOLINA, I.; SALVADOR, F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A. The use of posaconazole against Chagas disease. **Current opinion in infectious diseases**, v. 28, n. 5, p. 397-407, 2015. ISSN 0951-7375.

MONDOLFI, A. P. et al. Successful treatment of Old World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* with posaconazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1774-1776, 2011. ISSN 0066-4804.

MORRIS, M. I. Posaconazole: a new oral antifungal agent with an expanded spectrum of activity. **Am J Health Syst Pharm**, v. 66, n. 3, p. 225-36, Feb 1 2009. ISSN 1535-2900 (Electronic) 1079-2082 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19179636> >.

MUNDARGI, R. C. et al. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly (D, L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. **Journal of Controlled Release**, v. 125, n. 3, p. 193-209, 2008. ISSN 0168-3659.

NEUBAUER, W. et al. Determination of the antifungal agent posaconazole in human serum by HPLC with parallel column-switching technique. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 877, n. 24, p. 2493-8, Aug 15 2009. ISSN 1873-376X (Electronic) 1570-0232 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19577524> >.

NILAPWAR, S. M. et al. Absorption spectroscopy. In: (Ed.). **Methods in enzymology**: Elsevier, v.500, 2011. p.59-75. ISBN 0076-6879.

OTU, A. et al. Acute kidney injury: an unusual complication of posaconazole use. **Journal of Chemotherapy**, v. 30, n. 6-8, p. 380-383, 2018. ISSN 1120-009X.

PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 55, n. 3, p. 329-47, Feb 24 2003. ISSN 0169-409X (Print) 0169-409X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12628320> >.

PATEL, A. et al. Recent advances in protein and Peptide drug delivery: a special emphasis on polymeric nanoparticles. **Protein Pept Lett**, v. 21, n. 11, p. 1102-20, 2014. ISSN 1875-5305 (Electronic) 0929-8665 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25106908> >.

PATEL, N. R. et al. Itraconazole-loaded poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles for improved antifungal activity. **Nanomedicine (Lond)**, v. 5, n. 7, p. 1037-50, Sep 2010. ISSN 1748-6963 (Electronic) 1743-5889 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20874019> >.

PENG, H.-S. et al. Voriconazole into PLGA nanoparticles: Improving agglomeration and antifungal efficacy. **International journal of pharmaceutics**, v. 352, n. 1-2, p. 29-35, 2008. ISSN 0378-5173.

PIGATTO, M. C.; UCHOA, F.; COSTA, T. Farmacocinética dos novos antifúngicos de uso sistêmico utilizados em pacientes imunocomprometidos. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 90, p. 86-94, 2009.

PING, B. et al. Second-versus first-generation azoles for antifungal prophylaxis in hematology patients: a systematic review and meta-analysis. **Annals of hematology**, v. 92, n. 6, p. 831-839, 2013. ISSN 0939-5555.

PITISUTTITHUM, P. et al. Activity of posaconazole in the treatment of central nervous system fungal infections. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, n. 4, p. 745-55, Oct 2005. ISSN 0305-7453 (Print) 0305-7453 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16135526> >.

QIU, L. et al. Antifungal efficacy of itraconazole-loaded TPGS-b-(PCL-ran-PGA) nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, v. 10, p. 1415-23, 2015. ISSN 1178-2013 (Electronic) 1176-9114 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25733833> >.

RAIMUNDO JR, I. M.; PASQUINI, C. Espectrofotometria multicanal e arranjos de fotodiodos. **J Química Nova**, v. 20, n. 1, p. 83, 1997.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of controlled release**, v. 5, n. 1, p. 23-36, 1987. ISSN 0168-3659.

RÜPING, M. J. et al. Posaconazole concentrations in the central nervous system. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 62, n. 6, p. 1468-1470, 2008. ISSN 1460-2091.

SANCHEZ-ORTEGA, I. et al. Clinical efficacy and safety of primary antifungal prophylaxis with posaconazole vs itraconazole in allogeneic blood and marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 46, n. 5, p. 733-9, May 2011. ISSN 1476-5365 (Electronic) 0268-3369 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20697369> >.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **J Química nova. São Paulo**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003. ISSN 0100-4042.

SIEPMANN, J. et al. How autocatalysis accelerates drug release from PLGA-based microparticles: a quantitative treatment. **J Biomacromolecules**, v. 6, n. 4, p. 2312-2319, 2005. ISSN 1525-7797.

SILVA, A. S. D. **Desenvolvimento e validação de método de dissolução de suspensões de Benzoilmetronidazol e perfil de dissolução**. 2014. 120 Dissertação

(Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Pampa, Rio Grande do Sul.

SILVA, S. M. **Padronização e validação do método extração sortiva em barra de agitação e cromatografia líquida de alta eficiência (SBSE/HPLC) para a determinação de antidepressivos em amostras de plasma.** 2007. 126 Dissertação (Mestrado em Toxicologia) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **J Biophysical reviews**, v. 8, n. 4, p. 409-427, 2016. ISSN 1867-2450.

TORRES, H. A. et al. Posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal. **Lancet Infect Dis**, v. 5, n. 12, p. 775-85, Dec 2005. ISSN 1473-3099 (Print) 1473-3099 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16310149> >.

USP. **USP 41 NF36. US Pharmacopoeia National Formulary.** USA, Baltimore, MD: 2018.

VAN DER ELST, K. C. et al. Subtherapeutic Posaconazole Exposure and Treatment Outcome in Patients With Invasive Fungal Disease. **Ther Drug Monit**, v. 37, n. 6, p. 766-71, Dec 2015. ISSN 1536-3694 (Electronic) 0163-4356 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26565789> >.

VARENNE, F. et al. Towards quality assessed characterization of nanomaterial: Transfer of validated protocols for size measurement by dynamic light scattering and evaluation of zeta potential by electrophoretic light scattering. **International journal of pharmaceutics**, v. 528, n. 1-2, p. 299-311, 2017. ISSN 0378-5173.

VERWEIJ-VAN WISSEN, C. et al. Simultaneous determination of the azoles voriconazole, posaconazole, isavuconazole, itraconazole and its metabolite hydroxy-itraconazole in human plasma by reversed phase ultra-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v. 887, p. 79-84, 2012. ISSN 1570-0232.

VOLTAN, A. R. et al. Fungal diseases: could nanostructured drug delivery systems be a novel paradigm for therapy? **International journal of nanomedicine**, v. 11, p. 3715, 2016.

WANG, C.-H. et al. Clinical efficacy and safety of primary antifungal prophylaxis with posaconazole versus fluconazole in allogeneic blood hematopoietic stem cell transplantation recipients—A retrospective analysis of a single medical center in

Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 49, n. 4, p. 531-538, 2016. ISSN 1684-1182.

WANG, J.; WANG, B. M.; SCHWENDEMAN, S. P. Characterization of the initial burst release of a model peptide from poly (D, L-lactide-co-glycolide) microspheres. **Journal of controlled release**, v. 82, n. 2-3, p. 289-307, 2002. ISSN 0168-3659.

ZHANG, M. et al. A simple high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of three triazole antifungals in human plasma. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 1, p. 484-9, Jan 2013. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23147736> >.