

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Estudo físico-químico de micropartículas compostas por P(HB-HV) e por blendas de P(HB-HV) e PCL contendo fármacos-modelo lipofílicos ionizáveis

FERNANDA POLETTO

PORTO ALEGRE, 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Estudo físico-químico de micropartículas compostas por P(HB-HV) e por blendas de P(HB-HV) e PCL contendo fármacos-modelo lipofílicos ionizáveis

Dissertação apresentada por **Fernanda Poletto** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr. Adriana Raffin Pohlmann

Co-Orientadora: Dr. Maria Inês Ré

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 13.04.2006, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof. Dr. George González Ortega

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Letícia Koester

Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dr. Teresa Cristina Tavares Dalla Costa

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

P765e Poletto, Fernanda.

Estudo físico-químico de micropartículas compostas por P(HB-HV) e por blendas de P(HB-HV) e PCL contendo fármacos-modelo lipofílicos ionizáveis – Porto Alegre: UFRGS, 2006. – xxvi, 162 p.: il., gráf., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Micropartículas. 2. PCL. 3. Blendas de polímeros. 4. Sistemas de liberação de fármacos. 5. Modelagem matemática. I. Pohlmann, Adriana Raffin II. Ré, Maria Inês III. Título.

CDU: 615.4

Bibliotecárias responsáveis:

Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036

Margarida Maria C. F. Ferreira, CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Laboratório K204 do Instituto de Química da UFRGS, na cidade de Porto Alegre, com financiamento da Rede Cooperativa para Aplicação de Polihidroxialcanoatos (PHAs) no Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada de Ativos CT SAUDE/CNPq/2002, processo 500036/02-0. A autora recebeu bolsa de estudos do CNPq/MCT.

“Não trabalhamos apenas para ganhar dinheiro, mas para encontrar o significado de nossas vidas. O que fazemos é grande parte do que somos”.

(Alan Ryan)

À minha família

AGRADECIMENTOS

À Professora Dr. Adriana Raffin Pohlmann pela acolhida, bem como pela orientação dedicada nesses dois anos de convívio, os quais foram fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal. À Dr. Maria Inês Ré, pela valiosa co-orientação, especialmente no que se refere ao estudo de fenômenos difusionais a partir de micropartículas.

À Professora Dr. Sílvia Stanisçuaski Guterres pela importante colaboração no decorrer desse trabalho. Ao Professor Dr. Edilson Benvenuto (IQ-UFRGS) por possibilitar a realização das análises de área superficial e ao Professor Paulo Brenner (IQ-UFRGS) pelo auxílio na execução das análises de DSC.

Aos colegas dos laboratórios K204 (IQ - UFRGS) e 405 (Farmácia - UFRGS), pelos agradáveis momentos de convivência e pelo conhecimento compartilhado. Aos colegas do Laboratório de Tecnologia de Partículas (IPT/SP), pela calorosa recepção e auxílio. Em especial, à Maria Lionzo, à Clarissa Xavier e à Letícia Sias, pela amizade, coleguismo e companhia nas madrugadas de experimento no laboratório. Ao Eliézer Jäger, pela ajuda na fase inicial desse trabalho. Ao Diogo Miron, pelas valiosas discussões sobre validação de métodos analíticos.

À minha família, especialmente meus pais, Deniz e Denise, e minha irmã, Mariana, pelo suporte quando decidi estudar em Porto Alegre, pela compreensão nos momentos de ausência e apoio irrestrito quanto ao caminho que escolhi.

Ao Hugo, por ter sido meu grande companheiro nessa etapa, compartilhando comigo conquistas e dificuldades, pelo apoio e paciência na fase final do trabalho e, principalmente, por nunca ter me deixado desistir.

Ao CNPq/MCT, pela bolsa de estudos concedida e à Rede Cooperativa para Aplicação de Polihidroxialcanoatos (PHAs) no Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada de Ativos CT SAUDE/CNPq/20020, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ÍNDICE DE TABELAS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS	xxi
RESUMO	xxiii
ABSTRACT	xxv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo geral	7
2.2. Objetivos específicos	7
3. REVISÃO	9
3.1. Poli(hidroxicanoatos)	11
3.2. Blendas Poliméricas	14
3.3. Sistemas Microparticulados como Carreadores de Fármacos	17
3.3.1. Métodos de Preparação de Micropartículas	18
3.3.2. Caracterização Físico-Química	20
3.3.3. Micropartículas de PHB e P(HB-HV)	24
3.4. Fármacos-Modelo Lipofílicos Ionizáveis	25
3.3.4. Diclofenaco	26
3.3.5. Indometacina	27
3.5. Perfis de Liberação <i>In Vitro</i> de Fármacos a Partir de Sistemas Microparticulados	29
3.3.6. Técnicas Experimentais para a Determinação dos Perfis de Liberação	30

3.3.7. Influência das Características Físico-Químicas das Micropartículas nos Perfis de Liberação	31
3.6. Modelos Matemáticos de Liberação de Fármacos.....	32
3.3.8. Métodos <i>Ab Initio</i>	32
3.3.9. Técnicas de Simulação Numérica	36
3.3.10. Correlações Empíricas	37
3.7. Perfis de Liberação de Fármacos a Partir de Micropartículas de PHB e P(HB-HV).....	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1. Materiais	45
4.1.1. Matérias-primas	45
4.1.2. Aparelhos e Equipamentos.....	45
4.1.3. Solventes e outros Materiais	46
4.2. Métodos	47
4.2.1. Obtenção de Diclofenaco na Forma Ácida a Partir de seu Sal Sódico.....	47
4.2.2. Preparação de Micropartículas de P(HB-HV) e suas Blendas com PCL por Emulsificação/Evaporação do Solvente (o/a).....	47
4.2.3. Caracterização Físico-Química das Micropartículas.....	48
4.2.4. Modelagem Matemática dos Perfis de Liberação <i>In Vitro</i>	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1. Caracterização Físico-Química das Micropartículas de P(HB-HV) e de blendas de P(HB-HV)/PCL	59
5.1.1. Determinação do Teor de Fármaco e Eficiência de Encapsulação	59
5.1.2. Investigação do Comportamento Térmico das Micropartículas	60

5.1.3.	Espectroscopia na Região do Infravermelho	71
5.1.4.	Avaliação Morfológica.....	75
5.1.5.	Perfis de Liberação <i>In Vitro</i>	81
5.2.	Modelagem Matemática dos Perfis de Liberação	83
6.	CONCLUSÕES.....	97
7.	REFERÊNCIAS.....	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química dos PHA	11
Figura 2: Estruturas de ressonância dos PHA.....	13
Figura 3: Representação esquemática da formação de micropartículas por emulsificação/ evaporação do solvente.....	19
Figura 4: Estrutura química do diclofenaco	27
Figura 5: Estrutura química da indometacina.....	28
Figura 6: Termogramas das misturas físicas de P(HB-HV)/ PCL.....	61
Figura 7: Termogramas do P(HB-HV), das micropartículas da série MP e da PCL.....	62
Figura 8: Termogramas do diclofenaco, do P(HB-HV), das micropartículas da série DIC e da PCL.....	63
Figura 9: Termogramas da indometacina, do P(HB-HV), das micropartículas da série IND e da PCL.....	64
Figura 10: Termogramas das misturas físicas de diclofenaco e MP-50 e de indometacina e MP-50 em diferentes proporções.....	67
Figura 11: Grau de cristalinidade em função da concentração de PCL na matriz para P(HB-HV) e PCL	70
Figura 12: Espectro na região do infravermelho de filme de P(HB-HV)	71
Figura 13: Espectro na região do infravermelho de filme de PCL	72
Figura 14: Espectro na região do infravermelho do diclofenaco em partilha de KBr	73
Figura 15: Espectro na região do infravermelho da indometacina em pastilha de KBr	73

Figura 16: Espectros na região do infravermelho em pastilha de KBr de MP-50; DIC-50 e diclofenaco	74
Figura 17: Espectro na região do infravermelho em pastilha de KBr de MP-50; IND-50 e indometacina.....	75
Figura 18: Fotomicrografias eletrônicas das micropartículas MP-0, MP-10, MP-30 e MP-50.	76
Figura 19: Fotomicrografias eletrônicas das micropartículas DIC-0, DIC-10, DIC-30, DIC-50, IND-0, IND-10, IND-30 e IND-50.....	77
Figura 20: Imagens obtidas por microscopia óptica das micropartículas MP-50, DIC-50 e IND-50, sob luz normal.....	78
Figura 21: Variação do diâmetro de partícula $D[4,3]$ em função do percentual de PCL presente na matriz	80
Figura 22: Curvas de dissolução de diclofenaco em pó e perfis de liberação de micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/PCL contendo diclofenaco, determinados em meio tampão pH $7,4 \pm 0,1$, a $37,0 \pm 0,5$ °C, sob agitação magnética constante.	81
Figura 23: Curvas de dissolução de indometacina em pó e perfis de liberação de micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/PCL contendo indometacina, determinados em meio tampão pH $7,4 \pm 0,1$, a $37,0 \pm 0,5$ °C, sob agitação magnética constante.	82
Figura 24: Modelagem dos dados de liberação de diclofenaco a partir das micropartículas DIC-0, DIC-10, DIC-30 e DIC-50, através das equações monoexponencial e biexponencial.....	84

Figura 25: Modelagem dos dados de liberação de indometacina a partir das micropartículas IND-0, IND-10, IND-30 e IND-50, através das equações monoexponencial e biexponencial.....	85
Figura 26: Ajuste dos dados de liberação de diclofenaco a partir das micropartículas DIC-0, DIC-10, DIC-30 e DIC-50 à equação de Baker-Lonsdale	91
Figura 27: Ajuste dos dados de liberação de indometacina a partir das micropartículas IND-0, IND-10, IND-30 e IND-50 à equação de Baker-Lonsdale	92
Figura 28: Plotagem do logaritmo natural do produto do coeficiente de difusão aparente e da concentração de fármaco solubilizado na matriz, $\ln(DC_{s,m} \times 10^{16})$ correspondente ao diclofenaco e à indometacina, a partir das micropartículas de blendas de P(HB-HV)/ PCL, em função do percentual de PCL na matriz	94
Figura 29: Plotagem dos valores do fator de porosidade-tortuosidade relativo (ε/τ) em função da razão entre as áreas superficiais e o quadrado do raio das micropartículas contendo diclofenaco e indometacina.	96

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades térmicas de diferentes PHA e de polímeros sintéticos	12
Tabela 2: Mecanismos de liberação de substâncias a partir de sistemas poliméricos de acordo com o expoente de liberação n relacionado à lei da potência	38
Tabela 3: Composição de PCL e P(HB-HV) na fase orgânica.....	48
Tabela 4: Valores de teor e eficiência de encapsulação dos fármacos-modelo diclofenaco e indometacina em micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/PCL	60
Tabela 5: Valores de temperatura de fusão e temperatura de transição vítrea das matérias-primas e micropartículas	65
Tabela 6: Valores de entalpia de fusão e grau de cristalinidade do P(HB-HV) e da PCL presentes nas misturas físicas e nas micropartículas, bem como o grau de cristalinidade total das amostras	69
Tabela 7: Áreas superficiais específicas das micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/PCL.....	79
Tabela 8: Distribuição de tamanho das micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/ PCL.....	80
Tabela 9: Parâmetros da modelagem matemática dos perfis de liberação de diclofenaco a partir de micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/PCL utilizando as equações monoexponencial e biexponencial	86
Tabela 10: Parâmetros da modelagem matemática dos perfis de liberação de indometacina a partir de micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/PCL utilizando as equações monoexponencial e biexponencial	87

Tabela 11: Tempo de meia-vida das fases rápida e lenta de liberação de diclofenaco e indometacina a partir de micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/PCL em meio tampão pH $7,4 \pm 0,1$, a $37,0 \pm 0,5$ ° C.....	88
Tabela 12: Coeficientes de correlação (<i>R</i>) referentes ao ajuste dos dados de liberação à equação de Baker-Lonsdale	90
Tabela 13: Valores do produto entre o coeficiente de difusão aparente e a concentração de fármaco molecularmente dissolvido na matriz, $DC_{s,m}$, correspondentes ao diclofenaco e à indometacina incorporados às micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/PCL.....	93
Tabela 14: Fator de porosidade-tortuosidade relativo das micropartículas contendo diclofenaco ou indometacina	95

LISTA DE ABREVIATURAS

- P(HB-HV) : poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)
- PHB : poli(3-hidroxibutirato)
- PVA : poli(álcool vinílico)
- PCL : poli(*epsilon*-caprolactona)
- MP-0 : micropartículas de P(HB-HV) sem fármaco
- MP-10 : micropartículas de blenda de P(HB-HV) e PCL na proporção 90:10 (m/m) sem fármaco
- MP-30 : micropartículas de blenda de P(HB-HV) e PCL na proporção 70:30 (m/m) sem fármaco
- MP-50 : micropartículas de blenda de P(HB-HV) e PCL na proporção 50:50 (m/m) sem fármaco
- DIC-0 : micropartículas de P(HB-HV) contendo diclofenaco
- DIC-10 : micropartículas de blenda de P(HB-HV) e PCL na proporção 90:10 (m/m) contendo diclofenaco
- DIC-30 : micropartículas de blenda de P(HB-HV) e PCL na proporção 70:30 (m/m) contendo diclofenaco
- DIC-50 : micropartículas de blenda de P(HB-HV) e PCL na proporção 50:50 (m/m) contendo diclofenaco
- IND-0 : micropartículas de P(HB-HV) contendo indometacina
- IND-10 : micropartículas de blenda de P(HB-HV) e PCL na proporção 90:10 (m/m) contendo indometacina

IND-30	: micropartículas de blenda de P(HB-HV) e PCL na proporção 70:30 (m/m) contendo indometacina
IND-50	: micropartículas de blenda de P(HB-HV) e PCL na proporção 50:50 (m/m) contendo indometacina
Série MP	: série de micropartículas sem fármaco
Série DIC	: série das micropartículas que contêm diclofenaco
Série IND	: série das micropartículas que contêm indometacina
SEM	: microscopia eletrônica de varredura
$D[4,3]$: diâmetro de esfera equivalente
DSC	: calorimetria exploratória diferencial
T_g	: temperatura de transição vítrea
T_m	: temperatura de fusão
ΔH_m	: entalpia de fusão experimental
ΔH_m^o	: entalpia de fusão de material 100 % cristalino
χ_c	: grau de cristalinidade
MSC	: critério de seleção de modelo
pKa	: logaritmo negativo da constante de ionização molecular
$t_{1/2}$: tempo de meia-vida
ε/τ	: fator de porosidade-tortuosidade relativo
$DC_{s,m}$: produto da solubilidade do fármaco na matriz e seu coeficiente de difusão aparente

RESUMO

Micropartículas formadas por blendas de P(HB-HV) com PCL apresentam aumento da porosidade com o aumento do percentual de PCL. Considerando-se a influência de poros na velocidade de liberação de fármacos, bem como a ausência de estudos que correlacionem quantitativamente perfis de liberação e características morfológicas de micropartículas de P(HB-HV), o objetivo desse trabalho consistiu na preparação e caracterização de micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/PCL em diferentes proporções, buscando-se essa correlação para perfis de liberação de dois fármacos-modelo lipofílicos e ionizáveis (diclofenaco e indometacina). A técnica de emulsificação/evaporação do solvente foi empregada na preparação das micropartículas, com eficiência de encapsulação de cerca de 85 %. As micropartículas apresentaram formato esférico e interior oco. O diâmetro médio dos sistemas (122 μm a 273 μm) foi dependente da concentração de PCL, apresentando polidispersão inferior a 1,8. A metodologia de preparação das micropartículas influenciou no processo de cristalização do P(HB-HV). Adicionalmente, a indometacina atuou como um antiplastificante desse polímero. A liberação dos fármacos foi sustentada, cuja velocidade aumentou com o aumento da concentração de PCL. Tais perfis foram descritos por uma equação biexponencial. A partir do ajuste dos dados de liberação à equação de Baker-Lonsdale, determinou-se o produto $DC_{s,m}$ entre o coeficiente de difusão aparente dos fármacos e sua solubilidade na matriz. O logaritmo natural de $DC_{s,m}$ foi diretamente proporcional ao percentual de PCL. Além disso, o fator de porosidade-tortuosidade relativo mostrou-se inversamente proporcional à razão entre a área superficial e o quadrado do raio das micropartículas. A partir dos resultados desse estudo, sugeriu-se que o diclofenaco encontra-se associado às micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/PCL na forma de aglomerados nanométricos, enquanto que a indometacina é solubilizada pela matriz polimérica. Além disso, demonstrou-se que o controle da liberação pode ser efetuado pela modulação da morfologia das micropartículas.

Palavras-chave: P(HB-HV), PCL, micropartículas, perfis de liberação de fármacos, modelagem matemática, blenda polimérica.

ABSTRACT

Physico-Chemical Study of Microparticles Composed of P(HB-HV) and P(HB-HV)/PCL Blends Loaded with Ionizable Lipophilic Drug-Models

Microparticles composed of P(HB-HV)/PCL demonstrate an increase in porosity with a concomitant increase in PCL concentration. Several reports indicate that pores are able to increase the rate of drug delivery. Up to now, there is a lack of information regarding the correlation between the drug release profiles and the P(HB-HV) microparticles morphology. In this context, the objectives of the current work were the preparation and the characterization of microparticles composed of P(HB-HV) and P(HB-HV)/PCL in different proportions in order to obtain a correlation between the microparticles morphology and the release profiles, using two lipophilic and ionizable drug-models, diclofenac and indomethacin. Microparticles, prepared by emulsion/solvent evaporation technique, presented encapsulation efficiencies about 85 %. The SEM analyses showed hollow and spherical microparticles. Their average diameters (122 μm to 273 μm) were dependent on the PCL concentration, and the polydispersity values were lower than 1.8. DSC analyses showed that the preparation process influenced on the P(HB-HV) crystallization. Additionally, T_g values indicated that indomethacin was an antiplasticizer agent of P(HB-HV). The drug release from the microparticles showed sustained profiles. The release rate was faster with the increase in the PCL concentration. The profiles were described by a biexponential equation. After the adjustment of the release data to the Baker-Lonsdale equation, it was possible to determine the value of the product between the drug apparent diffusion coefficient and the drug solubility in the matrix ($DC_{s,m}$) for each formulation. The logarithms of such values were directly proportional to the PCL percentual. Besides, the relative porosity-tortuosity factor of the microparticles was inversely proportional to the ratio of their specific surface areas and the square of their radius. Based on the obtained results, it was proposed that the diclofenac is associated to the microparticles as nanometric agglomerates, while indomethacin was molecularly dispersed in the polymeric matrix. In addition, results demonstrated that the release can be modulated by controlling the microparticle morphology.

Keywords: P(HB-HV), PCL, microparticle, drug release, mathematical modeling, polymeric blend.

1. INTRODUÇÃO

Sistemas poliméricos carreadores de fármacos vêm despertando crescente interesse do meio científico devido à sua capacidade de liberação controlada e vetorização das substâncias ativas aos seus locais de ação específicos (WASHINGTON, 1990; YANG e ALEXANDRIDIS, 2000). Dentre esses sistemas, destacam-se as micropartículas, cujo tamanho encontra-se na faixa de 1 a 1000 μm (YANG e ALEXANDRIDIS, 2000). As respostas obtidas a partir de sistemas carreadores microparticulados estão intimamente relacionadas com as propriedades físico-químicas dos mesmos e também dos fármacos neles contidos. Nesse sentido, o controle das características da micropartícula permite o planejamento de uma formulação com perfis específicos de liberação do fármaco. Para tanto, deve-se conhecer as propriedades do sistema e do fármaco antecipadamente (POUPAERT e COUVREUR, 2003).

A influência das características da matriz nos perfis de liberação pode ser estudada pela incorporação de fármacos-modelo aos sistemas. Diclofenaco e indometacina, dois antiinflamatórios não-esteróides, vêm sendo amplamente empregados por nosso grupo como fármacos-modelo lipofílicos ionizáveis. Ambos apresentam valores de pKa próximos (3,8 e 4,5, respectivamente) e solubilidade em água na mesma ordem de grandeza ($6 \times 10^{-5} \text{ M}$ e $1 \times 10^{-5} \text{ M}$, respectivamente).

A escolha do polímero utilizado na composição de sistemas carreadores é dependente da via de administração e das características buscadas na investigação (KREUTER, 1991; SOPPIMATH *et al.*, 2001). Dentre os materiais utilizados como matrizes de micropartículas, especial atenção vem sendo dedicada a estudos envolvendo poliésteres biodegradáveis e biocompatíveis. Esses podem ser divididos em sintéticos e naturais, conforme sua fonte de obtenção. No primeiro grupo encontram-se polímeros como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e poli(*epsilon*-caprolactona) (PCL). No segundo grupo encontram-se os poli(3-hidroxicanoatos), tais como o poli(3-hidroxiбутирато) (PHB) e seus copolímeros (BRANNON-PEPPAS, 1995; REDDY *et al.*, 2003; EDLUND e ALBERTSSON, 2003; KHANNA e SRIVASTAVA, 2005). A tecnologia de biossíntese, extração e produção de PHB e derivados foi recentemente desenvolvida no Brasil, utilizando-se sacarose como matéria-prima (COPERSUCAR, 1991). Desse modo, o país pode tornar-se potencialmente competitivo nesse mercado de

polímeros biodegradáveis, transformando o PHB e seus copolímeros com hidroxivalerato (HV) em candidatos de interesse no desenvolvimento de sistemas poliméricos de liberação controlada de fármacos.

Uma estratégia vantajosa no desenvolvimento de sistemas carreadores envolve o emprego de blendas poliméricas, que consistem na mistura de polímeros, cujo material resultante pode combinar características muitas vezes superiores às dos componentes puros (HA e CHO, 2002). Dentre essas características, pode-se citar modificações de morfologia, tal como a formação de poros de tamanho controlado, observada em sistemas microparticulados compostos por blendas de PCL e P(HB-HV) em diferentes proporções (EMBLETON e TIGHE, 1993). Há relatos na literatura de que poros podem aumentar consideravelmente a velocidade de liberação de fármacos (YANG *et al.*, 2000; MANDAL *et al.*, 2001; LE RAY *et al.*, 2003). No entanto, nenhuma correlação entre perfis de liberação de fármacos e características morfológicas de micropartículas de PHB e seus copolímeros com HV foi proposta até esse momento.

Considerando-se a ausência de estudos que apontem tais correlações, este trabalho buscou investigar a influência da morfologia de partícula nos perfis de liberação de fármacos sob um ponto de vista quantitativo. Para isso, assumiu-se a hipótese de que a liberação de fármacos lipofílicos incorporados em micropartículas compostas por blendas de PCL e P(HB-HV) é difusional, sendo que há uma correlação diretamente proporcional entre o percentual de PCL na matriz (o qual é reflexo da porosidade do sistema) e o produto entre o coeficiente de difusão aparente do fármaco e sua solubilidade na matriz, $DC_{s,m}$.

2. OBJETIVOS

2.1. **Objetivo geral**

Preparar e caracterizar micropartículas compostas por P(HB-HV) e por blendas de P(HB-HV)/PCL em diferentes proporções, buscando correlacionar sua morfologia com os perfis de liberação de dois fármacos-modelo lipofílicos ionizáveis incorporados a esses sistemas.

2.2. **Objetivos específicos**

- Preparar pós de micropartículas de P(HB-HV)/PCL nas proporções 100/0, 90/10, 70/30 e 50/50 (m/m) pela técnica de emulsificação/evaporação do solvente, contendo dois fármacos-modelo lipofílicos - um derivado fenilacético (diclofenaco) e um derivado indolacético (indometacina).
- Determinar o teor e a eficiência de encapsulação dos fármacos incorporados às micropartículas.
- Caracterizar as micropartículas quanto ao diâmetro médio, polidispersão, área superficial específica, forma, morfologia de superfície e presença de cristais de fármaco.
- Investigar o comportamento térmico das micropartículas e de suas matérias-primas por calorimetria diferencial exploratória.
- Verificar a possibilidade de ocorrência de incompatibilidades químicas entre as matérias-primas das micropartículas por espectroscopia na região do infravermelho.
- Determinar os perfis de liberação *in vitro* dos fármacos-modelo incorporados às micropartículas.

- Ajustar modelos matemáticos aos perfis e investigar o mecanismo de transporte de massa envolvido no processo de liberação dos fármacos.

3. REVISÃO



3.1. Poli(hidroxicanoatos)

Poli(hidroxicanoatos) (PHA) constituem uma classe de poliésteres biodegradáveis e biocompatíveis, produzida em geral por uma ampla variedade de microrganismos, atuando como fonte de carbono e energia para os mesmos. Tais polímeros são armazenados como grânulos no citoplasma celular em níveis superiores a 80 % da massa celular seca, sob condições de estresse nutricional. Mais de uma centena de PHA são conhecidos atualmente, com diferentes estruturas químicas e, conseqüentemente, apresentando diferentes características físico-mecânicas. A estrutura geral dos PHA pode ser visualizada na Figura 1 (BRAUNEGG *et al.*, 1998).

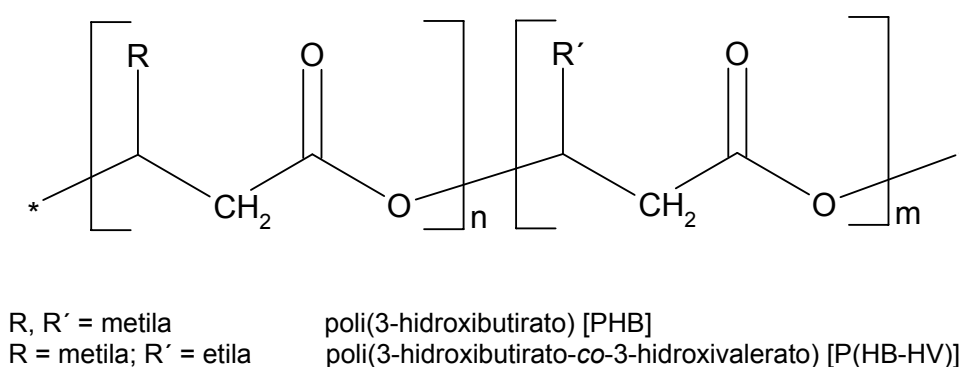


Figura 1: Estrutura química dos PHA.

O primeiro e mais intensamente investigado PHA de origem natural foi o poli(3-hidroxicanoato) (PHB), um polímero altamente cristalino derivado do ácido 3-hidroxicanoico. A massa molar do PHB produzido por bactérias não-recombinantes geralmente varia entre 1×10^4 e 3×10^6 g/mol, com uma polidispersão em torno de 2. Os monômeros constituintes do PHB estão naturalmente presentes no sangue e tecidos, o que justifica sua biocompatibilidade. Entretanto, seu emprego é limitado devido à sua alta friabilidade e baixa resistência mecânica (KUMAGAI e DOI, 1992; SUDESH *et al.*, 2000; CHEN e WU, 2005; KHANNA e SRIVASTAVA, 2005).

A incorporação de unidades de hidroxivalerato (HV) ao PHB resultou em um material com melhores características mecânicas, que podem variar conforme a proporção de cada monômero no copolímero resultante. O efeito do conteúdo de HV (0 a 20 mol %) nas propriedades físicas e mecânicas do PHB foi avaliado por SAVENKOVA e colaboradores (2000), que constataram aumento da elasticidade e diminuição da cristalinidade dos copolímeros em relação ao homopolímero. A diminuição da cristalinidade do PHB com o aumento do conteúdo de HV também foi observada por GURSEL e HASIRCI (1995). A partir de dados de ressonância magnética nuclear, CHEN e colaboradores (2002) atribuíram, em parte, a alta friabilidade do PHB a uma maior rigidez da sua região não-cristalina. Da mesma forma, a maior mobilidade de cadeia da região não-cristalina dos copolímeros avaliados no estudo, com conteúdo de HV de 4,33, 6,96 e 10,50 mol %, foi relacionada à sua menor friabilidade.

O grau de cristalinidade pode influenciar nas propriedades mecânicas de um polímero. Algumas destas propriedades do PHB, como resistência à tensão, são semelhantes às do poli(propileno) isotático. As cadeias de PHB tipicamente formam esferulitas quando cristalizadas a partir do material fundido (KUMAGAI e DOI, 1992). A sua temperatura de fusão (T_m) é próxima de 180 °C, diminuindo com o aumento do conteúdo de HV na estrutura (Tabela 1). O homopolímero apresenta alto grau de cristalinidade (70 %). Por sua vez, seus copolímeros apresentam valores menores de cristalinidade com o acréscimo do conteúdo de HV (KUMAGAI e DOI, 1992; PADERMSHOKE *et al.*, 2005; KUNZE *et al.*, 2006).

Tabela 1: Propriedades térmicas de diferentes PHA e de polímeros sintéticos.

Polímero ^a	T_m (°C) ^b	T_g (°C) ^c	Referência
P(3-HB)	175	9	AVELLA <i>et al.</i> , 2000
P(3-HB-co-7% 3-HV)	151	5	CHUN e KIM, 2000
P(3-HB-co-28% 3-HV)	102	-8	AVELLA <i>et al.</i> , 2000
P(4-HB)	60	-51	MARTIN e WILLIAMS, 2003
Poli(<i>epsilon</i> -caprolactona)	64	-61	CHUN e KIM, 2000
Poli(propileno) isotático	174	-17	AVELLA <i>et al.</i> , 2000
Poli(L-ácido láctico)	175	65	MARTIN e WILLIAMS, 2003

a – 3-HB, 3-hidroxibutirato; 3-HV, 3-hidroxivalerato; 4-HB, 4-hidroxibutirato

b – temperatura de fusão

c – temperatura de transição vítrea

O PHB é insolúvel em água e solúvel em solventes de baixa polaridade, como clorofórmio e diclorometano, pois estes apresentam parâmetros de solubilidade semelhantes ao do polímero. Essa característica hidrofóbica do PHB pode ser explicada pela sua estrutura eletrônica (Figura 2), que resulta em átomos de oxigênio da cadeia polimérica menos disponíveis para a solvatação da água (TERADA e MARCHESSAULT, 1999; AVELLA *et al.*, 2000).

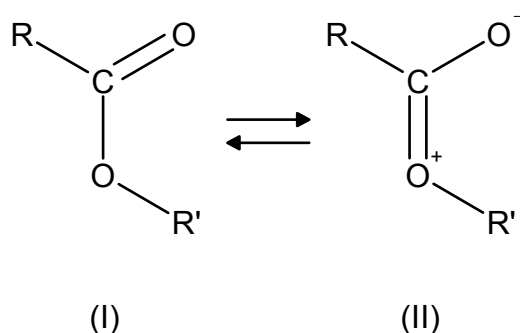


Figura 2: Estruturas de ressonância dos PHA.

Os resultados de investigações em cultura de células animais *in vitro* e testes com animais *in vivo* demonstraram a viabilidade celular do PHB. Entretanto, por tratar-se de material de origem bacteriana, outros fatores, como grau de pureza, métodos de processamento e propriedades de superfície podem influenciar na resposta biológica (CHEN e WU, 2005; KUNZE *et al.*, 2006). GOGOLEWSKI e colaboradores (1993) não observaram necrose, inflamação ou formação de abscesso após implante subcutâneo de PHB, porém houve um aumento de macrófagos e fibroblastos. Seu estudo mostrou que 56-99 % do polímero é degradado *in vivo* em 6 meses.

A aplicação de PHB e seus copolímeros para fins biomédicos vem sendo proposta como alternativa aos materiais de origem sintética. Há relatos na literatura envolvendo a utilização do P(HB-HV) como suporte para regeneração de ossos e de cartilagens (KÖSE *et al.*, 2003; KÖSE *et al.*, 2005), suturas (VOLOVA *et al.*, 2003) e sistemas de liberação controlada de fármacos (SENDIL *et al.*, 1999; LI e CHANG, 2005).

3.2. **Blendas Poliméricas**

Uma estratégia empregada no desenvolvimento de novos materiais envolve a produção de blendas poliméricas, que consistem na mistura de dois ou mais polímeros, onde o material resultante exibe combinações de características muitas vezes superiores às dos componentes isolados. Propriedades mecânicas, térmicas, morfológicas e de degradação podem ser modificadas pela escolha favorável dos componentes empregados (HA e CHO, 2002). Diferentes técnicas podem ser utilizadas para a preparação desses compostos, como dissolução dos polímeros em solvente apropriado e posterior evaporação (CHEN *et al.*, 2003), compressão/moldagem (BERTOLDO *et al.*, 2005), extrusão (GOMES *et al.*, 2002) ou combinações entre elas (WEN *et al.*, 2004).

Há relatos na literatura descrevendo a aplicação de blendas poliméricas no campo biomédico, preparadas por diferentes metodologias (CALANDRELLI *et al.*, 2000; JAYABALAN *et al.*, 2001). Dentre elas, pode-se citar a incorporação do complexo polimérico poli(vinilpirrolidona)-iodo (PVP-I) em poli(*epsilon*-caprolactona) (PCL), realizada por JONES e colaboradores (2002), que resultou em um filme biodegradável com atividade antimicrobiana, proposto como material alternativo para a fabricação de cânulas intra-uretrais.

Blendas poliméricas podem ser classificadas em três diferentes categorias, considerando-se a miscibilidade entre os componentes. Estes podem ser completamente miscíveis, parcialmente miscíveis ou imiscíveis. Blendas miscíveis são sistemas homogêneos resultantes de um processo de mistura onde é verdadeira a relação (Equação 1):

$$\Delta G_M = \Delta H_M - T \cdot \Delta S_M < 0 \quad T, p = \text{constantes}$$

(Equação 1)

onde T é a temperatura absoluta, p é a pressão e ΔG_M , ΔH_M e ΔS_M são as variações de energia livre, de entalpia e de entropia, respectivamente. Os principais fatores que afetam a miscibilidade da blenda são a natureza química e a massa molar dos polímeros. A interação entre as macromoléculas, ditada pela natureza química das mesmas, está relacionada ao fator entálpico – interações fortes apresentam $\Delta H_M < 0$. Por sua vez, a massa molar influencia ΔG_M de duas maneiras diferentes. Se a mistura é endotérmica, ΔS_M diminui com o aumento da massa molar, tornando a miscibilidade menos provável. O oposto acontece se ΔH_M apresenta valor negativo, já que o número de interações entre as macromoléculas aumenta com o aumento da massa molar, mesmo que essas interações impliquem em redução de ΔS_M (AVELLA *et al.*, 2000).

É possível avaliar essa característica através da medida da temperatura de transição vítrea (T_g) da blenda se a diferença entre as T_g dos polímeros puros for maior que 20 °C. A presença de uma única T_g da blenda indica miscibilidade dos seus componentes, enquanto que valores inalterados apontam imiscibilidade. Blendas parcialmente miscíveis apresentam valores de T_g intermediários aos encontrados para seus polímeros de origem (QIU *et al.*, 2005).

QIU e colaboradores (2005) investigaram a miscibilidade e o comportamento de cristalização de blendas de P(HB-HV) e PCL em proporções que variaram de 80/20 a 20/80, respectivamente, preparadas através da dissolução dos polímeros em solvente clorado. A ausência de alteração nos valores de T_g das blendas em comparação com os polímeros puros (cuja diferença entre ambos foi superior a 60 °C), bem como a existência de duas temperaturas de fusão (T_m) demonstraram a imiscibilidade dos polímeros na blenda. Além disso, foi observado que a velocidade de cristalização do P(HB-HV) a 70 °C diminuiu com o aumento da concentração de PCL. Estudo semelhante foi realizado por CHUN e KIM (2000), onde se verificou a imiscibilidade da blenda e a supressão da nucleação do P(HB-HV) com a adição de PCL.

Estes resultados confirmam um estudo conduzido por CHEE e colaboradores (2002), onde dados de viscosimetria foram utilizados para avaliar a miscibilidade de soluções de blendas de PHB e PCL, bem como de PHB e poli(óxido de etileno) (PEO), em clorofórmio. Os autores deduziram informações sobre o tipo de interação

entre os polímeros utilizando a equação de Huggins, que descreve a viscosidade de uma solução polimérica. Desvios positivos do comportamento ideal para a blenda de PHB e PEO foram relacionados à atração entre as espécies poliméricas. Desvios opostos foram detectados para a blenda de PHB e PCL, indicando repulsão e, conseqüentemente, imiscibilidade.

Fenômenos de transporte de massa são fortemente influenciados pelas características da blenda polimérica (GEORGE e THOMAS, 2001). HUATAN e colaboradores (1995) avaliaram o comportamento de liberação de albumina sérica bovina a partir de matrizes compostas por blendas de PCL de alta e de baixa massa molar e do copolímero em bloco poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno). A incorporação do copolímero aumentou o conteúdo de água disponível na matriz para a difusão da proteína, resultando em perfis de liberação não-fickianos, do tipo anômalo, diferentemente do perfil fickiano resultante do sistema formado apenas pela blenda de PCL de alta e baixa massa molar. Filmes de blendas de PHB isotático e atático e poli(epicloridrina) foram preparados por MIGUEL e colaboradores (2001) e avaliados quanto à permeabilidade de gás carbônico e vapor d'água. A presença de PHB atático nos filmes levou a um aumento da permeabilidade dessas moléculas em relação ao PHB isotático puro. Os autores relacionaram esse resultado com a diminuição da cristalinidade do sistema. Por sua vez, a poli(epicloridrina) diminuiu a permeabilidade do gás carbônico e da água na blenda.

O comportamento de biodegradação em meio aquoso de filmes formados por blendas de PCL e PHB foi estudado por LA CARA e colaboradores (2003). Ambos os polímeros foram tratados previamente com peróxidos (o que aumentaria sua reatividade). Paralelamente, foi avaliado PHB sem este tratamento prévio. Observou-se que o tratamento com peróxido aumentou significativamente a biodegradabilidade dos polímeros. No entanto, a biodegradabilidade do PHB, com ou sem pré-tratamento, mostrou-se superior à da PCL. Além disso, a cristalinidade do PHB na blenda aumentou com o tempo, o que foi explicado pelos autores como resultado do ataque seletivo dos microrganismos à fase amorfa desse polímero.

3.3. **Sistemas Microparticulados como Carreadores de Fármacos**

Materiais poliméricos podem ser vantajosamente utilizados como carreadores de fármacos, pois as moléculas ativas podem ser liberadas lentamente ou de maneira controlada pela difusão a partir do polímero ou pela decomposição da matriz. Além disso, apresentam a possibilidade de combinar componentes funcionais, que podem direcionar o sistema carreador ao sítio-alvo. Em vista dessas vantagens e em função da possibilidade de reabsorção pelo organismo, polímeros biodegradáveis são materiais de escolha no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. Seu emprego na forma de micropartículas vem sendo extensivamente investigado (BRANNON-PEPPAS, 1995; KAWAGUCHI, 2000; FREIBERG e ZHU, 2004).

Micropartículas podem ser definidas como matrizes poliméricas sólidas cujo tamanho encontra-se na faixa de 1 a 1000 μm (YANG e ALEXANDRIDIS, 2000). Esses dispositivos podem apresentar vantagens em relação a sistemas unitários de liberação de fármacos, apesar de sua produção mais complexa e custo elevado. Entre tais vantagens, pode-se citar menor variação na biodisponibilidade entre indivíduos, diminuição do risco de toxicidade em função de rompimento de um sistema de liberação prolongada unitário (*dose dumping*), maior reprodutibilidade em doses repetidas, além de proporcionar elevada biodisponibilidade dos fármacos encapsulados (KAWASHIMA et al., 1993; IWATA et al., 1999; VARDE e PACK, 2004).

Sistemas microparticulados vêm sendo estudados como dispositivos de liberação para diferentes vias de administração, como oftálmica (ZIMMER e KREUTER, 1995; AYALASOMAYAJULA e KOMPELLA, 2005), nasal (LI et al., 2005a), colônica (LAMPRECHT et al., 2004) e pulmonar (ZENG et al., 1995). A administração de micropartículas pela via oral, no entanto, é considerada a mais conveniente, especialmente quando é requerida rotineiramente (ANDRIANOV e PAYNE, 1998; NORRIS et al., 1998). Nesse caso, além das vantagens anteriormente descritas, sistemas microparticulados distribuem-se de forma uniforme e rápida numa grande área do trato gastrointestinal, minimizando o risco de dano

local. Adicionalmente, apresentam menor variação em relação ao tempo de trânsito gástrico em comparação com sistemas unitários, o que ocasiona menor flutuação na biodisponibilidade do fármaco entre indivíduos (KURKURI e AMINABHAVI, 2004).

3.3.1. Métodos de Preparação de Micropartículas

Vários métodos de preparação de micropartículas são descritos na literatura, os quais podem ser classificados como processos de natureza física, química ou físico-química. *Spray drying*, *spray cooling*, extrusão e leite fluidizado compreendem métodos de natureza física. Processos químicos envolvem polimerização interfacial e *in situ*. Coacervação e emulsificação/evaporação do solvente são caracterizados como processos físico-químicos. A escolha da técnica deve levar em consideração certos requisitos, como a manutenção da estabilidade e atividade biológica do fármaco, a obtenção de alta eficiência de encapsulação, uma distribuição apropriada de tamanho de partícula, reprodutibilidade da qualidade das micropartículas e do perfil de liberação, além da produção de pó de fluxo livre, sem agregação ou aderência (FLORENCE e ATTWOOD, 1998; JAIN *et al.*, 1998).

Dentre os processos físicos, a secagem por aspersão (*spray drying*) encontra ampla aplicação (THIES, 1996). Seu princípio consiste na conversão de uma dispersão líquida em produto seco pela sua aspersão numa câmara de secagem, onde entra em contato com o ar quente, o que permite uma secagem rápida. O processo é composto de quatro etapas essenciais: aspersão da amostra, contato líquido-vapor aquecido, evaporação e separação sólido-gás-vapor (BROADHEAD *et al.*, 1992; CONTE *et al.*, 1994).

Na polimerização interfacial, a membrana de uma microcápsula é formada na superfície de uma gota ou partícula por polimerização de monômeros reativos nessa superfície. Trata-se de uma técnica versátil, pois é possível encapsular diferentes núcleos, como soluções aquosas, líquidos hidrofóbicos e sólidos. Na polimerização *in situ*, a reação ocorre exclusivamente na fase contínua, resultando inicialmente em pré-polímeros de baixa massa molecular. Conforme esse pré-polímero cresce em

tamanho, deposita-se na superfície do núcleo a ser encapsulado, que se encontra disperso no meio (THIES, 1996).

Coacervação é uma das mais antigas técnicas de microencapsulação. Ela consiste na diminuição da solubilidade do polímero encapsulante por mudança de temperatura, adição de sais, não-solventes ou polímeros incompatíveis à solução polimérica, com sua conseqüente deposição ao redor do material a ser encapsulado. Por sua vez, a microencapsulação por emulsificação/evaporação do solvente compreende a emulsificação de uma solução polimérica contendo fármaco (dissolvido ou em suspensão) em uma segunda fase líquida e imiscível contendo agente estabilizante. O solvente é removido por aplicação de calor, pressão reduzida ou mesmo em condições de temperatura e pressão ambiente (Figura 3). O resultado final consiste em uma suspensão de micropartículas contendo fármaco, as quais podem ser filtradas ou centrifugadas, lavadas e secas (WATTS *et al.*, 1990; JAIN *et al.*, 1998).

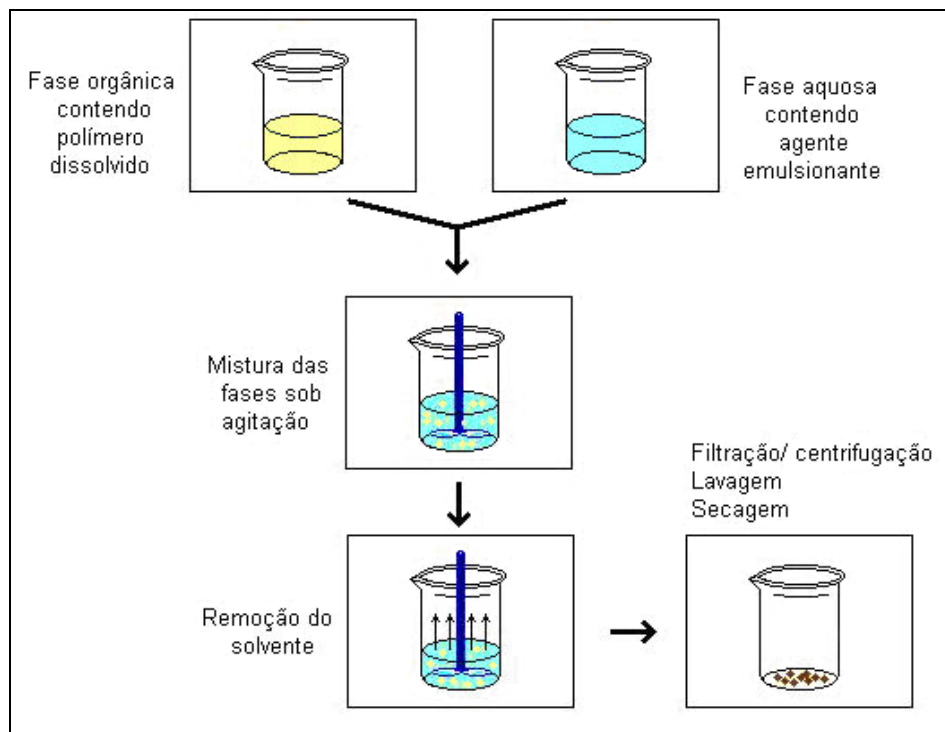


Figura 3: Representação esquemática da formação de micropartículas por emulsificação/ evaporação do solvente.

A seleção dos solventes de acordo com determinados critérios na fabricação de micropartículas por emulsificação/evaporação do solvente é fundamental para a eficácia do processo. Dentre eles, a fase dispersa deve ser capaz de dissolver o fármaco e o polímero, além de apresentar ponto de ebulição inferior ao da fase contínua. No entanto, esta última não deve dissolver o polímero ou o fármaco, bem como não deve deixar resíduos nas micropartículas. Ambas as fases devem ser imiscíveis. Diclorometano é o solvente orgânico mais empregado na produção de micropartículas por essa técnica. Trata-se de um líquido altamente volátil, de fácil remoção por evaporação. Porém, sua principal desvantagem é a toxicidade. Outro parâmetro a ser avaliado é o emulsionante, que atua principalmente na estabilização das gotas de emulsão na primeira etapa do processo. Um efeito desfavorável do emulsionante é aumentar a solubilidade do fármaco na fase contínua. Poli(álcool vinílico) (PVA), gelatina e metilcelulose são os compostos mais utilizados para esse fim (WATTS *et al.*, 1990).

3.3.2. Caracterização Físico-Química

Uma caracterização criteriosa das micropartículas é fundamental para garantir sua qualidade, especialmente na fase de desenvolvimento desses sistemas. Através da microscopia eletrônica de varredura, é possível avaliar forma, distribuição de tamanho, presença de poros, de agregados ou de cristais de fármaco adsorvidos nas partículas, bem como sua morfologia de superfície (GIOVANELLI *et al.*, 2005). Adicionalmente, a microscopia óptica pode ser empregada para avaliação preliminar de forma e tamanho de micropartículas, bem como no monitoramento de etapas de processos de fabricação de sistemas microparticulados que envolvam evaporação de solvente. Adicionalmente, a utilização de filtros polarizadores permite a distinção entre materiais isotrópicos e anisotrópicos. Desse modo, fármacos cristalinos podem ser identificados na superfície das partículas através dessa técnica (CROWDER *et al.*, 2003; MAIA *et al.*, 2004; ROSCA *et al.*, 2004).

A área superficial específica de um pó pode ser determinada pela medida da quantidade de um determinado gás, fisicamente adsorvido na superfície do sólido,

que corresponda a uma monocamada. O fenômeno de adsorção física resulta de forças fracas, como van der Waals, entre as moléculas de gás adsorvido e a superfície adsorvente do pó avaliado. Como a camada de adsorvente é monomolecular apenas a baixas pressões, medidas de adsorção são realizadas a baixas temperaturas, geralmente no ponto de ebulição do nitrogênio líquido, que corresponde a 77 K (- 196 °C) (MARTIN *et al.*, 1993; THE UNITED, 2004).

A porosidade de sistemas particulados pode ser um fator determinante para a eficiência de encapsulação e o perfil de liberação de fármacos (MANDAL *et al.*, 2001). Esse parâmetro pode ser obtido através de isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio gasoso à temperatura de ebulição do nitrogênio líquido. Materiais porosos apresentam histerese nos gráficos de isotermas de adsorção/dessorção. Isso ocorre em função do fenômeno de condensação/evaporação do adsorvato nos poros. Além disso, o tipo de gráfico de histerese formado pode fornecer informações a respeito da forma do poro. Outra maneira de determinar a porosidade de micropartículas envolve a obtenção das densidades aparente e real do pó. A densidade aparente pode ser obtida por picnometria de mercúrio, a qual determina a relação entre a massa e o volume do material analisado descontando-se o espaço interparticular. A densidade real, por sua vez, consiste na relação entre a massa e o volume do pó, descontando-se tanto o espaço interparticular quanto o espaço relativo a poros, capilares ou reentrâncias da micropartícula, podendo ser determinada por picnometria de hélio. Portanto, a porosidade da partícula ϵ_{int} pode ser obtida através da Equação 2 (MARTIN *et al.*, 1993):

$$\epsilon_{int} = 1 - \frac{\rho_g}{\rho}$$

(Equação 2)

onde ρ_g é a densidade aparente e ρ é a densidade real do pó.

Várias metodologias são descritas para determinar o tamanho das partículas em um pó, como microscopia, tamisação e sedimentação. Em geral, para partículas irregulares, o diâmetro é representado como o diâmetro de uma esfera equivalente, pois esta é a única forma geométrica que pode ser precisamente descrita por um único número. Os métodos para determinar esse diâmetro equivalente podem ser baseados nas dimensões volume, massa, superfície ou comprimento. Desse modo, nenhuma dessas medidas constitui-se como método verdadeiramente direto. A difratometria de *laser*, por exemplo, permite calcular o diâmetro das partículas analisadas a partir dos volumes de esfera equivalente, ou $D[4,3]$. Essa técnica segue o princípio de Fraunhofer, que descreve a interação entre a luz e partículas muito maiores que o seu comprimento de onda. Nessa situação, o raio de luz incidente é difratado na direção frontal à partícula com uma pequena alteração de ângulo. Os padrões de intensidade luminosa gerados apresentam-se a intervalos angulares regulares, que são proporcionais ao diâmetro da partícula responsável pela difração. A Equação 3 consiste na relação geral que descreve o diâmetro médio equivalente de partícula d_m (MARTIN *et al.*, 1993; STANIFORTH, 2002):

$$d_m = \left(\frac{\sum n d^{p+f}}{\sum n d^f} \right)^{1/p}$$

(Equação 3)

onde n é o número de partículas de uma faixa de tamanho cujo ponto médio, d , é um dos diâmetros de esfera equivalente. O termo p é um índice relacionado ao tamanho de uma partícula individual, sendo que $p = 1$, $p = 2$ ou $p = 3$ expressam comprimento, superfície ou volume da partícula, respectivamente. O índice de frequência f está relacionado com a expressão da distribuição de frequência dos tamanhos em termos de número de partículas, comprimento, superfície ou volume, apresentando respectivamente valores de 0, 1, 2 ou 3. Desse modo, $D[4,3]$ tem como parâmetros $p = 1$ e $f = 3$ (MARTIN *et al.*, 1993).

Outro fator fundamental na caracterização de micropartículas consiste na determinação da cristalinidade do sistema, pois o perfil de liberação é influenciado pelo estado físico do composto bioativo na matriz. Além disso, o grau de cristalinidade do polímero ou da blenda está relacionado com características do sistema, como por exemplo a eficiência de encapsulação do fármaco. Essa determinação pode ser feita através de difratometria de raio-X ou análise térmica (TAMILVANAN e SA, 2000; JEONG *et al.*, 2003). Na primeira, um feixe colimado de raio-X monocromático é difratado em várias direções quando atinge um pó cristalino. O cristal atua como um retículo de difração tridimensional dessa radiação. Esse fenômeno é descrito pela lei de Bragg (Equação 4), onde as ondas que são espalhadas a partir de diferentes regiões do cristal, em uma direção específica, viajam distâncias correspondentes a múltiplos inteiros (n) do comprimento de onda (λ) do feixe de raio-X incidente:

$$\frac{n\lambda}{2 \sin \theta} = d_{hkl}$$

(Equação 4)

onde d_{hkl} corresponde à distância entre as lamelas que compõem um cristal e θ é o ângulo de difração. Nessas circunstâncias, as ondas estão em fase (interferência construtiva). Tal condição ocorre apenas em materiais que apresentam periodicidade em sua estrutura molecular. Dessa forma, materiais cristalinos resultam em picos de difração bem definidos e característicos. No entanto, o arranjo randômico das moléculas em materiais amorfos resulta em espalhamento não-coerente dos raios-X e em picos largos e difusos (THE UNITED, 2004).

A análise térmica consiste no monitoramento da temperatura de uma amostra em função do tempo, em eventos que envolvam aquecimento ou resfriamento da mesma, sob condições programadas. As técnicas que encontram maior número de aplicações na área farmacêutica são a calorimetria diferencial exploratória (DSC) e a termogravimetria (TGA). A análise por DSC baseia-se na determinação do calor

envolvido em transições endotérmicas ou exotérmicas, pelo aquecimento simultâneo da amostra e de uma referência. A diferença de calor entre ambas fornece informações a respeito das propriedades físicas e energéticas do material, como fusão, decomposição, cristalização e condensação. A TGA, diferentemente, é um método baseado na determinação das variações de massa resultantes de transformações geradas pelo aquecimento da amostra, em função do tempo ou da temperatura. Desse modo, é possível obter informações sobre composição de substâncias e de misturas, presença de água adsorvida ou de cristalização, estabilidade e decomposição de amostras (HAINES, 1995; ROBINSON, 1995; CLAS *et al.*, 1999).

O perfil de liberação de fármacos a partir de sistemas microparticulados constitui um aspecto extremamente relevante no que concerne à eficiência terapêutica. Dessa maneira, sua determinação é fundamental para a caracterização de micropartículas. As informações podem ser obtidas por experimentos *in vitro* ou *ex vivo*, sendo que os principais mecanismos utilizados para explicar os perfis de liberação obtidos consistem em processos de difusão e/ou erosão. Os resultados devem ser compatíveis com a via de administração desejada. Cabe salientar que tais estudos devem ser realizados sob condição *sink*, onde o volume do meio de dissolução é grande o suficiente para que a concentração de fármaco presente não chegue a exceder 10 % do valor de sua concentração de saturação (AULTON, 2002).

3.3.3. Micropartículas de PHB e P(HB-HV)

MAIA e colaboradores (2004) investigaram como características dos polímeros PHB e P(HB-HV) e parâmetros do processo de emulsificação/ evaporação do solvente afetaram propriedades das microsferas. Foi observado que o aumento da concentração de PVA na fase aquosa externa de 0,5 % a 2,0 % (m/v) causou diminuição do tamanho das partículas. Entretanto, nenhuma diminuição significativa foi obtida de 2,0 a 4,0 % (m/v), em função do aumento da viscosidade da emulsão. Além disso, a degradação *in vitro* das micropartículas, em meio tampão pH 7,4 a

37 °C, foi avaliada por 30 dias através de gravimetria. Após esse período, o percentual de massa perdida foi de 2,0 % e 6,0 % para as micropartículas de PHB e de P(HB-HV), respectivamente. A degradação mais lenta do PHB foi relacionada à sua maior cristalinidade. Fotomicrografias eletrônicas demonstraram que as partículas mantiveram sua estrutura esférica após 30 dias de incubação, sem evidências de erosão na superfície.

Microcápsulas compostas por blendas de PCL e P(HB-HV) foram preparadas por EMBLETON e TIGHE (1993) através da técnica de dupla emulsificação/evaporação do solvente. Os autores observaram aumento na porosidade das microcápsulas proporcional à concentração de PCL na blenda, variando-a de 0 a 50 %, em intervalos de 10 %. Concentrações superiores a 50 % levaram à diminuição da porosidade. A avaliação do efeito da massa molar do P(HB-HV) na morfologia de superfície dos sistemas microparticulados também foi realizada. Observou-se que o tamanho dos poros na superfície de microcápsulas formadas por blendas de 20 % de PCL e 80 % de P(HB-HV) aumentou com o aumento da massa molar do P(HB-HV). Esse resultado foi relacionado com a diminuição da miscibilidade da blenda e aumento da viscosidade das gotas na fase de emulsificação. Os mesmos autores (EMBLETON e TIGHE, 2002) incorporaram hidrocortisona a micropartículas de P(HB-HV) de diferentes massas molares e conteúdo de HV, bem como de blendas desse polímero com PCL. Observou-se que a presença do fármaco causou a formação de pequenos poros na superfície das partículas, os quais aumentaram com a incorporação de maiores quantidades do fármaco.

3.4. Fármacos-Modelo Lipofílicos Ionizáveis

A utilização de fármacos-modelo na investigação de sistemas microparticulados é amplamente descrita na literatura (PANYAM *et al.*, 2003; SALONEN *et al.*, 2005; TU *et al.*, 2005). Um fármaco-modelo ideal deve apresentar alto grau de pureza, parâmetros físico-químicos e biológicos bem estabelecidos (SALONEN *et al.*, 2005), não deve sofrer degradação facilmente, deve apresentar

características estruturais que permitam fácil doseamento, como por exemplo, anéis aromáticos que absorvam luz ultravioleta, bem como deve ser um composto de fácil obtenção e baixo custo. Pode-se empregar moléculas com diferentes graus de lipofilia como fármacos-modelo, conforme o tipo de matriz polimérica escolhida para a produção das micropartículas. Moléculas lipofílicas apresentam alta afinidade com matrizes hidrofóbicas, resultando em elevados valores de eficiência de encapsulação. No entanto, sua liberação a partir do sistema carreador pode ser muito lenta, podendo corresponder a semanas (LI et al., 2005b). Por sua vez, moléculas hidrofílicas apresentam valores de eficiência de encapsulação muito baixos quando utiliza-se uma matriz hidrofóbica na formulação desses sistemas.

O emprego de moléculas lipofílicas ionizáveis poderia propiciar altos valores de eficiência de encapsulação e redução do tempo de liberação. Durante a preparação das micropartículas, seria incorporada a forma não-ionizada do fármaco-modelo, que apresenta maior afinidade pela matriz hidrofóbica. Por sua vez, a forma ionizada formaria-se no processo de liberação, apresentando uma solubilidade mais elevada no meio que a forma não-ionizada. No caso de ácidos fracos, em meio tampão pH 7,4 as moléculas encontram-se em sua forma ionizada. Portanto, a sua velocidade de liberação a partir de sistemas carreadores seria mais rápida em comparação com fármacos-modelo lipofílicos não-ionizáveis e a eficiência de encapsulação seria mais elevada em comparação com fármacos-modelo hidrofílicos, empregando-se uma matriz polimérica hidrofóbica. Dentro desse contexto, foram utilizados neste trabalho dois fármacos-modelo lipofílicos ionizáveis, diclofenaco e indometacina, ambos incorporados às micropartículas na sua forma ácida não-dissociada, pois o objetivo deste trabalho consistiu na verificação da hipótese de que a variação da concentração de PCL na matriz influencia na velocidade de liberação de fármacos.

3.3.4. Diclofenaco

O diclofenaco é um derivado do ácido fenilacético (Figura 4), disponível no mercado na forma de sal sódico ou potássico (ROBERTS II e MORROW, 2001). O

pó do diclofenaco na forma ácida é inodoro e apresenta coloração branca (BECK *et al.*, 2004), com temperatura de fusão correspondente a 180 °C (GIORDANO *et al.*, 2003). O pKa do diclofenaco na sua forma de ácido livre é de 3,8 e sua solubilidade em água é baixa ($6 \times 10^{-5} M$, a 25 °C) na forma não-ionizada (O'CONNOR e CORRIGAN, 2001). A massa molar do diclofenaco corresponde a 296 g/mol.

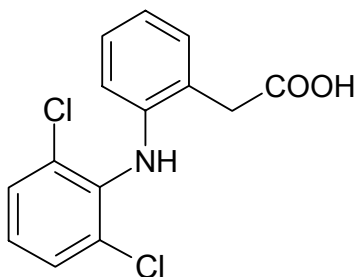


Figura 4: Estrutura química do diclofenaco.

Nosso grupo vem utilizando diclofenaco como fármaco-modelo em vários estudos envolvendo sistemas carreadores poliméricos (MÜLLER *et al.*, 2000; GUTERRES *et al.*, 2001). Dentre eles, pode-se citar sua incorporação na forma de ácido livre em nanocápsulas de poli(ácido láctico) como estratégia para melhorar a tolerância gastrointestinal do fármaco após administração oral e intravenosa. Uma significativa capacidade de redução da toxicidade sobre a mucosa gastrointestinal foi demonstrada quando o fármaco foi associado às nanocápsulas, em comparação com uma solução aquosa do sal do fármaco. Isso foi relacionado à diminuição do efeito lesivo pelo contato direto do fármaco com a mucosa (GUTERRES *et al.*, 1995).

3.3.5. Indometacina

A indometacina é um derivado indolacético (Figura 5) de massa molar correspondente a 358 g/mol, cujo pó é inodoro e de coloração branco-amarelada.

Esse fármaco apresenta polimorfismo, embora ambas as formas cristalinas descritas na literatura (formas I e II) apresentem igual atividade biológica. A forma I apresenta ponto de fusão de 161 °C, sendo termodinamicamente mais estável que a forma II. Esta, por sua vez, apresenta ponto de fusão correspondente a 155 °C. Além disso, a indometacina apresenta uma temperatura de transição vítrea (T_g) que corresponde a 42 °C (O'BRIEN *et al.*, 1984; CORRIGAN *et al.*, 1985; REYNOLDS, 1993; MATSUMOTO e ZOGRAFI, 1999; ANDRONIS e ZOGRAFI, 2000).

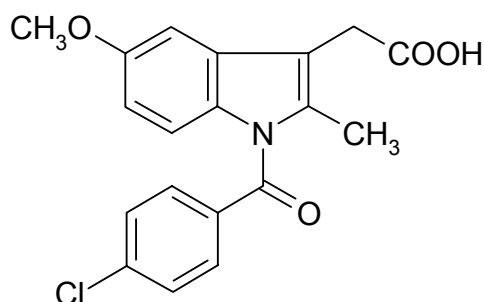


Figura 5: Estrutura química da indometacina.

A indometacina é praticamente insolúvel em água (0,40 mg/100 ml para o polimorfo I e 0,52 mg/100 ml para o polimorfo II, a 25 °C), porém bastante solúvel em clorofórmio (1:30) e etanol (1:50). Através da solubilidade em meio aquoso, foi calculado o pKa da indometacina, cujo valor correspondeu a 4,5. (O'BRIEN *et al.*, 1984).

Apesar do aumento na intensidade da sua coloração após exposição à luz intensa, apresenta baixa degradação. A indometacina é estável por cerca de 5 anos. Porém, em meio alcalino são formados os produtos de degradação *p*-clorobenzoato e 2-metil-5-metoxiindol-3-acetato, resultantes da hidrólise do fármaco. Seu tempo de meia-vida em pH 8,0 à temperatura ambiente é cerca de 200 h e, em pH 10,0, corresponde a cerca de 90 min (O'BRIEN, 1984; ARCHONTAKI, 1995; HAMMAD e MÜLLER, 1998).

A indometacina vem sendo amplamente empregada por nosso grupo como fármaco-modelo com o intuito de investigar características físico-químicas e

tecnológicas de sistemas carreadores de fármacos (GUTERRES *et al.*, 2000; POHLMANN *et al.*, 2004). Dentre esses estudos, pode-se citar a investigação da estabilidade e propriedades de pós obtidos pela secagem de suspensões de nanocápsulas e nanosferas de PCL ou poli(ácido láctico) contendo indometacina, através de *spray-drying*, utilizando-se dióxido de silício coloidal como suporte (POHLMANN *et al.*, 2002). O produto resultante consistiu de micropartículas nanorrevestidas, que mantiveram a estabilidade do fármaco, bem como a morfologia, após 5 meses de estocagem à temperatura ambiente. Além disso, a partir dos resultados obtidos, foi possível sugerir um modelo estrutural para as nanosferas preparadas com PCL e monoestearato de sorbitano como tensoativo lipofílico. Observou-se que ambos os materiais arranjam-se como um sistema bifásico, com o tensoativo disperso na matriz polimérica.

3.5. Perfis de Liberação *In Vitro* de Fármacos a Partir de Sistemas Microparticulados

Os estudos de liberação *in vitro* de fármacos a partir de micropartículas poliméricas podem fornecer informações quanto à estrutura do sistema, a interação fármaco-carreador e o mecanismo envolvido no processo de liberação. Moléculas de fármaco dissolvidas ou dispersas homogeneamente em um polímero exibem uma liberação controlada pela difusão do fármaco através da matriz e/ ou pela dissolução do próprio carreador. O controle da difusão é determinado pelos interstícios do material polimérico, bem como pelas propriedades do fármaco e do polímero. Por sua vez, a dissolução do carreador depende do meio de liberação e do tipo de ligação entre os monômeros da matriz polimérica, podendo ocorrer por degradação ou erosão (WASHINGTON, 1990; KIM, 2000).

3.3.6. Técnicas Experimentais para a Determinação dos Perfis de Liberação

Uma ampla gama de metodologias descritas em farmacopéias é utilizada nos estudos de avaliação dos perfis de liberação a partir de sistemas microparticulados, muitas apresentando variações, em função da ausência de métodos oficiais específicos. Entre elas, pode-se citar as técnicas de célula de fluxo, de hélices ou pás e de cestas rotatórias, descritas na Farmacopéia Norte-Americana. No método de cestas rotatórias, o carreador é colocado em uma cesta de fios de aço inoxidável, que é imersa no meio de dissolução e submetida à rotação em velocidade fixa. Amostras do meio são removidas em intervalos pré-determinados, filtradas e doseadas. O método de pás é semelhante ao anterior, porém a agitação é realizada com uma pá rotatória. Por sua vez, a técnica que emprega células de fluxo consiste no fluxo contínuo do meio através de uma câmara contendo o carreador. Após a passagem do meio pelo sistema, este é coletado em frações e a concentração de fármaco liberado em cada uma é determinada analiticamente. As informações procedentes desse sistema de dissolução dependem do volume do meio, da sua velocidade de fluxo e da distância entre o dispositivo de coleta e a célula de fluxo. Deve-se levar em conta que não apenas métodos diferentes podem levar a diferenças nos resultados, mas também mudanças nas variáveis experimentais dentro de um mesmo método podem fornecer resultados diferentes (FLORENCE e ATTWOOD, 1998; THE UNITED, 2004).

ZAHIRUL e KHAN (1996) criticaram os aparelhos preconizados para os métodos de pás e de cestas, por não permitirem um fluxo automático do meio de dissolução com pH variáveis, como seria necessário em testes de sistemas de liberação controlada. Para esses autores, a mudança manual do meio de dissolução é trabalhosa, consome tempo e pode comprometer a precisão, além de apresentar limitações para manter condição *sink*. Uma alternativa a essas metodologias, especialmente quando é necessário trocar freqüentemente o meio de dissolução, é a utilização de células de fluxo. O método de pás para avaliar a liberação de fármacos a partir de microcápsulas também foi questionado por UGWOKÉ e colaboradores (1999), por apresentar limitações, principalmente com relação à ausência de

correlação com a situação *in vivo*, pois a formulação é dispersa diretamente em uma quantidade excessiva de meio de dissolução.

3.3.7. Influência das Características Físico-Químicas das Micropartículas nos Perfis de Liberação

Parâmetros como estrutura externa, área superficial, estrutura cristalina, distribuição granulométrica e estado físico do fármaco podem influenciar nos perfis de liberação. JEONG e colaboradores (2003) investigaram a liberação de papaverina a partir de micropartículas de PCL preparadas por emulsificação/evaporação do solvente e relacionaram os resultados observados com a microestrutura desses sistemas. De acordo com os autores, mudanças nas condições de processamento alteraram o meio pelo qual ocorreu a difusão do fármaco, resultando em diferentes perfis de liberação. Maiores concentrações de PCL formaram partículas de maior tamanho, ocasionando liberação mais lenta. Perfis de liberação mais rápidos foram observados com o aumento da massa molar da PCL utilizada na preparação das formulações. Com isto, evidenciou-se a influência da microestrutura cristalina, pois com o aumento da massa molar a cristalinidade do sistema diminuiu, facilitando a difusão do fármaco.

A escolha dos emulsionantes deve ser criteriosa, pois os mesmos podem afetar as características das formulações. No caso de micropartículas de poli(ácido láctico-co-glicólico) preparadas por dupla emulsificação/evaporação do solvente por RAFATI e colaboradores (1997), a concentração de PVA na fase aquosa externa afetou não só o tamanho de partícula e conteúdo de albumina a ela incorporada, como também a sua liberação e características da morfologia interna dos sistemas. A diminuição da concentração de PVA resultou em aumento do tamanho de partícula. Por sua vez, uma maior concentração desse estabilizante resultou em micropartículas com maior conteúdo de albumina na superfície, aumentando o efeito *burst*. Isso foi relacionado ao aumento da viscosidade da solução aquosa com o aumento da concentração de PVA.

Há relatos na literatura de que poros na superfície da micropartícula podem aumentar consideravelmente a velocidade de liberação de fármacos (YANG *et al.*, 2000; MANDAL *et al.*, 2001; LE RAY *et al.*, 2003). ATKINS (1997) investigou micropartículas preparadas por dupla emulsificação/evaporação do solvente, compostas por blendas de PCL, P(HB-HV) e poli(adipato de etileno) contendo albumina sérica bovina (BSA). A porosidade, observada nas micropartículas de blendas de P(HB-HV) e PCL, influenciou na liberação do material encapsulado. Este foi mais rapidamente liberado em comparação com os perfis de BSA incorporada às outras micropartículas estudadas, que não apresentaram poros.

3.6. Modelos Matemáticos de Liberação de Fármacos

Métodos de modelagem matemática avaliam a aproximação de pontos experimentais a um modelo descrito pela comparação estatística de parâmetros calculados. Os modelos utilizados no estudo da liberação de fármacos a partir de sistemas microparticulados estão bem estabelecidos, particularmente em vista das investigações extensivas sobre sistemas macroscópicos, cujos princípios podem ser também aplicados para as micropartículas. Esses tratamentos matemáticos envolvendo a liberação de fármacos a partir de carreadores são amplamente descritos na literatura, podendo ser agrupados em três diferentes categorias: métodos *ab initio*, técnicas de simulação numérica e, por fim, correlações empíricas (WASHINGTON, 1990; O'HARA *et al.*, 1998).

3.3.8. Métodos *Ab Initio*

Estes métodos visam prever o comportamento de liberação de um sistema a partir de considerações fundamentais, como diâmetro de partícula, coeficientes de difusão e características estruturais do sistema, sem referências a dados

experimentais. Usualmente, segue-se a lei de difusão de Fick como ponto inicial (WASHINGTON, 1990).

Idealmente, o fármaco pode encontrar-se completamente dissolvido no polímero ou disperso como partículas sólidas discretas na matriz. A última condição prevalece quando a concentração de fármaco é muito maior que sua solubilidade no polímero. O conhecimento do estado físico do fármaco é fundamental, pois a cinética de liberação em cada caso é diferente (KIM, 2000).

A expressão matemática para a liberação de fármacos dissolvidos a partir de uma matriz polimérica de geometria esférica pode ser descrita pela segunda lei de difusão de Fick como (Equação 5):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{D}{r^2} \left(\frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C}{\partial r} \right) \right)$$

(Equação 5)

onde D é o coeficiente de difusão, C é a concentração de fármaco no polímero, r é o raio da esfera e t é o tempo. De acordo com essa lei, a variação da concentração em função do tempo em um dado ponto do sistema é igual à variação do gradiente de concentração multiplicada pelo coeficiente de difusão, ou seja, a concentração tende a se igualar em todos os pontos do sistema com o passar do tempo. Temperatura, pressão, propriedades do solvente, natureza química e concentração do material difundido, principalmente quando o mesmo encontra-se em altas concentrações, influenciam no valor do coeficiente de difusão D . Esse parâmetro está relacionado à mobilidade da substância analisada, sendo que matematicamente pode ser definido como a constante de proporcionalidade entre o gradiente de concentração dc/dx e o fluxo J dessa substância (Equação 6):

$$J = -D \cdot \left(\frac{dc}{dx} \right)$$

(Equação 6)

Essa equação é conhecida como primeira lei de difusão de Fick. O sinal negativo indica que o fluxo da substância ocorre em direção a regiões de menor concentração da mesma (MARTIN *et al.*, 1993; KIM, 2000).

Quando a solubilidade do fármaco em um polímero é muito baixa, parte deste encontrar-se-á homogeneamente dispersa na matriz na forma de aglomerados, enquanto o resto estará molecularmente dissolvido no polímero. A cinética de liberação a partir desse tipo de sistema foi investigada por HIGUCHI (1963). Em seu estudo, o autor desenvolveu vários modelos teóricos de liberação de fármacos dispersos em matrizes sólidas e/ou semi-sólidas, onde foi assumida linearidade do gradiente de concentração entre o fármaco não-dissolvido e o fármaco dissolvido (aproximação de pseudo-estado estacionário). Com o intuito de estudar a dissolução de substâncias em um sistema planar macroscópico a partir de uma matriz homogênea, a seguinte relação foi proposta (Equação 7):

$$Q = \sqrt{D(2C - C_s)C_s \cdot t}$$

(Equação 7)

onde Q é a quantidade de fármaco liberado no tempo t por unidade de área, C é a concentração inicial de fármaco, C_s é a solubilidade do fármaco na matriz e D é o coeficiente de difusão do fármaco na substância pela qual a matriz é constituída. Esta relação foi inicialmente utilizada para descrever o processo de dissolução a partir de bases de ungüentos, porém pode ser aplicada a outros tipos de sistemas (COSTA e LOBO, 2001).

Esses modelos assumem que a matriz não é significativamente alterada pela presença de água. Em geral, é possível resumir o modelo de Higuchi em uma expressão conhecida como lei da raiz quadrada ou modelo simplificado de Higuchi (Equação 8):

$$f_t = k_H \cdot t^{1/2}$$

(Equação 8)

onde f_t é a fração de fármaco liberado no tempo t e k_H é a constante de dissolução de Higuchi. Por ser derivada do fluxo a partir de um filme infinitamente profundo, a reserva de fármaco neste modelo não é significativamente diminuída. Por isso, espera-se que essa lei seja válida apenas para situações em que ocorra a liberação de pequenas frações do fármaco. Além disso, essas derivações assumem que o fármaco encontra-se uniformemente distribuído na fase dispersa e dissolve-se facilmente (KIM, 2000; COSTA e LOBO, 2001).

Modelos baseados nas considerações de Higuchi foram desenvolvidos para várias geometrias de sistemas de liberação. A Equação 9, conhecida como equação de Baker-Lonsdale, descreve a liberação controlada de um fármaco a partir de uma matriz esférica (WASHINGTON, 1990):

$$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = \frac{3DC_{s,m}}{r_o^2 C_o} t$$

(Equação 9)

onde M_t é a quantidade de fármaco liberado no tempo t e M_∞ é a quantidade de fármaco liberado em um tempo infinito, D é o coeficiente de difusão, $C_{s,m}$ é a

solubilidade do fármaco na matriz, r_0 é o raio da matriz esférica e C_0 é a concentração inicial do fármaco na matriz.

No entanto, modelos baseados nas considerações de Higuchi não podem descrever adequadamente a liberação de fármacos dispersos em uma matriz em determinadas situações. Por exemplo, quando a velocidade de dissolução de um fármaco é mais lenta que sua velocidade de difusão, o primeiro deve se dissolver em contato com o meio para que, em seguida, possa difundir para fora da matriz. Esses sistemas, conhecidos como de dissolução-difusão controlada, são descritos por equações que envolvem ambos os processos (KIM, 2000).

3.3.9. Técnicas de Simulação Numérica

Modelos numéricos de liberação de fármacos são de grande valor no estudo de sistemas que são muito complexos para serem analiticamente modelados. A maioria dos modelos considera o dispositivo de liberação como sendo composto de um certo número de finas camadas concêntricas. A evolução das concentrações nas camadas é calculada assumindo-se que a difusão ocorre de uma camada em direção à seguinte, dirigida pela diferença de concentração entre ambas. Isso é equivalente à integração numérica das equações de difusão no sistema, mas geralmente ocorrem situações mais complexas a serem estudadas para as quais as equações de difusão não podem ser solucionadas. Fatores como mecanismo de atrito, difusão do solvente e a não-homogeneidade do dispositivo devem ser levadas em consideração (WASHINGTON, 1990).

CRANE e colaboradores (2004) realizaram a determinação *in silico* do perfil de dissolução de ácido benzóico compactado nas mesmas condições obtidas quando utiliza-se um aparato de dissolução, em solução de HCl 0,1 N a 37 °C. A simulação calculou a perda de massa de fármaco a partir do compacto por unidade de tempo. Adicionalmente, foram estudados compactos de ácido benzóico/ácido salicílico e ácido benzóico/ácido adípico organizados em múltiplas camadas. Os resultados numéricos foram comparados com dados experimentais. Observou-se

uma correlação satisfatória entre os dados experimentais e a simulação do perfil de dissolução do compacto composto apenas por ácido benzóico. No entanto, uma aproximação mais grosseira foi encontrada para os sistemas de camadas múltiplas de diferentes fármacos.

A influência da concentração de fármaco e sua distribuição em sistemas carreadores sólidos e porosos sobre o teor de fármaco incorporado e sua cinética de liberação foi investigada por VILLALOBOS e colaboradores (2006). Os autores empregaram o modelo de redes cúbicas, nas quais o fármaco pode mover-se de maneira aleatória ao longo das redes, desde que apenas uma molécula ocupe cada espaço. Os dados obtidos a partir das simulações apresentaram uma correlação estreita com perfis descritos pela equação de Weibull, cujos parâmetros dependem da área superficial específica do carreador e da topologia interna da matriz.

3.3.10. Correlações Empíricas

Métodos empíricos para descrever a liberação de fármacos são direcionados por observações experimentais em detrimento de considerações teóricas (WASHINGTON, 1990).

KORSMEYER e colaboradores (1983) propuseram um modelo semi-empírico simples, relacionando exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo decorrido t (Equação 10):

$$f_t = at^n$$

(Equação 10)

onde a é uma constante que incorpora características estruturais e geométricas do sistema, n é o expoente de liberação e a função de t é M_t/M_∞ (fração de fármaco

liberado no tempo t). Esta equação também é conhecida como lei da potência, sendo aplicável à porção das curvas de liberação onde $M_t/M_\infty < 60\%$.

PEPPAS (1985) usou o expoente de liberação n para caracterizar diferentes mecanismos de liberação, concluindo que, para um filme, $n = 0,5$ corresponde a uma difusão fickiana. Quando $n = 1,0$, a taxa de liberação de fármaco é constante em função do tempo, o que corresponde a uma cinética de ordem zero. O mecanismo relacionado a este perfil segue modelo não-fickiano conhecido como transporte caso-II, onde o processo de relaxamento das macromoléculas do sistema na presença de água é a etapa determinante do processo. Valores intermediários para n sugerem que a transferência de massa segue ambos os fenômenos (transporte anômalo). Cabe salientar que esses valores são diferentes para esferas e cilindros, como pode-se observar na Tabela 2 (PEPPAS e SAHLIN, 1989).

Tabela 2: Mecanismos de liberação de substâncias a partir de sistemas poliméricos de acordo com o expoente de liberação n relacionado à lei da potência.

Expoente de liberação (n)			Mecanismo de liberação da substância
Filme	Cilindro	Esfera	
0,5	0,45	0,43	Difusão fickiana
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Transporte anômalo
1,0	0,89	0,85	Transporte caso-II

Mesmo que freqüentemente a liberação a partir de formas esféricas esteja adequadamente adaptada quando $n = 0,5$, esta aproximação requer dados precisos para permitir a extração de um valor útil de n . A expressão tem sido estendida para permitir a descrição de fases de latência (*lag-phases*) (WASHINGTON, 1990).

RITGER e PEPPAS (1987) utilizaram a lei da potência para descrever sistemas de liberação de fármacos que não sofrem inchamento em contato com o meio aquoso. Os autores propuseram que, no caso de sistemas microparticulados polidispersos, a quantidade de fármaco liberado em qualquer tempo t é igual à soma das contribuições individuais da mistura de populações. Em comparação com o comportamento de liberação a partir de uma amostra monodispersa, a presença de uma distribuição de tamanho de partícula causa aceleração do transporte do

fármaco nos tempos iniciais e retardo do mesmo nos tempos finais. A aceleração nas primeiras porções da curva é resultado da liberação a partir das micropartículas de menores tamanhos em relação ao tamanho médio. Por sua vez, partículas maiores são as responsáveis pelo retardo. A descrição de uma mistura hipotética de 20 % de partículas de 20 μm , 60 % de 100 μm e 20 % de 500 μm pela lei da potência foi possível com $n = 0,30$, o que é consideravelmente diferente do valor obtido para uma amostra monodispersa de partículas de 100 μm ($n = 0,43$).

Uma das relações empíricas mais utilizadas é a que descreve o processo difusional através de uma equação biexponencial (Equação 11):

$$C = 1 - [ae^{-\alpha t} + be^{-\beta t}]$$

(Equação 11)

onde C é a quantidade de fármaco liberado no tempo t e α e β são as constantes relacionadas ao tempo de duração dos dois componentes nos quais a função de decaimento é decomposta (constantes de velocidade). Usualmente estas exponenciais consistem de uma função rápida e outra lenta, chamadas respectivamente de fase de liberação rápida (*burst phase*) e fase de liberação sustentada (WASHINGTON, 1990; MAGENHEIM e BENITA, 1991).

Para WASHINGTON (1990), o maior problema do efeito de liberação rápida é a multiplicidade de processos físicos que podem originá-lo. Estes incluem: a) fármaco em solução na fase aquosa; b) fármaco solubilizado por um tensoativo livre presente, c) ligação do fármaco à superfície da partícula, e d) a contribuição de partículas menores. A importância relativa dessas contribuições para o efeito de liberação rápida varia conforme o tipo de carreador. Assim, micropartículas são menos propensas a apresentar este tipo de efeito, pois podem ser lavadas, tamisadas e secas.

Quando apenas uma fase é detectada, a cinética de liberação é dita de primeira ordem, ou seja, segue um modelo monoexponencial (Equação 12).

$$C = 1 - [C_0 \cdot e^{-kt}]$$

(Equação 12)

onde C_0 é a concentração inicial de fármaco presente no carreador e k é a constante de velocidade que descreve o processo de liberação. Perfis de dissolução descritos por esta equação apresentam uma relação linear entre o logaritmo da quantidade de fármaco liberado *versus* o tempo.

3.7. Perfis de Liberação de Fármacos a Partir de Micropartículas de PHB e P(HB-HV)

Apesar das propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade do PHB e seus copolímeros, há poucos relatos envolvendo a incorporação e subsequente liberação de agentes terapêuticos a partir de micropartículas compostas por esses materiais (CHEN e DAVIS, 2002). CHEN e DAVIS (2002) prepararam microsferas de P(HB-HV) contendo diazepam através da técnica de emulsificação/evaporação do solvente, empregando PVA como agente estabilizante, e avaliaram seu perfil de liberação por até 30 dias. Os perfis foram trifásicos, com um efeito *burst* inicial. Paralelamente, micropartículas de P(HB-HV) contendo o fármaco foram preparados por dupla emulsificação/evaporação do solvente tipo água/óleo/água e óleo/água/óleo, utilizando-se gelatina como agente estabilizante. Nessa última técnica, a gelatina atuou como uma camada de revestimento da micropartícula, o que não foi observado para a técnica tipo água/óleo/água. O uso de gelatina no lugar de PVA como agente estabilizante modificou os perfis de liberação do diazepam. Na técnica tipo água/óleo/água, o efeito *burst* foi reduzido de 40 % para 25 %, em comparação com o observado para as micropartículas preparadas com PVA. No entanto, o mesmo manteve sua característica trifásica. Por sua vez, o revestimento com gelatina proporcionou um perfil linear sem efeito *burst*. Embora os autores tenham caracterizado os perfis de liberação do diazepam a partir das

micropartículas como trifásicos ou de ordem zero, não foi feita qualquer modelagem matemática dos mesmos.

SENDIL e colaboradores (1999) estudaram micropartículas de P(HB-HV) de diferentes razões monoméricas, obtidas por método de dupla emulsificação/evaporação do solvente, com a finalidade de obter sistemas de liberação controlada contendo tetraciclina neutra ou seu cloridrato para uso em casos de doenças periodontais. Uma maior quantidade de HV na composição do copolímero ocasionou rápida liberação do fármaco *in vitro* a partir das micropartículas. Foi sugerido que esse comportamento ocorreu em função da partição do fármaco para regiões ricas em HV e, portanto, mais amorfas. Além disso, foi observado que a forma neutra do fármaco foi encapsulada em maior quantidade e que sua liberação foi mais lenta. Uma cinética de liberação próxima à ordem-zero foi encontrada para os perfis de tetraciclina neutra liberada a partir das micropartículas cujo polímero apresentou 7 % de HV. No entanto, os sistemas com 22 % de HV tiveram seus perfis melhor ajustados à equação de Higuchi. Segundo os autores, o aumento do conteúdo de HV levou ao aumento da porosidade. Como consequência, o aumento da superfície de difusão efetiva devido ao aumento de poros levou a uma liberação mais rápida.

Embora, nesses estudos, as características morfológicas dos sistemas tenham sido consideradas relevantes para os perfis de liberação, os autores não exploraram possíveis correlações quantitativas entre a morfologia das micropartículas e o comportamento de liberação do fármaco. Considerando a ausência de estudos dessa natureza envolvendo micropartículas de PHB e seus copolímeros com HV, este trabalho teve como objetivo buscar essa correlação para micropartículas de blendas de P(HB-HV)/PCL de diferentes proporções, utilizando-se dois fármacos-modelo lipofílicos ionizáveis, diclofenaco e indometacina, incorporados a esses sistemas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. **Materiais**

4.1.1. Matérias-primas

- Diclofenaco de sódio (Sigma – EUA);
- Indometacina (Sigma – EUA);
- Poli(álcool vinílico) Moviol-A40[®] (Delaware – Brasil) ;
- Poli(*epsilon*-caprolactona) MM = 65 kDa (Aldrich – França);
- Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) MM = 390 kDa, Lote 58 (PHB Industrial – Brasil).

4.1.2. Aparelhos e Equipamentos

- Espectrofotômetro na região do UV-Visível feixe único Unicam 8625, utilizado com cubeta de quartzo de 1 cm de percurso óptico (Inglaterra);
- Espectrofotômetro na região do UV-Visível feixe duplo Shimadzu UV-1601PC, utilizado com cubetas de quartzo de 1 cm de percurso óptico (Japão) – IQ/UFRGS;
- Espectrofotômetro na região do infravermelho com transformada de Fourier Shimadzu FT-IR 8300 (Japão) e prensa hidráulica Carver Modelo C (EUA) – IQ/UFRGS;
- Placa de agitação magnética com 15 pontos Velp (Europa);
- Dispositivo de aquecimento e circulação de água acoplado a termostato Ika EH4 (Alemanha);

- Evaporador rotatório Büchi RE120 (Suíça) – IQ/UFRGS;
- Microscópio óptico de luz polarizada Olympus BX41TF acoplado a câmera fotográfica (Japão) – IQ/UFRGS;
- Calorímetro exploratório diferencial com compensação de potência Perkin-Elmer modelo DSC-4 acoplado a microprocessador de controle Thermal Analysis, System 4 e a estação de dados 3700 (EUA) – IQ/UFRGS;
- As fotomicrografias eletrônicas foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS através de microscópio eletrônico de varredura Jeol Scanning Microscope, JSM-5800 (Japão) e metalizador de amostras Jeol Jee 4B SVG-IN (Japão);
- As análises de área superficial foram feitas em equipamento desenvolvido no Laboratório de Sólidos e Superfícies do IQ-UFRGS, coordenado pelo Prof. Dr. Edílson Benvenuti. O equipamento é constituído por uma linha de vácuo, com tubulação de vidro dotada de torneiras para a regulagem da entrada e saída de gases, conectada a uma bomba de vácuo turbomolecular Edwards 1.5 EXC 120 (Inglaterra), barômetro capilar de mercúrio e balão contendo nitrogênio gasoso;
- As determinações de diâmetro de partícula foram feitas no Laboratório de Tecnologia de Partículas do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT-SP), coordenado pela Dr. Maria Inês Ré, em equipamento de difratometria de *laser* Malvern Mastersizer 2000 (Reino Unido).

4.1.3. Solventes e outros Materiais

- Ácido clorídrico p.a. (Nuclear - Brasil);
- Brometo de potássio (Uvanol[®], Merck - Alemanha) para espectroscopia na região do infravermelho;

- Clorofórmio p.a. (Nuclear - Brasil);
- Etanol p.a. (Nuclear - Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico (Nuclear - Brasil);
- Hidróxido de sódio em pérolas (F. Maia - Brasil);

4.2. Métodos

4.2.1. Obtenção de Diclofenaco na Forma Ácida a Partir de seu Sal Sódico

Uma solução aquosa (400 mL) de diclofenaco sódico (3,0 g) foi acidificada com o gotejamento de uma solução de ácido clorídrico 5 M até turvação. O precipitado (ou seja, diclofenaco na forma ácida não-dissociada) foi filtrado e recristalizado em solução de etanol:água (1:1, v/v). Cristais incolores foram obtidos com 90 % de rendimento e caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho.

4.2.2. Preparação de Micropartículas de P(HB-HV) e suas Blendas com PCL por Emulsificação/Evaporação do Solvente (o/a)

Para a preparação das formulações, o P(HB-HV) foi previamente purificado conforme metodologia já descrita (McLELLAN e HALLING, 1988) para a purificação de PHA. As micropartículas foram preparadas pela técnica de emulsificação/evaporação do solvente, onde exatamente cerca de 0,4000 g da mistura física dos polímeros P(HB-HV) e PCL foram dissolvidos em 10 mL de clorofórmio a 50 °C, (conforme as proporções especificadas na Tabela 3), juntamente com exatamente cerca de 0,135 mmol de fármaco (ou seja, 0,0484 g de

indometacina ou 0,0400 g de diclofenaco). Paralelamente, foi preparada uma solução aquosa de 40 mL de poli(álcool vinílico) 1 % (m/v), aquecida a 50 °C. A fase aquosa foi vertida na fase orgânica, sob agitação de 1200 rpm a 50 °C por 10 min. O clorofórmio foi extraído da emulsão resultante através de evaporador rotatório a 50 °C. As micropartículas formadas foram filtradas, lavadas com 150 mL de água destilada e mantidas em dessecador por 24 h. Foram preparadas também micropartículas sem fármaco na fase orgânica.

Tabela 3: Composição de PCL e P(HB-HV) (% referente à massa total de polímero) na fase orgânica.

Formulação	P(HB-HV)	PCL	Fármaco-modelo
MP-0	100	0	ausente
MP-10	90	10	
MP-30	70	30	
MP-50	50	50	
DIC-0	100	0	diclofenaco
DIC-10	90	10	
DIC-30	70	30	
DIC-50	50	50	
IND-0	100	0	indometacina
IND-10	90	10	
IND-30	70	30	
IND-50	50	50	

4.2.3. Caracterização Físico-Química das Micropartículas

4.2.3.1. Determinação da Eficiência de Encapsulação e Teor de Fármaco Incorporado às Micropartículas

Exatamente cerca de 0,0100 g de micropartículas contendo fármaco foram mantidas sob agitação por 3 h em 50 mL de clorofórmio. Alíquotas foram retiradas, filtradas através de membrana (0,45 µm) e suas absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 278 nm (diclofenaco) ou 264 nm (indometacina). O método

analítico empregado foi previamente validado quanto aos parâmetros linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação (Anexo I). O doseamento foi feito em três lotes de cada tipo de formulação, sendo que cada lote foi avaliado em triplicata. A partir da média das medidas foram calculados tanto a eficiência de encapsulação E (%) quanto o teor T_r (mg/g):

$$E = 100 \times \frac{m_e}{m_t}$$

(Equação 13)

onde m_e e m_t correspondem à massa de fármaco encontrada e à massa teórica de fármaco, respectivamente.

$$T_r = \frac{m_f}{m_c}$$

(Equação 14)

onde m_f e m_c correspondem à massa de fármaco encontrada e à massa da micropartícula.

4.2.3.2. Liberação *In Vitro*

Os perfis de liberação dos fármacos-modelo a partir das micropartículas foram determinados através da técnica realizada por BECK e colaboradores (2004), com

modificações. Uma quantidade de micropartículas equivalente à concentração de $8,44 \times 10^{-3}$ mmol de fármaco foi adicionada a 50 mL de tampão pH $7,4 \pm 0,1$ (constituído por fosfato de sódio monobásico e hidróxido de sódio). Os experimentos foram realizados em banho termostaticado a $37,0 \pm 0,5$ °C, sob agitação magnética constante. Alíquotas de 2 mL foram retiradas em tempos pré-determinados e substituídas por igual volume de meio de dissolução a $37,0 \pm 0,5$ °C. As amostras coletadas foram filtradas ($0,45 \mu\text{m}$) e suas absorvâncias foram determinadas por espectroscopia na região do ultravioleta, em 280 nm (diclofenaco) ou 266 nm (indometacina). Paralelamente, o mesmo procedimento foi feito utilizando-se micropartículas sem fármaco, cujas alíquotas foram utilizadas como controle. Os perfis de dissolução representam a média de três lotes de micropartículas, sendo cada lote avaliado em duplicata. O mesmo procedimento foi realizado para cada fármaco-modelo livre, em triplicata. O método analítico empregado para o doseamento dos fármacos nas alíquotas foi previamente validado quanto aos parâmetros linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação (Anexo I).

4.2.3.3. Análise das Micropartículas por Microscopia Óptica (OM) e Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

A visualização da morfologia de superfície e da forma das micropartículas foi feita através de microscópio eletrônico de varredura (SEM) (Jeol Scanning Microscope, JSM-5800). Nessa análise, as micropartículas foram previamente recobertas com carbono e metalizadas com ouro (Jeol Jee 4B SVG-IN).

As amostras também foram visualizadas em microscópio óptico (Olympus BX41FT) acoplado à câmera fotográfica, com aumento de 30 vezes. Uma amostra de cada formulação foi depositada entre uma lâmina e uma lamínula de vidro, e analisada sob luz normal e polarizada. O mesmo procedimento foi feito com adição de óleo mineral ou água às micropartículas, para investigar a presença de cristais de fármaco na sua superfície.

4.2.3.4. Determinação da Distribuição Granulométrica

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho de partícula (*Span*) de uma mistura de três lotes de cada formulação foram determinados por difratometria de *laser* (Malvern Mastersizer 2000), utilizando-se água contendo polissorbato 80 como meio de dispersão sob ultrassom. O *Span* é definido como (Equação 15):

$$Span = \frac{D_{(90)} - D_{(10)}}{D_{(50)}}$$

(Equação 15)

onde $D_{(10)}$, $D_{(50)}$ e $D_{(90)}$ representam os diâmetros cumulativos de 10 %, 50 % e 90 % das partículas, respectivamente.

4.2.3.5. Determinação da Área Superficial Específica das Micropartículas

A área de superfície das micropartículas foi determinada pelo método BET (BRUNAUER *et al.*, 1938), em equipamento volumétrico com sistema de linha de vácuo e barômetro capilar de mercúrio, utilizando-se nitrogênio como gás de adsorção. Uma quantidade correspondente a exatamente cerca de 0,100 g de amostra foi transferida para tubo de vidro com volume pré-estabelecido e submetida à degaseificação sob pressão negativa e à temperatura ambiente, por três horas, a fim de eliminar gases e umidade contidos no pó. Transcorrido o tempo de degaseificação, o tubo conectado à amostra foi mergulhado em nitrogênio líquido. Nesta etapa, foi iniciada a adsorção de gás nitrogênio, que foi monitorada através da medida da diferença na altura da coluna de mercúrio antes e depois da sua incorporação ao sistema. Foram aplicadas pressões de saturação de 50, 100, 150 e

200 mmHg. Para cada medida de pressão de equilíbrio, feita após 10 min da entrada de nitrogênio na amostra, foi tomado o valor da temperatura ambiente correspondente, para correção da expansão e contração do mercúrio. Os dados obtidos foram utilizados para o cálculo do número de moles de nitrogênio adsorvido numa monocamada através da equação BET (Equação 16):

$$\frac{p}{n^a(P_0 - P)} = \frac{1}{n^a_m C} + \left(\frac{C - 1}{n^a_m C} \right) \cdot \left(\frac{P}{P_0} \right)$$

(Equação 16)

onde,

P = pressão de equilíbrio

P_0 = pressão de saturação

n_a = número de moles do gás adsorvido

n^a_m = número de moles do gás adsorvido numa monocamada

$C = \exp[(E_L - E_1)/RT]$

E_L = energia de adsorção a partir da segunda camada

E_1 = energia de adsorção da primeira camada

R = constante dos gases

T = Temperatura

Uma vez que n^a_m representa a quantidade de gás adsorvido necessário para cobrir a superfície do sólido analisado com uma camada monomolecular, a área específica das micropartículas corresponde a S (Equação 17):

$$S \text{ (m}^2\text{/g)} = n_m^a N a_m$$

(Equação 17)

onde,

N = número de Avogadro

a_m = área ocupada por uma molécula do gás adsorvido (m²)

n_m^a = capacidade da monocamada (mol/g)

4.2.3.6. Espectroscopia na Região do Infravermelho

Foram obtidos espectros na região do infravermelho de pastilhas de brometo de potássio, submetidas à compressão em prensa hidráulica Carver Modelo C, contendo micropartículas com e sem fármaco, bem como contendo os fármacos-modelo diclofenaco e indometacina, em espectrofotômetro Shimadzu FT-IR 8300, no modo transmitância com 100 acumulações, cobrindo a faixa de frequência de 4000 a 400 cm⁻¹. Espectros de filmes de PCL e P(HB-HV), os quais foram preparados por dissolução dos polímeros em clorofórmio e evaporação do solvente à temperatura ambiente, também foram obtidos nas mesmas condições de análise.

4.2.3.7. Análise Térmica das Micropartículas e das Matérias-Primas

Termogramas das micropartículas contendo ou não fármaco-modelo foram obtidos em calorímetro exploratório diferencial com compensação de potência Perkin-Elmer modelo DSC-4, calibrado com índio (156,6 °C, energia de transição de 6,80 cal/g), sob atmosfera de ar estático. A varredura compreendeu a faixa de temperatura de -20 °C a 250 °C, com uma razão de aquecimento de 10 °C/min. O

mesmo procedimento foi realizado para os fármacos-modelo diclofenaco (forma ácida) e indometacina, bem como para os polímeros P(HB-HV) e PCL, puros ou fisicamente misturados nas proporções 100/0, 90/10, 70/30 e 50/50, respectivamente. Os termogramas foram obtidos a partir do primeiro aquecimento, para verificar a influência da técnica de preparação sobre o comportamento dos materiais. Para verificar a sensibilidade da técnica quanto à detecção dos fármacos nas micropartículas devido às suas concentrações nas amostras, micropartículas MP-50 foram fisicamente misturadas a diclofenaco ou indometacina na mesma razão fármaco: polímero presente nas formulações das séries DIC e IND. Além disso, misturas físicas de micropartículas MP-50 e de fármaco na proporção 1:1 foram avaliadas quanto ao seu comportamento térmico com o intuito de determinar se houve sobreposição dos picos de fusão do fármaco e da matriz. Em todos os experimentos, foi analisada uma massa de material correspondente a cerca de 5 mg, acondicionada e selada em porta-amostra de alumínio, com volume nominal de 5 μl .

4.2.4. Modelagem Matemática dos Perfis de Liberação *In Vitro*

A descrição matemática das curvas de liberação *in vitro* dos fármacos incorporados às micropartículas foi realizada através do ajuste dos pontos experimentais aos modelos monoexponencial (Equação 12) e biexponencial (Equação 11).

$$C = 1 - [C_0 \cdot e^{-kt}]$$

(Equação 12)

onde,

C = quantidade de fármaco liberado no tempo t

C_0 = concentração inicial de fármaco

k = constante cinética (min^{-1})

$$C = 1 - [ae^{-\alpha t} + be^{-\beta t}]$$

(Equação 11)

onde,

C = Quantidade de fármaco liberado no tempo t

a, b = quantidade de fármaco correspondente às diferentes pseudo-fases do sistema

α, β = Constantes cinéticas das pseudo-fases do sistema (min^{-1})

A modelagem matemática dos dados cinéticos experimentais foi realizada através do programa Micromath Scientist[®] for Windows[™] (versão 2.0, Micromath[®], Inc., EUA), avaliando-se a adequação dos modelos aos dados com base nos seguintes parâmetros: critério de seleção do modelo (MSC), coeficiente de correlação (R) e ajuste gráfico.

Com o intuito de investigar a influência da morfologia dos sistemas na liberação *in vitro* dos fármacos-modelo incorporados às micropartículas, bem como os mecanismos envolvidos nesse processo, o modelo teórico de Baker-Lonsdale, baseado nas considerações de Higuchi, foi aplicado aos dados experimentais (Equação 9):

$$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = \frac{3DC_{s,m}}{r_o^2 C_o} t$$

(Equação 9)

onde,

M_t/M_∞ = fração de fármaco liberado no tempo t

C_o = teor de fármaco na matriz (g/g)

r_o = raio da micropartícula (m)

$C_{s,m}$ = solubilidade do fármaco na matriz (g/m³)

D = coeficiente de difusão (m²/s)

O parâmetro C_o foi determinado pelo doseamento das formulações, conforme descrito no item 4.2.4.1. Por sua vez, o raio de partícula foi obtido a partir dos dados de diâmetro determinados por difratometria de *laser*. A fim de que as correlações fossem estabelecidas com o mesmo número de pontos para cada perfil de uma mesma série de micropartículas, foram descartados os pontos cujos tempos foram superiores ao tempo correspondente a 100 % de fármaco liberado do perfil mais rápido de cada série. A partir da inclinação da reta obtida com o ajuste dos dados à Equação 9, foi possível determinar o produto do coeficiente de difusão e da concentração de fármaco molecularmente disperso na matriz, $DC_{s,m}$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização Físico-Química das Micropartículas de P(HB-HV) e de blendas de P(HB-HV)/PCL

Nesse estudo, a técnica de emulsificação/evaporação do solvente foi utilizada para preparar micropartículas de P(HB-HV) e de blendas deste polímero com PCL, contendo diclofenaco ou indometacina. Esta metodologia de preparação mostrou-se efetiva, com rendimentos próximos de 100 %. Com o intuito de caracterizar tais sistemas, foram avaliadas características térmicas e morfológicas das micropartículas, além da determinação do teor de fármaco incorporado e do seu perfil de liberação a partir de cada formulação. Uma discussão detalhada desses procedimentos é descrita a seguir.

5.1.1. Determinação do Teor de Fármaco e Eficiência de Encapsulação

O teor de fármaco incorporado em cada formulação foi determinado pela medida da quantidade total do mesmo em 10 mg de micropartículas. Por sua vez, a eficiência de encapsulação foi obtida pela comparação do teor determinado experimentalmente com a quantidade teórica, equivalente a 100 %. Tais resultados podem ser visualizados na Tabela 4.

Observou-se que tanto o diclofenaco quanto a indometacina apresentaram valores de eficiência de encapsulação elevados e semelhantes, independentemente da concentração de PCL na matriz. Considerando-se que a característica hidrofóbica das micropartículas não é significativamente afetada pela concentração de PCL e que os coeficientes de partição octanol/água do diclofenaco e da indometacina (4,41 e 3,73, respectivamente - programa Pallas[®] for Windows[™] versão *demo* 2.1, CompuDrug International[®], Inc., EUA) são próximos, uma perda quantitativamente semelhante de ambos os fármacos-modelo para a fase aquosa no processo de emulsificação/ evaporação do solvente seria provável, para quaisquer formulações investigadas nesse estudo.

Tabela 4: Valores de teor e eficiência de encapsulação dos fármacos-modelo diclofenaco e indometacina em micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/ PCL (n = 3).

Formulação	Teor (mg/g)	SD (±)	Eficiência de Encapsulação (%)	SD (±)
DIC-0	87,8	4,1	87	2
DIC-10	83,9	3,7	83	2
DIC-30	85,4	7,8	84	6
DIC-50	84,2	5,0	84	4
IND-0	96,8	7,0	83	3
IND-10	96,4	6,1	81	3
IND-30	97,0	6,5	82	3
IND-50	101,4	2,2	82	2

5.1.2. Investigação do Comportamento Térmico das Micropartículas

A análise por calorimetria diferencial exploratória (DSC) oferece informações valiosas de âmbito farmacêutico, como pureza de princípios ativos, compatibilidade de matérias-primas e estabilidade de formas farmacêuticas. Os tipos de transição mais importantes no estudo de formulações através de DSC compreendem transição vítrea, fusão e cristalização (BARRALL II e JOHNSON, 1970; FORD e TIMMINS, 1989). As micropartículas e as matérias-primas utilizadas na sua preparação foram avaliadas quanto às temperaturas de transição vítrea e de fusão, bem como quanto aos valores de entalpia de fusão. A Figura 6 mostra as curvas de DSC das misturas físicas de P(HB-HV) e PCL, em diferentes proporções, sob atmosfera de ar estático na faixa de temperatura entre -20 °C e 250 °C. A Figura 7 apresenta os termogramas das micropartículas sem fármaco, nas mesmas condições de análise.

Para as misturas físicas (Figura 6), foram observados dois picos endotérmicos em torno de 57 °C e 171 °C, devido à fusão das fases cristalinas da PCL e do P(HB-HV), respectivamente. No entanto, o P(HB-HV) nas micropartículas (Figura 7) apresentou dois picos de fusão em 159 °C e 171 °C. Esse resultado é indicativo de que o processo de emulsificação/evaporação do solvente aumentou a heterogeneidade de cristalitos presentes. Essa alteração do comportamento de

cristalização resultou na produção de cristalitos menos perfeitos, com menor temperatura de fusão (T_m), concomitantemente com cristalitos mais perfeitos, de maior T_m . Mudanças nas características térmicas do PHB em função do processo de encapsulação por emulsificação/evaporação do solvente foram previamente relatadas por MARTIN e colaboradores (2000).

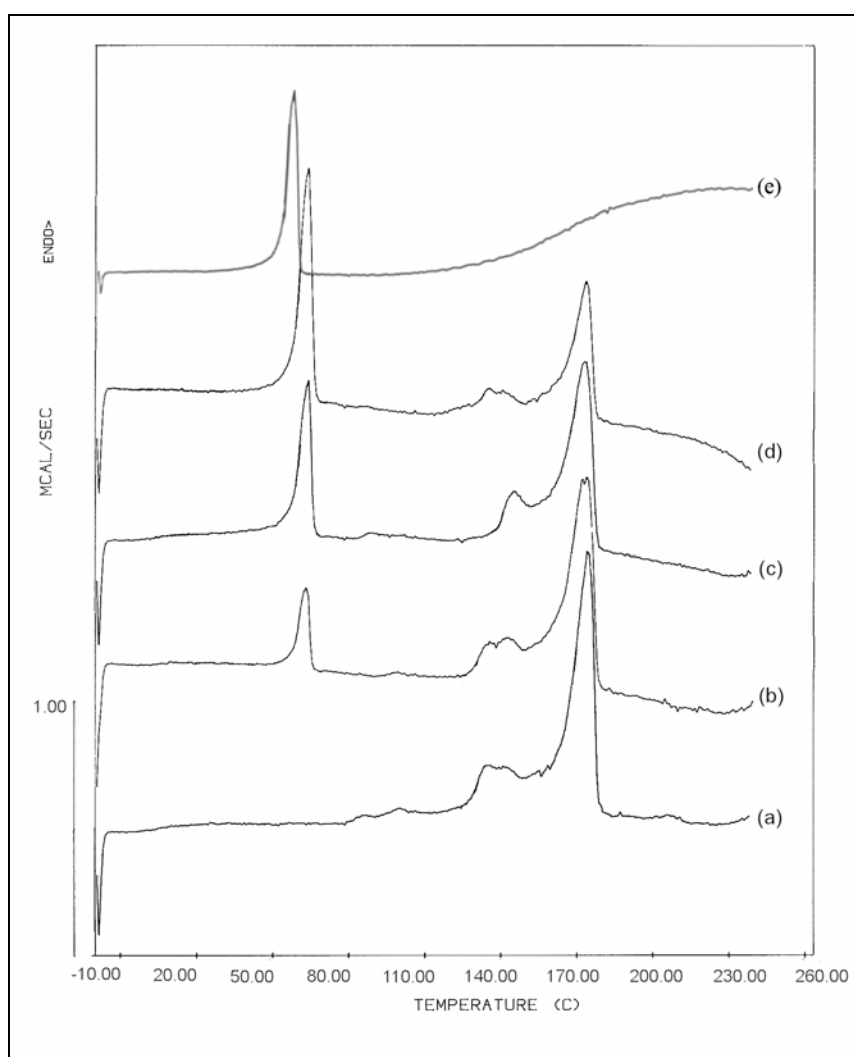


Figura 6: Termogramas das misturas físicas de P(HB-HV)/PCL nas proporções a) 100/0, b) 90/10, c) 70/30 e d) 50/50 e e) 0/100, respectivamente*.

* Agradecimento à Maria Lionzo pela obtenção do termograma da PCL.

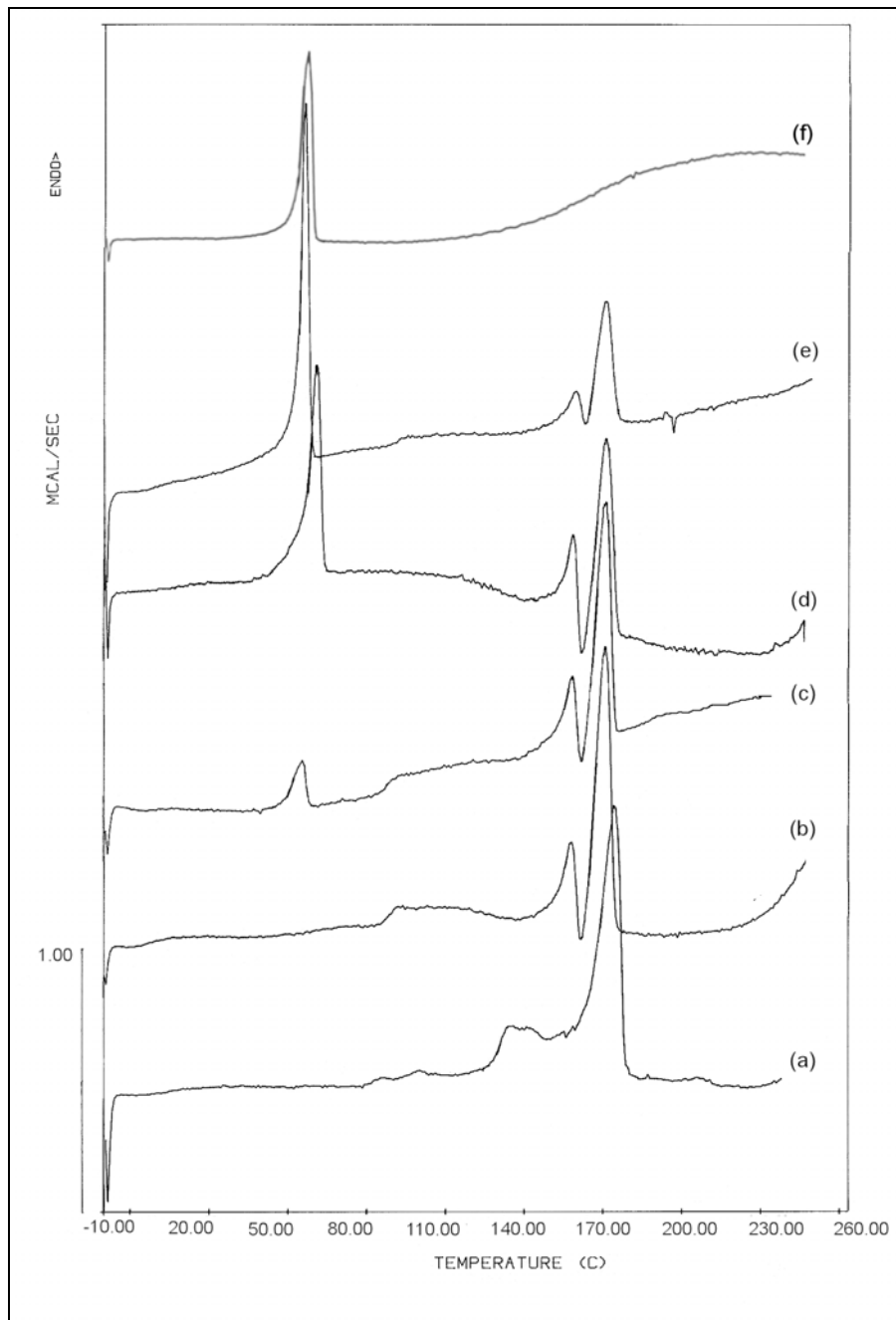


Figura 7: Termogramas a) do P(HB-HV), das micropartículas b) MP-0, c) MP-10, d) MP-30, e) MP-50, e f) da PCL.

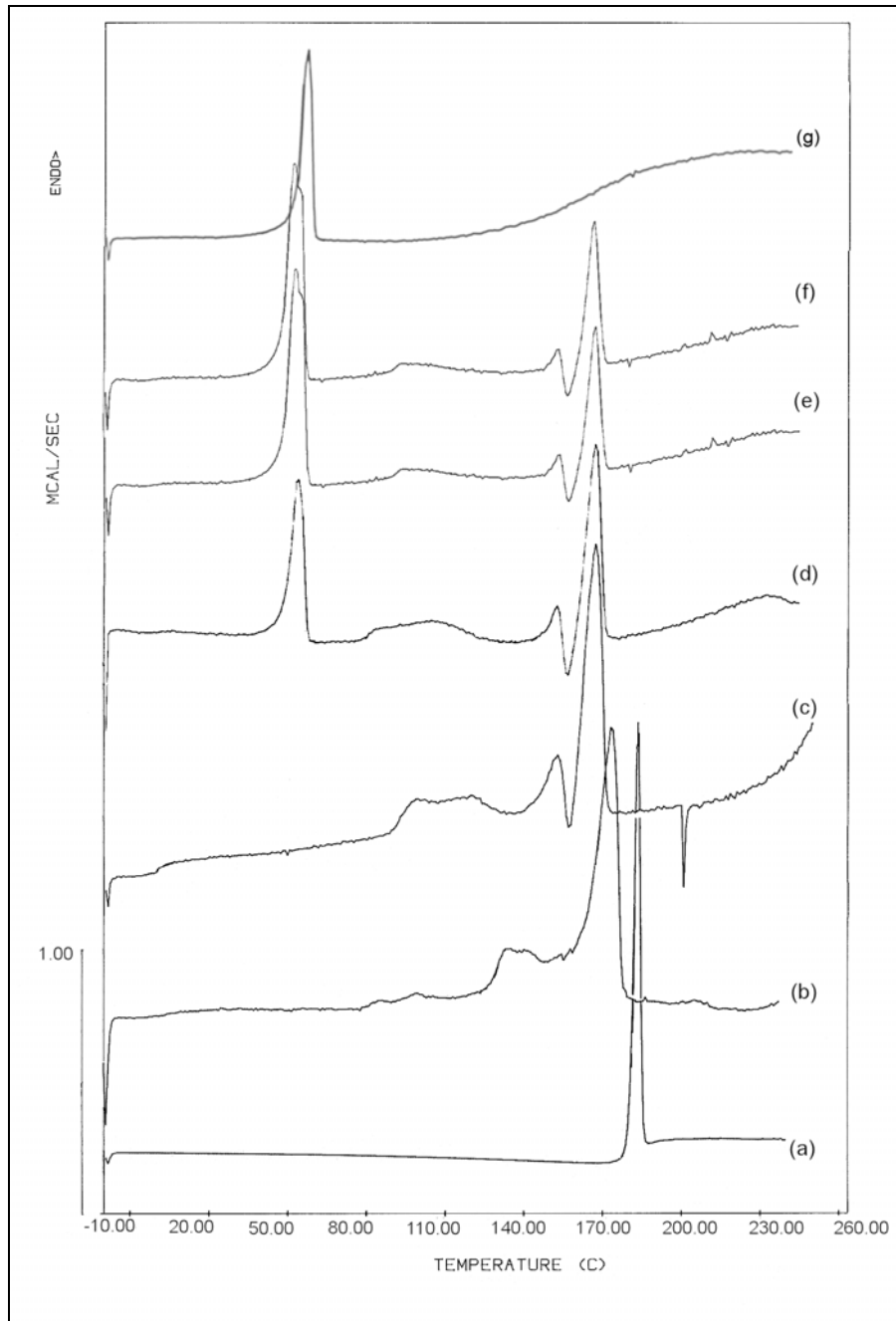


Figura 8: Termogramas a) do diclofenaco, b) do P(HB-HV), das micropartículas c) DIC-0, d) DIC-10, e) DIC-30, f) DIC-50, e g) da PCL.

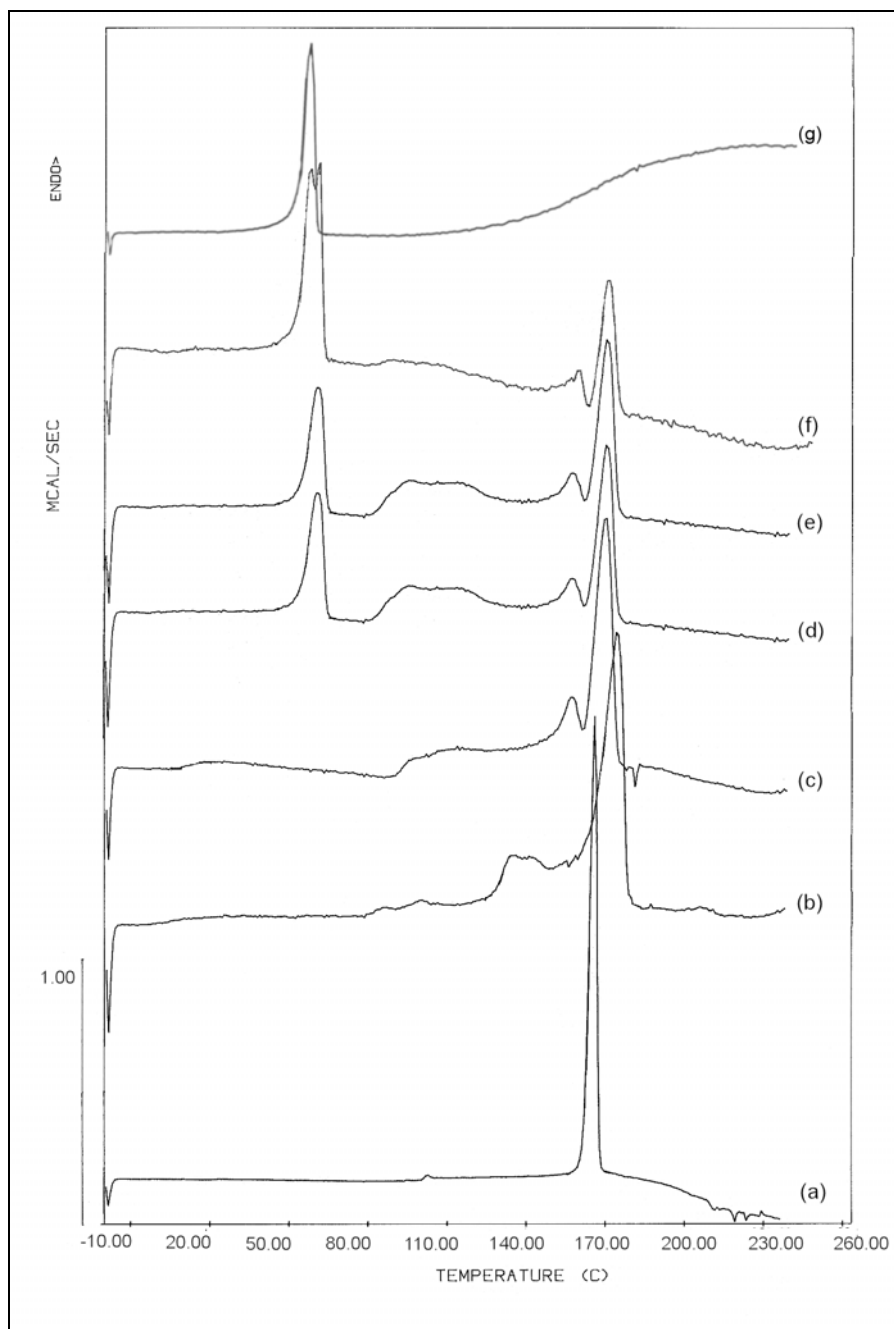


Figura 9: Termogramas a) da indometacina, b) do P(HB-HV), das micropartículas c) IND-0, d) IND-10, e) IND-30, f) IND-50, e g) da PCL.

Na Tabela 5 são apresentados os valores de T_m obtidos tanto para as micropartículas quanto para as matérias-primas. A diminuição da T_m do P(HB-HV) nas séries de micropartículas contendo diclofenaco e indometacina (séries DIC e IND) (Figuras 8 e 9), em relação à série de micropartículas sem fármaco (série MP) (Figura 7), sugere que a presença de fármaco também influenciou na cristalização

do P(HB-HV), alterando seu retículo cristalino. Da mesma forma, a T_m da PCL diminuiu nas formulações contendo fármaco. No entanto, as micropartículas sem fármaco apresentaram valores de T_m da PCL semelhantes aos valores encontrados para as misturas físicas.

Tabela 5: Valores de temperatura de fusão (T_m) e temperatura de transição vítrea (T_g) das matérias-primas e micropartículas.

Amostra	T_m Fármaco	T_m PCL	T_m P(HB-HV)	T_g P(HB-HV)
Diclofenaco	181,4	-	-	-
Indometacina	162,6	-	-	-
P(HB-HV)	-	-	171,6	-4,29
PCL	-	56,4	-	-
P(HB-HV) e PCL (90:10 m/m)	-	56,5	171,4	*
P(HB-HV) e PCL (70:30 m/m)	-	57,2	170,8	*
P(HB-HV) e PCL (50:50 m/m)	-	57,2	171,3	*
Diclofenaco e MP-50 (10:90 m/m)	ausente	57,2	158,6; 171,3	*
Indometacina e MP-50 (12:88 m/m)	ausente	57,0	153,8; 170,5	*
Diclofenaco e MP-50 (1:1 m/m)	178,3	56,7	153,5; <i>PS</i> **	*
Indometacina e MP-50 (1:1 m/m)	161,7	56,9	<i>PS</i> **; 171,5	*
MP-0	-	-	159,6; 172,2	0,4
MP-10	-	55,8	158,6; 171,1	-1,1
MP-30	-	61,2	159,0; 171,4	1,0
MP-50	-	56,5	159,6; 171,0	-1,0
DIC-0	ausente	-	152,9; 167,2	0,4
DIC-10	ausente	49,1	153,3; 167,2	-1,6
DIC-30	ausente	54,0	153,0; 167,4	1,3
DIC-50	ausente	53,1	153,6; 167,1	-0,6
IND-0	ausente	-	154,0; 167,4	3,8
IND-10	ausente	49,4	155,3; 169,0	3,5
IND-30	ausente	54,2	154,5; 168,1	3,6
IND-50	ausente	54,5	156,7; 168,4	4,2

* Não foi possível determinar o valor de T_g .

** Pico sobreposto (*PS*) ao pico de fusão do fármaco.

Não foram observados picos de fusão referentes aos fármacos nos termogramas das séries DIC e IND. Esse resultado poderia indicar que ambos estariam molecularmente dispersos na matriz, ou que através de DSC não seria possível detectá-los por falta de sensibilidade nessa concentração ou, ainda, que houvesse sobreposição dos picos de fusão do fármaco e do P(HB-HV). Para verificar essas hipóteses, misturas físicas de micropartículas MP-50 e de fármaco em diferentes proporções foram avaliadas quanto ao seu comportamento térmico. Os termogramas das misturas físicas das micropartículas MP-50 e dos fármacos nas mesmas proporções utilizadas na preparação das formulações, ou seja, diclofenaco:polímero 10:90 (m/m) e indometacina:polímero 12:88 (m/m) (Figura 10a e 10b) não mostraram os picos dos fármacos. Paralelamente, os termogramas das misturas físicas na proporção 1:1 apresentaram picos de fusão sobrepostos (Figura 10c e 10d). Deste modo, mesmo que o diclofenaco e/ou a indometacina estivessem presentes na matriz na forma cristalina, a sobreposição dos picos de fusão do P(HB-HV) e dos fármacos pode impedir a detecção da fusão destes últimos nas curvas das micropartículas das séries DIC e IND (Figura 8 e Figura 9).

A transição vítrea representa uma medida da mobilidade das cadeias poliméricas. Abaixo da temperatura de transição vítrea (T_g) as cadeias e átomos de polímero apresentam uma baixa amplitude de movimento vibratório e o polímero encontra-se usualmente em um estado quebradiço. Acima da T_g , as cadeias poliméricas encontram-se no estado elastomérico, no qual apresentam movimentos rotacionais e difusionais mais pronunciados. Cabe salientar que essa transição é um evento que compreende apenas a porção amorfa do material polimérico em estudo (FORD e TIMMINS, 1989). Geralmente, a T_g de um polímero é determinada no seu segundo ciclo de aquecimento, para que não ocorram interferências relativas à sua história térmica (NÚÑEZ *et al.*, 2005). No entanto, as medidas feitas nesse estudo foram obtidas no primeiro ciclo de aquecimento, para prevenir mudanças na morfologia dos sistemas que pudessem afetar os resultados. A T_g referente ao P(HB-HV) foi detectada na maioria das amostras. Porém, a T_g da PCL não foi observada, pois seu valor encontra-se fora da faixa de temperatura avaliada no estudo devido à limitação de resfriamento do equipamento disponível. As temperaturas das transições obtidas nos termogramas das amostras encontram-se na Tabela 5.

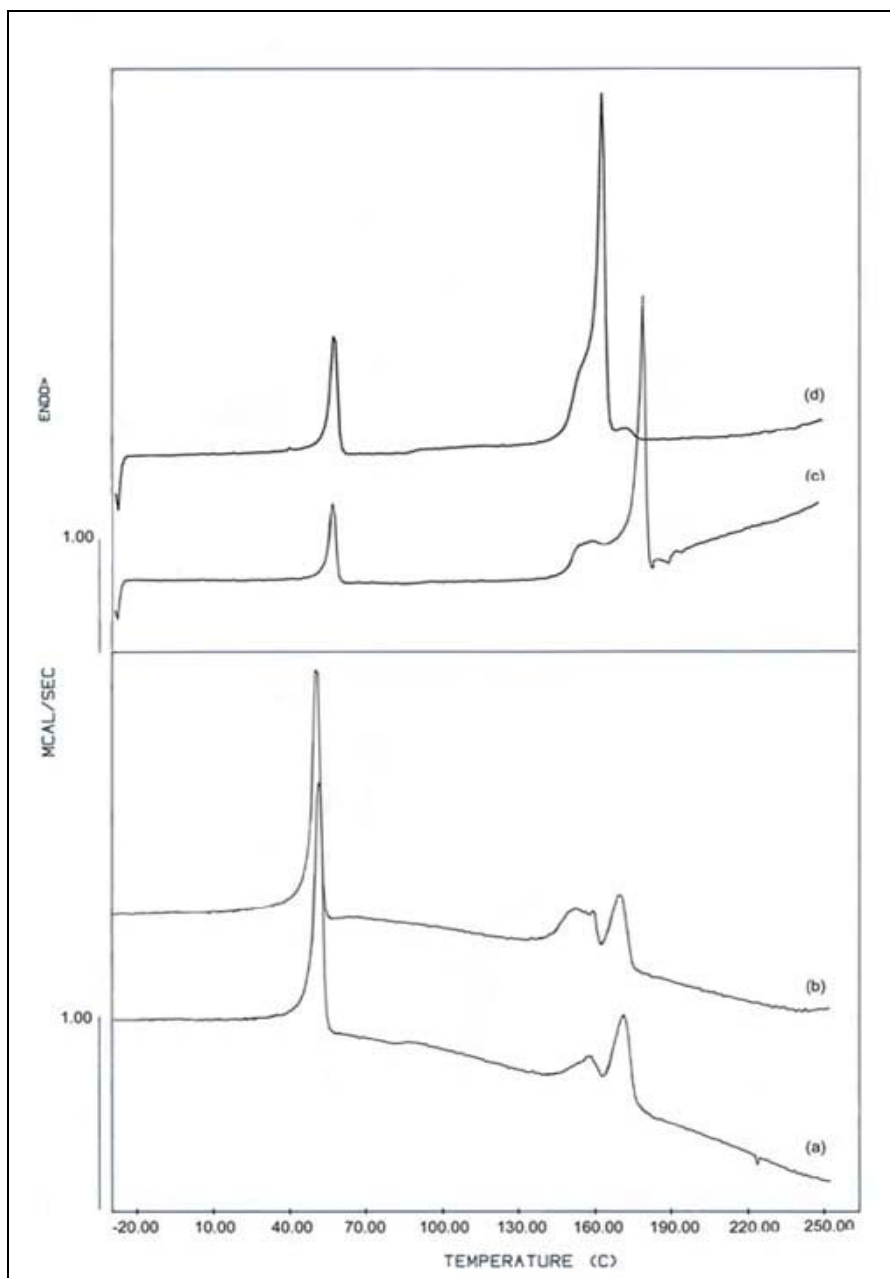


Figura 10: Termogramas das misturas físicas de a) diclofenaco e MP-50 (10:90 m/m), b) indometacina e MP-50 (12:88 m/m), c) diclofenaco e MP-50 (50:50 m/m), e d) indometacina e MP-50 (50:50 m/m).

Todas as formulações de uma mesma série (ou seja, com um mesmo fármaco incorporado ou sem fármaco) apresentaram valores de T_g do P(HB-HV) semelhantes, o que sugere que os polímeros P(HB-HV) e PCL são imiscíveis na fase amorfa. Esta observação concorda com os resultados de QIU e colaboradores (2005) para filmes de blendas de PCL e P(HB-HV). No entanto, a T_g do P(HB-HV)

nas formulações aumentou em relação à T_g do polímero utilizado como matéria-prima. Desse modo, constatou-se que o processo de obtenção das micropartículas influenciou na flexibilidade das cadeias de P(HB-HV).

A T_g da indometacina não foi visualizada, embora seja descrita na literatura (ANDRONIS e ZOGRAFI, 2000). Considerando-se que a transição vítrea é um fenômeno de segunda ordem, nem sempre é detectada pelos equipamentos de DSC convencionais. Porém, a T_m da indometacina pulveréa foi obtida, permitindo caracterizá-la como sua forma polimorfa I.

Observou-se um deslocamento, para maiores valores, da T_g do P(HB-HV) nas micropartículas contendo indometacina em relação à T_g do polímero obtida para as micropartículas sem fármaco. A partir desses resultados, infere-se que a indometacina atuou como um antiplastificante do P(HB-HV). Esse comportamento ocorre quando o movimento molecular das cadeias poliméricas é dificultado por uma espécie de baixa massa molecular presente na matriz. De acordo com SLARK (1997), um aumento da T_g do polímero é observado quando há grande afinidade entre o material polimérico e a espécie de pequeno tamanho adicionada ao mesmo. Alterações na T_g do P(HB-HV) não foram observadas para as micropartículas contendo diclofenaco, evidenciando a ausência de interações físico-químicas envolvendo o fármaco e as cadeias poliméricas que sejam passíveis de detecção por essa técnica. Tais resultados sugerem que a indometacina está solubilizada pela parte amorfa do P(HB-HV), enquanto que o diclofenaco encontra-se disperso na forma de aglomerados nanométricos na partícula. Essas considerações encontram respaldo na análise térmica realizada para os fármacos utilizados como matérias-primas. A T_m do diclofenaco, igual a 181,4 °C, é superior à T_m da indometacina, de 162,6 °C. Além disso, a entalpia de fusão (ΔH_m) do diclofenaco foi igual a 173,5 J/g, cujo valor é superior ao ΔH_m da indometacina, que correspondeu a 117,4 J/g. A entalpia de fusão pode ser definida como a quantidade de calor necessária para provocar a fusão de um grama de determinada substância no estado sólido (FORD e TIMMINS, 1989). Valores elevados de entalpia de fusão sugerem arranjos cristalinos mais estáveis. Portanto, maior energia seria necessária para romper as interações intermoleculares no estado sólido do diclofenaco que da indometacina.

O grau de cristalinidade dos componentes na blenda foi calculado (χ_c) de acordo com a Equação 18 (MODESTI *et al.*, 2006):

$$\chi_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \times 100$$

(Equação 18)

Empregou-se os valores experimentais de ΔH_m das formulações e misturas físicas, considerando-se as entalpias de fusão de $\Delta H_m^0 = 146$ J/g e $\Delta H_m^0 = 142$ J/g para PCL e PHB 100 % cristalinos, respectivamente (VOGELSANGER *et al.*, 2003).

Tabela 6: Valores de entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (χ_c) do P(HB-HV) e da PCL presentes nas misturas físicas e nas micropartículas, bem como o grau de cristalinidade total das amostras (χ_c total).

Amostra	P(HB-HV)		PCL		χ_c total (%)
	ΔH_m (J/g)	χ_c (%)	ΔH_m (J/g)	χ_c (%)	
PCL	-	-	65,83	45	45
P(HB-HV)	47,36	33	-	-	33
P(HB-HV) e PCL (90:10 m/m)	44,08	31	8,23	6	37
P(HB-HV) e PCL (70:30 m/m)	40,55	28	19,06	13	41
P(HB-HV) e PCL (50:50 m/m)	23,62	17	30,01	20	37
MP-0	10,3; 33,10	30	-	-	30
MP-10	11,03; 28,76	28	4,97	3	31
MP-30	14,09; 27,17	29	23,41	16	45
MP-50	3,97; 15,51	14	29,51	20	34
DIC-0	9,15; 36,66	32	-	-	32
DIC-10	4,10; 32,10	25	4,72	3	28
DIC-30	6,52; 26,71	23	17,97	12	35
DIC-50	3,05; 17,56	14	30,14	21	35
IND-0	3,43; 28,80	23	-	-	23
IND-10	13,96; 30,64	31	3,47	2	33
IND-30	3,26; 19,81	16	15,38	10	26
IND-50	4,18; 15,67	14	28,51	19	33

O valor de ΔH_m° do PHB foi utilizado no cálculo em função da inexistência de um valor de ΔH_m° na literatura para o P(HB-HV) de mesma massa molar e fração de HV utilizado nesse estudo. Portanto, os valores de cristalinidade aqui obtidos para o P(HB-HV) são relativos, e não absolutos. Mesmo que o emprego do valor de ΔH_m° do PHB cause um pequeno erro sistemático, permitiu a obtenção de valores relativos de cristalinidade úteis para comparar as amostras (Tabela 6).

A Figura 11 apresenta a variação do grau de cristalinidade do P(HB-HV) e da PCL em função do aumento da percentagem de PCL tanto nas misturas físicas quanto na matriz das micropartículas. Para os polímeros puros, foi obtido χ_c igual a 33 % para o P(HB-HV) e 45 % para a PCL.

O grau de cristalinidade da PCL apresentou uma tendência de aumento linear em função do aumento do seu conteúdo na matriz, variando de 2 % a 21 %. Por sua vez, o grau de cristalinidade do P(HB-HV) nas micropartículas manteve-se na faixa de 14 % a 32 %. A cristalinidade total das formulações variou de 23 % a 45 %. Além disso, a adição de fármaco não modificou o grau de cristalinidade da PCL ou do P(HB-HV).

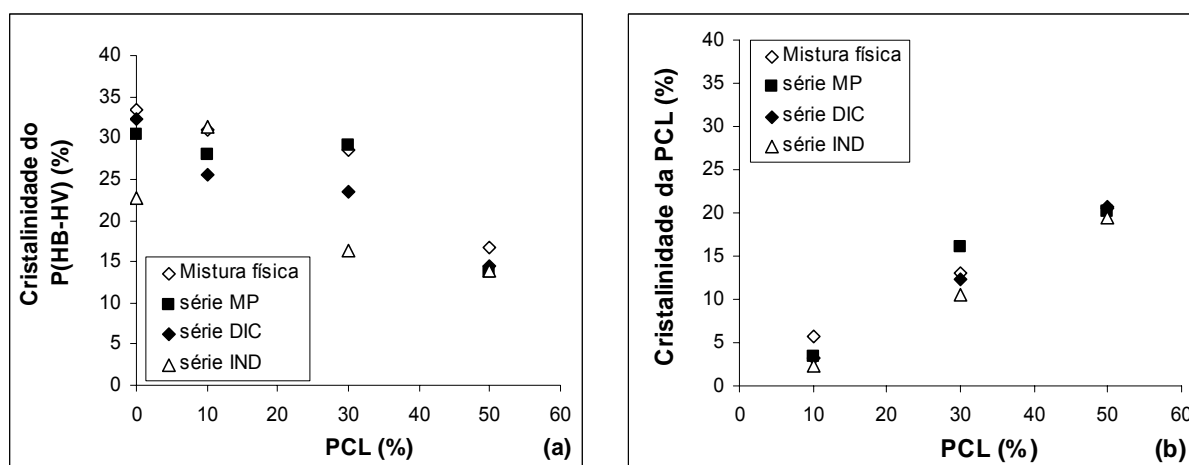


Figura 11: Grau de cristalinidade em função da concentração de PCL na matriz para: a) P(HB-HV); b) PCL.

5.1.3. Espectroscopia na Região do Infravermelho

O espectro de infravermelho com transformada de Fourier da Figura 12 demonstrou que o P(HB-HV) utilizado como matéria-prima para a preparação de micropartículas apresenta bandas características de estiramento da carbonila de éster (C=O) a 1735 cm^{-1} e de OH a 3440 cm^{-1} , além das bandas de estiramento de C-H saturado em 2940 cm^{-1} e 2960 cm^{-1} .

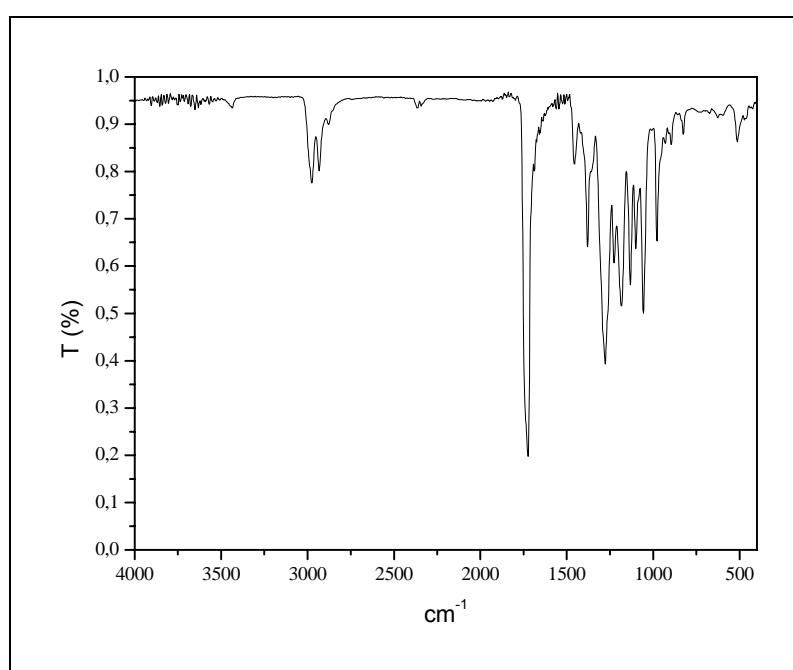


Figura 12: Espectro na região do infravermelho de filme de P(HB-HV).

A Figura 13 consiste no espectro da PCL, que também apresentou estiramento da carbonila de éster (C=O) a 1735 cm^{-1} e de OH a 3440 cm^{-1} , além das bandas de estiramento de C-H saturado em 2940 cm^{-1} e 2960 cm^{-1} . Ambos os polímeros apresentam absorções nas mesmas regiões por serem poliésteres alifáticos.

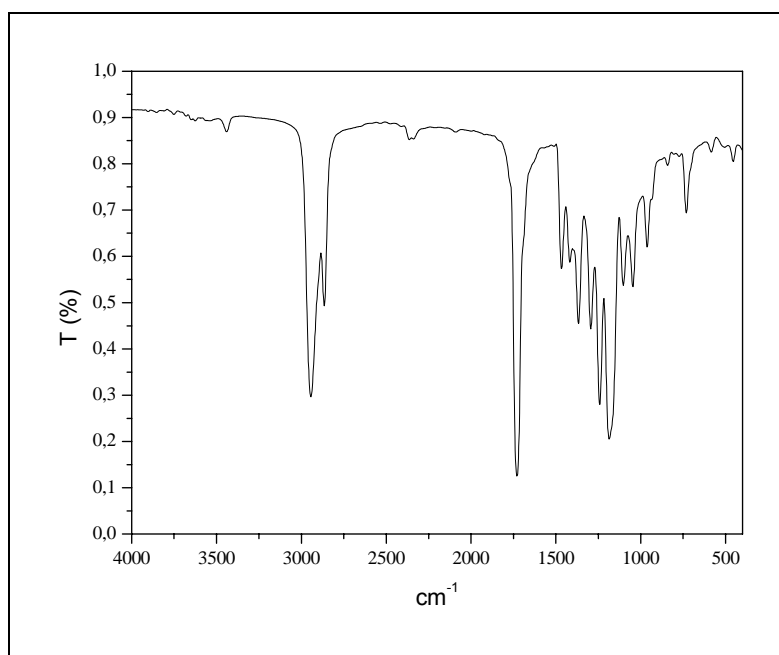


Figura 13: Espectro na região do infravermelho de filme de PCL.

Tanto os fármacos quanto as formulações de micropartículas foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho. O espectro do diclofenaco (Figura 14) apresentou uma banda aguda e pronunciada em 3300 cm^{-1} , característica de grupo N-H não-associado e uma banda larga entre 2500 cm^{-1} e 3200 cm^{-1} , relativa a OH da função ácida. Em 1710 cm^{-1} observa-se banda de estiramento de grupo C=O de ácido carboxílico (dímero). As bandas em 1580 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} , bem como em 1600 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} , indicam estiramento e vibração da ligação C=C e do anel aromático. Por sua vez, o espectro da indometacina (Figura 15) apresentou bandas de estiramento de C-H saturado e insaturado na região de 3000 cm^{-1} a 2800 cm^{-1} , assim como uma banda larga entre 2500 cm^{-1} e 3200 cm^{-1} , referente ao OH da função ácida. Banda de estiramento de grupo C=O de ácido carboxílico (dímero) pode ser visualizada em 1710 cm^{-1} . Além disso, observou-se uma banda de estiramento da ligação C=O de amida em 1640 cm^{-1} , de estiramento da ligação C=C em 1600 cm^{-1} , assim como, na região entre 1450 cm^{-1} e 1580 cm^{-1} , vibrações no plano do anel aromático.

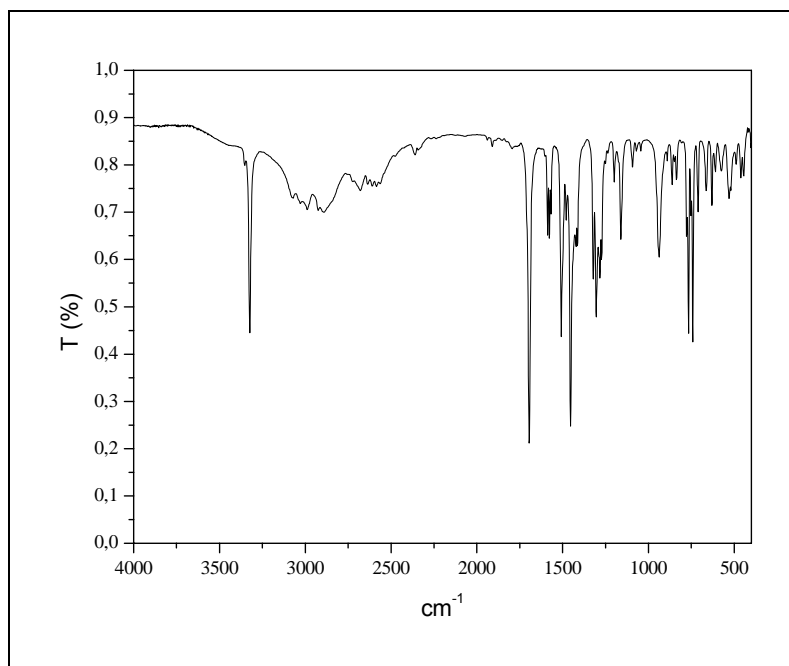


Figura 14: Espectro na região do infravermelho do diclofenaco em partilha de KBr.

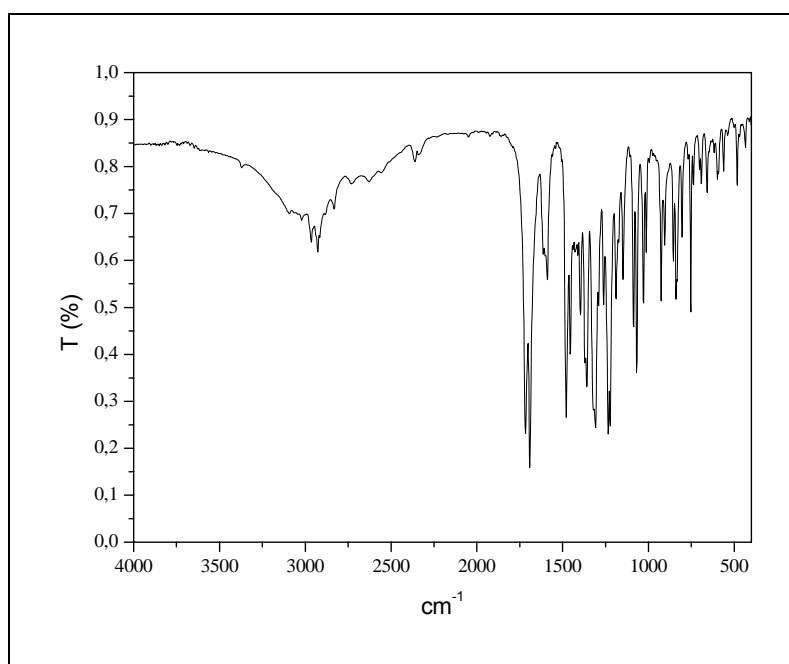


Figura 15: Espectro na região do infravermelho da indometacina em pastilha de KBr.

Picos característicos do diclofenaco foram observados nos espectros das micropartículas contendo este fármaco (Figura 16). Na região de 3300 cm^{-1} pode ser visualizado o pico referente ao estiramento de amina da estrutura do diclofenaco. Além disso, o pico em 1600 cm^{-1} indicou o estiramento das ligações C=C. Estes picos não estiveram presentes nos espectros das micropartículas sem fármaco.

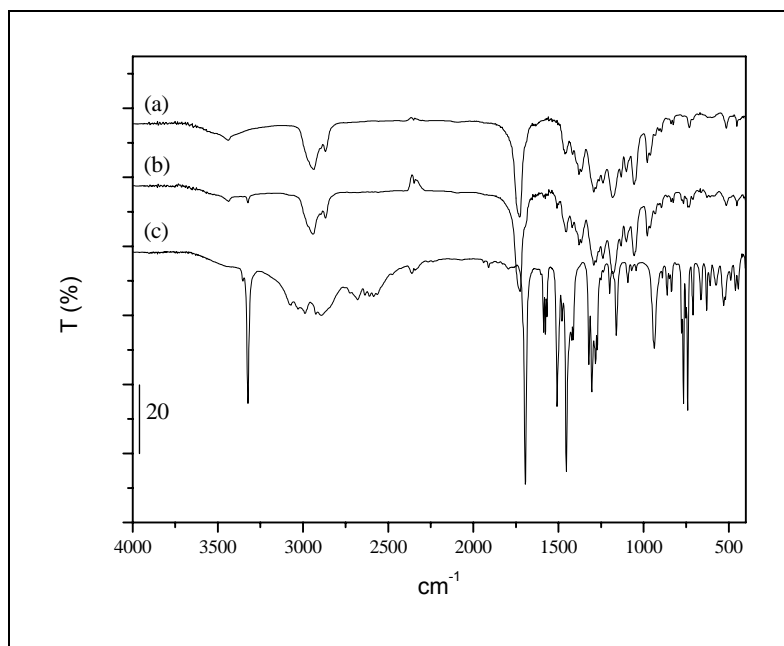


Figura 16: Espectros na região do infravermelho em pastilha de KBr de: a) MP-50; b) DIC-50; c) diclofenaco.

Da mesma forma, o pico em 1600 cm^{-1} indicando estiramento do grupo C=C da indometacina foi visualizado nos espectros das micropartículas da série IND, o qual esteve ausente nas micropartículas sem fármaco (Figura 17). Os demais picos referentes aos polímeros presentes nas micropartículas das séries DIC e IND não demonstraram alterações em comparação com os espectros das micropartículas sem fármaco (os espectros de infravermelho de todas as micropartículas e de suas matérias-primas encontram-se no Anexo II).

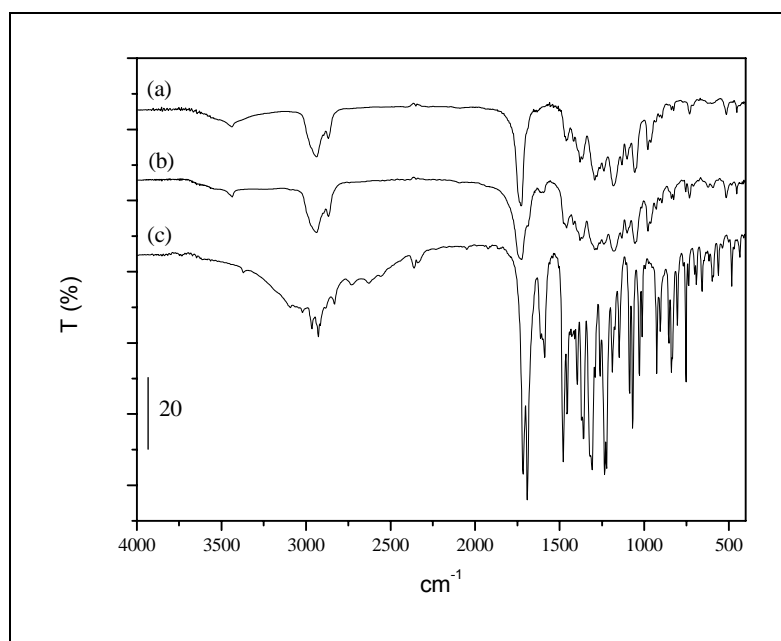


Figura 17: Espectro na região do infravermelho em pastilha de KBr de: a) MP-50; b) IND-50; c) indometacina.

Como não ocorreram alterações nas bandas características das substâncias envolvidas, demonstrou-se a ausência de rompimento ou formação de novas ligações químicas detectáveis por esta técnica entre os materiais empregados na preparação das micropartículas.

5.1.4. Avaliação Morfológica

Através de microscopia eletrônica de varredura (SEM) e microscopia óptica (OM) das formulações (Figuras 18, 19 e 20), foi observado que as micropartículas estudadas (contendo ou não o fármaco-modelo) possuem forma de esferas ocas, algumas delas colapsadas. Esta aparência pode ser explicada pela ocorrência de inversão de fase da emulsão durante a preparação das formulações. As micropartículas sem PCL, visualizadas na Figura 18, apresentaram poros diminutos na sua superfície, enquanto que poros de pequeno tamanho, porém em maior

número, foram observados nas micropartículas contendo 10 % desse polímero na matriz. Poros maiores foram observados nas micropartículas contendo 30 % e 50 % de PCL, sendo que a última apresentou regiões com descontinuidade de parede (crateras). O aumento do tamanho de poros com o aumento da concentração de PCL nas micropartículas constituídas por blends desse polímero com P(HB-HV) foi previamente relatado por EMBLETON e TIGHE (1993) e RÉ e colaboradores (2004).

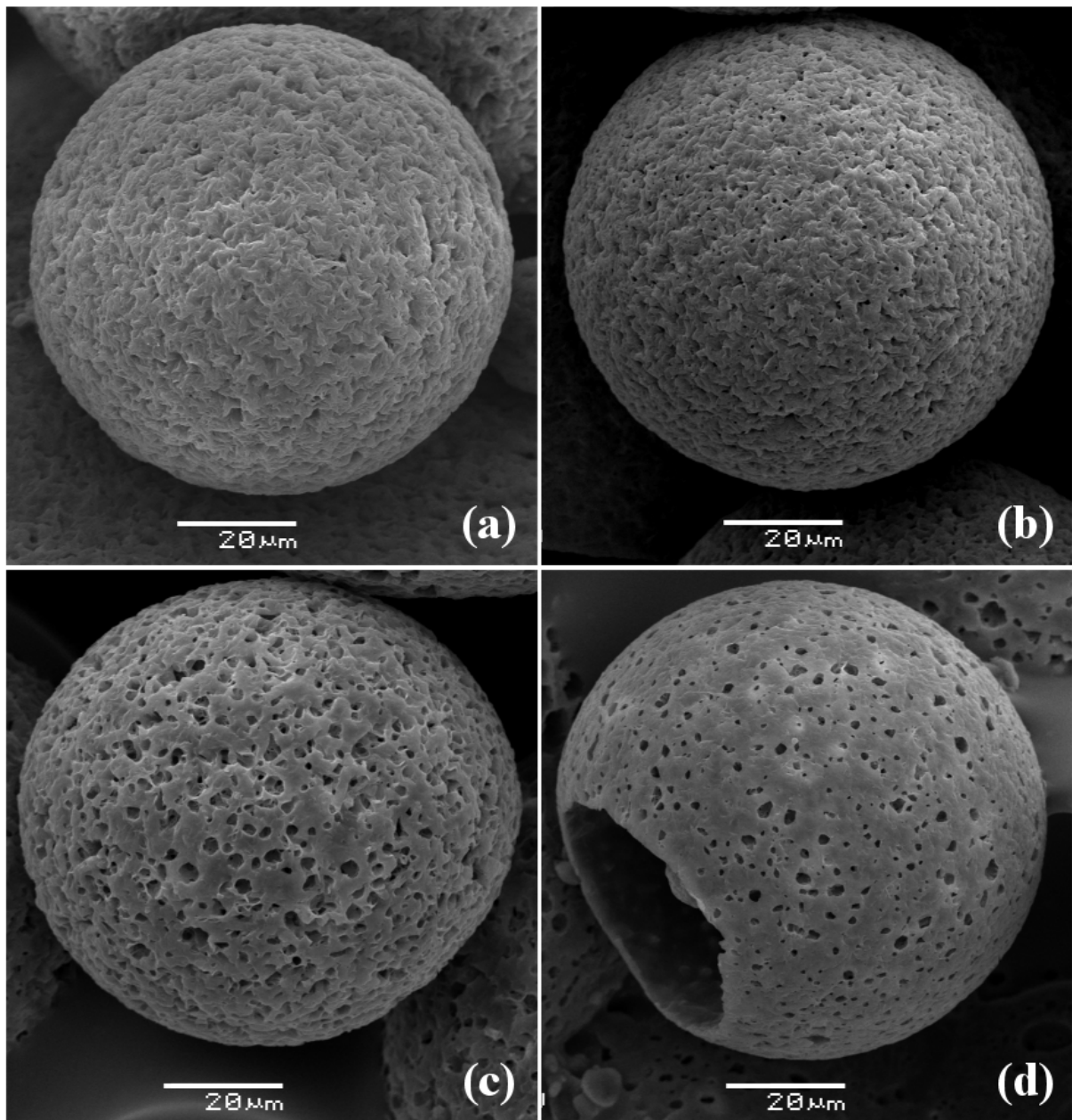


Figura 18: Fotomicrografias eletrônicas das micropartículas (600x, 15kV, barra = 20 μm) a) MP-0, b) MP-10, c) MP-30 e d) MP-50.

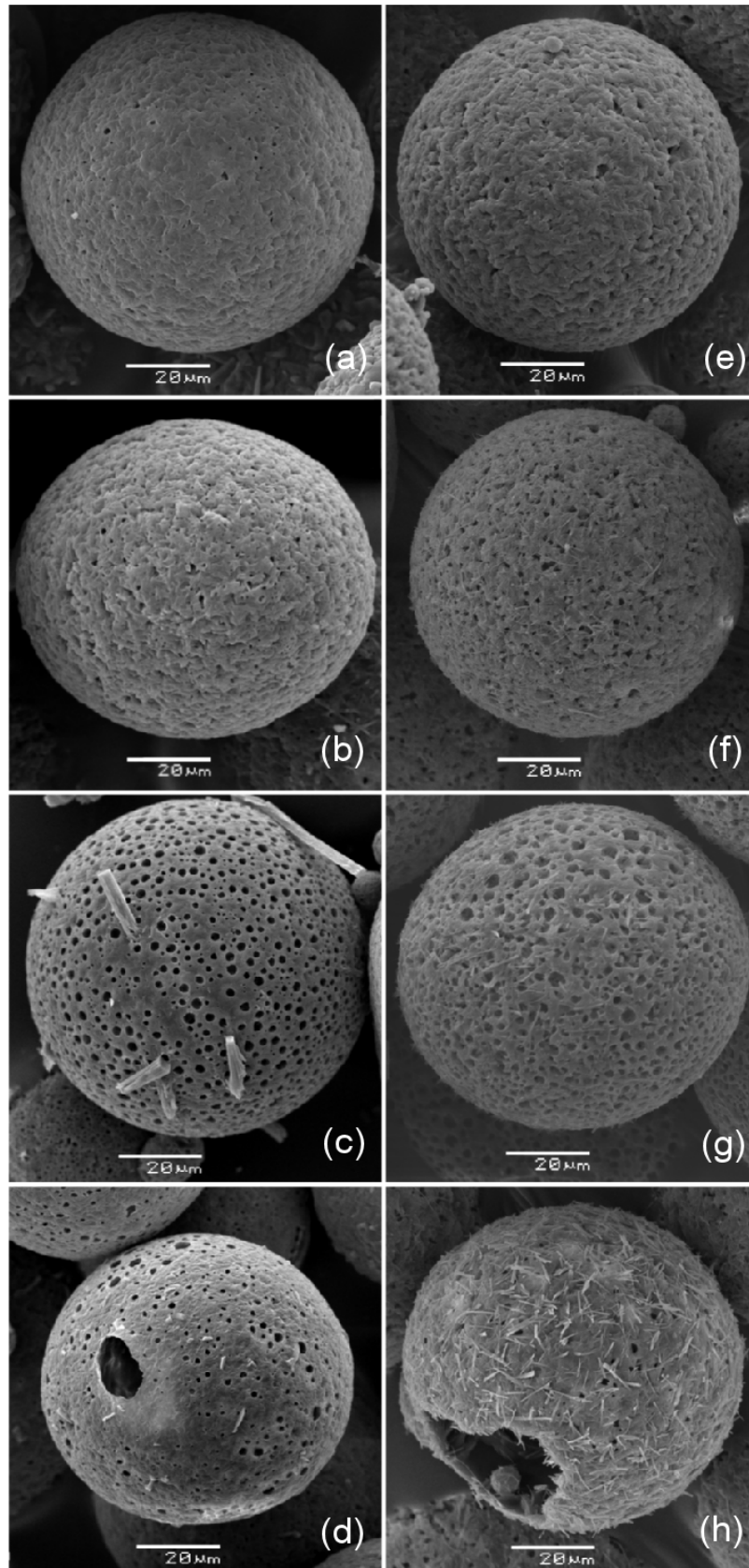


Figura 19: Fotomicrografias eletrônicas das micropartículas (600x, 15 kV, barra = 20 μ m) a) DIC-0, b) DIC-10, c) DIC-30, d) DIC-50, e) IND-0, f) IND-10, g) IND-30 e h) IND-50.

Cristais foram observados na superfície das micropartículas contendo diclofenaco e indometacina (Figura 19). Embora a maior afinidade da indometacina pelo polímero (verificada pelo aumento da T_g do P(HB-HV) nas micropartículas da série IND) possa contribuir para uma menor segregação do fármaco, provavelmente a quantidade de indometacina incorporada foi superior à sua saturação no polímero. Do mesmo modo, a quantidade de diclofenaco incorporado às micropartículas excedeu a sua concentração de saturação. A evaporação do solvente não foi suficientemente rápida para evitar a recristalização do excedente de fármaco na superfície da matriz polimérica. A lavagem das micropartículas com água, ao final do seu processo de obtenção, não foi efetiva quanto à completa remoção dos cristais na superfície das formulações. Paralelamente, as imagens obtidas por microscopia óptica (Figura 20) permitiram a visualização do formato esférico das micropartículas, bem como constituíram um indicativo de que a polidispersão foi estreita.

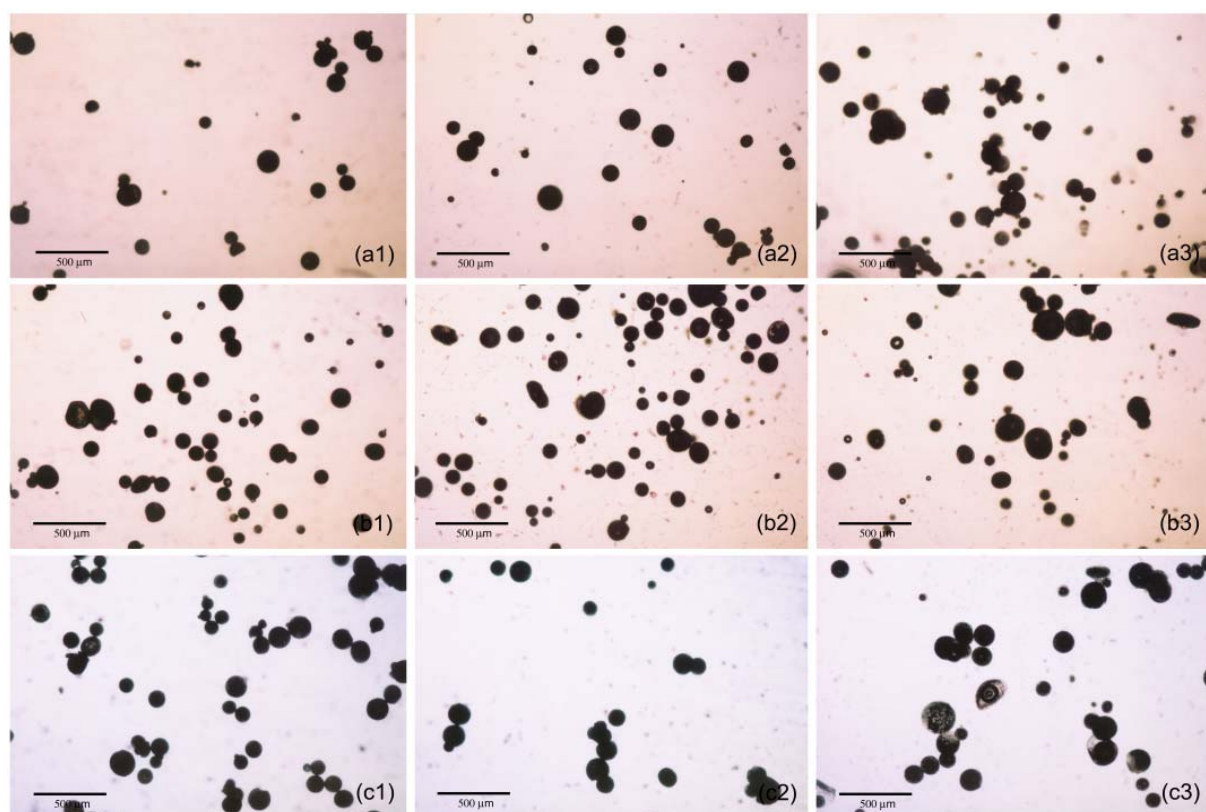


Figura 20: Imagens obtidas por microscopia óptica das micropartículas (barra = 500 μm): a) MP-50, b) DIC-50 e c) IND-50, sob luz normal (1.ar, 2.água, 3.óleo).

Sob luz polarizada, todas as micropartículas (com ou sem fármaco) apresentaram birrefringência. Esta característica das micropartículas concorda com os resultados de DSC, pois a presença dos picos de fusão do P(HB-HV) e da PCL nesta análise evidenciou a natureza semicristalina de ambos os polímeros.

O aumento do tamanho e/ou número de poros com o aumento da concentração de PCL foi confirmado pelos resultados de área superficial específica, obtidos através de isotermas de adsorção de nitrogênio gasoso à temperatura de ebulição do nitrogênio líquido (Tabela 7). Os valores de área das micropartículas aumentaram sistematicamente com o aumento do percentual de PCL presente na matriz. Além disso, observou-se similaridade entre as áreas das formulações com a mesma concentração de PCL, contendo ou não qualquer dos fármacos.

Tabela 7: Áreas superficiais específicas (m^2/g) das micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/ PCL.

Formulação	Área superficial específica (m^2/g)	Coefficiente de determinação (R^2)
MP-0	33	0,8604
MP-10	82	0,9980
MP-30	109	0,8825
MP-50	120	0,8256
DIC-0	26	0,9991
DIC-10	91	0,9984
DIC-30	111	0,9970
DIC-50	120	0,8803
IND-0	26	0,9993
IND-10	80	0,9980
IND-30	103	0,9387
IND-50	110	0,9578

A análise do tamanho das micropartículas, através de difratometria de *laser*, mostrou uma distribuição log-normal, bem como uma baixa polidispersão para todas as formulações analisadas, com valores de *Span* inferiores a 2,0. As formulações contendo 30 % e 50 % de PCL apresentaram diâmetros menores em relação às formulações cuja concentração de PCL corresponde a 0 % e 10 %, o que está de acordo com as imagens obtidas por microscopia (Tabela 8).

Tabela 8: Distribuição de tamanho das micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/PCL (μm) ($n = 3$).

Formulação	$D[4,3]$	SD (\pm)	$D_{(10)}$	$D_{(50)}$	$D_{(90)}$	Span
MP-0	214,9	1,8	99,3	195,0	360,0	1,3
MP-10	187,8	0,8	87,8	169,4	317,8	1,3
MP-30	176,2	0,2	82,0	159,0	296,8	1,3
MP-50	122,0	2,4	65,8	111,1	190,9	1,1
DIC-0	187,0	1,4	79,8	168,8	324,1	1,4
DIC-10	199,4	1,5	91,5	178,4	334,1	1,4
DIC-30	160,9	1,0	67,8	137,2	289,5	1,6
DIC-50	153,9	0,1	84,9	142,5	239,2	1,1
IND-0	271,6	1,5	112,0	248,1	466,8	1,4
IND-10	273,8	0,1	117,4	254,4	461,5	1,3
IND-30	174,0	1,0	64,3	127,0	293,1	1,8
IND-50	177,9	2,2	86,2	161,8	299,3	1,3

A partir dos resultados demonstrados na Tabela 8, pode-se inferir que a concentração de PCL influenciou no tamanho das micropartículas. Isso provavelmente ocorreu em função do aumento da cristalinidade da PCL com o aumento de sua concentração na matriz. Além disso, a presença de indometacina exerceu influência considerável no diâmetro das formulações IND-0 e IND-10, provavelmente em função da sua maior interação com a porção amorfa do P(HB-HV) (Figura 21). No entanto, como a concentração de PVA na fase aquosa foi igual para todas as formulações, uma distribuição de tamanho homogênea foi mantida.

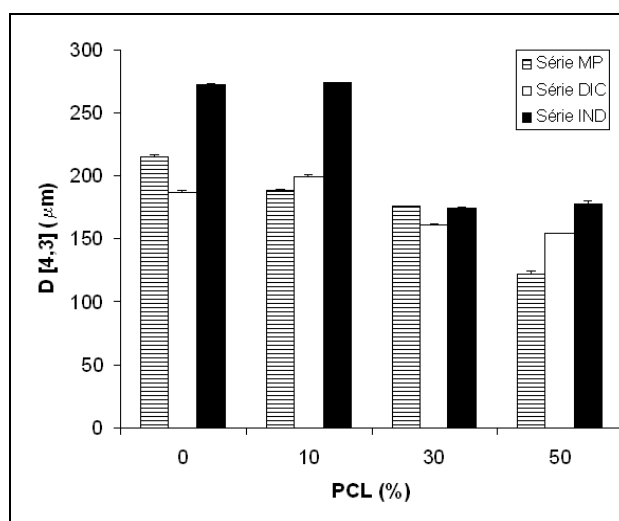


Figura 21: Variação do diâmetro de partícula $D[4,3]$ em função do percentual de PCL presente na matriz ($n = 3$).

5.1.5. Perfis de Liberação *In Vitro*

As Figuras 22 e 23 mostram os perfis de liberação *in vitro* de diclofenaco e indometacina a partir das micropartículas de P(HB-HV) e suas blends com PCL. Os experimentos foram realizados em meio tampão pH 7,4 a $37 \pm 0,5$ °C, sob agitação magnética constante. Paralelamente, os perfis de dissolução de ambos os fármacos na sua forma pulveréa foram determinados nas mesmas condições. Após 60 min, o diclofenaco em pó foi totalmente dissolvido. Todavia, de $23,6 \pm 3,0$ % (DIC-0) a $36,6 \pm 4,3$ % (DIC-50) de diclofenaco foram liberados a partir das micropartículas no mesmo período.

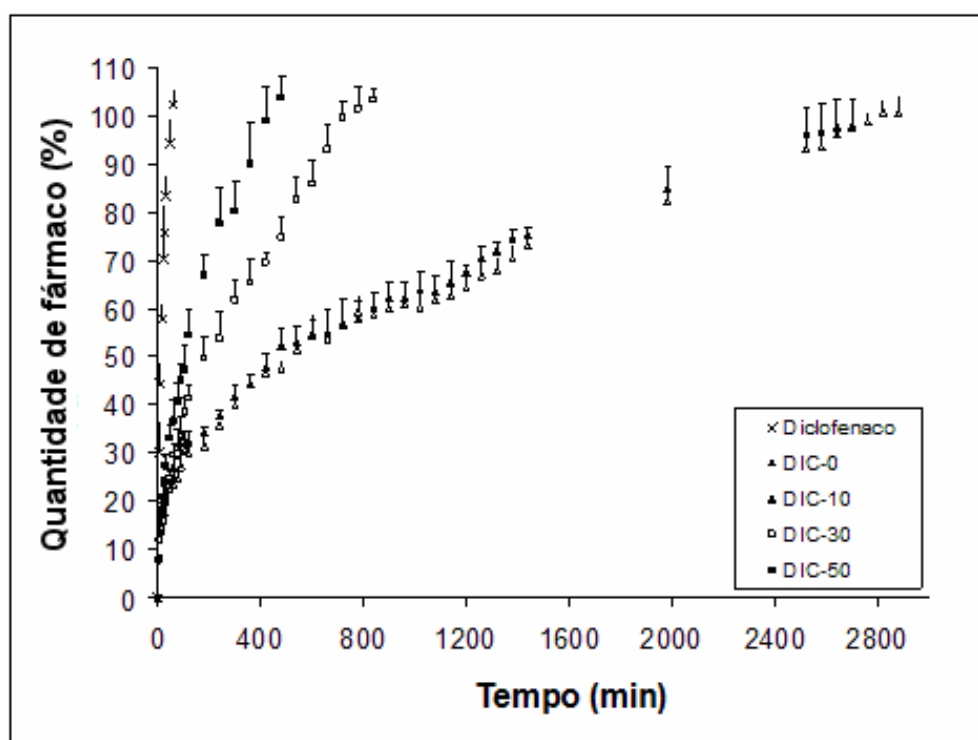


Figura 22: Curvas de dissolução de diclofenaco em pó e perfis de liberação de micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/PCL contendo diclofenaco, determinados em meio tampão pH $7,4 \pm 0,1$, a $37,0 \pm 0,5$ °C, sob agitação magnética constante.

Por sua vez, a indometacina na forma pulveréa atingiu 100 % de dissolução em 120 min. No entanto, as concentrações do fármaco liberado a partir das micropartículas no mesmo tempo variaram de $20,4 \pm 1,1$ % (IND-0) a $37,0 \pm 1,8$ % (IND-50).

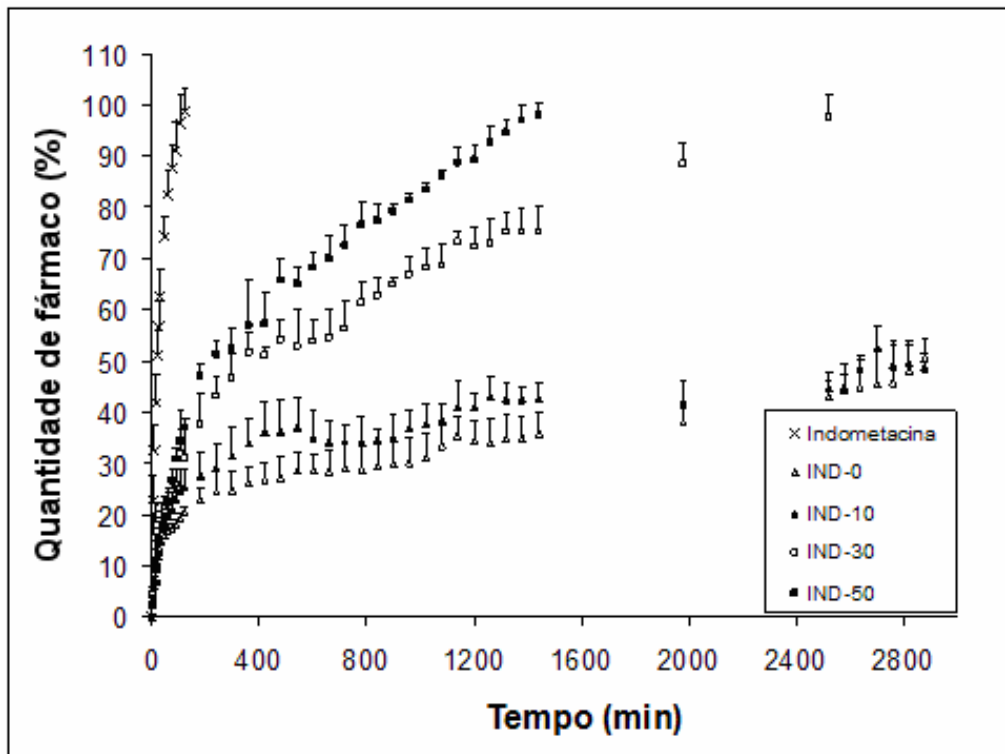


Figura 23: Curvas de dissolução de indometacina em pó e perfis de liberação de micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/PCL contendo indometacina, determinados em meio tampão pH $7,4 \pm 0,1$, a $37,0 \pm 0,5$ °C, sob agitação magnética constante.

Comparativamente, a liberação do diclofenaco a partir das formulações foi mais rápida que a de indometacina. Considerando-se os estudos previamente descritos a respeito do comportamento térmico das micropartículas das séries DIC e IND, sugere-se que a maior afinidade da indometacina pela matriz tornou sua liberação mais lenta. Além disso, a proporção de fármaco-modelo ionizado no meio de liberação é um fator que influencia na velocidade de dissolução. Sabe-se que o número de moléculas de ácidos fracos que apresentam o hidrogênio do grupo carboxila dissociado depende do seu valor de pKa e do pH do meio. O valor de pKa

do diclofenaco (3,8) é menor que o valor correspondente à indometacina (4,5), portanto a maior acidez do diclofenaco em relação à indometacina levou à formação mais rápida da forma dissociada do primeiro em meio tampão pH 7,4. Desse modo, uma velocidade de dissolução mais lenta da indometacina nesse meio seria esperada tanto na sua forma livre quanto na porção adsorvida na superfície das micropartículas, em comparação com o diclofenaco.

A liberação dos fármacos-modelo mostrou-se mais rápida com o aumento da concentração de PCL na matriz de uma mesma série de micropartículas. Tal comportamento de liberação pode estar relacionado ao aumento do número e/ou tamanho dos poros na superfície das partículas com o acréscimo de PCL na matriz. A presença de poros resultou em aumento da área de contato da matriz com o meio, facilitando a sua penetração nos interstícios das cadeias poliméricas e acelerando a liberação dos fármacos.

Sabe-se que a cristalinidade da matriz pode influenciar na velocidade de liberação de fármacos (FREIBERG E ZHU, 2004). Considerando-se que a cristalinidade total da matriz permaneceu na mesma ordem de grandeza para todas as formulações estudadas, tal fator exerceu uma influência semelhante em todos os perfis de liberação.

5.2. Modelagem Matemática dos Perfis de Liberação

Os dados obtidos nos experimentos de liberação do diclofenaco e da indometacina a partir das micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/PCL foram matematicamente modelados através do programa Micromath Scientist[®] (versão 2.0). A descrição matemática das curvas de liberação foi realizada pelo ajuste dos pontos experimentais aos modelos monoexponencial (Equação 12) e biexponencial (Equação 11). Tal ajuste é apresentado nas Figuras 24 e 25.

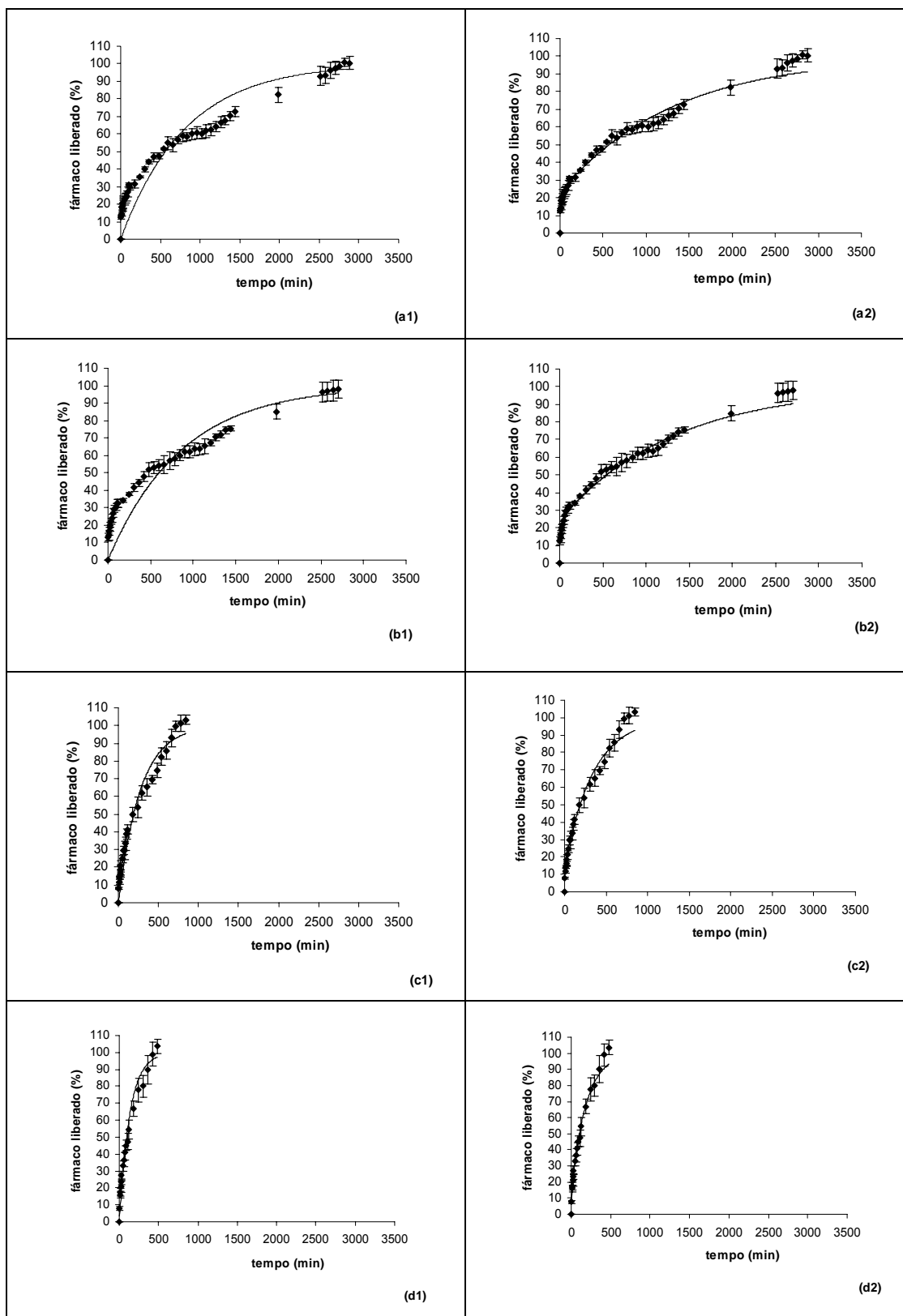


Figura 24: Modelagem dos dados de liberação de diclofenaco a partir das micropartículas a) DIC-0, b) DIC-10, c) DIC-30, d) DIC-50, através das equações monoexponencial (1) e biexponencial (2).

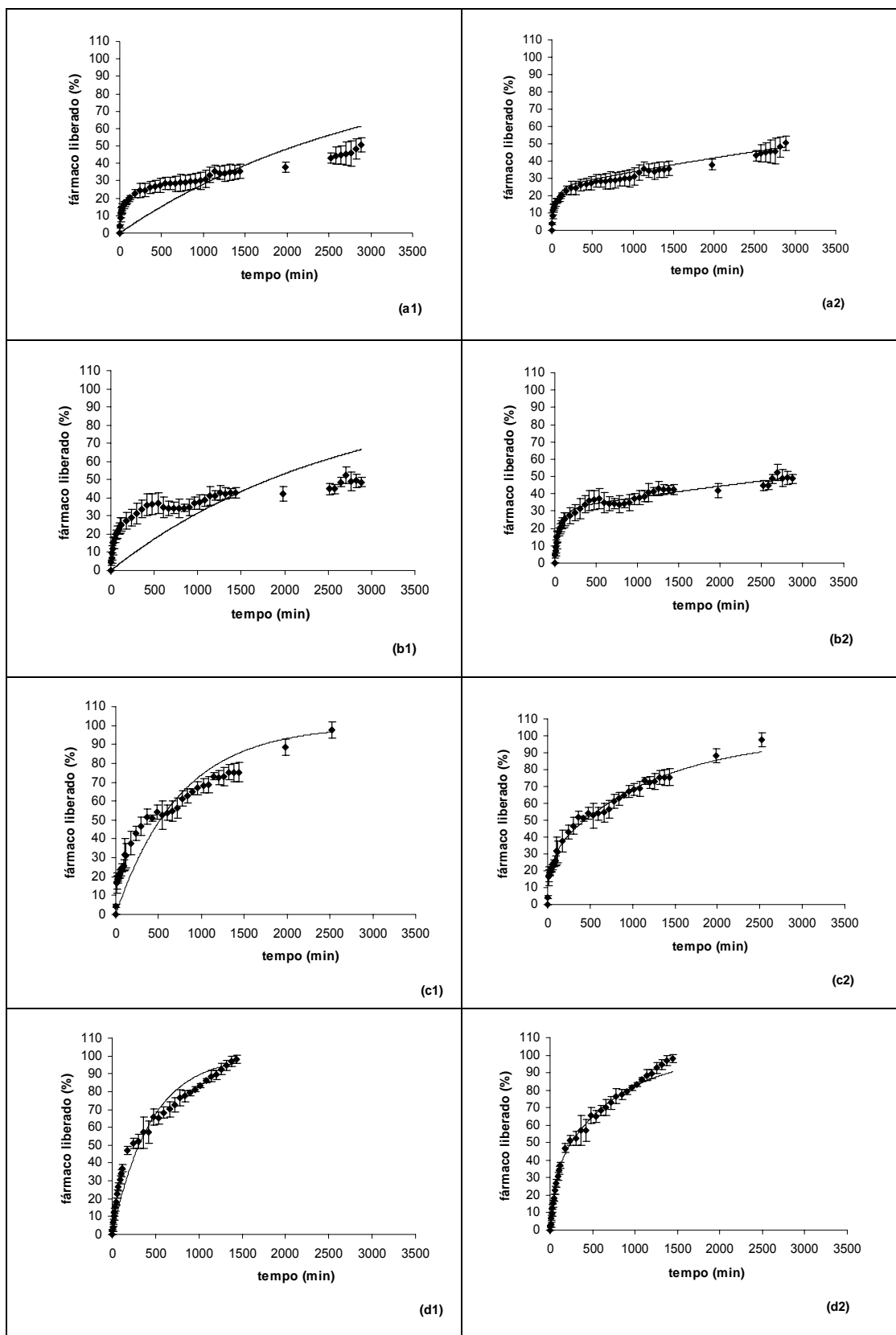


Figura 25: Modelagem dos dados de liberação de indometacina a partir das micropartículas a) IND-0, b) IND-10, c) IND-30, d) IND-50, através das equações monoexponencial (1) e biexponencial (2).

Os parâmetros e o coeficiente de correlação R referentes aos perfis de liberação do diclofenaco podem ser visualizados na Tabela 9:

Tabela 9: Parâmetros da modelagem matemática dos perfis de liberação de diclofenaco a partir de micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/PCL utilizando as equações monoexponencial e biexponencial.

Formulação	Monoexponencial	Biexponencial
DIC-0	$R = 0,8907$ $MSC = 1,58$	$R = 0,9872$ $MSC = 3,52$
	$k = 0,00123 \pm 7,5 \times 10^{-5}$	$A = 0,1755 \pm 0,11432$ $B = 0,7716 \pm 0,02342$ $\alpha = 0,07080 \pm 0,05185$ $\beta = 0,00076 \pm 8,5 \times 10^{-5}$
DIC-10	$R = 0,8794$ $MSC = 1,44$	$R = 0,9920$ $MSC = 3,99$
	$k = 0,00116 \pm 0,00018$	$A = 0,1745 \pm 0,02879$ $B = 0,7566 \pm 0,02290$ $\alpha = 0,04695 \pm 0,01595$ $\beta = 0,00076 \pm 9,5 \times 10^{-5}$
DIC-30	$R = 0,9589$ $MSC = 2,58$	$R = 0,9846$ $MSC = 3,29$
	$k = 0,00367 \pm 0,00032$	$A = 0,1269 \pm 0,05789$ $B = 0,8609 \pm 0,04105$ $\alpha = 0,11469 \pm 0,01974$ $\beta = 0,00292 \pm 0,00045$
DIC-50	$R = 0,9810$ $MSC = 3,19$	$R = 0,9969$ $MSC = 4,53$
	$k = 0,00749 \pm 0,00142$	$A = 0,1720 \pm 0,01138$ $B = 0,8537 \pm 0,01172$ $\alpha = 0,13764 \pm 0,02752$ $\beta = 0,00529 \pm 0,00088$

Da mesma forma, os dados fornecidos pelo programa, obtidos a partir dos perfis de liberação da indometacina, encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros da modelagem matemática dos perfis de liberação de indometacina a partir de micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/PCL utilizando as equações monoexponencial e biexponencial.

Formulação	Monoexponencial	Biexponencial
IND-0	$R = 0,2800$ $MSC = 0,02$	$R = 0,9868$ $MSC = 3,57$
	$k = 0,00033 \pm 7,7 \times 10^{-6}$	$A = 0,1858 \pm 0,01646$ $B = 0,7548 \pm 0,02623$ $\alpha = 0,01443 \pm 0,00948$ $\beta = 0,00013 \pm 1,62 \times 10^{-5}$
IND-10	$R = 0,5741$ $MSC = 0,59$	$R = 0,9878$ $MSC = 3,40$
	$k = 0,00038 \pm 3,4 \times 10^{-5}$	$A = 0,2547 \pm 0,04544$ $B = 0,6923 \pm 0,00453$ $\alpha = 0,01249 \pm 0,00228$ $\beta = 0,00011 \pm 2 \times 10^{-5}$
IND-30	$R = 0,8979$ $MSC = 1,66$	$R = 0,9921$ $MSC = 3,95$
	$k = 0,00134 \pm 0,00019$	$A = 0,1897 \pm 0,05648$ $B = 0,7096 \pm 0,06351$ $\alpha = 0,01431 \pm 0,00044$ $\beta = 0,00080 \pm 2,1 \times 10^{-6}$
IND-50	$R = 0,9625$ $MSC = 2,54$	$R = 0,9977$ $MSC = 5,18$
	$k = 0,00224 \pm 0,00028$	$A = 0,3165 \pm 0,02977$ $B = 0,7000 \pm 0,05282$ $\alpha = 0,01671 \pm 0,00317$ $\beta = 0,00138 \pm 4,5 \times 10^{-5}$

A escolha da equação que melhor descreveu os perfis foi baseada no critério de seleção do modelo (MSC), coeficiente de correlação R e ajuste gráfico. Quanto maiores os valores de MSC e de R , melhor é o ajuste dos dados ao modelo. A partir dos resultados, constatou-se que a equação biexponencial foi a mais adequada para descrever os dados experimentais.

Dessa maneira, foi possível inferir que o processo de liberação consiste de duas fases, as quais correspondem a uma fase rápida (efeito *burst*) e a uma fase de liberação sustentada. Os parâmetros A e B correspondem às concentrações iniciais de fármaco que contribuiriam para a liberação rápida e sustentada, respectivamente

(CRUZ, 2005). Paralelamente, os dados de dissolução do diclofenaco e da indometacina foram modelados através da equação monoexponencial. Os parâmetros obtidos na modelagem do perfil de dissolução do diclofenaco foram $MSC = 4,13$, $R = 0,9941$ e $k = 0,0602 \pm 0,0009$. Desta forma, o seu tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de dissolução correspondeu a 11,5 min. A modelagem do perfil de dissolução da indometacina forneceu os parâmetros $MSC = 3,31$, $R = 0,9963$ e $k = 0,0365 \pm 0,0009$, cujo $t_{1/2}$ de dissolução foi igual a 19,0 min.

A partir das constantes cinéticas α e β , calculou-se respectivamente os valores de $t_{1/2}$ das fases de liberação rápida e lenta dos fármacos-modelo (Tabela 11). Esses resultados indicaram liberação sustentada tanto do diclofenaco quanto da indometacina, pois os valores de $t_{1/2}$ da fase lenta de liberação dos fármacos a partir das micropartículas foram superiores aos valores de $t_{1/2}$ de dissolução dos mesmos.

Tabela 11: Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) das fases rápida e lenta de liberação de diclofenaco e indometacina a partir de micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/PCL em meio tampão pH $7,4 \pm 0,1$, a $37,0 \pm 0,5$ ° C.

Amostra	$t_{1/2}$ da fase rápida (min)	$t_{1/2}$ da fase sustentada (min)
DIC-0	10	912
DIC-10	15	912
DIC-30	6	237
DIC-50	5	131
IND-0	48	5331
IND-10	55	6300
IND-30	48	866
IND-50	41	502

De acordo com o parâmetro A , a quantidade de diclofenaco que contribuiu para a fase rápida correspondeu à faixa de 13 % a 17 % do total. Por sua vez, de 18% a 32 % do total de indometacina contribuiu para a fase rápida. Foi proposto que a fase rápida de liberação a partir das micropartículas ocorreu pela presença destas quantidades de fármaco próximo à superfície. Os valores de $t_{1/2}$ da fase rápida de liberação da indometacina (41 min a 55 min) foram cerca de 5 vezes maiores que os correspondentes ao diclofenaco (5 min a 15 min).

De acordo com o parâmetro B , a quantidade inicial de diclofenaco que contribuiu para a fase lenta correspondeu à faixa de 76 % a 86 %. No entanto, a quantidade inicial de 69 % a 75 % de indometacina contribuiu para a fase lenta. O aumento da concentração de PCL de 0 % a 50 % na matriz levou a uma diminuição do $t_{1/2}$ de liberação da fase sustentada do diclofenaco de cerca de 15 h (912 min) para cerca de 2 h (131 min). Isso corresponde a uma diminuição de 6,9 vezes. Por sua vez, o $t_{1/2}$ da indometacina decaiu de cerca de 89 h (5331 min) para cerca de 8 h (502 min) com o aumento da concentração de PCL de 0 % a 50 %, equivalente a uma diminuição de 10,6 vezes. Isso demonstra a capacidade de modulação dos perfis de liberação dos fármacos-modelo a partir dos sistemas estudados, variando-se as concentrações dos polímeros que compõem a matriz das micropartículas. Tal modulação pode ser interessante sob o ponto de vista da aplicação desses sistemas. Diferentes vias de administração exigem sistemas com características de liberação determinadas. Uma liberação mais lenta, de dias ou semanas, é necessária quando o dispositivo é utilizado em implantes (IOOSS *et al.*, 2001). No entanto, liberações mais rápidas, de algumas horas, encontram aplicação quando a via de interesse é a oral (SUGAWARA *et al.*, 2005). Em vista disso, os sistemas estudados encontram uma ampla potencialidade de emprego como carreadores de fármacos lipofílicos ionizáveis.

Uma abordagem mecanística dos processos envolvidos na liberação de fármacos é fundamental para ampliar o entendimento desses sistemas. Com base nos estudos desenvolvidos por MAIA e colaboradores (2004) e DHANARAJU e colaboradores (2006), podem ser consideradas desprezíveis as influências relativas à erosão das micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/PCL nas condições do experimento de liberação. Neste último estudo, microsferas de PCL contendo levonorgestrel e etinil-estradiol mantiveram a integridade de sua superfície por até 20 semanas *in vitro*. Além disso, a matriz polimérica é muito hidrofóbica para sofrer inchamento significativo após contato com o meio aquoso, o que poderia resultar em transporte anômalo do fármaco (PEPPAS e SAHLIN, 1989; TERADA e MARCHESSAULT, 1999; AVELLA *et al.*, 2000). Dessa forma, na busca por uma correlação entre a velocidade de liberação dos fármacos e a concentração de PCL na matriz (a qual está relacionada à tortuosidade do sistema), foi aplicada a cada perfil uma equação teórica baseada nas considerações de Higuchi, adaptada para

esferas, conhecida como equação de Baker-Lonsdale. Essa equação descreve o transporte de moléculas através de uma matriz polimérica como um processo difusional (Equação 9, p. 30). Como o raio de partícula é considerado na equação, os perfis de liberação foram normalizados com relação a esse parâmetro. Esse é um fator importante, pois a velocidade de liberação é afetada pelo diâmetro das micropartículas (FREIBERG e ZHU, 2004).

Tabela 12: Coeficientes de correlação (*R*) referentes ao ajuste dos dados de liberação (fase sustentada) à equação de Baker-Lonsdale.

Formulação	<i>R</i>
DIC-0	0,9824
DIC-10	0,9711
DIC-30	0,9965
DIC-50	0,9915
IND-0	0,9498
IND-10	0,8920
IND-30	0,9905
IND-50	0,9973

O ajuste dos dados de liberação à equação de Baker-Lonsdale foi feito através do método dos mínimos quadrados (Figuras 26 e 27), apresentando valores de *R* elevados (Tabela 12). Nessa modelagem, foram descartados os pontos cujos tempos foram superiores ao tempo correspondente a 100 % de fármaco liberado do perfil mais rápido de cada série, a fim de que as correlações fossem estabelecidas com o mesmo número de pontos para cada perfil de uma mesma série de micropartículas.

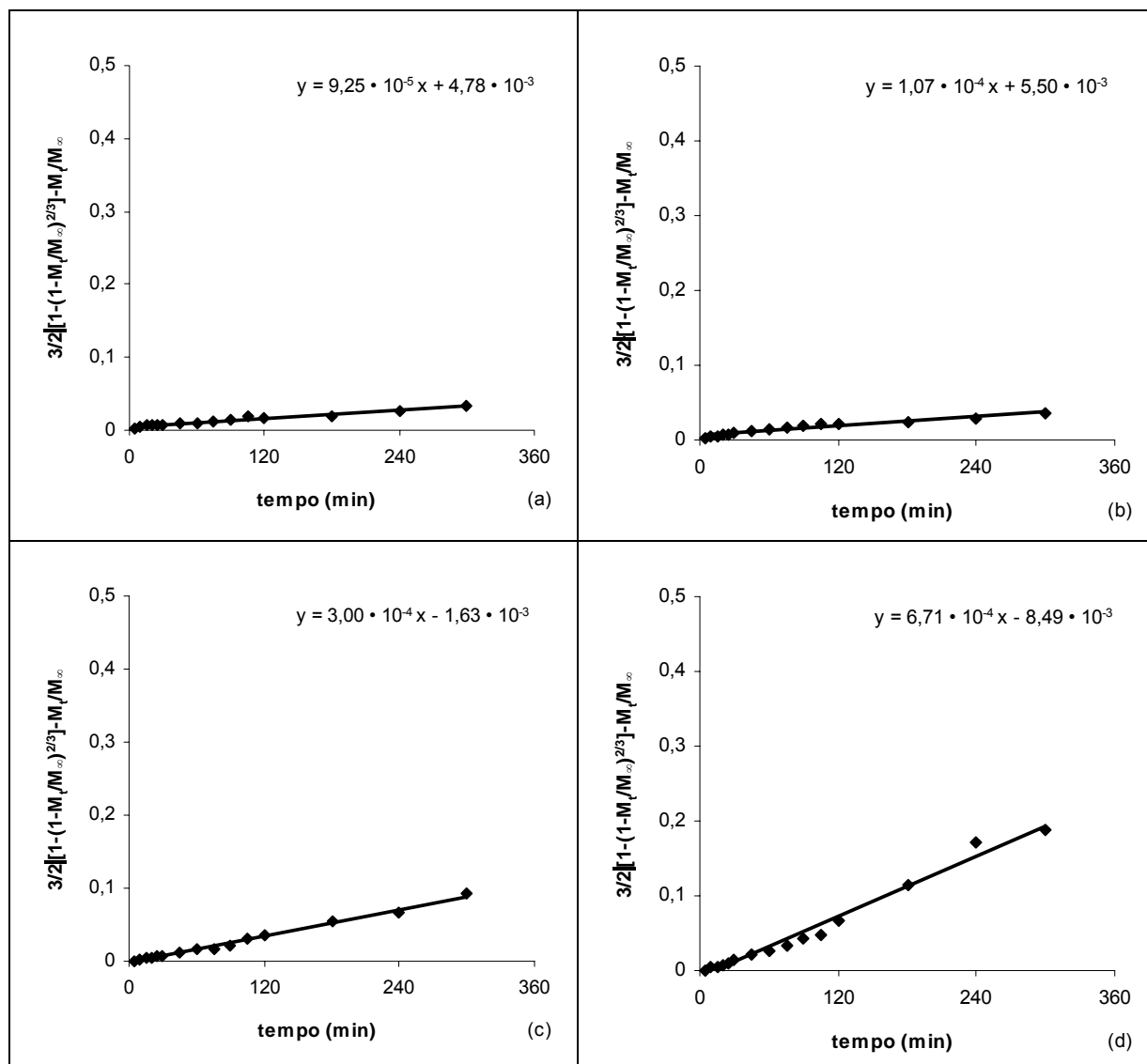


Figura 26: Ajuste dos dados de liberação de diclofenaco a partir das micropartículas a) DIC-0, b) DIC-10, c) DIC-30 e d) DIC-50 à equação de Baker-Lonsdale.

Dessa forma, demonstrou-se que o modelo de Baker-Lonsdale descreveu adequadamente os dados experimentais, confirmando a hipótese de que o mecanismo de liberação dos fármacos a partir das micropartículas estudadas é difusional. Como o lado esquerdo da equação apresentou uma relação linear com o tempo, foi possível obter a inclinação da reta. Este valor, juntamente com o raio r_o e a quantidade inicial de fármaco C_o , permitiu o cálculo do produto entre o coeficiente de difusão do fármaco e sua solubilidade na matriz, $DC_{s,m}$, para todas as formulações.

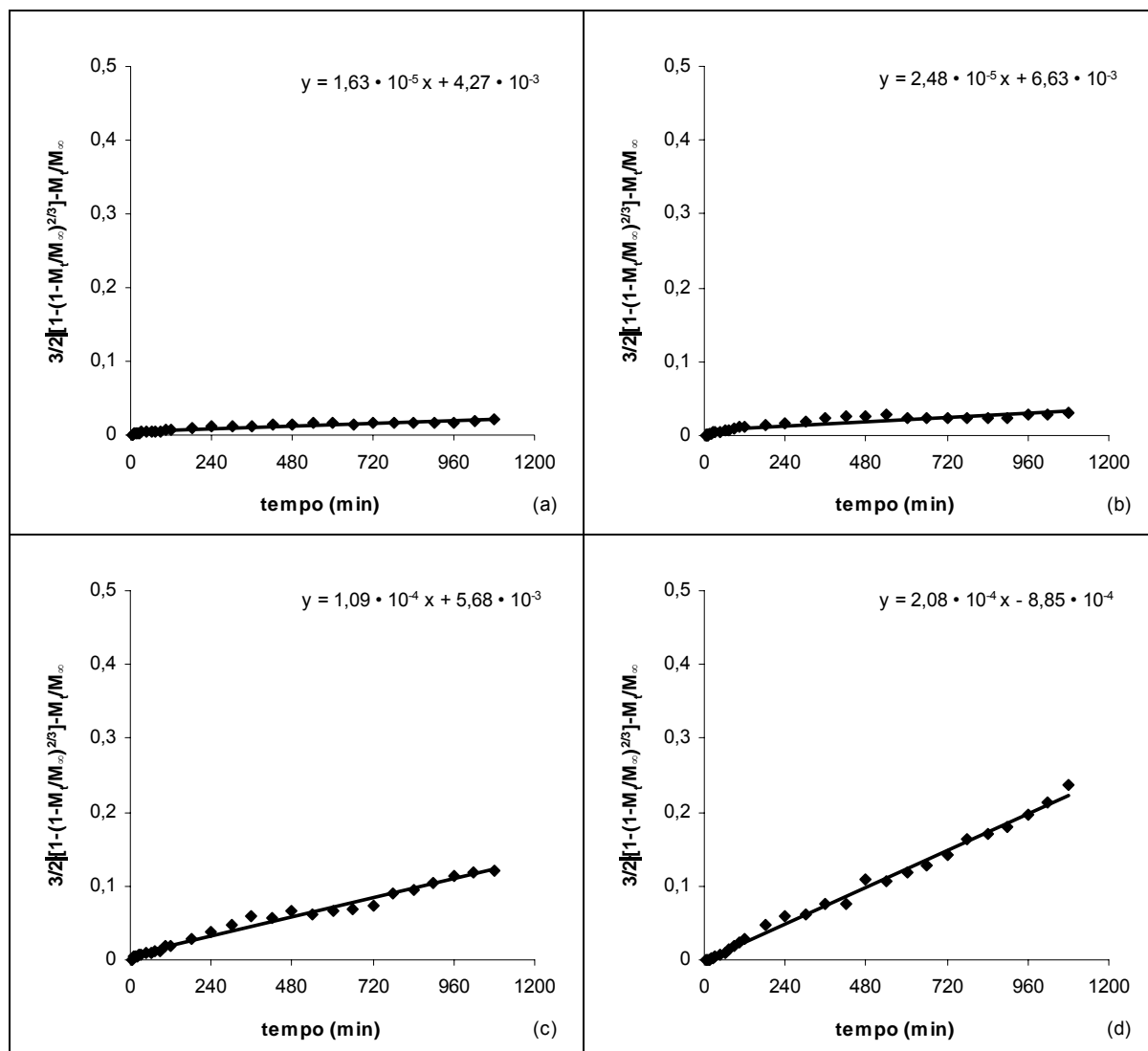


Figura 27: Ajuste dos dados de liberação de indometacina a partir das micropartículas a) IND-0, b) IND-10, c) IND-30 e d) IND-50 à equação de Baker-Lonsdale.

O parâmetro C_0 foi experimentalmente determinado por doseamento (item 4.2.3.1.). O raio foi obtido através da divisão por 2 do valor médio de diâmetro de esfera equivalente ($D[4,3]$) de cada formulação. Embora as fotomicrografias por SEM tenham demonstrado que as micropartículas estudadas são ocas, foram consideradas como esferas sólidas nesta modelagem, com o intuito de simplificar o equacionamento. Por isso, um valor relativo de $DC_{s,m}$ foi calculado (Tabela 13).

Cabe salientar que a equação de Baker-Lonsdale foi desenvolvida para sistemas matriciais não-porosos. Considerando-se que as matrizes envolvidas nesse estudo apresentam macroporos, os coeficientes difusionais corresponderam a um

valor aparente. Além disso, assumiu-se nesse estudo que o valor de D permaneceu constante para todos os tempos de cada perfil.

Tabela 13: Valores do produto entre o coeficiente de difusão aparente e a concentração de fármaco molecularmente dissolvido na matriz, $DC_{s,m}$, correspondentes ao diclofenaco e à indometacina incorporados às micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/PCL ($n = 3$).

Formulação	$DC_{s,m} \cdot 10^{-16} \text{ (g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\text{)}$	$SD \cdot 10^{-16} \text{ (}\pm\text{)}$
DIC-0	3,76	0,56
DIC-10	4,81	0,46
DIC-30	9,87	0,25
DIC-50	20,40	0,53
IND-0	1,67	0,60
IND-10	2,46	0,35
IND-30	4,03	0,95
IND-50	9,54	0,63

Os resultados de análise térmica das partículas e matérias-primas, obtidos nesse trabalho, sugerem que o diclofenaco encontra-se disperso na matriz na forma de aglomerados nanométricos, enquanto que a indometacina é solubilizada pelo polímero, pois apenas a última apresentou interação molecular com a porção amorfa das cadeias poliméricas. Portanto, pode-se inferir que o valor de $C_{s,m}$ da indometacina na matriz é superior ao valor de $C_{s,m}$ do diclofenaco. A partir da equação de Baker-Lonsdale, sabe-se que o coeficiente difusional e a concentração de fármaco solubilizado na matriz são inversamente proporcionais. Considerando-se a maior solubilidade da indometacina no polímero, sugere-se que seus valores de coeficiente difusional são iguais ou menores que os valores referentes ao diclofenaco, para um mesmo tipo de formulação (ou seja, com o mesmo percentual de PCL na matriz).

O logaritmo natural de $DC_{s,m}$ ($\times 10^{16}$) foi calculado para cada formulação, sendo que os valores obtidos foram plotados em função do percentual de PCL presente na matriz polimérica das micropartículas (Figura 28).

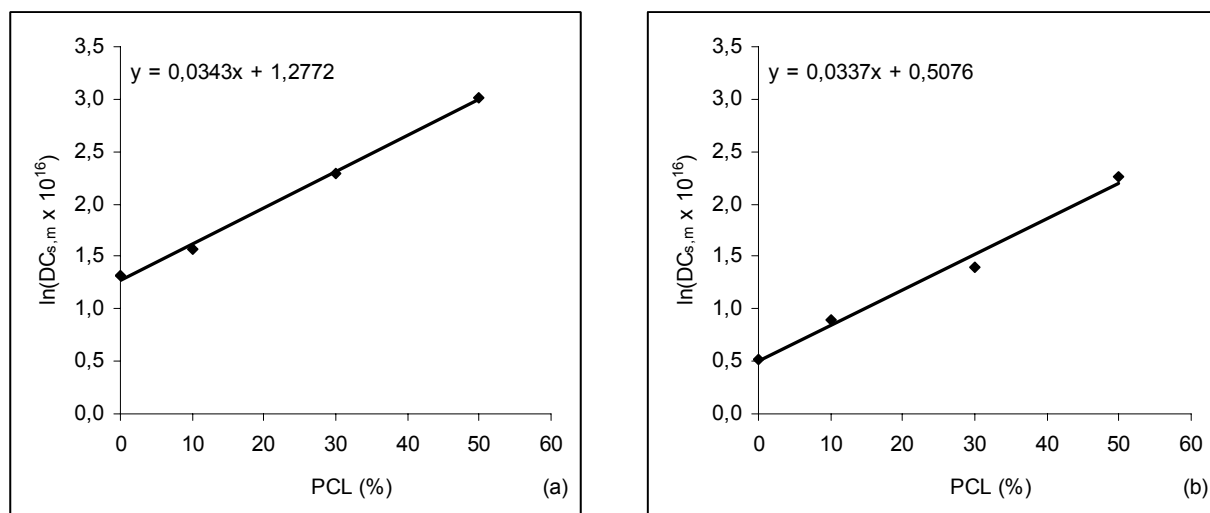


Figura 28: Plotagem do logaritmo natural do produto do coeficiente de difusão aparente e da concentração de fármaco solubilizado na matriz, $\ln(DC_{s,m} \times 10^{16})$ correspondente a) ao diclofenaco e b) à indometacina, a partir das micropartículas de blendas de P(HB-HV)/ PCL, em função do percentual de PCL na matriz.

A partir dos gráficos da Figura 28, observa-se que há uma relação diretamente proporcional entre o percentual de PCL e $\ln(DC_{s,m} \times 10^{16})$, com $R = 0,9984$ e $R = 0,9933$ para diclofenaco e indometacina, respectivamente. Como $DC_{s,m}$ é constante para todas as formulações contendo um mesmo fármaco, pois tal parâmetro é dependente apenas da interação fármaco-matriz, o aumento da concentração de PCL levou ao aumento do coeficiente de difusão aparente D de maneira proporcional. Isso deve-se à diminuição da tortuosidade do sistema com o aumento da concentração de PCL, o que significa que a saída do fármaco a partir das micropartículas foi facilitada, aumentando a velocidade de liberação.

O coeficiente de difusão aparente de uma substância em uma matriz porosa pode ser definido como a razão entre o seu coeficiente difusional na matriz sem poros e um fator que compreende a porosidade ε e a tortuosidade τ da matriz (KIM, 2000). Como o coeficiente de difusão dos fármacos a partir de uma matriz sem poros de P(HB-HV) e suas blendas com PCL não é conhecido, foi possível determinar um valor de ε/τ relativo, de acordo com a Equação 19, proposta neste trabalho, considerando-se que as micropartículas DIC-0 e IND-0 apresentam $\varepsilon/\tau = 1$.

$$\frac{\varepsilon}{\tau} = e^{-w \cdot C_{PCL}}$$

(Equação 19)

onde w corresponde ao coeficiente angular que descreve a curva de $\ln(DC_{s,m} \times 10^{16})$ em função do percentual de PCL para cada série de formulações (Figura 28) e C_{PCL} consiste no percentual de PCL presente na matriz. Os resultados do fator de porosidade-tortuosidade relativo são descritos na Tabela 14.

Tabela 14: Fator de porosidade-tortuosidade relativo (ε/τ) das micropartículas contendo diclofenaco ou indometacina, considerando-se $\varepsilon/\tau = 1$ tanto para DIC-0 quanto para IND-0.

Formulação	ε/τ
DIC-10	0,710
DIC-30	0,357
DIC-50	0,180
IND-10	0,714
IND-30	0,364
IND-50	0,185

Na Figura 29, os valores de ε/τ foram plotados em função da razão entre a área superficial (determinada pelo método BET, item 4.2.3.5.) e o quadrado do raio das micropartículas (obtido a partir do diâmetro de esfera equivalente $D[4,3]$, item 4.2.3.4.).

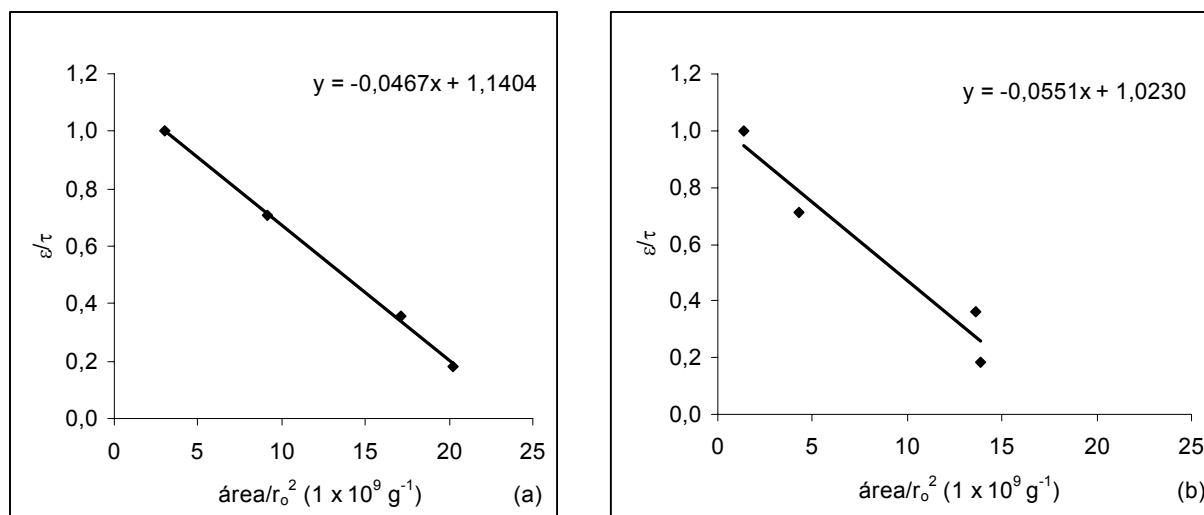


Figura 29: Plotagem do fator de porosidade-tortuosidade relativo ε/τ em função da razão entre as áreas superficiais e o quadrado do raio das micropartículas contendo: a) diclofenaco e b) indometacina (considerando-se $\varepsilon/\tau = 1$ para DIC-0 e para IND-0).

A partir dos gráficos, pode-se afirmar que a área normalizada em relação ao raio e o fator ε/τ das micropartículas contendo diclofenaco e indometacina são inversamente proporcionais, apresentando uma correlação linear, com valores de $R = 0,9993$ e $R = 0,9725$, respectivamente. Esses resultados demonstram quantitativamente a influência da morfologia das micropartículas, constituídas por matrizes poliméricas hidrofóbicas, nos perfis de liberação *in vitro* de fármacos lipofílicos. Alterando-se o percentual de PCL, e conseqüentemente o fator ε/τ do sistema, pode-se modificar a velocidade de liberação do fármaco de forma controlada.

Além disso, o conhecimento das interações moleculares entre o fármaco e a matriz é de fundamental importância para o desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos de liberação controlada, pois o modo como o fármaco organiza-se na matriz pode influenciar nos perfis de liberação. Considerando-se os dados obtidos nesse trabalho, pode-se propor que os fármacos diclofenaco e indometacina encontram-se organizados na matriz das micropartículas na forma de aglomerados nanométricos e como dispersão molecular, respectivamente.

6. CONCLUSÕES

A obtenção de micropartículas de P(HB-HV) e de blendas desse polímero com PCL por emulsificação/ evaporação do solvente foi possível com rendimentos próximos a 100 %. Altos valores de eficiência de encapsulação (cerca de 85 %) de diclofenaco e de indometacina foram obtidos para todas as formulações avaliadas.

As micropartículas apresentaram formato esférico e interior oco. Poros foram visualizados nas formulações, sendo que os mesmos aumentaram em tamanho e/ou número com o aumento da concentração de PCL na matriz. Tal observação foi corroborada pelos resultados de área superficial específica. Os sistemas apresentaram diâmetro médio dependente da concentração de PCL (cujos valores variaram de 122 μm a 273 μm), sendo que a polidispersão foi baixa para todas as formulações (*Span* inferior a 2,0). Além disso, cristais de indometacina e diclofenaco foram observados na superfície das micropartículas. Contrariamente ao diclofenaco, a indometacina influenciou no diâmetro das partículas com 0 % e 10 % de PCL na matriz em comparação com as formulações sem fármaco.

A blenda polimérica de P(HB-HV)/PCL mostrou-se imiscível, concordando com relatos precedentes da literatura. A metodologia de preparação das micropartículas influenciou tanto no processo de cristalização do P(HB-HV), aumentando a heterogeneidade de seus cristalitos, quanto na mobilidade de cadeia da sua fase amorfa, que diminuiu em comparação com o polímero empregado como matéria-prima. A presença dos fármacos influenciou no processo de cristalização do P(HB-HV). Adicionalmente, a indometacina atuou como um antiplastificante desse polímero. O grau de cristalinidade da PCL aumentou linearmente com o aumento de sua concentração no sistema. No entanto, a cristalinidade total das micropartículas manteve a mesma ordem de grandeza com a adição dos fármacos ou de quantidades crescentes de PCL.

A análise por espectroscopia na região do infravermelho demonstrou a presença de bandas características nos espectros do P(HB-HV) e da PCL utilizados como matérias-primas, bem como dos fármacos-modelo diclofenaco e indometacina. Incompatibilidades químicas entre os componentes das micropartículas não foram detectadas empregando-se esta técnica.

Os perfis de liberação de diclofenaco e de indometacina a partir das micropartículas foram sustentados, sendo descritos por uma equação biexponencial, que indicou uma fase *burst* seguida de liberação lenta (fase sustentada). Além disso, observou-se diminuição do tempo de meia-vida de liberação *in vitro* dos fármacos com o aumento da concentração de PCL na matriz.

A partir do ajuste dos dados da fase sustentada de liberação à equação de Baker-Lonsdale, foi possível determinar o valor do produto entre o coeficiente de difusão aparente dos fármacos e sua solubilidade na matriz ($DC_{s,m}$) para cada tipo de formulação. O logaritmo natural de $DC_{s,m}$ ($\times 10^{16}$) apresentou uma relação linear diretamente proporcional ao percentual de PCL presente na matriz das micropartículas. Além disso, o fator de porosidade-tortuosidade relativo das micropartículas apresentou uma relação linear inversamente proporcional à razão entre sua área superficial específica e o quadrado do raio. Desta forma, demonstrou-se que o controle da liberação pode ser efetuado pelo controle da morfologia das micropartículas.

Os dados experimentais sugerem que o diclofenaco encontra-se associado às micropartículas de P(HB-HV) e P(HB-HV)/PCL na forma de aglomerados nanométricos, enquanto que a indometacina é solubilizada pela matriz polimérica.

7. REFERÊNCIAS

ANDRIANOV, A. K.; PAYNE, L. G. Polymeric carriers for oral uptake of microparticulates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 34, p. 155–170, 1998.

ANDRONIS, V.; ZOGRAFI, G. Crystal nucleation and growth of indomethacin polymorphs from the amorphous state. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 271, p. 236-248, 2000.

ARCHONTAKI, H. A. Kinetic-study on the degradation of indomethacin in alkaline aqueous-solutions by derivative ultraviolet spectrophotometry. **Analyst**, v. 120, n. 10, p. 2627-2634, 1995.

ATKINS, T. W. Fabrication of microcapsules using poly(ethylene adipate) and a blend of poly(ethylene adipate) with poly(hydroxybutyratehydroxyvalerate): incorporation and release of bovine serum albumin. **Biomaterials**, v.18, p. 173-180, 1997.

AULTON, M. Dissolution and Solubility. In: _____(Ed). **Pharmaceutics: the science of dosage form design**. 2. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002. cap. 2, p. 15-32.

AVELLA, M.; MARTUSCELLI, E.; RAIMO, M. Properties of blends and composites based on poly(3-hydroxy)butyrate (PHB) and poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHBV) copolymers. **Journal of Materials Science**, v. 35, p. 523–545, 2000.

AYALASOMAYAJULA, S. P.; KOMPELLA, U. B. Subconjunctivally administered celecoxib-PLGA microparticles sustain retinal drug levels and alleviate diabetes-induced oxidative stress in a rat model. **European Journal of Pharmacology**, v. 511, p. 191– 198, 2005.

BARRAL II, E. M.; JOHNSON, J. F. Differential Scanning Calorimetry Theory and Applications. In: SLADE JR., PHILIP E.; JENKINS, LLOYD T. (Eds). **Techniques and Methods of Polymer Evaluation: thermal characterization techniques**. New York: Marcel Dekker, 1970. v. 2, cap. 1, p. 1-39.

BECK, R. C. R.; POHLMANN A. R.; GUTERRES S. S. Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, n. 5, p. 499-512, 2004.

BERTOLDO, M.; COLTELLI, M. B. ; MIRAGLIA, L. ; NARDUCCI, P.; BRONCO; S. Surface energy inducing asymmetric phase distribution in films of a binary polymeric blend. **Polymer**, v. 46, p. 11311–11321, 2005.

BRANNON-PEPPAS, L. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 116, p. 1-9, 1995.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 65, p. 127–161, 1998.

BROADHEAD, J.; ROUAN, S. K. E.; RHODES, C. T. The spray drying of pharmaceuticals. **Development and Industrial Pharmacy**, v. 18, n. 11-12, p. 1169-1206, 1992.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 2, p. 309-319, 1938.

CALANDRELLI, L.; IMMIRZI, B.; MALINCONICO, M.; VOLPE, M. G.; OLIVA, A.; DELLA RAGIONE, F. Preparation and characterisation of composites based on biodegradable polymers for “in vivo” application. **Polymer**, v. 41, p. 8027-8033, 2000.

CHEE, M. J. K.; ISMAIL, J.; KUMMERLÖWE, C.; KAMMER, H. W. Study on miscibility of PEO and PCL in blends with PHB by solution viscometry. **Polymer**, v. 43, p. 1235-1239, 2002.

CHEN, J.; DAVIS, S. S. The release of diazepam from poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 2, p. 191-201, 2002.

CHEN, Y.; YANG, G.; CHEN, Q. Solid-state NMR study on the structure and mobility of the noncrystalline region of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). **Polymer**, v. 43, p. 2095-2099, 2002.

CHEN, C.-C.; CHUEH, J.-Y.; TSENG, H.; HUANG, H.-M.; LEE, S.-Y. Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends. **Biomaterials**, v. 24, p. 1167–1173, 2003.

CHEN, G. -Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, v. 26, p. 6565–6578, 2005.

CHUN, Y. S.; KIM, W. N. Thermal properties of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly(ϵ -caprolactone) blends. **Polymer**, v. 41, p. 2305–2308, 2000.

CLAS, S. D.; DALTON, C. D.; HANCOCK, B. C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 2, n. 8, p. 311-319, 1999.

CONTE, U.; CONTI, B.; GIUNCHEDI, P.; MAGGI, L. Spray dried polylactide microsphere preparation: influence of the technological parameters. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 20, n. 3, p. 235-258, 1994.

COPERSUCAR. Cooperativa de Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo Ltda. (São Paulo); IPT. Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S/A (São Paulo). Oliveira, M. S.; Matsubara, R. M. S.; Netto, C. L. B.; Craveiro, A. M.; Maiorano, A. E.; Pinto, A. G.; Pradella, J. G. C. Processo para produzir polihidroxialcanoatos a partir de açúcares extraídas da cana de açúcar. BR n. PI9103116-8, 16 jul. 1991.

CORRIGAN, O. I.; HOLOHAN, E. M.; REILLY, M. R. Physicochemical properties of indomethacin and related compounds co-spray dried with polyvinylpyrrolidone. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 11, n. 2 – 3, p. 677-695, 1985.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123–133, 2001.

CRANE, M.; HURLEY, N.J.; CRANE, L.; HEALY, A. M.; CORRIGAN, O. I.; GALLAGHER, K. M.; MCCARTHY, L. G. Simulation of the USP drug delivery problem using CFD: experimental, numerical and mathematical aspects. **Simulation Modelling Practice and Theory**, v. 12, p. 147–158, 2004.

CROWDER, T. M.; HICKEY, A. J.; LOUEY, M. D.; ORR, N. Instrumental Analysis. In:_____. **A Guide to Pharmaceutical Particulate Science**. USA: Interpharm/CRC, 2003. Disponível em: <<http://www.pharmaceuticalnetbase.com/>>. Acesso em: 10 nov. 2005, 16:30:00.

CRUZ, L. **Estudo físico-químico comparativo de sistemas nanoestruturados contendo indometacina ou seu éster etílico e avaliação *in vivo* da atividade antiedematogênica.** 2005. 109 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

DHANARAJU, M. D.; GOPINATH, D.; AHMED, M. R.; JAYAKUMAR, R.; VAMSADHARA, C. Characterization of polymeric poly(*epsilon*-caprolactone) injectable implant delivery system for the controlled delivery of contraceptive steroids. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 76A, n. 1, p. 63-72, 2006.

EDLUND, U.; ALBERTSSON, A.-C. Polyesters based on diacid monomers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 585–609, 2003.

EMBLETON, J. K.; TIGHE, B. J. Polymers for biodegradable medical devices. X. Microencapsulation studies: control of poly-hydroxybutirate-hydroxyvalerate microcapsules porosity via caprolactone blending. **Journal of Microencapsulation**, v. 10, n. 3, p. 341-352, 1993.

EMBLETON, J. K.; TIGHE, B. J. Polymers for biodegradable medical devices. XI. Microencapsulation studies: characterization of hydrocortisone-loaded poly-hydroxybutirate-hydroxyvalerate microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 6, p. 737-752, 2002.

FREIBERG, S.; ZHU, X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, n. 1-2, p. 1-18, 2004.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Physicochemical Principles of Pharmacy.** 3. ed. London: Macmillan Press, 1998.

FORD, J. L.; TIMMINS, P. **Pharmaceutical Thermal Analysis.** Chichester: Ellis Horwood, 1989.

GEORGE, S. C.; THOMAS, S. Transport phenomena through polymeric systems. **Progress in Polymer Science**, v. 26, p. 985-1017, 2001.

GIORDANO, F.; ROSSI, A.; PASQUALI, I.; BETTINI, R.; FRIGO, E.; GAZZANIGA, A.; SANGALLI, M. E.; MILEO, V.; CATINELLA, S. Thermal degradation and melting point determination of diclofenac. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 73, p. 509-518, 2003.

GIOVANELLI, L.; BELLOMI, S.; PATTARINO, F.; ALBERTINI, B. Characterization of nifedipine microparticles prepared by hot air coating technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 293, p. 225–234, 2005.

GOGOLEWSKI, S.; JOVANOVIĆ, M.; PERREN, S. M.; DILLON, J. G.; HUGHES, M. K. Tissue response and *in vivo* degradation of selected polyhydroxyacids: polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/VA). **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 27, p. 1135-1148, 1993.

GOMES, M.E.; GODINHO, J.S.; TCHALAMOV, D.; CUNHA, A.M.; REIS, R.L. Alternative tissue engineering scaffolds based on starch: processing methodologies, morphology, degradation and mechanical properties. **Materials Science and Engineering C**, v. 20, p. 19–26, 2002.

GURSEL I, HASIRCI V. Properties and drug-release behavior of poly(3-hydroxybutyric acid) and various poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) copolymer microcapsules. **Journal of Microencapsulation**, v. 12, n. 2, p. 185-193, 1995.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRAT, G.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.-P.H. Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing non-steroidal anti-inflammatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 10, p. 1-3, 1995.

GUTERRES, S. S.; WEISS, V.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. **Drug Delivery**, v. 7, p. 195-199, 2000.

GUTERRES, S. S.; MÜLLER, C. R.; MICHALOWSKI, C. B.; POHLMANN, A. R.; DALLA COSTA, T. Gastro-intestinal tolerance following oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. **STP Pharma Sciences**, v. 11, n. 3, p. 229-233, 2001.

HA, C.-S.; CHO, W.-J. Miscibility, properties, and biodegradability of microbial polyester containing blends. **Progress in Polymer Science**, v. 27, p. 759-809, 2002.

HAINES, P. J. **Thermal Methods of Analysis**: principles, application and problems. London: Chapman and Hall, 1995.

HAMMAD, M. A.; MÜLLER, B. W. Factors affecting solubility and stability of indomethacin in mixed micelles. **Pharmazie**, v. 53, n. 11, p. 790-794, 1998.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication: theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 1145-1149, 1963.

HUATAN, H.; COLLETT, J.H.; ATTWOOD, D.; BOOTH, C. Preparation and characterization of poly(ϵ -caprolactone) polymer blends for the delivery of proteins. **Biomaterials**, v. 16, p. 1297-1303, 1995.

IOOSS, P.; LE RAY, A.-M.; GRIMANDI, G.; DACULSI, G.; MERLE, C. A new injectable bone substitute combining poly(ϵ -caprolactone) microparticles with biphasic calcium phosphate granules. **Biomaterials**, v. 22, p. 2785-2794, 2001.

IWATA, M.; NAKAMURA, Y.; MCGINITY, J. E. In vitro and in vivo release properties of brilliant blue and tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) from poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) multiphase microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, p. 777-792, 1999.

JAIN, R.; SHAH, N. H.; MALICK, A. W.; RHODES, C. T. Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: different preparative approaches. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 8, p. 703-727, 1998.

JAYABALAN, M.; THOMAS, V.; RAJESH, P. N. Polypropylene fumarate/phloroglucinol triglycidyl methacrylate for use as partially biodegradable orthopaedic cement. **Biomaterials**, v. 22, p. 2749-2757, 2001.

JEONG, J.-C.; LEE, J.; CHO, K. Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 92, p. 249– 258, 2003.

JONES, D. S.; DJOKIC, J.; MCCOY, C. P.; GORMAN, S. P. Poly(ϵ -caprolactone) and poly(ϵ -caprolactone)-polyvinylpyrrolidone iodine blends as ureteral biomaterials: characterization of mechanical and surface properties, degradation and resistance to encrustation *in vitro*. **Biomaterials**, v. 23, p. 4449–4458, 2002.

KAWAGUCHI, H. Functional polymer microspheres. **Progress in Polymer Science**, v. 25, n. 8, p. 1171-1210, 2000.

KAWASHIMA, Y.; IWAMOTO, T.; NIWA, T.; TAKEUCHI, H.; HINO, T. Uniform and improved bioavailability of newly developed rapid and sustained release suspensions of ibuprofen microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 89, p. 9-17, 1993.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 607-619, 2005.

KIM, C.- J. **Controlled Release Dosage Form Design**. Lancaster: Technomic, 2000.

KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanism of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, p. 25-35, 1983.

KÖSE, G. T.; KORKUSUZ, F.; KORKUSUZ, P.; PURALI, N.; ÖZKUL, A.; HASIRCI, V. Bone generation on PHBV matrices: an *in vitro* study. **Biomaterials**, v. 24, p. 4999-5007, 2003.

KÖSE, G. T.; KORKUSUZ, F.; ÖZKUL, A.; SOYSAL, Y.; ÖZDEMİR, T.; YILDIZ, C.; HASIRCI, V. Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. **Biomaterials**, v. 26, p. 5187-5197, 2005.

KREUTER, J. Nanoparticle-based drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 16, p. 169-176, 1991.

KUMAGAI, Y.; DOI, Y. Enzymatic degradation and morphologies of binary blends of microbial poly(3-hydroxy butyrate) with poly(*epsilon*-caprolactone), poly(1,4-butylene adipate and poly(vinyl acetate)). **Polymer Degradation and Stability**, v. 36, n. 3, p. 241-248, 1992.

KUNZE, C.; BERND, H. E.; ANDROSCH, R.; NISCHAN, C.; FREIER, T.; KRAMER, S.; KRAMP, B.; SCHMITZ, K.-P. In vitro and in vivo studies on blends of isotactic and atactic poly (3-hydroxybutyrate) for development of a dura substitute material. **Biomaterials**, v. 27, p. 192-201, 2006.

KURKURI, M. D.; AMINABHAVI, T. M. Poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid) sequential interpenetrating network pH-sensitive microspheres for the delivery of diclofenac sodium to the intestine. **Journal of Controlled Release**, v. 96, n. 1, p. 9-20, 2004.

LA CARA, F.; IMMIRZI, B.; IONATA, E.; MAZZELLA, A.; PORTOFINO, S.; ORSELLO, G.; DE PRISCO, P.P. Biodegradation of poly- ϵ -caprolactone/poly-*b*-hydroxybutyrate blend. **Polymer Degradation and Stability**, v. 79, p. 37-43, 2003.

LAMPRECHT, A.; YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Design of pH-sensitive microspheres for the colonic delivery of the immunosuppressive drug tacrolimus. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 37-43, 2004.

LE RAY, A. -M.; CHIFFOLEAU, S.; IOOSS, P.; GRIMANDI, G.; GOUYETTE, A.; DACULSI, G.; MERLE, C. Vancomycin encapsulation in biodegradable poly(ϵ -caprolactone) microparticles for bone implantation: influence of the formulation process on size, drug loading, *in vitro* release and cytocompatibility. **Biomaterials**, v. 24, p. 443-449, 2003.

LI, H.; CHANG, J. Preparation, characterization and *in vitro* release of gentamicin from PHBV/wollastonite composite microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 107, p. 463-473, 2005.

LI, Y.; JIANG, H. L.; ZHU, K. J.; LIU, J. H.; HAO, Y. L. Preparation, characterization and nasal delivery of α -cobrotoxin-loaded poly(lactide-co-glycolide)/polyanhydride microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 108, p. 10-20, 2005a.

LI, Y.; ZHU, K. J.; ZHANG, J. X.; JIANG, H. L.; LIU, J. H.; HAO, Y. L.; YASUDA, H.; ICHIMARU, A.; YAMAMOTO, K. *In vitro* and *in vivo* studies of cyclosporin A-loaded microspheres based on copolymers of lactide and ϵ -caprolactone: comparison with conventional PLGA microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295, p. 67-76, 2005b.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **S.T.P. Pharma Sciences**, v. 1, n. 4, p. 221-241, 1991.

MAIA, J. L.; SANTANA, M. H. A.; RÉ, M. I. The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 1, p. 1-12, 2004.

MANDAL, T.K.; BOSTANIAN, L.A.; GRAVES, R.A.; CHAPMAN, S.R.; IDODO, T.U. Porous biodegradable microparticles for delivery of pentamidine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 91-96, 2001.

MARTIN, A.; BUSTAMANTE, P.; CHUN, A. H. C. **Physical Pharmacy**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993.

MARTIN, M. A.; MIGUENS, F. C.; RIEUMONT, J.; SANCHEZ, R. Tailoring of the external and internal morphology of poly-3-hydroxy butyrate microparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 17, p. 111–116, 2000.

MARTIN, D. P.; WILLIAMS, S. F. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 97–105, 2003.

MATSUMOTO, T.; ZOGRAFI, G. Physical properties of solid molecular dispersions of indomethacin with poly(vinylpyrrolidone) and poly(vinylpyrrolidone-co-vinylacetate) in relation to indomethacin crystallization. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 11, p. 1722-1728, 1999.

McLELLAN, D. W.; HALLING, P. J. Preparation and chromatographic analysis of poly(3-hydroxybutyrate) hydrolysis products. **Journal of Chromatography**, v. 445, p. 251-257, 1988.

MIGUEL, O.; EGIBURU, J. L.; IRUIN, J. J. Blends of bacterial poly(3-hydroxybutyrate) with synthetic poly(3-hydroxybutyrate) and poly(epichlorohydrin): transport properties of carbon dioxide and water vapour. **Polymer**, v. 42, p. 953-962, 2001.

MODESTI, M.; LORENZETTI, A.; BON, D.; BESCO, S. Thermal Behaviour of Compatibilised polypropylene nanocomposite: effect of processing conditions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, p. 672-680, 2006.

MULLER, C. R.; BASSANI, V. L.; POHLMANN, A. R.; MICHALOWSKI, C. B.; PETROVICK, P. R.; GUTERRES, S. S. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 343-347, 2000.

NORRIS, D. A.; PURI, N.; SINKO, P. J. The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 34, p. 135–154, 1998.

NÚÑEZ, E.; GARCÍA, P.; GEDDE, U. W. Crystallisation behaviour and crystal rearrangement of poly(ethylene oxybenzoate) **Materials Science and Engineering A**, v. 413-414, n. 15, p. 435-441, 2005.

O'BRIEN, M.; McCAULEY, J.; COHEN, E. Indomethacin. In: FLOREY, K. (Ed). **Analytical Profiles of Drug Substances**. New York: Academic Press, 1984. v. 13, p. 211-218.

O'CONNOR, K. M.; CORRIGAN, O. I. Preparation and characterization of a range of diclofenac salts. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 226, p. 163-179, 2001.

O'HARA, T.; DUNNE, A.; BUTLER, J.; DEVANE, J. A review of methods used to compare dissolution profile data. **PSTT**, v. 1, n. 5, 1998.

PADERMSHOKE, A.; KATSUMOTO, Y.; SATO, H.; EKGASIT, S.; NODA, I.; OZAKI, Y. Melting behavior of poly(3-hydroxybutyrate) investigated by two-dimensional infrared correlation spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 61, p. 541-550, 2005.

PANYAM, J.; DALI, M. M.; SAHOO, S. K.; MA, W.; CHAKRAVARTHI, S. S.; AMIDON, G. L.; LEVY, R. J.; LABHASETWAR, V. Polymer degradation and *in vitro* release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 92, p. 173-187, 2003.

PEPPAS, N. A. Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 60, n. 4, p. 110-111, 1985.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, p. 169-172, 1989.

POHLMANN, A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; PESCE DA SILVEIRA, N.; GUTERRES, S. S. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability valuation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 305-312, 2002.

POHLMANN, A. R.; SOARES, L. U.; CRUZ, L.; PESCE DA SILVEIRA, N.; GUTERRES, S.S. Alkaline hydrolysis as a tool to determine the association form of indomethacin in nanocapsules prepared with poly(ϵ -caprolactone). **Current Drug Delivery**, v. 1, p. 103-110, 2004.

POUPAERT, J.; COUVREUR, P. A computationally derived structural model of doxorubicin interacting with oligomeric polyalkylcyanoacrylate in nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 92, p. 19-26, 2003.

QIU, Z. B.; YANG, W. T.; IKEHARA, T.; NISHI, T. Miscibility and crystallization behavior of biodegradable blends of two aliphatic polyesters. Poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly(*epsilon*-caprolactone). **Polymer**, v. 46, n. 25, p. 11814-11819, 2005.

RAFATI, H.; COOMBES, A. G. A.; ADLER, J.; HOLLAND, J.; DAVIS, S. S. Protein-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles for oral administration: formulation, structural and release characteristics. **Journal of Controlled Release**, v. 43, n. 1, p. 89-102, 1997.

RÉ, M. I.; MAIA, J. L. ; DEROBIO, L. I. ; LIONZO, M. I. Z. ; BENVENUTTI, E.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Preparation and characterization of poly(hydroxybutyrate-co-valerate)-poly(ϵ -caprolactone) blended microspheres with controlled porosity. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON BIOENCAPSULATION, 12., 2004, Vitória-Gasteiz. **Proceedings**, 2004. p. 283-286.

REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 137-146, 2003.

REYNOLDS, J. (Ed). **Martindale: the extra pharmacopoeia**. 30. ed. London: Pharmaceutical, 1993.

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

ROBERTS II, L. J.; MORROW, J. D. Analgesic-antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. (Eds). **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10. ed. USA: McGraw-Hill, 2001. cap. 27, p. 687-731.

ROBINSON, J. W. Thermal Analysis. In: _____(Ed). **Undergraduate Instrumental Analysis**. 5. ed. New York: Marcel Dekker, 1995. cap. 14, p 661-687.

ROSCA, I. D.; WATARIB, F.; UO, M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 271-280, 2004.

SALONEN, J.; LAITINEN, L.; KAUKONEN, A. M.; TUURA, J.; BJÖRKQVIST, M.; HEIKKILÄ, T.; VÄHÄ-HEIKKILÄ, K.; HIRVONEN, J.; LEHTO, V.-P. Mesoporous silicon microparticles for oral drug delivery: loading and release of five model drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 108, p. 362- 374, 2005.

SAVENKOVA, L.; GERBERGA, Z.; BIBERS, I.; KALNIN, M. Effect of 3-hydroxy valerate content on some physical and mechanical properties of polyhydroxyalkanoates produced by *Azotobacter chroococcum*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 445-450, 2000.

SENDIL, D.; GURSEL, I.; WISE, D. L.; HASIRCI, V. Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 59, p. 207-217, 1999.

SLARK, A. T. The effect of intermolecular forces on the glass transition of solute-polymer blends. **Polymer**, v. 38, n. 10, p. 2407-2414, 1997.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

STANIFORTH, J. Particle-size analysis. In: AULTON, M. E. (Ed). **Pharmaceutics: the science of dosage form design**. 2. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002. cap. 10, p. 152-165.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 25, p. 1503-1555, 2000.

SUGAWARA, M.; KADOMURA, S.; HE, X.; TAKEKUMA, Y.; KOHRI, N.; MIYAZAKI, K. The use of an *in vitro* dissolution and absorption system to evaluate oral absorption of two weak bases in pH-independent controlled-release formulations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, p. 1-8, 2005.

TAMILVANAN, S.; SA, B. Studies on *in vitro* release behaviour of indomethacin-loaded polystyrene microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 201, p. 187-197, 2000.

TERADA, M.; MARCHESSAULT, R. H. Determination of solubility parameters for poly(3-hydroxyalkanoates). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 207-215, 1999.

THE UNITED States Pharmacopeia. 27. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2004.

THIES, C. A survey of microencapsulation processes. In: BENITA, S. (Ed). **Microencapsulation: methods and industrial applications**. 10. ed. New York: Marcel Dekker, 1996. cap.1, p. 1-19.

TU, J.; BOLLA, S.; BARR, J.; MIEDEMA, J.; LI, X.; JASTI, B. Alginate microparticles prepared by spray-coagulation method: preparation, drug loading and release characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 303, p. 171-181, 2005.

UGWOKE, M. I.; EXAUD, S.; VAN DEN MOOTER, G.; VERBEKE, N.; KINGET, R. Bioavailability of apomorphine following intranasal administration of mucoadhesive drug delivery systems in rabbits. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, p. 213-219, 1999.

VARDE, N. K.; PACK, D. W. Microspheres for controlled release drug delivery. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 4, p. 35-51, 2004.

VILLALOBOS, R.; CORDERO, S.; VIDALES, A. M.; DOMÍNGUEZ, A. *In silico* study on the effects of matrix structure in controlled drug release. **Physica A**, v. 367, p. 305-318, 2006.

VOGELSANGER, N.; FORMOLO, M. C.; PEZZIN, A. P. T.; SCHNEIDER, A. L. S. S.; FURLAN, S. A.; BERNARDO, H. P.; PEZZIN, S. H.; PIRES, A. T. N.; DUEK, E. A. R. Blendas biodegradáveis de poli(3-hidroxibutirato)/poli(ε-caprolactona): obtenção e estudo da miscibilidade. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 359-365, 2003.

VOLOVA, T.; SHISHATSKAYA, E.; SEVASTIANOV, V.; EFREMOV, S.; MOGILNAYA, O. Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 125-133, 2003.

WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 58, p. 1-12, 1990.

WATTS, P. J.; DAVIES, M. C.; MELIA, C. D. Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: an overview of techniques and applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 7, n. 3, p. 235-259, 1990.

WEN, B.; WU, G.; YU, J. A flat polymeric gradient material: preparation, structure and property. **Polymer**, v. 45, p. 3359–3365, 2004.

YANG, L.; ALEXANDRIDIS, P. Physicochemical aspects of drug delivery and release from polymer-based colloids. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 5, p. 132-143, 2000.

YANG, Y. -Y., CHUNG, T. -S., BAI, X. -L., CHAN, W. -K. Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. **Chemical Engineering Science**, v. 55, p. 2223–2236, 2000.

ZAHIRUL, M.; KHAN, I. Dissolution testing for sustained or controlled release oral dosage forms and correlation with in vivo data: challenges and opportunities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 140, p. 131-143, 1996.

ZENG, X. M.; MARTIN, G. P.; MARRIOTT, C. The controlled delivery of drugs to the lung. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 124, p. 149-164, 1995.

ZIMMER, A.; KREUTER, J. Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 61-73, 1995.

8. ANEXOS

ANEXO I



Validação do Método Analítico

A espectrofotometria no ultravioleta foi o método empregado para a quantificação dos fármacos-modelo liberados a partir das micropartículas, bem como para o doseamento das formulações. A validação da metodologia foi realizada segundo as recomendações presentes nos protocolos emitidos pela International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use (ICH, 1994; ICH, 1996). Adicionalmente, foi consultada a RE nº 899/03 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003).

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida. Para validar uma metodologia analítica, cujas finalidades sejam determinar o teor de princípio ativo em produtos farmacêuticos (categoria I) ou o perfil de dissolução do ativo (categoria III), de acordo com a RE nº 899/03 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), são preconizados os testes de especificidade, linearidade, intervalo, repetibilidade, precisão intermediária, limites de detecção e quantificação, exatidão e robustez.

Nesse estudo, foram avaliados os parâmetros linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão, limites de detecção e quantificação. Como a determinação do teor de fármaco foi realizada através da dissolução das micropartículas em clorofórmio e os perfis de liberação foram obtidos em meio tampão fosfato pH 7,4, esses parâmetros foram avaliados na determinação de diclofenaco e de indometacina por espectroscopia no ultravioleta em ambos os meios. As medidas referentes ao diclofenaco foram realizadas no comprimento de onda de 280 nm e 278 nm para o meio tampão fosfato pH 7,4 e para o clorofórmio,

ANVISA. Resolução RE – 899/2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. 2003. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 10 fev. 2004, 09:32:00.

ICH. Harmonized Tripartite Guideline. Text on validation of analytical procedures Q2A. ICH Steering Committee, Suíça, 1994. Disponível em:<<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Acesso em 10 fev. 2004, 11:36:00.

ICH. Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: methodology Q2B. ICH Steering Committee, Suíça, 1996. Disponível em:<<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA418.pdf>>. Acesso em 10 fev. 2004, 11:37:00.

respectivamente. Por sua vez, os comprimentos de onda de 266 nm para o meio tampão pH 7,4 e 264 nm para o clorofórmio foram utilizados nas análises envolvendo indometacina. Para avaliação dos parâmetros repetibilidade, precisão intermediária e exatidão, foram utilizadas as formulações MP-50, DIC-50 e IND-50, pois as mesmas são constituídas de P(HB-HV) e PCL na proporção 1:1 (m/m).

Metodologia

A especificidade dos métodos de quantificação de diclofenaco e indometacina nos meios tampão pH 7,4 e clorofórmio foi verificada pela obtenção dos espectros de varredura na região do ultravioleta de soluções dos fármacos isolados, bem como de soluções de micropartículas MP-50, as quais foram previamente filtradas (0,45 μm). Para avaliação da linearidade em meio tampão fosfato pH 7,4, três curvas de calibração do fármaco foram avaliadas em três dias diferentes. Para tanto, pesou-se exatamente cerca de 0,0100 g do fármaco e dissolveu-se em 10 mL de acetonitrila. A partir desta solução, foram preparadas diluições em tampão nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 mg/L. Estas soluções foram analisadas por espectroscopia no ultravioleta nos comprimentos de onda de 280 nm para o diclofenaco e 266 nm para a indometacina. Da mesma forma, para validação da linearidade em clorofórmio, foram avaliadas três curvas de calibração em três dias. Nesse caso, pesou-se exatamente cerca de 0,0100 g do fármaco e dissolveu-se em 10 mL de clorofórmio. Paralelamente, 0,0100 g de micropartículas MP-50 foram dissolvidas em 10 mL de clorofórmio. A partir da solução de fármaco, foram preparadas diluições em clorofórmio nas concentrações de 5, 7,5, 10, 15 e 20 mg/L. Adicionalmente, alíquotas da solução de micropartículas sem fármaco foram adicionadas a todas as soluções de leitura resultando em uma concentração de 40 mg/L de polímero em cada uma. Estas soluções foram analisadas por espectroscopia no ultravioleta nos comprimentos de onda de 278 nm e 264 nm para diclofenaco e indometacina, respectivamente.

Para a avaliação da repetibilidade do método, suspensões de micropartículas DIC-50 e IND-50 no meio tampão fosfato pH 7,4 e em clorofórmio foram preparadas

em triplicata. A quantidade de micropartículas suspensas foi calculada com base na quantidade teórica de fármaco incorporado, de modo que foram obtidas suspensões de micropartículas em três diferentes concentrações de fármaco, as quais corresponderam a 5, 15 e 25 mg/L para meio tampão fosfato pH 7,4 e 5, 10 e 20 mg/L para meio constituído por clorofórmio. Após 24 h de agitação, as suspensões foram filtradas (0,45 μm) e suas absorvâncias foram determinadas.

Para avaliar a precisão intermediária, foram preparadas três suspensões de DIC-50 e IND-50, em três dias diferentes, de modo que a quantidade de micropartículas nas suspensões correspondesse a 10 mg/L e 15 mg/L de fármaco, no meio tampão fosfato pH 7,4 e em clorofórmio. Essas suspensões foram filtradas (0,45 μm) após 24 h de agitação e analisadas por espectroscopia no ultravioleta.

Os valores de limite de detecção e quantificação foram teoricamente determinados através das equações descritas na RE nº 899/03 da ANVISA (2003). Por sua vez, a exatidão foi avaliada através do método de adição padrão, onde quantidades crescentes do fármaco são adicionadas numa matriz da amostra. Para avaliação desse parâmetro, suspensões de micropartículas DIC-50 e IND-50 no meio tampão fosfato pH 7,4 e em clorofórmio foram preparadas em três triplicatas. Foram obtidas suspensões de micropartículas em tampão pH 7,4 cujas concentrações de diclofenaco e de indometacina corresponderam a exatamente cerca de 8,0 $\mu\text{g/mL}$ e 10,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A cada triplicata foram adicionadas alíquotas crescentes de uma solução-mãe do fármaco em acetonitrila, nas concentrações de 2, 5 e 15 $\mu\text{g/mL}$. Após 24 h de agitação, as suspensões foram filtradas (0,45 μm) e suas absorvâncias foram determinadas. Da mesma maneira, micropartículas DIC-50 e IND-50 cujas concentrações de fármaco corresponderam a exatamente cerca de 8 mg/L e 10 mg/L foram dissolvidas em clorofórmio. A cada triplicata foram adicionadas alíquotas crescentes de uma solução-mãe do fármaco em clorofórmio. As concentrações finais do fármaco adicionado às soluções de leitura contendo a matriz corresponderam a 2, 5 e 10 mg/L. Após 24 h de agitação, as suspensões foram filtradas (0,45 μm) e suas absorvâncias foram determinadas. Nas determinações de precisão e exatidão em tampão fosfato pH 7,4, uma suspensão contendo MP-50 (sem fármaco) foi utilizada como controle.

Resultados da Validação Envolvendo Diclofenaco

Especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003). Esse parâmetro foi verificado por meio da obtenção dos espectros de varredura na região do ultravioleta tanto do diclofenaco isolado quanto de soluções preparadas com micropartículas MP-50 em tampão pH 7,4 (Figura AI-1) e clorofórmio (Figura AI-2), previamente filtradas com filtro de 0,45 μm .

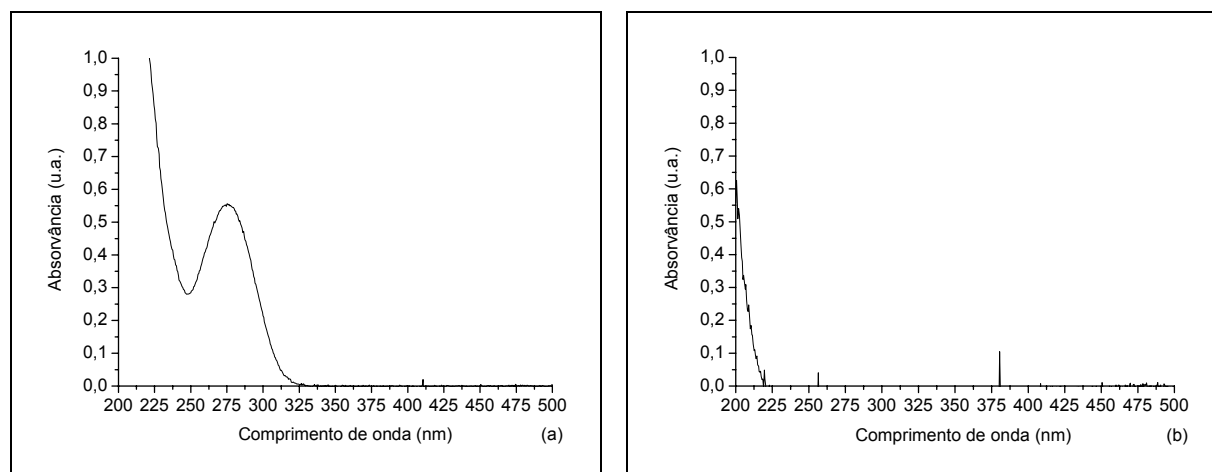


Figura AI-1: Espectros de varredura na região do ultravioleta de soluções em meio tampão pH 7,4, previamente filtradas (0,45 μm), de (a) diclofenaco (forma ácida) e (b) MP-50.

Verificou-se que o grau de interferência da matriz nos comprimentos de onda de leitura do diclofenaco em ambos os meios foi considerado baixo e, portanto, aceitável.

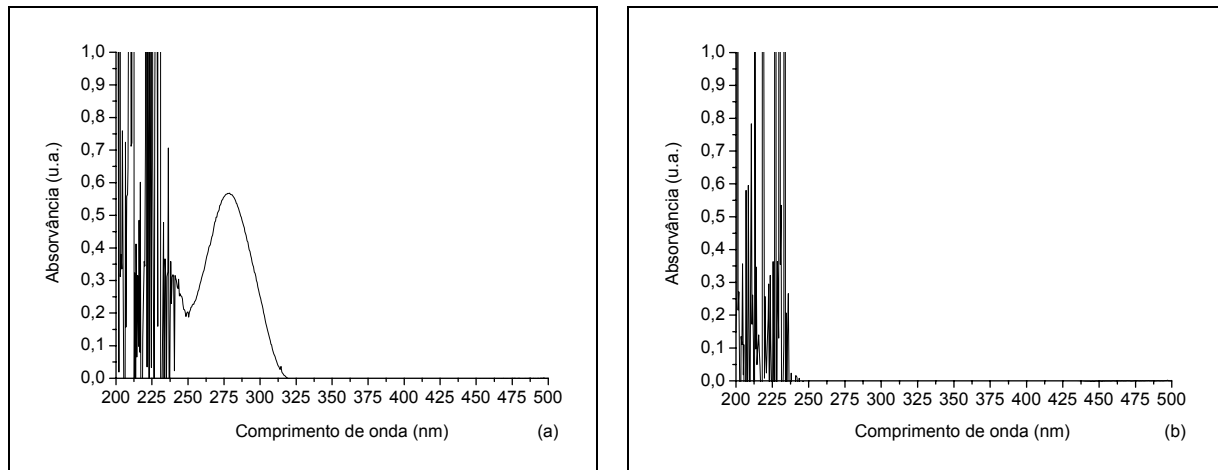


Figura AI-2: Espectros de varredura na região do ultravioleta de soluções em clorofórmio, previamente filtradas ($0,45 \mu\text{m}$), de (a) diclofenaco (forma ácida) e (b) MP-50.

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ICH, 1994).

Desse modo, três curvas de calibração de diclofenaco foram avaliadas em três dias diferentes, em meio tampão pH 7,4. Os resultados foram avaliados com base no coeficiente de correlação, coeficiente angular e interseção da curva, além do valor de F da ANOVA da regressão.

A média das nove curvas padrão de diclofenaco na forma ácida em meio tampão pH 7,4 utilizadas para a validação da metodologia analítica, cujo coeficiente de correlação R foi igual a 0,9993, está representada na Figura AI-3, com a equação da reta correspondente.

Além disso, três curvas de calibração de diclofenaco, em meio constituído de clorofórmio contaminado com micropartículas, foram avaliadas em três dias diferentes. Da mesma forma que para a curva padrão em tampão, os resultados foram avaliados com base no coeficiente de correlação, coeficiente angular e interseção da curva, além do valor de F da ANOVA da regressão.

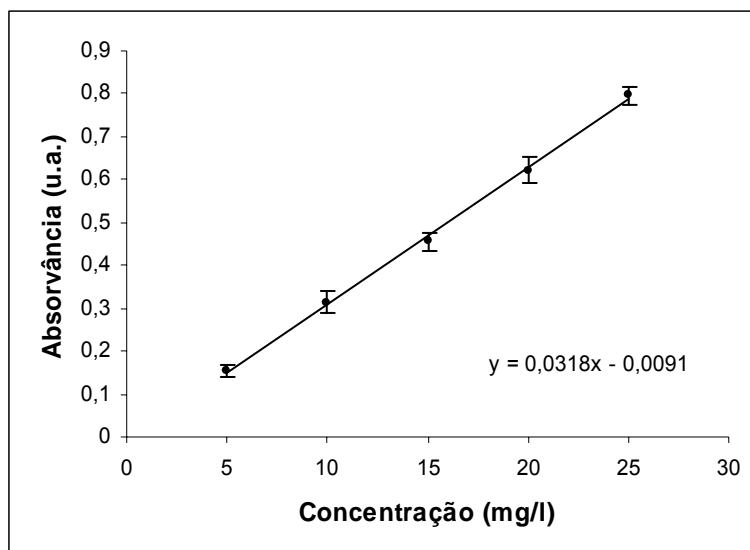


Figura AI-3: Média das nove curvas padrão de diclofenaco na forma ácida em meio tampão pH 7,4, determinadas por espectroscopia no ultravioleta a 280 nm.

A média das nove curvas padrão de diclofenaco na forma ácida em clorofórmio, cujo $R = 0,9998$, está representada na Figura AI-4, com a equação da reta.

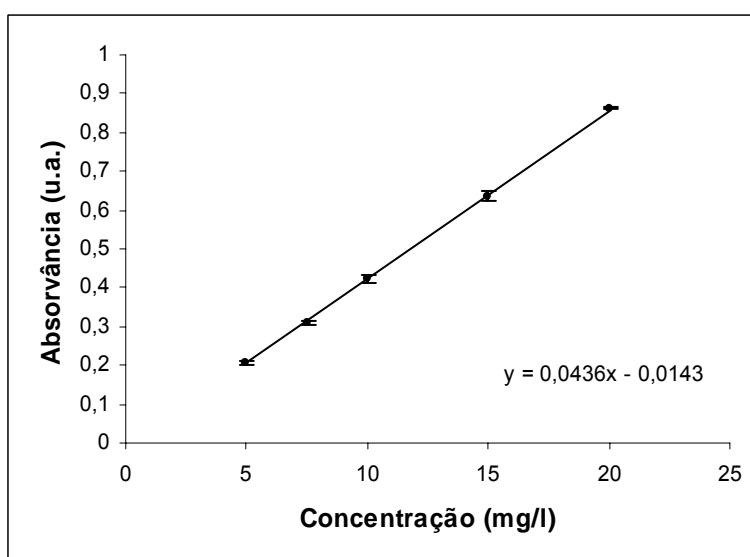


Figura AI-4: Média das nove curvas padrão de diclofenaco na forma ácida, em clorofórmio contaminado com micropartículas MP-50, determinadas por espectroscopia no ultravioleta a 278 nm.

Os resultados da avaliação da linearidade das curvas padrão de diclofenaco em tampão pH 7,4 e clorofórmio através de regressão linear são mostrados na Tabela AI-1.

Tabela AI-1: Parâmetros para avaliação da curva padrão de diclofenaco na forma ácida em meio tampão pH 7,4 e em clorofórmio.

Meio tampão pH 7,4		
<i>Parâmetro</i>	<i>Valor</i>	<i>Limites de confiança</i>
F da regressão	3237,583*	-----
R (coeficiente de correlação)	0,9995	-----
a (coeficiente angular)	0,030241	0,0285493 a 0,031932
b (interseção)	-0,010709	-0,038758 a 0,017339
Meio clorofórmio		
<i>Parâmetro</i>	<i>Valor</i>	<i>Limites de confiança</i>
F da regressão	11752,09*	-----
R (coeficiente de correlação)	0,9999	-----
a (coeficiente angular)	0,043609	0,042329 a 0,044889
b (interseção)	-0,014283	-0,030539 a 0,001973

* Significativo para $\alpha = 0,05$

O valor de F da ANOVA da regressão foi maior que o F tabelado para $\alpha = 0,05$ (10,01), demonstrando que há relação casual entre as variáveis. Do mesmo modo, o coeficiente de correlação calculado foi considerado adequado, pois o critério mínimo aceitável do mesmo, de acordo com a RE nº 899/03, deve ser igual a 0,99. Os limites da interseção permitem excluir a possibilidade de erro sistemático constante. A análise dos resíduos não apresentou tendências (Figura AI-5).

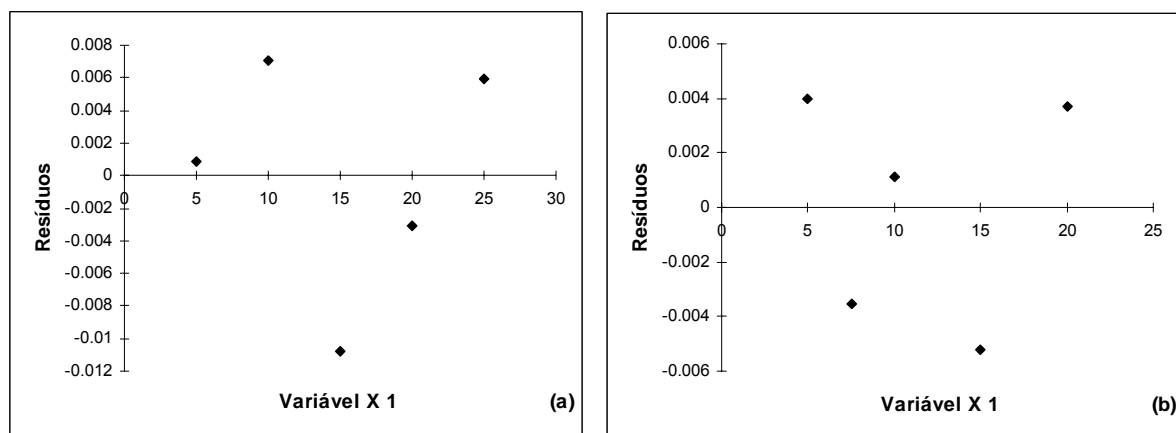


Figura AI-5: Análise dos resíduos da curva padrão de diclofenaco em: a) meio tampão pH 7,4, determinada por espectroscopia no ultravioleta a 280 nm; b) clorofórmio contaminado com MP-50, determinada por espectroscopia no ultravioleta a 278 nm.

A precisão consiste na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A repetibilidade (precisão intra-dia) corresponde à concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. De acordo com a ICH (1996), esta deve ser verificada por, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações (baixa, média e alta) com 3 réplicas cada. A precisão intermediária (precisão inter-dias) é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes. Para sua determinação, recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes (ICH, 1994; ANVISA, 2003).

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (*DPR*), segundo a fórmula (Equação AI-1):

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

(Equação AI-1)

onde *DP* é o desvio padrão e *CMD* é a concentração média determinada.

Para a avaliação da repetibilidade do método, suspensões de micropartículas DIC-50 nos meios tampão pH 7,4 e clorofórmio foram preparadas em triplicata, em três concentrações diferentes. Os valores dos desvios padrão relativos obtidos para as três concentrações podem ser visualizados na Tabela AI-2.

Tabela AI-2: Valores de desvio padrão relativo (*DPR*) das três concentrações de diclofenaco liberado no meio tampão pH 7,4 e em clorofórmio a partir da amostra DIC-50, determinados por espectroscopia no ultravioleta ($n = 3$).

Meio tampão pH 7,4	
<i>Concentração de diclofenaco (mg/L)</i>	<i>DPR (%)</i>
5	4,26
15	2,02
25	3,96
Meio clorofórmio	
<i>Concentração de diclofenaco (mg/L)</i>	<i>DPR (%)</i>
5	4,33
10	2,44
20	2,14

Os valores de *DPR* obtidos indicam que a repetibilidade do método é aceitável, pois é menor que 5 % (ANVISA, 2003).

Para avaliação da precisão intermediária, foram preparadas, em três dias diferentes, três suspensões de micropartículas de concentração teórica igual a 15 mg/L em tampão pH 7,4 e 10 mg/L em clorofórmio. O *DPR* obtido para as nove suspensões em cada meio foi igual a 4,86 % e 4,14 %, respectivamente. Esses resultados demonstram que a precisão intermediária é aceitável, pois é menor que 5 % (ANVISA, 2003).

O limite de quantificação (*LQ*) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Pode ser expresso pela equação para o cálculo teórico (Equação AI-2):

$$LQ = \frac{DP}{IC} \times 10$$

(Equação AI-2)

onde *DP* é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração; *IC* é a inclinação da curva de calibração (ICH, 1994).

O resultado obtido indicou a concentração de 3,4 mg/L como o limite de quantificação teórico para o método que utiliza meio tampão pH 7,4 e 1,4 mg/L para o método que utiliza clorofórmio como meio. Isto indica que a avaliação das amostras com base na curva, onde a menor concentração utilizada correspondeu a 5 mg/L, mostrou-se adequada.

O limite de detecção (*LD*) corresponde à menor quantidade do analito detectável, porém não necessariamente quantificável, presente em uma amostra sob as condições experimentais estabelecidas. Sua estimativa pode ser feita através da Equação AI-3 (ICH, 1994; ANVISA, 2003):

$$LD = \frac{DP}{IC} \times 3$$

(Equação AI-3)

Os valores encontrados para esse parâmetro foram iguais a 1,0 mg/L para o método realizado em meio tampão pH 7,4 e a 0,4 mg/L para o método que emprega clorofórmio.

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). A ICH (1996) estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de

concentração deve ser obedecido. Um dos processos mais empregados para a avaliação desse parâmetro consiste na adição padrão. No método de adição padrão, quantidades conhecidas da substância são adicionadas em nível crescente numa matriz da amostra.

A exatidão deve ser expressa como o percentual de fármaco recuperado no ensaio, em relação ao valor aceito como verdadeiro, que corresponde a 100 %, ou como a diferença entre a média observada e o valor verdadeiro (ICH, 1996). O percentual de fármaco recuperado em cada concentração é apresentado na Tabela AI-3.

Tabela AI-3: Valores de percentual recuperado (*Rec*) e desvio padrão relativo (*DPR*) das três concentrações de diclofenaco determinadas por espectroscopia no ultravioleta nos meios tampão pH 7,4 e clorofórmio a partir da amostra DIC-50 (n = 3).

Tampão pH 7,4		
<i>Concentração teórica (mg/L)</i>	<i>Faixa de concentração recuperada (mg/L)</i>	<i>Percentual recuperado</i>
10,28	10,17 – 10,39	98,9 – 101,1
13,60	13,54 – 13,65	99,6 – 100,4
22,68	22,63 – 22,72	99,8 – 100,2
Clorofórmio		
<i>Concentração teórica (mg/L)</i>	<i>Faixa de concentração recuperada (mg/L)</i>	<i>Percentual recuperado</i>
9,79	9,69 – 9,89	99,0 – 101,0
12,91	12,79 – 13,02	99,1 – 100,9
17,51	17,43 – 17,60	99,5 – 100,5

Resultados da Validação Envolvendo Indometacina

A especificidade foi verificada por meio da obtenção dos espectros de varredura na região do ultravioleta tanto da indometacina isolada quanto de soluções preparadas com micropartículas MP-50 em tampão pH 7,4 (Figura AI-6) e clorofórmio (Figura AI-7), previamente filtradas com filtro de 0,45 µm.

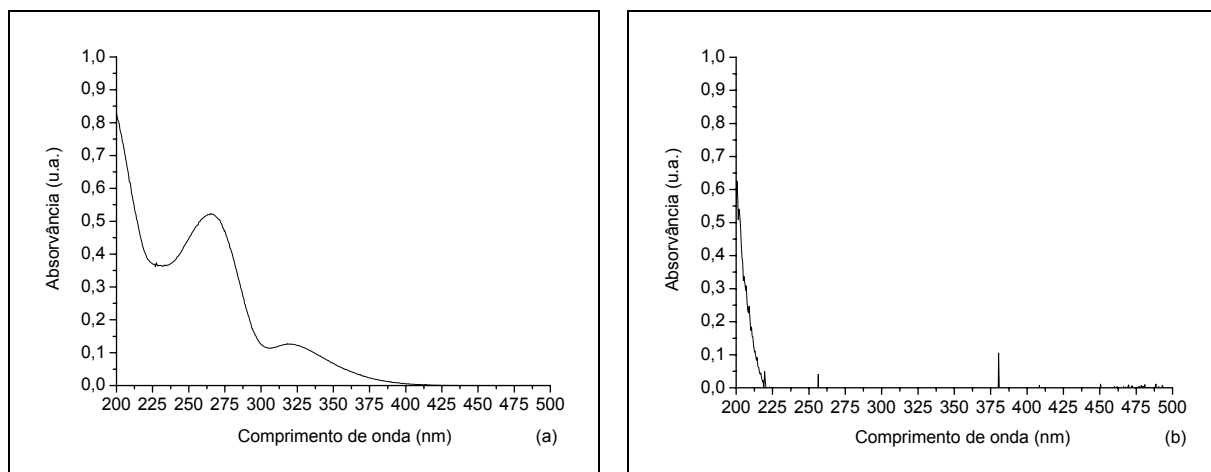


Figura AI-6: Espectros de varredura na região do ultravioleta de soluções em meio tampão pH 7,4, previamente filtradas ($0,45 \mu\text{m}$), de (a) indometacina e (b) MP-50.

Verificou-se que o grau de interferência da matriz nos comprimentos de onda de leitura da indometacina em ambos os meios foi considerado baixo e, portanto, aceitável.

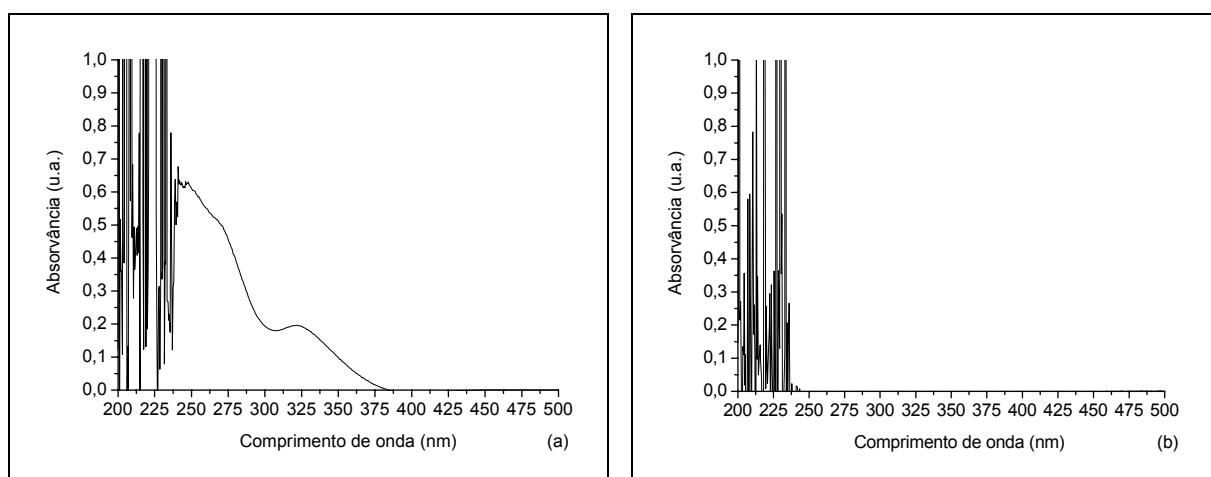


Figura AI-7: Espectros de varredura na região do ultravioleta de soluções em clorofórmio, previamente filtradas ($0,45 \mu\text{m}$), de (a) indometacina e (b) MP-50.

A linearidade da metodologia analítica aplicada para a quantificação de indometacina foi avaliada a partir de três curvas de calibração preparadas em três dias diferentes, nos meios clorofórmio e tampão pH 7,4. Os resultados foram avaliados com base no coeficiente de correlação, coeficiente angular e intersecção da curva, além do valor de F da Análise de Variância (ANOVA). A média das nove curvas padrão do fármaco encontra-se representada na Figura AI-8, com a equação da reta correspondente. O valor de R encontrado foi igual a 0,9999.

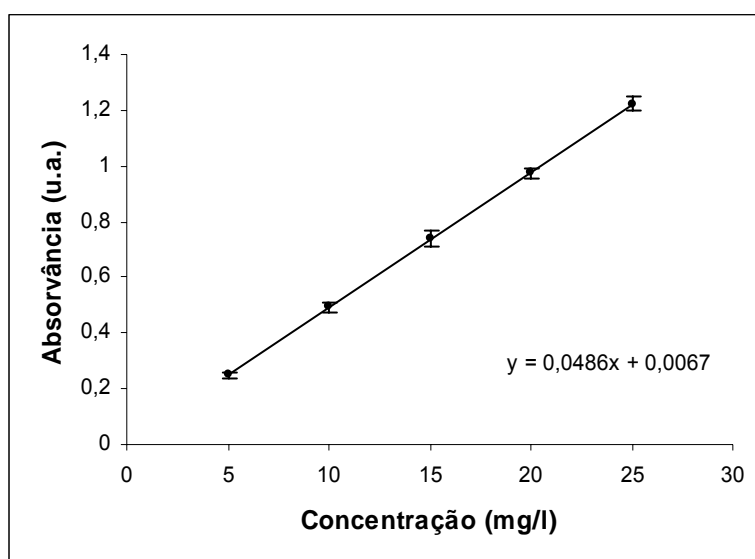


Figura AI-8: Média das nove curvas padrão de indometacina em meio tampão pH 7,4, determinadas por espectroscopia no ultravioleta a 266 nm.

Por sua vez, a média das nove curvas padrão de indometacina em clorofórmio, cujo $R = 0,9998$, está representada na Figura AI-9, com a equação da reta.

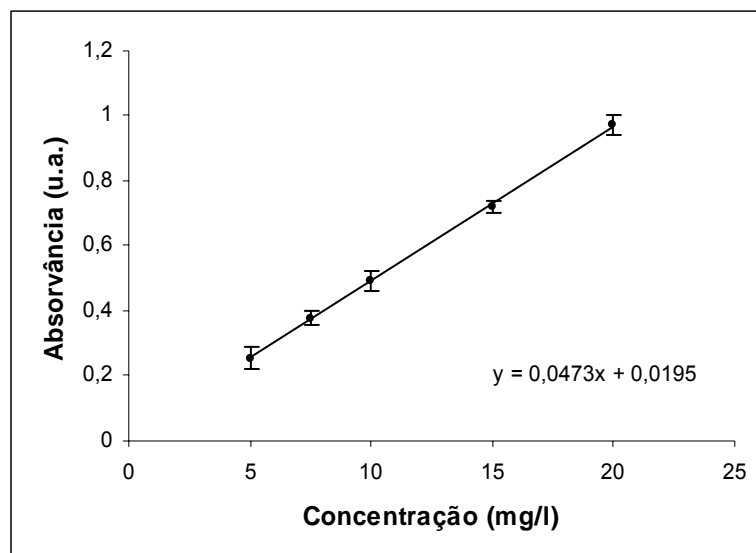


Figura AI-9: Média das nove curvas padrão de indometacina, em clorofórmio contaminado com micropartículas MP-50, determinadas por espectroscopia no ultravioleta a 264 nm.

Os resultados da avaliação da linearidade das curvas padrão de indometacina em tampão pH 7,4 e clorofórmio através de regressão linear são mostrados na Tabela AI-4.

Tabela AI-4: Parâmetros para avaliação da curva padrão de indometacina em meio tampão pH 7,4 e em clorofórmio.

Meio tampão pH 7,4		
<i>Parâmetro</i>	<i>Valor</i>	<i>Limites de confiança</i>
F da regressão	36367,86*	-----
R (coeficiente de correlação)	0,9999	-----
a (coeficiente angular)	0,048598	0,047787 a 0,049409
b (intersecção)	0,006670	-0,006779 a 0,020119
Meio clorofórmio		
<i>Parâmetro</i>	<i>Valor</i>	<i>Limites de confiança</i>
F da regressão	9297,064*	-----
R (coeficiente de correlação)	0,9998	-----
a (coeficiente angular)	0,047330	0,045768 a 0,048893
b (intersecção)	0,019495	-0,000342 a 0,039332

* Significativo para $\alpha = 0,05$

A relação casual entre as variáveis foi demonstrada, pois o valor de F da regressão foi maior que o F tabelado para α de 0,05 (10,01). Da mesma maneira, o coeficiente de correlação calculado foi considerado adequado. Os limites da intersecção permitem excluir a possibilidade de erro sistemático constante. Além disso, a análise dos resíduos não apresentou tendência (Figura AI-10).

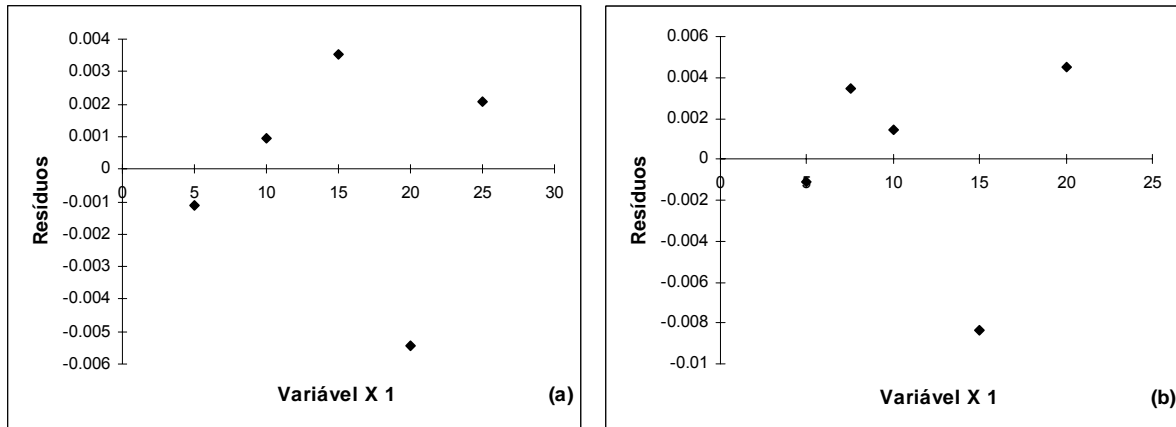


Figura AI-10: Análise dos resíduos da curva padrão de indometacina em: a) meio tampão pH 7,4, determinada por espectroscopia no ultravioleta a 266 nm; b) clorofórmio contaminado com MP-50, determinada por espectroscopia no ultravioleta a 264 nm.

Para a avaliação da repetibilidade do método, suspensões de micropartículas IND-50 foram preparadas em triplicata nos meios tampão pH 7,4 e clorofórmio, em três concentrações diferentes. Os valores dos desvios padrão relativos obtidos para cada concentração podem ser visualizados na Tabela AI-5.

Os valores de *DPR* obtidos para as três concentrações indicam que a repetibilidade do método é aceitável, pois é menor que 5 % (ANVISA, 2003).

Além disso, avaliou-se a precisão intermediária do método de quantificação da indometacina. Para isso, foram preparadas três suspensões de IND-50, em três dias diferentes, nos meios tampão pH 7,4 e clorofórmio. O *DPR* obtido para as nove suspensões em cada meio mostrou-se aceitável, correspondendo a 4,50 % e 3,90 %, respectivamente.

Tabela AI-5: Valores de desvio padrão relativo (*DPR*) das três concentrações de indometacina liberada no meio tampão fosfato pH 7,4 e em clorofórmio a partir da amostra IND-50, determinados por espectroscopia no ultravioleta (n = 3).

Meio tampão pH 7,4	
<i>Concentração de indometacina (mg/L)</i>	<i>DPR (%)</i>
5	4,14
15	2,05
25	2,39
Meio clorofórmio	
<i>Concentração de indometacina (mg/L)</i>	<i>DPR (%)</i>
5	4,22
10	2,26
20	2,67

O limite de quantificação teórico (Equação AI-2) da indometacina, obtido para o método que utiliza meio tampão pH 7,4, correspondeu a 2,2 mg/L. Por sua vez, o resultado desse parâmetro relacionado à utilização de clorofórmio contaminado com micropartículas como meio foi igual a 1,7 mg/L. Isto indica que a avaliação das amostras com base nas curvas onde a menor concentração utilizada correspondeu a 5 mg/L mostrou-se adequada. Além disso, foram determinados os valores de limite de detecção através da Equação AI-3, os quais corresponderam a 0,7 mg/L para o método realizado em meio tampão pH 7,4 e 0,5 mg/L para aquele desenvolvido em clorofórmio.

Para a determinação da exatidão dos métodos empregados nesse estudo, suspensões de micropartículas IND-50 nos meio tampão pH 7,4 e clorofórmio foram preparadas em três triplicatas. A estas suspensões foram adicionadas alíquotas crescentes de uma solução-mãe de indometacina.

A exatidão foi expressa como o percentual de fármaco recuperado no ensaio, em relação ao valor aceito como verdadeiro, que corresponde a 100 %, juntamente com o desvio padrão relativo (*DPR*), conforme pode ser observado na Tabela AI-6.

Tabela AI-6: Valores de percentual recuperado (*Rec*) e desvio padrão relativo (*DPR*) das três concentrações de indometacina determinadas nos meios tampão pH 7,4 e clorofórmio a partir da amostra IND-50, através espectroscopia no ultravioleta (n = 3).

Tampão pH 7,4		
<i>Concentração teórica (mg/L)</i>	<i>Faixa de concentração recuperada (mg/L)</i>	<i>Percentual recuperado (%)</i>
12,42	12,26 – 12,58	98,7 – 101,3
15,42	15,40 – 15,43	99,9 – 100,1
24,47	23,98 – 24,96	98,0 – 102,0
Clorofórmio		
<i>Concentração teórica (mg/L)</i>	<i>Faixa de concentração recuperada (mg/L)</i>	<i>Percentual recuperado (%)</i>
12,60	12,55 – 12,65	99,6 – 100,4
15,81	15,73 – 15,90	99,5 – 100,5
21,60	20,99 – 21,12	99,7 – 100,3

A partir desses resultados, demonstrou-se que as metodologias analíticas empregadas neste trabalho para determinação de diclofenaco e indometacina em tampão fosfato pH 7,4 e em clorofórmio foram adequadas.

ANEXO II

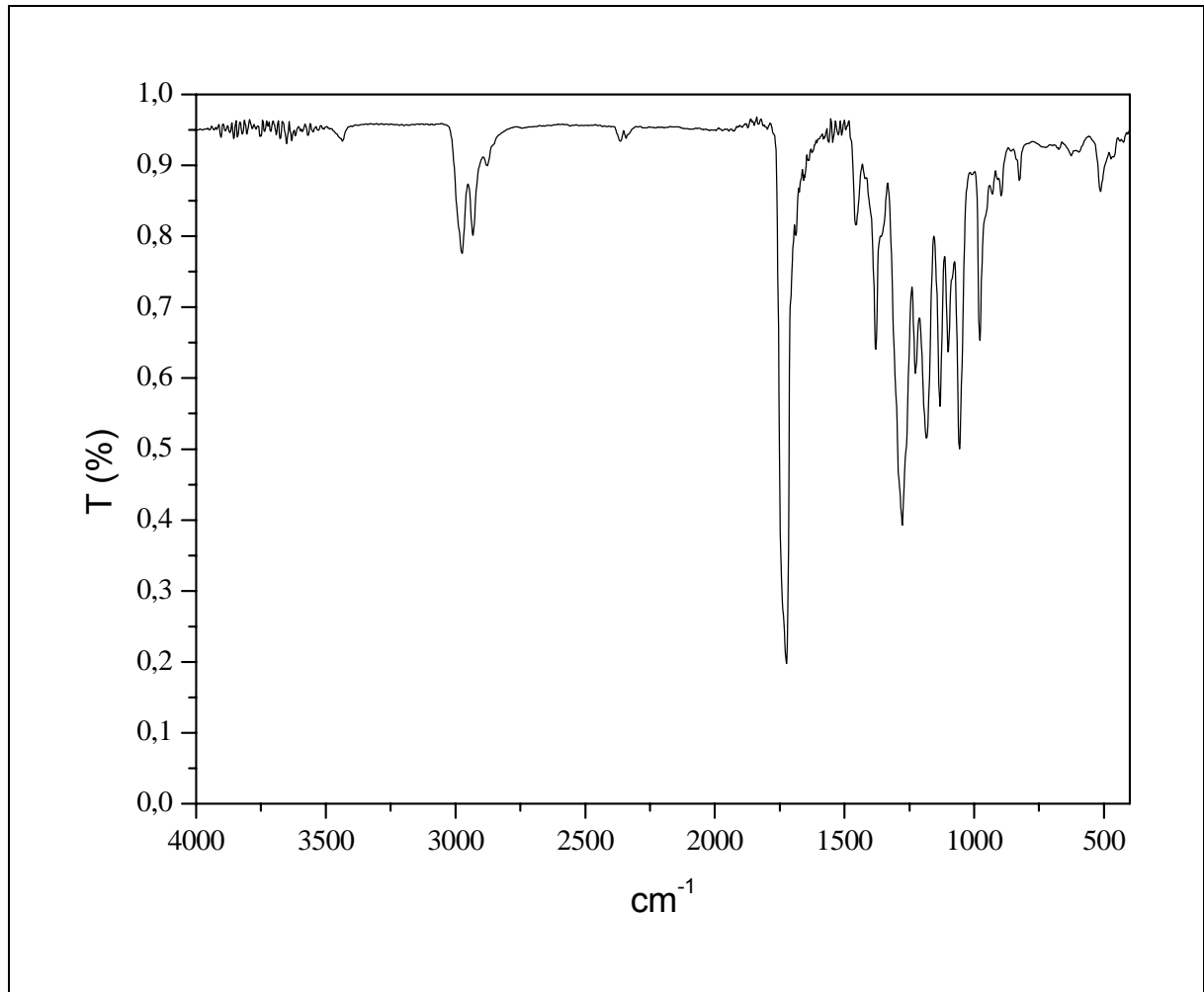


Figura AII.1. Espectro na região do infravermelho de filme de P(HB-HV), preparado por dissolução em clorofórmio e evaporação do mesmo à temperatura ambiente.

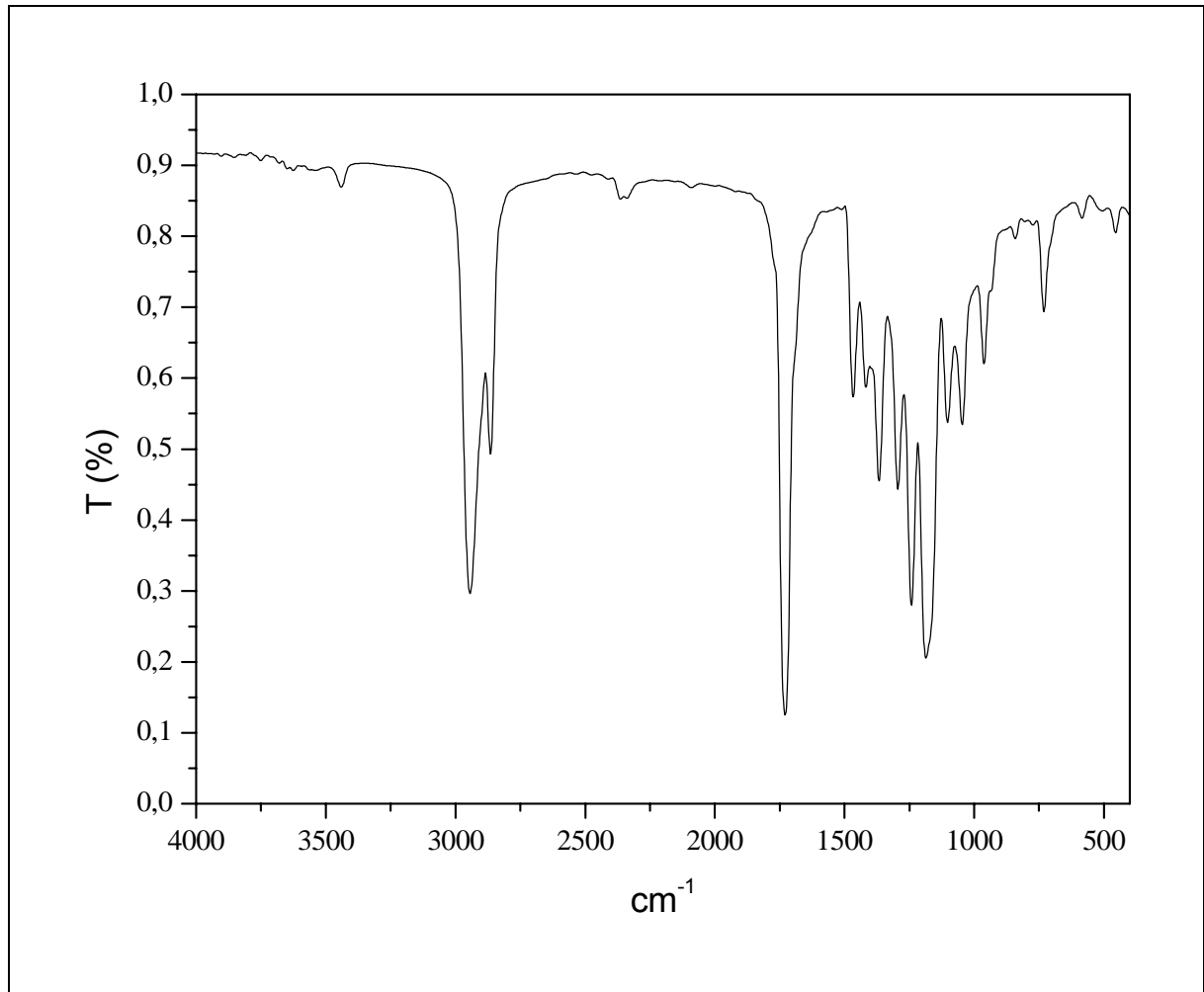


Figura AII.2. Espectro na região do infravermelho de filme de PCL, preparado por dissolução em clorofórmio e evaporação do mesmo à temperatura ambiente.

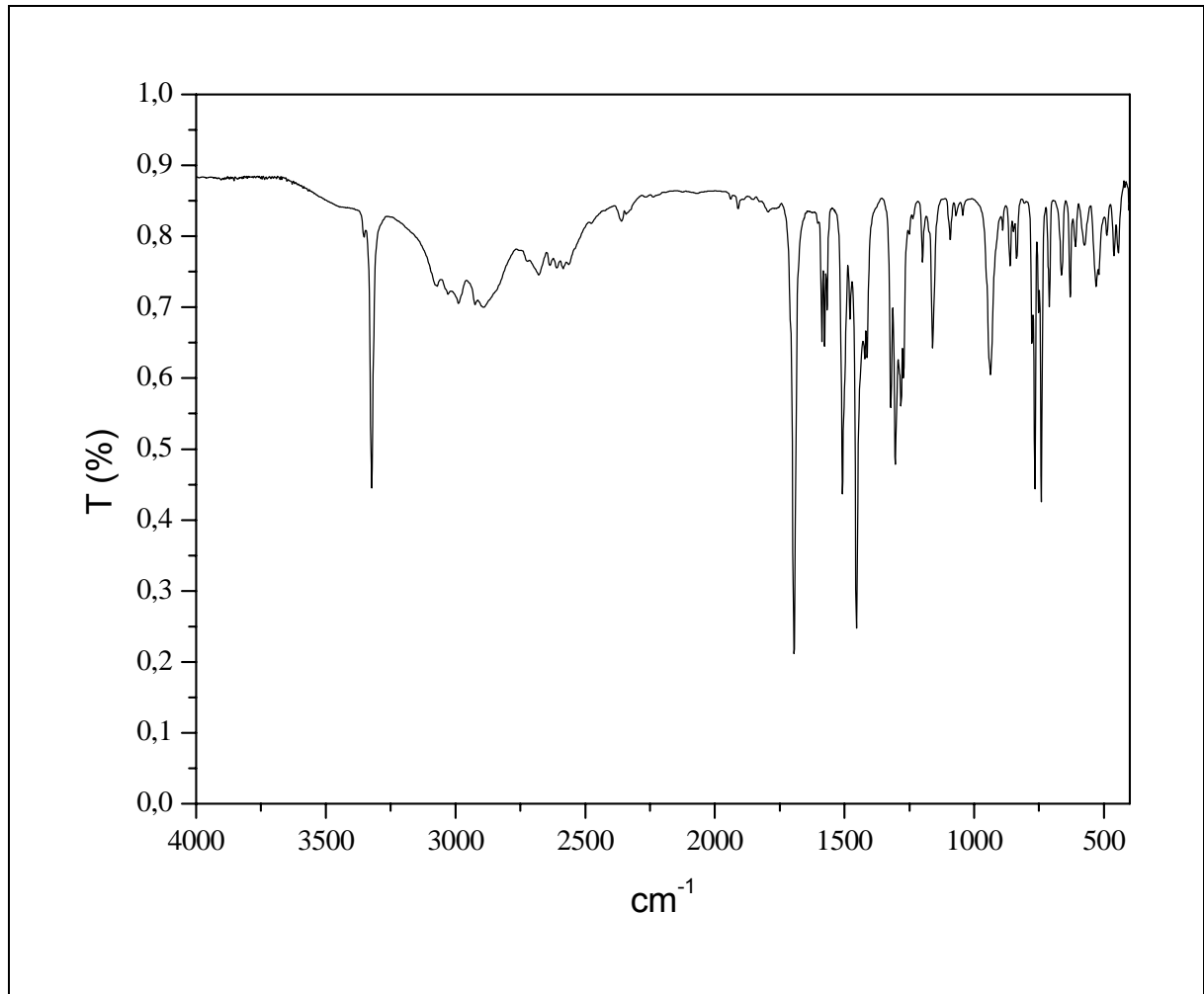


Figura AII.3. Espectro na região do infravermelho de diclofenaco em pastilha de KBr.

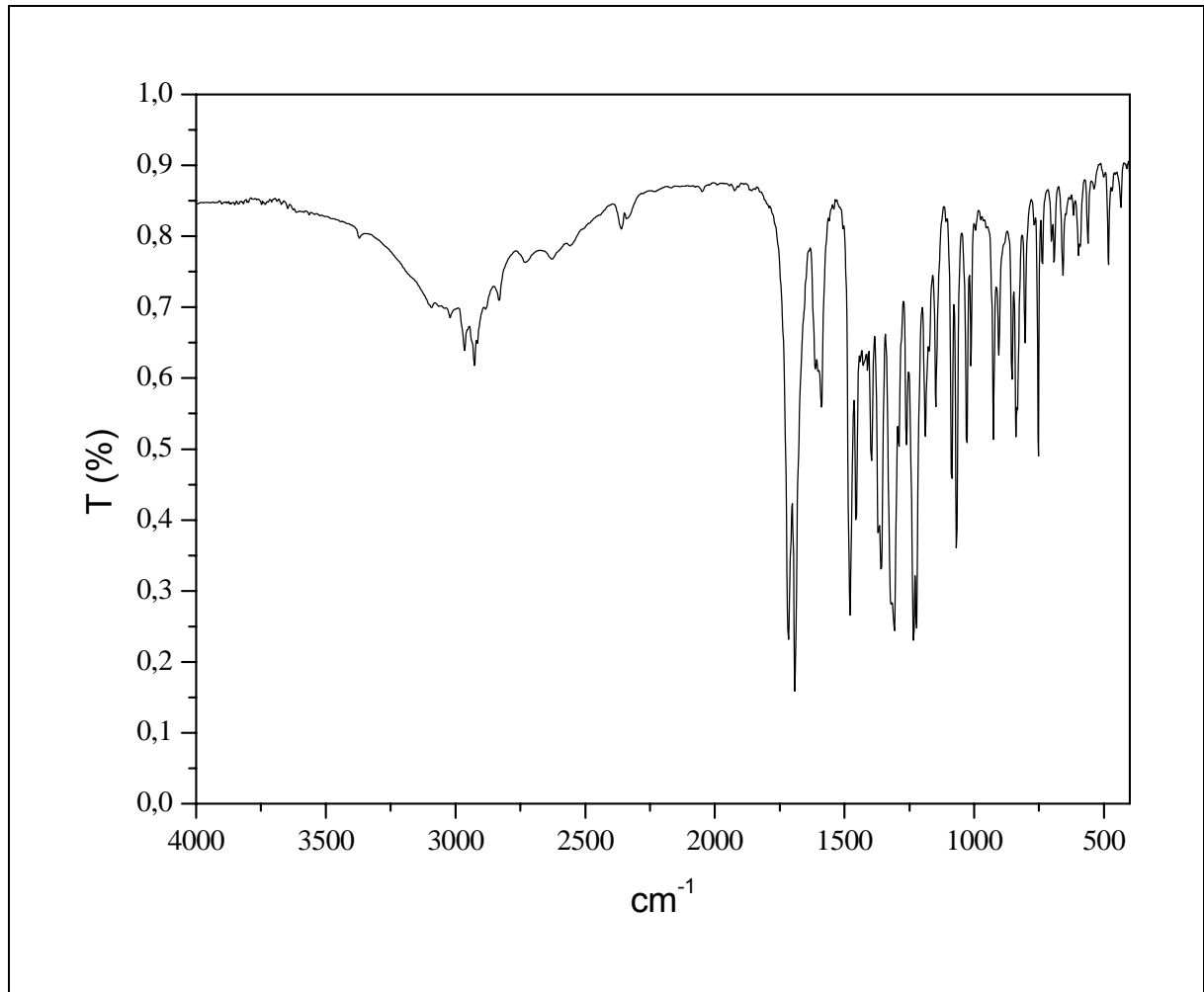


Figura AII.4. Espectro na região do infravermelho de indometacina em pastilha de KBr.

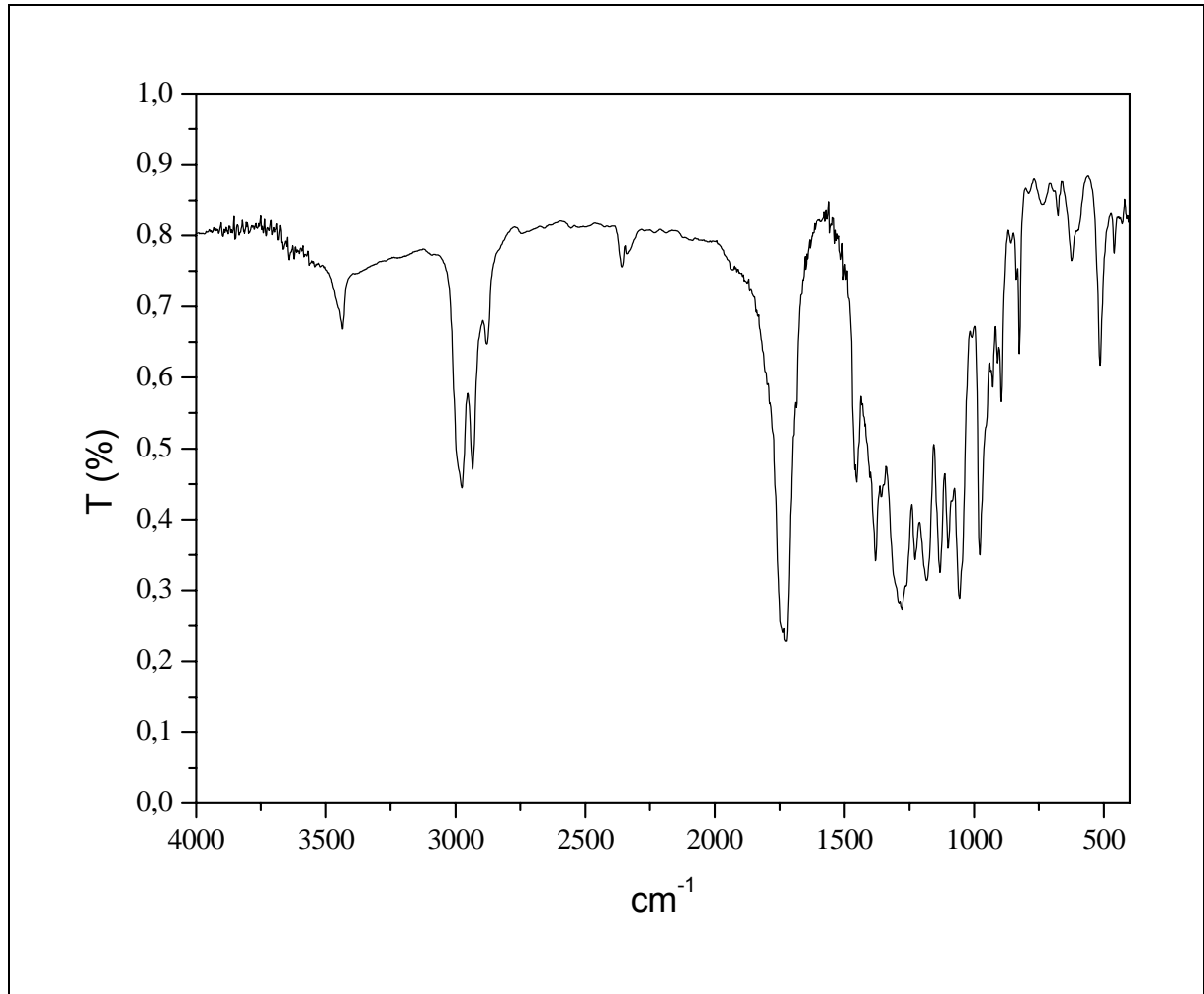


Figura All.5. Espectro na região do infravermelho de micropartículas MP-0 em pastilha de KBr.

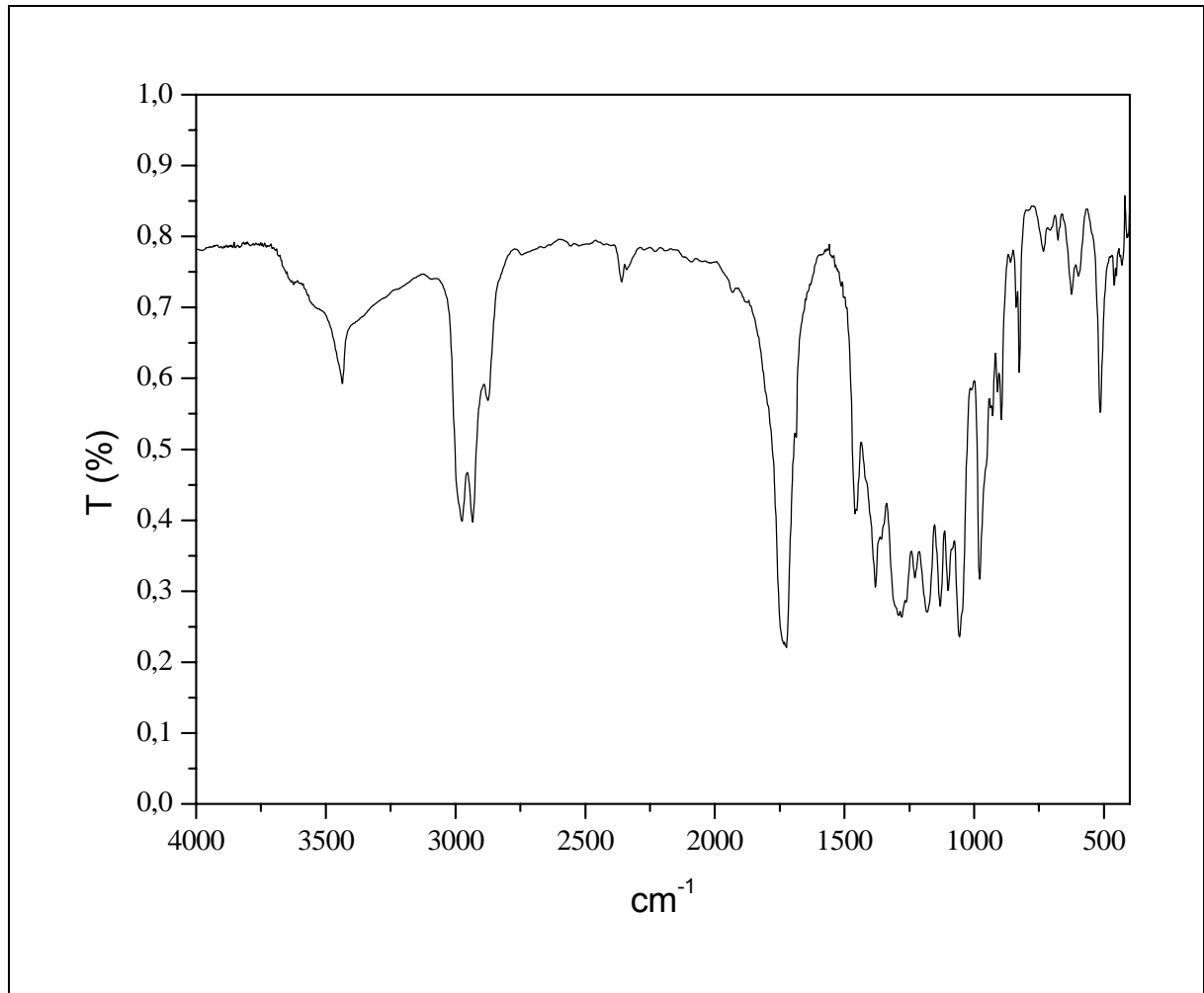


Figura AII.6. Espectro na região do infravermelho de micropartículas MP-10 em pastilha de KBr.

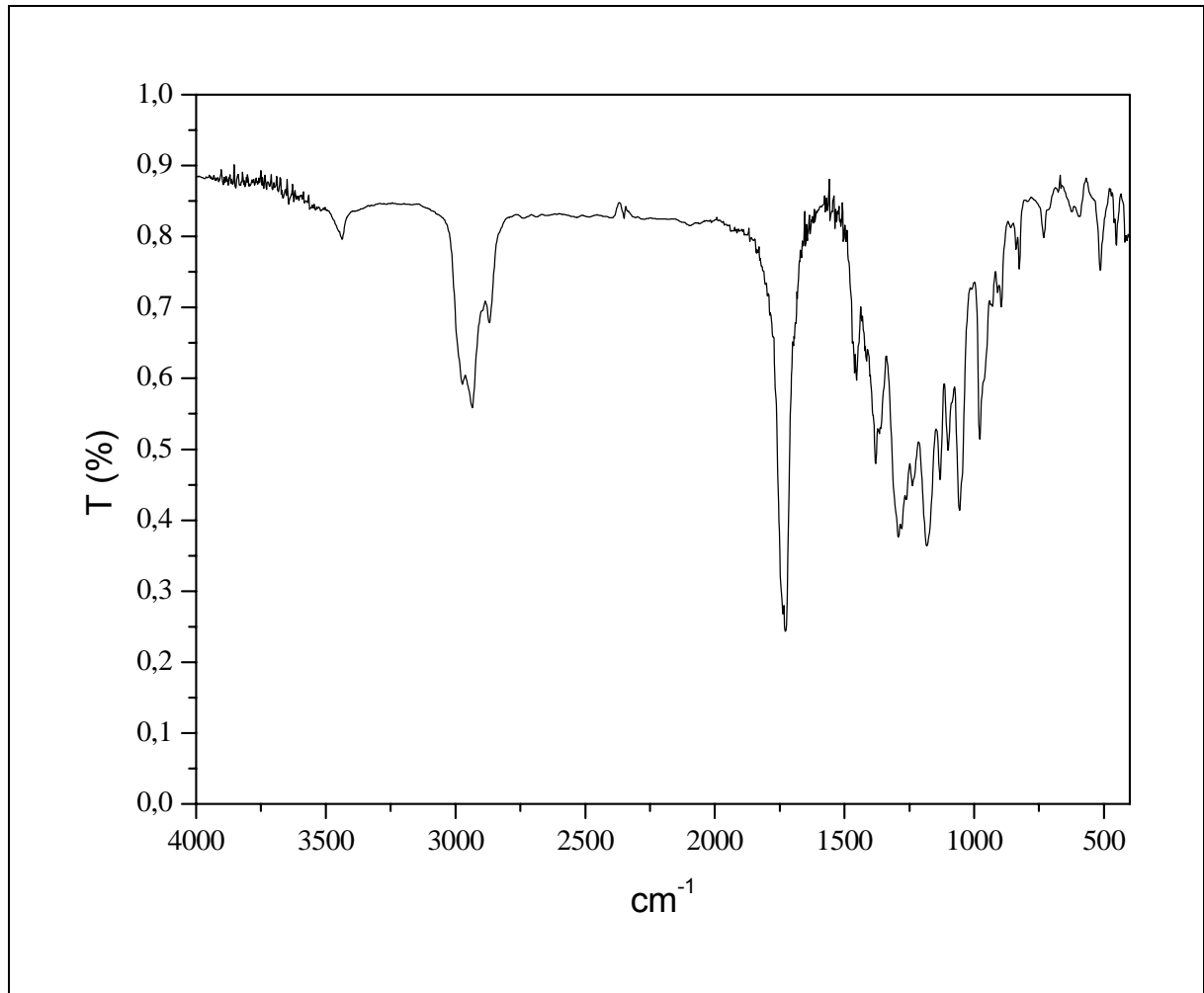


Figura AII.7. Espectro na região do infravermelho de micropartículas MP-30 em pastilha de KBr.

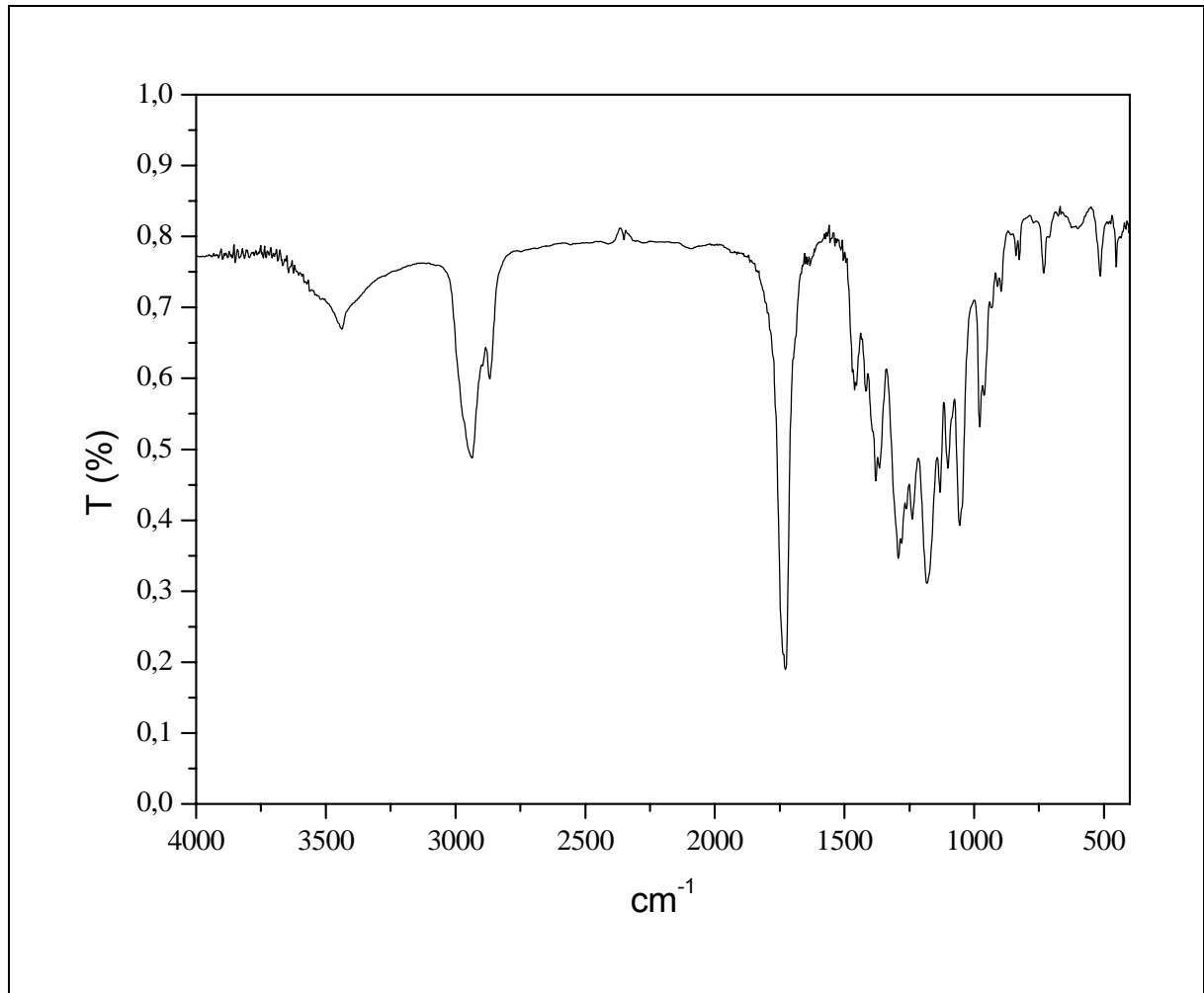


Figura AII.8. Espectro na região do infravermelho de micropartículas MP-50 em pastilha de KBr.

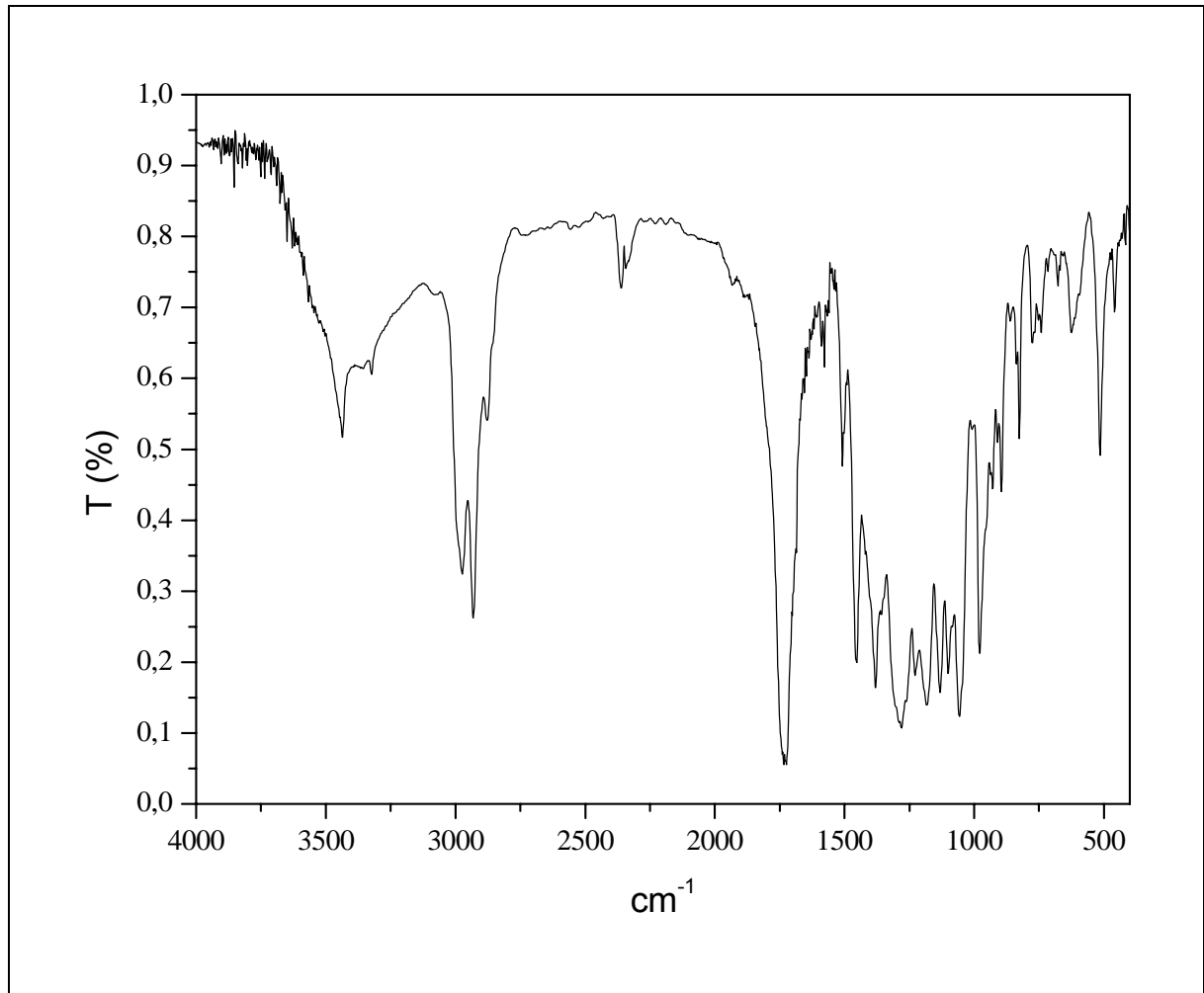


Figura AII.9. Espectro na região do infravermelho de micropartículas DIC-0 em pastilha de KBr.

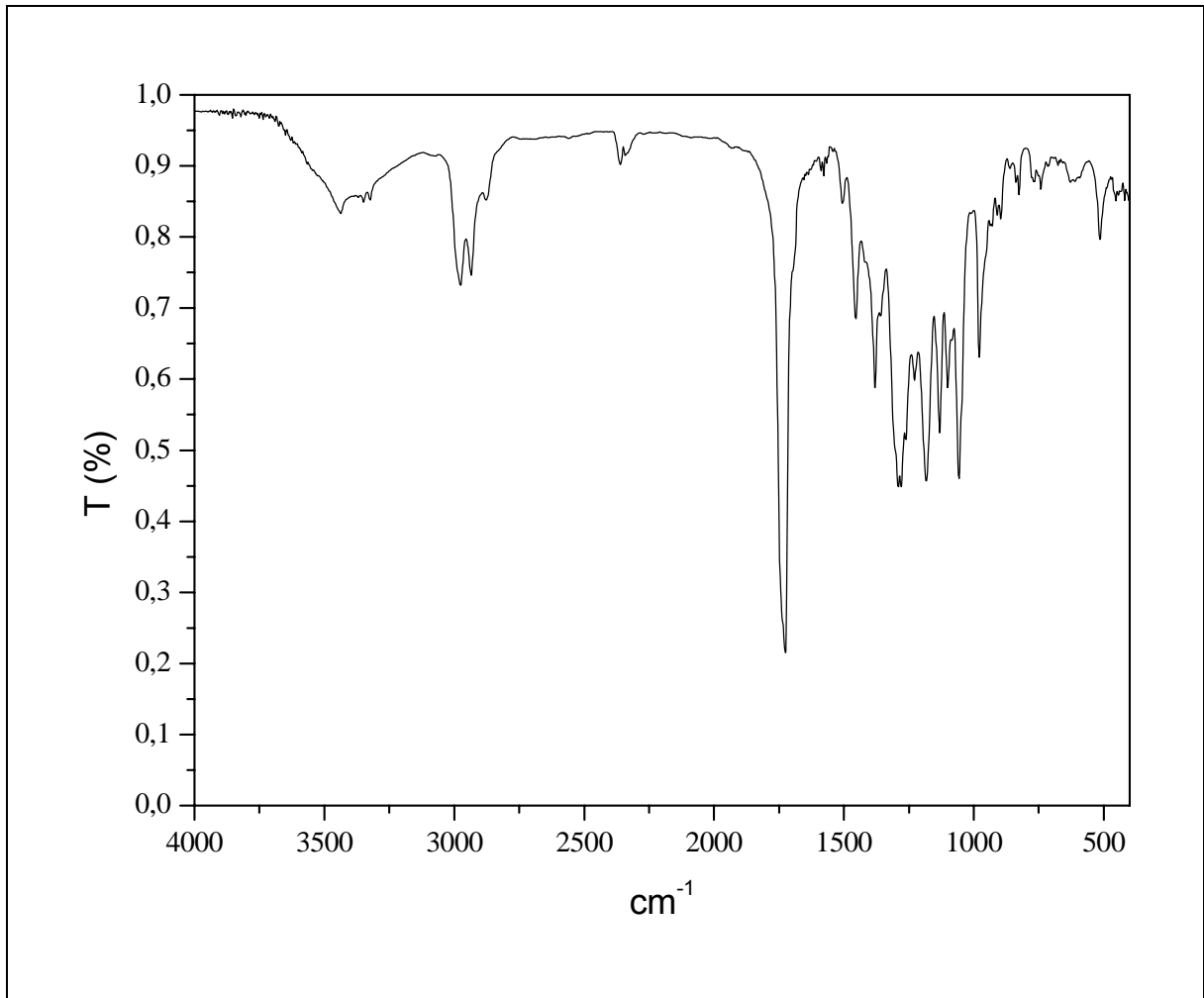


Figura All.10. Espectro na região do infravermelho de micropartículas DIC-10 em pastilha de KBr.

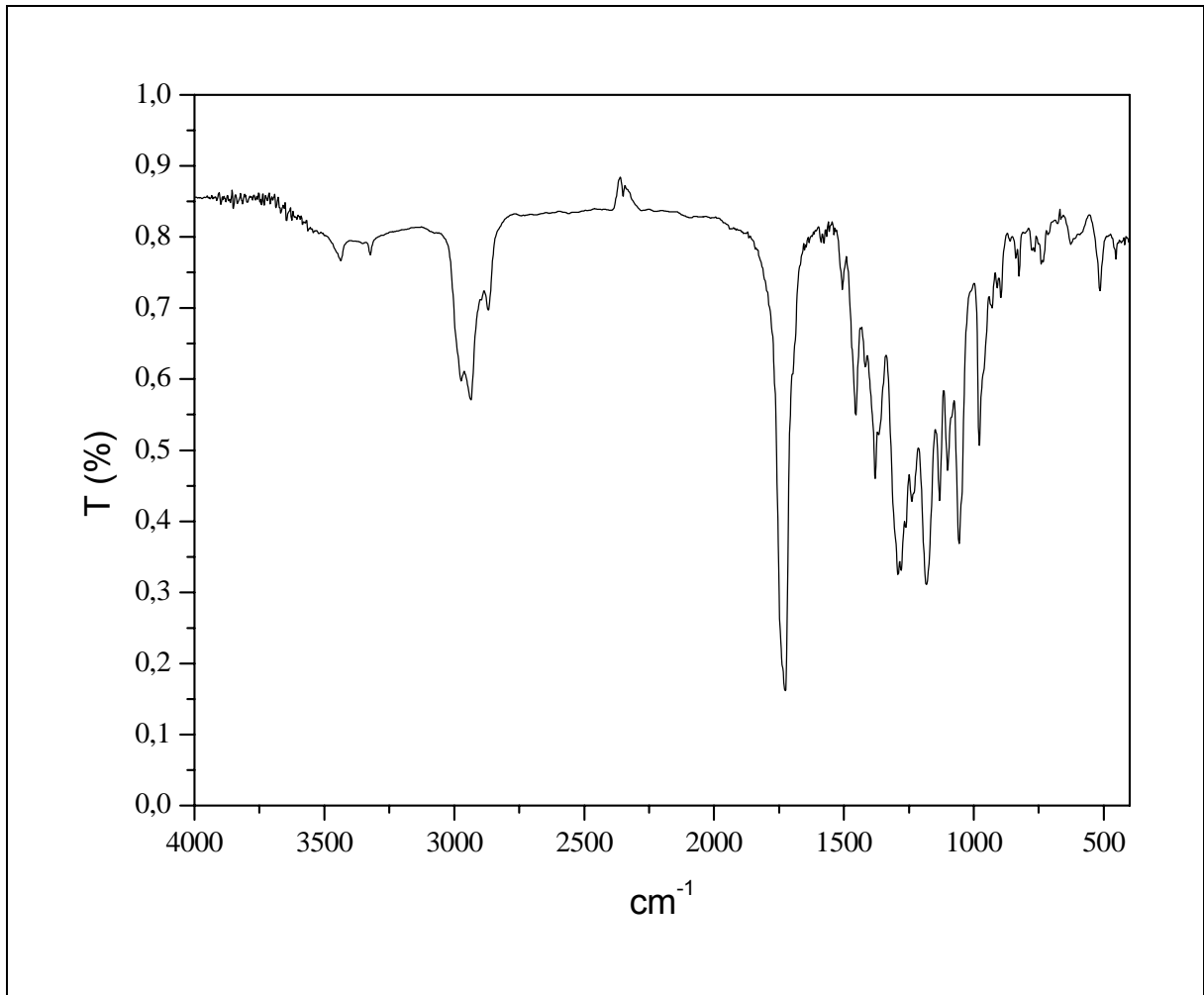


Figura All.11. Espectro na região do infravermelho de micropartículas DIC-30 em pastilha de KBr.

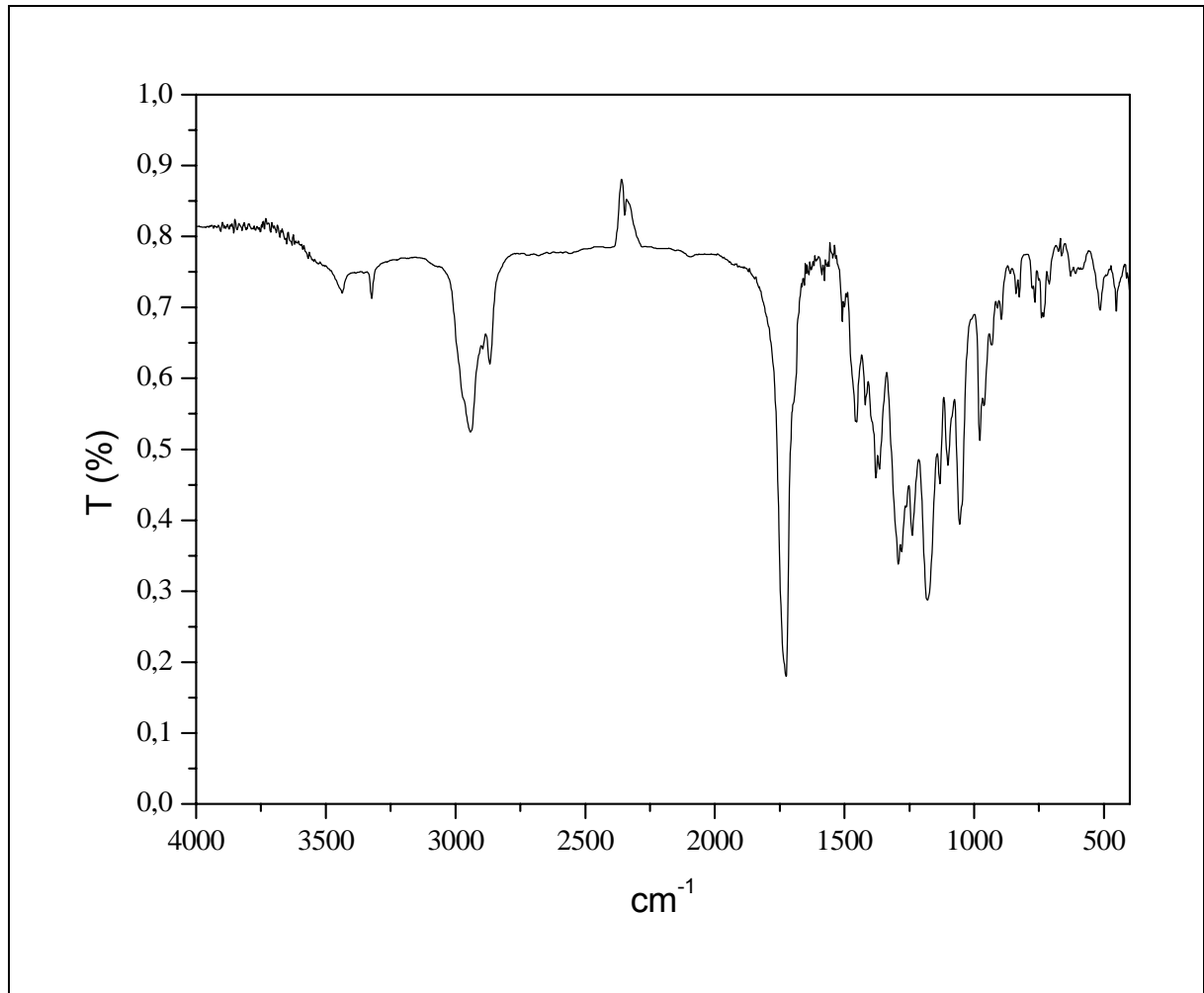


Figura All.12. Espectro na região do infravermelho de micropartículas DIC-50 em pastilha de KBr.

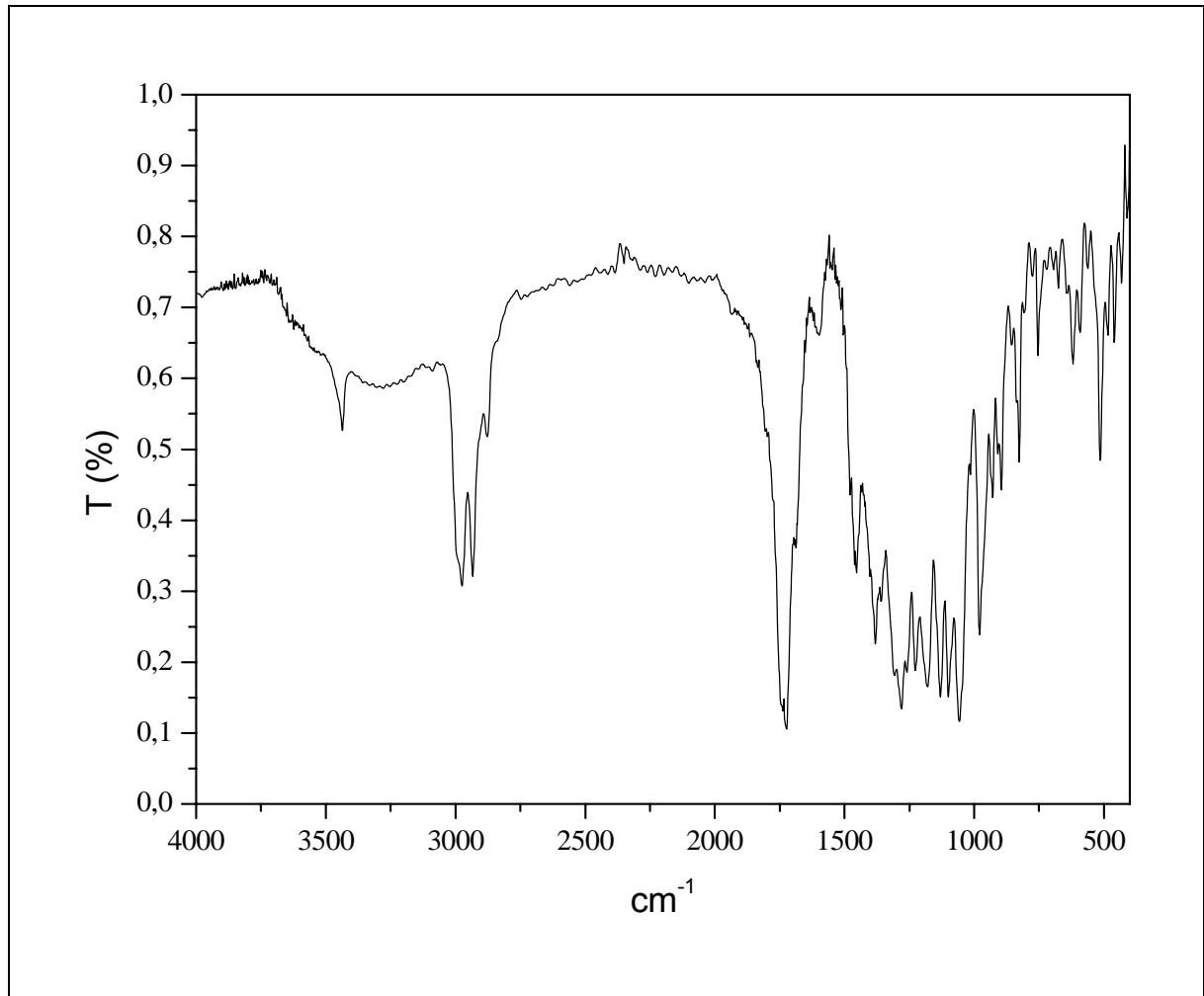


Figura All.13. Espectro na região do infravermelho de micropartículas IND-0 em pastilha de KBr.

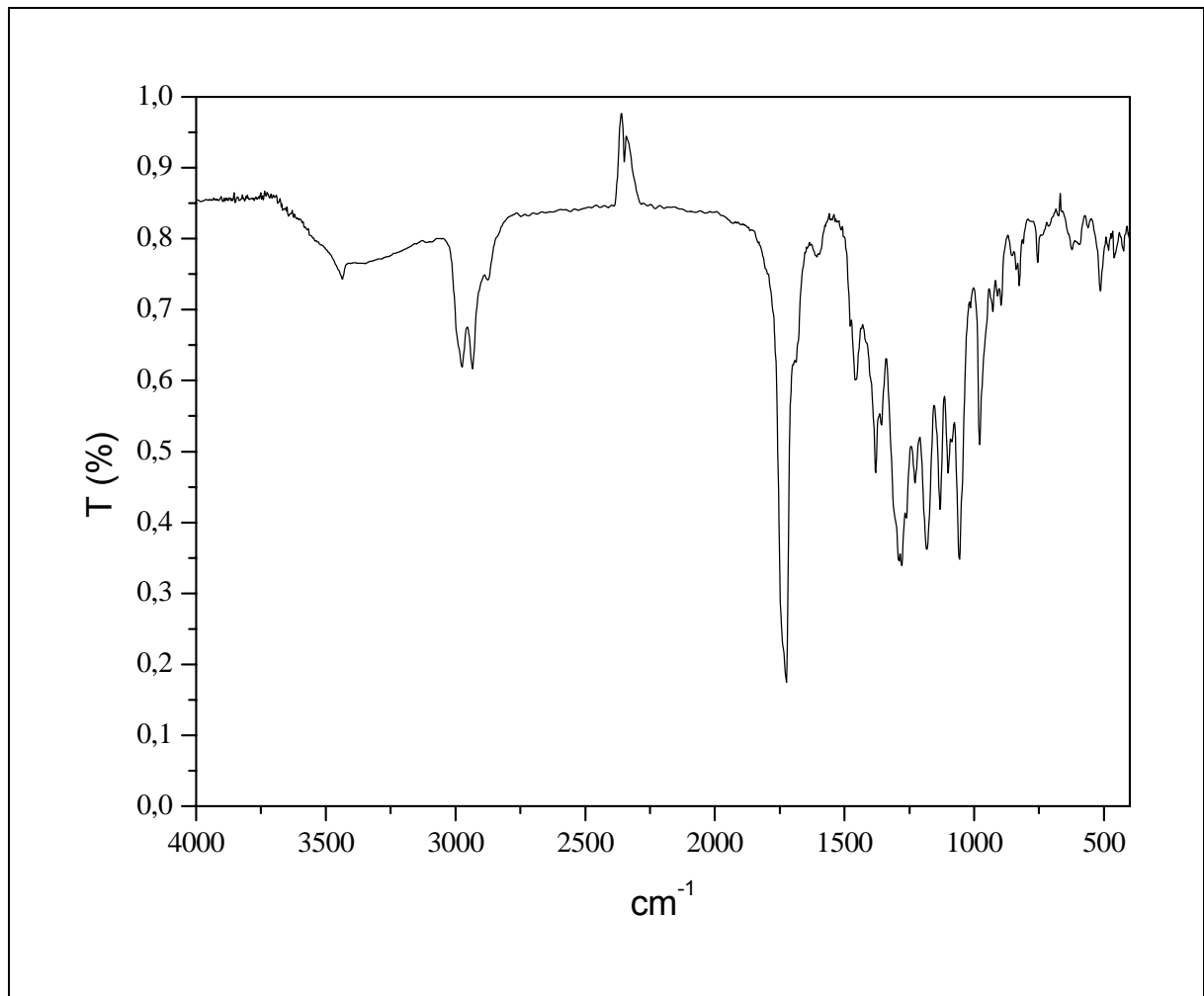


Figura AII.14. Espectro na região do infravermelho de micropartículas IND-10 em pastilha de KBr.

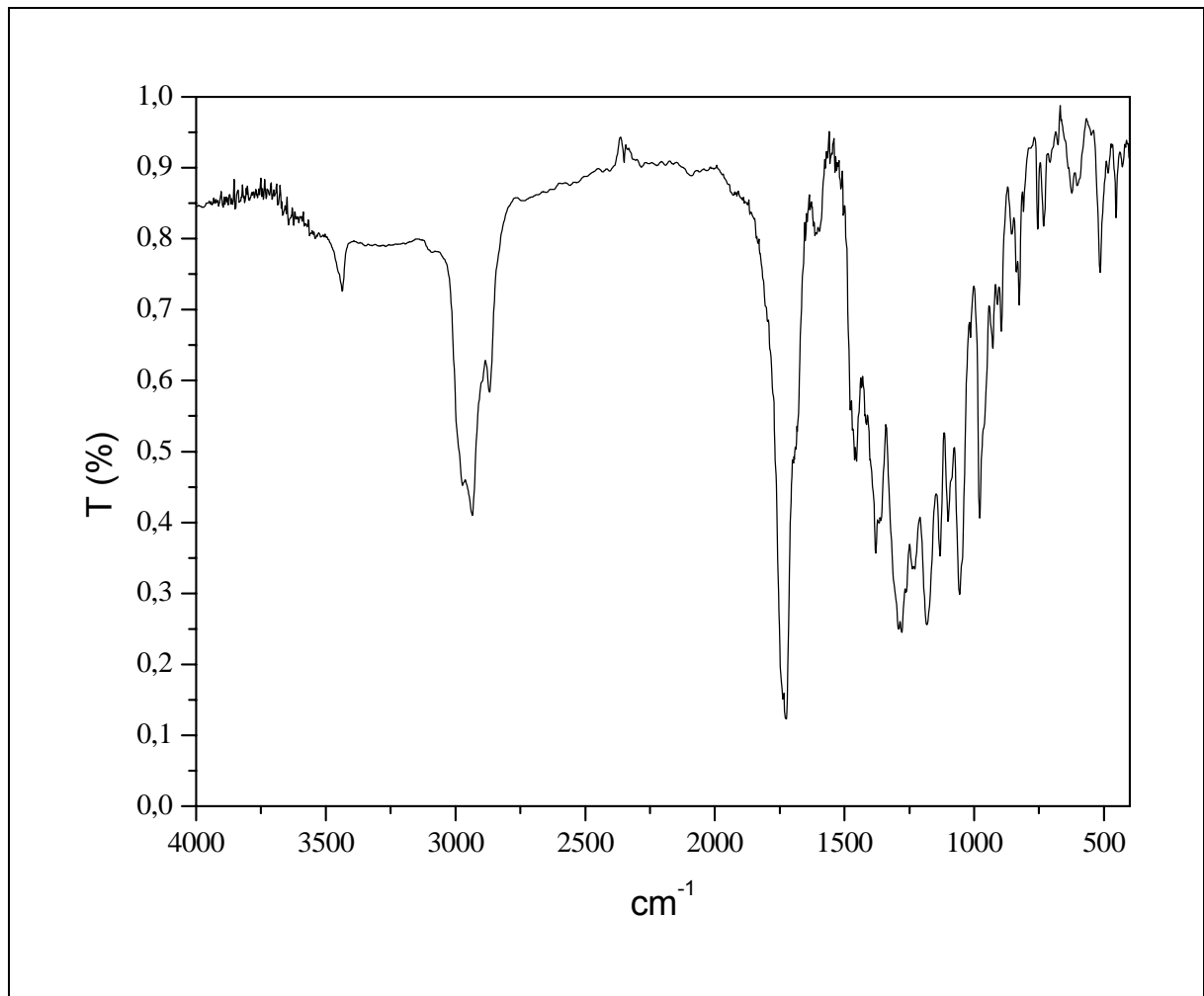


Figura AII.15. Espectro na região do infravermelho de micropartículas IND-30 em pastilha de KBr.

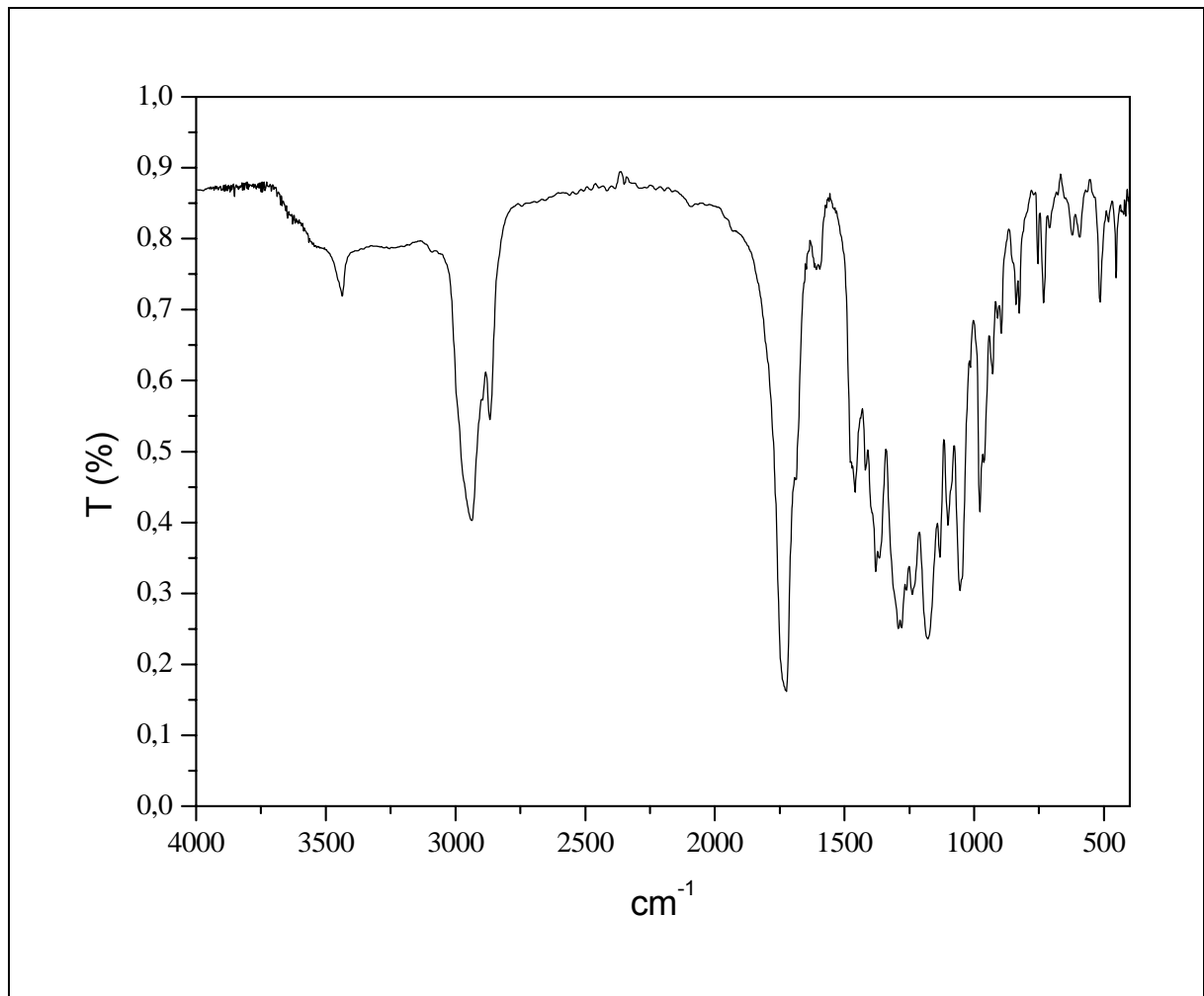


Figura AII.16. Espectro na região do infravermelho de micropartículas IND-50 em pastilha de KBr.

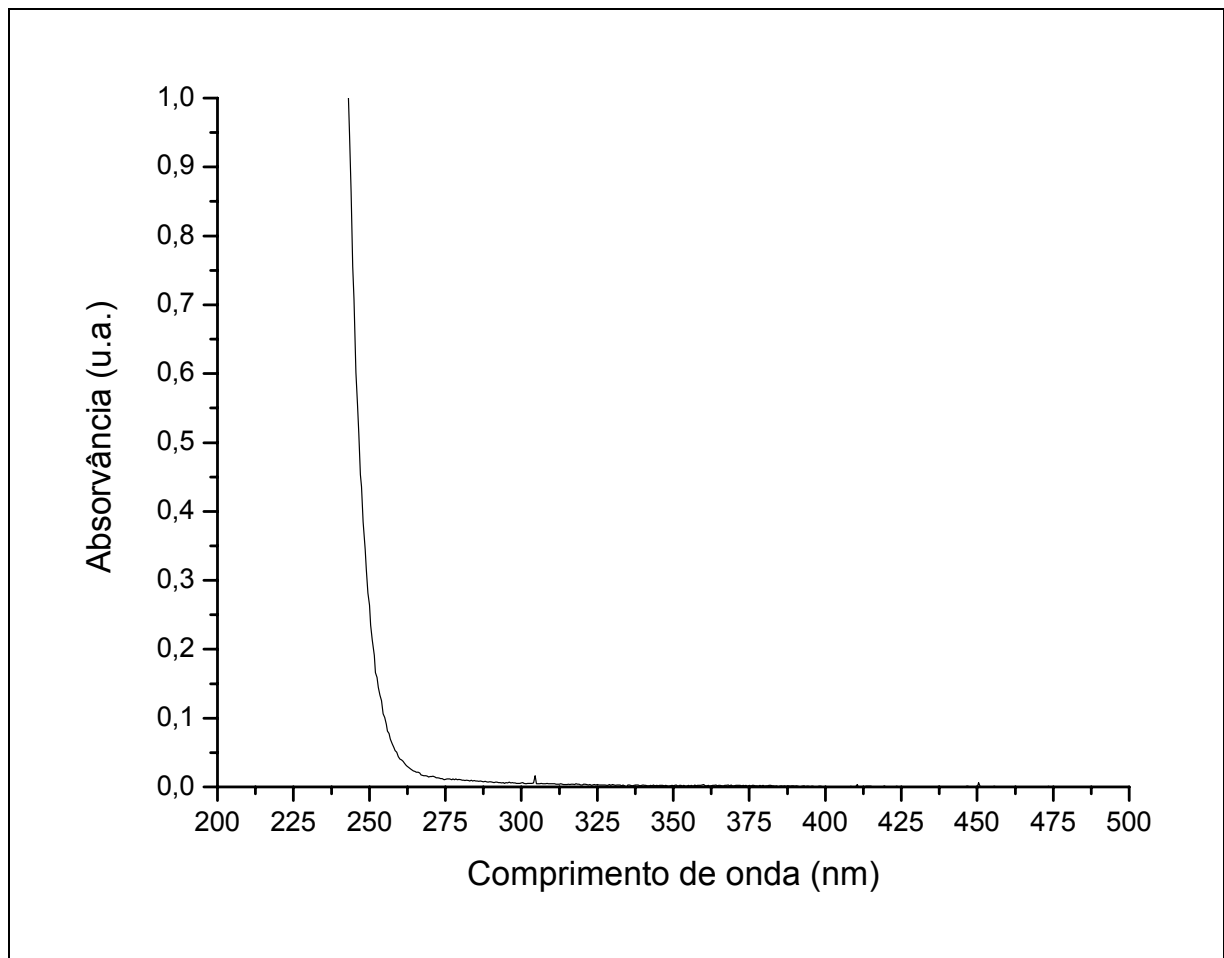


Figura AII.17. Espectro de varredura na região do ultravioleta do clorofórmio utilizado no doseamento das micropartículas (comparação: água).

