

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – Unifal-MG

ANDRÉ LUÍS MORAIS RUELA

**PARTÍCULAS DE POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR COMO SISTEMAS
PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS**

Alfenas/MG

2015

ANDRÉ LUÍS MORAIS RUELA

**PARTÍCULAS DE POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR COMO SISTEMAS
PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas-MG como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Gislaine Ribeiro Pereira

Alfenas/MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Ruela, André Luís Morais.

Partículas de polímeros de impressão molecular como sistemas para liberação controlada de fármacos / André Luís Morais Ruela. – Alfenas - MG, 2015.

152 f.

Orientadora: Gislaine Ribeiro Pereira.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2015.

Bibliografia.

1. Nicotina. 2. Doença de Alzheimer. 3. Polímeros impressos. 4. Sistemas de Liberação de Medicamentos. 5. Polimerização.
I. Pereira, Gislaine Ribeiro. II. Título.

CDD-615.19

ANDRÉ LUÍS MORAIS RUELA

***PARTÍCULAS DE POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR
COMO SISTEMAS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
FÁRMACOS***

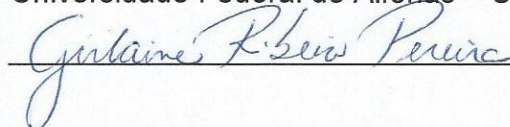
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas-MG como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 4 de dezembro de 2015.

Profa. Dra. Gislaine Ribeiro Pereira

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG

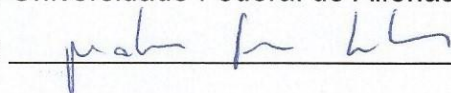
Assinatura



Prof. Dr. Mateus Freire Leite

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG

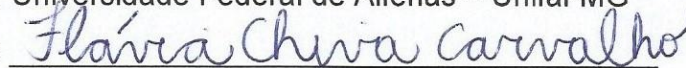
Assinatura



Profa. Dra. Flávia Chiva Carvalho

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG

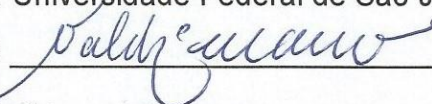
Assinatura



Prof. Dr. Valdir Mano

Instituição: Universidade Federal de São João del-Rei - UFSJ

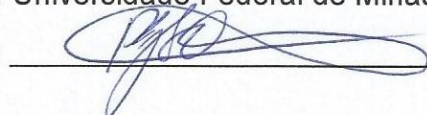
Assinatura



Prof. Dr. Ricardo Gerado de Sousa

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Assinatura



AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Gislaine Ribeiro Pereira, por todo este tempo que me orientou, desde a iniciação científica até o doutorado;

Ao pessoal do **Laboratório de Pesquisa em Sistemas de Liberação de Fármaco (LSLF)**, em especial às técnicas Andréa Marques Roberto Passos e Neila Sena Ribeiro, e à Profa. Dra. Flávia Chiva Carvalho por toda colaboração neste trabalho;

À Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo e ao pessoal do **Núcleo Controle de Qualidade da UNIFAL-MG**, por todo suporte e colaboração, em especial à Gilmara Maria Bernardes de Oliveira pela ajuda nas análises de infravermelho;

Ao Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo e à Dra. Patrícia Penido Maia do **Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos(LATF)**, por ajudar na realização deste trabalho;

À mestranda Aline Gravinez Perissinato do **Laboratório de Análise e Caracterização de Fármacos (LACFar/IQ)**, por ajudar nos estudos de análise térmica;

Ao laboratório Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Ayalla Marketing e Representações Ltda. e ao laboratório Megafine Pharma (P) Ltd. pela doação da matéria-prima cloridrato de donepezila;

Aos meus pais, aos meus irmãos e toda minha família, por toda ajuda e por apoiar minhas decisões;

À minha namorada Fernanda Segurasse de Moraes por todo companheirismo e compreensão;

À CAPES, FAPEMIG e UNIFAL-MG pelo apoio financeiro.

RESUMO

Os polímeros de impressão molecular (MIPs) são materiais com capacidade de estabelecer interações seletivas com uma molécula que foi previamente adicionada durante a etapa de síntese, denominada molécula molde. A molécula molde pode ser, por exemplo, um fármaco, que é removido da matriz polimérica após a síntese. Apesar disto, o MIP ainda possui a capacidade de estabelecer interações de natureza seletiva com a molécula molde. Devido à estas interações seletivas, estes polímeros têm sido amplamente aplicados na área analítica, e também vêm sendo considerada sua aplicação como sistema de liberação prolongada/sustentada de fármacos. Os sistemas de liberação prolongada de fármacos apresentam vantagens como a redução de picos plasmáticos associados a efeitos adversos, contribuindo para o desenvolvimento de melhores alternativas clínicas para a administração de fármacos. Neste trabalho, foram selecionados dois fármacos de caráter básico contendo grupamentos amina terciária para proposição de sistemas de liberação prolongada baseados em partículas de MIPs: a nicotina, molécula hidrofílica indicada na terapia de abandono do fumo; e a donepezila, molécula lipofílica indicada no tratamento da doença de Alzheimer. Partículas poliméricas de MIPs foram sintetizadas pela técnica de polimerização por precipitação e os materiais poliméricos foram caracterizados usando diferentes técnicas como espectroscopia no infravermelho, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica. Estudos de isoterma de adsorção indicaram a heterogeneidade dos sítios de ligação, com melhor ajuste ao modelo não linear de Langmuir-Freundlich. As formulações para administração por diferentes vias (oral ou transdérmica) foram delineadas a partir da dispersão das partículas poliméricas em veículos apropriados para uso farmacêutico, sobretudo, veículos lipídicos, como o óleo mineral e o ácido oleico. O fármaco foi previamente solubilizado nos veículos oleosos para assegurar maiores interações do tipo fármaco-polímero. As formulações transdérmicas para liberação de nicotina baseadas em MIPs permitiram prolongar a liberação *in vitro* do fármaco conforme o modelo cinético de Higuchi, caracterizando a difusão do fármaco a partir da matriz polimérica. Estudos de permeação cutânea *in vitro* usando pele de orelha de porcos foram realizados para avaliar as formulações transdérmicas, demonstrando que até 48 horas, a permeação cutânea da nicotina foi prolongada seguindo uma cinética de ordem zero. Foi possível demonstrar que a velocidade de permeação cutânea da nicotina a partir das formulações baseadas em MIPs (razão fármaco/polímero 1:3) foi menor do que nas formulações baseadas em polímeros não impressos (NIPs), provavelmente devido ao reconhecimento seletivo da nicotina nas partículas de MIPs. A cinética de liberação da donepezila a partir dos sistemas baseados em MIPs também foi melhor ajustada ao modelo de Higuchi, sendo que os MIPs apresentaram melhor efeito em prolongar a liberação do fármaco do que os NIPs, independente da razão fármaco:polímero. Deste modo, sistemas inovadores para liberação prolongada de fármacos baseados em MIPs, considerando diferentes vias de administração, foram apropriadamente desenvolvidos e avaliados.

Palavras-chave: Nicotina. Donepezila. Polímeros molecularmente impressos. Sistemas de liberação prolongada de fármacos. Polimerização por precipitação.

ABSTRACT

Molecularly imprinted polymers (MIPs) are synthetic polymers that have the property to establish selective interactions with a compound called template *e.g.* a drug. The template is added in the synthesis step. After the synthesis, the template is removed. However, the property to establish selective interactions remain among MIPs and template. MIPs have been applied in the analytical field due to their selective interactions. The application of these materials as sustained release drug delivery systems has also been evaluated. Sustained release drug delivery systems may offer advantages, avoiding the high plasmatic peak concentrations of drugs related to their side effects. These drug delivery systems may also contribute to develop better clinical strategies to administration of drugs in the clinical practice. In this study, we select basic compounds with tertiary amine moieties to propose sustained release drug delivery systems based on MIPs. The selected drugs were nicotine (hydrophilic drug administered as an aid to smoking cessation therapy) and donepezil (lipophilic drug administered in the treatment of the Alzheimer's disease). Polymer particles of MIPs were synthesized by precipitation polymerization and characterized by different techniques as infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, and atomic force microscopy. Adsorption isotherms studies indicated the heterogeneity of the binding sites with the better adjust to Langmuir-Freundlich model. The formulations were designed to administration by different pathways (transdermal or oral), and they were prepared from the dispersion of polymer particles in an oil vehicle as oleic acid and mineral oil. The drug was previously incorporated in the oil vehicle. Nicotine was administered by transdermal formulations based on MIPs using mineral oil as vehicle, and the results indicated that drug release was controlled according to Higuchi kinetic model, characterising the drug diffusion from the polymer matrix. Permeation studies were carried out using porcine ear skin, and the results demonstrated that the permeation of nicotine was prolonged up to 48 h according to zero order kinetic. The nicotine transdermal formulations based on MIPs showed a better effect in the control of drug permeation across the skin in relationship to the non-imprinted ones (NIPs) only when the amount of nicotine in the formulations was increased, with a drug/polymer ratio of 1:3. The donepezil release from the formulations based on MIPs using oleic acid as vehicle was better adjusted to Higuchi kinetic model, and the release rate of MIPs was smaller than NIPs, independent of the drug/polymer ratio. In this way, novel sustained release drug delivery systems based on MIPs were successfully developed and characterised for drug administration by different pathways.

Keywords: Nicotine. Donepezil. Molecularly imprint polymer. Sustained release drug delivery systems. Precipitation polymerization.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	–	Nível de significância
ACHC	–	1,1-azobisciclohexano-carbonitrila
AIBN	–	2,2-azobisisobutironitrila
AMA	–	Ácido metacrílico
ATR-FTIR	–	Espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier acoplada a um acessório de refletância total atenuada
C₁₈	–	Sílica quimicamente ligada a grupos octadecilsilano
CED	–	Calorimetria exploratória diferencial
CLAE	–	Cromatografia líquida de alta eficiência
Da	–	Dalton
DMAEMA	–	2-dimetilamino-etil-metacrilato
DP	–	Desvio padrão
DPR	–	Desvio padrão relativo
E	–	Erro relativo
EDGMA	–	Etilenoglicoldimetacrilato
FDA	–	<i>Food and Drug Administration</i>
GMA	–	Glicidilmetacrilato
HEMA	–	2-hidroxietil metacrilato
k'	–	Fator de retenção
K	–	Partilha do composto entre duas fases
K_p	–	Coefficiente de permeabilidade
kV	–	Quilovolts
log_k	–	Logaritmo do coeficiente de partição
log_{K_{ow}}	–	Logaritmo do coeficiente de partição <i>n</i> -octanol/água
ICH	–	<i>International Conference of Harmonization</i>
LC-MS/MS	–	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas <i>in tandem</i>
M	–	Capacidade de adsorção do fármaco no polímero
mA	–	Miliampere

MEV	–	Microscopia eletrônica de varredura
MFA	–	Microscopia de força atômica
MIP	–	Polímero impresso molecularmente
m/z	–	Razão massa/carga
n	–	Número de determinações
ND	–	Não determinado
NIP	–	Polímero não-impresso molecularmente (polímero controle)
pH	–	Potencial de hidrogênio
PFPS	–	Surfactante perfluorocarbono polimérico
pK_a	–	Logaritmo da constante de dissociação ácida
PMS	–	Perfluorometilcilcohexano
poli(EDGMA)	–	Homopolímero de etilenoglicoldimetacrilato
PTFE	–	Politetrafluoretileno
PVA	–	Polímero de álcool polivinílico
r	–	Coefficiente de correlação
r²	–	Coefficiente de determinação
R	–	Porcentagem de recuperação
RAFT	–	Técnica de transferência reversível de cadeia por adição-fragmentação
RAM	–	Material de acesso restrito
RAM-MIP	–	Material molecularmente impresso de acesso restrito
RAM-NIP	–	Material não impresso de acesso restrito
rpm	–	Rotação por minuto
T máx	–	Tempo para atingir a concentração plasmática máxima
TIC	–	<i>Total ion current</i>
TRIT	–	Trimetilolpropanotrimetilmacrilato
UV	–	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Etapas da síntese dos MIPs e interações do tipo fármaco-polímero.....	23
Figura 2 -	Estrutura química de reagentes utilizados na síntese dos MIPs..	25
Figura 3 -	Partículas poliméricas em suspensão em solvente orgânico obtidas por polimerização por precipitação (a); e monólito de polímero obtido por polimerização em massa (b)	29
Figura 4 -	Reação de abertura do anel epóxido do monômero glicidil metacrilato	32
Figura 5 -	Estrutura da pele humana	37
Figura 6 -	Estrutura química e ionização da molécula de nicotina	39
Figura 7 -	Estrutura química da donepezila.....	50
Figura 8 -	Formulações para liberação transdérmica de nicotina baseadas em MIPs.....	77
Figura 9 -	Célula de difusão vertical: (a) representação esquemática e (b) imagem do equipamento utilizado	79
Figura 10 -	Coeficientes de partição da nicotina entre diferentes fases aquosas (tampões pH 5; 7,4; 11 e solução aquosa sem tamponamento, em que o pH final foi 9,4) e veículo óleo mineral ($n=3$)	86
Figura 11 -	Espectros de absorção obtidos por ATR-FTIR para nicotina e para o veículo óleo mineral.....	89
Figura 12 -	Espectros de absorção obtidos por ATR-FTIR para os monômeros funcionais (ácido metacrílico, AMA; 2-hidroxietilmetacrilato, HEMA; glicidil metacrilato, GMA) utilizados na síntese dos polímeros.....	90
Figura 13 -	Espectros de absorção obtidos por ATR-FTIR para o monômero EDGMA empregado como agente de ligação cruzada e seu respectivo homopolímero poli(EDGMA).....	91
Figura 14 -	Espectros de absorção obtidos por ATR-FTIR para os polímeros impressos (MIPs) sem carregamento.....	92
Figura 15 -	Espectros de absorção obtidos por ATR-FTIR para os polímeros não impressos (NIPs) sem carregamento	92
Figura 16 -	Espectros de absorção obtidos por ATR-FTIR para os polímeros impressos (MIPs) carregados com nicotina	93
Figura 17 -	Espectros de absorção obtidos por ATR-FTIR para os polímeros não impressos (NIPs) carregados com nicotina.....	93

Figura 18 -	Espectros de absorção “hotstage” obtidos por ATR-FTIR para a nicotina	94
Figura 19 -	Espectros de absorção “hotstage” obtidos por ATR-FTIR para os MIP-2 (a) e NIP-2 (b) sem carregamento com nicotina	94
Figura 20 -	Espectros de absorção “hotstage” obtidos por ATR-FTIR para os MIP-2 (a) e NIP-2 (b) carregados com nicotina	94
Figura 21 -	Imagem topográfica do MIP-1 obtida por MFA (10 x 10 μm^2).....	96
Figura 22 -	Imagem topográfica do MIP-1 obtida por MFA (5 x 5 μm^2).....	96
Figura 23 -	Imagem topográfica do NIP-1 obtida por MFA (10 x 10 μm^2)	96
Figura 24 -	Imagem topográfica do NIP-1 obtida por MFA (5 x 5 μm^2)	97
Figura 25 -	Imagens do MIP-2 (síntese 1) em dois campos diferentes obtidas por MEV (2000 x e 5000 x)	97
Figura 26 -	Imagens do MIP-2 (síntese 2) em dois campos diferentes obtidas por MEV (2000 x e 5000 x)	98
Figura 27 -	Imagens do NIP-2 em dois campos diferentes obtidas por MEV (20000 x)	98
Figura 28 -	Imagens do MIP-7 em dois campos diferentes obtidas por MEV (5000 x e 10000 x)	98
Figura 29 -	Imagens do NIP-7 em dois campos diferentes obtidas por MEV (15000 x)	99
Figura 30 -	Representação das curvas de calibração da nicotina analisadas por CLAE para a metodologia para avaliação da adsorção da nicotina. A curva extraída está apresentada em preto e a curva não-extraída em vermelho	101
Figura 31 -	Isotermas de adsorção da nicotina nos polímeros (a) MIP-2 síntese 1, (b) MIP-2 síntese 2 e (c) NIP-2. Os dados foram ajustados ao modelo de isoterma de Langmuir-Freundlich ($n=3$)	108
Figura 32 -	Perfil de liberação da nicotina a partir de formulações preparadas a partir de (A) dispersões dos polímeros (MIP-1 e NIP-1) em monoléina e óleo mineral e (B) diretamente dos veículos monoléina e óleo mineral (C1 e C2) ($n=3$).....	110
Figura 33 -	Liberação da nicotina a partir das formulações baseadas em MIPs ($n=3$)	112
Figura 34 -	Permeação cutânea <i>in vitro</i> da nicotina a partir de (A) formulações transdérmicas baseadas em MIPs e (B) formulações controle C2 (5 mg de nicotina) e C3 (10 mg de nicotina) ($n=3$).....	114
Figura 35 -	Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS em modo TIC(+) da donepezila base livre (A) e do cloridrato de donepezila e	

espectros de massas da donepezila nas formas de base livre (C) e cloridrato (D)	118
Figura 36 - Padrão de fragmentação proposto para a donepezila	118
Figura 37 - Difractogramas para caracterização das formas cristalinas das matérias-primas de donepezila	120
Figura 38 - Espectros de absorção no infravermelho do cloridrato de donepezila e da donepezila base livre	121
Figura 39 - Caracterização do cloridrato de donepezila (a) e donepezila base livre (b) por calorimetria exploratória diferencial e análise termogravimétrica	122
Figura 40 - Espectros de absorção obtidos por ATR-FTIR para os polímeros sintetizados após a lavagem	125
Figura 41 - Espectros de absorção obtidos por ATR-FTIR para os polímeros sintetizados anterior a lavagem.....	126
Figura 42 - Imagens obtidas por MFA para o MIP em campo de 20x20 μm^2 . 127	127
Figura 43 - Imagens obtidas por MFA para o NIP em campo de 20x20 μm^2 . 127	127
Figura 44 - Imagens obtidas por MEV para o MIP com aumento de 20000x. 127	127
Figura 45 - Imagens obtidas por MEV para o NIP com aumento de 20000x . 128	128
Figura 46 - Imagens obtidas por MEV para o RAM-MIP com aumento de 1000x e 5000x	128
Figura 47 - Imagens obtidas por MEV para o RAM-NIP com aumento de 5000x e 15000x	128
Figura 48 - Estrutura química da rivastigmina.....	129
Figura 49 - Isotermas de adsorção da donepezila nos polímeros a) MIP e b) NIP, avaliada em acetonitrila, com os dados ajustados aos modelos de Langmuir (vermelho) e Freundlich (azul) ($n=3$)	131
Figura 50 - Isotermas de adsorção da donepezila nos polímeros a) MIP e b) NIP, avaliada em acetonitrila na presença de rivastigmina, com os dados ajustados ao modelo não-linear de Langmuir-Freundlich ($n=3$).....	132
Figura 51 - Espectros de absorção obtidos por ATR-FTIR para o veículo ácido oleico e para as dispersões baseadas em partículas de polímeros	133
Figura 52 - Estrutura química dos veículos lipídicos ácido oleico e monoleína usados no preparo das formulações baseadas em MIPs.....	134
Figura 53 - Perfis de liberação da donepezila base livre a partir das formulações baseadas em partículas de MIPs usando o veículo ácido oleico. A razão fármaco/polímero a partir das formulações	

foi (A) 1:3, (B) 1:6 e (C) 1:18. A formulação baseada em RAM-MIP na razão fármaco/polímero 1:18 está apresentada em (D) .. 136

Figura 54 - Perfis de liberação da donepezila base livre a partir das formulações baseadas em partículas de MIPs na razão fármaco:polímero 1:6: A – MIP e NIP usando como veículo ácido oleico + 5% (m/m) de Cremophor EL; B – MIP e NIP usando como veículo ácido oleico:monoleína 1:1 (m/m), e C – RAM-MIP e RAM-NIP usando como veículo ácido oleico:monoleína 1:1 (m/m) 138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Aplicações recentes de MIPs como sistemas de liberação de fármacos na literatura	28
Tabela 2 -	Sistemas de liberação de nicotina descritos na literatura	44
Tabela 3 -	Alguns sistemas de liberação de donepezila descritos na literatura.....	53
Tabela 4 -	Síntese dos polímeros impressos pela técnica de polimerização por precipitação usando nicotina como molécula molde.....	67
Tabela 5 -	Síntese dos polímeros impressos pela técnica de polimerização por precipitação usando donepezila como molécula molde.....	74
Tabela 6 -	Formulações transdérmicas avaliadas para liberação de nicotina	78
Tabela 7 -	Formulações para liberação de donepezila baseadas em MIPs.....	82
Tabela 8 -	Coeficientes de partição da nicotina veículo/água ($n=3$)	86
Tabela 9 -	Estudos de intumescimento dos polímeros sintetizados ($n=3$). Valores expressos em porcentagem de intumescimento (%) ..	100
Tabela 10 -	Resultados obtidos na determinação da precisão do método analítico para determinação da nicotina	102
Tabela 11 -	Resultados obtidos na avaliação da diluição de amostras.....	102
Tabela 12 -	Adsorção da nicotina avaliada na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ nos polímeros ($n=3$).....	104
Tabela 13 -	Adsorção da nicotina avaliada na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ nos polímeros ($n=3$).....	106
Tabela 14 -	Modelos de isoterma de adsorção avaliados ($n=3$)	107
Tabela 15 -	Parâmetros cinéticos da curva de liberação da nicotina a partir das formulações baseadas em diferentes veículos (óleo mineral e monoleína), conforme o modelo de Higuchi ($n=3$)	111
Tabela 16 -	Parâmetros cinéticos da curva de liberação da nicotina a partir das formulações baseadas em MIPs, conforme o modelo de Higuchi ($n=3$).....	112
Tabela 17 -	Parâmetros cinéticos da curva de permeação cutânea <i>in vitro</i> da nicotina a partir das formulações baseadas em MIPs, conforme o modelo de ordem zero ($n=3$).....	115

Tabela 18 - Parâmetros cinéticos da curva de permeação cutânea <i>in vitro</i> da nicotina nas formulações controle, conforme o modelo de Higuchi ($n=3$)	117
Tabela 19 - Padrão de fragmentação da donepezila nas formas de base livre e de cloridrato usando ionização por <i>electrospray</i> em modo positivo (M^+ 380)	119
Tabela 20 - Frequências das bandas de absorção da donepezila nas formas de sal e base obtidas por espectroscopia na região do infravermelho	121
Tabela 21 - Solubilidade da donepezila (cloridrato e base livre) em diferentes veículos aquosos à temperatura ambiente ($n=3$)	123
Tabela 22 - Solubilidade da donepezila em veículos lipídicos	124
Tabela 23 - Modelos de isoterma de adsorção avaliados para donepezila em acetonitrila ($n=3$)	131
Tabela 24 - Modelos de isoterma de adsorção avaliados para donepezila em acetonitrila na presença de rivastigmina ($n=3$)	131
Tabela 25 - Parâmetros cinéticos das curvas de liberação da donepezila a partir das formulações baseadas em MIPs e veículo oleoso (ácido oleico) usando o modelo de Higuchi ($n=3$)	135
Tabela 26 - Parâmetros cinéticos das curvas de liberação da donepezila a partir das formulações baseadas em MIPs e veículo oleoso (ácido oleico) usando o modelo de Korsmeyer-Peppas ($n=3$) .	135
Tabela 27 - Parâmetros cinéticos das curvas de liberação da donepezila a partir das formulações baseadas em MIPs ($n=3$)	137

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	OBJETIVOS	20
1.1.1	Objetivo geral	20
1.1.2	Objetivos específicos	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	POLÍMEROS IMPRESSOS MOLECULARMENTE	22
2.1.1	Polimerização por precipitação	29
2.2	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	33
2.2.1	Administração transdérmica de fármacos	36
2.3	FÁRMACOS ESTUDADOS	38
2.3.1	Nicotina	38
2.3.1.1	<i>Farmacologia e importância clínica</i>	40
2.3.1.2	<i>Dispositivos transdérmicos para liberação de nicotina</i>	42
2.3.1.3	<i>Desenvolvimento de sistemas para liberação de nicotina</i>	44
2.3.2	Donepezila	49
2.3.2.1	<i>Farmacologia e importância clínica</i>	51
2.3.2.2	<i>Formulações para liberação de donepezila</i>	52
3	MATERIAL E MÉTODOS	56
3.1	PADRÕES, REAGENTES E SOLVENTES	56
3.2	EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	57
3.3	MÉTODOS	58
3.3.1	Determinação analítica da nicotina por CLAE	58
3.3.2	Determinação analítica da donepezila por CLAE	59
3.3.3	Caracterização físico-química da nicotina	59
3.3.3.1	<i>Solubilidade da nicotina no veículo</i>	59
3.3.3.2	<i>Coeficientes de partição veículo/água</i>	60
3.3.3.3	<i>Coeficiente de partição n-octanol/água</i>	60
3.3.4	Obtenção da donepezila base livre	61

3.3.5	Caracterização das matérias-primas de donepezila e ensaios de pré-formulação.....	62
3.3.5.1	<i>Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas in tandem (LC-MS/MS)</i>	62
3.3.5.2	<i>Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada</i>	62
3.3.5.3	<i>Difração de raios X</i>	63
3.3.5.4	<i>Análise térmica</i>	63
3.3.5.5	<i>Estudos de solubilidade em veículos aquosos</i>	63
3.3.5.6	<i>Estudos de solubilidade em veículos lipídicos</i>	64
3.3.5.7	<i>Coeficiente de partição veículo/água</i>	64
3.3.5.8	<i>Coeficiente de partição n-octanol/água</i>	65
3.3.6	Síntese dos polímeros pela técnica de polimerização por precipitação usando a nicotina como molécula molde.....	65
3.3.6.1	<i>Lavagem e preparação das partículas poliméricas</i>	67
3.3.6.2	<i>Abertura do anel epóxido nos copolímeros contendo GMA</i>	68
3.3.7	Caracterização dos MIPs usando nicotina como molécula molde.....	69
3.3.7.1	<i>Carregamento das partículas poliméricas para estudos de caracterização</i>	69
3.3.7.2	<i>ATR-FTIR</i>	69
3.3.7.3	<i>Avaliação da morfologia das partículas por estudos de microscopia</i>	70
3.3.7.4	<i>Estudos de intumescimento das partículas poliméricas</i>	70
3.3.7.5	<i>Estudos de adsorção da nicotina em óleo mineral</i>	71
3.3.7.6	<i>Isotermas de adsorção</i>	72
3.3.7.7	<i>Potencial zeta</i>	73
3.3.8	Síntese dos polímeros pela técnica de polimerização por precipitação usando a donepezila como molécula molde.....	73
3.3.8.1	<i>Lavagem e preparação das partículas poliméricas</i>	75
3.3.8.2	<i>Abertura do anel epóxido nos copolímeros contendo GMA</i>	75
3.3.9	Caracterização dos MIPs usando donepezila como molécula molde.....	75
3.3.9.1	<i>ATR-FTIR</i>	75
3.3.9.2	<i>Avaliação da morfologia das partículas por estudos de microscopia</i>	76

3.3.9.3	<i>Potencial zeta</i>	76
3.3.9.4	<i>Isotermas de adsorção</i>	76
3.4	FORMULAÇÕES TRANSDÉRMICAS PARA LIBERAÇÃO DE NICOTINA	77
3.4.1	Ensaio de liberação e permeação cutânea <i>in vitro</i>	78
3.4.1.1	<i>Preparo do meio receptor</i>	79
3.4.2	Estudos de liberação <i>in vitro</i>	79
3.4.3	Estudos de permeação cutânea <i>in vitro</i>	80
3.4.4	Avaliação das cinéticas de liberação e permeação cutânea <i>in vitro</i> ..	80
3.5	FORMULAÇÕES BASEADAS EM MIPS PARA LIBERAÇÃO PROLONGADA DE DONEPEZILA.....	81
3.5.1	Avaliação da liberação <i>in vitro</i> da donepezila	82
3.5.2	Avaliação da cinética de liberação <i>in vitro</i>	83
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	84
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
4.1	NICOTINA	85
4.1.1	Síntese dos polímeros	87
4.1.2	Caracterização dos polímeros	88
4.1.2.1	<i>ATR-FTIR</i>	88
4.1.2.2	<i>Potencial zeta</i>	95
4.1.2.3	<i>Avaliação da morfologia dos materiais</i>	95
4.1.2.4	<i>Estudos de intumescimento dos polímeros</i>	99
4.1.2.5	<i>Adsorção da nicotina nos polímeros</i>	100
4.1.2.6	<i>Isotermas de adsorção</i>	106
4.1.3	Desenvolvimento e avaliação das formulações	108
4.2	DONEPEZILA	117
4.2.1	Solubilidade da donepezila	122
4.2.2	Coeficiente de partição	124
4.2.3	Síntese e caracterização dos polímeros	124
4.2.3.1	<i>ATR-FTIR</i>	125
4.2.3.2	<i>Avaliação da morfologia dos materiais</i>	126
4.2.3.3	<i>Potencial zeta</i>	129
4.2.3.4	<i>Isotermas de adsorção</i>	129

4.2.4	Formulações baseadas em MIPs para liberação prolongada de donepezila	132
5	CONCLUSÃO.....	139
	REFERÊNCIAS.....	142

1 INTRODUÇÃO

Os polímeros impressos molecularmente (MIPs) são materiais com capacidade de estabelecer interações seletivas com uma molécula adicionada durante a síntese dos MIPs, denominada molécula molde (*template*). Durante a síntese, ocorre a formação de uma matriz polimérica tridimensional na presença da molécula molde. A molécula molde pode ser, por exemplo, um fármaco e é removida após a etapa de síntese. Apesar disto, o MIP ainda pode preservar a capacidade de estabelecer interações de natureza seletiva com esta molécula, uma vez que é esperada a formação de cavidades na matriz polimérica impressa que são complementares a molécula molde, também denominados sítios impressos. O formato e a posição dos grupos funcionais dos monômeros dentro da matriz polimérica podem favorecer a religação seletiva da molécula molde nos sítios impressos, sendo empregado como um material que pode adsorver o *template*. O processo de religação da molécula molde na matriz polimérica impressa é denominado reconhecimento seletivo (UMPLEBY et al., 2004; POMA; TURNER; PILETSKY, 2010).

A propriedade de reconhecimento seletivo dos MIPs é comparada à capacidade de ligação seletiva dos anticorpos a antígenos em sistemas biológicos. Diferente dos anticorpos, os MIPs são materiais sintéticos e apresentam maior estabilidade térmica e química. As propriedades de reconhecimento seletivo dos MIPs conferem aplicações avançadas a estes materiais, sobretudo na área de química analítica em técnicas de preparo de amostras (extração em fase sólida) (ABDELKADER; LOCKWOOD; SANSONGSAK, 2010), no empacotamento de colunas cromatográficas (SAMBE et al., 2006) e no desenvolvimento de sensores químicos seletivos (TAN et al., 2001). Na última década, os MIPs também vêm sendo descritos como materiais com potencial para aplicação biomédica e farmacêutica (ALVAREZ-LORENZO; CONCHEIRO, 2004; CUNLIFFE; KIRBY; ALEXANDER, 2005; KUNATH et al., 2015). Neste sentido, os MIPs têm sido avaliados como sistemas para monitoramento de substâncias em fluidos biológicos (TAN et al., 2001), no desenvolvimento de ferramentas para diagnóstico laboratorial (SHI et al., 2006) e como sistemas para liberação controlada de fármacos (MAYES et al., 2005; SUMI et al., 2010; SUEDEE et al., 2010).

Em sistemas de liberação de fármacos, os MIPs podem ser aplicados como excipientes funcionais com diferentes finalidades. Em todos os casos, a funcionalidade dos MIPs está relacionada às interações fármaco-polímero, decorrentes da adsorção seletiva de uma fração significativa do fármaco na matriz polimérica impressa. Desta maneira, os MIPs podem modificar a difusão do fármaco a partir da matriz e, conseqüentemente, modificar a cinética de liberação do fármaco e as propriedades biofarmacêuticas da formulação. Desta forma, a aplicação dos MIPs pode auxiliar a reduzir ou eliminar picos plasmáticos do fármaco que são associados aos seus efeitos adversos, bem como alcançar a liberação controlada do fármaco, auxiliando na manutenção de concentrações plasmáticas da molécula bioativa com menores flutuações. Os MIPs também podem contribuir para melhorar as propriedades técnicas da formulação, por exemplo, aumentando a estabilidade do sistema devido às interações fármaco-polímero (POMA; TURNER; PILETSKY, 2010; SILVA et al, 2011; ROSTAMIZADEH; VAHEDPOUR; BOZORGI, 2012; RUELA; FIGUEIREDO; PEREIRA, 2014; SHEYBANI et al., 2015).

MIPs podem ser sintetizados usando diferentes técnicas conforme a aplicação do material. Em muitos casos, os MIPs são sintetizados como monólitos pela técnica de polimerização em massa (*bulk*), sendo posteriormente moídos e peneirados para obtenção de micropartículas com morfologia irregular. De modo inconveniente, este procedimento de preparo das partículas pode consumir muito tempo, levar a perdas significativas de material e produzir polímeros com sítios impressos de elevada heterogeneidade (ALVAREZ-LORENZO; CONCHEIRO, 2004; CORMACK; ELORZA, 2004; UMPLEBY II, 2004; POMA; TURNER; PILETSKY, 2010). De modo alternativo, nano ou micropartículas de MIPs podem ser prontamente sintetizadas usando outras técnicas de polimerização, com destaque para a polimerização por precipitação. A técnica de polimerização por precipitação é realizada na maioria das vezes em etapa única e o material obtido pode apresentar-se como partículas com baixa polidispersão, morfologia regular, elevada área superficial e elevada capacidade de adsorção. Estas propriedades são consideradas atrativas do ponto de vista farmacêutico para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos (ALVAREZ-LORENZO; CONCHEIRO, 2004; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

Em trabalho anterior (RUELA; FIGUEIREDO; PEREIRA, 2014), foram desenvolvidos sistemas para liberação transdérmica de nicotina empregando MIPs

sintetizados em massa (*bulk*). Os resultados demonstraram que estes materiais apresentaram grande potencial para aplicação dos MIPs no controle da cinética de liberação da nicotina, devido às interações fármaco-polímero estabelecidas. Tendo em vista dar continuidade a esta linha de pesquisa e desenvolver sistemas otimizados, este trabalho busca avaliar partículas poliméricas de MIPs em escala nano e/ou micrométrica, com elevada capacidade de adsorção para administração de fármacos por diferentes vias.

Os fármacos selecionados foram a nicotina (molécula hidrofílica indicada na terapia de abandono do fumo) e a donepezila (molécula lipofílica indicada no tratamento da doença de Alzheimer). Ambos os fármacos selecionados exercem efeitos no sistema nervoso, possuem caráter alcalino e contêm grupamentos amina terciária em sua estrutura química. A seleção das moléculas foi baseada na sua diferença de polaridade, conforme o valor de coeficiente de partição óleo-água ($\log_{K_{ow}}$), sendo a donepezila um fármaco de maior caráter lipofílico enquanto a nicotina possui características hidrofílicas.

As formulações desenvolvidas para ambas as moléculas se basearam em dispersões do fármaco e das partículas poliméricas em veículos apropriados para uso farmacêutico, sobretudo veículos oleosos que podem favorecer a adsorção e o reconhecimento seletivo dos fármacos. A avaliação destes sistemas foi realizada empregando ensaios *in vitro* apropriados conforme a via de administração da formulação. Os sistemas de liberação de nicotina foram delineados para administração transdérmica, enquanto que os sistemas de liberação de donepezila foram delineados para administração oral.

1.1 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho serão apresentados a seguir.

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar sistemas para liberação de fármacos baseados em partículas de MIPs sintetizadas pela técnica de polimerização por precipitação.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Sintetizar partículas de MIPs pela técnica de polimerização por precipitação. Os fármacos nicotina e donepezila foram usados como molécula molde;
- b) Caracterizar partículas de MIPs e avaliar as interações fármaco-polímero utilizando técnicas comumente usadas em estudos de pré-formulação de fármacos e medicamentos, como espectroscopia na região do infravermelho com refletância total atenuada (ATR-FTIR), técnicas microscópicas (microscopia eletrônica de varredura, MEV, e microscopia de força atômica, MFA), medidas de potencial zeta e isothermas de adsorção do fármaco na matriz polimérica;
- c) Desenvolver sistemas para liberação transdérmica de nicotina empregando partículas de MIPs;
- d) Avaliar a liberação e permeação cutânea *in vitro* da nicotina a partir das formulações transdérmicas desenvolvidas;
- e) Desenvolver sistemas para liberação controlada (oral) de donepezila empregando partículas de MIPs;
- f) Avaliar o efeito das partículas de MIPs em controlar a cinética de liberação da donepezila a partir das formulações desenvolvidas usando metodologias *in vitro* apropriadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O desenvolvimento de sistemas de liberação baseados em MIPs exige o estudo detalhado dos polímeros e dos sistemas de liberação que podem ser formulados a partir destes materiais, incluindo a avaliação de formulações por diferentes vias de administração. Esta revisão de literatura aborda aspectos gerais relacionados à síntese dos MIPs por diferentes técnicas de polimerização, sua caracterização e avaliação, incluindo a aplicação dos MIPs como sistemas de liberação de fármacos. Considerações gerais sobre os sistemas de liberação controlada de fármacos também foram realizadas, incluindo os sistemas de liberação transdérmica e uma revisão detalhada sobre os dois fármacos selecionados para realização deste estudo, a donepezila e a nicotina.

2.1 POLÍMEROS IMPRESSOS MOLECULARMENTE

A impressão molecular é uma tecnologia capaz de produzir polímeros dotados de sítios seletivos de reconhecimento moldados estereoquimicamente a partir de uma molécula molde. A molécula molde pode ser, por exemplo, um fármaco, um marcador bioquímico ou uma molécula bioativa de interesse clínico ou analítico. A aplicação dos MIPs constitui uma ferramenta bem desenvolvida no campo analítico, principalmente no que se refere à separação e quantificação de diferentes substâncias presentes em matrizes de complexidade variável. Embora estes materiais ainda não tenham alcançado uma aplicação clínica no domínio de sistemas de liberação controlada de fármacos, vários autores destacam o grande potencial desta tecnologia no desenvolvimento de sistemas para liberação controlada de fármacos (ALVAREZ-LORENZO; CONCHEIRO, 2004; MAYES; WHITCOMBE, 2005; FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008).

Nos MIPs, a etapa de síntese ocorre após a formação de um complexo entre os monômeros funcionais e a molécula molde (Figura 1). Assim, podem ocorrer interações a partir do complexo em pontos complementares entre as diferentes moléculas. Em seguida, é adicionado um monômero multifuncional com função de agente de ligação cruzada. A reação de polimerização ocorre a partir da adição de um iniciador radicalar, que sofre clivagem química (térmica ou fotoquímica) e gera radicais livres que darão início à reação de polimerização. Entre os iniciadores

radicais pode-se citar o peróxido de benzoíla, a 2,2-azobisisobutironitrila (AIBN) e a 1,1-azobis(ciclohexano-carbonitrila) (ACHC). A polimerização radicalar livre é a técnica mais usada, porém alguns trabalhos já foram descritos empregando técnicas de polimerização controlada, como a técnica de transferência reversível de cadeia por adição-fragmentação (RAFT). A partir da geração de radicais livres, a polimerização ocorre devido às ligações covalentes que são estabelecidas a partir dos grupamentos vinílicos dos monômeros. A rede polimérica tridimensional é formada por meio do monômero multifuncional, que tem como função estabelecer ligações cruzadas entre os diferentes monômeros, formando uma matriz polimérica rígida e insolúvel (LI et al., 2010; PAN et al., 2010; POMA; TURNER; PILETSKY, 2010; ZHOU et al., 2014).

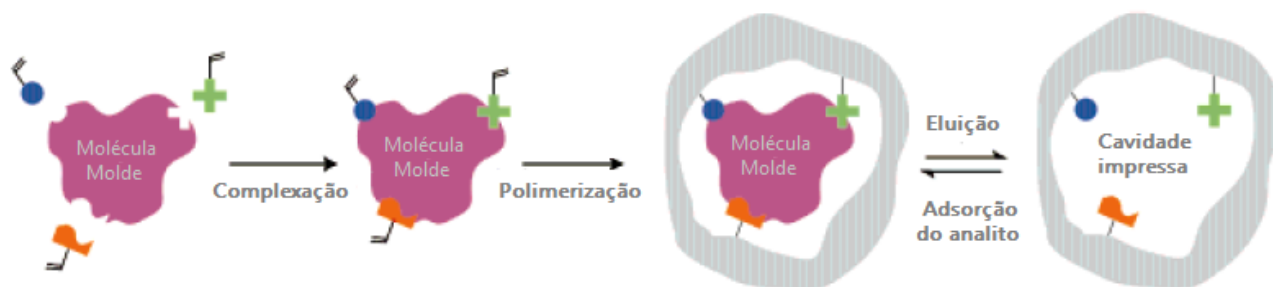


Figura 1 - Etapas da síntese dos MIPs e interações do tipo fármaco-polímero. Fonte: WHITCOMBE; VULFSON (2001, p. 467).

Durante a etapa de síntese dos MIPs, a molécula molde pode interagir com os monômeros funcionais da matriz polimérica de forma covalente ou não covalente. No primeiro caso, após a reação de polimerização, deve ser realizada a clivagem química das ligações covalentes entre monômero e molécula molde para obtenção das cavidades complementares. No segundo caso, as interações entre molécula molde e polímero são de natureza mais fraca, em geral, interações intermoleculares como ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, forças de Van der Waals. Interações eletrostáticas entre o fármaco e o polímero nas suas formas ionizadas também podem acontecer em meios aquosos. Em ambos os casos, por consequência das interações estabelecidas pelo complexo entre “monômero e molécula molde”, uma notável capacidade de religação da molécula molde é alcançada após a síntese, o que é atribuído ao arranjo complementar das cavidades

na matriz polimérica impressa que permitem o reconhecimento seletivo da molécula molde (MAYES; WHITCOMBE, 2005).

A síntese não-covalente é a estratégia de síntese mais descrita na literatura. Esta estratégia permite a remoção da molécula molde do MIP com maior facilidade e também possibilita o uso de uma grande variedade de monômeros durante a síntese. A seleção do monômero depende das características físico-químicas da molécula molde. Se a molécula molde possuir caráter básico, monômeros de caráter ácido favorecem a formação de complexos mais estáveis entre monômero e molécula molde. Na síntese covalente, a disponibilidade de monômeros é restrita e a seleção dos monômeros depende da molécula molde. A grande vantagem da síntese covalente é a obtenção de sítios mais seletivos e uniformes, porém o obstáculo de uma baixa cinética de ligação/religação da molécula-molde nas cavidades complementares da matriz polimérica dificulta a sua ampla aplicação. De modo contrário, durante a síntese não-covalente são obtidos sítios de maior heterogeneidade e flexibilidade, porém a facilidade na ligação/religação do *template* durante a aplicação do material sintetizado justifica o maior emprego desta estratégia de síntese (CORMACK; ELORZA, 2004; UMPLEBY et al., 2004).

A Figura 2 apresenta a estrutura química dos reagentes utilizados na síntese dos diferentes materiais avaliados ao longo do desenvolvimento deste trabalho (monômeros funcionais, agente de ligação cruzada e iniciador radicalar), em que MIPs “não covalentes” foram sintetizados usando monômeros acrílicos para posterior aplicação no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos.

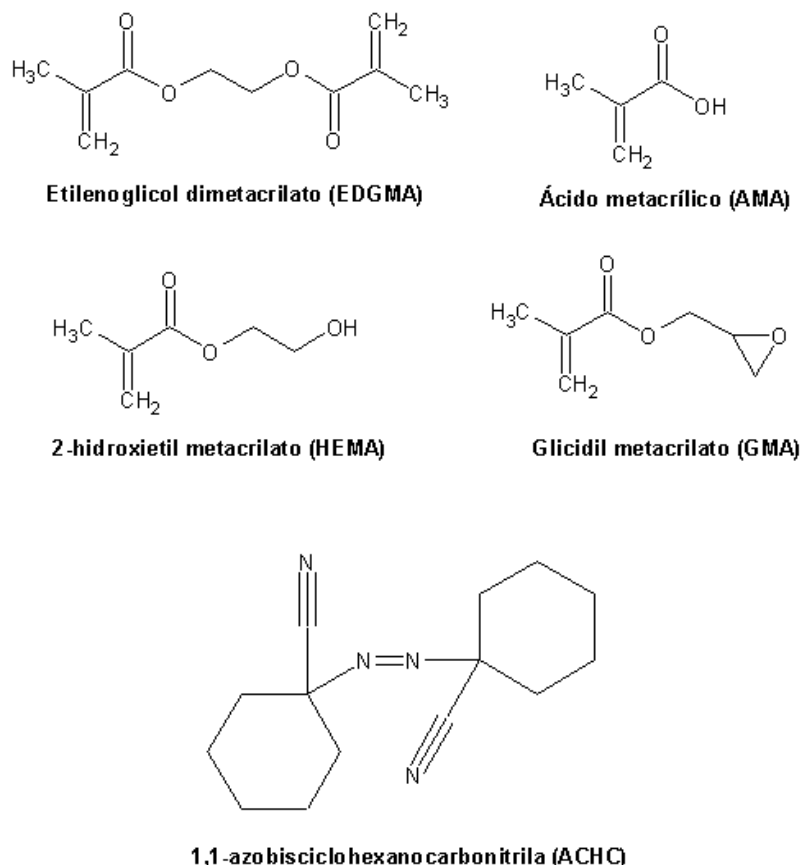


Figura 2 - Estrutura química de reagentes utilizados na síntese dos MIPs.
Fonte: Do autor.

O solvente empregado na síntese exerce grande influência no material polimérico obtido. Muitas vezes, o solvente é denominado porogênico, uma vez que uma matriz polimérica porosa é obtida após a reação de polimerização. O tipo e a quantidade de solvente, ou da mistura de solventes, também exerce grande influência nas propriedades do material poroso, além de modificar a estabilidade do complexo “monômero e molécula molde”. Por este motivo, o solvente porogênico pode modificar a seletividade dos MIPs, uma vez que a formação de complexos pré-polimerização de maior estabilidade está associada a polímeros mais seletivos. A água não é um solvente porogênico convencional, uma vez que pode estabelecer inúmeras ligações de hidrogênio com o monômero e a molécula molde e assim diminuir drasticamente a seletividade dos polímeros. Porém, em algumas técnicas de síntese, a água pode ser usada como um meio de dispersão dos reagentes, como a técnica de polimerização em suspensão. Em geral, solventes orgânicos com maior caráter apolar são indicados para a síntese de MIPs devido à menor interação

com o complexo pré-polimerização. A quantidade de solvente está na maioria das vezes relacionada à técnica de síntese. A técnica de polimerização em massa (*bulk*) pode utilizar como solvente os próprios monômeros, porém é comum acrescentar pequenos volumes de solvente no meio reacional (em torno de 10 mL) para aumentar a porosidade da matriz polimérica. O produto polimérico obtido nesta técnica é um monólito que deve ser moído e tamisado formando um particulado heterogêneo. Apesar da polimerização em massa ser amplamente utilizada, outras técnicas também vêm sendo bastante aplicadas. Estas técnicas empregam volumes maiores de solventes e, como resultado, permitem obter nano ou micropartículas que são prontamente formadas durante a síntese, dispensando etapas de moagem do monólito e reduzindo as perdas do material. Entre as técnicas de síntese para a pronta obtenção de partículas de MIPs pode-se citar a polimerização por precipitação, por suspensão em meio aquoso ou não aquoso e, recentemente, a polimerização em fluido supercrítico (JANTARAT et al., 2008; POMA; TURNER; PILETSKY, 2010; SUEDEE et al., 2010; DA SILVA et al., 2011b; ROSTAMIZADEH; VAHEDPOUR; BOZORGI, 2012). É importante considerar que independente da técnica adotada para síntese dos MIPs há numerosas variáveis a serem exploradas que podem modificar a seletividade dos polímeros, sendo difícil prever o efeito de uma variável específica na aplicação final do material. Deve-se considerar ainda que os MIPs são sintetizados usando uma determinada molécula molde e os resultados obtidos com um polímero não devem ser arbitrariamente extrapolados para avaliações de outras moléculas.

A aplicação dos MIPs como sistemas de liberação de fármacos tem sido avaliada, sobretudo, devido ao potencial das interações seletivas do tipo fármaco-polímero em modificar o perfil de liberação do fármaco. Trabalhos recentes neste campo estão descritos na Tabela 1, em que diferentes técnicas de síntese foram empregadas para obtenção dos polímeros.

Tabela 1 - Aplicações recentes de MIPs como sistemas de liberação de fármacos na literatura. (continua)

Monômero Funcional/ Agente de ligação cruzada	Técnica de síntese/ Solvente porogênico/ Iniciador	Sistema de liberação proposto	Cinética de liberação	Referência
AMA/ Metacrilamida- etil-metacrilato	Precipitação/ Acetonitrila e clorfórmio/ AIBN a 60°C	Nanopartículas magnéticas para liberação de betametasona	ND	AZODI- DEILAMI; ABDOUSS; KORDESTANI, 2014
HEMA/ EGDMA	Precipitação/ Acetonitrila/ AIBN a 60°C	Microesferas para liberação de gatifloxacina	ND	LU et al., 2014
AMA/ EGDMA	<i>Bulk</i> Diclorometano/ ABIN a 60°C	Matriz para liberação transdérmica de nicotina	Higuchi	RUELA; FIGUEIREDO; PEREIRA, 2014
Ácido itaçônico/ EGDMA	<i>Bulk</i> / Acetonitrila e tampão acetato de sódio/ ABIN a 40°C	Matrizes de argila montmorillonita modificados com silano e impressas com cloridrato de tiamina	Ritger e Peppas	ANIRUDHAN; DIVYA; NIMA, 2013
HEMA, AMA/ EGDMA	<i>Bulk</i> / Não adicionou solvente/ ABIN a 50°C	Géis hidrofílicos de 5-fluoracila	Primeira ordem	KAN; LI, 2013
AMA/ EGDMA	Mini-emulsão/ ABIN a 70°C	Nanopartículas para liberação de carbamazepina	ND	ESFANDYARI- MANESH et al., 2012
DMAEMA/ EDGMA	Fluido supercrítico (dióxido de carbono)	Partículas para liberação de ibuprofeno	Korsmeyer e Peppas	DA SILVA et al., 2011b

Tabela 1 - Aplicações recentes de MIPs como sistemas de liberação de fármacos na literatura. (conclusão)

Monômero Funcional/ Agente de ligação cruzada	Técnica de síntese/ Solvente porogênico/ Iniciador	Sistema de liberação proposto	Cinética de liberação	Referência
DMAEMA/ EDGMA	Fluido supercrítico (dióxido de carbono)	Partículas para liberação de ácido flufenâmico	ND	DA SILVA et al., 2011a
AMA/ EGDMA	Suspensão/ PMC, PFPS e clorofórmio/ ABIN a temperatura ambiente usando radiação ultravioleta (365 nm)	Partículas para liberação enantiosseletiva de S-propranolol	ND	JANTARAT et al., 2008

Fonte: Do autor.

ABIN, 2,2-azobisisobutironitrila; AMA, ácido metacrílico; DMAEMA, 2-dimetilamino-etil-meacrilato; EGDMA, etilenoglicol dimetacrilato; HEMA, 2-hidroxietilmetacrilato; ND, não determinado; PFPS, surfactante perfluorocarbono polimérico; PMC, perfluoro metilcilcohexano.

As técnicas de síntese que permitem a pronta obtenção de partículas de MIPs vêm recebendo atenção especial devido a sua potencial aplicação como sistemas de liberação controlada de fármacos. As partículas poliméricas obtidas apresentam como vantagens a possibilidade de apresentarem uma morfologia definida, elevada área superficial e alta capacidade de carregamento com fármacos. Entretanto, apesar destas vantagens, muitas vezes pode ser difícil controlar o tamanho das partículas. De qualquer forma, o aumento da área superficial das partículas é o ponto-chave das técnicas de síntese de partículas poliméricas, pois o acesso do fármaco às cavidades complementares da matriz impressa é maior. Também é relatado que a redução do tamanho das partículas impressas está associada ao aumento da homogeneidade das cavidades impressas, sendo por isso muitas vezes interessante a obtenção de partículas na escala sub-micrométrica. Neste sentido, o efeito do polímero em modificar a cinética de liberação do fármaco pode ser otimizado (DA SILVA, 2011b; EBRAHIMZADEH et al., 2013).

2.1.1 Polimerização por precipitação

A técnica de polimerização por precipitação é a mais descrita para a pronta obtenção de partículas de MIPs. Esta técnica também é amplamente utilizada para sintetizar partículas de outros tipos de polímeros, tanto em meio aquoso como em meio não aquoso. Pode-se citar nanocápsulas de polímeros acrílicos (FENG et al., 2013), nanopartículas de sílica (EFFATI; POURABBAS, 2013) e microesferas de anidrido maleico (YIN et al., 2015). A metodologia é análoga à técnica de polimerização em massa, porém volumes maiores de solventes são empregados a fim de impedir a formação de um monólito (Figura 3). É comum empregar neste caso volumes de solvente pelo menos cinco vezes maiores do que na técnica de polimerização em massa. A formação das partículas a partir da técnica de polimerização por precipitação ocorre a partir do crescimento da cadeia polimérica ao longo da reação, o que torna o polímero cada vez menos solúvel no meio até precipitar na forma de partículas insolúveis. Pode-se destacar como vantagem da técnica de polimerização por precipitação o seu maior rendimento (aproximadamente 85%) em comparação com os 50% do método de polimerização em massa (TARLEY et al., 2005).

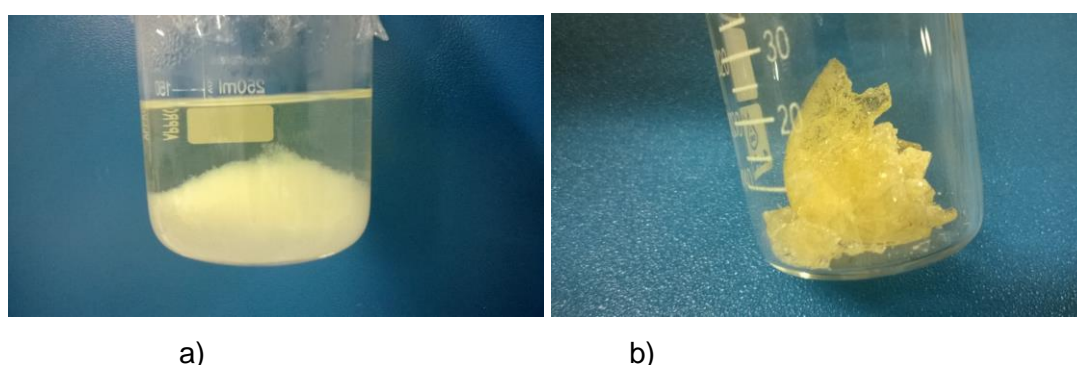


Figura 3 - Partículas poliméricas em suspensão em solvente orgânico obtidas por polimerização por precipitação (a); e monólito de polímero obtido por polimerização em massa (b).

Fonte: Do autor.

Nos protocolos de síntese de MIPs pela técnica de polimerização por precipitação, as partículas são prontamente formadas, possuindo formato esférico e tamanho de ordem nano ou micrométrica, geralmente $\leq 1 \mu\text{m}$. Em alguns casos, é possível obter partículas com baixa polidispersão (MAYES; WHITCOMBE, 2005; NAKAMURA et al., 2005; TARLEY et al., 2005; SAMBE et al., 2006)

Em seguida, serão descritos detalhadamente alguns trabalhos em que partículas de MIPs foram sintetizadas pela técnica de polimerização por precipitação e aplicadas como sistemas de liberação de fármacos.

Ciardelli e colaboradores (2004) sintetizaram nanopartículas esféricas impressas para teofilina usando ácido metacrílico (AMA) ou metacrilato de metila como monômeros funcionais e trimetilproprano trimetacrilato como agente de ligação cruzada. O solvente porogênico foi a acetonitrila. Os resultados demonstraram que o material apresentou características favoráveis para o reconhecimento molecular da teofilina e a capacidade de adsorção dos copolímeros foi variável conforme a composição dos monômeros. Os pesquisadores consideraram que as características de liberação da teofilina a partir da matriz impressa foram satisfatórias, com liberação de 95% da carga total do fármaco em 7 dias (CIARDELLI et al., 2004).

Esfandyari-Manesh e colaboradores (2011) avaliaram o reconhecimento molecular e a liberação do fármaco antitrombótico dipiridamol usando nanopartículas de MIP. O solvente porogênico foi uma mistura de acetonitrila:clorofórmio (19:1) ou clorofórmio puro. O monômero funcional selecionado foi AMA e o agente de ligação cruzada foi o trimetilolproprano trimetilmacrilato (TRIT). As partículas sintetizadas em clorofórmio apresentaram tamanho e morfologia irregular, enquanto que as partículas sintetizadas na mistura de acetonitrila e clorofórmio foram caracterizadas como nanoesferas de baixa polidispersão. A capacidade de carregamento das nanoesferas impressas foi de $67,5 \text{ mg g}^{-1}$ com tamanho de partícula de 88 nm (medidas realizadas por espectroscopia de correlação de fótons usando acetonitrila como solvente para dispersão das partículas). O polímero não impresso (NIP) apresentou tamanho de partícula maior, em escala sub-micrométrica (741 nm), e capacidade de carregamento menor ($38,0 \text{ mg g}^{-1}$). As partículas de MIP liberaram o fármaco de maneira controlada pelo período de vários dias em ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (ESFANDYARI-MANESH et al., 2011).

Rostamizadeh e colaboradores (2012) prepararam nanopartículas impressas com o antagonista opióide naltrexona. Ácido acrílico e AMA foram avaliados como

monômeros funcionais e EDGMA como agente de ligação cruzada. Os autores avaliaram o efeito dos monômeros funcionais isoladamente, não incluindo a mistura dos dois na rede polimérica. O polímero impresso apresentou maior capacidade de adsorção para a naltrexona quando o ácido acrílico foi usado como monômero funcional (75 mg g^{-1}). O carregamento do polímero usando AMA como monômero funcional foi de aproximadamente 34 mg g^{-1} . Os pesquisadores também demonstraram que as partículas de MIP apresentaram efeito significativo na modificação da cinética de liberação do fármaco (ROSTAMIZADEH; VAHEDPOUR; BOZORGI, 2012).

Seifi e colaboradores (2014) avaliaram partículas de MIP usando o analgésico de ação central tramadol como molécula molde. O monômero funcional avaliado foi o AMA e o agente de ligação cruzada o EDGMA. Os autores variaram as proporções de monômero funcional e do agente de ligação cruzada durante a etapa síntese de diferentes materiais. Diferentes solventes porogênicos também foram avaliados: clorofórmio, acetonitrila e tolueno. O tamanho de partícula dos diferentes materiais foi bastante variável (40 nm a 5 μm) conforme o solvente empregado. Os autores selecionaram um MIP sintetizado em acetonitrila com proporções praticamente equimolares de AMA e EDGMA para realizar os estudos de liberação, uma vez que este polímero apresentou maior seletividade em relação ao respectivo NIP durante os estudos de adsorção em meio aquoso. O MIP selecionado foi capaz de sustentar a liberação do tramadol em solução salina por até 30 horas (SEIFI et al., 2014).

Durante o desenvolvimento de sistemas poliméricos para liberação controlada de fármacos, algumas propriedades das partículas poliméricas podem ser modificadas, como por exemplo, as características dos monômeros empregados na síntese. A capacidade de reconhecimento molecular do MIP também pode ser modificada conforme as características dos monômeros empregados na síntese dos polímeros, como por exemplo, a afinidade pela água e a capacidade de ionização. Recentemente, o uso de comonômeros contendo grupamentos hidrofílicos que podem modificar a capacidade de inchaço do polímero em meio aquoso ou alterar as interações fármaco-polímero tem sido relatado com objetivo de modificar a cinética de liberação do fármaco (PUOCI et al., 2009).

Puoci e colaboradores (2009) propuseram a síntese de partículas de MIP usando paracetamol como molécula molde e também avaliaram a modificação superficial das partículas poliméricas usando o comonômero glicidil metacrilato

(GMA). O GMA possui um anel epóxido que pode ser aberto por meio de reação química em solução aquosa de ácido perclórico a 10% após a reação de polimerização, havendo exposição de grupamentos hidrofílicos (hidroxilas) na rede polimérica (Figura 4). O comonômero foi empregado para formar o material impresso de acesso restrito, denominado RAM-MIP.



Figura 4 - Reação de abertura do anél epóxido do monômero glicidil metacrilato.
Fonte: Do autor.

O RAM-MIP é indicado na área analítica para o preparo de amostras e análise cromatográfica. O material é empregado para avaliação de amostras complexas como fluidos biológicos, uma vez que a superfície hidrofílica (que caracteriza o RAM) atua de modo preventivo para evitar a adsorção inespecífica de proteínas, lipídeos e outras macromoléculas na superfície das partículas poliméricas. Geralmente, a adsorção de macromoléculas causa um efeito obstrutivo no polímero, levando à perda da funcionalidade do material. Conforme os resultados apresentados por Puoci et al. (2009), a capacidade de inchaço das partículas do RAM-MIP foi avaliada, demonstrando o maior caráter hidrofílico do material, com absorção de até 40% de água, enquanto o MIP absorveu apenas 7% de água. Estudos de liberação foram realizados em fluido gástrico simulado (HCl 0,1 mol L⁻¹) e fluido intestinal simulado (pH 6,8). As partículas de RAM-MIP liberaram cerca de 60% da carga de paracetamol em 5 horas, enquanto o RAM-NIP liberou aproximadamente 90% do seu conteúdo neste mesmo tempo.

2.2 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

A liberação de fármacos é um tópico de grande destaque junto às Ciências

Farmacêuticas, pois está diretamente relacionada com a modificação da biodisponibilidade *in vivo* da molécula bioativa. Os sistemas de liberação de fármacos podem explorar diferentes estratégias e materiais na busca por formulações que possam otimizar o uso clínico de um fármaco. Os MIPs oferecem uma estratégia que vem sendo estudada recentemente, porém considerações gerais sobre os sistemas de liberação devem ser previamente avaliadas antes do desenvolvimento de novas formulações (DA SILVA et al., 2011b).

A administração da maioria dos fármacos é realizada usando formulações de liberação imediata. Estas formulações têm como principal característica a liberação muito rápida do fármaco, sendo que em poucos minutos o fármaco estará na sua forma solúvel e prontamente disponível para a absorção (cerca de 85% do fármaco é liberado em 15 ou 30 minutos). Nestas formulações, o sistema atua como um suporte praticamente inerte para a substância ativa, pouco interferindo nas características de liberação. A rápida absorção do fármaco a partir destas formulações pode levar a flutuações nos níveis plasmáticos da molécula bioativa e a picos de concentração plasmática relacionados a efeitos adversos. Por outro lado, algumas formulações podem ser delineadas como sistemas especializados em que a liberação do fármaco é bem caracterizada conforme um processo cinético definido. Em geral, a liberação da substância ativa ocorre de forma gradual a partir da formulação. Neste contexto, estes sistemas especializados para liberação de fármacos podem ser denominados como sistemas de liberação controlada (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; AULTON, 2005).

Segundo Aulton (2005), os sistemas de liberação controlada de fármacos têm como principais atributos a modificação das características da formulação, sendo que cada tipo de sistema apresenta vantagens e desvantagens quanto à sua aplicação. Entre as principais características que tornam interessante o uso de sistemas de liberação controlada pode-se citar:

- a) O aumento da eficácia do fármaco, com o direcionamento da molécula ao local de ação;
- b) A redução de efeitos adversos, uma vez que o fármaco pode ser vetorizado para o sítio de ação, diminuindo seus efeitos sistêmicos;
- c) A liberação controlada do fármaco pode ser prolongada, programada ou retardada, podendo reduzir a frequência da dose e administrações noturnas;

- d) A manutenção de concentrações plasmáticas constantes, reduzindo picos de concentração;
- e) O aumento da estabilidade da formulação, protegendo o fármaco da degradação química ou biológica.

Muitos sistemas de liberação controlada são baseados em polímeros. Vários tipos de polímeros naturais ou sintéticos podem ser utilizados para esta finalidade. A grande aplicação dos polímeros deve-se, sobretudo, à variedade de materiais disponíveis e suas diferentes propriedades. Alguns exemplos das principais aplicações de polímeros como sistemas de liberação podem ser citados (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010; ZHANG; CHAN; LEONG, 2013), conforme:

- a) O encapsulamento de fármacos usando copolímeros biodegradáveis de ácido lático e ácido glicólico;
- b) A modificação da viscosidade usando copolímeros em bloco de polietileno e polioxietileno (Pluronic®) ou carbômeros derivados do ácido acrílico (Carbopol®);
- c) O uso de polímeros bioadesivos catiônicos (quitosana), aniônicos (derivados do ácido acrílico, como os carbômeros e o policarbofil) e não iônicos (derivados de celulose como a hidroxipropilmetilcelulose);
- d) A formação de filmes de revestimento usando metacrilatos (Eudragit®);
- e) O uso de copolímeros de etileno e acetato de polivinila (CoTran®) para formação de membranas em sistemas de liberação transdérmicos;
- f) O uso de polímeros anfífilicos como agentes emulsificantes que formam arranjos do tipo micelar, como derivados de carbômeros (Pemulen®) e copolímeros em bloco de polietileno e polioxietileno (Poloxamer®),
- g) O uso de derivados da celulose (Methocel®, Ethocel®, Cellosize®, Aquacoat®) em diferentes sistemas de liberação como géis, sistemas osmóticos, sistemas que sofrem degradação/erosão, matrizes hidrofílicas e na produção de agentes de revestimentos.

Quanto à liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos, o coeficiente de difusão de um fármaco através do polímero pode ser influenciado por vários parâmetros da matriz polimérica, como: densidade de reticulação, grau de

ramificação, grau de cristalinidade, tamanho das zonas cristalinas, carga elétrica (iônicos, não-iônicos, anfóteros) e capacidade de intumescimento. Em geral, nos sistemas poliméricos o fármaco está incorporado em uma matriz ou revestido por uma membrana. Em ambos os casos, a liberação segue o mesmo curso: a água difunde-se pela matriz ou membrana, o fármaco é dissolvido e a fração solúvel se difunde para fora da rede polimérica. Em muitos casos, a difusão do fármaco em polímeros não é adequadamente descrita pela Lei de Fick ou expressões derivadas como a Lei de Noyes-Whitney. Estas equações são apropriadamente empregadas para descrever a liberação do fármaco a partir de formulações de liberação imediata em que o fármaco é dissolvido e liberado rapidamente. Os sistemas poliméricos se diferem principalmente devido ao aumento do volume em alguns sistemas (denominado intumescimento), como o caso de polímeros plásticos, que tendem a não seguir a Lei de Fick, seguindo um comportamento anômalo ou não-Fickiano. Por outro lado, polímeros elastoméricos, que são reticulados e resistem à deformação, tendem a seguir a Lei de Fick. Assim, no desenvolvimento de sistemas de liberação poliméricos deve-se avaliar o ajuste dos dados obtidos a partir de estudos de liberação *in vitro* a diferentes modelos matemáticos (ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, entre outros). Deste modo, é possível a caracterização do mecanismo de liberação, sendo que muitas vezes mecanismos diferentes podem coexistir em um mesmo sistema de liberação. Desta forma, deve-se reconhecer que a biodisponibilidade do fármaco está intimamente relacionada à cinética de liberação a partir da formulação, tendo a formulação um papel decisivo na modulação dos níveis plasmáticos da molécula ativa (COSTA; LOBO, 2001; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; PEPPAS; NARASIMHAN, 2014).

Apesar de muito aplicados como sistemas de liberação, os polímeros apresentam limitações como materiais de interesse farmacêutico. Algumas considerações devem ser realizadas quanto à presença de produtos de degradação, solventes e reagentes residuais da síntese. A biocompatibilidade, bioadesão e biodegradabilidade do polímero são outros pontos importantes ao se considerar a aplicação farmacêutica de um dado material. Estas considerações são ainda mais importantes dependendo da invasividade da via selecionada para administração das formulações (AULTON, 2005; CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014).

Neste trabalho, os MIPs foram aplicados para o desenvolvimento de formulações administradas pelas vias oral e transdérmica. Os MIPs podem ser

empregados como excipientes funcionais em diferentes formulações devido às interações fármaco-polímero que podem ser estabelecidas. A partir destas interações e das propriedades do próprio material polimérico é possível explorar a aplicação dos MIPs no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada.

2.2.1 Administração transdérmica de fármacos

A rota transdérmica é caracterizada pela absorção de fármacos através da pele, de modo a alcançar concentrações sistêmicas efetivas. A administração de fármacos através da pele pode apresentar diversas vantagens. É possível alcançar a liberação controlada e/ou prolongada do fármaco, evitar oscilações nas concentrações plasmáticas e reduzir a incidência de efeitos indesejáveis associados aos picos de concentração. Além disso, a rota transdérmica é uma alternativa segura em relação à via oral para fármacos que apresentam baixa biodisponibilidade devido à absorção irregular no trato gastrintestinal, ao metabolismo hepático de primeira-passage e ao tempo de meia-vida plasmática curto e com intervalos reduzidos entre doses (BARRY, 2001; PRAUSNITZ; LANGER, 2009; ALEXANDER et al., 2012; SELZER et al., 2013).

Outras vantagens da administração transdérmica de fármacos são o aumento da adesão do paciente ao tratamento pela maior facilidade de utilização e, quando necessário, o tratamento pode ser interrompido pela simples remoção do dispositivo. A rota transdérmica também é uma alternativa às injeções hipodérmicas, evitando o uso de uma via invasiva, com administração dolorosa e que expõe o paciente a riscos (BARRY, 2001; PRAUSNITZ; LANGER, 2009; ALEXANDER et al., 2012).

Fármacos candidatos à administração transdérmica devem apresentar preferencialmente algumas características relacionadas às suas propriedades físico-químicas, interações com a pele (como o coeficiente de permeabilidade, K_p) e propriedades farmacocinéticas. As propriedades físico-químicas ideais de uma molécula para penetrar no estrato córneo são: baixa massa molar, em geral, menor que 1000 Dalton; solubilidade adequada em lipídeos e água, bem como no veículo da formulação; coeficiente de partição *n*-octanol-água ($\log K_{ow}$) em torno de 2, considerando como regra geral $\log K_{ow} < 5$, de modo a evitar retenção cutânea; baixo ponto de fusão (< 200 °C), correlacionando com boa solubilidade como predito pela teoria da solubilidade ideal (KALIA; GUY, 2001; MOSER et al., 2001;

FARAHMAND; MAIBACH, 2009; OBATA et al., 2010; ALEXANDER et al., 2012).

Devido às suas características de barreira e impermeabilidade, o estrato córneo torna-se a camada limitante da velocidade de permeação da maior parte das moléculas através da pele. A estrutura da pele humana está apresentada na Figura 5. Promotores químicos atuam na pele, em geral, nos lipídeos e proteínas do estrato córneo e nas demais camadas da pele, aumentando a permeabilidade do tecido de modo reversível. Alguns exemplos típicos de promotores químicos são os alcoóis, ácidos graxos saturados e insaturados, tensoativos, propilenoglicol, azona, dimetilsulfóxido, miristato de isopropila, 2-pirrolidona e *N*-metil-2-pirrolidona (FARAHMAND; MAIBACH, 2009; CEVC; VIERL, 2010; ALEXANDER et al., 2012; JEPPS et al., 2012; ANISSIMOV et al., 2013; CHEN; HAN; LIAN, 2013; NOTMAN; ANWAR, 2013).

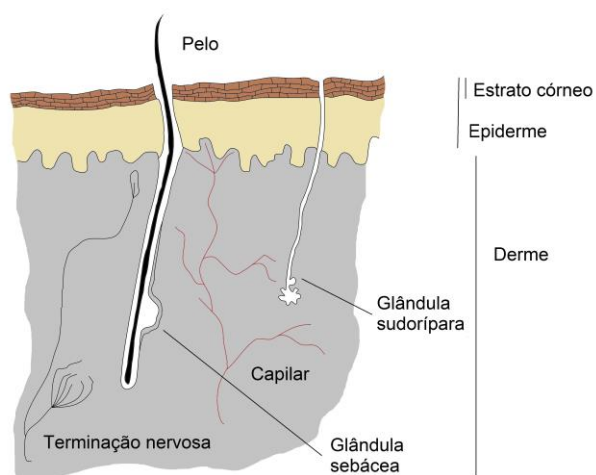


Figura 5 - Estrutura da pele humana.
Fonte: Do autor.

Atualmente, buscam-se novas estratégias no desenvolvimento de dispositivos transdérmicos mais eficientes. Diversos avanços foram alcançados na permeação cutânea de fármacos com diferentes tamanhos moleculares e propriedades físico-químicas. Tais avanços devem-se em grande parte ao emprego de promotores químicos e físicos de permeação cutânea. Porém, além de estudar a promoção da permeação cutânea, existe muito interesse em estudar tecnologias que também possam permitir maior controle da velocidade da liberação do fármaco a partir de um

dispositivo transdérmico. Neste contexto, é interessante o desenvolvimento de formulações transdérmicas que controlem a liberação do fármaco com alta eficiência, diminuindo os efeitos da pele, sobretudo do estrato córneo, em controlar a velocidade de liberação do fármaco (MOSER et al., 2001; EL MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008; PRAUSNITZ; LANGER, 2009; ALEXANDER et al., 2012).

2.3 FÁRMACOS ESTUDADOS

Os fármacos selecionados neste estudo foram a donepezila e a nicotina, ambas moléculas de caráter básico e que possuem grupamentos ionizáveis, notadamente aminas terciárias. Considerando-se que enquanto a donepezila apresenta caráter lipofílico, a nicotina é um fármaco hidrofílico. Neste sentido, este estudo considerou o desenvolvimento de sistemas de liberação baseados em MIPs a partir da incorporação de fármacos com diferentes propriedades físico-químicas.

2.3.1 Nicotina

A nicotina, 3-(1-metil-2-pirrolinidil)-piridina, é um alcaloide extraído das folhas do tabaco (*Nicotiana tabacum L.*). Apresenta-se como base volátil no estado líquido à temperatura ambiente, coloração amarela pálida, higroscópica, bastante solúvel em água, álcoois e óleos, que se torna acastanhada e adquire o odor de tabaco quando exposta ao ar. Quimicamente, a nicotina é uma amina terciária e aromática de caráter anfifílico ($\log_{K_{ow}} = 1,17$), possuindo dois grupamentos ionizáveis, uma piridina e um anel pirrolidona, com valores de pK_a de, respectivamente, 3,04 e 7,84 (Figura 6). O fármaco é considerado a molécula modelo da rota transdérmica devido a sua alta permeabilidade através da pele íntegra e tem sido o fármaco mais estudado por esta via de administração (NAIR et al., 1997; BENOWITZ; HUKANNEN; JACOB III, 2009; FARAHMAND; MAIBACH, 2009; PONGJANYAKUL; SUKSRI, 2009; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011; WATKINSON, 2013).

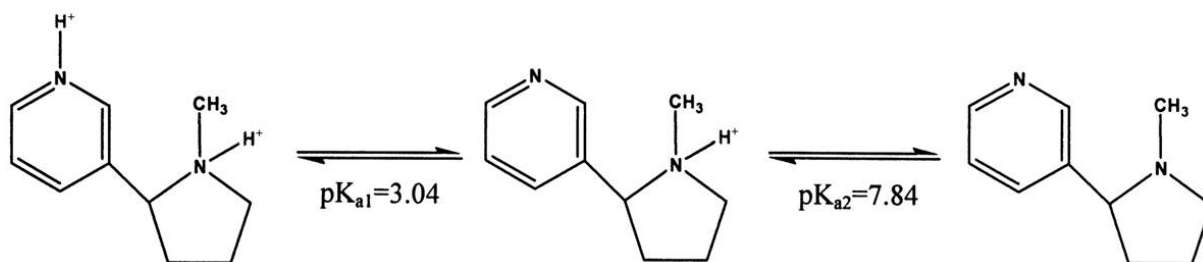


Figura 6 – Estrutura química e ionização da molécula de nicotina ($C_{10}H_{14}N_2$, Massa molar = $162,23 \text{ g mol}^{-1}$; CAS no. 54-11-5).

Fonte: PONGJANYAKUL; KHUNAWATTANAKUL; PUTTIPIPATKHACHORN (2009, p. 243).

Apesar de ser considerada a molécula modelo para a administração transdérmica, muitas dificuldades são relatadas durante o desenvolvimento de *patches* de nicotina, o que se deve principalmente à volatilidade do fármaco e a sua incompatibilidade química e física com muitos materiais convencionais utilizados no processo de fabricação. Muitos materiais podem ser dissolvidos ou degradados na presença da nicotina, indicando incompatibilidades físicas e químicas, respectivamente. Como exemplo, polímeros adesivos acrílicos ou à base de silicone podem tornar-se pegajosos, perderem as suas propriedades adesivas ou serem carregados excessivamente com a nicotina, ocasionando um efeito *burst* durante a liberação. Vários polímeros policarbonatos, poliestirenos, politereftalato de etileno, polibutiratos, cloreto de polivinila e poliuretanos podem sofrer problemas como inchaço excessivo, desintegração e completa dissolução na presença de nicotina. Por outro lado, muitos polímeros podem resistir ao ataque físico ou químico da nicotina, porém estes materiais apresentam alta permeabilidade ao fármaco, não permitindo a retenção da nicotina na formulação, que passa a ser liberada rapidamente. Neste caso, podem ser citados os filmes constituídos de copolímeros de estireno-acetato de vinila com baixas porcentagens de acetato de vinila que, apesar de não sofrerem ataque químico da nicotina, são altamente permeáveis ao fármaco, não tendo efeito significativo no controle da velocidade de liberação do fármaco (BAKER, KOCHINKE, HUANG, 1990; DAVARAN et al., 2005).

O estudo de formulações transdérmicas para liberação controlada de nicotina é de grande interesse, pois ainda não estão disponíveis comercialmente sistemas para liberação do fármaco por período superior a 24 horas. Neste sentido, é interessante explorar novos materiais como sistemas de liberação de nicotina, o que

inclui os MIPs. MIPs usando nicotina como *template* têm sido descritos para fins analíticos. Já foram descritos MIPs sintetizados pela técnica de polimerização em massa (TAN et al., 2001; YANG et al., 2007, FIGUEIREDO et al., 2009; ABDELKADER; LOCKWOOD; SANSONGSAK, 2010), polimerização por precipitação (SAMBE et al., 2006), polimerização direta na superfície de eletrodos de titânio (WU et al., 2009) e também MIPs sintetizados por técnicas de polimerização controlada (ZHOU et al., 2014).

Em estudo anterior (RUELA; FIGUEIREDO; PEREIRA, 2014), sistemas inovadores para liberação transdérmica de nicotina baseados em MIPs sintetizados pela técnica de polimerização em massa apresentaram resultados promissores para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. Estes materiais apresentaram estabilidade física e química na presença do fármaco e permitiram controlar a sua velocidade de liberação e permeação cutânea por até 24 horas.

2.3.1.1 *Farmacologia e importância clínica*

A nicotina tem considerável importância clínica em virtude de sua toxicidade, presença no tabaco e tendência a produzir dependência nos usuários. O fármaco atua nos receptores colinérgicos nicotínicos que são encontrados no cérebro, gânglios autônomos e junções neuromusculares. A variação na estrutura e função dos receptores nicotínicos ajuda a explicar a diversidade dos efeitos da molécula, relacionados à liberação de vários neurotransmissores como serotonina, acetilcolina, beta endorfina, entre outros. A dependência à nicotina e o seu efeito fisiológico de recompensa são fortemente ligados à liberação de dopamina, porém a liberação de outros neurotransmissores pode contribuir com este efeito (ZEVIN; GOURLAY; BENOWITZ, 1998; BENOWITZ; HUKKANEN; JACOB III, 2009)

A nicotina é usada como agente terapêutico em muitas formas farmacêuticas como *patches* transdérmicos, *sprays* nasais, inaladores, comprimidos sublinguais e gomas de mascar, todos indicados como auxiliar na terapia para cessação do tabagismo e diminuição do desejo de fumar. Outras aplicações para esta molécula vêm sendo estudadas, como o seu papel na doença de Alzheimer, doença de Parkinson e colite ulcerativa (WILSON et al., 1995; CHENG et al., 2002; WHITE; LEVIN, 2004; BENOWITZ; HUKKANEN; JACOB III, 2009).

Em geral, a absorção da nicotina pode ser rápida na pele e mucosas devido

às características da molécula favoráveis à permeação, porém existe uma dependência do pH do tecido e do pH do sistema de liberação. Por exemplo, na forma ionizada, em meios ácidos, a nicotina apresenta menor capacidade de atravessar membranas. Enquanto isso, em pH alcalino, a forma molecular do fármaco é rápida e extensamente absorvida (LEWIS; PAULO; FAUSTINO, 1997; NAIR et al., 1997; GORE; CHIEN, 1998; ZEVIN; GOURLAY; BENOWITZ, 1998; TYNDALE; SELLERS, 2001; OLIVIER; RABOUAN; COUET, 2003; BENOWITZ; HUKKANEN; JACOB III, 2009)

Existem dois enantiômeros da nicotina: o isômero ativo *S*-nicotina, correspondente à forma levógira (-), presente no tabaco, com maior afinidade de ligação pelos receptores colinérgicos nicotínicos, e o isômero *R*-nicotina, forma dextrógira (+), não encontrada na natureza, sendo somente um fraco agonista destes mesmos receptores. Durante o ato de fumar, pode haver alguma racemização da molécula, com exposição do fumante a pequenas quantidades de *R*-nicotina (ZEVIN; GOURLAY; BENOWITZ, 1998).

Formulações de *sprays* nasais proporcionam a absorção mais rápida da nicotina, alcançando picos plasmáticos em cerca de 10 minutos após a aplicação. As gomas de mascar, contendo de 2 a 4 mg de nicotina, produzem um perfil plasmático caracterizado por absorção mais lenta, alcançando um pico plasmático em torno de 30 minutos, sendo a absorção do fármaco através da mucosa bucal incompleta e irregular. Na maioria dos estudos clínicos, formulações de gomas de mascar apresentam elevada variabilidade interindividual (NAIR et al., 1997; NIAURA et al., 2005; SHIFFMAN et al., 2009).

Os níveis plasmáticos de nicotina em fumantes variam durante o dia na faixa de 10 a 37 ng mL⁻¹, com picos plasmáticos entre 19 e 50 ng mL⁻¹. O aumento na concentração de nicotina após o fumo de um cigarro varia de 5 a 30 ng mL⁻¹, dependendo do modo como o cigarro é fumado. As concentrações alcançadas durante o uso de *sprays* nasais, inaladores, comprimidos sublinguais e gomas de mascar variam de 10 a 15 ng mL⁻¹. Considera-se baixa a ligação da nicotina às proteínas plasmáticas, em torno de 5%, sendo o volume de distribuição do fármaco aproximadamente 2,6 L kg⁻¹ (BENOWITZ; HUKKANEN; JACOB III, 2009; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011).

Gupta e colaboradores (1993) avaliaram a farmacocinética absoluta da nicotina em voluntários humanos após uma infusão intravenosa contínua de

bitartarato de nicotina diidratado na forma deuterada ($0,2 \mu\text{g min}^{-1} \text{kg}^{-1}$). Os autores determinaram que, pelo modelo monocompartmental, a meia-vida de eliminação da molécula de nicotina por infusão intravenosa foi de 2,0 horas, com *clearance* de $80,3 \text{ L.h}^{-1}$ ($\pm 29\%$). A área sob a curva para a administração de infusão intravenosa determinada até o infinito ($\text{AUC}_{0-\infty}$) foi de 299 ng.h/mL . Estima-se que somente 5 a 10% deste valor corresponda à contribuição do *clearance* renal do fármaco, sendo o metabolismo da nicotina predominantemente hepático. Cerca de 70% do fármaco biotransformado é convertido a cotinina por via oxidativa do citocromo P450 isoenzima CYP2A6 (GUPTA et al., 1993; TYNDALE; SELLERS, 2001).

É importante mencionar que a biodisponibilidade oral da nicotina é de cerca de 20 a 35%, principalmente devido ao extenso metabolismo pré-sistêmico. Em relação à toxicidade da molécula, a dose letal de nicotina em adultos encontra-se na faixa entre 40 e 60 mg, sendo que concentrações sanguíneas maiores que $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ podem ser fatais (BENOWITZ; HUKKANEN; JACOB III, 2009; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011).

2.3.1.2 Dispositivos transdérmicos para liberação de nicotina

Nos Estados Unidos, o FDA aprovou no início dos anos 1990 quatro diferentes dispositivos transdérmicos contendo nicotina em diferentes dosagens (Nicoderm®, Habitrol®, Prostep®, e Nicotrol®). Estes dispositivos são produzidos com diferentes materiais e tecnologias, sendo indicados para utilização por 16 a 24 horas, com doses liberadas de 7 a 21 mg em 24 horas. Para liberar uma dose menor de nicotina, os fabricantes realizam a diminuição da área do dispositivo transdérmico sem alterar as características de liberação da formulação (GORE; CHIEN, 1998; DEVEAUGH-GEISS et al., 2010; WATKINSON, 2013).

O tratamento consiste na aplicação diária de um adesivo transdérmico durante 4 a 8 semanas, a fim de fornecer uma dose ajustada ao nível de dependência. A partir da dose inicial é realizada a redução gradual da dose diária de nicotina a cada 2 a 4 semanas, utilizando um adesivo transdérmico de dose menor (OLIVIER; RABOUAN; COUET, 2003).

Dos sistemas aprovados, o Nicoderm® (fabricado pela ALZA Corporation e comercializado no Brasil com o nome comercial NiQuitin®) é caracterizado como um dispositivo do tipo reservatório e membrana, sendo esperado um perfil de liberação

linear ou ordem zero. Entretanto, ocorre acúmulo de nicotina na camada adesiva durante a estocagem, sendo que durante o início do processo de liberação pode-se esperar uma cinética de Higuchi. O perfil de liberação dos outros três produtos é expresso como cinética de Higuchi, característico da difusão a partir da matriz polimérica (GORE; CHIEN, 1998; DEVEAUGH-GEISS et al., 2010; RUELA et al., 2013). Entre os dispositivos matriciais, pode-se mencionar o Habitrol® (fabricado pela Novartis Consumer Health Inc e comercializado no Brasil com o nome comercial Nicotinell®), que inclui no conteúdo uma solução de nicotina e copolímero de ácido metacrílico dispersa em um disco de algodão e viscose, sobre o qual é incluída uma camada de material adesivo (LEWIS; PAULO; FAUSTINO, 1997).

Apesar de os estudos de liberação demonstrarem que os *patches* comerciais apresentam uma cinética de Higuchi, pode-se esperar que durante os estudos de permeação cutânea os dispositivos apresentem uma cinética de ordem zero. Isto é explicado devido ao efeito de barreira da pele, que em alguma extensão regula o fluxo da nicotina apesar da elevada permeabilidade da molécula (OLIVIER; RABOUAN; COUET, 2003; RUELA et al., 2013). Para os *patches* transdérmicos, a liberação inicial da nicotina é lenta, alcançando um *steady-state* após cerca de 4 horas com manutenção de concentrações plasmáticas dentro da faixa terapêutica por até 24 horas (GORE; CHIEN, 1998; ZEVIN; GOURLAY; BENOWITZ, 1998).

A velocidade de liberação da nicotina e as concentrações plasmáticas alcançadas utilizando dispositivos transdérmicos podem ser muito variáveis entre diferentes fabricantes, com biodisponibilidade variável de 68 a 98% (em relação à quantidade absorvida do total de fármaco liberado). Em geral, existe um *lag time* de aproximadamente 1 hora antes de a nicotina alcançar a corrente sanguínea, e a absorção sistêmica pode continuar após a remoção do dispositivo, o que se deve à quantidade residual de fármaco retido na estrutura da pele. As reações adversas mais citadas relacionadas ao uso transdérmico de nicotina são irritação local, coceira e eritema. Todas estas reações são citadas como brandas ou moderadas e, na maioria dos casos, dependentes da concentração de nicotina no dispositivo transdérmico (GUPTA et al., 1993; WOLF; TÜZÜN; TÜZÜN, 1998).

Durante a terapia de reposição de nicotina, os níveis plasmáticos tendem a ser menores do que as concentrações plasmáticas em fumantes. No estado estacionário, as concentrações plasmáticas de nicotina alcançadas usando *patches* variam de 10 a 20 ng.mL⁻¹, conforme a dose de nicotina liberada a partir do

dispositivo (BENOWITZ; HUKKANEN; JACOB III, 2009).

2.3.1.3 Desenvolvimento de sistemas para liberação de nicotina

Na literatura, diversos estudos abordaram o desenvolvimento e a avaliação de sistemas para liberação de nicotina (Tabela 2). É importante considerar que estes estudos abordam sistemas baseados em diferentes materiais e vias de administração, destacando-se a importância da adequada seleção dos materiais conforme o sistema a ser desenvolvido e o perfil de liberação esperado. Neste sentido, considera-se que formulações para liberação controlada da nicotina têm apresentado um desenvolvimento difícil devido às propriedades físico-químicas da molécula, pois é líquida à temperatura ambiente, sendo considerada uma amina terciária volátil, e apresenta incompatibilidades físicas e químicas com muitos materiais comumente utilizados no desenvolvimento de dispositivos transdérmicos (BAKER, KOCHINKE, HUANG, 1990; DAVARAN et al., 2005).

Tabela 2 - Sistemas de liberação de nicotina descritos na literatura.

(continua)

Sistema de liberação	Via de administração	Considerações	Referências
Micropartículas mucoadesivas de quitosana e silicato de alumínio e magnésio	Mucosa bucal	Interações eletrostáticas entre nicotina e os silicatos permitiram o carregamento das partículas, que apresentaram um perfil de liberação conforme a cinética de Higuchi por até 8 horas.	KANJANAKAWINKUL et al., 2013
Filmes mucoadesivos de quitosana e silicato de alumínio e magnésio	Mucosa bucal	A nicotina foi apropriadamente incorporada nos filmes. O fármaco foi liberado rapidamente conforme cinética de Higuchi, alcançando platô após 30 minutos.	PONGJANYAKUL et al., 2013

Tabela 2 - Sistemas de liberação de nicotina descritos na literatura.

(continuação)

Sistema de liberação	Via de administração	Considerações	Referências
Sistema contendo membrana de nanotubos de carbono funcionalizados com grupamentos aniônicos. O fármaco foi incorporado em gel de hidroxietilcelulose 2% p/v	Transdérmica	Liberação realizada em célula de difusão acoplada a eletrodos, sendo a liberação regulada pela corrente elétrica aplicada. Na ausência de corrente elétrica observou-se um fluxo eletrosmótico lento da nicotina	WU et al., 2010
Complexos de nicotina com silicatos de alumínio e magnésio	Não especificado	A nicotina foi adsorvida com sucesso nas partículas de silicato em diferentes valores de pH. Grande quantidade do fármaco (70%) foi liberada rapidamente devido ao efeito <i>burst</i> . Os autores sugeriram que a adsorção da nicotina nas partículas poderia aumentar a estabilidade da molécula, porém as partículas não apresentaram potencial intrínseco para controlar a liberação da nicotina, podendo ser incorporadas em outros sistemas como um reservatório para o fármaco	PONGJANYAKUL; KHUNAWATTANAK UL; PUTTIPIPATKHACHORN, 2009
Complexos de nicotina e silicatos de alumínio e magnésio em filmes do polímero aniônico alginato de sódio	Mucosa bucal	Sistema biocompatível com liberação controlada por difusão. As partículas incorporadas nos filmes de alginato interagiram com a nicotina formando microreservatórios para o fármaco	PONGJANYAKUL; SUKSRI, 2009

Tabela 2 - Sistemas de liberação de nicotina descritos na literatura.

(continuação)

Sistema de liberação	Via de administração	Considerações	Referências
Matriz preparada por compressão contendo diferentes polímeros (hidroxietilcelulose, alginato e copolímeros de ácido lático e glicólico)	Implante cerebral para tratamento da doença de Parkinson	Partículas de hidroxietilcelulose e alginato foram preparadas por gelificação ionotrópica. Observou-se efeito <i>burst</i> inicial, seguido de um processo de liberação multifásico. A liberação da nicotina pode ser controlada por 21 dias.	CHOONARA et al., 2009
Matriz polimérica de poli(caprolactona)	Não especificado	Os sistemas foram carregados com cafeína e nicotina. A liberação seguiu a cinética de Higuchi, sendo a cafeína liberada por 25 dias, enquanto que a nicotina foi totalmente liberada em 9 dias. Observou-se efeito <i>burst</i> na liberação da nicotina com liberação inicial de cerca de 60% do fármaco	ROSENBERG; SIEGEL; DAN, 2008
Micropartículas porosas de polímeros biodegradáveis de ácido lático e copolímero de ácido lático e glicólico	Implante cerebral (indicado para tratamento da doença de Alzheimer)	Observou-se efeito <i>burst</i> com liberação rápida do fármaco em aproximadamente 30 minutos. Os resultados esperados não foram alcançados no trabalho, pois a liberação da nicotina a partir das formulações alcançou um platô após aproximadamente 2 horas	SINGH et al., 2006
Reservatório composto de um gel de carbopol e membrana de polietileno	Transdérmica	Cinética de ordem zero (24 h), sendo que a inclusão de propilenoglicol nas formulações aumentou o fluxo transdérmico	TIRNAKSIZ; YUCE, 2005

Tabela 2 - Sistemas de liberação de nicotina descritos na literatura.

(continuação)

Sistema de liberação	Via de administração	Considerações	Referências
Formulações baseadas em gel de hidroxipropil metilcelulose administradas na forma liofilizada	Nasal	As formulações com potencial bioadesivo apresentaram liberação controlada pelo processo de difusão por até 4 horas. Estudos <i>in vivo</i> confirmaram a modificação do perfil plasmático da nicotina a partir das formulações	MCINNES et al., 2005
Reservatório contendo gel de carbopol, propilenoglicol e complexos de inclusão β -ciclodextrina com nicotina, incluindo uma membrana de PVA resistente ao ataque químico da nicotina	Transdérmica	Estudos de permeação cutânea demonstraram cinética de ordem zero da nicotina por 48 horas. A liberação da nicotina foi controlada devido a dissociação dos complexos de inclusão β -ciclodextrinas contendo o fármaco	DAVARAN et al., 2005
Comprimidos mucoadesvios baseados em hidroxipropilmetilcelulose, ácido algínico e Carbopol 974P	Mucosa bucal	As formulações foram avaliadas em célula de difusão, com liberação controlada por difusão Fickiana por até 8 horas	İKINCI et al., 2004

Tabela 2 - Sistemas de liberação de nicotina descritos na literatura.

(continuação)

Sistema de liberação	Via de administração	Considerações	Referências
Comprimidos mucoadesivos baseados em Carbopol-934 e hidroxipropilcelulose	Mucosa bucal	O Carbopol 934 apresentou maior potencial como polímero bioadesivo e a hidroxietilcelulose apresentou maior efeito para controlar a liberação do fármaco. Em geral, as formulações liberaram o fármaco pelo processo de difusão não-Fickiana por um período de até 4 horas	PARK; MUNDAY, 2002
Resinas de troca iônica (Amberlite IRP69 e IR120)	Nasal	Liberação <i>in vitro</i> foi controlada por difusão, por período inferior a 3 horas. Estudos <i>in vivo</i> mostraram que o T _{máx} foi alcançado de 15 a 35 minutos	CHENG et al., 2002
Prolipossomos preparados a partir de lecitina de ovo e sorbitol, que formam lipossomos em contato com água	Nasal	Os sistemas para liberação prolongada de nicotina foram preparados com tartarato de nicotina, sendo demonstrado que concentrações plasmáticas do fármaco foram mantidas constantes por mais de 6 horas	JUNG et al., 2000
Supositórios preparados em uma base de monoglicérides saturados (C12 a C18) avaliando o efeito da monoleína e carbopol nas características de liberação	Retal para tratamento da colite ulcerativa	As formulações contendo monoleína apresentaram liberação mais rápida da nicotina, em torno de 4 horas, em comparação com as formulações de Carbopol 934 e 974, com liberação em torno de 6 a 8 horas. A liberação do fármaco foi dependente dos mecanismos de difusão e erosão da matriz lipídica	DASH et al., 1999

Tabela 2 - Sistemas de liberação de nicotina descritos na literatura.

(conclusão)

Sistema de liberação	Via de administração	Considerações	Referências
Formulações baseadas em carbômeros e incluídas em cápsulas revestidas com Eudragit L	Formulação de administração oral para liberação no cólon para tratamento de colite ulcerativa	Os autores realizaram estudos in vivo, com o $T_{máx}$ variando entre 6 a 7 horas, porém foi observado que a nicotina produziu irritação no local de absorção	GREEN et al., 1999
Pró-lipossomos sob condições oclusivas	Transdérmica	O fluxo da nicotina no controle (fármaco aplicado diretamente na pele) foi inicialmente maior do que aos das formulações pró-lipossomas, porém a diferença entre os fluxos diminuiu após cerca de 4 horas	HWANG et al., 1997

Fonte: Do autor.

PVA, polímero de álcool polivinílico; $T_{máx}$, tempo para atingir a concentração plasmática máxima.

2.3.2 Donepezila

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa que representa cerca de 80% dos casos de demência em idosos. A donepezila, cloridrato de (\pm)-2,3-diidro-5,6-dimetoxi-2-[[1-(fenilmetil)-4-piperidil]metil]-1H-inden-1-ona, é o fármaco mais prescrito atualmente para o tratamento da doença e encontra-se disponível comercialmente na forma farmacêutica de comprimidos. O fármaco (Figura 7) é classificado como um inibidor seletivo e reversível da enzima acetilcolinesterase, sendo quimicamente uma amina terciária, aromática e de caráter alcalino ($pK_a = 8,82$), com massa molecular de $379,5 \text{ g mol}^{-1}$ (ANGELANTONIO; BERNARDI; MERCURI, 2004; CHOI et al., 2012; KUMAR; SINGH; EKAVALI, 2015).

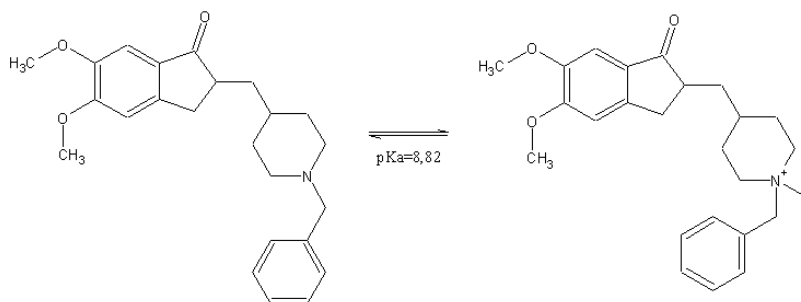


Figura 7 – Estrutura química da donepezila.

Fonte: Do autor.

Devido às suas características físico-químicas, sobretudo a lipofilicidade ($\log_{K_{ow}}$ entre 3,08 e 4,11), a donepezila pode atravessar a barreira hematoencefálica com facilidade e alcançar concentrações significativas no cérebro (ANGELANTONIO; BERNARDI; MERCURI, 2004). O fármaco é bem absorvido por via oral com alta biodisponibilidade (aproximadamente 100%), porém apresenta elevada incidência de efeitos colaterais. Devido ao aumento da secreção gástrica causada pelo aumento da atividade colinérgica no trato gastrointestinal, a administração oral da donepezila está associada a náuseas, diarreia, vômito e anorexia (PARK et al., 2008). Os efeitos colaterais prejudicam em grande extensão a adesão do paciente ao tratamento e comprometem o uso clínico do fármaco (MEIER-DAVIS et al., 2012; ROJANASTHEIN et al., 2012). Neste contexto, muitos trabalhos recentes têm se dedicado ao estudo de novos sistemas de liberação para donepezila considerando diferentes vias de administração (oral, nasal e transdérmica) na busca de uma melhor aplicação clínica do fármaco, uma vez que existem poucas opções terapêuticas atualmente para o tratamento da doença de Alzheimer. Podem ser citados como exemplos a administração transdérmica passiva (SUBEDI et al., 2012; CHOI et al., 2012) ou aplicando a técnica da iontoforese (SALUJA et al., 2013), injeções subcutâneas usando micropartículas de polímeros biodegradáveis (ZHANG et al., 2007), filmes de desintegração oral (LIEW et al., 2011), depósitos de esferas lipídicas em formulações injetáveis (YEHIA et al., 2012) e formulações para uso nasal que direcionam o fármaco diretamente para o cérebro, denominadas “*nose to brain*” (BHAVNA et al., 2014).

Sendo assim, a busca por novas alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Alzheimer é de grande importância. O desenvolvimento de novos sistemas capazes de controlar a cinética de liberação da donepezila é uma

estratégia que pode minimizar os efeitos colaterais do fármaco evitando picos plasmáticos e flutuações das concentrações na corrente sanguínea. É importante ressaltar que MIPs usando donepezila como molécula molde são inéditos na literatura. Desta forma, os materiais a serem desenvolvidos neste trabalho têm caráter inovador e os sistemas de liberação têm grande potencial para explorar novas alternativas no tratamento da doença de Alzheimer.

2.3.2.1 *Farmacologia e importância clínica*

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa progressiva e irreversível com poucas alternativas terapêuticas para reduzir a sua progressão e sintomatologia, como a perda da memória, demência e distúrbios cognitivos. A doença de Alzheimer de acometimento tardio atinge a população senil, com aparecimento ao redor dos 60 anos, sendo que sua prevalência tem sido associada ao aumento da expectativa de vida em muitos países. Quando precoce, ocorre ao redor dos 40 anos e apresenta recorrência familiar. De forma geral, a doença de Alzheimer está relacionada a fatores genéticos e hereditários. No cérebro de indivíduos acometidos, pode-se perceber diversas alterações como atrofia cortical difusa, a presença de placas senis em elevado número, perda neuronal e degenerações grânulo-vasculares. Distúrbios metabólicos estão associados ao acúmulo de proteínas beta-amilóide nas placas senis e microtubulina tau nosovelos neurofibrilares, dificultando a transmissão colinérgica no sistema nervoso central (KUMAR; SINGH, 2015).

Embora não haja cura para a doença de Alzheimer, uma série de fármacos que aliviam os sintomas cognitivos associados à doença foram aprovados para reduzir os sintomas relacionados a sua progressão. Os fármacos aprovados para tratamento das manifestações da doença de Alzheimer são a rivastigmina, galantamina, memantina, tacrina e donepezila. Todos os fármacos são inibidores da enzima acetilcolinesterase, com exceção da memantina, que é classificada como antagonista do receptor de N-metil-D-aspartato. Estes fármacos são administrados na grande maioria dos casos pela via oral, porém apresentam diversos efeitos adversos. No caso dos inibidores da enzima acetilcolinesterase, pode-se citar o aumento da secreção gástrica causada pelo aumento da atividade colinérgica no trato gastrointestinal. Neste sentido, é comum os pacientes apresentarem náuseas,

diarreia, vômitos e anorexia, o que diminui consideravelmente a adesão ao tratamento (CHOI et al., 2012; SUBEDI et al., 2012; YEHIA; ELSHAFEEY; ELSAYED, 2012; KUMAR; SINGH; EKAVALI, 2015).

Os inibidores da acetilcolinesterase previnem a hidrólise da acetilcolina, aumentando a função colinérgica. A donepezila é um inibidor reversível da enzima acetilcolinesterase baseada na piperidina, sendo o agente terapêutico mais prescrito para o tratamento da doença de Alzheimer atualmente. O fármaco é um dos mais potentes e seletivos da sua classe, porém ainda apresenta uma incidência significativa de efeitos adversos gástricos. A donepezila é absorvida lentamente por via oral, sendo o pico plasmático alcançado após cerca de 3 a 4 horas. As concentrações plasmáticas após a administração oral da dose convencional (5 mg) varia de 7,7 a 10,1 ng.mL⁻¹, sendo que o fármaco possui farmacocinética linear na faixa de 1 a 10 mg administrado em dose diária única. Possui elevada biodisponibilidade (100%) e a presença de alimentos não interfere na extensão ou velocidade de absorção do fármaco. Após a absorção, a donepezila é extensamente ligada a proteínas plasmáticas (96%), predominantemente na albumina (75%) e em menor extensão na α -glicoproteína ácida (21%). O fármaco passa por extenso metabolismo pré-sistêmico após absorção oral e é eliminado predominantemente por via renal, na forma inalterada, ou como glicuronídeos ou produtos de hidrólise. O metabolismo hepático é predominante pelo CYP 450 (2D6 e 3A4). A eliminação da donepezila nas fezes ocorre em uma extensão muito pequena. O tempo de meia-vida do fármaco varia de 50 a 70 horas e o volume de distribuição no estado estacionário, geralmente alcançado após cerca de 15 dias, é de 12 L.kg⁻¹ (TISEO; PERDOMO; FRIEDHOFF, 1998; PATEL et al., 2008; CHOI et al., 2012; ROJANASTHIEN et al., 2012).

2.3.2.2 *Formulações para liberação de donepezila*

Diversas formulações para liberação de donepezila têm sido estudadas nos últimos anos (Tabela 3), considerando que atualmente ainda existem poucas alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Alzheimer. Neste sentido, diversos pesquisadores buscam o desenvolvimento de formulações para liberação de donepezila de modo a reduzir os efeitos adversos do fármaco e alcançar a sua liberação controlada, estabelecendo melhores estratégias para administração, o que

também inclui explorar vias de administração alternativas.

Tabela 3 – Alguns sistemas de liberação de donepezila descritos na literatura.

(continua)

Sistema de liberação	Via de administração	Considerações	Referência
Nanosuspensão de partículas de quitosana reticuladas com tripolifosfato	Nasal	Liberação bifásica, caracterizada por efeito <i>burst</i> inicial seguido de difusão lenta do fármaco. Estudos <i>in vivo</i> usando ratos demonstraram que o fármaco pode ser significativamente vetorizado para o cérebro	BRAVNA et al., 2014
Soluções aquosas tamponadas avaliando o efeito de promotores químicos (ácido oleico, azona, polietilenoglicol 400 e ácido desoxicólico)	Bucal	Cerca de 20% da dose administrada de donepezila permeou a mucosa bucal <i>in vitro</i> de forma controlada após 4 horas de estudo	CAON et al., 2014
Gel de hidroxipropilmetilcelulose 2%	Transdérmica usando iontoforese	O cloridrato de donepezila foi incorporado nos géis e estudos <i>in vivo</i> usando ratos sem pelos indicaram que os sistemas puderam alcançar níveis terapêuticos do fármaco	SALUJA et al., 2013
Filmes de PVA	ND	Os filmes apresentaram liberação rápida do fármaco incorporado a 2% (maior que 50% em 60 minutos)	NECHIFOR et al., 2013
Propilenoglicol contendo ácidos graxos	Transdérmica	Os ácidos graxos insaturados (ácido oleico e linoleico) promoveram significativamente a permeação cutânea da donepezila na forma de base livre	CHOI et al., 2012

Tabela 3 – Alguns sistemas de liberação de donepezila descritos na literatura.

(continua)

Sistema de liberação	Via de administração	Considerações	Referência
Filmes de desintegração oral compostos de hidróxi propilmetilcelulose, amido de milho, polietilenoglicol e lactose monohidratada	Bucal	Liberação muito rápida do fármaco (80%) em torno de 5 minutos, sendo recomendados para desintegração na língua	LIEW; TAN; PEH, 2012
Sistemas matriciais contendo tensoativos Brij® 30 e Brij® 52 e adesivos Duro-Tak® 87-503-A e Duro-Tak® 87-504A	Transdérmica	As formulações apresentaram adesividade apropriada e os estudos de permeação cutânea <i>in vitro</i> indicaram que níveis terapêuticos do fármaco poderiam ser sustentados por até 3 dias	SUBEDI et al., 2012
Suspensão aquosa de lipoesferas compostas de tripalmitato de glicerila e álcool polivinílico	Formação de depósito subcutâneo ou intramuscular	Estudos <i>in vitro</i> demonstraram a liberação controlada da donepezila a partir das formulações pelo período de até 10 dias. Os resultados foram confirmados por estudos <i>in vivo</i> usando coelhos	YEHIA; ELSHAFFEEY; ELSAYED, 2012
Sistemas híbridos compostos de argilas esmectitas e Eudragit® E-100	ND	A donepezila foi intercalada em camadas de argila e o polímero Eudragit® E-100 foi incluído em alguns casos, sendo possível obter a liberação controlada da donepezila pelo período de até 5 dias	PARK et al., 2008

Tabela 3 – Alguns sistemas de liberação de donepezila descritos na literatura.

(continua)

Sistema de liberação	Via de administração	Considerações	Referência
Micropartículas de copolímeros de ácido láctico e ácido glicólico	Formação de depósito subcutâneo	Estudos <i>in vitro</i> demonstraram a liberação controlada da donepezila a partir das formulações pelo período de até 30 dias. Os resultados foram confirmados por estudos <i>in vivo</i> usando ratos	ZHANG et al., 2007

Fonte: Do autor.

ND, não foi descrita; PVA, polímero de álcool polivinílico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O material e métodos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho serão apresentados a seguir.

3.1 PADRÕES, REAGENTES E SOLVENTES

Acetonitrila grau HPLC JT Baker®

Ácido acético P.A. Vetec®

Ácido clorídrico P.A. Vetec®

Ácido metacrílico (AMA) 99% Sigma-Aldrich®

Ácido (orto) fosfórico 85% P.A. Vetec®

Ácido perclórico 70% P.A. Vetec®

Ácido oleico Sigma-Aldrich®

Água ultra pura

1,1-azobis-(ciclo hexanocarbonitrila) (ACHC) 98% Sigma-Aldrich®

Cremophor EL Sigma-Aldrich®

Cloreto de potássio P.A. Vetec®

Cloreto de sódio P.A. Vetec®

Etileno glicol dimetacrilato (EDGMA) 98% Sigma-Aldrich®

Fosfato de potássio monobásico anidro P.A. Vetec®

Fosfato de sódio monobásico monoidratado P.A. Vetec®

Fosfato de sódio dibásico anidro P.A. Vetec®

Hidróxido de sódio (lentilhas) P.A. Vetec®

2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) 97% Sigma-Aldrich®

Glicidil metacrilato (GMA) 97% Sigma-Aldrich®

Metanol grau HPLC JT Baker®

Miristato de isopropila (falta a marca)

Monoleína (Monooleato de glicerila) Myverol 18-99K Quest International

(-)-Nicotina $\geq 99,0\%$ (CG) Sigma-Aldrich®

Nitrogênio 99,999% White Martins®

Óleo de oliva

Óleo de soja

Óleo mineral (vaselina líquida) Vetec®

Palmitato de isopropila

Propilenoglicol Vetec®

Soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 Vetec®

Tartarato de rivastigmina United States Pharmacopeia reference standard (99,7%)

Tolueno grau HPLC JT Baker®;

Tween 80 P.A. Vetec®

3.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Agitador magnético com chapa de aquecimento Marconi® modelo MA-085

Agitador de tubos Marconi® modelo MA162

Analizador termogravimétrico Exstar® modelo TG/DTA 7000 series

Banho ultrassom Unique®

Balança analítica Sartorius® modelo CP225D

Bomba de vácuo Primatec®

Calorímetro exploratório diferencial(CED) Mettler Toledo® modelo DSC 1 Stare System

Centrífuga CELM® modelo LS-3 plus

Célula de difusão vertical Hanson Research® com volume de 7,0 mL e área de difusão de 1,77 cm²

Coluna cromatográfica C18 Acqua (150,0 x 4,6 d.i.) mm 125 Å 5 µm Phenomenex® e pré-coluna C18 Acqua (4,0 x 3,0 mm) Phenomenex®

Coluna XTerra® RP 18 5 µm (100,0 x 4,6 mm) marca Waters®

Difratômetro de raios X de pó Rigaku modelo Ultima IV tipo II de geometria θ - 2θ

Espectrofotômetro infravermelho por transformada de Fourier Shimadzu® modelo Affinity-1 acoplado a um acessório de refletância total atenuada da marca Pike Miracle com cristais de ZnSe Pike Technologies

Espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier, modelo Nicolet IS50, com placa de aquecimento “hotstage” Thermo Scientific® - Pike Technologies

Estufa de secagem e esterilização com circulação de ar Solab Científica®

Filtro de seringa Millex® com membrana PTFE modificada para filtração de

solventes aquosos e orgânicos 0,45 µm 13 mm não-estéril

Homogeneizador de tecidos tipo TURRAX modelo MA102

Medidor de pH Tecnopon® modelo mPA-210 MS

Membrana porosa tubular de celulose regenerada Spectra/Por® com poros de 12-14 kDa

Membrana para filtração de solventes aquosos e orgânicos Millipore® em PTFE modificado 0,45 µm

Microscópio de força atômica Nanosurf Easyscan 2

Microscópio eletrônico de varredura Leo Evo 40

Pipetador automático Kacil® de volume ajustável 100 - 1000 µL

Pipetador automático Kacil® de volume ajustável 40 - 200 µL

Pipetador automático Digipet® de volume ajustável 10 - 100 µL

Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu® modelo 10 VP, com módulo de injeção automática, forno para coluna e sistema controlador. O equipamento foi acoplado com detector UV modelo SPD-10AVP e detector DAD modelo SPD-M10AVP

Sistema Micropore® para filtração de solventes da fase móvel

Sistema Micropore® para purificação de água por osmose reversa

Tamises Bertel Metalúrgica® com abertura de malha de 200 e 150 mesh (respectivamente, 75 e 106 µm)

3.3 MÉTODOS

Os métodos utilizados nas diferentes etapas de elaboração deste trabalho estão descritos nesta seção. Estão incluídos os métodos para síntese das partículas poliméricas, bem como os estudos para caracterização e avaliação destes materiais. Também estão descritos os estudos para desenvolvimento e avaliação de formulações baseadas em partículas de MIPs para liberação prolongada de fármacos.

3.3.1 Determinação analítica da nicotina por CLAE

A determinação da nicotina nas diferentes etapas deste trabalho foi realizada conforme o método validado de acordo com o guia ICH Q2 (r1). O método analítico

foi previamente descrito por Ruela et al. (2013). Empregou-se coluna cromatográfica C₁₈ Acqua (150,0 x 4,6 d.i.) mm com partículas de 5 µm e pré-coluna C₁₈ Acqua (4,0 x 3,0 mm). A fase móvel foi preparada a partir de uma mistura de tampão fosfato de potássio 10 mmol L⁻¹ contendo 0,2% de trietilamina e acetonitrila (80:20, v/v). O pH da fase móvel foi ajustado para 6,9 com ácido fosfórico 85%. O volume de injeção foi de 50 µL, a vazão de fase móvel foi de 1,0 mL min⁻¹ e a detecção UV a 260 nm. As amostras foram analisadas no intervalo linear de 0,5 a 300,0 µg mL⁻¹, sendo realizada a diluição quando necessário.

3.3.2 Determinação analítica da donepezila por CLAE

A determinação de donepezila nas diferentes etapas do trabalho foi realizada por CLAE conforme o método indicativo de estabilidade descrito por Ruela et al. (2014). As condições cromatográficas foram: coluna cromatográfica C₁₈ Acqua (150,0 x 4,6 d.i.) mm com partículas de 5 µm Phenomenex® e pré-coluna C₁₈ Acqua (4,0 x 3,0 mm) Phenomenex®. A fase móvel foi preparada a partir de uma mistura de tampão fosfato de potássio monobásico 5 mmol L⁻¹ contendo 0,5% de trietilamina e metanol (55:45, v/v). O pH da fase móvel foi ajustado para 3,0 com ácido fosfórico 85%. A vazão de fase móvel foi 1,0 mL min⁻¹, o volume de injeção de 50 µL e a detecção UV a 268 nm.

3.3.3 Caracterização físico-química na nicotina

A caracterização físico-química da nicotina incluiu estudos de solubilidade e de coeficiente de partição do fármaco no veículo.

3.3.3.1 Solubilidade da nicotina no veículo

A solubilidade da nicotina em óleo mineral foi avaliada adicionando 150 µL de nicotina em 5 mL de óleo mineral ($n=3$). A mistura foi mantida sob agitação magnética constante por 24 horas. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas (3400 rpm por 15 minutos) de modo a observar a separação de fases entre o óleo mineral saturado com o fármaco e o excesso de nicotina. Uma quantidade de 0,25 mL de óleo mineral saturado com nicotina foi transferida para

balão volumétrico de 10 mL e o volume ajustado com óleo mineral. Em tubos de ensaios com tampa ($n=3$), transferiu-se 1 mL da solução de nicotina em óleo mineral e 1 mL de água. O sistema foi agitado em vórtex por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3400 rpm por 15 minutos e a fase aquosa foi separada e analisada por CLAE (item 3.3.1).

3.3.3.2 Coeficientes de partição veículo/água

A partição da nicotina entre duas fases imiscíveis (veículo oleoso e meio aquoso) foi estudada considerando o efeito da ionização da molécula pelo método *shaking-flask*. As soluções aquosas de nicotina foram preparadas na concentração de 10,0 mg mL⁻¹ e foi monitorado o pH final da solução. Para isso, estudos foram realizados usando como fase aquosa a água ultrapura sem tamponamento (pH da solução aquosa de nicotina = 9,40) e soluções tampão de diferentes valores de pH (5,0; 7,4 e 11,0). Em tubos de ensaios com tampa ($n=3$), adicionaram-se 2 mL da solução aquosa de nicotina e 2 mL do óleo mineral. O sistema foi mantido sob agitação magnética a 600 rpm por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3400 rpm por 15 minutos e a fase aquosa foi separada, diluída e analisada por CLAE (item 3.3.1). A partilha da nicotina entre as duas fases (K) foi calculada conforme a equação 4:

$$K = (C_1 - C_2)/C_2 \quad (\text{Equação 4})$$

em que, C_1 é a concentração inicial de nicotina na fase aquosa e C_2 é a concentração de nicotina na fase aquosa após a partição. O coeficiente de partição da nicotina em cada condição foi determinado como o logaritmo de K .

3.3.3.3 Coeficiente de partição *n*-octanol/água

O coeficiente de partição *n*-octanol/água ($\log K_{ow}$) da nicotina foi determinado pelo método indireto usando CLAE em modo fase reversa (MINICK et al., 1988). As condições experimentais foram: coluna cromatográfica Waters XTerra RP 18 5 μ m (100x4.6 mm, d.i.), detecção UV ($\lambda=254$ nm) e vazão de 0,5 mL min⁻¹. A fase móvel foi uma mistura de solvente orgânico (metanol + 0,25% v/v de *n*-octanol) e solvente

aquoso (tampão fosfato de potássio monobásico 10 mmol L⁻¹ pH 7,4 previamente saturado com *n*-octanol). Foram avaliadas cinco diferentes proporções de fase móvel, em que a porcentagem usada de solvente orgânico foi 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0%. Foram realizadas três injeções de solução de nicotina 100,0 µg mL⁻¹ (20 µL) diluída em metanol em cada proporção de fase móvel. O fator de retenção (*k'*) foi calculado em cada condição. A partir dos resultados, foi plotado um gráfico da porcentagem de solvente orgânico em decimal (eixo y) *versus* logaritmo do *k'* (eixo x) e a equação da reta foi determinada pelo método dos mínimos quadrados. O valor de *k'* correspondente a 100% de solvente aquoso (*k'*_w) foi calculado como a intersecção da reta no eixo x. O valor *k'*_w foi usado na equação $\log K_{ow} = 0,13418 + 0,98452 \log k'_w$.

3.3.4 Obtenção da donepezila base livre

Considerando que a donepezila base livre apresenta propriedades físico-química distintas ao cloridrato de donepezila (temperatura de fusão, solubilidade, estabilidade térmica, entre outros), a donepezila base livre foi obtida a partir do sal do fármaco (cloridrato) conforme a metodologia descrita por Ruela, Carvalho e Pereira (2015). O cloridrato de donepezila foi gentilmente cedido pela Megafine Pharma (P) Ltd (Mumbai, Índia) e Laboratório Cristália (Itapira, São Paulo). A metodologia para obtenção da base livre foi baseada em uma extração líquido-líquido. Para isso, 2,0 g de cloridrato de donepezila foram dispersos em 100 mL de água purificada contendo 1,0 g de fosfato de potássio monobásico. Em seguida, a dispersão aquosa do sal foi transferida para um funil de separação e foram adicionados 25 mL de tolueno. O sistema foi agitado vigorosamente e depois foram adicionados 10 mL de hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹. A mistura foi agitada vigorosamente até ambas as fases se apresentarem límpidas. Em seguida, o sistema foi mantido em repouso por 5 minutos para separação de fases. A fase aquosa inferior foi descartada e a fase orgânica superior (tolueno) foi coletada. A cristalização do fármaco foi realizada a partir da secagem do tolueno em capela de exaustão à temperatura ambiente.

3.3.5 Caracterização das matérias-primas de donepezila e ensaios de pré-formulação

As amostras de matéria-prima de donepezila nas formas de base livre e sal (cloridrato) foram caracterizadas usando diferentes técnicas para identificação, caracterização das formas cristalinas e determinação da solubilidade.

3.3.5.1 *Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas in tandem (LC-MS/MS)*

O padrão de fragmentação da donepezila base livre e do cloridrato foram avaliados a partir de soluções preparadas em metanol:água 1:1 (v/v) na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos (LATF) da Unifal-MG (Alfenas, MG). As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna cromatográfica C_{18} Acqua (150.0 x 4.6 d.i.) mm com partículas de $5 \mu\text{m}$ e pré-coluna C_{18} Acqua (4.0 x 3.0 mm). A fase móvel foi preparada a partir de uma mistura de ácido acético 0,2% pH 3,2 e metanol (60:40, v/v). Utilizou-se como método de ionização o *electrospray* em modo positivo. O íon precursor avaliado foi o de 380 m/z. A energia da câmara de colisão foi de 25 v.

3.3.5.2 *Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada*

Foram realizadas varreduras espectrais utilizando espectroscopia infravermelho (IV) com transformada de Fourier usando o modo de transmitância e refletância total atenuada (ATR-FTIR). Os espectros foram obtidos na faixa de número de onda de $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$, sendo as amostras colocadas diretamente sobre o cristal de reflexão. Os ensaios foram realizados no Núcleo Controle de Qualidade da UNIFAL-MG (NCQ-UNIFAL-MG, Alfenas, MG). Os espectros foram normalizados e as bandas associadas aos grupamentos químicos foram avaliadas para caracterização do fármaco.

3.3.5.3 Difração de raios X

O ensaio foi realizado no Laboratório de Cristalografia da UNIFAL-MG (Alfenas, MG). As varreduras foram realizadas 3 a $50^\circ 2\theta$, à temperatura ambiente, com passo de 2θ de $0,01^\circ$, corrente de 30 mA, tensão de 40 kV, velocidade de varredura foi $0,25^\circ 2\theta \text{ min}^{-1}$.

3.3.5.4 Análise térmica

A donepezila base livre (forma cristalina B) e o cloridrato de donepezila (forma cristalina I) foram caracterizados por técnicas de análise térmica (calorimetria exploratória diferencial, CED, e análise termogravimétrica). As análises foram realizadas no Laboratório de Análise e Caracterização de Fármacos/IQ/UNIFAL-MG (Alfenas, MG). O equipamento para CED foi calibrado com padrão de índio (ponto de fusão de $156,6^\circ\text{C}$, entalpia de fusão $- 28,59 \text{ J g}^{-1}$). Cerca de 2,0 mg ($\pm 0,2 \text{ mg}$) de cada amostra foram acondicionados em cadinhos de alumínio hermeticamente fechados e analisadas no intervalo de temperatura de 30 a 350°C a uma razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica com fluxo de nitrogênio de $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A análise termogravimétrica foi realizada com cerca de 3,0 mg ($\pm 0,2 \text{ mg}$) das amostras pesadas em cadinhos de alumínio. A análise foi realizada em atmosfera dinâmica com fluxo de nitrogênio, no intervalo de temperatura de 30 a 350°C , com razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$.

3.3.5.5 Estudos de solubilidade em veículos aquosos

As determinações foram baseadas no método “shaking flask” descrito por Wells (1988). Foram determinadas as solubilidades da donepezila base livre (forma cristalina B) nos seguintes veículos aquosos: Água deionizada, propilenoglicol, tampão fosfato 0,02M pH 5,0, tampão fosfato 0,02M pH 7,4 e tampão fosfato 0,02M pH 11,5. A solubilidade do cloridrato de donepezila (forma cristalina I) foi determinada nos seguintes veículos aquosos: Água deionizada, propilenoglicol, tampão fosfato 0,02M pH 7,4 e tampão fosfato 0,02M pH 11,5.

Para determinar a solubilidade da donepezila, um excesso do fármaco (matéria-prima) foi adicionado a 10 mL de cada veículo em erlenmeyer, o qual foi

protegido da luz, tampado e submetido a um processo de agitação constante por 24 horas à temperatura ambiente. A solução foi filtrada em filtro de seringa 0,45 µm e a quantidade de fármaco solúvel no meio foi determinada por CLAE (item 3.3.2).

3.3.5.6 Estudos de solubilidade em veículos lipídicos

A solubilidade da donepezila em veículos lipídicos foi avaliada visualmente. Observou-se a capacidade do veículo em solubilizar o fármaco (matéria-prima) sem restarem resíduos sólidos. O fármaco (10,0 mg) foi adicionado a 1 mL do veículo e mantido sob agitação constante por 24 horas. A seguir, as dispersões (1% m/v) foram analisadas e classificadas conforme a seguinte escala:

- a) *Solúvel* – Não são observados cristais;
- b) *Parcialmente solúvel* – Observam-se cristais insolúveis;
- c) *Insolúvel* – Praticamente todos cristais estão insolúveis.

Os veículos avaliados foram óleo de soja, óleo de oliva, ácido oleico, óleo mineral, palmitato de isopropila e miristato de isopropila.

3.3.5.7 Coeficiente de partição veículo/água

A partição da donepezila base livre entre duas fases imiscíveis foi estudada pelo método *shaking-flask*. Previamente, realizou-se a saturação da água com o veículo (ácido oleico), mantendo os dois veículos em agitação por 8 horas. A água saturada com ácido oleico foi usada para preparar uma solução aquosa de donepezila saturada conforme o item 3.3.5.5. Em tubos de ensaios com tampa ($n=3$), adicionaram-se 2 mL da solução aquosa saturada de donepezila e 2 mL de ácido oleico. O sistema foi mantido sob agitação magnética a 600 rpm por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3400 rpm por 15 minutos e a fase aquosa foi separada e filtrada usando um filtro de seringa 0,45 µm. As soluções aquosas de donepezila antes e após a partição foram analisadas por CLAE (item 3.3.2).

A partilha da donepezila entre as duas fases (K) foi calculada conforme a equação 8:

$$K = (C_1 - C_2)/C_2 \quad (\text{Equação 8})$$

em que, C_1 é a concentração inicial de donepezila na fase aquosa e C_2 é a concentração de donepezila na fase aquosa após a partição. O coeficiente de partição da donepezila foi determinado como logaritmo de K.

3.3.5.8 Coeficiente de partição *n*-octanol/água

A determinação do coeficiente de partição *n*-octanol/água ($\log K_{ow}$) da donepezila foi realizada usando o método por CLAE proposto por Minick et al. (1988). Para isso, injetaram-se em triplicata 20 μL de solução padrão de donepezila ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e calculou o fator de retenção (k') usando cinco proporções diferentes da mistura fase móvel: tampão fosfato pH 7,4 (previamente saturado com *n*-octanol) e metanol + 0,25% de *n*-octanol. As porcentagens de solvente orgânico usadas na fase móvel foram 50,0; 60,0; 70,0; 80,0 e 90,0%. As condições cromatográficas foram: Coluna XTerra® RP 18 5 μm (100,0 x 4,6 mm), vazão de fase móvel 0,5 mL min^{-1} e comprimento de onda 260 nm. Os dados foram plotados como proporção de solvente orgânico (em decimal) *versus* o logaritmo do fator de retenção ($\log k'$). A equação da reta foi determinada após análise de regressão linear e a intersecção no eixo x foi calculada de modo a determinar o fator de retenção usando 100% de solvente aquoso (k'_w). A equação $\log K_{ow} = 0,13418 + 0,98452 \times \log k'_w$, foi usada para calcular o $\log K_{ow}$.

3.3.6 Síntese dos polímeros pela técnica de polimerização por precipitação usando a nicotina como molécula molde

A síntese dos polímeros foi realizada em um sistema reator montado usando um kitassato (frasco de polimerização) acoplado a um condensador com circulação de água para prevenir a evaporação do solvente porogênico. Uma mistura de acetonitrila e tolueno (3:1, v/v) foi utilizada como solvente porogênico (150 mL). Após a adição de todos os reagentes no frasco de polimerização, o sistema foi totalmente vedado e mantido em banho de óleo aquecido a 80 °C. O meio reacional foi mantido sob agitação magnética constante ao longo da reação de polimerização radicalar

livre. O ácido metacrílico (AMA) foi utilizado como monômero funcional, etileno glicol dimetacrilato (EDGMA) como agente de ligação cruzada, nicotina como molécula modelo e 1,1-azobisciclohexanocarbonitrila (ACHC) como iniciador radicalar. Os comonômeros 2-hidroximetil metacrilato (HEMA) e glicidil metacrilato (GMA) também foram utilizados. As proporções dos reagentes utilizados estão apresentados na Tabela 4.

A síntese foi realizada em procedimento de etapa única, com exceção de MIP-7 e NIP-7. No procedimento de etapa única, adicionou-se inicialmente a nicotina e o AMA (monômero funcional) na mistura do solvente porogênico (etapa de pré-polimerização). Após 30 minutos, foi realizada a adição dos comonômero(s) (HEMA e/ou GMA), quando o caso, e após 15 minutos adicionou-se o agente de ligação cruzada (EDGMA) e 25,0 mg do iniciador radicalar (ACHC). A solução foi degaseificada em banho de ultrassom sob vácuo por 30 minutos e depois purgada com nitrogênio por 15 minutos. O sistema de síntese foi vedado e aquecido a 80°C, sendo depois mantido por 24 horas sob agitação magnética constante. Após este tempo, uma suspensão de partículas poliméricas foi obtida. As partículas poliméricas na forma de um pó seco foram coletadas após evaporação do solvente porogênico em capela de exaustão à temperatura ambiente.

A síntese em duas etapas (MIP-7 e NIP-7) foi realizada de modo semelhante a síntese em etapa única. Entretanto, a polimerização foi iniciada a partir da mistura de 7,5 mmol de AMA, 4 mmol de HEMA e 4 mmol de EDGMA. Após 4 horas a 80°C, quando já era possível observar partículas em suspensão no meio reacional, adicionou-se os reagentes da segunda etapa (26 mmol de HEMA e 26 mmol de EDGMA). A mistura foi mantida no reator por mais 20 horas.

Os NIPs foram sintetizados conforme a mesma metodologia, porém na ausência de nicotina.

Tabela 4 – Síntese dos polímeros impressos pela técnica de polimerização por precipitação usando nicotina como molécula molde.

Polímero	AMA (mmol)	HEMA (mmol)	GMA (mmol)	EDGMA (mmol)	Nicotina (mmol)
<i>Poli-(EDGMA)</i>	-	-	-	30,0	-
<i>MIP-1</i>	7,5	-	-	30,0	1,875
<i>MIP-2</i>	7,5	7,5	-	30,0	1,875
<i>MIP-3</i>	7,5	-	7,5	30,0	1,875
<i>MIP-4</i>	7,5	7,5	7,5	30,0	1,875
<i>MIP-5</i>	7,5	-	-	30,0	0,625
<i>MIP-6</i>	7,5	-	-	7,5	0,625
<i>MIP-7**</i>	7,5	30,0	-	30,0	1,875
<i>NIP-1*</i>	7,5	-	-	30,0	-
<i>NIP-2</i>	7,5	7,5	-	30,0	-
<i>NIP-3</i>	7,5	-	7,5	30,0	-
<i>NIP-4</i>	7,5	7,5	7,5	30,0	-
<i>NIP-5*</i>	7,5	-	-	30,0	-
<i>NIP-6</i>	7,5	-	-	7,5	-
<i>NIP-7**</i>	7,5	30,0	-	30,0	-

Fonte: Do autor.

AMA, ácido metacrílico; HEMA, 2-hidroxiethylmetacrilato; GMA, glicidilmetacrilato; EDGMA, etilenoglicol dimetacrilato; MIP, polímero impresso molecularmente; NIP, polímero não-impresso (controle). *Não existem diferenças entre os NIP-1 e NIP-3, porém foram realizadas sínteses diferentes. **Síntese em duas etapas.

3.3.6.1 Lavagem e preparação das partículas poliméricas

A etapa de lavagem das partículas para remoção da nicotina e reagentes residuais foi realizada em ciclos sucessivos de limpeza com solventes. As partículas foram colocadas em suspensão no solvente em tubos de polipropileno com tampa (50 mL) e lavadas sucessivamente. Foram realizados vários ciclos de lavagem com duração média de 4 horas cada, utilizando 25 mL de solvente em cada ciclo. Após a adição de solvente, as partículas foram levadas em banho de ultrassom por 60 minutos e depois a suspensão foi mantida em repouso. Para separação das partículas, os tubos eram levados à centrífuga por 60 minutos a 3400 rpm.

Primeiramente, foram realizados cinco ciclos de lavagem com solução de limpeza ácida, constituída de metanol:solução aquosa de ácido acético a 30% (60:40/v/v). Cinco ciclos de lavagem foram realizados com uma solução de limpeza neutra, preparada a partir de uma mistura de metanol:água (60:40 v/v). Por fim, as partículas foram lavadas exaustivamente com solução tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ pH 7,5:metanol (80:20). Realizou-se a análise das soluções de lavagem por CLAE (item 3.3.1) para assegurar a completa remoção da nicotina. O pH das soluções de limpeza foi monitorado de modo a garantir a remoção de resíduos de ácido provenientes do primeiro ciclo de lavagem.

Após a lavagem, as partículas foram secas em estufa a 50°C até peso constante. O material obtido foi triturado levemente em almofariz para desfazer grumos de particulados e depois tamisado para remoção de possíveis particulados grosseiros. A fração de partículas recuperada da tamisação foi inferior a 75 µm. O pó fino seco e padronizado foi armazenado em frascos fechados à temperatura ambiente até o momento do uso. O mesmo procedimento de lavagem e preparação das partículas de polímeros foi realizado para os NIPs.

3.3.6.2 *Abertura do anel epóxido nos copolímeros contendo GMA*

Conforme a Tabela 4, os copolímeros impressos MIP-3 e MIP-4 e seus respectivos controles, NIP-3 e NIP-4, tiveram a adição do comonômero GMA na síntese. O monômero GMA contém um anel epóxido que foi aberto conforme metodologia adaptada de Puoci e colaboradores (2009) para obter o material modificado denominado RAM-MIP. Para isso, 2,0 g de cada polímero foram preparados conforme a seção 3.3.2.1 e colocados em erlenmeyer contendo 100 mL de solução aquosa de ácido perclórico 10% e mantido a temperatura ambiente sob agitação magnética constante. Após 48 horas, as partículas foram coletadas por centrifugação (3400 rpm por 10 minutos) e lavadas exaustivamente com solução tampão fosfato de potássio 10 mmol L⁻¹ pH 7,5 até neutralização dos resíduos ácidos. O pH da solução de limpeza foi monitorado para garantir a neutralização.

Os polímeros preparados foram secos em estufa a 50°C até peso constante. O material foi armazenado em frascos fechados à temperatura ambiente até o momento do uso.

3.3.7 Caracterização dos MIPs usando nicotina como molécula molde

As técnicas utilizadas para caracterização dos materiais e a metodologia para preparação das amostras serão descritas a seguir.

3.3.7.1 *Carregamento das partículas poliméricas para estudos de caracterização*

Os estudos de caracterização dos materiais poliméricos por espectroscopia infravermelho foram realizados com os materiais após a lavagem (item 3.3.6.1) e os materiais carregados com a nicotina. O carregamento dos materiais foi realizado a partir da pesagem de 100,0 mg de cada polímero (foram selecionados MIP-1, MIP-2, MIP-3 e MIP-4, bem como seus respectivos controles não-imprensos) em tubos de ensaio com tampa. Em cada tubo, foram adicionados 5 mL de uma solução de nicotina 20,0 mg mL⁻¹ preparada em solvente porogênico (acetonitrila:tolueno, 3:1 v/v), equivalente a uma massa de 100,0 mg de nicotina. Após 24 horas, as amostras foram centrifugadas por 60 minutos a 3400 rpm e o sobrenadante foi descartado. O material polimérico sedimentado foi seco em estufa a 50°C até peso constante. Após a secagem, os polímeros carregados foram armazenados em frascos apropriados até a realização dos ensaios de caracterização.

3.3.7.2 *ATR-FTIR*

Foram realizadas varreduras espectrais utilizando ATR-FTIR. Os ensaios foram realizados no Núcleo Controle de Qualidade da UNIFAL-MG (NCQ-UNIFAL-MG, Alfenas, MG). Os espectros foram obtidos na faixa de número de onda de 4000-400 cm⁻¹, sendo as amostras colocadas diretamente sobre o cristal de reflexão. Os espectros foram normalizados e as bandas associadas aos grupamentos químicos foram avaliadas para caracterização dos materiais. Foram realizadas varreduras da nicotina e dos polímeros (MIP e NIP, com e sem carregamento).

Estudos adicionais foram realizados utilizando ATR-FTIR usando placa de aquecimento, “*hot stage*”, para caracterizar a interação da nicotina com a matriz polimérica das partículas (MIP-2 e NIP-2). Os espectros foram obtidos em diferentes temperaturas de 30 até 230°C. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Análise e Caracterização de Fármacos/IQ/UNIFAL-MG (Alfenas, MG).

3.3.7.3 Avaliação da morfologia das partículas por estudos de microscopia

Estudos microscópicos foram realizados utilizando as técnicas microscopia de força atômica (MFA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), respectivamente no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, CNPEM, Campinas, São Paulo) e no Laboratório de Microscopia do Departamento de Fitopatologia (Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais). As amostras MIP-2 e MIP-7, bem como seus respectivos controles, foram analisadas por MEV. As imagens do MIP-1 e NIP-1 foram obtidas por MFA.

As imagens obtidas por MEV foram realizadas com o equipamento operando na energia de 20 kV. As amostras previamente secas (item 3.3.6.1) foram fixadas em fita de carbono e depois metalizadas com uma camada delgada de ouro (aproximadamente 10 nm).

As imagens topográficas por MFA foram obtidas no modo de operação de contato. As amostras foram previamente dispersas em solução aquosa, a qual foi levada ao banho de ultrassom por 10 minutos. A dispersão foi homogeneizada e uma alíquota (10 μL) foi aplicada em superfície de mica. O solvente aquoso foi seco sob fluxo de nitrogênio de modo a obter uma fina camada de partículas do material a ser analisado. As áreas analisadas foram de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ e $5 \times 5 \mu\text{m}^2$.

3.3.7.4 Estudos de intumescimento das partículas poliméricas

Estudos de intumescimento do material polimérico (*swelling*) com diferentes solventes foram realizados de acordo com o método volumétrico descrito por Sumi e colaboradores (2008). Foram avaliados os MIP-1, MIP-2 e MIP-5, bem como seus respectivos polímeros controle, NIP-1, NIP-2 e NIP-5. Os solventes avaliados foram ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; tampão fosfato pH 7,4 e óleo mineral. Para isso, 1,0 g de polímero foi pesado ($n=3$) em um tubo graduado e centrifugado por 30 minutos a 3400 rpm. O volume ocupado pelo pó foi determinado, V_1 . Foram adicionados 5 mL do solvente e a mistura foi agitada vigorosamente, permanecendo em repouso por 24 h. Após este tempo, o tubo foi novamente centrifugado (30 minutos a 3400 rpm) e o volume ocupado pelo pó intumescido foi determinado, V_2 . O intumescimento das partículas foi determinado de acordo com a equação 1:

$$\text{Intumescimento} = (V_2 - V_1) / V_1 \times 100\% \quad (\text{Equação 1})$$

3.3.7.5 Estudos de adsorção da nicotina em óleo mineral

A metodologia para avaliação da adsorção da nicotina em óleo mineral foi apropriadamente desenvolvida e validada conforme o guia ICH Q2 (r1). Os parâmetros de validação avaliados foram: a seletividade, linearidade/intervalo, precisão e exatidão, e diluição das amostras.

As amostras foram preparadas avaliando a adsorção da nicotina nos polímeros a partir de uma solução do fármaco preparada no veículo (óleo mineral). Duas soluções de concentrações diferentes de nicotina (100 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram preparadas em óleo mineral. Para isso, 1 mL de solução oleosa de nicotina foi colocada em contato com 10,0 mg de cada polímero. A mistura de solução oleosa de nicotina e polímero foi agitada vigorosamente em agitador de tubos por 2 minutos. A mistura foi mantida em contato por 24 horas. Após este tempo, a mistura foi centrifugada a 3400 rpm por 15 minutos. Uma fração de 600 μL de óleo mineral (sobrenadante) foi transferida para outro tubo. Adicionaram-se 600 μL de água ultrapura para outro tubo e agitou-se vigorosamente em agitador de tubos por 2 minutos. Em seguida, centrifugou-se a amostra (3400 rpm por 5 minutos) e coletaram-se 400 μL de fase aquosa. As amostras foram analisadas por CLAE (item 3.3.1).

A seletividade foi avaliada a partir de amostra preparada usando óleo mineral sem o fármaco, de acordo com o procedimento já descrito anteriormente. A linearidade ($n=3$) foi avaliada a partir da extração de soluções oleosas de nicotina em diferentes concentrações (25, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A equação da reta e o coeficiente de correlação foram determinados após regressão linear dos dados. A curva analítica foi comparada com curva preparada diretamente em água ultrapura (solvente extrator).

A precisão do método analítico foi determinada a partir da extração de seis réplicas de soluções oleosas de nicotina na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As análises foram realizadas em dois dias diferentes. A precisão intra e inter dias foi estabelecida como a dispersão das medidas ao redor do seu valor médio e expressa matematicamente pelo desvio padrão relativo (*DPR*), apresentado na equação 2:

$$DPR = (\text{Desvio padrão} / \text{Média}) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

A exatidão do método analítico foi determinada a partir da extração de seis réplicas de soluções oleosas de nicotina na concentração de 100 µg mL⁻¹. As análises foram realizadas em dois dias diferentes. A exatidão intra e inter dias, apresentada como erro relativo (*E*), foi calculada pela equação 3, apresentada a seguir:

$$E = \frac{(\text{Concentração encontrada} - \text{Concentração teórica}) \times 100}{\text{Concentração teórica}} \quad (\text{Equação 3})$$

A diluição das amostras extraídas a partir de soluções de 500 e 1000 µg mL⁻¹ foi avaliada de modo a assegurar a recuperação do método. Para isso, as soluções oleosas em uma concentração superior ao intervalo linear foram extraídas e depois diluídas em água antes da injeção. A amostra foi diluída de cinco a dez vezes e a recuperação calculada em comparação com amostra extraída na concentração de 100 µg mL⁻¹.

3.3.7.6 *Isotermas de adsorção*

Foi avaliada a isoterma de adsorção da nicotina nos polímeros MIP-2 e NIP-2. Para isso, foram pesados exatamente 10,0 mg do polímero e, em seguida, adicionou-se 1 mL de uma solução de nicotina em diferentes concentrações (50, 100, 200, 500, 750 e 1000 µg mL⁻¹) diluída em óleo mineral. Após 24 horas à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas (3400 rpm por 15 minutos) de modo a ocorrer a precipitação das partículas poliméricas. A concentração de nicotina livre em solução (sobrenadante) foi determinada por CLAE após extração líquido-líquido conforme descrito no item 3.3.7.5. A quantidade de nicotina adsorvida foi determinada pela diferença de concentração na solução inicial e na solução após o equilíbrio. O ensaio foi realizado em triplicata.

A partir dos resultados, o ajuste dos dados foi testado nos modelos lineares de isotermas de adsorção de Langmuir e Freundlich e no modelo não-linear de Langmuir-Freundlich. As equações correspondentes a estes modelos estão

apresentadas a seguir:

a) Modelo de Langmuir;

$$Q_e = KMC_e/(1 + KC_e)$$

b) Modelo de Freundlich;

$$Q_e = KMC_e^\beta$$

c) Modelo de Langmuir-Freundlich;

$$Q_e = KMC_e^\beta/(1 + KC_e^\beta)$$

em que, Q_e é a quantidade de fármaco adsorvida por grama de adsorvente (mg g^{-1}), M é a capacidade de adsorção máxima (mg g^{-1}), C_e é a concentração do fármaco em equilíbrio com o adsorvente (mg L^{-1}), K é um parâmetro relacionado à afinidade entre adsorvido e adsorvente, β é um parâmetro empírico relacionado à heterogeneidade da superfície adsorvente.

O melhor ajuste para caracterizar a adsorção do fármaco no polímero foi determinado pelo coeficiente de determinação r^2 ajustado para cada modelo.

3.3.7.7 Potencial zeta

O potencial zeta foi determinado em equipamento Nanosize NS (Malvern Instruments). As medidas foram realizadas em solução para avaliar a carga elétrica das partículas de MIPs. Para isso, as partículas foram dispersas em água ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e analisadas.

3.3.8 Síntese dos polímeros pela técnica de polimerização por precipitação usando donepezila como molécula molde

A síntese dos polímeros foi realizada em um sistema reator montado usando um kitassato (frasco de polimerização) acoplado a um condensador com circulação de água para prevenir a evaporação do solvente porogênico. Após a adição de todos os reagentes no frasco de polimerização, o sistema foi totalmente vedado e mantido em banho de aquecimento. O meio reacional foi mantido sob agitação magnética

constante durante a reação de polimerização radicalar livre.

Uma mistura de acetonitrila e tolueno (3:1, v/v) foi utilizada como solvente porogênico (150 mL). As proporções dos reagentes utilizados estão apresentadas na Tabela 5. O ácido metacrílico (AMA) foi utilizado como monômero funcional, etileno glicol dimetacrilato (EDGMA) como agente de ligação cruzada, donepezila como molécula modelo e 1,1-azobisciclohexanocarbonitrila (ACHC) como iniciador radicalar. Os comonômeros 2,2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) e glicidil metacrilato (GMA) também foram utilizados.

A síntese do MIP e NIP foi realizada em procedimento de etapa única, enquanto o RAM-MIP e RAM-NIP foram sintetizados em duas etapas. No procedimento de etapa única, adicionaram-se inicialmente a donepezila e o AMA (monômero funcional) na mistura do solvente porogênico (etapa de pré-polimerização). Após 30 minutos, foi realizada a adição do HEMA como comonômero. A mistura foi mantida em repouso por mais 30 minutos e adicionou-se o agente de ligação cruzada (EDGMA) e o iniciador radicalar (ACHC). A solução foi degaseificada em banho de ultrassom sob vácuo por 10 minutos e depois purgada com nitrogênio por 15 minutos. O sistema de síntese foi vedado e aquecido a 80°C, sendo depois mantido por 24 horas sob agitação magnética constante. Após este tempo, foi obtida uma suspensão de partículas poliméricas. As partículas foram coletadas após secagem do solvente porogênico em capela de exaustão à temperatura ambiente.

Tabela 5 – Síntese dos polímeros impressos pela técnica de polimerização por precipitação usando donepezila como molécula molde.

Polímero	AMA (mmol)	HEMA (mmol)	GMA (mmol)	EDGMA (mmol)	Donepezila (mmol)
<i>MIP</i>	6,0	15,0	-	14,0	1,0
<i>RAM-MIP*</i>	6,0	15,0	15,0	14,0	1,0
<i>NIP</i>	6,0	15,0	-	14,0	-
<i>RAM-NIP*</i>	6,0	15,0	15,0	14,0	-

Fonte: Do autor.

AMA, ácido metacrílico; HEMA, 2-hidroxietilmetacrilato; GMA, glicidilmetacrilato; EDGMA, etilenoglicol dimetacrilato; MIP, polímero impresso molecularmente; NIP, polímero não-impresso (controle); RAM, material de acesso restrito. * Síntese em duas etapas.

A síntese em duas etapas (RAM-MIP e RAM-NIP) foi realizada de modo semelhante à síntese em etapa única. Entretanto, a polimerização foi iniciada a partir da mistura de 6 mmol de AMA e 8 mmol de EDGMA. Após 4 horas a 80°C, quando já era possível observar partículas em suspensão no meio reacional, adicionaram-se os reagentes da segunda etapa (mistura de 15 mmol de HEMA, 15 mmol de GMA e 6 mmol de EDGMA). A mistura foi mantida no reator por mais 20 horas a 80°C.

Os polímeros controle não-impessos (NIP e RAM-NIP) foram sintetizados conforme a mesma metodologia, porém, na ausência de donepezila.

3.3.8.1 *Lavagem e preparação das partículas poliméricas*

A etapa de lavagem das partículas para remoção da donepezila e dos reagentes residuais foi realizada em ciclos sucessivos de limpeza com solventes conforme descrito no item 3.3.6.1. Realizou-se a análise das soluções de lavagem por CLAE (item 3.3.2) para assegurar a completa remoção da donepezila. O preparo das partículas também foi realizado conforme descrito no item 3.3.6.1.

3.3.8.2 *Abertura do anel epóxido nos copolímeros contendo GMA*

Conforme a Tabela 17, os copolímeros impessos RAM-MIP e RAM-NIP tiveram a adição do comonômero GMA em sua síntese. O procedimento realizado foi o mesmo descrito no item 3.3.6.2.

3.3.9 *Caracterização dos MIPs usando donepezila como molécula molde*

As técnicas utilizadas para caracterização das partículas poliméricas e a metodologia para preparação das amostras serão descritas a seguir.

3.3.9.1 *ATR-FTIR*

Foram realizadas varreduras espectrais das partículas utilizando ATR-FTIR. Os espectros das partículas poliméricas antes e após lavagem foram obtidos na faixa de número de onda de 4000-400 cm^{-1} , sendo as amostras colocadas diretamente sobre o cristal de reflexão. Os espectros foram normalizados e as

bandas associadas aos grupamentos químicos foram avaliadas para caracterização dos materiais.

3.3.9.2 *Avaliação morfológica das partículas por técnicas de microscopia*

Estudos microscópicos foram realizados utilizando as técnicas MFA e MEV. A MFA. As amostras MIP e RAM-MIP, bem como seus respectivos controles, NIP e RAM-NIP, foram obtidas por MEV. As imagens do MIP e NIP também foram analisadas por MFA. As imagens por MEV e MFA foram obtidas conforme descrito no item 3.3.7.3. As áreas analisadas para obtenção das imagens topográficas por MFA foram de 20x20 μm^2 .

3.3.9.3 *Potencial zeta*

Os ensaios foram realizados conforme previamente descrito no item 3.3.7.7.

3.3.9.4 *Isotermas de adsorção*

Foi avaliada a isoterma de adsorção da donepezila nos polímeros MIP e NIP. Para isso, foram pesados cerca de 10,0 mg de polímero e, em seguida, adicionou-se 1 mL de uma solução de donepezila em diferentes concentrações (50, 100, 200, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) diluídas em acetonitrila. Após 24 horas à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas (3400 rpm por 15 minutos) de modo a ocorrer a deposição das partículas poliméricas. A concentração de fármaco livre em solução (sobrenadante) foi determinada por CLAE conforme descrito no item 3.3.2. A quantidade de donepezila adsorvida foi determinada pela diferença entre a concentração inicial na solução e após o equilíbrio. O ensaio foi realizado em triplicata.

A isoterma de adsorção da donepezila nos polímeros MIP e NIP também foi avaliada na presença de molécula análoga, a rivastigmina. Neste ensaio, foram pesados cerca de 10,0 mg de polímero e, em seguida, adicionou-se 1 mL de uma solução de donepezila em diferentes concentrações (50, 100, 200, 300, 400, 750 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) diluídas em acetonitrila, porém incluindo a rivastigmina. Em todos os pontos a concentração de rivastigmina foi constante, igual a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O

procedimento de preparo de amostra foi o mesmo descrito anteriormente.

A partir dos resultados, o ajuste dos dados foi testado nos modelos lineares de isotermas de adsorção de Langmuir e Freundlich. A isoterma na presença de rivastigmina foi avaliada adicionalmente quanto ao ajuste no modelo não-linear de Langmuir-Freundlich. As equações correspondentes a estes modelos foram apresentadas no item 3.3.7.6.

3.4 FORMULAÇÕES TRANSDÉRMICAS PARA LIBERAÇÃO DE NICOTINA

A composição das formulações está apresentada na Tabela 6. Cada formulação foi preparada em 200 mg do veículo indicado (monoleína ou óleo mineral), sendo as quantidades de polímero e fármaco diretamente incorporadas no veículo. As formulações foram acondicionadas em discos moldados em papel alumínio com área de 1,77 cm² para posterior aplicação na célula de difusão vertical (Figura 8), onde foram realizados os ensaios de liberação e permeação cutânea *in vitro*. Após o preparo, as formulações foram mantidas em repouso por 72 horas antes das avaliações.



Figura 8 – Formulações para liberação transdérmica de nicotina baseadas em MIPs.

Fonte: Do autor.

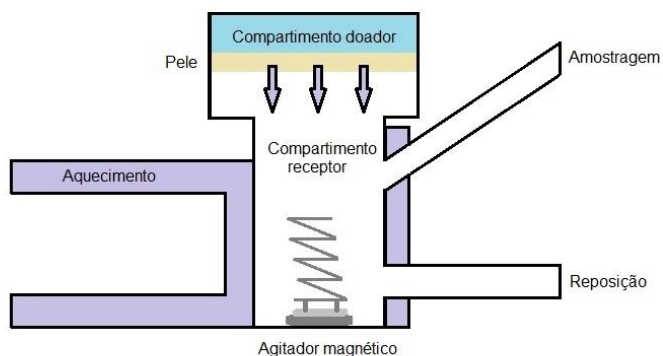
Tabela 6 – Formulações transdérmicas avaliadas para liberação de nicotina.

Formulação	Polímero	Razão fármaco: polímero (m/m)	Veículo	Quantidade de nicotina (mg)	Quantidade de polímero (mg)
C1	-	-	Monoleína	5,0	-
F1	MIP-1	1:10	Monoleína	5,0	50,0
F2	NIP-1	1:10	Monoleína	5,0	50,0
C2	-	-	Óleo mineral	5,0	-
C3	-	-	Óleo mineral	10,0	-
F3	MIP-1	1:10	Óleo mineral	5,0	50,0
F4	NIP-1	1:10	Óleo mineral	5,0	50,0
F5	MIP-1	1:5	Óleo mineral	10,0	50,0
F6	NIP-1	1:5	Óleo mineral	10,0	50,0
F7	MIP-2 síntese 1	1:5	Óleo mineral	10,0	50,0
F8	MIP-2 síntese 2	1:5	Óleo mineral	10,0	50,0
F9	NIP-2	1:5	Óleo mineral	10,0	50,0
F10	MIP-2 síntese 2	1:3	Óleo mineral	10,0	30,0
F11	NIP-2	1:3	Óleo mineral	10,0	30,0

Fonte: Do autor.

3.4.1 Ensaios de liberação e permeação cutânea *in vitro*

Os ensaios de liberação e permeação cutânea *in vitro* foram realizados em células de difusão vertical Hanson Research® com volume de 7,0 mL e área de difusão de 1,77 cm². A célula de difusão vertical está apresentada na Figura 9. As formulações foram aplicadas no compartimento doador e o compartimento receptor foi preenchido com o meio receptor isotônico.



(a)



(b)

Figura 9 - Célula de difusão vertical: (a) representação esquemática e (b) imagem do equipamento utilizado.

Fonte: Do autor.

3.4.1.1 Preparo do meio receptor isotônico

O meio receptor tampão fosfato isotônico $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 foi utilizado nos estudos de liberação e permeação cutânea. A solução tampão foi preparada a partir da dissolução de 1,732 g de fosfato de sódio dibásico, 1,0 g de fosfato de potássio monobásico, 8,0 g de cloreto de sódio e 0,2 g de cloreto de potássio em 1000 mL de água ultra pura. Em todos os casos, o pH do meio receptor foi ajustado para 7,4 com ácido fosfórico 85% e depois filtrado em membrana de PTFE modificado $0,45 \mu\text{m}$. A remoção de bolhas de ar foi realizada usando ultrassom por 60 minutos sob vácuo.

3.4.2 Ensaio de liberação *in vitro*

Os estudos de liberação foram realizados usando membranas de diálise

constituídas de celulose regenerada como suporte. As membranas foram previamente lavadas com água de osmose reversa. Durante os experimentos, o meio receptor foi mantido sob agitação magnética a 100 rpm à temperatura de 32 °C. Foram coletadas alíquotas de 1,0 mL do meio receptor em diferentes tempos com imediata reposição de meio aquecido a 32 °C. A quantificação da nicotina no meio receptor foi realizada por CLAE conforme o item 3.3.1. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4.3 Ensaio de permeação cutânea *in vitro*

Os estudos de permeação cutânea *in vitro* foram realizados utilizando pele da orelha de porcos. As orelhas foram obtidas do frigorífico Olhos d'Água (Ipuã, SP). A pele sem lesões superficiais foi higienizada com água potável e dissecada com auxílio de material cirúrgico para separação da cartilagem. Vasos sanguíneos, nervos e tecido adiposo também foram removidos. A pele preparada foi congelada a -70°C até a sua utilização nos estudos de permeação cutânea. As peles dissecadas foram descongeladas a temperatura ambiente antes do início dos ensaios. Fragmentos de pele foram cortados em tamanho compatível para cobrir a área de difusão efetiva do compartimento doador da célula de difusão vertical. A formulação foi aplicada sobre a camada córnea e a derme ficou em contato com o meio receptor. As células foram previamente preenchidas com o meio receptor isotônico que foi mantido sob agitação magnética a 600 rpm na temperatura de 32 °C. Foram coletadas amostras de 1,0 mL do meio receptor em diferentes tempos com imediata reposição do meio aquecido a 32°C. A quantificação da nicotina no meio receptor foi realizada por CLAE conforme o item 3.3.1.

3.4.4 Avaliação das cinéticas de liberação e permeação cutânea *in vitro*

Os dados obtidos dos estudos de liberação e permeação cutânea foram plotados como quantidade cumulativa permeada por área de difusão ($\mu\text{g cm}^{-2}$) em função do tempo (horas), e diferentes modelos cinéticos foram aplicados:

a) Ordem zero (concentração *versus* tempo);

$$Q_t = Q_0 + K_0 t$$

- b) Pseudo-primeira ordem ou Higuchi (concentração *versus* raiz quadrada do tempo);

$$Q_t/Q_0 = K_H t^{1/2}$$

- c) Primeira ordem (logaritmo da concentração *versus* tempo);

$$\log Q_t = \log Q_0 + K_1 t$$

em que, Q_t é a quantidade liberada (μg) no tempo t (horas), Q_0 é a quantidade inicial de nicotina no compartimento doador (μg), K_0 é a constante de ordem zero ($\mu\text{g h}^{-1}$), K_H é a constante de pseudo-primeira ordem ($\mu\text{g h}^{-1/2}$), K_1 é a constante de primeira ordem ($\mu\text{g h}^{-1}$).

O melhor ajuste para caracterizar a cinética de liberação e permeação cutânea foi determinado pelo r ajustado a partir de cada modelo. Após estabelecer o modelo cinético com melhor ajuste dos dados, determinou-se o fluxo de liberação e/ou permeação do fármaco, definido como a inclinação da reta no modelo selecionado.

3.5 FORMULAÇÕES BASEADAS EM MIPS PARA LIBERAÇÃO PROLONGADA DE DONEPEZILA

As formulações foram delineadas de modo a caracterizar a funcionalidade dos MIPS em adsorver seletivamente a donepezila a partir da solução de ácido oleico e prolongar a liberação do fármaco a partir da desorção/difusão da donepezila. Outros adjuvantes também foram avaliados em relação às suas propriedades em modificar a liberação do fármaco como a monoleína e o tensoativo Cremophor EL.

Foram preparadas formulações considerando diferentes razões fármaco: polímero (Tabela 7). As formulações foram preparadas mantendo a solução de donepezila em ácido oleico sob agitação junto às partículas de MIP ou RAM-MIP, por 12 horas. Em algumas formulações, o veículo empregado foi uma mistura de ácido oleico e monoleína (1:1) ou ácido oleico contendo o tensoativo não-iônico Cremophor EL a 5%. As formulações foram acondicionadas em cápsulas número zero para avaliar a liberação *in vitro*. As formulações controle foram preparadas da mesma forma usando o respectivo polímero não-impresso.

Tabela 7 – Formulações para liberação de donepezila baseadas em MIPs.

Formulação	Composição do veículo	Veículo (mg)	Polímero	Polímero (mg)	Razão Fármaco: Polímero (m/m)	Donepezila base livre (mg)
C1	Ácido oleico	300,0	-	-	-	20,0
F1	Ácido oleico	300,0	MIP	60,0	1:3	20,0
F2	Ácido oleico	300,0	MIP	120,0	1:6	20,0
F3	Ácido oleico	300,0	MIP	360,0	1:18	20,0
F4	Ácido oleico	300,0	RAM-MIP	360,0	1:18	20,0
C2	Ácido oleico + 5% Cremophor EL	150,0	-	-	-	10,0
F5	Ácido oleico + 5% Cremophor EL	150,0	MIP	60,0	1:6	10,0
C3	Ácido oleico: Monoleína (1:1)	150,0	-	-	-	10,0
F6	Ácido oleico: Monoleína (1:1)	150,0	MIP	60,0	1:6	10,0
F7	Ácido oleico: Monoleína (1:1)	150,0	RAM-MIP	60,0	1:6	10,0

Fonte: Do autor.

MIP, polímero impresso molecularmente; RAM, material de acesso restrito.

3.5.1 Avaliação da liberação *in vitro* da donepezila

Os ensaios de liberação foram realizados em aparelho dissolutor de cubas conforme o método descrito por Ruela, Carvalho e Pereira (2015). As condições

usadas foram: 900 mL de meio ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ + 0,5% (m/v) Tween 80, aparato II (pás), agitação de 100 rpm, temperatura de 37°C. Coletas de 5 mL foram realizadas em diferentes tempos para caracterizar o perfil de liberação com imediata reposição de meio previamente aquecido a 37°C. A quantificação do fármaco foi realizada por CLAE (item 3.3.2).

3.5.2 Avaliação da cinética de liberação *in vitro*

Os dados obtidos dos estudos de liberação foram plotados como porcentagem da quantidade cumulativa liberada (%) em função do tempo (horas), e diferentes modelos cinéticos foram testados:

- a) Pseudo-primeira ordem ou Higuchi (concentração *versus* raiz quadrada do tempo);

$$Q_t/Q_0 = K_H t^{1/2}$$

- b) Korsmeyer-Peppas (logaritmo fracional da liberação do fármaco *versus* logaritmo do tempo);

$$Q_t/Q_\infty = a t^n$$

em que, Q_t é a quantidade liberada (%) no tempo t (horas), Q_0 é a quantidade inicial de donepezila na formulação (100 %), Q_t/Q_∞ é a liberação fracional do fármaco, K_0 é a constante de ordem zero (mg h⁻¹), K_H é a constante de pseudo-primeira ordem (mg h^{-1/2}), a é uma constante que incorpora características estruturais e geométricas da forma farmacêutica, n é o expoente de liberação, indicativo do mecanismo de liberação.

O melhor ajuste para caracterizar a cinética de liberação foi determinado pelo r ajustado para cada modelo. Após estabelecer o modelo cinético com melhor ajuste, determinou-se a velocidade de liberação do fármaco, definida como a inclinação da reta no modelo selecionado.

3.6 ANÁLISE ESTADÍSTICA

Os resultados encontrados foram avaliados estatisticamente usando análise

de variância (ANOVA) seguida de teste Tukey para comparação de médias. O nível de significância utilizado $\alpha=5\%$. Valores de $P<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho serão apresentados em duas partes. Na primeira parte, serão apresentados e discutidos os resultados dos estudos para desenvolvimento de sistemas de liberação transdérmica de nicotina baseados em MIPs. Na segunda parte, serão apresentados e discutidos os resultados dos estudos para desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada de donepezila baseados em MIPs para administração oral.

4.1 NICOTINA

Foi devidamente realizada a caracterização físico-química da nicotina e do veículo (óleo mineral) selecionado para preparação das formulações. A solubilidade da nicotina em óleo mineral foi limitada. A nicotina é totalmente miscível em água, porém, apesar do valor determinado para a sua solubilidade em óleo mineral ser elevado ($25,17 \pm 0,21 \text{ mg mL}^{-1}$), ocorreu separação de fases ao se adicionar excesso do fármaco, uma vez que este se encontra no estado líquido e provavelmente ocorre a saturação do veículo com a nicotina.

A avaliação do coeficiente de partição da nicotina pelo método *shaking-flask* indicou que o fármaco teve maior afinidade pela água do que pelo óleo mineral (Tabela 8 e Figura 10), o que era esperado uma vez que a nicotina apresenta maior solubilidade em água do que em óleo mineral. Também foi possível observar que em pH ácido (pH 5,0), em que a nicotina se encontra ionizada na forma monoprótica, foi observada uma maior afinidade do fármaco pela fase aquosa com valor de $\log K = -2,28 \pm 0,81$. A afinidade da nicotina pelo óleo mineral foi maior em valores de pH elevados, à medida que a ionização do fármaco diminui. Porém, apesar da lipofilicidade da nicotina aumentar conforme com o aumento do pH, a afinidade do fármaco pela fase aquosa ainda é maior, o que pode ser evidenciado em pH 11, quando a nicotina está totalmente na forma não dissociada, porém apresentando $\log K = -0,17 \pm 0,01$. Desta forma, estes resultados permitiram evidenciar o caráter hidrofílico da nicotina e seu comportamento em relação ao veículo (óleo mineral). Os resultados também podem ser associados aos resultados do coeficiente de partição *n*-octanol/água, em que o valor encontrado foi de 1,28. O *n*-octanol é um álcool de cadeia longa e de polaridade mais alta que os hidrocarbonetos do óleo mineral, que

apresentam acentuada apolaridade, sendo esperada uma maior afinidade da nicotina pelo *n*-octanol do que pelo veículo avaliado. Além disso, é provável que interações entre o veículo óleo mineral e a nicotina devem apresentar magnitude insignificante, enquanto que interações entre *n*-octanol e nicotina poderiam ser mais fortes, como por exemplo, ligações de hidrogênio entre os grupos amina terciária da nicotina e a hidroxila alcoólica do *n*-octanol.

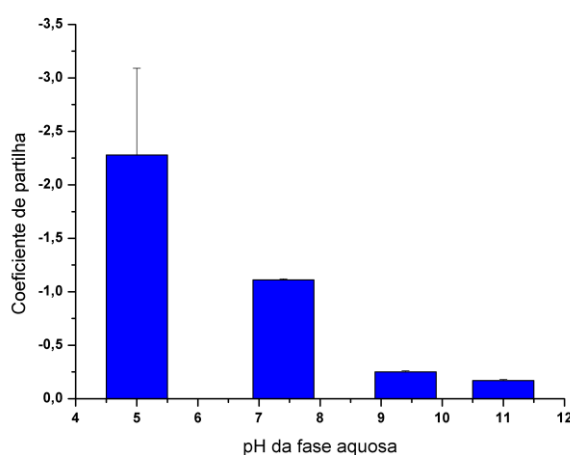


Figura 10 – Coeficientes de partilha da nicotina entre diferentes fases aquosas (tampões pH 5; 7,4; 11 e solução aquosa sem tamponamento, em que o pH final foi 9,4) e veículo óleo mineral ($n=3$).

Fonte: Do autor.

Tabela 10 – Coeficientes de partilha da nicotina veículo/água ($n=3$).

pH da fase aquosa	C_1	C_2	K	$\log K$
5,0	971,45 ± 11,33	961,12 ± 3,51	0,01 ± 0,01	-2,28 ± 0,81
7,4	970,35 ± 0,42	684,35 ± 21,07	0,42 ± 0,04	-0,38 ± 0,05
9,4	975,49 ± 3,07	626,28 ± 2,66	0,56 ± 0,01	-0,25 ± 0,01
11,0	949,83 ± 2,17	568,09 ± 1,87	0,67 ± 0,01	-0,17 ± 0,01

Fonte: Do autor.

C_1 , concentração da nicotina antes da partilha; C_2 , concentração da nicotina após a partilha; K , partilha da nicotina entre as duas fases imiscíveis; $\log K$, coeficiente de partilha.

4.1.1 Síntese dos polímeros

Os materiais poliméricos a serem avaliados como sistemas de liberação para a nicotina foram sintetizados pela técnica de polimerização por precipitação usando um grande volume de solvente porogênico (150 mL). Nesta condição, espera-se que partículas poliméricas insolúveis sejam prontamente formadas devido à densidade de reticulação das cadeias (EDGMA variando de 7,5 mmol a 30 mmol). Também foi desejável que as partículas apresentassem baixa polidispersão e formato esférico. A composição química das matrizes poliméricas é basicamente um copolímero poli(AMA-co-EDGMA) em que a introdução dos monômeros na matriz é aleatória e dependente da reatividade de cada par de monômeros conforme a reação de polimerização radicalar livre. Desta forma, os monômeros mais reativos serão introduzidos primeiramente na matriz polimérica e os monômeros com menor reatividade tendem a ser incorporados à medida que a concentração do monômero mais reativo diminui ao longo da reação de polimerização. Em alguns casos, a reatividade dos monômeros pode ser modificada antes da polimerização pela adição de uma maior concentração inicial da espécie monomérica menos reativa.

Os grupos carboxílicos do AMA podem interagir com os grupamentos contendo nitrogênio da nicotina, sendo que estas interações intermoleculares entre átomos eletronegativos do monômero e do fármaco são responsáveis pela adsorção do fármaco no polímero e pela modificação das características de liberação da molécula (RUELA; FIGUEIREDO; PEREIRA, 2014). Entretanto, a introdução de comonômeros (HEMA e GMA) pode aumentar a complexidade destas matrizes e modificar consideravelmente as características do polímero, principalmente aquelas relacionadas à incorporação dos monômeros na matriz polimérica, à afinidade do polímero pelo meio solvente e às interações fármaco-polímero. Entre as principais características do HEMA e do GMA, pode-se citar que estes monômeros podem estabelecer ligações de hidrogênio com a água e aumentar a afinidade dos polímeros por solventes aquosos (PUOCI et al., 2009).

Em todos os casos, pós finos foram obtidos após a síntese, de modo que as partículas foram prontamente formadas. Deste modo, para avaliar a incorporação dos monômeros nas partículas e para avaliar a morfologia e características relacionadas à performance dos materiais, foram necessários realizar estudos de caracterização usando diferentes técnicas.

4.1.2 Caracterização dos polímeros

Os ensaios de caracterização usando diferentes técnicas permitem a obtenção de informações complementares para estudar os materiais sintetizados e as interações fármaco-polímero.

4.1.2.1 ATR-FTIR

Os estudos por ATR-FTIR fornecem informações importantes quanto à incorporação de grupos funcionais na matriz polimérica e também permite o estudo das interações fármaco-polímero. Estas investigações são realizadas a partir da observação de bandas características dos grupos funcionais nos espectros de absorção, sendo importante observar o aparecimento ou desaparecimento de picos de absorção, deslocamento da frequência e aumento ou diminuição da intensidade das bandas.

A caracterização dos MIPs por ATR-FTIR foi realizada inicialmente com os componentes dos polímeros e o fármaco em isolado. A caracterização de cada substância baseou-se na identificação dos grupos funcionais destas moléculas.

Os espectros da nicotina e do veículo óleo mineral estão apresentados na Figura 11. O óleo mineral é uma mistura de hidrocarbonetos saturados com cadeias de 15 a 40 carbonos. Os estiramentos C-H simétricos e assimétricos (CH₂ e CH₃) podem ser observados em 2951, 2922 e 2852 cm⁻¹. O estiramento C-H sp³ é observado acima de 3000 cm⁻¹, sendo característico de cadeias alifáticas saturadas. As deformações angulares C-H são observadas em 1458 e 1377 cm⁻¹ e a vibração de deformação angular do metileno no plano “*rocking*” é observada em 721 cm⁻¹. O espectro da nicotina apresenta o estiramento C-H fora do plano do anel piridínico monossustituído em 716 cm⁻¹, o estiramento C=N em 1575 cm⁻¹ e as vibrações de deformação angular do metileno (C-H piridínico) de 1427 a 1477 cm⁻¹. O estiramento em 1316 cm⁻¹ é associado às ligações C-N.

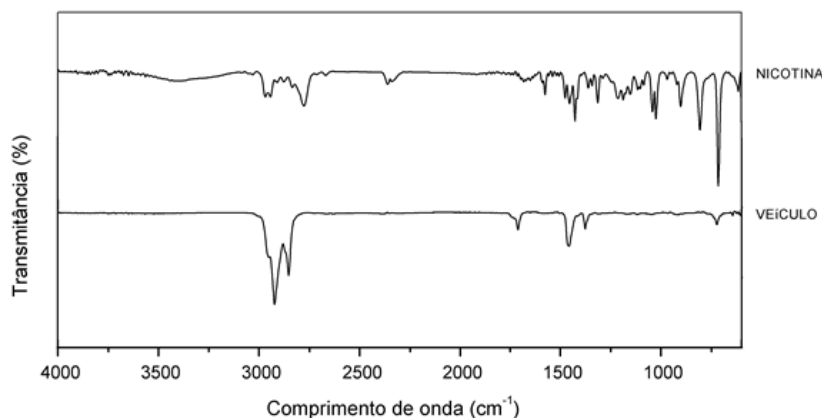


Figura 11 – Espectros de absorção obtidos por ATR-FTIR para nicotina e para o veículo óleo mineral.

Fonte: Do autor.

Os espectros dos monômeros AMA, HEMA e GMA estão apresentados na Figura 12. O AMA apresenta os estiramentos C-H sobrepostos pelo estiramento O-H do ácido carboxílico (2800 a 3100 cm^{-1}). É também possível observar o estiramento C=O (1692 cm^{-1}), estiramento C=C (1643 cm^{-1}), estiramento C-O (1298, 1220, 1202 e 1009 cm^{-1}) e as deformações angulares C-H (1454, 1431 e 1375 cm^{-1}). O HEMA apresenta os estiramentos C-H simétricos e assimétricos no plano (2957, 2932 e 2886 cm^{-1}), estiramento C=O do éster (1717 cm^{-1}), estiramento C=C (1636 cm^{-1}), estiramento C-O (1163, 1078 e 1030 cm^{-1}), estiramento de O-H do álcool (de 3600 a 3100 cm^{-1}) e as deformações angulares CH₂ e CH₃ (1454, 1404, 1379 e 1371 cm^{-1}). O GMA apresenta os estiramentos C-H simétricos e assimétricos no plano (3001, 2986, 2959 e 2930 cm^{-1}), estiramento C=O do éster (1717 cm^{-1}), estiramento C=C (1638 cm^{-1}), estiramento C-O (1155 e 1136 cm^{-1}) e as deformações angulares CH₂ e CH₃ (1454, 1434, e 1402 cm^{-1}).

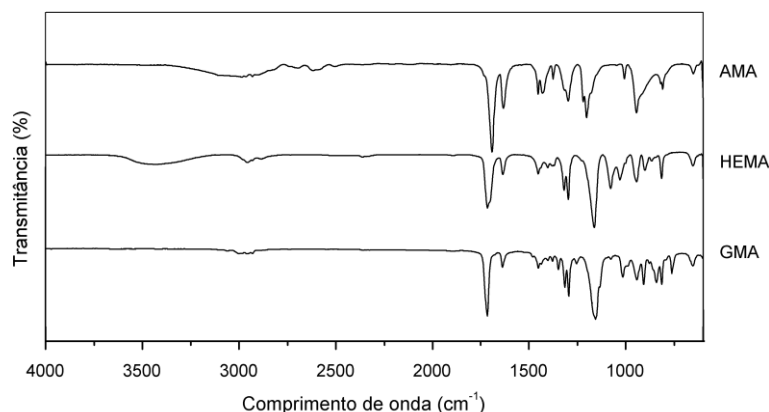


Figura 12 – Espectros de absorção obtidos por ATR-FTIR para os monômeros funcionais (ácido metacrílico, AMA; 2-hidroxietilmetacrilato, HEMA; glicidil metacrilato, GMA) utilizados na síntese dos polímeros.

Fonte: Do autor.

O EDGMA apresenta os estiramentos simétricos e assimétricos no plano (2982 , 2961 e 2930 cm^{-1}), estiramento $\text{C}=\text{O}$ (1717 cm^{-1}), estiramento $\text{C}=\text{C}$ (1638 cm^{-1}), estiramento $\text{C}-\text{O}$ (1148 cm^{-1}) e as deformações angulares CH_2 e CH_3 (1404 , 1377 e 1368 cm^{-1}), conforme observado na Figura 13. O homopolímero poli(EDGMA) apresentou praticamente as mesmas bandas que o monômero EDGMA. O homopolímero foi avaliado sem ser submetido às etapas de lavagem, de modo a observar o estiramento $\text{C}=\text{C}$ (1638 cm^{-1}). Entretanto, foi possível observar o aparecimento de uma banda em 754 cm^{-1} , relacionada à reação de polimerização, sendo correspondente à vibração de deformação angular do metileno no plano “*rocking*”. Ao mesmo tempo, observou-se uma diminuição da intensidade da banda do estiramento $\text{C}=\text{C}$ (1638 cm^{-1}). É interessante observar que a banda em 754 cm^{-1} aparece nos espectros dos demais copolímeros (MIPs e NIPs) apresentados a seguir nas Figuras 14 a 17.

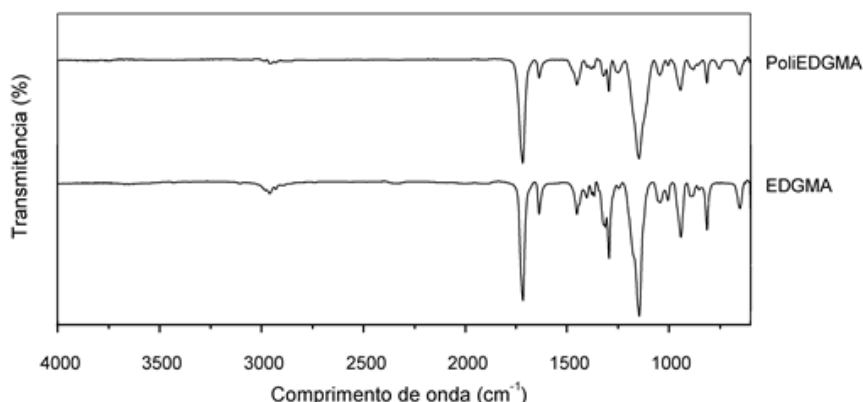


Figura 13 – Espectros de absorção obtidos por ATR-FTIR para o monômero EDGMA empregado como agente de ligação cruzada e seu respectivo homopolímero poli(EDGMA).

Fonte: Do autor.

Os espectros dos polímeros sem carregamento não apresentaram diferenças significativas (Figuras 14 e 15). Entretanto é possível observar a incorporação dos outros monômeros na rede tridimensional do EDGMA ao se analisar as diferenças espectrais entre o espectro do homopolímero de EDGMA (Figura 13). Os copolímeros apresentaram os estiramentos C-H simétricos e assimétricos sobrepostos aos estiramentos O-H do ácido carboxílico (aproximadamente 3000 cm^{-1}), estiramento C=O (1724 cm^{-1}), estiramento C=C (1638 cm^{-1}), estiramento C-O (1150 cm^{-1}) e as vibrações de deformações angulares CH₂ e CH₃ (em torno de 1460 cm^{-1}). Não houve diferenças significativas em relação aos espectros dos copolímeros carregados, com exceção do aparecimento de uma banda em 716 cm^{-1} (Figura 16 e 17). Esta banda corresponde ao estiramento C-H fora do plano do anel piridínico monossustituído da nicotina em 716 cm^{-1} conforme a Figura 9. A confirmação dos resultados foi realizada por estudos de ATR-FTIR em placa de aquecimento, em que os espectros são coletados em função de um programa de temperatura. A amostra MIP-2 foi avaliada, bem como seu respectivo controle. Conforme os resultados, a nicotina isolada (Figura 18) volatilizou totalmente a temperaturas maiores que 190°C , observado pelo desaparecimento das bandas características do fármaco. Os copolímeros sem carregamento (Figura 19) não apresentaram alterações significativas nos espectros decorrentes do aumento da temperatura até 230°C . Nos polímeros carregados (Figura 20), observou-se no MIP

uma diminuição da banda em 716 cm^{-1} do polímero carregado, porém até 230°C ainda foi possível observá-la. NoNIP, a banda em 716 cm^{-1} do polímero carregado desapareceu em torno de 165°C .

Os resultados dos estudos por ATR-FTIR usando placa de aquecimento colaboraram para demonstrar que a nicotina foi adsorvida na matriz polimérica, porém pode sofrer dessorção térmica, uma vez que é um fármaco volátil e interage com o polímero por meio de interações intermoleculares, sobretudo, ligações de hidrogênio. Desta maneira, as interações fármaco-polímero são caracterizadas como interações reversíveis, o que torna interessante a avaliação destes materiais como sistemas de liberação de fármacos.

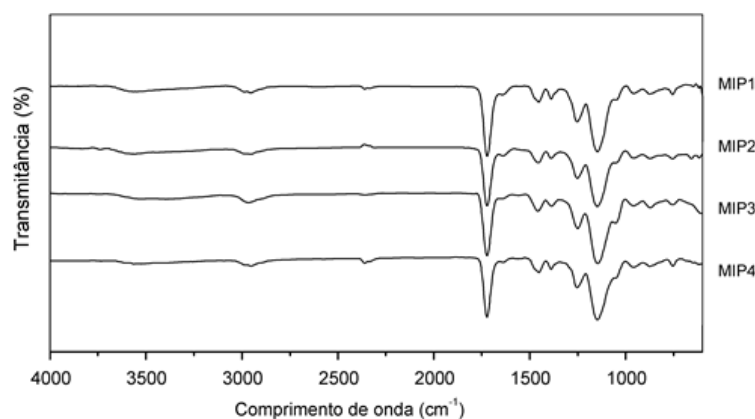


Figura 14 – Espectros de absorção obtidos por ATR-FTIR para os polímeros impressos (MIPs) sem carregamento.

Fonte: Do autor.

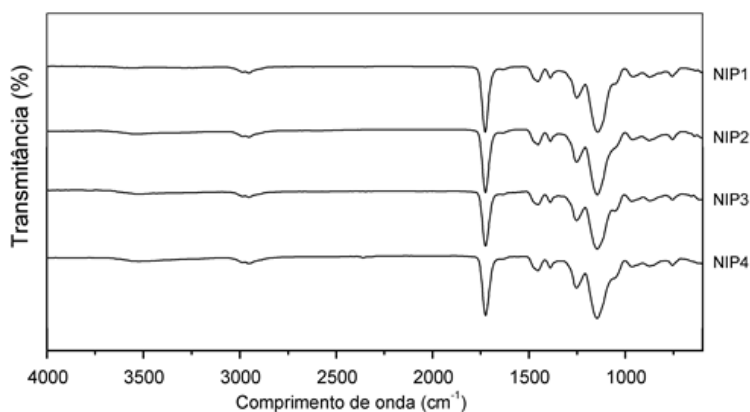


Figura 15 – Espectros de absorção obtidos por ATR-FTIR para os polímeros não impressos (NIPs) sem carregamento.

Fonte: Do autor.

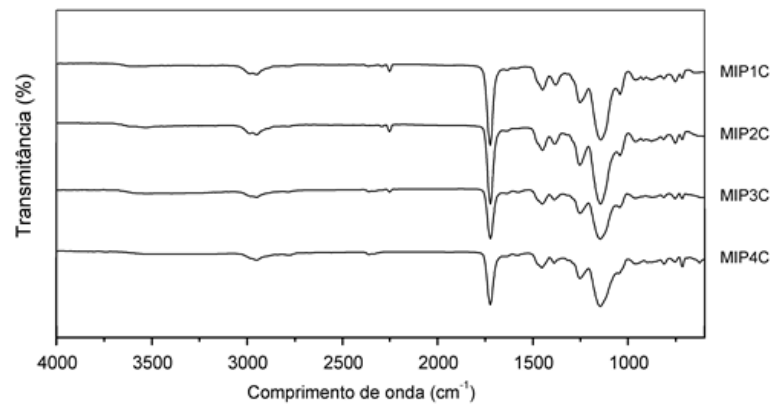


Figura 16 – Espectros de absorção obtidos por ATR-FTIR para os polímeros impressos (MIPs) carregados com nicotina.

Fonte: Do autor.

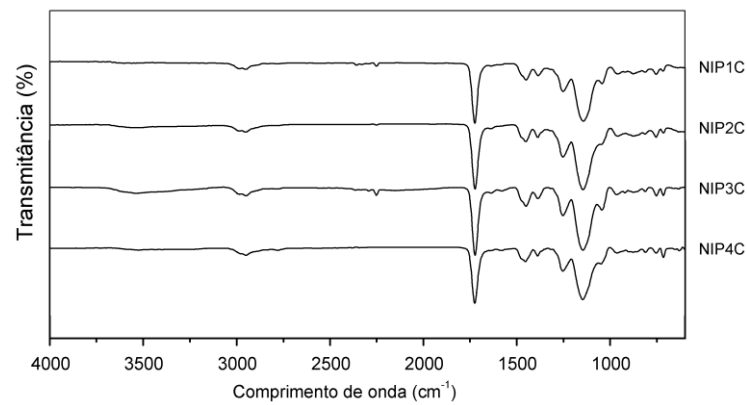


Figura 17 – Espectros de absorção obtidos por ATR-FTIR para os polímeros não impressos (NIPs) carregados com nicotina.

Fonte: Do autor.

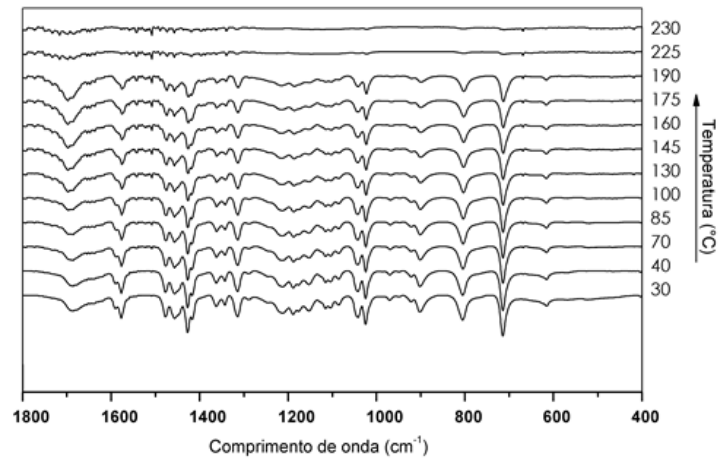
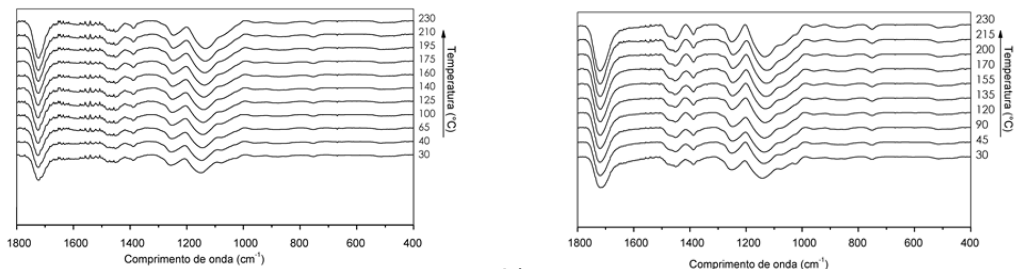


Figura 18 – Espectros de absorção “hotstage” obtidos por ATR-FTIR para a nicotina.

Fonte: Do autor.

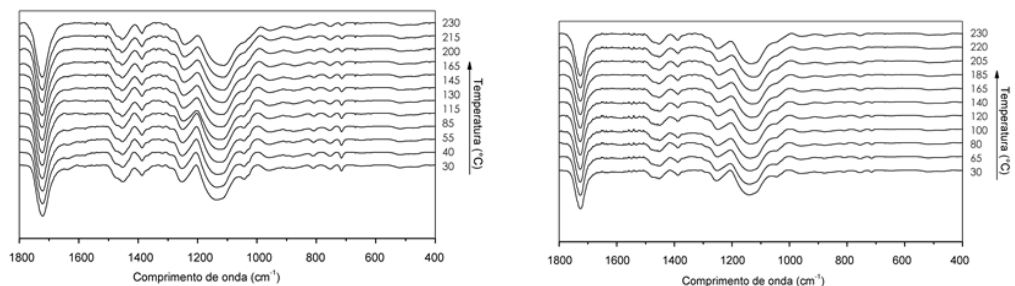


a)

b)

Figura 19 – Espectros de absorção “hot stage” obtidos por ATR-FTIR para os MIP-2 (a) e NIP-2 (b) sem carregamento com nicotina.

Fonte: Do autor.



a)

b)

Figura 20 – Espectros de absorção “hot stage” obtidos por ATR-FTIR para os MIP-2 (a) e NIP-2 (b) carregados com nicotina.

Fonte: Do autor.

4.1.2.2 Potencial zeta

Foram determinados o potencial zeta das partículas de MIP-1 e MIP-2 (síntese 1 e síntese 2), bem como seus respectivos controles (NIP-1 e NIP-2). Também foi determinado o potencial zeta do poli(EDGMA). Os valores de potencial zeta determinados foram negativos, o que era esperado, uma vez que o AMA incorporado nas partículas poliméricas lhes confere uma carga superficial negativa. Os valores para MIP-1, MIP-2 síntese 1 e MIP-2 síntese 2 foram, respectivamente, $-33,3 \pm 0,9$ mV; $-33,2 \pm 0,2$ mV e $-28,8 \pm 2,8$ mV. Os valores determinados para NIP-1 e NIP-2 foram, respectivamente, $-41,4 \pm 1,9$ mV e $-30,5 \pm 0,2$ mV. O poli-(EDGMA) apresentou valor $0,1 \pm 0,2$ mV, indicando a neutralidade de cargas superficiais destas partículas, uma vez que o homopolímero composto por EDGMA não contém grupamentos ionizáveis em sua composição química.

4.1.2.3 Avaliação da morfologia dos materiais

As imagens topográficas das partículas de MIP-1 e NIP-1 obtidas por MFA estão apresentadas nas Figuras de 21 a 24. Os estudos por MFA foram realizados para avaliar a viabilidade da técnica de síntese de polimerização por precipitação usando o reator montado conforme descrito no item 3.3.6. Ambos os materiais apresentaram partículas de formato esférico com aparente baixa polidispersão. Entretanto, foi possível visualizar que as partículas de NIPs apresentaram tamanho menor do que as partículas de MIPs. Nas Figuras 21 e 22 foi possível observar partículas isoladas e aglomerados de partículas, enquanto que as Figuras 23 e 24 apresentam as partículas em maior concentração, na forma de um aglomerado maior. Outra consideração importante é a rugosidade na superfície das partículas, o que pode ser um indicativo da porosidade do material.

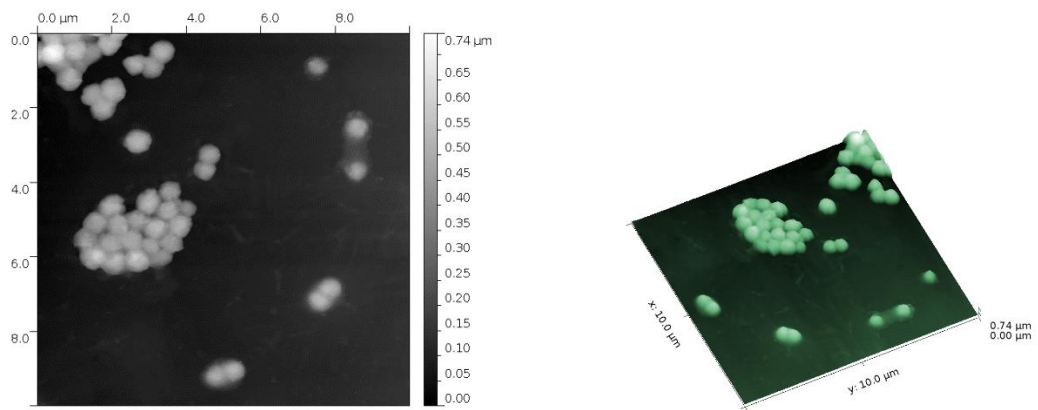


Figura 21 – Imagem topográfica do MIP-1 obtida por MFA ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$).

Fonte: Do autor.

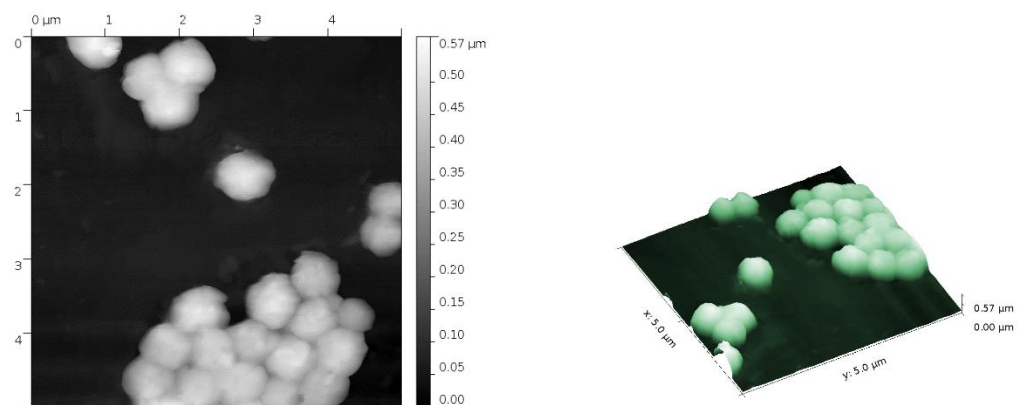


Figura 22 – Imagem topográfica do MIP-1 obtida por MFA ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$).

Fonte: Do autor.

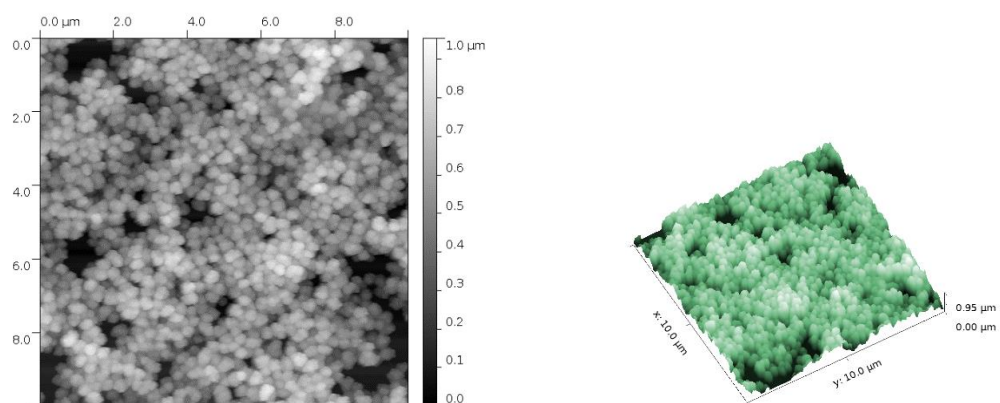


Figura 23 – Imagem topográfica do NIP-1 obtida por MFA ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$).

Fonte: Do autor.

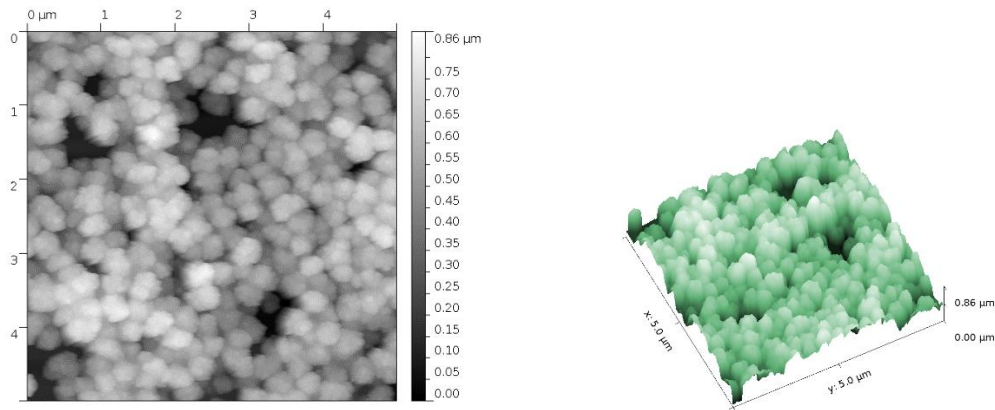


Figura 24 – Imagem topográfica do NIP-1 obtida por MFA ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$).

Fonte: Do autor.

Posteriormente, foram realizados estudos microscópicos das partículas por MEV (Figuras 25 a 29). Os resultados demonstraram que as partículas de MIP-2 e MIP-7 apresentaram morfologia irregular e com tamanho de partícula bastante variável. Estes resultados não eram esperados, uma vez que ao se utilizar a técnica de polimerização por precipitação eram esperadas partículas esféricas e com baixa polidispersão. Entretanto, as partículas de NIP-2 e NIP-7 apresentaram morfologia esférica com tamanho de significativamente menor. Uma vez que partículas amorfas foram observadas somente nos MIPs contendo HEMA, sugere-se que estes resultados podem estar associados às interações entre nicotina e HEMA, resultando em uma alteração morfológica das partículas poliméricas.

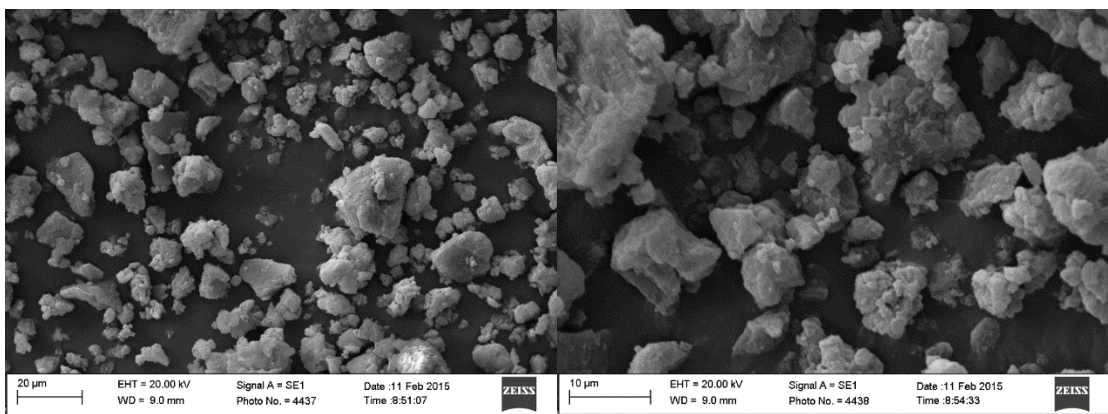


Figura 25 – Imagens do MIP-2 (síntese 1) em dois campos diferentes obtidas por MEV (2000 x e 5000 x).

Fonte: Do autor.

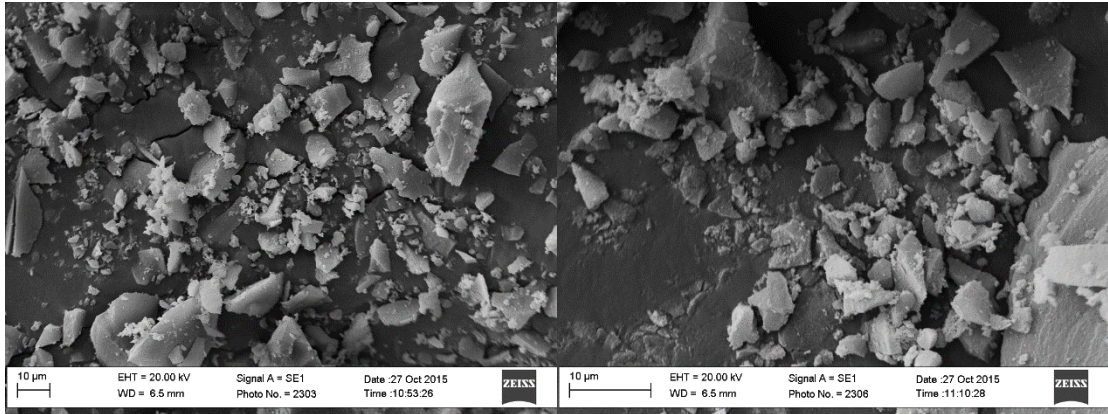


Figura 26 – Imagens do MIP-2 (síntese 2) em dois campos diferentes obtidas por MEV (2000 x e 5000 x).

Fonte: Do autor.

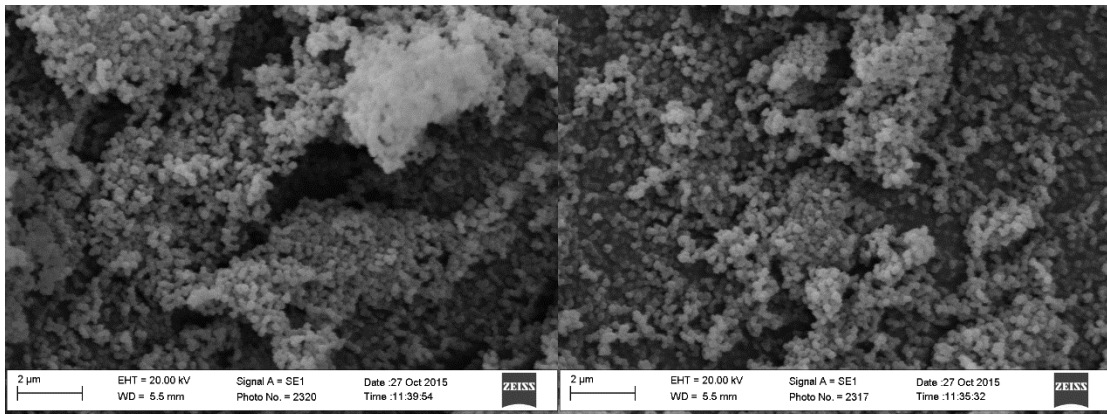


Figura 27 – Imagens do NIP-2 em dois campos diferentes obtidas por MEV (20000 x).

Fonte: Do autor.

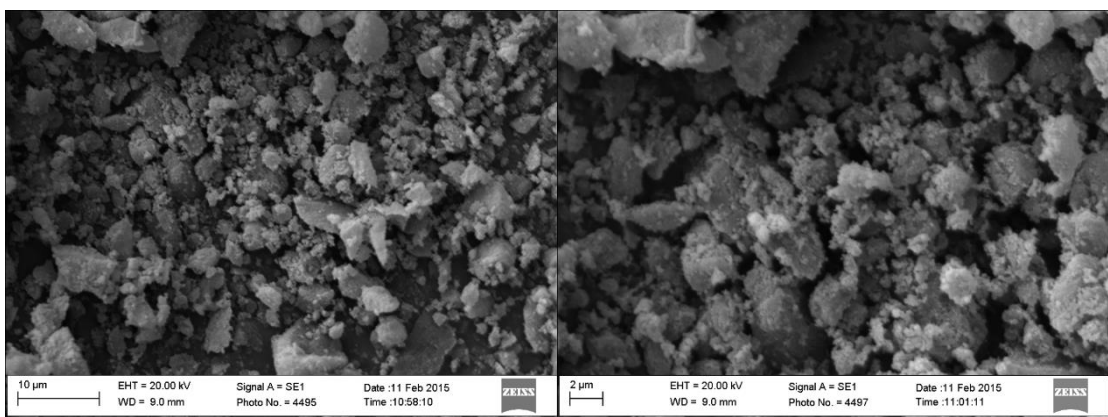


Figura 28 – Imagens do MIP-7 em dois campos diferentes obtidas por MEV (5000 x e 10000 x).

Fonte: Do autor.

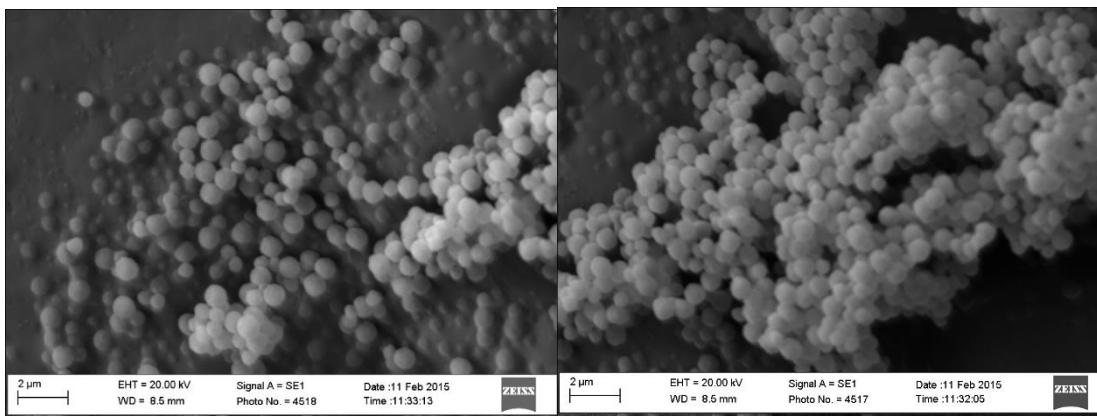


Figura 29 – Imagens do NIP-7 em dois campos diferentes obtidas por MEV (15000 x).

Fonte: Do autor.

4.1.2.4 Estudos de intumescimento dos polímeros

Os MIPs apresentaram significativa capacidade de intumescimento em meio aquoso, tanto em meio ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}=1,2$) como em meio tampão fosfato $\text{pH } 7,4$ (Tabela 9). Entretanto, os NIPs apresentaram uma capacidade de inchaço significativamente menor ($P < 0,05$), com valores em ordem de magnitude, de 3 a 5 vezes menores que os MIPs. Estes resultados foram associados a uma provável maior porosidade das partículas impressas, o que favoreceu o seu intumescimento em meio aquoso. A maior porosidade poderia estar associada neste caso à presença do *template* durante a síntese dos polímeros. Diferentes valores de pH foram avaliados de modo a considerar o efeito da ionização do monômero funcional ácido metacrílico ($pK_a=4,66$) presente nas partículas poliméricas (YANG et al, 2007; FIGUEIREDO et al., 2009). Em meio ácido, o polímero está na forma não dissociada e as interações entre o monômero ácido e a água são provavelmente do tipo ligações de hidrogênio, sendo esperado um menor intumescimento em pH ácido do que em $\text{pH } 7,4$. Uma vez que em $\text{pH } 7,4$ os grupamentos do monômero ácido estão ionizados, esperava-se uma maior interação do polímero com a água decorrente da hidratação dos grupos aniônicos. Entretanto, em ambos os valores de pH , a porcentagem de intumescimento do MIP e NIP foram muito semelhantes, indicando pouco efeito da ionização das partículas poliméricas nas suas características de intumescimento. É importante ainda considerar que o MIP-2 poderia apresentar maior intumescimento decorrente da incorporação do monômero

neutro HEMA, que por sua vez pode estabelecer ligações de hidrogênio com a água. Porém, resultados semelhantes em meios aquosos foram observados para MIP-1 e MIP-2, sendo que o MIP-1 não contém o monômero neutro. Deste modo, pode-se observar que o HEMA apresentou uma influência pouco significativa no intumescimento das partículas de MIPs.

No veículo (óleo mineral), ambos os polímeros apresentaram uma menor porcentagem de intumescimento, sem diferenças significativas entre MIP e NIP. Estes resultados podem estar associados a uma menor hidrofobicidade das partículas poliméricas sintetizadas. É importante notar que as partículas são densamente reticuladas com o EDGMA, um monômero hidrofóbico e insolúvel em meios aquosos. Porém, a incorporação dos monômeros ácidos ou neutros na rede polimérica podem ter modificado estas propriedades na matriz polimérica, aumentando a compatibilidade dos polímeros com água. Estas propriedades macromoleculares dos materiais também podem estar associadas à técnica de síntese de polimerização por precipitação, que devido à obtenção de partículas menores e, possivelmente, mais porosas, pode aumentar o acesso dos solventes aquosos à rede polimérica, permitindo a penetração de maiores quantidades de água.

Tabela 9 – Estudos de intumescimento dos polímeros sintetizados ($n=3$). Valores expressos em porcentagem de intumescimento (%).

Polímero	Ácido clorídrico	Tampão fosfato pH 7,4	Óleo mineral
	0,1 mol L ⁻¹		
MIP-1	84,0 ± 5,2	127,0 ± 4,2	ND
NIP-1	31,0 ± 3,2	21,2 ± 4,0	ND
MIP-2 Síntese 1	ND	124,1 ± 6,8	ND
MIP-2 Síntese 2	81,3 ± 6,0	84,7 ± 6,0	14,8 ± 3,2
NIP-2	34,7 ± 2,4	32,4 ± 3,4	12,9 ± 0,3

Fonte: Do autor.

ND, não determinado; n , número de determinações.

4.1.2.5 Adsorção da nicotina nos polímeros

Os estudos de validação analítica apresentaram resultados satisfatórios para a metodologia para avaliação da adsorção da nicotina nos MIPs usando óleo mineral

como veículo. De acordo com o estudo de seletividade, picos de interferentes não foram detectados no mesmo tempo de retenção da nicotina na amostra extraída de branco (óleo mineral).

O método apresentou-se linear no intervalo de 25,0 a 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a curva extraída e para a curva sem extração. A equação de reta e o r obtidos para curva sem extração (preparada e injetada diretamente em água) foram de, respectivamente, $y = 49424x - 148087$ e 0,999810. equação da reta e o r obtidos para curva extraída foram de, respectivamente, $y = 28842x - 55556$ e 0,999835. As curvas de calibração estão apresentadas na Figura 30. Sendo assim, foi possível demonstrar que a nicotina não é completamente recuperada do óleo mineral usando água como solvente extrator, porém foi possível demonstrar a linearidade do método no intervalo de concentrações estudado usando o método proposto.

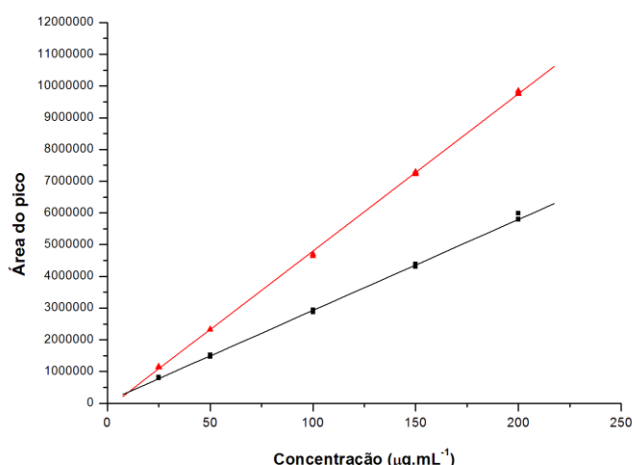


Figura 30 – Representação das curvas de calibração da nicotina analisadas por CLAE para a metodologia para avaliação da adsorção da nicotina. A curva extraída está apresentada em preto e a curva não-extraída em vermelho.

Fonte: Do autor.

Os resultados de exatidão e precisão do método analítico estão apresentados na Tabela 10. Os resultados foram considerados satisfatórios conforme a finalidade dos estudos.

Tabela 10 – Resultados obtidos na determinação da precisão do método analítico para determinação da nicotina.

Concentração nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisão (DPR, $n=6$)		Exatidão (E , $n=6$)	
	<i>Intra-dia</i>	<i>Inter-dia</i>	<i>Intra-dia</i>	<i>Inter-dia</i>
100,0	2,32	0,91	95,61	95,81

Fonte: Do autor.

DPR, coeficiente de variação (%); E , erro relativo (%); n , número de determinações.

Da mesma forma, os resultados para avaliação da diluição das amostras estão apresentados na Tabela 11 e também mostraram resultados satisfatórios.

Tabela 11 – Resultados obtidos na avaliação da diluição de amostras.

Concentração nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (R , $n=3$) \pm DP (%)
500,0	101,95 \pm 0,27
1000,0	100,25 \pm 0,78

Fonte: Do autor.

R , recuperação (%); DP, desvio padrão; n , número de determinações.

Estudos de adsorção foram realizados inicialmente em duas concentrações de nicotina (100 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), de modo a realizar uma triagem dos vários polímeros sintetizados para selecionar aqueles com maior potencial para serem aplicados como sistemas de liberação de fármacos. A adsorção da nicotina nos polímeros foi avaliada primeiramente em uma concentração maior do fármaco (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sendo que o fator de impressão foi calculado como a razão entre a massa adsorvida de fármaco no MIP em relação ao seu respectivo controle (NIP), determinando a seletividade de cada material (Tabela 12). O poli-(EDGMA) também foi avaliado. Este polímero não contém grupamentos carboxílicos nem outros grupamentos ionizáveis, porém mesmo assim houve a adsorção da nicotina no polímero na extensão de 8,5%. Neste caso, a adsorção do fármaco no EDGMA ocorre de modo não seletivo devido às interações dipolo-dipolo, forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio, provavelmente a partir dos grupamentos carbonila

(C=O) presentes na estrutura química deste monômero.

Uma notável capacidade de adsorção da nicotina foi determinada no MIP-1 (51,5% de nicotina adsorvida na matriz impressa e 53,6% no controle, NIP-1), o que pode ser associado à presença de AMA na matriz polimérica. O fator de impressão não indicou seletividade do MIP-1 em relação ao NIP-1, o que pode estar relacionado à amplitude das interações dos grupos ácido carboxílico do AMA com a nicotina. Os copolímeros MIP-2, MIP-3 e MIP-4 foram sintetizados contendo as mesmas proporções de AMA e EDGMA, porém com adição de comonômeros (HEMA ou GMA, ou ambos, conforme a Tabela 9). A adsorção da nicotina no MIP-2, MIP-3 e MIP-4 também foi alta. É importante mencionar que o HEMA e o GMA não contêm grupos ionizáveis como o AMA e isto pode levar a uma diminuição da amplitude das interações fármaco-polímero, resultando em interações mais fracas. O MIP-2 apresentou maior seletividade conforme o fator de impressão (1,76), demonstrando que a presença de HEMA pode ocasionar um efeito de estabilização na matriz polimérica, reduzindo interações de natureza não-seletiva. O MIP-2 foi sintetizado duas vezes e resultados semelhantes de adsorção foram encontrados. Os MIP-3 e MIP-4 não apresentaram seletividade, sendo este comportamento associado a uma incompatibilidade entre GMA e nicotina. É provável que uma reação química entre os grupos epóxido do GMA e os grupos amina da nicotina tenha ocorrido, levando à incorporação de nicotina ligada covalentemente na matriz dos MIP-3 e MIP-4. Este fato pode ter prejudicado a adsorção da nicotina nestes copolímeros, uma vez que a nicotina ligada covalentemente impediu a adsorção do fármaco durante estes estudos. Realizou-se um teste em tubo de ensaio, em que a nicotina na forma pura foi misturada a um mesmo volume do monômero GMA, sendo observado o desenvolvimento de uma coloração escura após a mistura.

Tabela 12 – Adsorção da nicotina avaliada na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nos polímeros ($n=3$).

Polímero	Massa adsorvida \pm DP ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	Fator de impressão
Poli-(EDGMA)	4,45 \pm 0,33	-
MIP-1	27,01 \pm 2,65	0,96
NIP-1	28,06 \pm 6,27	
MIP-2 síntese 1	26,39 \pm 3,36	1,78
NIP-2	14,79 \pm 1,11	
MIP-2 síntese 2	26,96 \pm 3,34	1,82
MIP-3	23,84 \pm 0,60	0,91
NIP-3	26,07 \pm 0,56	
MIP-4	17,77 \pm 0,36	0,88
NIP-4	20,19 \pm 1,26	
MIP-5	28,12 \pm 0,27	0,95
NIP-5	29,54 \pm 1,68	
MIP-6	5,95 \pm 0,71	1,57
NIP-6	3,79 \pm 0,65	
MIP-7	7,06 \pm 0,33	1,39
NIP-7	5,08 \pm 0,87	

Fonte: Do autor.

n , número de determinações.

Os MIP-5, MIP-6 e MIP-7 foram sintetizados a partir de protocolos considerando variações da quantidade de molécula molde, quantidade de agente de ligação cruzada e monômeros funcionais. O MIP-5 foi sintetizado com uma menor quantidade de nicotina (redução de 1,875 mmol para 0,625 mmol), porém não se observaram alterações significativas na capacidade de adsorção dos materiais, nem aumento do fator de impressão molecular. O MIP-6 foi sintetizado reduzindo a quantidade de agente de ligação cruzada. O EDGMA foi reduzido de 30 mmol para 7,5 mmol, sendo que a quantidade de AMA não foi alterada em relação ao MIP-1 (7,5 mmol), de modo a obter um copolímero em proporções equimolares de AMA:EDGMA. A capacidade de adsorção do MIP-6 foi drasticamente reduzida (11,4% para MIP e 7,2% para NIP) e o material apresentou fator de impressão de 1,57. É possível deduzir que o EDGMA confere rigidez à matriz polimérica das partículas, e este fator é importante para favorecer a adsorção do fármaco no

polímero. Sendo assim, a menor densidade de reticulação da rede polimérica no caso do MIP-6 em relação ao MIP-1 pode estar associada à menor capacidade de adsorção do MIP-6. O MIP-7 foi sintetizado em duas etapas e com menor densidade de reticulação, incluindo um aumento considerável nas proporções de HEMA (de 7,5 mmol para 30,0 mmol). O copolímero MIP-7 apresentou diminuição da capacidade de adsorção, entretanto, o mesmo foi seletivo em relação ao NIP-7 (fator de impressão 1,39). Na primeira etapa de síntese do MIP-7 foram adicionados os monômeros ácidos (AMA), enquanto que na segunda etapa foram adicionadas as maiores proporções do monômero neutro HEMA e do agente de ligação cruzada (EDGMA), de modo a obter uma superfície das partículas com menor número de grupamentos ácidos. Apesar do MIP-7 apresentar maior adsorção da nicotina do que o NIP-7, estes polímeros não foram considerados como potenciais sistemas de liberação devido à baixa capacidade de adsorção em comparação com os outros polímeros sintetizados.

Estudos de adsorção foram realizados com menor concentração de fármaco ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados (Tabela 13) foram coerentes com os experimentos anteriores usando $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nicotina. O MIP-1 não apresentou diferenças em relação ao NIP-1 e teve maior capacidade de adsorção que o MIP-2. O MIP-1 adsorveu 80,3% da nicotina no meio, enquanto o MIP-2 adsorveu 62,9%. O fator de impressão para o MIP-1 foi de 1,0, não demonstrando seletividade, entretanto, o fator de impressão para o MIP-2 foi consideravelmente maior, igual a 2,42. Os polímeros MIP-3 e MIP-4 apresentaram baixa seletividade em relação aos seus respectivos controles, NIP-3 e NIP-4. O MIP-5 também não apresentou diferenças em relação ao NIP-5 e apresentou capacidade de adsorção (82,0%) muito semelhante ao MIP-1, o que foi associado à constituição de ambos serem muito semelhantes. Os polímeros com menor densidade de reticulação (MIP-6 e MIP-7) apresentaram menor capacidade de adsorção, da mesma forma que nos experimentos anteriores, porém observou-se um aumento da seletividade dos materiais. Os fatores de impressão foram de 1,60 e 2,56, respectivamente para os MIP-6 e MIP-7. O MIP-6 e seu controle adsorveram respectivamente 22,4% e 14,0% da nicotina do meio e o MIP-7 e seu controle adsorveram 23,9% e 9,3%, respectivamente. É importante considerar que foi esperado um aumento da seletividade dos polímeros ao avaliá-los quanto à adsorção usando menores concentrações de fármaco, pois ocorre uma tendência em aumentar a afinidade do

fármaco pelos sítios seletivos e reduzir a interação não seletiva com a matriz polimérica.

Tabela 13 – Adsorção da nicotina avaliada na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ nos polímeros ($n=3$).

Polímero	Massa adsorvida \pm DP ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	Fator de impressão
MIP-1	$8,41 \pm 0,18$	1,00
NIP-1	$8,42 \pm 0,26$	
MIP-2 síntese 1	$6,36 \pm 0,41$	2,42
NIP-2	$2,62 \pm 0,03$	
MIP-2 síntese 2	$6,94 \pm 0,82$	2,65
MIP-3	$7,37 \pm 0,06$	1,02
NIP-3	$7,20 \pm 0,18$	
MIP-4	$6,00 \pm 0,22$	0,80
NIP-4	$7,51 \pm 0,20$	
MIP-5	$8,59 \pm 0,47$	0,98
NIP-5	$8,74 \pm 0,18$	
MIP-6	$2,35 \pm 0,01$	1,60
NIP-6	$1,47 \pm 0,35$	
MIP-7	$2,50 \pm 0,20$	2,56
NIP-7	$0,98 \pm 0,09$	

Fonte: Do autor.

n , número de determinações.

4.1.2.6 Isotermas de adsorção

O modelo não-linear de isoterma de Langmuir-Freundlich apresentou melhor ajuste aos dados de adsorção da nicotina nos MIP-2 e NIP-2, de modo a determinar a capacidade de adsorção máxima (M) com maior exatidão (Tabela 14). Este modelo de isoterma indica a presença de sítios heterogêneos na matriz polimérica. Os resultados podem ser associados à adsorção da nicotina em uma ampla variedade de concentrações, em que a afinidade do fármaco por sítios de maior ou menor seletividade torna-se variável e um fenômeno de maior complexidade à medida que ocorre a saturação de uma determinada população de sítios de ligação (UMPLEBY, 2004; SEGATELLI et al., 2010). É importante considerar que a natureza dos

monômeros AMA e HEMA podem permitir à nicotina interagir de maneira diferente com sítios de ligação presentes nas partículas poliméricas. Sendo assim, apesar das ligações de hidrogênio serem consideradas a principal força para adsorção do fármaco nos polímeros, a magnitude destas interações deve ser variável entre os diferentes comonômeros.

Tabela 14 – Modelos de isoterma de adsorção avaliados ($n=3$).

Modelos	<i>M</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>E</i>	β	<i>E</i>	r^2
Langmuir (MIP-2)	80,27713	8,51140	0,00225	0,00043	-	-	0,97678
Langmuir (MIP- síntese 2)	41,04643	2,89271	0,00642	0,00135	-	-	0,94773
Langmuir (NIP-2)	87,11279	42,64688	0,00050	0,00032	-	-	0,93851
Freundlich (MIP-2)	-	-	0,75302	0,18656	0,64973	0,04101	0,97143
Freundlich (MIP2-síntese 2)	-	-	1,57328	0,38753	0,48247	0,04094	0,94355
Freundlich (NIP-2)	-	-	0,08362	0,04713	0,8562	0,08698	0,93396
Langmuir- Freundlich (MIP-2)	59,51712	7,77832	0,00153	0,00095	1,18061	0,15981	0,98085
Langmuir- Freundlich (MIP2 síntese 2)	53,95814	18,81605	0,01152	0,00489	0,77201	0,18102	0,94855
Langmuir- Freundlich (NIP-2)	38,08351	13,64653	0,00014	0,00025	1,41019	0,38043	0,93879

Fonte: Do autor.

M, capacidade máxima de adsorção ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$); *E*, erro padrão; *K*, parâmetro relacionado a afinidade entre adsorbato e adsorvente; β , parâmetro empírico relacionado à heterogeneidade da superfície adsorvente; r^2 , coeficiente de determinação; *n*, número de determinações.

A Figura 31 apresenta os dados das isotermas de adsorção ajustados ao modelo não-linear de Langmuir-Freundlich.

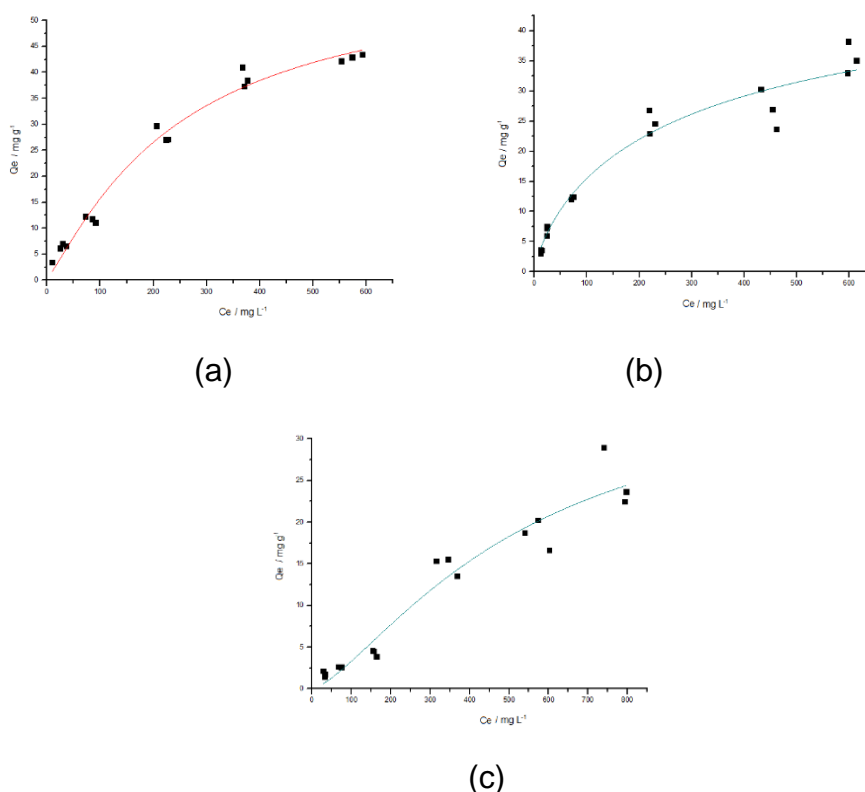


Figura 31 – Isotermas de adsorção da nicotina nos polímeros (a) MIP-2 síntese 1, (b) MIP-2 síntese 2 e (c) NIP-2. Os dados foram ajustados ao modelo de isoterma de Langmuir-Freundlich ($n=3$).

Fonte: Do autor.

4.1.3 Desenvolvimento e avaliação das formulações

Realizou-se a dispersão das partículas de polímero nos veículos inicialmente selecionados (óleo mineral e monoleína). A nicotina foi diretamente incorporada na dispersão das partículas no veículo. As dispersões apresentaram-se opacas e com alta viscosidade. O aumento da viscosidade das dispersões ocorreu após a agitação do sistema por cerca de pelo menos 12 horas, provavelmente devido ao intumescimento das partículas com o veículo. Os resultados dos ensaios de liberação da nicotina a partir das formulações F1 a F4 e de seus respectivos controles C1 e C2 (nicotina incorporada nos veículos) estão apresentados na Figura 32.

Os resultados (Figura 32) demonstraram que as partículas sintetizadas puderam controlar a velocidade de liberação da nicotina, o que pode ser observado

em relação às quantidades liberadas em relação aos respectivos controles (veículos contendo somente o fármaco na ausência dos polímeros). Entretanto, os resultados indicaram que o MIP-1 não apresentou diferenças significativas em relação à cinética de liberação do NIP-1 em ambos os veículos, óleo mineral ou monoleína. Estes resultados foram associados aos resultados dos estudos de adsorção (item 3.4.1.4), em que não foram observadas diferenças entre as quantidades de fármaco adsorvidas entre MIP-1 e NIP-1. Com relação aos veículos, a velocidade de liberação foi mais lenta nos polímeros incorporados em óleo mineral do que quando os mesmos polímeros foram incorporados em monoleína ($P < 0,05$). A quantidade de nicotina a ser liberada foi a mesma em ambas as formulações, porém a monoleína apresenta maior caráter polar que o óleo mineral e possui capacidade de incorporação de água (MILAK; ZIMMER, 2015). Em meios muito hidrofóbicos, esperam-se maiores interações fármaco-polímero, uma vez que o reconhecimento molecular tende a ser maior em veículos de baixa polaridade, similares ao solvente porogênico, conforme já havíamos evidenciado em estudo anterior (RUELA; FIGUEIREDO; PEREIRA, 2014). Uma vez que a síntese foi realizada em solvente orgânico, espera-se que a conformidade dos sítios impressos em meio de baixa polaridade seja semelhante à síntese.

Estes resultados foram melhor evidenciados a partir dos estudos cinéticos, em que os dados foram melhor ajustados ao modelo de Higuchi (Tabela 15), característico da difusão do fármaco a partir de uma matriz. Os dados para as formulações F1 e F2 (preparadas em monoleína) foram ajustados até o tempo de 36 horas, sendo que após este tempo foi alcançado um platô de liberação, em que a quantidade liberada passou a ser pouco significativa. Enquanto isso, nas formulações F3 e F4 (preparadas em óleo mineral) os dados foram ajustados até o último tempo avaliado (99,3 h), uma vez que a nicotina ainda era liberada gradualmente.

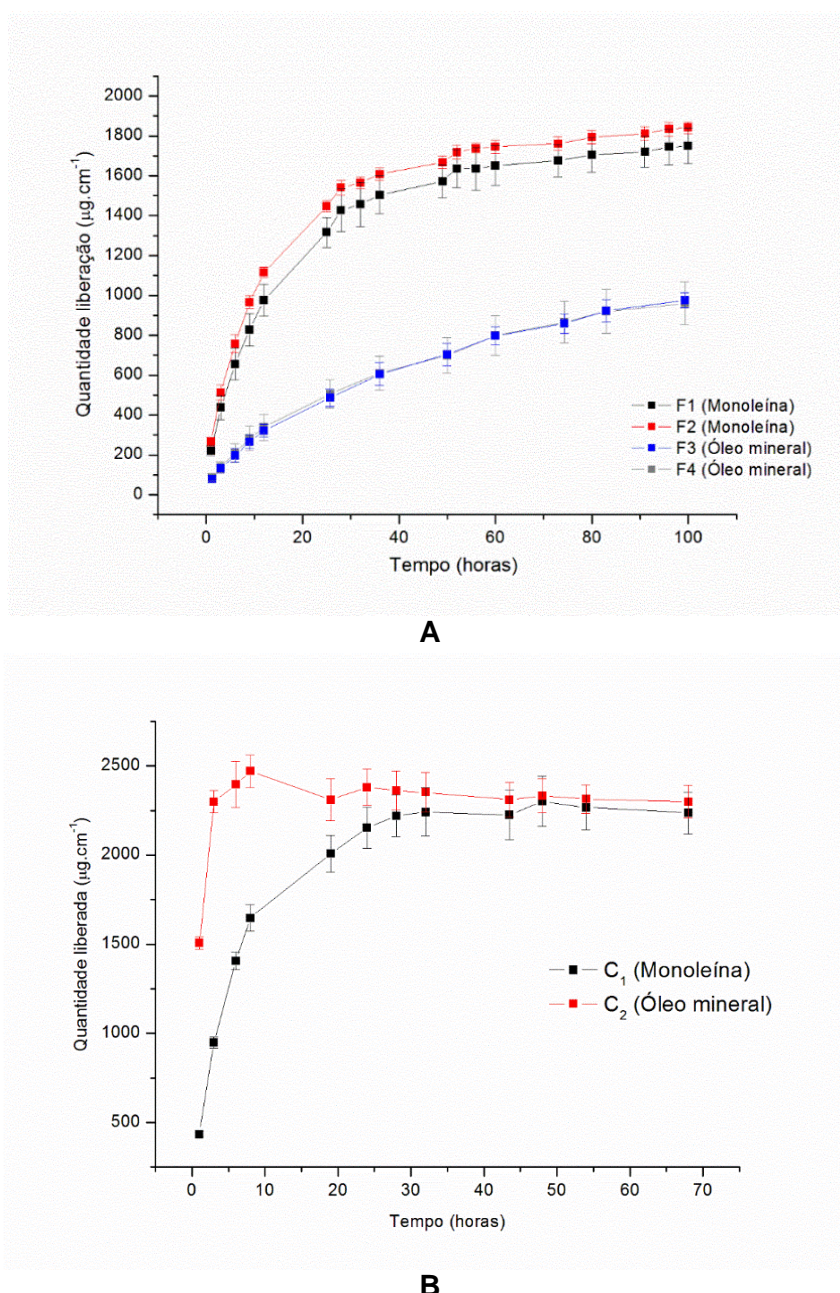


Figura 32 – Perfil de liberação da nicotina a partir de formulações preparadas a partir de (A) dispersões dos polímeros (MIP-1 e NIP-1) em monoléina e óleo mineral e (B) diretamente dos veículos monoléina e óleo mineral (C₁ e C₂) (n=3).

Fonte: Do autor.

Tabela 15 – Parâmetros cinéticos da curva de liberação da nicotina a partir das formulações baseadas em diferentes veículos (óleo mineral e monoleína), conforme o modelo de Higuchi ($n=3$).

Formulação	Nicotina (mg)	r	Fluxo \pm DP ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1/2}$)
F1	10,0	$0,99542 \pm 0,00111$	$259,37 \pm 12,21$
F2	10,0	$0,99070 \pm 0,00042$	$268,77 \pm 3,39$
F3	10,0	$0,99849 \pm 0,00066$	$105,34 \pm 5,68$
F4	10,0	$0,99799 \pm 0,00133$	$103,01 \pm 10,04$

Fonte: Do autor.

r , coeficiente de correlação; DP, desvio padrão.

É importante considerar que nestas formulações baseadas em MIPs, o fármaco pode estar na forma livre ou ligado ao polímero. A fração livre está pronta para ser rapidamente liberada, enquanto que a fração ligada depende da dessorção do fármaco da matriz polimérica. Neste caso, nas formulações F3 e F4, a nicotina provavelmente está adsorvida em uma maior extensão nos polímeros do que nas formulações preparadas em monoleína (F1 e F2). O fenômeno de dessorção do fármaco é então relacionado à sua liberação controlada e depende da dissociação das interações fármaco-polímero. Além disso, o fármaco também deve passar por um processo de difusão através da matriz polimérica. Outra consideração importante são os tipos de interações do fármaco com a estrutura polimérica, que podem ser seletivas ou não. As interações não seletivas podem ser observadas a partir da liberação do fármaco da matriz não impressa (NIP). Neste caso, o fármaco interage com grupos químicos presentes na matriz que estão distribuídos de modo aleatório. No caso dos MIPs, deve ser considerada que interações adicionais podem ser estabelecidas entre fármaco e matriz polimérica, devido à presença de sítios de ligação seletivos em que ocorre o reconhecimento molecular do *template*. Os sítios de reconhecimento, apesar da seletividade, podem apresentar heterogeneidade, o que pode levar à presença de sítios impressos no MIP com diferentes afinidades pela molécula molde, com interações de diferente magnitude. A presença de sítios impressos com maior seletividade em uma matriz polimérica é o fator determinante para modificar a difusão do fármaco a partir dos MIPs. Assim, espera-se que a velocidade de liberação da molécula impressa seja reduzida devido à maior afinidade da fração ligada do fármaco nos sítios seletivos dos MIPs.

A liberação da nicotina a partir das formulações F5, F6, F7, F8 e F9 foi

determinada avaliando-se um aumento da concentração de nicotina em relação às formulações F1, F2, F3 e F4 (de 5 mg para 10 mg), porém mantendo a mesma quantidade do polímero (Figura 33). O MIP-2, que apresentou maior seletividade em relação ao NIP-2, foi empregado nas formulações F7 e F8. A liberação da nicotina a partir de todas estas formulações foi melhor ajustada ao modelo cinético de Higuchi, sendo possível caracterizar a liberação controlada do fármaco a partir das matrizes poliméricas conforme um mecanismo de difusão (Tabela 16).

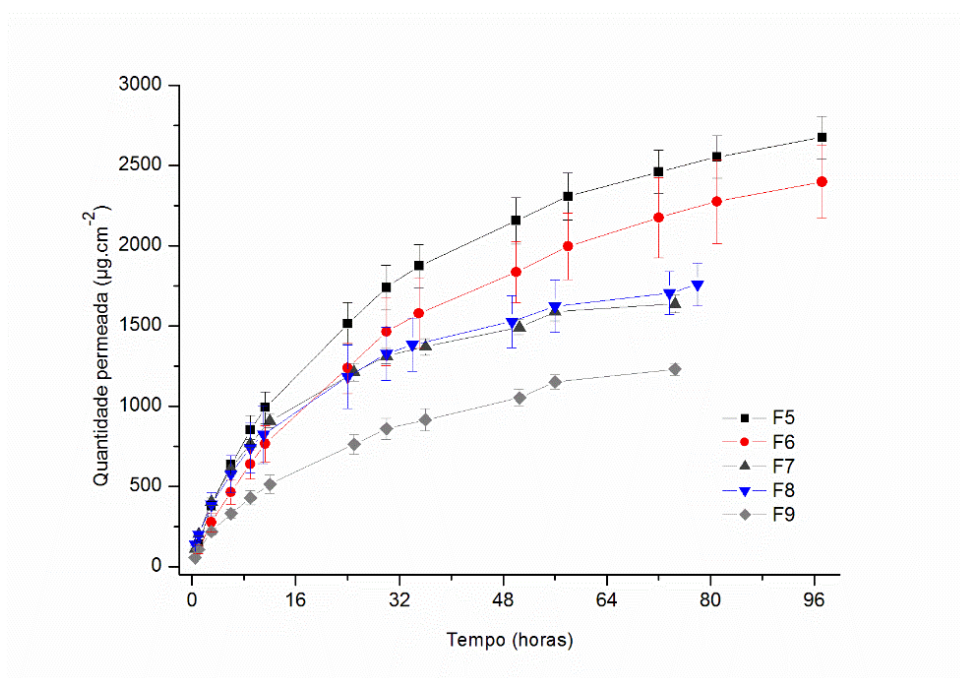


Figura 33 – Liberação da nicotina a partir das formulações baseadas em MIPs ($n=3$).
Fonte: Do autor.

Tabela 16 – Parâmetros cinéticos da curva de liberação da nicotina a partir das formulações baseadas em MIPs, conforme o modelo de Higuchi ($n=3$).

Formulação	Nicotina (mg)	r	Fluxo \pm DP ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1/2}$)
F5	10,0	0,99141 \pm 0,00296	297,23 \pm 15,61
F6	10,0	0,99539 \pm 0,00233	272,98 \pm 26,88
F7	10,0	0,98221 \pm 0,00288	200,84 \pm 7,13
F8	10,0	0,98644 \pm 0,00805	203,43 \pm 14,07
F9	10,0	0,99631 \pm 0,00178	154,91 \pm 8,68

Fonte: Do autor.

r , coeficiente de correlação; DP, desvio padrão.

As formulações F5 e F6, contendo os polímeros MIP-1 e NIP-1, respectivamente, apresentaram maior velocidade de liberação do que as formulações F7, F8 e F9, preparadas com MIP-2 e NIP-2 ($P < 0,05$). Os copolímeros MIP-1 e NIP-1 possuem em sua composição os monômeros AMA e EDGMA e durante os estudos de adsorção evidenciou-se uma elevada capacidade de adsorção associada a interações não-seletivas. A mesma falta de seletividade foi evidenciada nos estudos de liberação, sendo que a velocidade de liberação da formulação F5 foi ligeiramente maior em ordem de magnitude do que em F6, não sendo observada diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$). As formulações F7, F8 e F9 foram preparadas com copolímeros incluindo o monômero HEMA, respectivamente o MIP-2 síntese 1, MIP-2 síntese 2 e NIP-2. Estes copolímeros apresentaram também uma notável capacidade de adsorção da nicotina, porém apresentaram-se seletivos, com o MIP-2 apresentando maior carregamento que o NIP-2. Apesar disso, observou-se que as formulações contendo MIP-2 liberaram a nicotina em velocidade significativamente maior que o NIP-2 ($P < 0,05$). Neste caso, este comportamento foi associado ao intumescimento das partículas de MIP-2 com o meio de liberação aquoso, uma vez se observou uma maior porcentagem de intumescimento no MIP-2 em relação ao NIP-2 ($P < 0,05$) conforme o item 3.4.2.4. No caso do MIP-1, apesar de o intumescimento ser superior ao do NIP-1, não houve diferenças significativas entre as velocidades de liberação entre MIP-1 e NIP-1 ($P > 0,05$). No caso do MIP-2, uma vez que interações seletivas são estabelecidas entre fármaco e polímero, é possível que o maior intumescimento das partículas impressas no meio aquoso leve à dessorção mais rápida da nicotina seletivamente ligada, uma vez que o fármaco é uma molécula hidrofílica e conforme previamente apresentado nos estudos de caracterização apresenta maior afinidade pela água.

Estudos de permeação cutânea usando pele de orelha de porco foram realizados com as formulações F5, F6, F8 e F9 até o tempo de 48 horas (Figura 34a). Os resultados apresentaram melhor ajuste ao modelo cinético de ordem zero (Tabela 17). De acordo com os resultados, foi possível realizar a administração controlada da nicotina por período de tempo prolongado a partir das formulações baseadas nos copolímeros selecionados.

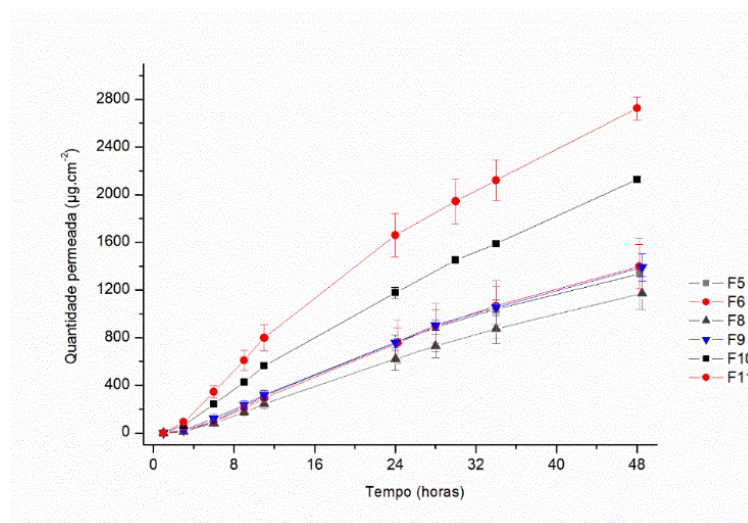
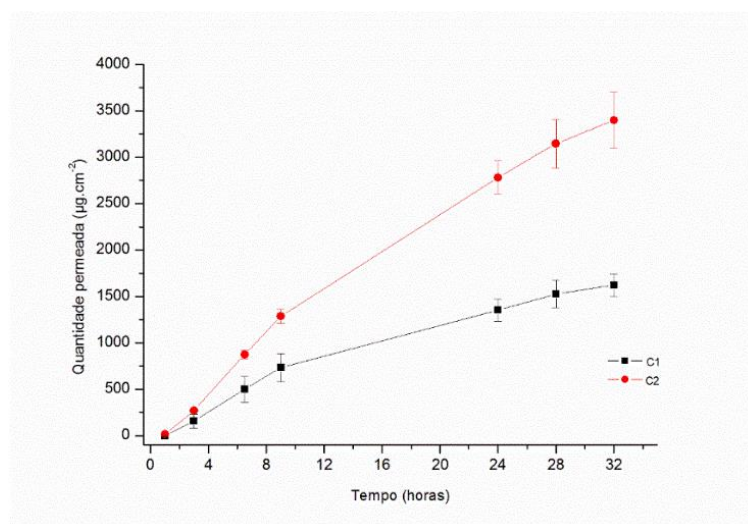
**A****B**

Figura 34 – Permeação cutânea da nicotina a partir de (A) formulações transdérmicas baseadas em MIPs e (B) formulações controle C2 (5 mg de nicotina) e C3 (10 mg de nicotina) ($n=3$).

Fonte: Do autor.

Tabela 17 – Parâmetros cinéticos da curva de permeação cutânea da nicotina a partir das formulações baseadas em MIPs, conforme o modelo de ordem zero ($n=3$).

Formulação	Nicotina (mg)	r	Fluxo \pm DP ($\mu\text{g cm}^{-2}\text{h}^{-1}$)
F5	10,0	0,99387 \pm 0,00166	30,36 \pm 7,30
F6	10,0	0,99589 \pm 0,00184	31,63 \pm 4,51
F8	10,0	0,99691 \pm 0,00138	26,21 \pm 3,33
F9	10,0	0,99540 \pm 0,00136	30,94 \pm 2,40
F10	10,0	0,99668 \pm 0,00029	46,48 \pm 0,37
F11	10,0	0,99160 \pm 0,00599	60,21 \pm 3,12

Fonte: Do autor.

r , coeficiente de correlação; DP, desvio padrão.

Apesar da permeação cutânea da nicotina ter sido controlada a partir das formulações F5, F6 e F8, baseadas em MIPs, observou-se que não houve diferença significativa em relação às respectivas formulações controle, F7 e F9, baseadas em NIPs, sendo que o controle da velocidade de permeação cutânea pode ter ocorrido em grande extensão a partir de interações não-seletivas entre fármaco e polímero ($P < 0,05$). No caso do MIP-2 (formulação F8), apesar da maior liberação da nicotina em relação ao NIP-2 (formulação F9) ter sido observada nos ensaios de liberação, não foi observado este mesmo comportamento nos ensaios de permeação cutânea, o que pode estar relacionado ao menor intumescimento dos polímeros durante os ensaios de permeação cutânea, uma vez que, nestes estudos, as formulações são mantidas na superfície da pele e a absorção de água é restrita. As formulações F10 e F11, também baseadas em MIP-2 e NIP-2, respectivamente, foram preparadas aumentando a quantidade de nicotina em relação ao polímero (razão fármaco/polímero 1:3), sendo possível evidenciar um maior efeito dos MIPs (formulação F10) em relação aos NIPs (formulação F11) no controle da velocidade de permeação do fármaco ($P < 0,05$). Este comportamento foi associado ao excesso de nicotina nas formulações, tendendo a ocorrer a saturação dos sítios de ligação do copolímero. Conforme previamente caracterizado, é provável que os MIPs apresentem sítios heterogêneos com diferentes afinidades pela nicotina, sendo que o fármaco foi liberado mais lentamente a partir da formulação F10 uma vez que interações seletivas fármaco-polímero foram estabelecidas em uma maior extensão. As quantidades permeadas a partir da formulação F10 foram clinicamente

relevantes, podendo ser comparadas com resultados obtidos na avaliação de *patches* transdérmicos comerciais (RUELA et al., 2013). Conforme Ruela et al. (2013), a velocidade de permeação dos *patches* transdérmicos comerciais ajustada ao modelo de ordem zero foi de $41,69 \pm 1,16 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ para os dispositivos do tipo membrana, enquanto que nos dispositivos do tipo matriz a velocidade foi de $38,29 \pm 3,56 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre a velocidade de permeação dos *patches* transdérmicos comerciais em relação à formulação F10 baseada em MIP-2 ($46,48 \pm 0,37 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$). É importante enfatizar que além das formulações desenvolvidas liberarem quantidades de fármaco equivalentes às formulações comerciais, o controle da velocidade de permeação da nicotina a partir das formulações desenvolvidas foi assegurado até 48 horas, sendo que este perfil de permeação cutânea prolongada não é assegurado pelas formulações comerciais.

É importante ainda considerar que a pele exerce efeito significativo no controle da absorção cutânea da nicotina, uma vez que durante os ensaios de liberação observou-se uma liberação mais rápida do fármaco, caracterizada pelo modelo de Higuchi. Entretanto, as curvas de permeação foram melhor caracterizadas quanto ao ajuste ao modelo de ordem zero. Sendo assim, foram realizados estudos de permeação cutânea com a nicotina incorporada no veículo na ausência dos copolímeros (formulações controle C2 e C3), de modo a avaliar a extensão do efeito da pele no controle da velocidade de permeação da nicotina.

A avaliação da absorção cutânea da nicotina usando as formulações C2 e C3, em que óleo mineral foi empregado como veículo, demonstrou que a nicotina foi absorvida através da pele seguindo a cinética de Higuchi (Figura 34b e Tabela 18). As quantidades de fármaco permeadas a partir de C2 e C3 foram maiores do que nas formulações F5, F6, F8 e F9 ($P < 0,05$) e observou-se a redução da velocidade de permeação cutânea a partir de 6h, provavelmente devido à depleção da nicotina nas formulações C2 e C3. Estes resultados podem ser associados aos estudos de liberação da formulação C2, em que foi demonstrada a rápida liberação do fármaco para o meio aquoso. Sendo assim, pode-se considerar que a partição da nicotina para a pele a partir do uso de um veículo lipofílico é muito alta. Estes resultados são importantes para demonstrar que o óleo mineral não possui efeito no controle da velocidade de permeação cutânea da nicotina, podendo, de modo contrário, aumentar a velocidade de permeação cutânea da nicotina, uma vez que neste

veículo a partição do fármaco para a pele é aumentada. No caso das formulações F5, F6, F8 e F9, a redução da velocidade de permeação cutânea é então associada às maiores interações fármaco-polímero que podem ocorrer no veículo hidrofóbico, e não a um efeito do veículo por si só em regular a cinética de liberação da nicotina.

Tabela 18 – Parâmetros cinéticos da curva de permeação cutânea da nicotina nas formulações controle, conforme o modelo de Higuchi ($n=3$).

Formulação	Nicotina (mg)	r	Fluxo \pm DP ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1/2}$)
C2	5,0	0,99684 \pm 0,00070	359,30 \pm 19,10
C3	10,0	0,99678 \pm 0,00059	761,99 \pm 64,86

Fonte: Do autor.

r , coeficiente de correlação; DP, desvio padrão.

Sendo assim, foi possível concluir que os copolímeros acrílicos possuem uma capacidade intrínseca de interagir com a nicotina devido às interações de natureza não seletiva, e a partir disso é possível controlar em grande extensão a cinética de liberação do fármaco. O MIP-2 apresentou maior potencial para estabelecer interações seletivas com a nicotina, sendo este polímero considerado o mais promissor neste trabalho para o desenvolvimento de formulações para liberação transdérmica do fármaco. Desta forma, formulações baseadas em MIP-2 contendo uma maior dose de nicotina permitiram evidenciar um maior efeito das partículas poliméricas impressas no controle da velocidade de permeação cutânea do fármaco em relação às formulações baseadas em NIP-2.

4.2 DONEPEZILA

Após a preparação da base livre da donepezila a partir do cloridrato (monoidratado), realizou-se a caracterização físico-química das matérias-primas. A análise por LC-MS/MS (Figura 35) permitiu a identificação da donepezila, não havendo indícios de degradação do fármaco durante o processo de obtenção da base livre (item 3.3.4). De acordo com a Figura 36, o íon precursor $[M+H]^+$ possui m/z 380 e a perda do tolueno (m/z 91) forma o fragmento m/z 288, que sofre posteriores fragmentações para formar os fragmentos m/z 273 e 243 devido a

sucessivas clivagens do anel piperidínico. O padrão de fragmentação do cloridrato e da base livre foram bastante semelhantes, incluindo a abundância dos fragmentos gerados (Tabela 19). Estes resultados foram esperados, uma vez a estrutura química da molécula é a mesma em ambas as matérias-primas, apesar do cloridrato apresentar-se na forma de sal.

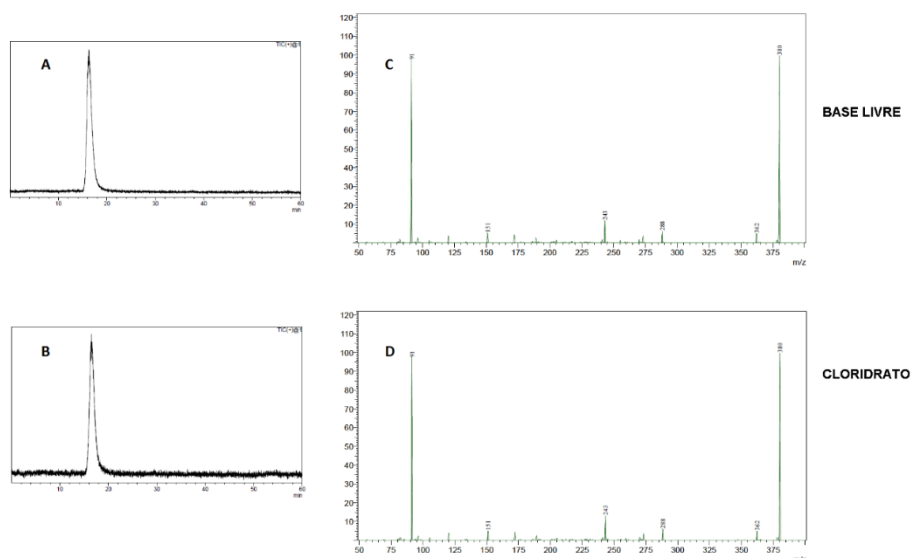


Figura 35 – Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS em modo TIC(+) da donepezila base livre (A) e cloridrato de donepezila e espectros de massas da donepezila nas formas de base livre (C) e cloridrato (D).

Fonte: Do autor.

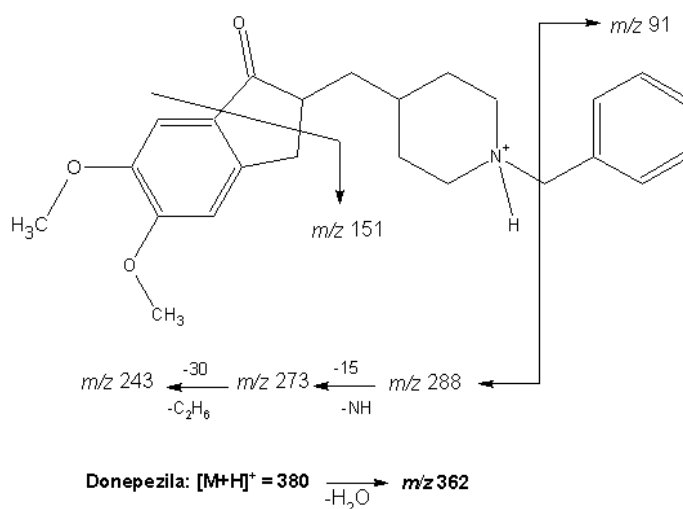


Figura 36 - Padrão de fragmentação proposto para a donepezila.
Fonte: Adaptado de Meier-Davis et al. (2012).

Tabela 19 – Padrão de fragmentação da donepezila nas formas de base livre e de cloridrato usando ionização por *electrospray* em modo positivo (M^+ 380).

Base livre		Cloridrato	
<i>m/z</i>	<i>Intensidade relativa (%)</i>	<i>m/z</i>	<i>Intensidade relativa (%)</i>
91,15	97,61	91,15	97,85
151,05	5,37	151,10	5,02
243,10	11,95	243,10	13,23
288,10	6,31	288,15	6,06
362,15	5,02	362,15	5,07
380,20	100,00	380,20	100,00

Fonte: Do autor.

m/z, relação massa/carga.

A difração de raios X por pó é a técnica mais utilizada para determinar o arranjo de materiais policristalinos. O arranjo cristalino é organizado devido às interações intermoleculares (ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals, interações eletrostáticas entre outras), sendo que uma mesma molécula pode formar diferentes arranjos cristalinos ao estabelecer diferentes interações intermoleculares. Os cristais obtidos podem, desta forma, apresentar diferentes propriedades físico-químicas (como solubilidade e estabilidade) conforme o tipo de arranjo cristalino. Este fenômeno é denominado como polimorfismo de sólidos cristalinos.

A caracterização das formas cristalinas das matérias-primas de donepezila utilizadas neste trabalho foi realizada baseada nas informações publicadas na literatura (PARK et al., 2009; BRITAIN, 2014; LIU et al., 2014). Conforme os picos obtidos nos difratogramas (Figura 37), o sal monoidratado foi caracterizado como forma cristalina I. A base livre obtida a partir da secagem do solvente tolueno foi caracterizada como forma B.

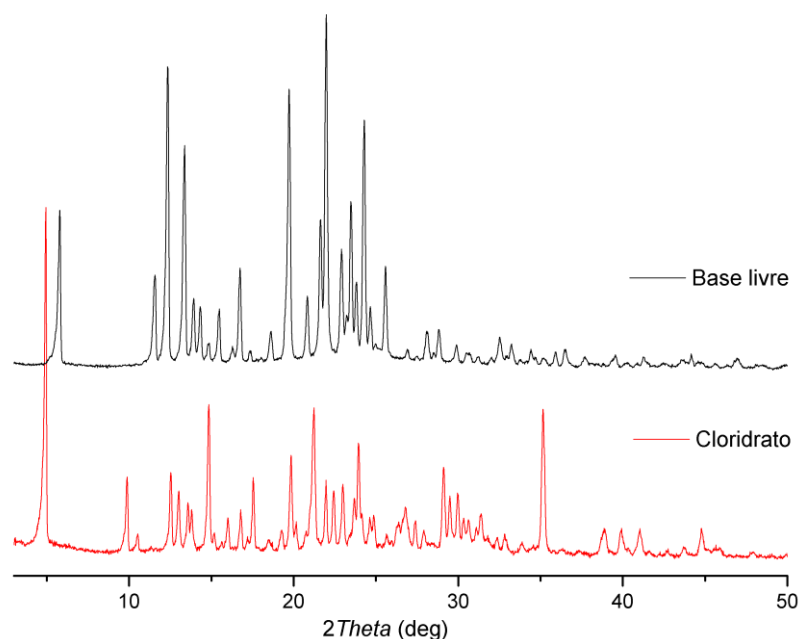


Figura 37 – Difratoogramas para caracterização das formas cristalinas das matérias-primas de donepezila.

Fonte: Do autor.

Os espectros de absorção da donepezila obtidos por ATR-FTIR estão apresentados na Figura 38. As bandas características do fármaco na forma de sal (cloridrato) e base livre foram caracterizadas (Tabela 20). É possível observar diferenças entre os espectros do cloridrato e da base livre. O cloridrato é um sal hidratado e apresenta o estiramento -OH da hidroxila livre em 3588 cm^{-1} . Além disso, é possível observar o estiramento em 1640 cm^{-1} no cloridrato, que caracteriza ligações de hidrogênio entre a água presente na estrutura do sal hidratado e os grupamentos C=O da donepezila. O pico de maior intensidade nos espectros corresponde ao C=O , sendo que o formato estreito dos picos é característico da presença de anel aromático na molécula (LIEW; TAH; PEN, 2012). Uma vez que a donepezila base livre se apresenta na forma anidra, não havendo água na sua estrutura cristalina, estes estiramentos não foram observados.

Tabela 20 – Frequências das bandas de absorção da donepezila nas formas de sal e base obtidas por espectroscopia na região do infravermelho.

Frequência (cm ⁻¹)	Cloridrato	Base livre
	Frequência (cm ⁻¹)	Frequência (cm ⁻¹)
Estiramento O-H (hidroxila livre)	3588	-
Estiramento aromático C-H	2924	2924
Estiramento C=O	1682	1684
Estiramento aromático C=C	1593	1591
Vibração de C-H alifático	1501, 1454	1499, 1454
Estiramento C-N	1314	1308
Estiramento C-O	1265	1265
Vibração de C-H aromático	750, 700	737, 696

Fonte: Do autor.

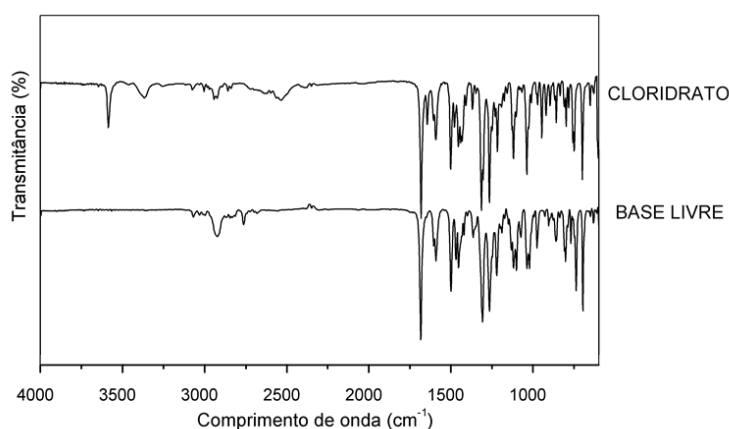


Figura 38 – Espectros de absorção no infravermelho do cloridrato de donepezila e da donepezila base livre.

Fonte: Do autor.

Os resultados obtidos por análise térmica permitiram caracterizar o teor de água nas matérias-primas, o ponto de fusão e a estabilidade térmica. A CED e a análise termogravimétrica podem ser consideradas técnicas complementares, uma vez que os resultados são analisados em conjunto. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 39.

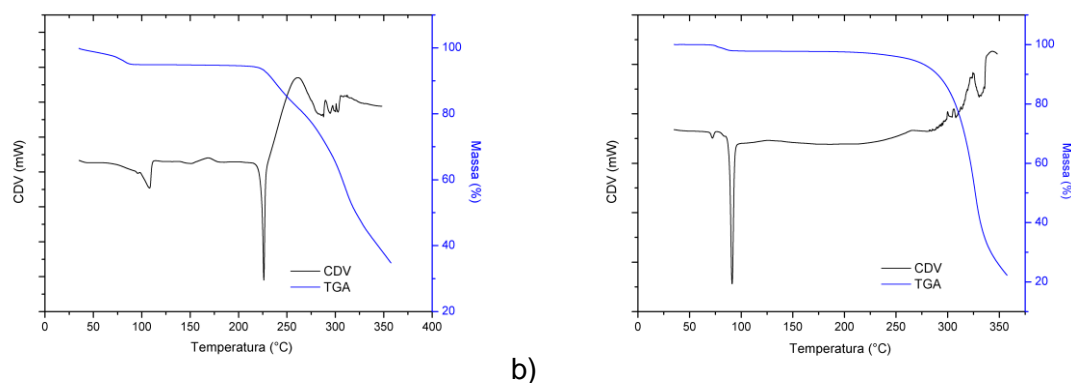


Figura 39 – Caracterização do cloridrato de donepezila(a) e donepezila base livre (b) por calorimetria exploratória diferencial e análise termogravimétrica.

Fonte: Do autor.

Os resultados demonstraram que a fusão da donepezila na forma de base livre ocorreu em temperatura muito inferior ao ponto de fusão do sal. O ponto de fusão da base livre ocorreu em torno de 90°C, enquanto o sal apresentou ponto de fusão em torno de 220°C. Considera-se que o ponto de fusão da substância é inversamente proporcional a sua solubilidade em lipídeos e lipofilicidade (ALEXANDER et al., 2012; LIU et al., 2014). O teor de água determinado para as matérias-primas foi de 4,86% para o cloridrato e 2,05% para a base livre. A base livre apresentou maior estabilidade térmica do que o sal. O cloridrato apresentou degradação a partir de 200°C, caracterizada pela perda de massa imediatamente após o ponto de fusão. Enquanto isso, a donepezila base livre foi mais estável termicamente, apresentando maiores perdas de massa após 250°C. A menor estabilidade térmica do cloridrato pode ser associada ao ácido clorídrico presente na rede cristalina do sal hidratado.

4.2.1 Solubilidade da donepezila

A determinação da solubilidade é um parâmetro chave em estudos de pré-formulação. Os resultados dos estudos de solubilidade da donepezila em meios aquosos estão apresentados na Tabela 21. A solubilidade da donepezila base livre foi cerca de 10.000 vezes menor em água do que o cloridrato. Estes resultados foram esperados, uma vez que a dissociação do cloridrato favorece a ionização da

donepezila e, conseqüentemente, a solubilidade do fármaco. O pH da solução aquosa do cloridrato de donepezila foi de 4,70, enquanto que o pH da solução aquosa de base livre foi 8,61. De forma geral, em todos os veículos aquosos com exceção do tampão pH 11,5, a donepezila na forma de cloridrato apresentou maior solubilidade. A solubilidade do fármaco tende a aumentar em valores de pH ácido, uma vez a ionização do fármaco básico ($pK_a=8,82$) é maior, caracterizando a solubilidade da donepezila como pH-dependente. Em valores de pH alcalino, como o tampão 11,5, a donepezila apresentou solubilidade muito baixa, uma vez que o fármaco está totalmente na forma não-dissociada. Somente em pH 11,5 não se observou diferenças entre a solubilidade da donepezila base livre e do cloridrato de donepezila.

Tabela 21 – Solubilidade da donepezila (cloridrato e base livre) em diferentes veículos aquosos a temperatura ambiente ($n=3$).

Donepezila	Solvente	Solubilidade \pm DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Cloridrato (Forma cristalina I)*	Água purificada	37769,42 \pm 1376,98
	Propilenoglicol	64425,01 \pm 464,60
	Tampão fosfato pH 7,4	4908,24 \pm 198,80
	Tampão fosfato pH 11,5	6,27 \pm 0,45
Base livre (Forma cristalina B)*	Água purificada	33,04 \pm 3,36
	Propilenoglicol	10715,19 \pm 348,28
	Tampão fosfato pH 5,0	3915,01 \pm 33,06
	Tampão fosfato pH 7,4	259,28 \pm 2,58
	Tampão fosfato pH 11,5	6,67 \pm 0,06

Fonte: Do autor.

DP, desvio padrão. *A forma cristalina foi previamente caracterizada por difração de raios X; n , número de determinações.

A solubilidade da donepezila também foi caracterizada em veículos lipídicos: ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos e óleos (Tabela 22). A donepezila base livre foi solúvel somente em ácido oleico, sendo este veículo considerado promissor para o desenvolvimento sistemas de liberação de fármacos baseados em MIPs. O cloridrato de donepezila não foi totalmente solúvel em nenhum dos outros veículos lipídicos avaliados.

Tabela 22 – Solubilidade da donepezila em veículos lipídicos.

Veículo lipídico	Base livre (forma cristalina B)*			Cloridrato (forma cristalinal)*		
	<i>Insolúvel</i>	<i>Parcialmente solúvel</i>	<i>Solúvel</i>	<i>Insolúvel</i>	<i>Parcialmente solúvel</i>	<i>Solúvel</i>
Óleo de soja		X		X		
Óleo de oliva		X			X	
Ácido oleico			X		X	
Palmitato de isopropila		X		X		
Miristato de isopropila		X		X		
Óleo mineral	X			X		

Fonte: Do autor.

*A forma cristalina foi previamente caracterizada por difração de raios X.

4.2.2 Coeficiente de partição

A concentração do fármaco em água saturada com ácido oleico foi de $27,32 \pm 3,24 \mu\text{g mL}^{-1}$. A concentração do fármaco após a partição da água para o ácido oleico foi de $0,67 \pm 0,24 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sendo assim, o $\log K$ foi calculado como $1,61 \pm 0,17$, demonstrando que a donepezila no pH da água (6,0) tem maior afinidade pelo veículo lipídico, mesmo estando parcialmente na forma protonada, em que a molécula tenderia a ser mais hidrofílica. O valor do coeficiente de partição da donepezila *n*-octanol/água determinado pelo método usando CLAE também evidenciou a lipoficidade da molécula, com valor de $\log K_{ow}$ igual a 3,16.

4.2.3 Síntese e caracterização dos polímeros

Similarmente aos materiais obtidos com a nicotina, os polímeros a serem avaliados como sistemas de liberação para a donepezila foram sintetizados pela técnica de polimerização por precipitação. Os resultados referentes à preparação e caracterização destes materiais estão apresentados a seguir. É importante ressaltar que MIPs para donepezila ainda não foram descritos na literatura.

4.2.3.1 ATR-FTIR

Os estudos por ATR-FTIR fornecem informações importantes quanto à presença de grupos funcionais de monômeros introduzidos na matriz polimérica e também permite o estudo das interações fármaco-polímero. Estas investigações são realizadas a partir da observação de bandas características dos grupos funcionais nos espectros de absorção, sendo importante observar o aparecimento ou desaparecimento de picos de absorção, deslocamento da frequência, e aumento ou diminuição da intensidade das bandas.

A caracterização dos MIPs por ATR-FTIR foi realizada inicialmente com os polímeros antes e após a etapa de lavagem (Figuras 40 e 41). A caracterização baseou-se na identificação dos grupos funcionais das espécies monoméricas, como o estiramento da carbonila C=O em aproximadamente 1720 cm^{-1} e os estiramentos C-O em 1078 e 1154 cm^{-1} . Foi também possível visualizar os estiramentos C-H em torno de 3000 cm^{-1} e em 1638 cm^{-1} , das bandas C=C associadas aos resíduos de monômeros na matriz polimérica nos polímeros antes da etapa de lavagem. Outros estiramentos visualizados foram associados à presença da molécula molde adsorvida nas partículas poliméricas. A dessorção do fármaco da matriz polimérica também pode ser caracterizada a partir dos espectros dos polímeros após vários ciclos de lavagem.

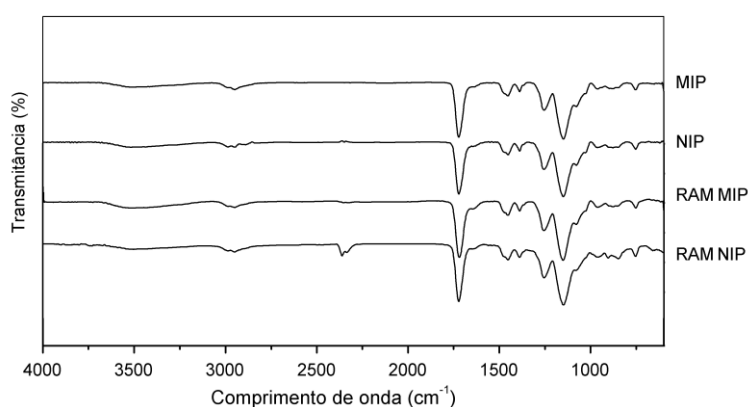


Figura 40 – Espectros de absorção obtidos por ATR-FTIR para os polímeros sintetizados após a lavagem.

Fonte: Do autor.

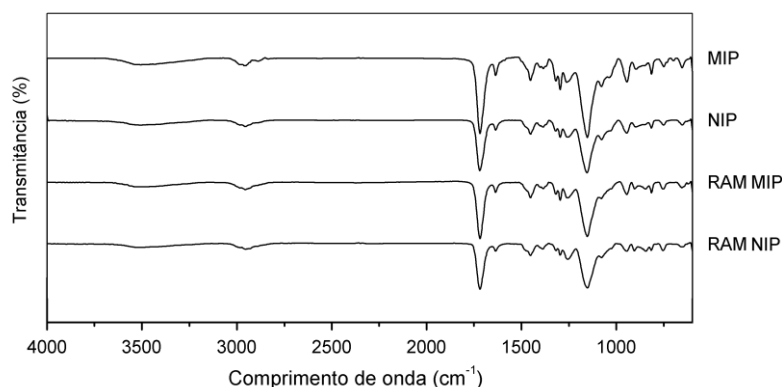


Figura 41 – Espectros de absorção obtidos por ATR-FTIR para os polímeros sintetizados anterior a lavagem.

Fonte: Do autor.

4.2.3.2 Avaliação da morfologia dos materiais

Os polímeros MIP e NIP apresentaram-se como partículas esféricas conforme as imagens obtidas por MFA (Figuras 42 e 43) e MEV (Figuras 44a 47). Os estudos microscópicos por MFA permitem visualizar aglomerados de partículas com tamanho próximo a 1 μm tanto para MIP quanto para NIP.

Os estudos por MEV também possibilitaram a visualização das partículas poliméricas. As partículas de MIP (Figura 44) apresentaram visivelmente maior polidispersão que as partículas de NIPs (Figura 45), sendo que em ambos os casos se apresentaram como partículas esféricas. O RAM-MIP (Figura 46) apresentou-se como partículas irregulares e heterogêneas, com tamanho significativamente maior (> 10 μm) do que os demais polímeros. O RAM-NIP (Figura 47), entretanto, apresentou-se como partículas esféricas. O tamanho das partículas de RAM-NIP foi visivelmente menor, na ordem de 1 μm .

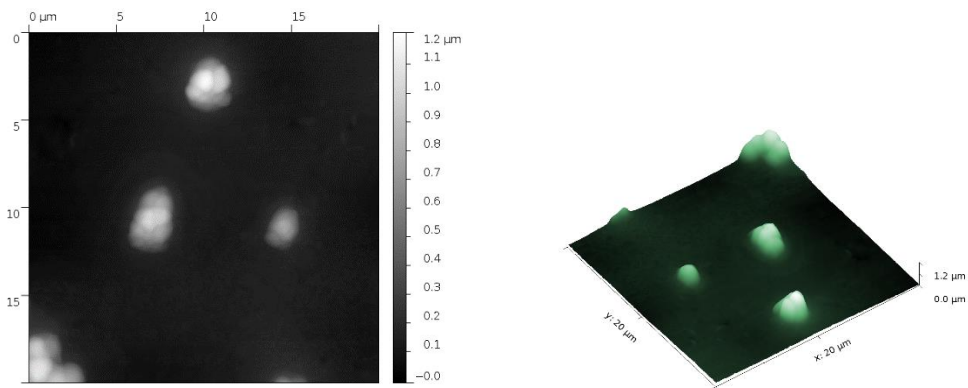


Figura 42 – Imagens obtidas por MFA para o MIP em campo de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$.

Fonte: Do autor.

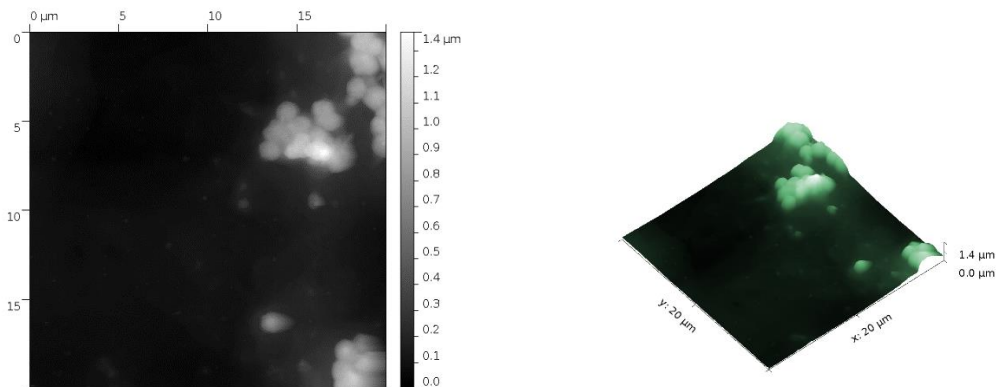


Figura 43 – Imagens obtidas por MFA para o NIP em campo de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$.

Fonte: Do autor.

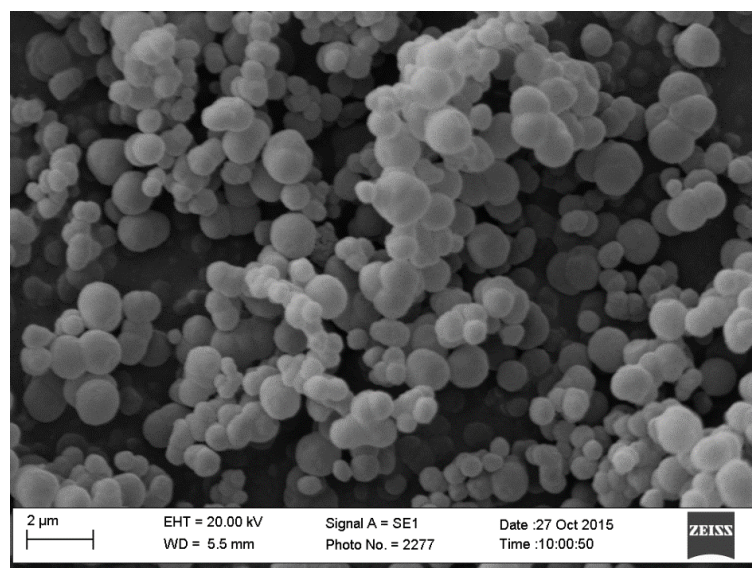


Figura 44 – Imagens obtidas por MEV para o MIP com aumento de 20000x.

Fonte: Do autor.

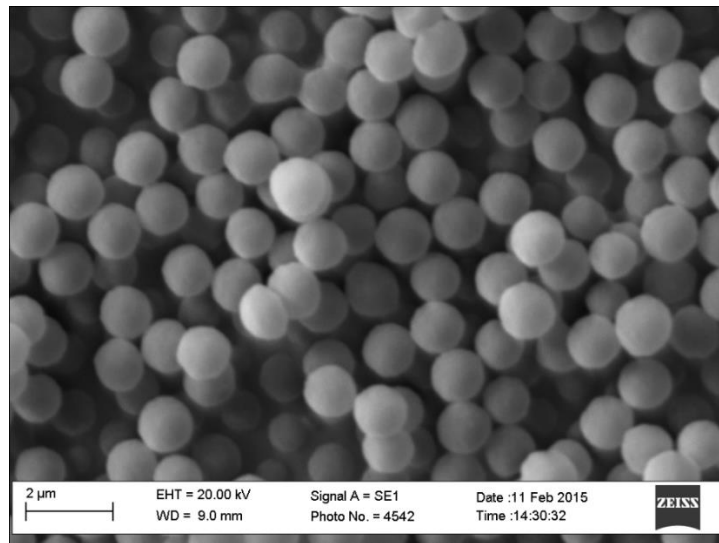


Figura 45 – Imagens obtidas por MEV para o NIP com aumento de 20000x.
Fonte: Do autor.

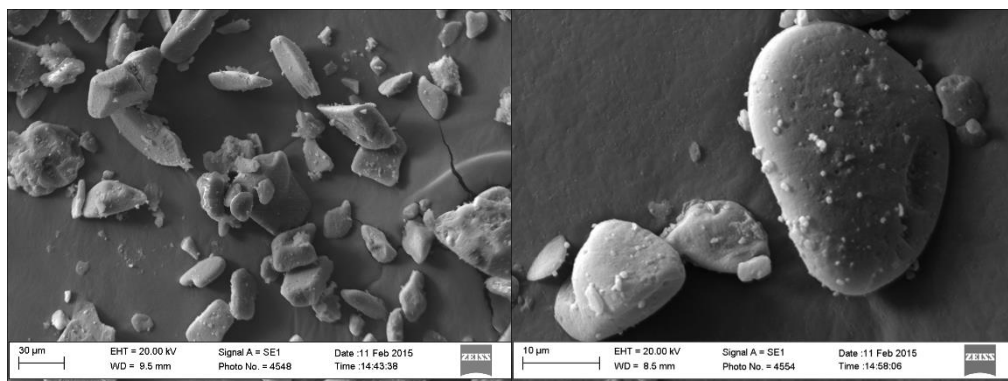


Figura 46 – Imagens obtidas por MEV para o RAM-MIP com aumento de 1000x e 5000x.
Fonte: Do autor.

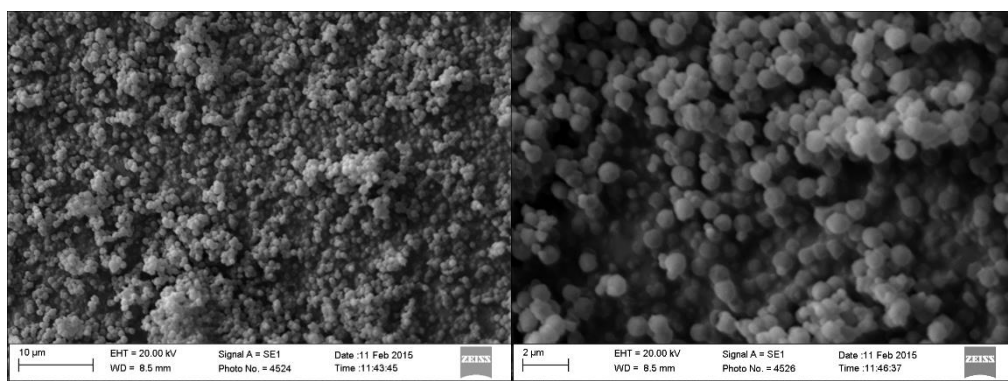


Figura 47 – Imagens obtidas por MEV para o RAM-NIP com aumento de 5000x e 15000x.
Fonte: Do autor.

4.2.3.3 Potencial zeta

As medidas de potencial zeta das partículas de MIP e NIP em solução aquosa apresentaram valores de $-50,3 \pm 0,6$ mV e $-61,0 \pm 0,7$ mV, respectivamente. O valor negativo do potencial zeta indica a incorporação do AMA nas partículas poliméricas, uma vez que estes monômeros são ácidos orgânicos que possuem grupos funcionais aniônicos em solução aquosa.

4.2.3.4 Isotermas de adsorção

As isotermas de adsorção da donepezila nos polímeros foram avaliadas em acetonitrila, considerando a donepezila isolada ou em uma solução contendo uma molécula estruturalmente análoga, a rivastigmina. A rivastigmina também é um fármaco inibidor da acetilcolinesterase, que contém grupamentos amina terciária em sua estrutura química (Figura 48).

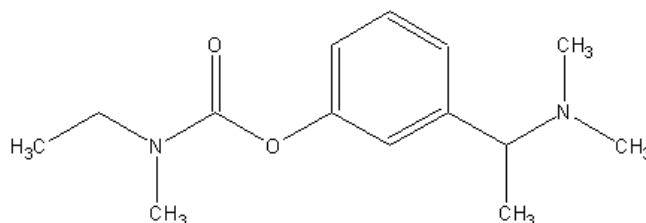


Figura 48 – Estrutura química da rivastigmina.

Fonte: Do autor.

De acordo com os resultados da avaliação das isotermas a partir de soluções contendo somente a donepezila (Tabela 23), foi possível obter um melhor ajuste dos dados ao modelo de Langmuir, caracterizando que a adsorção do fármaco no polímero ocorreu em monocamadas (Figura 49). A capacidade de adsorção da donepezila nos polímeros (M) foi determinada a partir do modelo de Langmuir, sendo que o MIP apresentou uma maior capacidade adsortiva ($61,5 \pm 2,4$ mg g⁻¹) do que o NIP ($54,2 \pm 2,0$ mg g⁻¹). Estes valores apresentaram somente uma discreta diferença, sendo assim avaliada a isoterma na presença da rivastigmina. Uma vez que foram observadas diferenças nas características de liberação da donepezila a

partir das formulações baseadas em MIPs preparadas em ácido oleico, a caracterização da seletividade dos materiais se fez necessária. Neste sentido é importante considerar que o solvente acetonitrila apresenta uma moderada polaridade, superior à polaridade do ácido oleico, sendo este um fator associado à baixa seletividade observada nos experimentos iniciais de adsorção. Também é importante considerar que não foi possível a determinação direta da adsorção da donepezila em ácido oleico, uma vez que estas determinações requerem o desenvolvimento de uma metodologia apropriada para análise do fármaco no veículo oleoso. Desta maneira, o ensaio competitivo de adsorção (na presença de rivastigmina) foi realizado como uma estratégia mais simples para caracterizar a seletividade das partículas de MIP. Os resultados (Tabela 24 e Figura 50) foram melhores ajustados ao modelo de Langmuir-Freundlich, em que também é possível calcular a capacidade adsortiva dos polímeros. Neste caso, foi determinada a capacidade adsortiva de ambos os polímeros, sendo os valores inferiores em ordem de magnitude aos obtidos durante a avaliação da isoterma da donepezila isolada. Entretanto, foi encontrada uma maior diferença entre os resultados obtidos para MIP e NIP. O MIP apresentou de capacidade adsortiva de $29,0 \pm 4,1 \text{ mg g}^{-1}$ e o NIP de $16,8 \pm 0,5 \text{ mg g}^{-1}$. Os resultados encontrados podem estar associados à competição das duas moléculas pelos sítios do polímero, apesar da rivastigmina ter se ligado em uma extensão desprezível em ambos MIP e NIP. É também importante considerar que o modelo de Langmuir-Freundlich indica heterogeneidade dos sítios de adsorção, enquanto que o modelo de Langmuir ajustado aos dados da isoterma da donepezila isolada indica uma maior homogeneidade dos sítios de adsorção. Neste sentido, torna-se difícil caracterizar a homogeneidade dos sítios a partir dos experimentos realizados, porém, conforme Umpleby et al. (2004), na prática, são esperados sítios heterogêneos a partir de polímeros impressos.

Tabela 23 – Modelos de isoterma de adsorção avaliados para donepezila em acetonitrila ($n=3$).

Modelos	M	E	K	E	β	E	r^2
Langmuir (MIP)	61,524	2,400	0,00404	0,00047	-	-	0,98139
Langmuir (NIP)	54,197	2,009	0,00599	0,00080	-	-	0,97459
Freundlich (MIP)	-	-	2,05971	0,28889	2,12276	0,10015	0,97967
Freundlich (NIP)	-	-	2,86434	0,48672	2,40368	0,15639	0,96126

Fonte: Do autor.

M , capacidade máxima de adsorção ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$); E , erro padrão; K , parâmetro relacionado a afinidade entre adsorbato e adsorvente; β , parâmetro empírico relacionado à heterogeneidade da superfície adsorvente; r^2 , coeficiente de determinação; n , número de determinações.

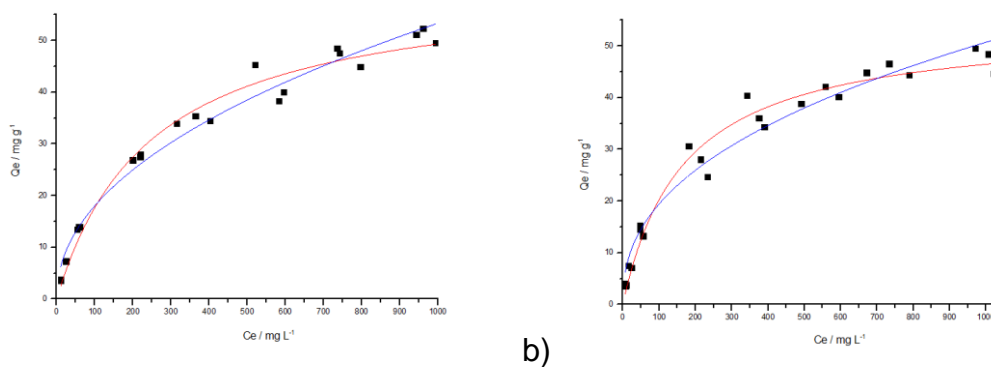


Figura 49 - Isothermas de adsorção da donepezila nos polímeros a) MIP e b) NIP, avaliada em acetonitrila, com os dados ajustados aos modelos de Langmuir (vermelho) e Freundlich (azul) ($n=3$).

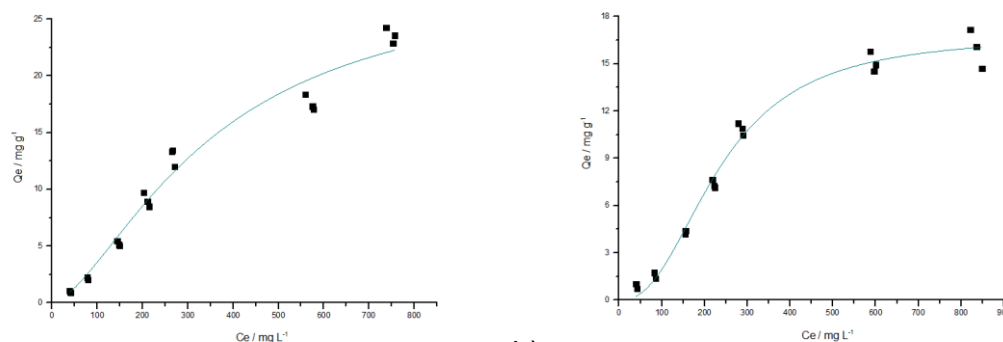
Fonte: Do autor.

Tabela 24 – Modelos de isoterma de adsorção avaliados para a donepezila em acetonitrila na presença de rivastigmina ($n=3$).

Modelos	M	E	K	E	B	E	r^2
Langmuir (MIP)	63,45811	13,26984	0,00075	0,00022	-	-	0,96444
Langmuir (NIP)	31,50633	4,47664	0,00138	0,00034	-	-	0,94445
Freundlich (MIP)	-	-	0,10916	0,03639	1,23293	0,08202	0,95742
Freundlich (NIP)	-	-	0,16165	0,06572	1,43649	0,13505	0,91235
Langmuir-Freundlich (MIP)	28,99062	4,12599	0,00011	0,00014	1,55595	0,27027	0,96935
Langmuir-Freundlich (NIP)	16,81697	0,53182	0,000002	0,000003	2,36736	0,26015	0,98586

Fonte: Do autor.

M , capacidade máxima de adsorção ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$); E , erro padrão; K , parâmetro relacionado a afinidade entre adsorbato e adsorvente; β , parâmetro empírico relacionado à heterogeneidade da superfície adsorvente; r^2 , coeficiente de determinação.



a) b)
 Figura 50 - Isotermas de adsorção da donepezila nos polímeros a) MIP e b) NIP, avaliada em acetonitrila na presença de rivastigmina, com os dados ajustados ao modelo não-linear de Langmuir-Freundlich ($n=3$).

Fonte: Do autor.

4.2.4 Formulações baseadas em MIPs para liberação prolongada de donepezila

O desenvolvimento das formulações baseadas em MIPs foi realizado utilizando o fármaco na forma de base livre. A donepezila base livre não é apropriada para o desenvolvimento de formulações em que a liberação do fármaco seja dependente da sua dissolução, como por exemplo, comprimidos de liberação imediata de donepezila. Nestes casos, utiliza-se o cloridrato de donepezila devido a sua maior solubilidade em água (CHOI et al., 2012; BRITAIN, 2014). Porém, neste trabalho, foi utilizada a donepezila base livre, uma vez que o fármaco, praticamente insolúvel em água, foi previamente dissolvido em um veículo oleoso. Uma vez que o fármaco foi dissolvido, foi realizada a incorporação dos polímeros. É importante destacar que a incorporação do fármaco previamente dissolvido em um veículo lipídico é uma estratégia bem definida para administração de fármacos de baixa solubilidade, de modo a assegurar a sua biodisponibilidade. Estas formulações são conhecidas como formulações baseadas em lipídeos (PORTER; TREVASKIS; CHARMAN, 2007; MU; HOLM; MULLERTZ, 2014; RUELA; CARVALHO; PEREIRA, 2016).

As formulações desenvolvidas foram avaliadas por estudos de liberação *in vitro*. O método para avaliar a liberação do fármaco foi apropriadamente desenvolvido considerando a solubilidade da molécula no meio de liberação. Deve-se considerar que a solubilidade do fármaco é um parâmetro termodinâmico de

grande importância nas etapas iniciais de delineamento de novas formulações. Enquanto isso, a determinação da velocidade de liberação de um fármaco a partir de um sistema de liberação modificada é um estudo cinético relacionado à performance da formulação e está diretamente relacionado à solubilidade da molécula ativa (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; RUELA; CARVALHO; PEREIRA, 2016).

As formulações para liberação de donepezila baseadas em MIPs no veículo ácido oleico foram primeiramente caracterizadas por ATR-FTIR. A Figura 51 apresenta o espectro de absorção das formulações. Conforme os resultados, pode-se observar nos espectros das formulações, as bandas características do ácido oleico e, adicionalmente, os estiramentos característicos de C-O a 1200 a 1300 cm^{-1} que são atribuídos às partículas poliméricas. Também foi observado que nas formulações houve alargamento do estiramento C=O do ácido oleico em torno de 1720 cm^{-1} , devido a sua sobreposição com o estiramento C=O dos polímeros. Neste contexto, é importante afirmar que nestas formulações podem ocorrer interações entre o polímero, o fármaco e o veículo. Uma vez que todos estes componentes possuem grupamentos ionizáveis e grupamentos com capacidade de estabelecer ligações de hidrogênio, todos estes componentes podem apresentar interações de alguma forma entre si.

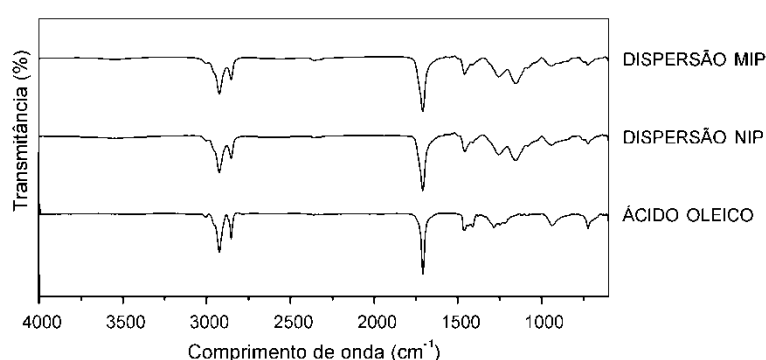


Figura 51– Espectros de absorção obtidos por ATR-FTIR para o veículo ácido oleico e para as dispersões baseadas em partículas de polímeros.

Fonte: Do autor.

As formulações avaliadas neste trabalho foram preparadas empregando o ácido oleico e a monoleína como veículos. O ácido oleico é um ácido graxo insaturado, enquanto que a monoleína é um monoglicerídeo formado pela esterificação do ácido oleico com o glicerol (Figura 52). Enquanto que o ácido oleico é imiscível com a água, a monoleína pode absorver água e formar mesofases líquido-cristalinas (LUO et al., 2015; MILAK, ZIMMER, 2015). Desta forma, o ácido oleico foi empregado no preparo das formulações como veículo isoladamente ou em mistura com a monoleína nas proporções 1:1 (m/m).

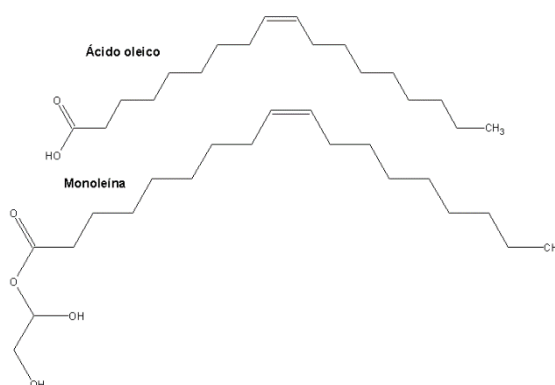


Figura 52 – Estrutura química dos veículos lipídicos ácido oleico e monoleína usados no preparo das formulações baseadas em MIPs.

As formulações baseadas em MIPs preparadas em ácido oleico em diferentes razões fármaco/polímero demonstraram a influência que estes materiais podem exercer na velocidade de liberação da donepezila (Figura 53). O efeito das formulações baseadas em NIPs em modificar a cinética de liberação da donepezila foi significativamente menor do que das formulações baseadas em MIPs. Este comportamento foi associado à presença de sítios seletivos na matriz polimérica impressa, o que resulta em interações fármaco-polímero seletivas e de maior intensidade, reduzindo a velocidade de liberação da donepezila, que está diretamente relacionada à dessorção do fármaco a partir da matriz polimérica. Pode-se observar que o aumento da razão fármaco/polímero promoveu da mesma forma um aumento no controle da velocidade de liberação do fármaco. Enquanto que as formulações na razão fármaco/polímero 1:3 e 1:6 apresentaram-se como sistemas semissólidos de menor viscosidade, a formulação 1:18 apresentou-se como uma matriz que não se dispersou no meio durante todo o ensaio de liberação *in vitro* (24

horas). Também foi possível observar a diminuição do efeito *burst* decorrente do aumento da razão fármaco/polímero.

As curvas de liberação da donepezila a partir destes sistemas baseados em MIPs foram avaliadas quanto ao modelo cinético de Higuchi (Tabela 25).

Tabela 25 – Parâmetros cinéticos das curvas de liberação da donepezila a partir das formulações baseadas em MIPs e veículo oleoso (ácido oleico) usando o modelo de Higuchi ($n=3$).

Razão fármaco/polímero	Modelo de Higuchi		
	r	t (h)	Fluxo \pm DP ($\mu\text{g cm}^{-2}\text{h}^{-1/2}$)
1:3 – MIP	$0,99314 \pm 0,00020$	2,0	$63,57 \pm 3,67$
1:3 – NIP	$0,94388 \pm 0,02826$	1,0	$90,49 \pm 7,28$
1:6 – MIP	$0,93480 \pm 0,01388$	12,0	$22,17 \pm 1,38$
1:6 – NIP	$0,93896 \pm 0,02247$	4,0	$44,12 \pm 8,00$
1:18 – MIP	$0,99314 \pm 0,00245$	12,0	$9,83 \pm 0,31$
1:18 – NIP	$0,94571 \pm 0,04744$	12,0	$14,59 \pm 2,94$
1:18 – RAM-MIP	$0,92590 \pm 0,01044$	12,0	$17,97 \pm 0,99$
1:18 – RAM-NIP	$0,85835 \pm 0,00983$	3,5	$27,20 \pm 2,84$

Fonte: Do autor.

r , coeficiente de correlação; DP, desvio padrão; t , tempo final utilizado para avaliação da cinética de liberação; n , número de determinações.

A formulação nas proporções 1:18 também foi avaliada quanto ao modelo de Korsmeyers-Peppas (Tabela 26).

Tabela 26 - Parâmetros cinéticos das curvas de liberação da donepezila a partir das formulações baseadas em MIPs e veículo oleoso (ácido oleico) usando o modelo de Korsmeyer-Peppas ($n=3$).

Razão fármaco/polímero	Modelo de Korsmeyer-Peppas		
	r	t (h)	$n \pm$ DP
1:18 – MIP	$0,99203 \pm 0,00111$	36,0	$0,4195 \pm 0,0187$
1:18 – NIP	$0,96458 \pm 0,01507$	3,0	$0,4164 \pm 0,1638$
1:18 – RAM-MIP	$0,93781 \pm 0,00465$	3,5	$0,3540 \pm 0,0283$

Fonte: Do autor.

r , coeficiente de correlação; DP, desvio padrão; t , tempo final utilizado para avaliação da cinética de liberação; n , expoente relacionado ao mecanismo de liberação; n , número de determinações.

A avaliação da cinética de liberação da donepezila foi realizada até o tempo anterior ao platô de liberação ser alcançado. Desta forma, diferentes tempos dos ensaios de liberação foram utilizados na determinação da cinética de liberação. De acordo com os resultados (Tabela 25), observou-se uma tendência do MIP apresentar um melhor ajuste ao modelo de Higuchi, que caracteriza a difusão do fármaco a partir da matriz. Em todos os casos, observa-se que as formulações baseadas em MIPs apresentaram uma menor velocidade de liberação em relação às respectivas formulações controle (baseadas em NIPs). Além disso, o ajuste dos dados ao modelo de Korsmeyer-Peppas nas formulações com razão fármaco/polímero 1:18 evidenciou que a liberação da donepezila apresentou um valor de $n < 0,45$, caracterizando um processo de difusão fickiana do fármaco a partir das formulações (Tabela 26).

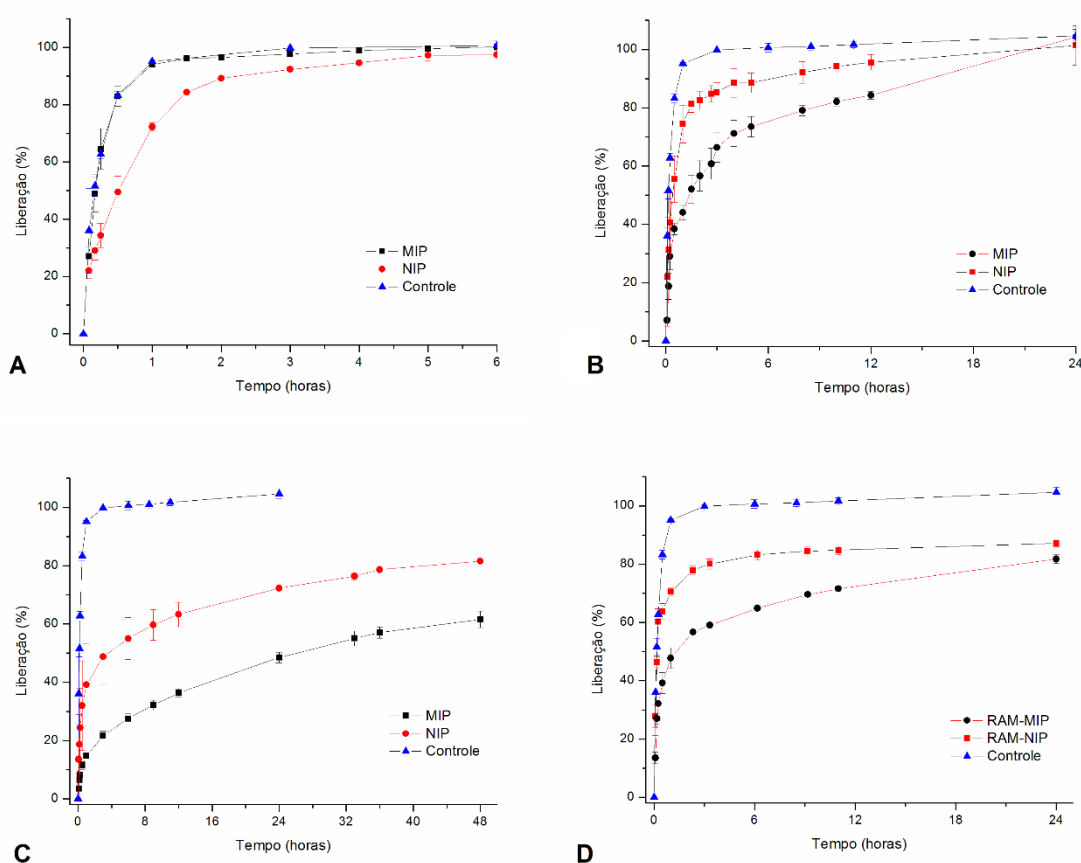


Figura 53 – Perfis de liberação da donepezila base livre a partir das formulações baseadas em partículas de MIPs usando o veículo ácido oleico. A razão fármaco/polímero a partir das formulações foi (A) 1:3, (B) 1:6 e (C) 1:18. A formulação baseada em RAM-MIP na razão fármaco/polímero 1:18 está apresentada em (D).

Fonte: Do autor.

A adição do tensoativo não-iônico Cremophor EL no veículo ácido oleico resultou em uma maior velocidade de liberação (Figura 54 e Tabela 27), provavelmente devido ao efeito do surfactante em dispersar com maior facilidade o ácido oleico no meio aquoso. Mesmo com uma maior velocidade de liberação a partir da adição do tensoativo na formulação, observou-se que o MIP pode controlar a liberação da donepezila nestas formulações por cerca de 1 hora, o que não foi observado para o NIP.

Quando o veículo usado nas formulações foi a mistura monoleína:ácido oleico 1:1 (m/m), observou-se que os sistemas não apresentaram diferenças entre MIP e NIP ou RAM-MIP e RAM-NIP nas características de liberação (Figura 54 e Tabela 27) ($P>0,05$). A diminuição do efeito de reconhecimento molecular pode estar associada ao caráter polar da monoleína e sua facilidade de interação com moléculas de água devido as suas propriedades anfifílicas.

Tabela 27 – Parâmetros cinéticos das curvas de liberação da donepezila a partir das formulações baseadas em MIPs ($n=3$).

Razão fármaco/polímero	Veículo	Modelo de Higuchi		
		r	t (h)	Fluxo \pm DP ($\mu\text{g cm}^{-2}\text{h}^{-1/2}$)
1:6 – MIP	Ácido oleico + 5%	0,88275 \pm	3,0	32,79 \pm 7,17
	Cremophor EL	0,01579		
Controle	Monoleína: Ácido oleico (1:1)	0,97134 \pm 0,00667	3,0	53,86 \pm 4,57
	Monoleína: Ácido oleico (1:1)	0,98118 \pm 0,00494		
1:6 – MIP	Monoleína: Ácido oleico (1:1)	0,98118 \pm 0,00494	3,0	31,18 \pm 2,17
1:6 – NIP	Monoleína: Ácido oleico (1:1)	0,97690 \pm 0,01092	3,0	33,91 \pm 1,34
1:6 – RAM-MIP	Monoleína: Ácido oleico (1:1)	0,98176 \pm 0,01002	3,0	37,49 \pm 3,41
1:6 – RAM-NIP	Monoleína: Ácido oleico (1:1)	0,97331 \pm 0,01471	3,0	36,79 \pm 2,12

Fonte: Do autor.

r , coeficiente de correlação; DP, desvio padrão; t , tempo final utilizado para avaliação da cinética de liberação; n , expoente relacionado ao mecanismo de liberação; n , número de determinações.

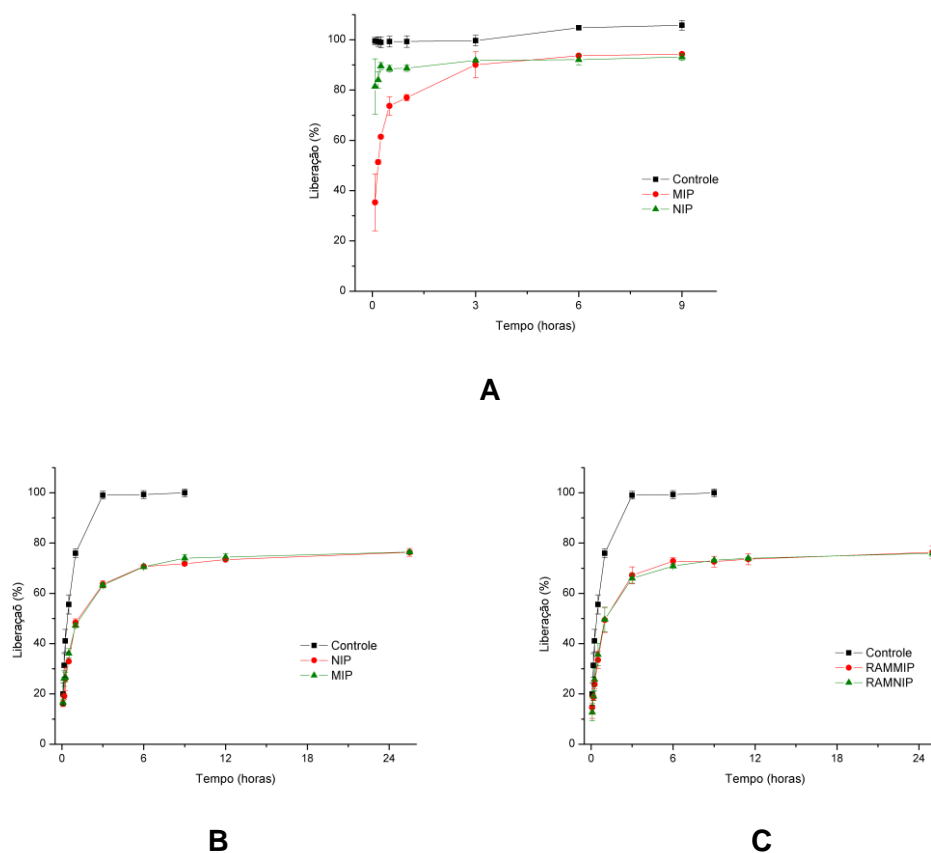


Figura 54 – Perfis de liberação da donepezila base livre a partir das formulações baseadas em partículas de MIPs na razão fármaco:polímero 1:6: A – MIP e NIP usando como veículo ácido oleico + 5% (m/m) Cremophor EL; B – MIP e NIP usando como veículo ácido:monoleína 1:1 (m/m), e C – RAMMIP e RAM-NIP usando como veículo ácido:monoleína 1:1 (m/m).

Fonte: Do autor.

Desta forma, os sistemas baseados em MIPs para liberação prolongada de donepezila apresentaram um melhor efeito quando as partículas de MIP foram incorporadas no veículo ácido oleico, sendo este efeito melhor caracterizado a partir da avaliação de formulações preparadas em diferentes razões fármaco:polímero. Estes sistemas ainda devem ser avaliados quanto ao seu perfil farmacocinético para caracterizar a administração controlada *in vivo* do fármaco, de modo a otimizar seu uso clínico e poder colaborar na redução de efeitos adversos.

5 CONCLUSÃO

- a) A caracterização físico-química da nicotina indicou que o fármaco apresentou alta solubilidade em água e óleo mineral, porém, durante estudos de coeficiente de partição água/ óleo mineral, a nicotina apresentou maior afinidade pela fase aquosa, independentemente do valor de pH do meio aquoso, caracterizando o fármaco como uma molécula hidrofílica;
- b) MIPs usando nicotina como molécula molde foram sintetizados pela técnica de polimerização por precipitação, obtendo copolímeros com diferentes composições de monômeros (EDGMA, HEMA, GMA e AMA);
- c) Estudos de caracterização das partículas de MIPs usando ATR-FTIR demonstraram que interações fármaco-polímero do tipo não-covalente foram estabelecidas, podendo o fármaco ser desorvido da matriz polimérica;
- d) O intumescimento em meios aquosos das partículas de MIP usando nicotina como *template* foi superior ao NIP, provavelmente devido a presença da molécula molde durante a síntese. Por outro lado, o intumescimento das partículas com óleo mineral não apresentou diferenças significativas entre MIP e NIP;
- e) A morfologia dos MIPs (MIP-2 e MIP-7) foi estudada por MEV usando nicotina como *template* e os resultados indicaram que partículas irregulares foram obtidas quando o monômero HEMA foi usado, sendo que os respectivos NIPs apresentaram partículas de formato esférico. As partículas de MIP-1 e NIP-2, preparadas a partir da polimerização do AMA e EDGMA, sem usar HEMA, apresentaram morfologia esférica;
- f) Estudos de isoterma de adsorção da nicotina no MIP-2 indicaram melhor ajuste ao modelo não-linear de isoterma de Langmuir-Freundlich, caracterizando a heterogeneidade dos sítios de ligação;
- g) Ensaio de liberação *in vitro* da nicotina demonstraram que as formulações contendo partículas poliméricas usando óleo mineral como veículo

apresentaram melhor efeito em prolongar a velocidade de liberação do fármaco em comparação às formulações empregando a monoleína como veículo;

- h) Estudos cinéticos indicaram que a liberação da nicotina a partir das formulações baseadas em MIPs foi melhor ajustada ao modelo de Higuchi, enquanto que as curvas de permeação cutânea foram melhor ajustadas ao modelo de ordem zero;
- i) A permeação cutânea *in vitro* da nicotina apresentou cinética de ordem zero por até 48 horas, demonstrando o efeito das formulações baseadas nos copolímeros em prolongar a permeação do fármaco;
- j) A razão fármaco:polímero das formulações baseadas em MIP-2 foi ajustada para apresentar uma cinética de permeação cutânea *in vitro* da nicotina similar à das formulações comerciais. Porém, demonstrou-se que as formulações baseadas em MIPs podem oferecer um fluxo transdérmico prolongado por até 48 horas, enquanto que as formulações comerciais asseguram uma liberação controlada por até 24 horas;
- k) MIP e RAM-MIP usando donepezila como molécula molde e seus respectivos controles NIP e RAM-NIP foram sintetizados pela técnica de polimerização por precipitação;
- l) A donepezila base livre apresentou maior solubilidade em veículos lipídicos do que o cloridrato de donepezila, sendo o ácido oleico selecionado como um veículo promissor, e a base livre do fármaco selecionada para o desenvolvimento das formulações baseadas em MIPs;
- m) Estudos de caracterização das partículas de MIPs usando donepezila como *template* foram realizados por técnicas microscópicas (MFA e MEV) demonstrando que as partículas apresentaram formato esférico. Estudos de determinação do potencial zeta indicaram que as partículas apresentaram carga negativa, provavelmente devido à incorporação do ácido metacrílico na matriz polimérica das partículas;

- n) Estudos de liberação *in vitro* de donepezila demonstraram que as formulações contendo partículas de MIP e RAM-MIP impressos com o fármaco usando ácido oleico como veículo tiveram maior efeito no controle da velocidade de liberação da donepezila em relação às formulações baseadas em seus respectivos controles, NIP e RAM-NIP;
- o) As formulações para liberação prolongada de donepezila baseadas nos copolímeros, usando ácido oleico como veículo apresentou resultados mais promissores que a mistura ácido oleico:monoleína (1:1, m/m). Sugere-se que as interações seletivas do tipo fármaco-polímero foram reduzidas devido às interações entre monoleína, água e polímero;
- p) A adição do tensoativo não-iônico Cremophor EL aumentou significativamente a velocidade de liberação da donepezila a partir das formulações baseadas em partículas MIPs;
- q) As formulações baseadas em MIPs para liberação prolongada de donepezila apresentaram resultados promissores, uma vez que podem oferecer uma alternativa ao tratamento da doença de Alzheimer, reduzindo os efeitos colaterais do fármaco associados a picos de concentração plasmática;
- r) Os sistemas de liberação baseados em MIPs apresentaram características distintas em relação aos fármacos estudados, sendo que, a nicotina, devido às suas características hidrofílicas, tende a ser mais facilmente liberada da matriz polimérica a partir do contato com o meio aquoso, que levou ao intumescimento significativo das partículas poliméricas. Por outro lado, a donepezila, por se tratar de uma molécula lipofílica, tende a ser liberada por um mecanismo de difusão a partir das partículas poliméricas, com menor influência do contato com o meio aquoso. Desta forma, este estudo permitiu melhor caracterizar os efeitos do reconhecimento molecular dos MIPs em prolongar a cinética de liberação de diferentes fármacos.

REFERÊNCIAS

ABDELKADER, M. S. A.; LOCKWOOD, A. B.; SANSONGSAK, P. Uptake of nicotine from suspensions culture of *Nicotiana tabacum* by molecularly imprinted polymers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 5, p. 633-637, 2010.

ABU-HUWAIJ, R. et al. Formulation and in vitro evaluation of xanthan gum or carbopol 934-based mucoadhesive patches, loaded with nicotine. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 1, p. 21-27, 2011.

ALEXANDER, A. et al. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 164, n. 1, p. 26-40, 2012.

ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A. Molecularly imprinted polymers for drug delivery. **Journal of Chromatography B: Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 804, n. 1, p. 231-245, 2004.

ANDERSON, N. H. et al. An evaluation of fit factors and dissolution efficiency for the comparison of in vitro dissolution profiles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, p. 811-822, 1998.

ANGELANTONIO, S.; BERNARDI, G.; MERCURI, N. B. Donepezil modulates nicotinic receptors of substantia nigra dopaminergic neurones. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 4, p. 644-652, 2004.

ANIRUDHAN, T. S.; DIVYA, P. L.; NIMA, J. Silylated montmorillonite based molecularly imprinted polymer for the selective binding and controlled release of thiamine hydrochloride. **Reactive and Functional Polymers**, v. 73, n. 8, p. 1144-1155, 2013.

ANISSIMOV, Y. G. et al. Mathematical and pharmacokinetic modelling of epidermal and dermal transport processes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 2, p. 169-190, 2013.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. São Paulo: Artmed, 2005. 667 p.

AZODI-DEILAMI, S.; ABDOUSS, M.; KORDESTANI, D. Synthesis and characterization of the core-shell magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles using 2-(methacrylamido)ethyl methacrylate amide as a novel cross-link Agent for controlled release of betamethasone. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 15, p. 1-7, 2014.

BAKER, R. W.; KOCHINKE, F.; HUANG, C. Prolonged activity nicotine patch. US Patent no. 4,943,435. 1990.

BARRY, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 2, p. 101-114, 2001.

BENOWITZ, N. L.; HUKANNEN, J.; JACOB III; P. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. **Handbook Experimental Pharmacology**, Germany, v. 192, p. 29-60, 2009.

BHAVNA, S. M. et al. Donepezil nanosuspension intended for nose to brain targeting: In vitro and in vivo safety evaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 418-425, 2014.

BRITTAIN, H. G. Spectroscopic studies of solid-state forms of donepezil free base and salt forms with various salicylic acids. **Journal of Molecular Structure**, v. 1078, p. 207-212, 2014.

CAON, T. et al. Exploiting the buccal mucosa as an alternative route for the delivery of donepezil hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 6, p. 1643-1651, 2014.

CARVALHO, F. C.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M. P. D. Plataformas bio(muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos - Propriedades, metodologias e aplicações. **Polímeros**, v. 24, n. 2, p. 203-213, 2014.

CEVC, G.; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, v. 141, n. 3, p. 277-299, 2010.

CHEN, L.; HAN, L.; LIAN, G. Recent advances in predicting skin permeability of hydrophilic solutes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 2, p. 295-305, 2013.

CHENG, Y. H. et al. Development of a novel nasal nicotine formulation comprising an optimal pulsatile and sustained plasma nicotine profile for smoking cessation. **Journal of Controlled Release**, v. 79, n. 1-3, p. 243-254, 2002.

CHOI, J. et al. Effect of fatty acids on the transdermal delivery of donepezil: In vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 422, n. 1-2, p. 83-90, 2012.

CHOONARA, Y. E. et al. Mechanistic evaluation of alginate-HEC gelisphere compacts for controlled intrastriatal nicotine release in Parkinson's disease. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 6, p. 2059-2072, 2009.

CIARDELLI, G. et al. Acrylic polymeric nanospheres for the release and recognition of molecules of clinical interest. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 6, p. 1083-1090, 2004.

- CONAGHEY, O. M.; CORISH, J.; CORRIGAN, O. I. The release of nicotine from a hydrogel containing ion exchange resins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 170, n. 2, p. 215-224, 1998.
- CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: Synthesis and characterisation. **Journal of Chromatography. B: Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 804, n. 1, p. 173-182, 2004.
- COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.
- CUNLIFFE, D.; KIRBY, A.; ALEXANDER, C. Molecularly imprinted drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 12, p. 1836-1853, 2005.
- DA SILVA, M. S. et al. Development of molecularly imprinted co-polymeric devices for controlled delivery of flufenamic acid using supercritical fluid technology. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 58, n. 1, p. 150-157, 2011a.
- DA SILVA, M. S. et al. Development of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate-based molecular recognition devices for controlled drug delivery using supercritical fluid technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, n. 1, p. 61-68, 2011b.
- DASH, A. K. et al. Development of a rectal nicotine delivery system for the treatment of ulcerative colitis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 190, n. 1, p. 21-34, 1999.
- DAVARAN, S. et al. Development of a novel prolonged-release nicotine transdermal patch. **Pharmacological Research**, v. 51, n. 3, p. 233-237, 2005.
- DEVEAUGH-GEISS, A. M. et al. Pharmacokinetic comparison of two nicotine transdermal systems, a 21-mg/24-hour patch and a 25-mg/16-hour patch: A randomized, open-label, single-dose, two-way crossover study in adult smokers. **Clinical Therapeutics**, v. 32, n. 6, p. 1140-1148, 2010.
- EBRAHIMZADEH, H. et al. Determination of haloperidol in biological samples using molecular imprinted polymer nanoparticles followed by HPLC-DAD detection. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 2, p. 601-609, 2013.
- EFFATI, E.; POURABBAS, B. Synthesis of core-shell poly (N-isopropylacrylamide) grafted silica nanoparticles by distillation precipitation polymerization. **Powder Technology**, v. 246, p. 473-477, 2013.
- EL MAGHRABY, G. M.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 4-5, p. 203-222, 2008.
- ESFANDYARI-MANESH, M. et al. Dipyrindamole recognition and controlled release by uniformly sized molecularly imprinted nanospheres. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, n. 8, p. 1692-1699, 2011.

ESFANDYARI-MANESH, M. et al. Molecularly imprinted nanoparticles prepared by miniemulsion polymerization as selective receptors and new carriers for the sustained release of carbamazepine. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, n. 4, p. 963-972, 2012.

FARAHMAND, S.; MAIBACH, H. I. Transdermal drug pharmacokinetics in man: Interindividual variability and partial prediction. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, n. 1-2, p. 1-15, 2009.

FENG, H. et al. A controlled morphology of polymeric nanocapsules via the density of surface vinyl group for the precipitation polymerization. **Polymer**, v. 54, n. 17, p. 4511-4520, 2013.

FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B., ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para liberação controlada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 361-375, 2008.

FIGUEIREDO, E. C. et al. On-line molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective spectrophotometric determination of nicotine in the urine of smokers. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, n. 1, p. 102-107, 2009.

GORE, A. V.; CHIEN, Y. W. The nicotine transdermal system. **Clinics in Dermatology**, v. 16, n. 5, p. 599-615, 1998.

GREEN, J. T. et al. An oral formulation of nicotine for release and absorption in the colon: Its development and pharmacokinetics. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 48, n. 4, p. 485-493, 1999.

GUPTA, S. K. et al. Bioavailability and absorption kinetics of nicotine following application of a transdermal system. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 221-227, 1993.

HWANG, B. Y. et al. In vitro skin permeation of nicotine from proliposomes. **Journal of Controlled Release**, v. 49, n. 2-3, p. 177-184, 1997.

İKINCI, G. et al. Development of a buccal bioadhesive nicotine tablet formulation for smoking cessation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 277, n. 1-2, p. 173-178, 2004.

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Publications: Guidelines. "Quality" Topics. **Q2 (r1) Validation of Analytical Procedures: text and methodology**. Geneva, 2005. 13 p.

JANTARAT, C. et al. S-Propranolol imprinted polymer nanoparticle-on-microsphere composite porous cellulose membrane for the enantioselectively controlled delivery of racemic propranolol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, p. 212-225, 2008.

JEPPS, O. G. et al. Modeling the human skin barrier - Towards a better understanding of dermal absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 149-151, 2012.

JUNG, B. H. et al. Prolonged delivery of nicotine in rats via nasal administration of proliposomes. **Journal of Controlled Release**, v. 66, n. 1, p. 73-79, 2000.

KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Modeling transdermal drug release. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 2-3, p. 159-172, 2001.

KAN, W.; LI, X. Mathematical modeling and sustained release property of a 5-fluorouracil imprinted vehicle. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 12, p. 4167-4175, 2013.

KANJANAKAWINKUL, W. et al. Nicotine-magnesium aluminum silicate microparticle surface modified with chitosan for mucosal delivery. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 3, p. 1727-1736, 2013.

KUMAR, A.; SINGH, A.; EKAVALI. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 2, p. 195-203, 2015.

KUNATH, S. et al. Cell and tissue imaging with molecularly imprinted polymers as plastic antibody mimics. **Advanced Healthcare Materials**, v. 4, n. 9, p. 1322-1326, 2015.

LEWIS, D.; PAULO, M.; FAUSTINO, E. In vitro comparative studies of transdermal nicotine delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 148, n. 2, p. 177-189, 1997.

LI, Y. et al. Synthesis of core-shell magnetic molecular imprinted polymer by the surface RAFT polymerization for the fast and selective removal of endocrine disrupting chemicals from aqueous solutions. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 6, p. 2317-2323, 2010.

LIEW, K. B.; TAN, Y. T.; PEH, K. K. Characterization of oral disintegrating film containing donepezil for Alzheimer disease. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 1, p. 134-142, 2012.

LIU, T. et al. The dehydration behavior and non-isothermal dehydration kinetics of donepezil hydrochloride monohydrate (Form I). **Frontiers Of Chemical Science and Engineering**, v. 8, n. 1, p. 55-63, 2014.

LU, X. F. et al. Preparation and characterization of molecularly imprinted poly(hydroxyethyl methacrylate) microspheres for sustained release of gatifloxacin. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 6, p. 1461-1469, 2014.

LUO, Q. et al. A novel glyceryl monoolein-bearing cubosomes for gambogic acid: Preparation, cytotoxicity and intracellular uptake. **International Journal of**

Pharmaceutics, v. 493, n. 1-2, p. 30-39, 2015.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

MAYES, A. G.; WHITCOMBE, M. J. Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 12, p. 1742-1778, 2005.

MCINNES, F. J. et al. E. In vivo evaluation of nicotine lyophilised nasal insert in sheep. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 304, n. 1-2, p. 72-82, 2005.

MEIER-DAVIS, S. R. et al. Comparison of metabolism of donepezil in rat, mini-pig and human, following oral and transdermal administration, and in an in vitro model of human epiderms. **Drug Metabolism&Toxicology**, v. 3, n. 4, 2012.

MILAK, S.; ZIMMER, A. Glycerol monooleate liquid crystalline phases used in drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, p. 569-587, 2015.

MINICK, D. J. et al. A comprehensive method for determining hydrophobicity constants by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 10, p. 1923-1933, 1988.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. **Clarke's analysis of drug and poisons**: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 4 ed. London: Pharmaceutical Press, 2011. 2609 p.

MOSER, K. et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p. 103-112, 2001.

MU, H.; HOLM, R.; MULLERTZ, A. Lipid-based formulations for oral administration of poorly water-soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1; p. 215-224, 2013.

NAIR, M. K. et al. Biomembrane permeation of nicotine: Mechanistic studies with porcine mucosae and skin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 2, p. 257-262, 1997.

NAKAMURA, M. et al. Uniformly sized molecularly imprinted polymer for atropine and its application to the determination of atropine and scopolamine in pharmaceutical preparations containing Scopolia extract. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 2, p. 231-237, 2005.

NECHIFOR, C. D. et al. Spectral studies of donepezil release from stretched PVA polymer films. **Journal of Molecular Structure**, v. 1044, p. 262-267, 2013.

NIAURA, R. et al. Comparative efficacy of rapid-release nicotine gum versus nicotine polacrilex gum in relieving smoking cue-provoked craving. **Addiction**, v. 100, n. 11, p. 1720-1730, 2005.

NOTMAN, R.; ANWAR, J. Breaching the skin barrier - Insights from molecular simulation of model membranes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 2, p. 237-250, 2013.

OBATA, Y. et al. A statistical approach to the development of a transdermal delivery system for ondansetron. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 399, n. 1-2, p. 87-93, 2010.

OLIVIER, J. C.; RABOUAN, S.; COUET, W. In vitro comparative studies of two marketed transdermal nicotine delivery systems: Nicopatch® and Nicorette®. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 252, n. 1-2, p. 133-140, 2003.

PAN, G. et al. An efficient approach to obtaining water-compatible and stimuli-responsive molecularly imprinted polymers by the facile surface-grafting of functional polymer brushes via RAFT polymerization. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 3, p. 976-982, 2010.

PARK, C. R.; MUNDAY, D. L. Development and evaluation of a biphasic buccal adhesive tablet for nicotine replacement therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 237, n. 1-2, p. 215-226, 2002.

PARK, J. K. et al. Controlled release of donepezil intercalated in smectite clays. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 359, n. 1-2, p. 198-204, 2008.

PATEL, B. N. et al. Quantitation of donepezil and its active metabolite 6-O-desmethyl donepezil in human plasma by a selective and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometric method. **Analytica Chimica Acta**, v. 629, n. 1-2, p. 145-157, 2008.

PARK, T. et al. Polymorphic characterization of pharmaceutical solids, donepezil hydrochloride, by ¹³C CP/MAS solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 30, n. 9, 2009.

PEPPAS, N. A.; NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 75-81, 2014.

POMA, A.; TURNER, A. P. F.; PILETSKY, S. A. Advances in the manufacture of MIP nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 12, p. 629-637, 2010.

PONGJANYAKUL, T.; KHUNAWATTANAKUL, W.; PUTTIPIPATKHACHORN, S. Physicochemical characterizations and release studies of nicotine-magnesium aluminum silicate complexes. **Applied Clay Science**, v. 44, n. 3-4, p. 242-250, 2009.

PONGJANYAKUL, T. et al. Characterization of chitosan-magnesium aluminum silicate nanocomposite films for buccal delivery of nicotine. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 55, p. 24-31, 2013.

PONGJANYAKUL, T.; SUKSRI, H. Alginate-magnesium aluminum silicate films for buccal delivery of nicotine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 74, n. 1, p. 103-113, 2009.

PORTER, C. J.; TREVASKIS, N. L.; CHARMAN, W. N. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 3, p. 231-248, 2007.

PRAUSNITZ, M. R.; LANGER, R. Transdermal drug delivery. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1261-1268, 2009.

PUOCI, F. et al. New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media. **European Polymer Journal**, v. 45, n. 6, p. 1634-1640, 2009.

ROJANASTHIEN, N. et al. Bioequivalence study of donepezil hydrochloride tablets in healthy male volunteers. **ISRN Pharmacology**, v. 2012, p. 1-4, 2012.

ROSENBERG, R. T.; SIEGEL, S. J.; DAN, N. Release of highly hydrophilic drugs from poly(ϵ -caprolactone) matrices. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 107, n. 5, p. 3149-3156, 2008.

ROSTAMIZADEH, K.; VAHEDPOUR, M.; BOZORGI, S. Synthesis, characterization and evaluation of computationally designed nanoparticles of molecular imprinted polymers as drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 424, n. 1-2, p. 67-75, 2012.

RUELA, A. L. M. et al. In vitro evaluation of transdermal nicotine delivery systems commercially available in Brazil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 3, p. 579-588, 2013.

RUELA, A. L. M. et al. LC-PDA and LC-MS studies of donepezil hydrochloride degradation behaviour in forced stress conditions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 11, p. 2094-2101, 2014.

RUELA, A. L. M.; FIGUEIREDO, E. C.; PEREIRA, G. R. Molecularly imprinted polymers as nicotine transdermal delivery systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 248, p. 1-8, 2014.

RUELA, A. L. M.; CARVALHO, F. C.; PEREIRA, G. R. Exploring the phase behavior of monolein/oleic acid/water systems for enhanced donepezil administration for Alzheimer disease treatment. **Journal of Pharmaceutcial Sciences**, v. 106, n. 1, p. 71-77, 2016.

SALUJA, S. et al. A novel electronic skin patch for delivery and pharmacokinetic evaluation of donepezil following transdermal iontophoresis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 2, p. 395-399, 2013.

SAMBE, H. et al. Uniformly-sized, molecularly imprinted polymers for nicotine by precipitation polymerization. **Journal of Chromatography A**, v. 1134, n. 1-2, p. 88-94, 2006.

SEGATELLI, M. G. et al. Cadmium ion-selective sorbent preconcentration method using ion imprinted poly(ethylene glycol dimethacrylate-co-vinylimidazole). **Reactive and Functional Polymers**, v. 70, n. 6, p. 325-333, 2010.

SEIFI, M.; et al. Preparation and study of tramadol imprinted micro-and nanoparticles by precipitation polymerization: Microwave irradiation and conventional heating method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, n. 1-2, p. 37-44, 2014.

SELZER, D. et al. Finite and infinite dosing: Difficulties in measurements, evaluations and predictions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 2, p. 278-294, 2013.

SHEIBANY, S. et al. Mesoporous molecularly imprinted polymer nanoparticles as a sustained release system of azithromycin. **RSC Advances**, v. 5, p. 98880-98891, 2015.

SHI, Y. et al. Selective solid-phase extraction of cholesterol using molecularly imprinted polymers and its application in different biological samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n. 5, p.549–555, 2006.

SHIFFMAN, S. et al. Rapid absorption of nicotine from new nicotine gum formulations. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 91, n. 3, p. 380-384, 2009.

SINGH, N. et al. Formulation and statistical optimization of novel double-incorporated PLA-PLGA microparticles within an alginate-pectinate platform for the delivery of nicotine. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n. 2, p. 153-167, 2006.

SUBEDI, R. K. et al. Formulation and in vitro evaluation of transdermal drug delivery system for donepezil. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2012.

SUEDEE, R. et al. Development of a pH-responsive drug delivery system for enantioselective-controlled delivery of racemic drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 142, n. 1, p. 122-131, 2010.

SUKSAEREE, J. et al. Characterization, in vitro release and permeation studies of nicotine transdermal patches prepared from deproteinized natural rubber latex blends. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 90, n. 7, p. 906-914, 2012.

SUMI, V. S. et al. Imprinted polymers as drug delivery vehicles for metal-based anti-inflammatory drug. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, n. 1-2, p. 30-37, 2008.

TAN, Y. et al. A study of a new TSM bio-mimetic sensor using a molecularly imprinted polymer coating and its application for the determination of nicotine in human serum and urine. **Bioelectrochemistry**, v. 53, n. 2, p. 141–148, 2001.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: Preparo e aplicações de MIP (“Molecularly imprinted polymers”) em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076-1086, 2005.

TIRNAKSIZ, F.; YUCE, Z. Development of transdermal system containing nicotine by using sustained release dosage design. **Farmaco**, v. 60, n. 9, p. 763-770, 2005.

TISEO, P. J.; PERDOMO, C. A.; FRIEDHOFF, L. T. Metabolism and elimination of ¹⁴C-donepezil in healthy volunteers: A single-dose study. **British journal of Clinical Pharmacology**, v. 46, Suppl 1, p. 19-24, 1998.

TYNDALE, R. F.; SELLERS, E. M. Variable CYP2A6-mediated nicotine metabolism alters smoking behavior and risk. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 29, n. 4, p. 548-552, 2001.

UMPLEBY, R. J. et al. Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers. **Journal of Chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 804, n. 1, p. 141-149, 2004.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

WATKINSON, A. C. A commentary on transdermal drug delivery systems in clinical trials. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 1, p. 3082-3088, 2013.

WHITCOMBE, M. J.; VULFSON, E. N. Imprinted polymers. **Advanced Materials**, v. 13, n. 7, p. 467-478, 2001.

WHITE, H. K.; LEVIN, E. D. Chronic transdermal nicotine patch treatment effects on cognitive performance in age-associated memory impairment. **Psychopharmacology**, v. 171, n. 4, p. 465-471, 2004.

WILSON, A. L. et al. Nicotine patches in Alzheimer’s Disease: Pilot study on learning, memory, and safety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 51, n. 2-3, p. 509-514, 1995.

WOLF, R.; TÜZÜN, B.; TÜZÜN, Y. Adverse skin reactions to the nicotine transdermal system. **Clinics in dermatology**, v. 16, n. 5, p. 617-623, 1998.

WU, C. T. et al. Detection of nicotine based on molecularly imprinted TiO₂-modified electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 633, n. 1, p. 119-126, 2009.

- WU, J. et al. Programmable transdermal drug delivery of nicotine using carbon nanotube membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 26, p. 11698-11702, 2010.
- YANG, J. et al. Selective hair analysis of nicotine by molecular imprinted solid-phase extraction: An application for evaluating tobacco smoke exposure. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 6, 896-903, 2007.
- YEHIA, S. A.; ELSHAFFEEY, A. H.; ELSAYED, I. Biodegradable donepezil lipospheres for depot injection: Optimization and in-vivo evaluation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 10, p. 1425-1437, 2012.
- YIN, C. et al. Preparation of slightly crosslinked monodisperse poly(maleic anhydride-cyclohexyl vinyl ether-divinylbenzene) functional microspheres with anhydride groups via precipitation polymerization. **Particuology**, v. 19, p. 99-106, 2015.
- ZEVIN, S.; GOURLAY, S. G.; BENOWITZ, N. L. Clinical pharmacology of nicotine. **Clinics in Dermatology**, v. 16, n. 5, p. 557-564, 1998.
- ZHANG, P. et al. In vitro and in vivo evaluation of donepezil-sustained release microparticles for the treatment of Alzheimer's disease. **Biomaterials**, v. 28, n. 10, p. 1882-1888, Apr. 2007.
- ZHANG, Y.; CHAN, H. F.; LEONG, K. W. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 104-120, 2013.
- ZHOU, T. et al. Molecularly imprinted polymer beads for nicotine recognition prepared by RAFT precipitation polymerization: A step forward towards multi-functionalities. **RSC Advances**, v. 4, n. 57, p. 30292-30299, 2014.