

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**MICROPARTÍCULAS DE P(HBHV) E DE BLENDS DE P(HBHV):PCL  
CONTENDO DEXAMETASONA OU ACETATO DE DEXAMETASONA COMO  
MODELOS DE FÁRMACOS: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PERFIS  
DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*.**

Maria Ismenia Zulian Lionzo

Porto Alegre, 2006.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MICROPARTÍCULAS DE P(HBV) E DE BLENDS DE P(HBV):PCL CONTENDO  
DEXAMETASONA OU ACETATO DE DEXAMETASONA COMO MODELOS DE  
FÁRMACOS: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PERFIS DE LIBERAÇÃO *IN*  
*VITRO*.

Dissertação apresentada por **Maria Ismenia Zulian  
Lionzo** para obtenção do GRAU DE MESTRE em  
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Raffin Pohlmann

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. 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 12.04.2006, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Martin Steppe

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Nádyá Pesce da Silveira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Ruy Carlos Ruver Beck

Universidade Federal de Santa Maria

L763m

Lionzo, Maria Ismenia Zulian

Micropartículas de p(hbvh) e de blendas de p(hbvh):pcl contendo dexametasona ou acetato de dexametasona como modelos de fármacos: caracterização físico-química e perfis de liberação in vitro / Maria Ismenia Zulian Lionzo – Porto Alegre: UFRGS, 2006. - xix, 125p.: il., gráf., tab.

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

1. Micropartículas. 2. Polímeros biodegradáveis. 3. Blendas de polímeros. 4. Dexametasona. 5. Sistema de liberação de fármacos. I. Pohlmann, Adriana Raffin. II. Ré, Maria Inês. III. Título.

CDU: 615.4'

Bibliotecárias responsáveis:

Heloísa do Canto Canabarro, CRB10/1036

Margarida Maria C. F. Ferreira, CRB10/480



## AGRADECIMENTOS

Agradeço à prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana R. Pohlmann pela oportunidade, orientação, estímulo à pesquisa e os inúmeros ensinamentos.

À Dr<sup>a</sup>. Maria Inês Ré pela co-orientação e pela atenção dada durante os momentos em que estive no IPT.

À prof<sup>a</sup>. Sílvia S. Guterres pela obsequiedade demonstrada durante a realização dos experimentos no laboratório 405.

Ao prof. Edilson V. Benvenuti pelos conhecimentos transmitidos e pelo auxílio nas determinações de área superficial.

Ao prof. Valter Stefani pelo acolhimento nos domínios da química, pelos ensinamentos, convivência e amizade.

Ao professor Paulo Brenner pela execução das análises por DSC.

Ao meu pai, Beno, pelo exemplo, incentivo e compreensão sempre presentes.

Aos colegas do K204, Alessandro, Ângela, Eliézer, Fabiano, Leandra, Márcia, Nalva, Rosane, Humberto, pelos ótimos momentos de convívio e troca de experiências.

Aos colegas do laboratório 405, Alessandra, Daniela, Clarissa, Érico, Gislane, Helen, Lali, Leandro, Letícia Colomé, Letícia Cruz, Renata, Rodrigo, Ruy, Sandra, Scheila e Vitória pela convivência e intercâmbio de conhecimentos.

Agradeço especialmente à Fernanda e à Letícia pela grande amizade e indispensável suporte em todos os momentos.

Aos amigos Dani, Carla, Joana, Clarissa, Gilda, Marcelo e Sabrina pelo apoio e, particularmente, à Gisele e ao Jesús pela disponibilidade.

Agradecimentos à CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho e à Rede Cooperativa para Aplicação de Poli(hidroxialcanoatos) (PHAs) no Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada de Ativos, pelo apoio financeiro.





## SUMÁRIO

Listagem de figuras.....	ix
Listagem de tabelas.....	xiii
Abreviaturas.....	xv
Resumo.....	ixx
Abstract.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	7
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos específicos.....	9
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1 Micropartículas.....	13
3.1.1 Materiais empregados na preparação de micropartículas.....	14
3.1.2 Obtenção de micropartículas por emulsificação/evaporação de solvente....	16
3.1.3 Caracterização de micropartículas.....	18

3.1.4 Micropartículas de poli(hidroxialcanoato).....	23
3.1.4.1 Micropartículas de blendas de P(HBHV) e PCL.....	30
3.1.5 Fármacos.....	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Materiais.....	39
4.1.1 Matérias-primas.....	39
4.1.2 Aparelhos e equipamentos.....	39
4.1.3 Solventes e outros materiais.....	41
4.2 Métodos.....	42
4.2.1 Obtenção das micropartículas.....	42
4.2.2 Caracterização das micropartículas.....	45
4.2.2.1 Determinação do rendimento.....	45
4.2.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação.....	46
4.2.2.3 Microscopia óptica.....	47
4.2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura.....	47
4.2.2.5 Difractometria de <i>laser</i> .....	48
4.2.2.6 Determinação da área superficial.....	48
4.2.2.7 Calorimetria diferencial exploratória (DSC).....	49
4.2.2.8 Perfil de liberação <i>in vitro</i> em célula de fluxo.....	49

4.2.2.9 Perfil de liberação <i>in vitro</i> em erlenmeyer.....	50
4.2.2.10 Avaliação dos perfis de liberação.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1 Preparação e caracterização de micropartículas preparadas com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:4 (v/v).....	55
5.1.1 Rendimento e eficiência de encapsulação.....	55
5.1.2 Microscopia óptica.....	58
5.1.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	62
5.1.4 Avaliação da distribuição de tamanhos por difratometria de <i>laser</i> .....	63
5.1.5 Avaliação da área superficial.....	65
5.1.6 Perfis de liberação da dexametasona e do acetato de dexametasona em célula de fluxo.....	66
5.2 Preparação e caracterização de micropartículas preparadas com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:1 (v/v).....	71
5.2.1 Rendimento e eficiência de encapsulação.....	71
5.2.2 Microscopia óptica.....	73
5.2.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	78
5.2.4 Avaliação da distribuição de tamanhos por difratometria de <i>laser</i> .....	81
5.2.5 Avaliação da área superficial.....	82
5.2.6 Calorimetria exploratória diferencial.....	84

5.2.7 Perfis de liberação da dexametasona e do acetato de dexametasona em erlenmeyer a partir das micropartículas.....	94
6. CONCLUSÕES.....	103
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
8. ANEXOS.....	121

## LISTAGEM DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do poli(hidroxicanoato). R1 = metil, [poli(hidroxi-butirato)] (PHB), R2 = etil, [poli(hidroxi-valerato)] (PHV)	24
Figura 2. Estrutura química da poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), x=5.....	31
Figura 3. Estrutura química da dexametasona e do acetato de dexametasona....	34
Figura 4. Preparação das micropartículas por emulsificação/evaporação de solvente.....	43
Figura 5. Imagens referentes às formulações FB-0-10, FB-1-10 e FB-2-10.....	59
Figura 6. Imagens referentes às formulações DX-0-10, DX-1-10 e DX-2-10 .....	60
Figura 7. Imagens referentes às formulações ADX-0-10, ADX-1-10 e ADX-2-10.	61
Figura 8. Fotomicrografias de varredura das formulações FB-0-10, FB-1-10 e FB-2-10.....	62
Figura 9. Fotomicrografia de varredura das formulações DX-0-10, DX-1-10 e DX-2-10.....	63
Figura 10. Fotomicrografia de varredura das formulações ADX-0-10, ADX-1-10 e ADX-2-10.....	63
Figura 11. Perfis de liberação das micropartículas contendo dexametasona do fármaco puro.....	67
Figura 12 Perfis de liberação das micropartículas contendo acetato de dexametasona do fármaco puro.....	68

Figura 13 Imagens em nível macroscópico da fase orgânica contendo dexametasona.sobre fundos claro e escuro.....	70
Figura 14 Imagens em nível microscópico da fase orgânica de dexametasona na concentração de 0,4 % m/v.....	70
Figura 15 Micropartículas brancas referentes às formulações FB-0-40; FB-1-40 e FB-2-40.....	74
Figura 16 Micropartículas contendo dexametasona, referentes às formulações FDX-0-40, FDX-1-40 e FDX-2-40.....	75
Figura 17 Cristais da dexametasona comercial e da dexametasona processada	76
Figura 18 Micropartículas contendo acetato de dexametasona, referentes às formulações FADX-0-40, FADX-1-40 e FADX-2-40.....	77
Figura 19 Fotomicrografias de varredura das formulações FB-0-40, FB-1-40 e FB-2-40,.....	78
Figura 20 Fotomicrografias de varredura das formulações DX-0-40, DX-1-40 e DX-2-40.....	79
Figura 21 Fotomicrografias de varredura das formulações ADX-0-40, ADX-1-40 e ADX-2-40.....	79
Figura 22 Fotomicrografias de varredura das formulações ADX-1-40 e ADX-2-40.....	80
Figura 23 Termograma do P(HBHV) individualmente, das misturas físicas P(HBHV):PCL [90:10 (m/m)] e P(HBHV):PCL [80:20 (m/m)] e da PCL individualmente.....	85
Figura 24 Termograma das amostras FB-0-40, FB-1-40 e FB-2-40.....	86

Figura 25 Termograma das amostras DX-0-40, DX-1-40 e DX-2-40.....	88
Figura 26 Termograma das amostras ADX-0-40, ADX-1-40 e ADX-2-40 .....	89
Figura 27 Termograma dos fármacos acetato de dexametasona, dexametasona e dexametasona submetida ao processo de emulsificação/evaporação de solvente.....	90
Figura 28 Termograma das amostras FB-2-40, adicionadas de 1 % (m/m) e 5 % (m/m) de acetato de dexametasona.....	91
Figura 29. Efeito da presença do P(HBHV) na cristalinidade da PCL.....	92
Figura 30 Perfis de liberação da dexametasona comercial, recristalizada e a partir das micropartículas.....	95
Figura 31. Ajustes gráficos da equação monoexponencial aos perfis de liberação.....	97
Figura 32. Perfis de liberação do acetato de dexametasona comercial, recristalizado e a partir das micropartículas.....	98
Figura 33. Ajustes gráficos da equação biexponencial aos perfis de liberação das micropartículas e monoexponencial para o fármaco.....	101
Figura 34. Fotomicrografias de varredura das micropartículas ADX-0-40, ADX-1-40 e ADX-2-40, observadas após 100 % de liberação.....	101





## LISTAGEM DE TABELAS

Tabela 1. Composição quantitativa das formulações de micropartículas.....	44
Tabela 2. Rendimento de micropartículas obtido em cada formulação, empregando filtração na separação das micropartículas.....	56
Tabela 3. Valores de eficiência de encapsulação dos fármacos empregados nas diferentes formulações testadas.....	57
Tabela 4. Eficiência de encapsulação de dexametasona e percentuais de perdas.....	57
Tabela 5. Análise granulométrica e índices de polidispersão (span) das micropartículas.....	64
Tabela 6. Área superficial e coeficiente de correlação da equação de BET.....	65
Tabela 7. Eficiência de dissolução das amostras.....	69
Tabela 8. Rendimento de micropartículas obtido em cada formulação.....	72
Tabela 9. Eficiência de encapsulação de fármaco nas micropartículas obtidas.....	72
Tabela 10. Medidas de tamanho das micropartículas.....	81
Tabela 11. Área superficial, coeficiente de correlação e concentração de fármaco nas micropartículas.....	83
Tabela 12. Valores de temperatura de fusão ( $T_m$ ) do P(HBV) e da PCL e temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do P(HBV) nas matérias-	

primas e misturas físicas.....	86
Tabela 13. Valores de temperatura de fusão ( $T_m$ ) do P(HBHV) e da PCL e temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do P(HBHV) nas formulações sem fármaco.....	87
Tabela 14. Valores de temperatura de fusão ( $T_m$ ) do P(HBHV) e da PCL e temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do P(HBHV) nas formulações contendo dexametasona .....	88
Tabela 15. Valores de temperatura de fusão ( $T_m$ ) do P(HBHV) e da PCL e temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do P(HBHV) nas formulações contendo acetato de dexametasona.....	89
Tabela 16. Entalpia de fusão e cristalinidade do P(HBHV), da PCL e das formulações.....	92
Tabela 17. Dissolução da dexametasona pura e a partir das formulações, após 60 e 120 minutos de experimento.....	96
Tabela 18. Parâmetros obtidos empregando a modelagem dos dados à equação monoexponencial.....	97
Tabela 19. Parâmetros obtidos empregando a modelagem dos dados à equação biexponencial.....	100
Tabela 20. Área superficial e coeficiente de correlação das micropartículas, antes e após o experimento de liberação.....	102

## ABREVIATURAS

**a/o/a** emulsão múltipla água em óleo em água

**a/o/o** emulsão múltipla água em óleo em óleo

**o/a** emulsão simples óleo e, água

**ADX** acetato de dexametasona

**ADX-0-10** formulação de P(HBHV):PCL na proporção 100:0, com acetato de dexametasona, preparada com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:4 (v/v)

**ADX-0-40** formulação de P(HBHV):PCL na proporção 100:0, com acetato de dexametasona, preparada com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:1 (v/v)

**ADX-1-10** formulação de P(HBHV):PCL na proporção 90:10, com acetato de dexametasona, preparada com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:4 (v/v)

**ADX-1-40** formulação de P(HBHV):PCL na proporção 90:10, com acetato de dexametasona, preparada com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:1 (v/v)

**ADX-2-10** formulação de P(HBHV):PCL na proporção 80:20, com acetato de dexametasona, preparada com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:4 (v/v)

**ADX-2-40** formulação de P(HBHV):PCL na proporção 80:20, com acetato de dexametasona, preparada com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:1 (v/v)

**BET** Brunauer-Emmet-Teller

**DSC** acrônimo de *Differential Scanning Calorimetry* ou calorimetria exploratória diferencial

**DX** dexametasona

**DX-0-10** formulação de P(HBHV):PCL na proporção 100:0, com dexametasona, preparada com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:4 (v/v)

**DX-0-40** formulação de P(HBHV):PCL na proporção 100:0, com dexametasona, preparada com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:1 (v/v)

**DX-1-10** formulação de P(HBHV):PCL na proporção 90:10, com dexametasona, preparada com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:4 (v/v)

**DX-1-40** formulação de P(HBHV):PCL na proporção 90:10, com dexametasona, preparada com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:1 (v/v)

**DX-2-10** formulação de P(HBHV):PCL na proporção 80:20, com dexametasona, preparada com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:4 (v/v)

**DX-2-40** formulação de P(HBHV):PCL na proporção 80:20, com dexametasona, preparada com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:1 (v/v)

**EDS** acrônimo de *Energy Dispersive System* ou sistema de energia dispersiva

**FB-0-10** formulação de P(HBHV):PCL na proporção 100:0, sem fármaco, preparada com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:4 (v/v)

**FB-0-40** formulação de P(HBHV):PCL na proporção 100:0, sem fármaco, preparada com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:1 (v/v)

**FB-1-10** formulação de P(HBHV):PCL na proporção 90:10, sem fármaco, preparada com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:4 (v/v)

**FB-1-40** formulação de P(HBHV):PCL na proporção 90:10, sem fármaco, preparada com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:1 (v/v)

**FB-2-10** formulação de P(HBHV):PCL na proporção 80:20, sem fármaco, preparada com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:4 (v/v)

**FB-2-40** formulação de P(HBHV):PCL na proporção 80:20, sem fármaco, preparada com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:1 (v/v)

**FT-IR** espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

**HV** hidroxivalerato

**IgG** imunoglobulina G

**MET** microscopia eletrônica de transmissão

**MEV** microscopia eletrônica de varredura

**MFB-1** mistura física dos componentes da formulação FB-1

**MFB-2** mistura física dos componentes da formulação FB-2

**PCL** poli( $\epsilon$ -caprolactona)

**pH** potencial hidrogeniônico

**PHA** poli(hidroxialcanoato)

**PHB** poli(hidroxibutirato)

**P(HBHV)** poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

**PHV** poli(hidroxivalerato)

**PLA** poli(ácido láctico)

**PLGA** poli(ácido láctico-co-glicólico)

**PGA** poli(ácido glicólico)

**PVA** poli(álcool vinílico)

**r** coeficiente de correlação

**r<sup>2</sup>** coeficiente de determinação

**T<sub>g</sub>** temperatura de transição vítrea

**T<sub>m</sub>** temperatura de fusão

**UV** ultravioleta



## RESUMO

Tendo em vista o controle da porosidade da matriz polimérica de micropartículas constituídas por blendas de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) [P(HBHV)] e de poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), o presente trabalho objetivou verificar a possibilidade de controle da liberação de fármacos associados a esses sistemas. Foram preparadas micropartículas constituídas de blendas de P(HBHV):PCL nas proporções de 100:0, 90:10 e 80:20 (m/m) pelo método de emulsificação/evaporação de solvente, variando-se o volume de fase orgânica. Os modelos de fármacos utilizados foram a dexametasona e o acetato de dexametasona. As micropartículas obtidas apresentaram rendimento e eficiência de encapsulação satisfatória, entretanto, através de análises por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura foi evidenciada a ocorrência de cristais de fármaco não encapsulado. Os diâmetros de partícula permaneceram em torno de 100 a 200  $\mu\text{m}$  e variaram em função do volume de fase orgânica. A área superficial foi afetada pelo percentual de PCL na blenda e pela presença de cristais do fármaco nas formulações. A análise térmica das amostras demonstrou que o processo de obtenção alterou a estrutura cristalina do P(HBHV) e que a encapsulação dos fármacos levou à variação da sua temperatura de transição vítrea e cristalinidade. Os perfis de dissolução da dexametasona a partir das micropartículas apresentaram ajustes adequados ao modelo monoexponencial e foram semelhantes aos perfis apresentados pelo fármaco não encapsulado. Nas formulações contendo acetato de dexametasona houve liberação sustentada do fármaco por até 250 horas quando associado aos sistemas e a modelagem matemática indicou ajuste dos perfis ao modelo biexponencial. Evidenciou-se um aumento nos valores das constantes de liberação dos fármacos conforme o acréscimo do conteúdo de PCL na blenda.

**PALAVRAS-CHAVE:** micropartículas, polímeros biodegradáveis, blendas poliméricas, dexametasona, sistemas de liberação de fármacos.





## ABSTRACT

Considering the control of the porosity in polymeric microparticles matrix by preparing poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) [P(HBHV)] and poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) blends, the objective of the present work was to verify the possibility of the controlling release of drugs by varying the PCL concentration in those systems. Microparticles have been prepared with P(HBHV):PCL blends using the ratios of 100:0, 90:10 and 80:20 (m/m) by an emulsion solvent evaporation process. The steroidal drug models employed were dexamethasone and dexamethasone acetate. The formulations were characterized considering the yield, the encapsulation efficiency, the morphologic analysis and the thermal properties. The release profiles were determined and mathematical modeled by fitting data with the mono and the biexponential equations. Microparticles presented satisfactory yields and encapsulation efficiencies. However, non-encapsulated drug crystals were evidenced by light microscopy and scanning electron microscopy analysis. The particle diameters were 100 to 200  $\mu\text{m}$  depending on the variation of proportion between the organic and the aqueous phases. The surface area was affected by the PLC content in the blend, as well as by the presence of drug crystals in the formulations. The DSC analyses of the samples demonstrated that the preparation process influenced on the crystalline structure of P(HBHV). Besides, the encapsulation of the drugs led to variation of glass transition temperature and crystallinity of P(HBHV). The dexamethasone release profiles from microparticles fitted with the monoexponential model and showed similarity with the non-encapsulated drug dissolution. For dexamethasone acetate loaded microparticles, a sustained release of the drug (up to 250 hours) was observed. These data fitted with the biexponential model. The kinetic constant values increased with the increase of PCL content in the blend.

KEY-WORDS: microparticles, biodegradable polymers, polymer blends, dexamethasone, drug delivery systems.



## **1. INTRODUÇÃO**



Sistemas carreadores de fármacos têm apresentado crescente interesse frente a formas terapêuticas convencionais, uma vez que permitem o controle da velocidade de liberação de fármacos. Este controle fornece vantagens adicionais a estes sistemas, dentre as quais: o aumento da adesão do paciente ao tratamento, o emprego de menores quantidades de fármaco, a diminuição de efeitos adversos locais e sistêmicos, proteção ao fármaco, melhoria da eficiência do tratamento, maior velocidade na resposta terapêutica, redução da flutuação dos níveis plasmáticos, aumento da biodisponibilidade de alguns fármacos, possibilidade de vetorização e em alguns casos, redução de custos (Kim, 2000).

Dentre os sistemas mais estudados encontram-se as micropartículas, que podem apresentar estrutura matricial ou vesicular. Num sistema matricial ou monolítico, o fármaco pode estar na forma dissolvida ou dispersa (Gennaro, 2000). Por outro lado, num sistema vesicular ou reservatório, o fármaco está contido no interior de uma membrana, que controla sua difusão (Martin, 1993).

Existem inúmeras técnicas de microencapsulação e, em cada uma, é possível variar os parâmetros de processo a fim de obter sistemas com padrões de liberação específicos (Freiberg e Zhu, 2004). A emulsificação/evaporação de solvente é uma das técnicas mais utilizadas na preparação de micropartículas e permite a incorporação tanto de fármacos hidrofílicos quanto hidrofóbicos. Uma vantagem desta metodologia é a sua simplicidade de execução, porém, requer a seleção adequada de solventes, emulsificantes e condições de agitação (Watts *et al.*, 1990).

A caracterização de sistemas microparticulados considera rendimento, tamanho, morfologia, área superficial, porosidade, carga superficial, cristalinidade, comportamento térmico, entre outras (Freiberg e Zhu, 2004). No que concerne a presença de fármaco associado, são avaliados a capacidade de incorporação e de liberação, modelagem matemática dos perfis de liberação e respostas específicas *in vitro* e *in vivo* (Faisant *et al.*, 2002; Brophy e Deasy, 1986).

Em geral, os materiais empregados na preparação de micropartículas são polímeros de origem natural ou sintética. A escolha destes polímeros deve considerar alguns aspectos relevantes, tais como, biocompatibilidade e propriedades físico-químicas (Chandra e Rustgi, 1998).

Poli(hidroxicarboxilatos) (PHA) são polímeros biodegradáveis e biocompatíveis produzidos por bactérias durante a etapa de fermentação e armazenados como substância de reserva (Sudesh *et al.*, 2000; Pouton e Akhtar, 1995). Estes poliésteres têm atraído atenção, devido à potencialidade de seu emprego em sistemas de liberação de fármacos. Porém, um fator limitante ao uso do poli(hidroxibutirato) [(PHB)] é sua alta cristalinidade, que pode ser alterada mediante sua copolimerização com outras unidades monoméricas, tais como o hidroxivalerato (Braunegg *et al.*, 1998). Esta alteração conduz a materiais com melhores propriedades mecânicas (Vergoogt *et al.*, 1994) e melhores características de liberação de fármacos, quando associados a estes (Gürsel *et al.*, 2001).

Uma forma adicional de aperfeiçoar as propriedades termoplásticas é através da formação de blendas com outros homopolímeros ou copolímeros. A poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) é um polímero sintético semicristalino biodegradável e, em blendas com poli(hidroxibutirato) (PHB), pode agir como um plastificante polimérico, modulando a rigidez e processabilidade do material (Vogelsanger *et al.*, 2003; Gassner e Owen 1994). O uso de blendas de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (P(HBHV)) e PCL na preparação de micropartículas permite a modulação da porosidade das estruturas e conduz a sistemas com características promissoras para emprego como carreadores de fármacos (Embleton e Tighe, 1993; Ré, *et al.*, 2004). Entretanto, ainda não há relatos na literatura de trabalhos empregando fármacos associados a estas micropartículas com porosidade controlada.

A dexametasona e o acetato de dexametasona constituem modelos de fármaco com diferentes solubilidades. A dexametasona é fracamente solúvel em água, o acetato é altamente hidrofóbico e suas solubilidades em água são, respectivamente, 1,0 mg/mL e 0,1 mg/mL (Einmahl *et al.*, 1999). A dexametasona é um glicocorticóide esteróide

análogo sintético da hidrocortisona, que apresenta diversos empregos terapêuticos, dentre os quais, como antiinflamatório, antiasmático, antialérgico, imunossupressor, antiemético, entre outros. A dexametasona apresenta a maior potência dentre os glicocorticóides de via sistêmica (Korolkovas, 2001). Entretanto, esse fármaco apresenta algumas desvantagens terapêuticas, tais como efeitos sistêmicos indesejáveis e a necessidade de administração freqüente, quando empregada em tratamento crônico (Hickey *et al.*, 2002).

O uso de sistemas carreadores de fármacos possibilita a modulação da liberação de moléculas com diferentes características físico-químicas (Martin, 1993). É possível aumentar a biodisponibilidade de fármacos ou prolongar a sua liberação em função de alterações morfológicas nos sistemas carreadores (Mandal *et al.*, 2001; Siepmann *et al.*, 2004).

Neste trabalho, buscou-se verificar se o controle da porosidade fornecido pela variação da concentração de PCL, em micropartículas de blendas de P(HBHV):PCL, nas proporções 100:0, 90:10 e 80:20 (m/m) refletiria nos perfis de liberação de fármacos modelo esteróides com diferentes graus de hidrofobicidade.

Este trabalho está inserido na “Rede Cooperativa para aplicação de poli(hidroxialcanoatos) (PHAs) no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de ativos”, apoiada pelo CNPq/MCT e coordenada pela Dra. Maria Inês Ré. A Rede tem como um de seus objetivos buscar aplicações no campo da terapêutica para o P(HBHV) produzido por empresa nacional de biotecnologia (PHB Industrial).





## **2.OBJETIVOS**





## 2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral verificar a influência da presença e concentração de PCL nas micropartículas de P(HBHV) com o intuito de modificar-se os perfis de dissolução e liberação da dexametasona e do acetato de dexametasona.

## 2.2 Objetivos específicos

- Preparar micropartículas de P(HBHV) e de blends de P(HBHV):PCL nas proporções de 90:10 e 80:20 contendo dexametasona ou acetato de dexametasona e determinar o rendimento e a eficiência de encapsulação.
- Caracterizar físico-quimicamente as formulações através de microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura, adsorção de nitrogênio, difração de *laser* e calorimetria exploratória diferencial para determinar a morfologia, a área superficial, a distribuição granulométrica e as interações intermoleculares.
- Determinar os perfis de liberação *in vitro* dos modelos de fármacos a partir das micropartículas.
- Modelar matematicamente os perfis de liberação para acessar os parâmetros cinéticos dos sistemas.



### **3. REVISÃO DE LITERATURA**





### 3.1 Micropartículas

As micropartículas são definidas como partículas esféricas, que podem ser poliméricas, inorgânicas ou mistas, com tamanhos que variam de 1 a 250  $\mu\text{m}$ . Como características, apresentam tamanho e volume pequenos, grande área superficial específica, uniformidade, alta difusibilidade e formam dispersões estáveis (Kawagushi, 2000). Estes sistemas apresentam diversas vantagens frente aos sistemas unitários convencionais, uma vez que possibilitam modular perfis de liberação de diferentes maneiras. A liberação pode ser controlada pela microencapsulação, uma vez que o fármaco necessita sofrer difusão a partir do carreador ou ainda pode ter sua liberação modulada pela decomposição do sistema (Kim, 2000). Por outro lado, a boa dispersão apresentada pelas micropartículas, pode aumentar a biodisponibilidade oral de fármacos que apresentam baixa solubilidade (Yang, 2005). Em outros casos, por via oral ou parenteral, permitem o direcionamento a órgãos específicos mediante interações com o organismo ou pela funcionalização com componentes vetorizantes, reduzindo efeitos adversos sistêmicos (Freiberg e Zhu, 2004). Além disso, viabilizam a proteção do fármaco, melhoram a eficiência do tratamento e permitem o uso de menores quantidades de fármacos (Kim, 2000). Sistemas convencionais de administração nem sempre provêm liberação controlada, levando a uma liberação brusca, que causa aumento da concentração do fármaco em níveis tóxicos, seguida de um período de queda da concentração até a próxima administração (Freiberg e Zhu, 2004). Sistemas de liberação controlada de fármacos são formas farmacêuticas nas quais se busca estabelecer uma determinada taxa de liberação, que pode ser baseada numa concentração terapêutica desejada e/ou na farmacocinética do agente farmacológico associado a estes (Yuksel, 1996).

Carreadores microparticulados representam uma importante área de pesquisa e inúmeros estudos vêm sendo conduzidos abordando diferentes aspectos como a influência do uso de diferentes matérias-primas, o emprego de diversas técnicas de obtenção, ajustes de parâmetros de processo e incorporação de fármacos (Brannon-

Peppas, 1995; Freiberg e Zhu, 2004; Watts *et al.*, 1990). Outros estudos, visando respostas específicas, se dispõem a caracterizar as micropartículas, seja em função de suas propriedades físico-químicas ou biológicas (Couvreur *et al.*, 1997; Allémann *et al.*, 1998).

### **3.1.1 Materiais empregados na preparação de micropartículas**

Micropartículas carreadoras de fármacos podem ser obtidas a partir de materiais de constituição inorgânica, mista ou orgânica. A grande maioria dos estudos desenvolvidos emprega materiais poliméricos.

Na primeira categoria se encontram as micropartículas de composição inorgânica. Dentre os materiais utilizados, destacam-se os óxidos de silício. Unger e colaboradores (1983) foram os pioneiros no emprego da técnica de síntese de sílica pelo método sol-gel para preparar um novo sistema de liberação de fármacos. O processo sol-gel envolve a formação de uma matriz inorgânica em condições brandas à baixas temperaturas. Num estudo, o emprego de micropartículas de xerogéis de sílica contendo dexmedetomidina demonstrou o controle da liberação do fármaco. Diferentes perfis foram obtidos em função da modificação estrutural do xerogel e da técnica de secagem empregada na preparação das micropartículas (Kortesuo *et al.*, 2001). Um obstáculo ao emprego de micropartículas inorgânicas tem sido a ocorrência de efeito *burst* acentuado e a rápida liberação durante todo o processo (Charnay *et al.*, 2004).

Dentre as micropartículas de composição mista estão os sistemas microparticulados de constituição orgânico-inorgânica obtidos por secagem por aspersão de suspensões de nanopartículas poliméricas contendo fármaco, empregando dióxido de silício como adjuvante de secagem (Müller *et al.*, 2000). Estas micropartículas apresentam a superfície recoberta homoganeamente pelas nanoestruturas (Müller *et al.*, 2001), possibilitando uma nova abordagem de associação do fármaco ao núcleo de sílica e posterior revestimento das micropartículas por



nanocápsulas e nanoesferas de polímeros com solubilidade pH-dependente, visando liberação controlada (Beck *et al.*, 2004). Outra alternativa é o revestimento das micropartículas inorgânicas com filmes poliméricos. Neste caso, micropartículas porosas de  $\text{CaCO}_3$  são impregnadas com fármaco e, após secagem são revestidas com multicamadas de polímeros catiônicos e aniônicos. Este procedimento diminuiu a liberação inicial do fármaco associado ao núcleo inorgânico (Wang *et al.*, 2006).

Dentre os materiais orgânicos empregados na obtenção de micropartículas estão os polímeros biodegradáveis de origem natural ou sintética (Jain, 2000). Verificam-se estudos utilizando polissacarídeos, polipeptídeos, poliésteres, polianidridos, poliacrilatos, entre outros (Chandra e Rustgi, 1998). Os poliésteres, especialmente o poli(ácido lático) (PLA), o poli(ácido glicólico) (PGA), a poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), o poli(hidroxibutirato) (PHB) e seus copolímeros são os mais comuns, devido aos seus perfis de biocompatibilidade e biodegradação (Arshady, 1991). As características das micropartículas obtidas estão intimamente correlacionadas com as propriedades dos polímeros. Dessa forma, é possível modular a liberação de fármacos através do emprego de polímeros com diferentes massas molares, de copolímeros ou de blendas (Freiberg e Zhu, 2004). Esses materiais são os mais utilizados na fabricação de micropartículas carreadoras, pois viabilizam a associação de fármacos com diferentes características físico-químicas, além de admitirem o uso de diversas técnicas de preparação. A versatilidade desses materiais permite a obtenção de micropartículas com perfis de liberação específicos permitindo o uso através de diversas vias de administração (Jain, 2000).

### 3.1.2 Obtenção de micropartículas por emulsificação/evaporação de solvente

A emulsificação/evaporação de solvente é uma técnica amplamente empregada podendo ser usada na encapsulação de fármacos a partir de emulsões simples ou múltiplas. No processo de emulsificação/evaporação de solvente, a partir de emulsões simples o/a, o polímero é dissolvido em um solvente orgânico e nesta fase orgânica o fármaco é dissolvido ou disperso. Esta solução ou dispersão é emulsificada numa fase aquosa, contendo um agente emulsificante. Para formação das microesferas, o solvente orgânico sofre difusão pela fase aquosa e evaporação na interface água/ar. Após, as micropartículas podem ser filtradas ou separadas por centrifugação (O'Donnell e McGinity, 1997). Emulsões múltiplas a/o/a são empregadas para obtenção de micropartículas contendo fármacos hidrofílicos. Neste caso, uma solução aquosa do fármaco é emulsificada em uma solução orgânica contendo o polímero formador da matriz. A seguir, essa emulsão primária ( $a_1/o$ ) é emulsificada em uma fase externa aquosa, contendo agente emulsificante (Herrmann e Bodmeier, 1995).

As características das micropartículas carreadoras de fármacos obtidas por emulsificação/evaporação de solvente são influenciadas por diversas condições envolvidas no processo. Dentre essas, observam-se as propriedades físico-químicas do solvente orgânico, do polímero e do fármaco, a concentração do polímero e do fármaco na fase orgânica, a velocidade de agitação, a temperatura, a velocidade de evaporação do solvente orgânico e a concentração do agente emulsificante.

No que se refere à escolha do solvente que constitui a fase orgânica, é necessário considerar a sua miscibilidade com a água, a capacidade de solubilizar tanto o polímero, quanto o fármaco, além de avaliar sua toxicidade (O'Donnell e McGinity, 1997; Birnbaum *et al.*, 2000). Solventes com baixa solubilidade em água conduzem a emulsões mais estáveis, fornecendo micropartículas de qualidade superior. Entretanto, solventes imiscíveis com a água apresentam difusão através da fase aquosa reduzida durante a etapa de eliminação do solvente. Este comportamento diminui a taxa de

precipitação polimérica no momento da formação das micropartículas e permite a ocorrência de difusão do fármaco para a fase aquosa, reduzindo sua encapsulação (Bodmeyer e McGinity, 1988).

As características físico-químicas do fármaco a ser incorporado nas micropartículas devem ser consideradas uma vez que podem influenciar na sua distribuição no interior da micropartícula (Freiberg e Zhu, 2004). Dessa forma, o fármaco pode encontrar-se completamente dissolvido no polímero ou disperso como discretas partículas sólidas distribuídas na matriz (Kim, 2000). Além disso, durante a etapa de emulsificação, a solubilidade do fármaco nas fases deve ser considerada pois pode ocorrer difusão e perda, reduzindo a eficiência de encapsulação (Watts *et al.*, 1990).

Durante a escolha do polímero empregado na obtenção de micropartículas deve-se dar importância à massa molar, à biodegradabilidade e às propriedades térmicas (Genta *et al.*, 1998; Ueda e Tabata, 2003; Ginés *et al.*, 1996). Esses aspectos irão definir algumas características importantes das micropartículas, como a porosidade e o tamanho de partícula, além de influenciar o comportamento de liberação de fármacos associados (Embleton e Tighe, 1993; Genta *et al.*, 1998).

A concentração do polímero na fase orgânica desempenha um papel importante nas características de liberação de fármacos associados a micropartículas. Uma concentração elevada de polímero na fase orgânica confere maior viscosidade à solução, retardando a precipitação do polímero, resultando em micropartículas menos porosas e, dessa forma, reduzindo a liberação de fármacos encapsulados. O aumento da concentração de fármaco, por sua vez, resulta em maior liberação inicial atribuída à perda de fármaco durante a solidificação da matriz polimérica (Luan e Bodmeier, 2006)

A velocidade de agitação influencia no tamanho das micropartículas obtidas sendo que, quanto maior a velocidade de agitação, menor o diâmetro e a dispersão de tamanhos das micropartículas obtidas (Sansdrap e Möes, 1993). Outro parâmetro considerado é a velocidade de evaporação do solvente orgânico que pode ser controlada pela temperatura e pela pressão as quais são submetidas a emulsão ou a

dispersão. Altas temperaturas e baixas pressões facilitam a evaporação, mantendo um alto gradiente de difusão entre as micropartículas e a fase contínua e resultam na obtenção de micropartículas com tamanhos reduzidos (Freitas *et al.*, 2005; Maia *et al.*, 2004).

A variação da concentração do agente empregado na estabilização da emulsão influencia no tamanho das micropartículas obtidas devido à redução na coalescência. Dessa forma, o aumento da concentração do estabilizante pode conduzir à redução do tamanho de partícula, desde que não exceda a quantidade ótima de estabilização, que pode conduzir ao aumento da viscosidade da emulsão (Maia *et al.*, 2004).

### **3.1.3 Caracterização de micropartículas**

Normalmente, a caracterização física e química das micropartículas leva em consideração os mais diversos aspectos. Os valores de rendimento de micropartículas podem ser bastante variáveis, porém o ideal é obter valores altos e reprodutíveis. Liu e colaboradores (2002), empregando a técnica de emulsificação/evaporação de solvente, encontraram valores de rendimento para micropartículas de derivados de celulose contendo nitrofurantoína oscilando entre 50 e 90 %, sendo que o aumento do rendimento foi proporcional ao aumento da concentração de fármaco na formulação.

A eficiência de encapsulação de fármacos em micropartículas poliméricas é afetada por diversos fatores, dentre os quais, interações entre fármaco e polímero, estabilidade da emulsão e tamanho das micropartículas. Na literatura verificam-se valores de eficiência de encapsulação bastante variáveis, sendo específicos para cada tipo de sistema. Em alguns estudos, empregando a metodologia de emulsificação/evaporação de solvente, foram encontradas taxas de encapsulação em torno de 50 a 61 % (Trapani *et al.*, 2003) para o zolpiden em micropartículas de PLA e PLGA. Por outro lado, em micropartículas de PLGA, obtidas por Sansdrap e Mões (1993) foi possível verificar valores de até 100 % na encapsulação do nifedipino.

No que se refere à caracterização da superfície das micropartículas, pode-se fazer a análise morfológica por microscopia óptica, que permite a visualização do formato, a observação da espessura da parede polimérica das partículas e a ocorrência de cristais referentes ao fármaco (Ré e Biscans, 1999; Berkland *et al.*, 2001; Beck *et al.*, 2003). A avaliação da forma das micropartículas é importante, pois pode afetar as características de fluxo e empacotamento das partículas, além de apresentar alguma influência sobre a área superficial (Martin, 1993). É possível observar as micropartículas sob luz normal ou polarizada, sendo que esta última permite a visualização de estruturas cristalinas anisotrópicas, como acontece com os cristais de fármaco que aparecem refratados. Essa refração das estruturas está relacionada à birrefringência da amostra que provoca mudança na velocidade do feixe luminoso (Rossi, 1966; Fowles, 1975). Esta propriedade também se verifica em estruturas contendo arranjos moleculares organizados, e se relaciona aos níveis de orientação molecular, sendo de interesse na caracterização de materiais poliméricos (Wimberger-Friedl, 1995).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma ferramenta extensamente utilizada na observação da topografia e da distribuição de cristais do fármaco nas microestruturas (Burger *et al.*, 1985). Essa técnica também é usada na avaliação da distribuição de tamanhos e da porosidade das micropartículas (Siepmann *et al.*, 2004). Também é possível complementar a caracterização através de Sistema de Energia Dispersiva (EDS) acoplado ao microscópio, que permite a determinação da composição qualitativa e semi-quantitativa das amostras (Duarte *et al.*, 2003).

Quanto à determinação da área específica, pode-se empregar a análise das isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio (Martin, 1993). O conhecimento dos valores de área superficial das micropartículas permite explicar o comportamento de liberação de fármacos associados. Uma das maneiras mais simples de se determinar a área superficial total de sistemas porosos é através do método de adsorção gasosa. Basicamente, as técnicas de adsorção envolvem a determinação da quantidade de gás necessária para formar uma camada molecular na superfície analisada. O número de moléculas necessárias para formar esta única camada pode ser calculado através do volume de gás necessário para recobrir inteiramente a superfície do sólido (Lowell &

Shields, 1991). As isotermas são apresentadas sob a forma gráfica, representando o volume adsorvido em função da pressão relativa ( $P/P_0$ ), onde  $P_0$  é a pressão de saturação da substância adsorvida na temperatura do ensaio. O coeficiente de correlação ( $r$ ) estabelece a regressão a partir dos valores experimentais empregando a equação BET (Brunauer *et al.*, 1938). É sabido que quanto maior a área específica das partículas, maior será a liberação de fármacos, pois o acesso do meio de dissolução é facilitado (Martin, 1993). A área pode variar em função do tamanho de partícula e da presença de poros na estrutura. Sistemas microparticulados são caracterizados por apresentarem grande área superficial. Para se ter uma idéia destes valores, microesferas não porosas de 0,100  $\mu\text{m}$  apresentaram valores de área em torno de 60  $\text{m}^2/\text{g}$  (Siepmann *et al.*, 2004, Kawagushi, 2000). Por outro lado, Maia e colaboradores (2004) obtiveram micropartículas porosas de PHB e P(HBHV), com diâmetros variando entre 40 e 50  $\mu\text{m}$ , cujos valores de área superficial permaneceram em torno de 19-20  $\text{m}^2/\text{g}$ , os quais foram considerados altos tratando-se de micropartículas. Valores de área elevados são interessantes no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, especialmente aqueles empregando o PHB, uma vez que este é um polímero que apresenta degradação lenta.

A determinação do diâmetro de partícula é crucial na caracterização das micropartículas pois essa propriedade afeta a área específica e, em conseqüência, os perfis de liberação de fármacos associados (Martin, 1993). O diâmetro médio é expresso por  $D[4,3]$  e os valores 4 e 3 entre colchetes derivam, respectivamente, dos expoentes  $p+f$  e  $f$  da equação de Edmundson (1), onde o índice  $p = 1$  expressa o tamanho individual da partícula em função do seu comprimento e o índice  $f = 3$  indica a freqüência de distribuição de tamanho expressa pelo volume e pela massa das partículas.

$$D[p + f, f] = \left( \frac{\sum nd^{p+f}}{\sum nd} \right)^{1/p} \quad (1)$$

Encontram-se valores de diâmetro de partícula que variam entre 0,1 até 600  $\mu\text{m}$ . Entretanto, a grande maioria dos trabalhos relata a preparação de partículas com tamanhos entre 1 e 100  $\mu\text{m}$ . (O'Donnell e McGinity, 1997; Hickey *et al.*, 2002; Rosca *et al.*, 2004; Siepman *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005)

A análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) também é uma técnica empregada na caracterização de micropartículas poliméricas carreadoras de fármacos. No que concerne à utilização de micropartículas de blendas de polímeros essa análise permite obter informações preciosas sobre a miscibilidade dos componentes da blenda. Um parâmetro utilizado para identificar a miscibilidade de blendas, por exemplo, é a variação da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). Quando o termograma de dois polímeros apresenta aproximação dos valores de  $T_g$  ou supressão dos picos característicos de  $T_g$  substituídos por um pico apenas, significa que a blenda é miscível (Hatakeyama e Quinn, 1999). Caso haja miscibilidade, a blenda apresentará apenas uma  $T_g$  situada em temperaturas intermediárias às  $T_g$  dos polímeros individuais (Kumagai e Doi, 1992; Vogelsanger *et al.*, 2003).

A  $T_g$  representa a temperatura na qual as cadeias poliméricas apresentam uma combinação de energia (vibracional, translacional, rotacional, etc) igual às forças de atração (forças dispersivas, interações polares, interações específicas, etc) (Olabisi *et al.*, 1979). O estado de um polímero em temperaturas acima da  $T_g$  apresenta flexibilidade e elasticidade, com relativa liberdade de rotação entre as ligações carbono-carbono das cadeias. Por outro lado, abaixo da  $T_g$ , apresenta-se duro e quebradiço, restando apenas a movimentação através de vibrações dos átomos nas suas posições de equilíbrio. A  $T_g$  é encontrada em todos os polímeros amorfos e nas regiões amorfas de polímeros parcialmente cristalinos. Termodinamicamente, é uma transição de segunda ordem, porém é mais apropriado tratá-la como um fenômeno cinético, pois é influenciado pelas taxas de aquecimento e resfriamento (Ford e Timmins, 1989; Martin, 1993).

Existem relatos sobre o comportamento térmico envolvendo aditivos incorporados em matrizes poliméricas. Esse aditivo pode funcionar tanto como

plastificante quanto como antiplastificante, dependendo de suas características físico-químicas e da quantidade empregada. Normalmente a característica resultante da inclusão de moléculas em polímeros é a redução da Tg, ou seja, o aumento da plasticidade, porém, diversos estudos denotam a ocorrência do efeito antiplastificante (Garcia *et al.*, 2004; Slark, 1997). Num estudo avaliando o efeito antiplastificante de um soluto em filmes poliméricos, os autores relataram a ocorrência de aumento da Tg do polímero, o que indicou um aumento da afinidade entre o soluto e o polímero. Considerando o sistema como uma blenda soluto-polímero, os autores propuseram uma representação da estrutura tridimensional na qual as moléculas do soluto estariam agindo cooperativamente na redução da extensão rotacional dos segmentos da cadeia polimérica. Esta ação estaria causando um aumento da Tg da blenda em relação ao polímero puro (Slark, 1997). Volume livre refere-se ao espaço ocupado pela cadeia polimérica nas regiões amorfas onde há possibilidade de movimentação dos segmentos da cadeia. A adição de antiplastificantes leva à redução desses espaços livres, ocasionando diminuição do movimento Browniano e aumentando a Tg do polímero (Stepek e Daoust, 1983).

A cristalinidade dos polímeros empregados em sistemas carreadores de fármacos também pode ser determinada através da análise térmica. O efeito sobre a cristalinidade de polímeros em função da presença de fármacos incorporados é conflitante (Akhtar *et al.*, 1992; Ginés *et al.*, 1996). Alguns autores relatam a redução da cristalinidade de micropartículas poliméricas devido à presença de fármacos. Essa redução da cristalinidade está relacionada com a presença de uma espécie diferente (fármaco) que causa uma diminuição no crescimento dos cristalitos do polímero durante a organização das lamelas. Cabe salientar que este efeito depende das condições de cristalização, pois a velocidade de formação dos cristais vai conduzir a uma maior ou menor expulsão das espécies para as fronteiras dos cristalitos (Liggins e Burt, 2004). Em contrapartida, em outros trabalhos verifica-se o aumento da cristalinidade em decorrência da incorporação de fármaco (Frank *et al.*, 2005). Nesse caso, pressupõe-se a atuação de cristais de fármaco como agentes de nucleação dos cristalitos do polímero. A ocorrência de um ou outro fenômeno depende de diversos fatores, dentre



os quais, as características físico-químicas do fármaco e do polímero envolvidos (Akhtar *et al.*, 1992; Ginés *et al.*, 1996).

No que concerne a obtenção de perfis de liberação de fármacos a partir de micropartículas, diferentes tipos de experimento podem ser conduzidos. Estes perfis fornecem a fração de fármaco liberada em função do tempo, sob condições pré-estabelecidas. Alguns estudos focados em perfis de liberação de fármacos empregam o método de dissolução de pás e cestas, um sistema fechado, preconizado pela Farmacopéia Americana (USP XXV) (Zahirul e Khan, 1996). Uma alternativa a esta metodologia é o uso de célula de fluxo modificada (Möller e Wirbitzki, 1993), preconizado pela Farmacopéia Americana (USP XXV), que consiste em um sistema aberto e possibilita a variação do meio de dissolução. Os meios de dissolução usados em estudos de liberação *in vitro* podem variar em função da via de administração requerida (Komuro *et al.*, 1991). A Farmacopéia Americana propõe o uso de soluções aquosas (faixa de pH entre 4 e 8), sendo que meios hidroalcoólicos são desaconselhados. A adição de tensoativos ou eletrólitos deve ser feita com parcimônia, considerando o poder discriminatório do teste.

Dentre as metodologias analíticas usadas na quantificação do fármaco está a espectrofotometria na região do ultravioleta, a qual requer validação, a fim de verificar a linearidade, a precisão e a exatidão dos resultados (Lamprecht *et al.*, 2000; Morales *et al.*, 2004).

#### **3.1.4 Micropartículas de poli(hidroxicanoato)**

Alguns autores empregam o termo poli(hidroxicanoato) (PHA) para designar poliésteres produzidos por condensação de hidróxiácidos, englobando os homopolímeros PLA, PGA e PHB e seus copolímeros na mesma classe (Ueda e Tabata, 2003). Entretanto, é mais comum encontrar na literatura estudos que usam o termo PHA para designar exclusivamente o PHB e seus copolímeros P(HBHV), que são

poliésteres sintetizados por bactérias (Chandra e Rustgi, 1998; Edlund e Albertsson, 2002).

O PHB (Figura 1) é um polímero cuja ocorrência na forma de inclusões sólidas em *Azotobacter chroococcum* foi relatada, pela primeira vez, por Meyer<sup>1</sup> e data do início do século passado (1903), fato este que atesta o grande número de estudos que vêm sendo conduzidos desde então utilizando estes polímeros (Meyer *apud* Sudesh *et al.*, 2000).

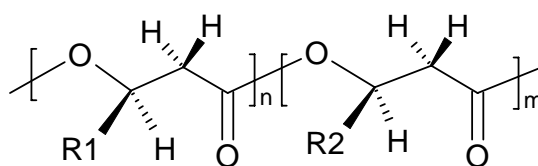


Figura 1. Estrutura química do poli(hidroxicanoato). R1 = metil, [poli(hidroxicbutirato)] (PHB), R2 = etil, [poli(hidroxicvalerato)] (PHV).

A estrutura do poli(hidroxicbutirato), o poli(hidroxicanoato) mais comumente encontrado como substância de reserva em bactérias foi identificada em 1926 por Lemoigne. Em 1959, foi descoberto seu papel como substância de reserva de carbono e energia na espécie *Bacillus* (Doudoroff, 1959) e, entre 1960 e 1980, foi evidenciada sua biodegradabilidade. Nessa época, iniciou-se a utilização desses materiais na produção industrial de copolímeros (Baptist, US Patent *apud* Sudesh *et al.*, 2000<sup>2</sup>).

O fato de esses polímeros serem produzidos por via biossintética ao invés de síntese química tem como vantagem a não utilização de catalisadores e iniciadores, devido à toxicidade associada a esses. Além disso, há uma vantagem estereoquímica, que resulta em produtos enantiomericamente puros pela ação estereosseletiva das

<sup>1</sup> Meyer A. Praktikum der botanischen bakterienkunde. Jena, 1903. *apud* Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Sciences**, v. 25, p. 1503-1555, 2000.

<sup>2</sup> Baptist, J. N. Process for preparing poly-b-hydroxybutyric acid. US Patent No. 3, 036, 959, 1962a. Baptist, J. N. Process for preparing poly-b-hydroxybutyric acid. US Patent No. 3, 044, 959, 1962b. Baptist, J.N. Molded product containing poly-b-hydroxybutyric acid and method of making. US Patent No.3,107, 172. 1963. Baptist, J.N. Plasticized poly-b-hydroxybutyric acid and process. US Patent No. 3,182, 036, 1965. *apud* Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y. Síntesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Sciences**, v. 25, p. 1503-1555, 2000.

enzimas bacterianas. Outra razão pelo interesse nestes materiais resulta da sua ocorrência natural do ácido hidroxibutírico no corpo humano (Pouton e Akhtar, 1996).

A degradação hidrolítica do PHB conduz ao monômero ácido *D-(-)-3*-hidroxibutírico que é um constituinte normal do sangue (Pouton e Akhtar, 1996). Devido à sua biodegradabilidade, inúmeros trabalhos foram desenvolvidos, com o PHB (Baptist, 1962a, 1962b, 1963, 1965), entretanto um fator limitante ao seu uso é a alta cristalinidade, que o torna rígido e quebradiço (King, 1982).

As primeiras alternativas para aprimorar as características apresentadas pelo PHB consideraram a sua copolimerização com o hidroxivalerato P(HBHV), conduzindo a materiais com menor cristalinidade, pontos de fusão mais baixos, mais dúcteis e fáceis de moldar, conferindo características termoplásticas superiores (Holmes, 1985; Doi *et al.*, 1988; Luzier, 1992). As possibilidades de emprego destes materiais, geradas por essas modificações, levaram ao crescente interesse acerca desta classe de materiais.

O uso dos PHA como carreadores de fármacos remonta do início da década de 80, derivado de estudos conduzidos por Korsatko e colaboradores (1983) empregando comprimidos matriciais de liberação sustentada. Juni e colaboradores (1986) prepararam micropartículas de PHB contendo aclarubicina pelo método de emulsificação/evaporação de solvente (Juni *et al.* 1986 *apud* Arshady, 1991)<sup>3</sup>. A eficiência de encapsulação atingida foi de 11 % e a liberação do fármaco foi extremamente lenta devido à elevada massa molar do polímero empregado (440.000 Da).

Brophy e Deasy (1986) obtiveram micropartículas de PHB e P(HBHV) contendo sulfametizol por emulsificação/evaporação de solvente. Verificaram, mediante análise por MEV, a presença de cristais na superfície das estruturas, os quais explicaram a

---

<sup>3</sup> Juni, K.; Nakano, M.; Kubota, M. Controlled release of aclarubicin, an anticancer antibiotic from poly(hydroxybutyric) acid microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 4, p 25-32, 1986. *apud* Arshady, R. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules 2. Polylactides and related polyesters. **Journal of Controlled Release**, v. 17, n. 1, p. 1-21, 1991.

ocorrência de efeito *burst*, durante a liberação *in vitro*. A fim de reduzir a liberação inicial, fizeram o recobrimento das micropartículas com PLA. Obtiveram eficiência de encapsulação em torno de 50 % que foi considerada baixa devido à alta cristalinidade apresentada pelo polímero. O perfil de liberação *in vitro* das micropartículas não revestidas demonstrou liberação completa após 10 horas de experimento. Durante o mesmo período, as amostras revestidas apresentaram liberação de aproximadamente 30 %. Após a administração das micropartículas não revestidas a cães, os perfis de concentração plasmática demonstraram que a absorção *in vivo* e a dissolução *in vitro* do fármaco foram similares.

Gangrade e Price (1991) prepararam por emulsificação/evaporação de solvente microesferas de PHB e de copolímeros de PHB contendo 9 e 24 mol% de hidroxivalerato (HV). Empregaram dois tipos de solvente na fase orgânica (diclorometano e clorofórmio) e constataram por MEV que o uso de clorofórmio conduziu a micropartículas com superfície menos porosa e, conseqüentemente, a menores taxas de liberação. No que se refere ao efeito da presença de HV sobre os perfis de liberação da progesterona foi observado que as micropartículas preparadas com PHB e P(HBHV) contendo 24 mol% de HV apresentaram taxas de liberação superiores do que as micropartículas preparadas com 9 mol% de HV. Esse resultado foi relacionado à menor porosidade dessa última formulação. Foi sugerido que a presença de HV na proporção de 9 mol% conferiu um efeito plastificante ótimo devido à formação de uma matriz mais homogênea. Neste trabalho também foi determinada, pela primeira vez, por cromatografia gasosa, a presença de solvente orgânico remanescente nas micropartículas. Não foi detectada a permanência de diclorometano residual nas microestruturas submetidas à temperatura de 40 °C, durante 30 minutos.

Gürsel e Hasirci (1995) prepararam por emulsificação/evaporação de solvente e caracterizaram micropartículas de PHB e P(HBHV) contendo 2,7-diclorofluoresceína em diferentes concentrações e incorporando aos sistemas o polifosfato de cálcio, um complexo formador de canais. Verificaram, por DSC, que a conversão do polímero nas microcápsulas levou à redução da temperatura de fusão em 1-2 °C. Essa redução foi mais evidente após a incorporação, tanto do 2,7-diclorofluoresceína, quanto do

polifosfato de cálcio nas microcápsulas, indicando redução na cristalinidade do polímero. Os perfis de liberação demonstraram que quanto menor a concentração de 2,7-diclorofluoresceína nas microcápsulas preparadas com PHB maior foi a liberação do fármaco modelo. Os autores observaram que o uso do copolímero P(HBHV) na preparação das micropartículas levou à encapsulação mais eficiente do 2,7-diclorofluoresceína e reduziu sua taxa de liberação, em relação aos sistemas preparados com o homopolímero PHB. Este resultado foi relacionado à maior homogeneidade da microestrutura propiciada pelo copolímero, devido à sua menor cristalinidade.

Conway e colaboradores (1997) conduziram um estudo comparativo entre a resposta imune elicitada pelo antígeno albumina sérica bovina encapsulado em micropartículas de PLA e de PHB, após administração intramuscular em camundongos. De um modo geral, a incorporação da albumina sérica bovina nas micropartículas conduziu ao aumento da resposta imune, quando comparada com aquela elicitada pelo antígeno puro. Este fato se deve à propriedade adjuvante das micropartículas na estimulação da resposta imune, devido à redução da liberação dos antígenos encapsulados. A administração das micropartículas preparadas com PHB conduziu a um pico de concentração sérica de IgG após 40 dias de imunização enquanto que para as micropartículas de PLA o pico ocorreu após 58 dias. Mediante análise por cromatografia de interação hidrofóbica, verificaram que as micropartículas constituídas de PHB são mais hidrofóbicas do que aquelas feitas com PLA. A hidrofobicidade superior das micropartículas de PHB levaria a uma maior captura pelos macrófagos conduzindo a uma resposta imune mais efetiva. Também foram medidas as variações de pH no meio de liberação, durante 40 dias, para avaliar a liberação de monômeros ácidos decorrentes da degradação dos polímeros. A menor variação de pH ocorreu no meio de liberação contendo as micropartículas de PHB, devido à sua lenta degradação, indicando um micro-ambiente mais adequado ao uso de proteínas.

Sendil e colaboradores (1999) prepararam, por emulsificação dupla a/o/a, micropartículas de P(HBHV) com 7, 14 e 22 % de HV, contendo tetraciclina nas formas ácida e neutra e avaliaram a influência de diferentes agentes emulsificantes [gelatina e

poli(álcool vinílico) (PVA)] na eficiência de encapsulação do fármaco. Observaram que houve uma concentração ótima de emulsificante, em torno de 1-2%, que favoreceu a encapsulação do fármaco. Verificaram que os resultados de liberação são expressos mais adequadamente pelas equações de liberação de Higuchi, as quais dependem das características de difusão de matrizes esféricas. A utilização da forma neutra da tetraciclina forneceu taxas de liberação mais lentas do que a forma ácida. Quando as micropartículas foram preparadas com tetraciclina ácida, observou-se uma velocidade de liberação menor para as formulações contendo HV a 14 %. Por outro lado, as micropartículas preparadas com tetraciclina neutra, empregando a formulação HV a 14 % apresentaram maior velocidade de liberação. Estes resultados demonstraram a alta influência da solubilidade do fármaco nos perfis de liberação e também a influência complexa da presença do hidroxivalerato nas características de encapsulação.

Uma técnica diferenciada para preparação de micropartículas de PHB contendo dinitrato de isossorbida foi proposta por Kim e colaboradores (2000). Neste processo, grânulos de PHB obtidos a partir de cultura de *Ralstonia eutrofa*, foram extraídos da biomassa e, após sua ressuspensão em água destilada, foram nebulizados. Estas partículas apresentaram estreita faixa de tamanho, com valores entre 0,6 e 1,1  $\mu\text{m}$ . A seguir, uma suspensão contendo os grânulos nebulizados e o fármaco, em acetona, foi submetida à evaporação a pressão reduzida. Esta técnica forneceu micropartículas com baixa capacidade de incorporação (aproximadamente 3 %), porém a eficiência de encapsulação foi elevada (em torno de 87 %). As micropartículas obtidas por esta técnica apresentaram liberação de 80 % do dinitrato de isossorbida até 12 horas de experimento, enquanto que o dinitrato de isossorbida puro apresentou dissolução total em 30 minutos. Estes resultados mostraram a potencialidade do uso dessas micropartículas como sistemas de liberação sustentada de fármacos.

Micropartículas de PHB preparadas por emulsificação/evaporação de solvente a partir de emulsões o/a e a/o/a, contendo hormônio folículo-estimulante foram avaliadas considerando suas características físicas e químicas (Martin *et al.*, 2000). A análise por difratometria de raios-X das micropartículas obtidas, comparadas com o polímero íntegro, demonstrou que a formação das micropartículas reduziu a cristalinidade do

polímero. Esta alteração no retículo cristalino foi corroborada pelos resultados obtidos por DSC, sendo que a metodologia de emulsificação dupla conduz a alterações mais evidentes do que a emulsificação simples. A superfície rugosa, evidenciada por MEV, foi explicada pela elevada cristalinidade do PHB, visto que polímeros amorfos, como o PLA, fornecem micropartículas de superfície lisa. A análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrou uma estrutura interna multivesicular para as micropartículas obtidas por emulsificação múltipla, denotando a formação de microcápsulas, enquanto que aquelas obtidas por emulsificação simples formaram estrutura matricial.

Micropartículas de PHB e P(HBHV) foram preparadas por emulsificação/evaporação de solvente (Maia *et al.*, 2004). As características das micropartículas foram correlacionadas a alterações nas condições do processo de obtenção. Foi verificado que as micropartículas podem ter o tamanho controlado mediante alterações na concentração do agente emulsificante (PVA), na temperatura e na composição do solvente. As concentrações de PVA avaliadas foram 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 % (m/v). Foi observada uma redução de 389  $\mu\text{m}$  para 38  $\mu\text{m}$  no diâmetro das micropartículas quando variou-se a concentração de PVA de 0,5 % (m/v) para 2,0 % (m/v). Isto é explicado pela melhor estabilização do sistema, que reduz a coalescência das gotículas da emulsão. A variação da temperatura de 40 °C para 50 °C levou a uma redução no tamanho das gotículas da emulsão observadas mediante microscopia óptica durante a evaporação do solvente. Entretanto, o valor final do diâmetro das micropartículas obtidas foi semelhante. O emprego de uma mistura de clorofórmio com acetona como fase orgânica, no lugar de clorofórmio, conduziu à redução no diâmetro médio das micropartículas de 22  $\mu\text{m}$  para 15  $\mu\text{m}$ . Esse comportamento foi atribuído à rápida difusão da acetona para fora das gotículas de emulsão, devido à sua miscibilidade com a fase contínua aquosa.

### 3.1.4.1 Micropartículas de blendas de P(HBHV) e PCL

Blendas são misturas de diferentes homopolímeros ou copolímeros (Olabisi, 1979). Blendas poliméricas podem existir em uma única fase de íntimo contato entre os dois componentes. Tal mistura é considerada homogênea em escala microscópica e miscível no sentido termodinâmico. As propriedades térmicas e mecânicas do material obtido constituem uma mescla das propriedades de cada componente da blenda. Por outro lado, quando uma mistura de dois polímeros apresenta duas fases distintas a blenda é dita heterogênea, em escala microscópica, e imiscível, em termos termodinâmicos. A maioria das blendas poliméricas é heterogênea, e apesar de não apresentarem miscibilidade, os dois polímeros podem demonstrar compatibilidade e fornecer materiais com características favoráveis (Verhoogt *et al.*, 1994). Um parâmetro utilizado para identificar a miscibilidade de blendas é a variação da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), determinada por DSC. Quando o termograma de dois polímeros apresenta aproximação dos valores de  $T_g$  individuais ou supressão dos picos característicos de  $T_g$  substituídos por um pico apenas, significa que a blenda é miscível (Hatakeyama e Quinn, 1999). Em alguns estudos, a variação da temperatura de fusão também é empregada para estimar a miscibilidade da blenda (Chun e Kim, 2000).

A utilização de polímeros em sistemas de liberação de fármacos exige uma série de requisitos, os quais nem sempre são atendidos por um único polímero. Inúmeros estudos têm sido conduzidos utilizando blendas de polímeros biodegradáveis (Lavelle *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 2001; Lin e Lee, 2003). O seu emprego em sistemas de liberação controlada de fármacos permite que sejam incorporados novos insumos farmacêuticos à terapêutica, em função da crescente demanda de matérias-primas que se ajustem aos novos sistemas carreadores de fármacos que vêm sendo desenvolvidos (Muzzio *et al.*, 2002). A obtenção de blendas poliméricas permite combinações de propriedades, conduzindo a materiais com características superiores daquelas apresentadas pelos componentes puros. Estas alterações significam o controle da liberação de fármacos, adequando as formulações ao uso terapêutico pretendido (Cha & Pitt, 1990).





cristalização do PHB. Também foi visto que o grau de cristalinidade da PCL tende a aumentar com o aumento do conteúdo de PHB (Vogelsanger *et al.*, 2003).

Atkins e Peacock (1997) avaliaram a degradação *in vitro* de micropartículas de P(HBHV) com 20 % de PCL contendo albumina sérica bovina, preparadas por emulsificação/evaporação de solvente. Os autores monitoraram a degradação em tampão Hank's pH 7,4 através de microscopia eletrônica e pelo percentual de perda de massa. Os estudos foram conduzidos empregando amostras coletadas após 9, 16, 23 e 30 dias de incubação, a 37 °C. Verificaram mediante microscopia eletrônica que, somente após transcorridos 30 dias, houve aumento do número de poros, porém, entretanto sem perda significativa de massa. Em um outro estudo, Maia e colaboradores (2004) avaliaram a degradação *in vitro* de micropartículas de P(HBHV) em tampão Hanks, pH 7,4 a 37 °C. Após transcorridos 30 dias, foi verificado a perda de massa de 6,0 % nas micropartículas de P(HBHV) e mediante observação por microscopia eletrônica os autores evidenciaram a manutenção da forma esférica e da estrutura de poros, sem erosão da superfície, denotando a lenta degradação deste material.

Embleton e Tighe (1993) prepararam microcápsulas empregando blendas de PHB ou P(HBHV) com PCL por emulsificação dupla. Verificaram rendimento superior na obtenção de micropartículas a partir de blendas do que aquele fornecido pelas micropartículas contendo apenas PHB ou P(HBHV). Foi observado que a presença de PCL em diferentes proporções conduziu à formação de micropartículas com porosidade controlada. Blendas de P(HBHV):PCL, em razões decrescentes de 90:10, 80:20, 70:30, 60:40 até 50:50, mostraram a ocorrência de aumento gradual na porosidade das micropartículas. A fim de explicar a ocorrência de poros nas micropartículas, consideraram a influência da solubilidade dos polímeros no solvente orgânico, velocidade de evaporação do solvente e a viscosidade da fase orgânica, no momento da emulsificação. A formação de poros segue um mecanismo segundo o qual a difusão do solvente para fora das gotículas da emulsão leva à precipitação do polímero menos solúvel (PCL) em microrregiões. O aumento da viscosidade no interior da gotícula reduz a mobilidade do polímero de forma que as microrregiões de PCL conservam-se

homogeneamente distribuídas no interior da gotícula rica em P(HBHV). Num segundo momento, a evaporação do solvente remanescente leva à precipitação do P(HBHV) que está em maior proporção e que formará a estrutura da micropartícula. A imiscibilidade entre os polímeros leva à separação das regiões adjacentes entre eles, deixando uma superfície microporosa.

Ré e colaboradores (2004) prepararam e caracterizaram micropartículas de P(HBHV) e de blendas de P(HBHV) com 10 e 20 % de PCL. A análise térmica das micropartículas demonstrou que não houve alteração da cristalinidade do P(HBHV) em função da presença de PCL nas formulações. Foi demonstrado que a presença de PCL em proporções crescentes conduz ao aumento da área superficial das micropartículas. Esse resultado foi relacionado com a degradação *in vitro* (tampão Hanks), durante 35 dias, que foi medida através do percentual de perda de massa. Foi verificada uma perda de massa de 2,5 % para as micropartículas de P(HBHV) e de 4,0 % para micropartículas de blenda de P(HBHV) com 20 % de PCL. A maior degradação hidrolítica apresentada pelas micropartículas de P(HBHV):PCL na proporção 80:20 foi decorrente do maior acesso do tampão Hanks às micropartículas. Foi demonstrado que a obtenção de sistemas com porosidade controlada constitui uma abordagem interessante no controle da degradabilidade das micropartículas.

### **3.1.5 Fármacos**

A dexametasona é um esteróide, derivado do núcleo ciclopentanoidrofenantreno que apresenta atividade glicocorticóide e antiinflamatória. Os efeitos antiinflamatórios são decorrentes da estimulação da biossíntese da proteína lipomodulina que, por sua vez, inibe a ação enzimática da fosfolipase A<sub>2</sub>. Deste modo é impedida a liberação de ácido araquidônico e, em conseqüência, não se formam seus metabólitos, como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, que são mediadores da inflamação (Korolkovas, 2001).

A dexametasona (Figura 3 A) apresenta massa molar de 392,47 g/mol. Pode ser caracterizada como um pó cristalino branco ou quase branco e inodoro, praticamente insolúvel em água; facilmente solúvel em etanol, acetona, dioxano e metanol; levemente solúvel em clorofórmio; muito solúvel em éter. Sua solubilidade em água é de 1 mg/mL e seu coeficiente de partição octanol-tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C é de 1,33. Deve ser protegida da luz (Martindale, 1996; Einmahl *et al.*, 1999). O acetato de dexametasona (Figura 3 B) tem massa molar de 434,51 g/mol. Apresenta-se como um pó branco a levemente amarelado e é mais hidrofóbica do que na forma dexametasona. É livremente solúvel em acetona, dioxano e metanol e praticamente insolúvel em água. Sua solubilidade em água é de 0,1 mg/mL e seu coeficiente de partição octanol-tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C é de 2,65 (Martindale, 1996; Einmahl *et al.*, 1999).

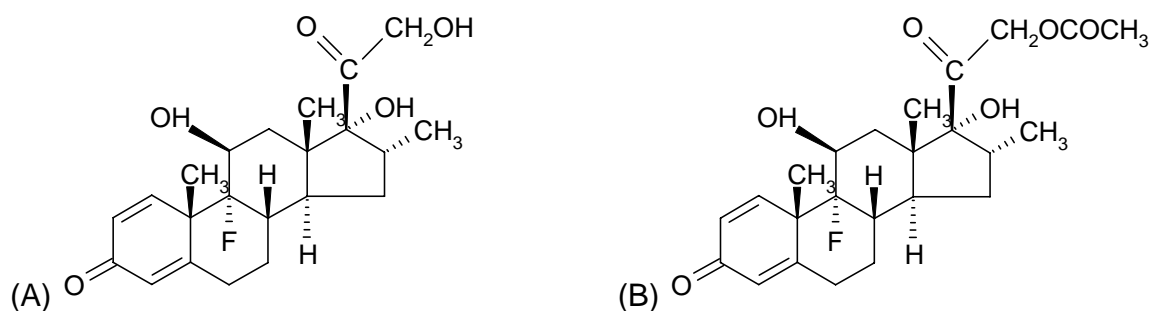


Figura 3. Estrutura química da dexametasona (A) e do acetato de dexametasona (B).

Einmahl e colaboradores (1999) demonstraram a influência significativa das características físico-químicas de diferentes formas de dexametasona (dexametasona, fosfato de dexametasona e acetato de dexametasona) associadas a matrizes de poli(orto-ésteres). Neste estudo, verificaram a influência das propriedades de acidez e basicidade, bem como o balanço hidrófilo-lipófilo dos fármacos sobre a degradação e erosão do polímero. Os estudos de liberação, após 96 horas em tampão pH 7,4, demonstraram uma rápida liberação apresentada pela dexametasona (90 %), uma lenta liberação apresentada pelo fosfato de dexametasona (20 %) e a ausência de liberação do acetato de dexametasona. A maior liberação apresentada pela dexametasona em relação ao fosfato foi explicada pela acido-basicidade de cada fármaco. A

dexametasona é neutra enquanto que o fosfato de dexametasona é básico e essas características podem influenciar na degradação do polímero ao qual os fármacos estão associados. Assim, a basicidade do fosfato de dexametasona levou a um tamponamento do microambiente durante a liberação, protegendo as ligações éster do polímero da hidrólise e retardando a liberação do fosfato. A dexametasona, por ser neutra, não apresentou tal efeito sobre a degradação polimérica e foi liberada rapidamente. Entretanto, os autores atribuíram a ausência de liberação do acetato de dexametasona à sua natureza altamente hidrofóbica, impedindo o acesso do meio de liberação à matriz polimérica. Dessa forma, tanto a liberação do fármaco, quanto a degradação da matriz polimérica foram dificultadas. Este estudo demonstrou a influência das propriedades físico-químicas dos fármacos sobre a sua liberação e sobre a degradação de polímeros erodíveis.

A utilização de P(HBHV) e de blendas de P(HBHV) com PCL na obtenção de micropartículas por emulsificação/evaporação permite controlar a porosidade, morfologia superficial e área específica. Essas características são interessantes no desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos. A associação dessas micropartículas a modelos de fármacos com diferentes propriedades físico-químicas como a dexametasona e o acetato de dexametasona constitui uma perspectiva interessante no estudo de sistemas de liberação controlada.



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

---





## **4.1 Materiais**

### **4.1.1 Matérias-primas**

Fármacos modelo: dexametasona (DX) e acetato de dexametasona (ADX) (Henrifarma, São Paulo, Brasil)

Polímeros: Poli(hidroxitirato-co-hidroxitirato) P(HBHV) [9,8 % HV] MM 273.000\*.

Poli( $\epsilon$ -caprolactona) MM 65.000 (Aldrich, Estrasburgo, França)

Estabilizante: poli(álcool vinílico) (PVA) altamente hidrolisado MM 40.000 (Delaware, Porto Alegre)

### **4.1.2 Aparelhos e equipamentos**

- Agitador magnético (Fisaton modelo 752A) (Instituto de Química – UFRGS);

---

\*Gentilmente cedido pela PHB Industrial ao IPT-SP para o desenvolvimento dos projetos vinculados à “Rede Cooperativa para aplicação de poli(hidroxicanoatos) (PHAs) no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de ativos”.

- Balança analítica AY220 SPM Shimadzu (Tóquio, Japão) (Instituto de Química – UFRGS);
- Evaporador rotatório Büchi R-114 (Instituto de Química – UFRGS);
- Calorímetro exploratório diferencial com compensação de potência Perkin-Elmer modelo DSC-4 acoplado a microprocessador de controle Thermal Analysis System 4 e estação de dados 3700 (Norwalk, EUA) (Instituto de Química – UFRGS);
- Equipamento para avaliação de liberação *in vitro*, composto de bomba peristáltica Desaga, células de fluxo, pêndulo automático Desaga (Münster, Alemanha) e aquecedor com misturador para banho de água Fisatom (Colaboração com a Profa. Sílvia Guterres);
- Equipamento de difratometria de *laser* Malvern Mastersizer 2000 (Malvern, Inglaterra) (IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas);
- Espectrofotômetro no infravermelho, FT-IR 8300 Shimadzu (Kioto, Japão). (Instituto de Química – UFRGS);
- Espectrofotômetro na região do ultravioleta-visível UV-1601 PC Shimadzu (Kioto, Japão). (Instituto de Química – UFRGS);

- Evaporador rotatório Büchi R-114 (Flawil, Suíça);
- Metalizador Jeol Jee 4B SVG-IN (Tóquio, Japão) (Centro de Microscopia Eletrônica – UFRGS);
- Microscópio eletrônico de varredura Jeol Scanning Microscope, JSM-5800 (Tóquio, Japão) (Centro de Microscopia Eletrônica – UFRGS);
- Microscópio óptico Olympus® mod. BX41 com câmera fotográfica Olympus® mod. PM20 (Tóquio, Japão) (Instituto de Química – UFRGS) ;
- Linha de vácuo, constituída de tubulação de vidro dotada de torneiras para regulagem da entrada e saída de gases, conectada a uma bomba de vácuo turbomolecular Edwards 1.5 EXC 120, barômetro capilar de mercúrio e balão contendo nitrogênio gasoso (Porto Alegre, Brasil) (Instituto de Química – UFRGS).

#### **4.1.3 Solventes e outros materiais**

- Clorofórmio p.a. (Nuclear®);
- Etanol p.a. (Nuclear®);

- Fosfato de potássio monobásico (Nuclear<sup>®</sup>);
- Hidróxido de sódio (Nuclear<sup>®</sup>)

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Obtenção das micropartículas

As micropartículas foram preparadas pelo método de emulsificação/evaporação de solvente, relatado anteriormente por Ré e colaboradores (2004). A composição quantitativa das formulações está expressa na Tabela 1 e o esquema de preparação está representado na Figura 4. Os polímeros (400 mg) e o fármaco (40-44 mg) foram dissolvidos em clorofórmio a 50 °C. Paralelamente foram preparados 40 mL de uma solução aquosa de PVA 1,0 % (m/v). A fase aquosa foi vertida gota-a-gota, através de funil de adição sobre a fase orgânica. A emulsão resultante foi mantida sob agitação a 1200 rpm a 50 °C durante 10 minutos. A seguir, o clorofórmio foi eliminado em evaporador rotatório. As micropartículas foram lavadas com 150 mL de água, filtradas (25 µm), mantidas em dessecador por 24 horas e armazenadas para as análises. Micropartículas sem fármaco também foram preparadas seguindo-se a mesma metodologia. Foram preparados dois conjuntos de formulações empregando-se volumes diferentes de fase orgânica. No primeiro foram empregados 10 mL e no segundo 40 mL de clorofórmio, resultando em razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:4 (v/v) e de 1:1 (v/v).

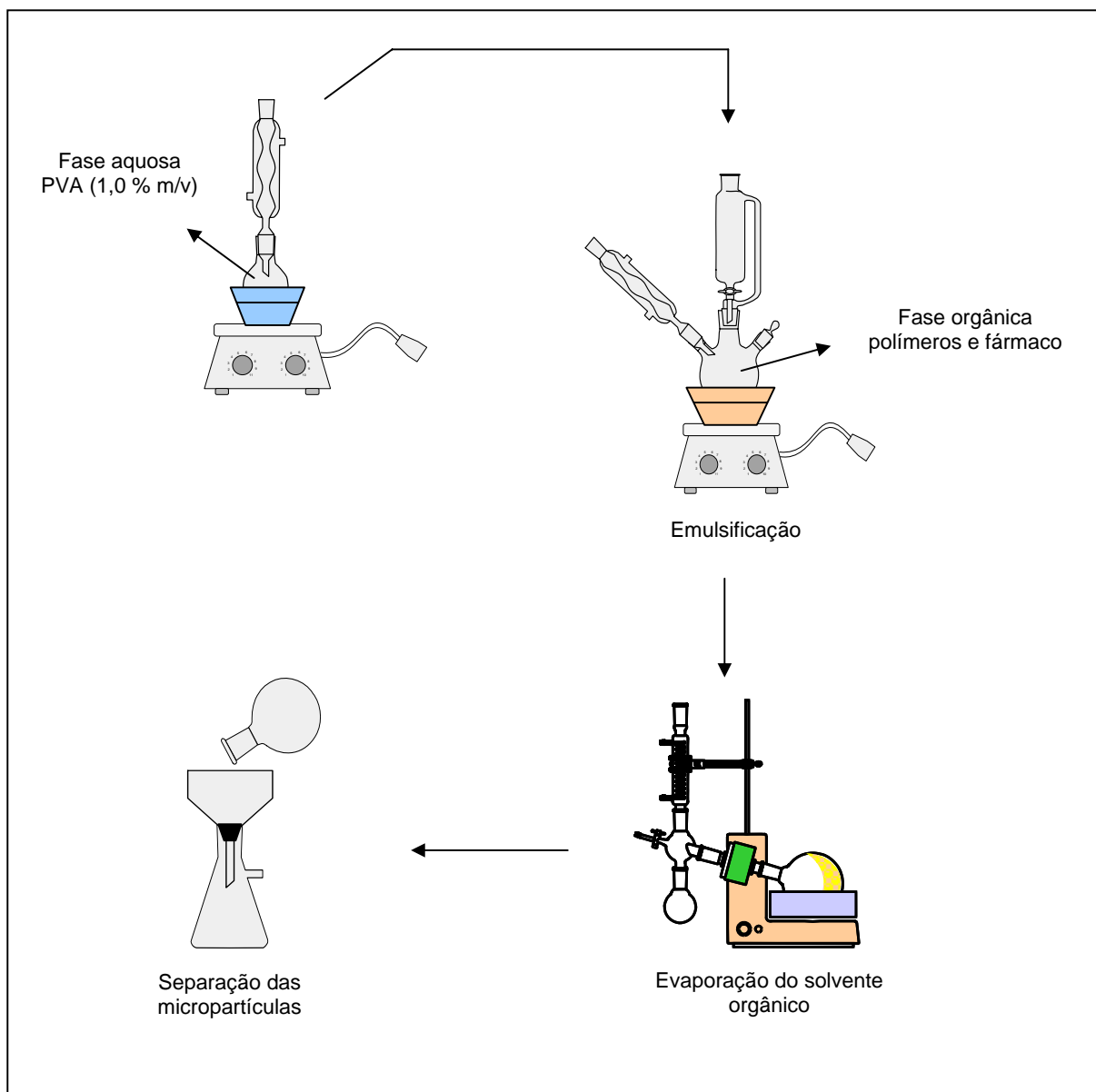


Figura 4. Preparação das micropartículas por emulsificação/evaporação de solvente.

Tabela 1. Composição quantitativa das formulações de micropartículas.

	Fase orgânica (mg)				Fase aquosa (mg)	Razão entre as fases orgânica e aquosa (v/v)
	PHBHV	PCL	DX	ADX	PVA	
FB-0-10	400	0	-	-	40	1:4
FB-1-10	360	40	-	-	40	1:4
FB-2-10	320	80	-	-	40	1:4
FB-0-40	400	0	-	-	40	1:1
FB-1-40	360	40	-	-	40	1:1
FB-2-40	320	80	-	-	40	1:1
DX-0-10	400	0	40	-	40	1:4
DX-1-10	360	40	40	-	40	1:4
DX-2-10	320	80	40	-	40	1:4
DX-0-40	400	0	40	-	40	1:1
DX-1-40	360	40	40	-	40	1:1
DX-2-40	320	80	40	-	40	1:1
ADX-0-10	400	0	-	44	40	1:4
ADX-1-10	360	40	-	44	40	1:4
ADX-2-10	320	80	-	44	40	1:4
ADX-0-40	400	0	-	44	40	1:1
ADX-1-40	360	40	-	44	40	1:1
ADX-2-40	320	80	-	44	40	1:1

As diferentes formulações são identificadas no texto pela abreviatura do fármaco seguida pelo percentual de PCL presente na blenda. Assim, as formulações contendo dexametasona preparadas com blendas de P(HBHV):PCL nas proporções 100:0, 90:10 e 80:20 (m/m) são, respectivamente, denominadas DX-0, DX-1 e DX-2. As formulações contendo acetato de dexametasona preparadas com blendas de P(HBHV):PCL nas

proporções 100:0, 90:10 e 80:20 (m/m) são, respectivamente, denominadas ADX-0, ADX-1 e ADX-2. Para fins de comparação, foram preparadas formulações sem fármaco com as mesmas proporções de P(HBV) e PCL, as quais foram denominadas FB-0, FB-10 e FB-20. Os números 10 ou 40 que aparecem no final da sigla indicam o volume de fase orgânica empregado na formulação.

## 4.2.2 Caracterização das micropartículas

Os produtos microparticulados foram caracterizados avaliando-se os seguintes parâmetros: rendimento, taxa de encapsulação, análise morfológica, calorimetria diferencial exploratória e determinação do perfil de liberação *in vitro* dos fármacos.

### 4.2.2.1 Determinação do rendimento

O rendimento das micropartículas preparadas com dexametasona e acetato de dexametasona foi calculado através da relação da massa de micropartículas obtidas e a massa total de todos os componentes sólidos utilizados na sua formulação, sem considerar a massa do PVA, que foi removido por lavagem com água, durante a etapa de filtração.

$$R = \frac{M_{exp}}{M_{P(HBV)} + M_{PCL} + M_{fármaco}} \times 100$$

$M_{exp}$  = massa de micropartículas obtida experimentalmente (g)

$M_{P(HBV)}$  = massa de P(HBV) (g)

$M_{PCL}$  = massa de PCL (g)

$M_{fármaco}$  = massa de dexametasona ou acetato de dexametasona (g)

#### 4.2.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação da dexametasona e do acetato de dexametasona foi determinada através do doseamento da concentração de fármaco presente nas micropartículas, após sua dissolução em clorofórmio. Para tanto, 10 mg de micropartículas foram solubilizados em 25 mL de clorofórmio a 37 °C. A solução foi analisada em espectrofotômetro na região do ultravioleta, no comprimento de onda de 260 nm. As análises foram realizadas em triplicata de lote.

A metodologia analítica foi previamente validada, avaliando-se como parâmetros a especificidade, a linearidade, a precisão e a exatidão, descritos na *International Conference on Harmonization* (ICH, 1996) e estão apresentados no Anexo 1.

Tendo em vista que os valores obtidos de eficiência de encapsulação não foram de 100 %, foi realizada a quantificação das perdas do fármaco durante a obtenção das micropartículas. Essas perdas foram avaliadas considerando os resíduos presentes no balão de emulsificação e a análise quantitativa da fase aquosa filtrada, após a precipitação das micropartículas.

Para quantificar as perdas do fármaco no balão de emulsificação, o conteúdo residual deste foi dissolvido em 20 mL de clorofórmio e mantido sob refluxo, a 40 °C, por 15 minutos. A seguir, o conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi ajustado. Após diluição adequada, procedeu-se a análise espectrofotométrica a 260 nm.

Para quantificar as perdas do fármaco na etapa de filtração, foram separados 25 mL da fase aquosa filtrada e submetidos à secagem em evaporador rotatório. O resíduo foi suspenso em 20 mL de clorofórmio, sob refluxo a 40 °C e o conteúdo foi filtrado e



transferido para balão volumétrico de 25 mL. Após diluição adequada, procedeu-se a análise espectrofotométrica a 260 nm.

#### **4.2.2.3 Microscopia óptica**

As micropartículas foram monitoradas através de microscópio óptico (Olympus BX41) dotado de câmera fotográfica (Olympus PM20) a fim de observar e registrar a morfologia, a presença de agregados e/ou de cristais. Para tal, quantidades estabelecidas arbitrariamente foram dispostas diretamente sobre lâmina de vidro e observadas em microscópio óptico, sob luz normal e luz polarizada. Foram obtidas fotografias das amostras em aumento de 30 vezes.

#### **4.2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura**

A análise da superfície, da forma e a presença de poros nas micropartículas foi realizada através de microscópio eletrônico (Jeol Scanning Microscope JSM-5800). As amostras foram dispostas sobre *stubs*, através da adesão dos pós sobre uma camada fina de esmalte contendo grafite. A seguir as amostras foram recobertas com carbono e metalizadas com ouro (Jeol Jee 4B SVG-IN). Foram obtidas fotomicrografias nos aumentos de 200, 800 e 1500 vezes.

#### **4.2.2.5 Difratometria de laser**

A distribuição de tamanho das micropartículas foi determinada em equipamento de difratometria de *laser* (Malvern Mastersizer 2000). As amostras foram dispersas em água e polissorbato 80, homogeneizadas, submetidas a banho de ultrassom e analisadas. Cada leitura foi repetida até fornecer medida constante e as leituras foram realizadas em triplicata.

#### **4.2.2.6 Determinação da área superficial**

As isotermas de adsorção foram determinadas em equipamento volumétrico fabricado por pesquisadores do Instituto de Química (UFRGS), acoplado a linha de vácuo e utilizando nitrogênio como gás de adsorção. As medidas da pressão foram determinadas utilizando-se um barômetro capilar de mercúrio. Os resultados foram comparados a um padrão de referência de alumina. As determinações das áreas específicas de sólidos foram obtidas considerando o tratamento das isotermas pelo método proposto por Brunauer, Emmet e Teller (BET) (Brunauer *et al.*, 1938).

Cerca de 300 mg de amostra foram submetidos à degaseificação à vácuo, à temperatura ambiente (25 °C) pelo período de três horas a fim de eliminar gases e umidade. Transcorrido o tempo de degaseificação, o tubo contendo a amostra foi mergulhado em nitrogênio líquido. Nesta etapa, foi iniciada a adsorção de gás nitrogênio, tendo-se o cuidado de esperar 10 minutos para permitir a estabilização da entrada de nitrogênio (adsorção) na amostra. Para cada medida de pressão, foi tomado o valor de temperatura correspondente, a fim de fazer as devidas correções relativas à expansão e contração do mercúrio. Este procedimento foi repetido para 4 pontos de pressão, quais sejam, 50, 100, 150, 200 mm de Hg.

Os valores das variações de pressão para cada ponto foram aplicados nos cálculos para obtenção dos gráficos de ajustes às equações de BET.

#### **4.2.2.7 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)**

Os termogramas das matérias-primas, das micropartículas e das misturas físicas dos materiais foram obtidos utilizando calorímetro exploratório diferencial (Perkin Elmer DSC-4), com compensação de potência, calibrado com Índio (156,6 °C, energia de transição – 6,80 cal/g). As análises foram realizadas no Laboratório de Medidas Térmicas do Instituto de Química (UFRGS).

Foram pesados exatamente de 1 a 10 mg de amostra e acondicionados em porta-amostras selados de alumínio. Os termogramas foram obtidos durante o primeiro aquecimento e as condições iniciais de análise foram:

- Faixa de aquecimento: –20 a 300 °C;
- Velocidade de aquecimento: 10 °C/min;
- Atmosfera de análise: ar, estático.

#### **4.2.2.8 Perfil de liberação *in vitro* em célula de fluxo**

Os perfis de liberação dos fármacos, a partir das micropartículas, foram avaliados em equipamento dotado de célula de fluxo com mecanismo para movimento pendular, acoplado à bomba peristáltica, em banho termostaticado a  $37 \pm 0,5$  °C. A técnica caracteriza-se por um sistema aberto, pelo qual se faz passar um fluxo contínuo

de uma solução tampão fosfato pH 7,4, a uma taxa constante (1 mL/minuto), garantindo a manutenção de perfeitas condições *sink* ao experimento.

A massa de micropartículas empregada foi determinada em função dos teores de fármaco em cada formulação. Dessa forma, a quantidade de fármaco usada em cada célula foi exatamente cerca de 3,0 mg, para as formulações contendo dexametasona ou 3,3 mg, para as formulações contendo acetato de dexametasona. Os experimentos foram realizados em triplicata de lote e paralelamente foi realizado o mesmo procedimento com as formulações correspondentes sem fármaco a fim de descontar os valores de absorvância relativos aos componentes da formulação.

As alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados (5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos), filtradas e analisadas por espectroscopia no UV (242 nm).

Os métodos analíticos de quantificação foram validados avaliando-se os parâmetros descritos na *International Conference on Harmonization* (ICH, 1996) e estão apresentados no Anexo 2.

#### **4.2.2.9 Perfil de liberação *in vitro* em erlenmeyer**

A metodologia de liberação em erlenmeyer foi empregada para as amostras cuja liberação não foi possível de ser realizada em célula de fluxo. O tempo de liberação total do acetato de dexametasona a partir das formulações ocorreu após 10 dias de experimento, sendo inviável a realização em célula de fluxo. Para fins de comparação, foi analisada a liberação da dexametasona nestas mesmas condições.

O experimento foi realizado em erlenmeyer de 250 mL, com a abertura protegida com filme plástico para impedir a evaporação do meio de liberação. Para evitar o aumento da pressão interna no recipiente foram feitas pequenas perfurações com agulha no filme plástico. Os recipientes foram revestidos com papel alumínio. O

experimento foi realizado em banho termostático a  $37 \pm 0,5$  °C sob agitação magnética (360 rpm) e empregando tampão fosfato pH 7,4 como meio de dissolução.

A massa de micropartículas empregada foi determinada em função dos teores de fármaco em cada formulação. Assim, a quantidade de fármaco usada em cada erlenmeyer foi de 2,0 mg, para as formulações contendo dexametasona ou 2,2 mg, para as formulações contendo acetato de dexametasona. O volume de meio empregado foi de 200 mL.

Alíquotas de 2 mL foram retiradas em intervalos de tempo determinados e houve reposição de meio após a coleta de cada alíquota. Para as formulações contendo DX, os tempos de coleta foram 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos e para o ADX foram 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 48, 50, 52, 54, 56, 72, 74, 76, 78, 96, 104, 120, 128, 144, 152, 168, 176, 192, 200, 216, 224, 240, 248, 264, 272, 288, 296, 312, 320, 336, 344 e 360 horas. A seguir, as amostras foram filtradas e analisadas por espectroscopia no UV (242 nm). Os experimentos foram realizados em triplicata de lote e paralelamente foi conduzida a liberação de formulações correspondentes sem fármaco a fim de descontar os valores de absorvância relativos aos componentes da formulação.

Os métodos analíticos de quantificação foram validados avaliando-se os parâmetros de performance analítica descritos na *International Conference on Harmonization* (ICH, 1996) e estão apresentados no Anexo 2.

#### **4.2.2.10 Avaliação dos perfis de liberação**

A comparação entre os perfis de liberação apresentados pelas diferentes formulações levou em consideração a comparação das constantes cinéticas fornecidas pela modelagem matemática. Os dados experimentais obtidos na determinação dos perfis de liberação foram submetidos à modelagem matemática através do ajuste dos

dados às equações monoexponencial [equação (2)] e biexponencial [equação (3)]. A modelagem matemática foi realizada através do programa Micromath Scientist<sup>®</sup>, avaliando-se a adequação dos modelos aos dados com base nos parâmetros de critério de seleção do modelo (MSC), coeficiente de correlação e ajuste gráfico.

$$C = 100 - (C_o \cdot e^{-kt}) \quad \text{equação (2)}$$

$C$  = concentração de fármaco liberado no tempo  $t$

$C_o$  = concentração inicial de fármaco

$k$  = constante cinética

$$C = 100 - (ae^{-\alpha t} + be^{-\beta t}) \quad \text{equação (3)}$$

$C$  = concentração de fármaco liberado no tempo  $t$

$a, b$  = concentrações iniciais do fármaco nas diferentes pseudo-fases do sistema

$\alpha, \beta$  = constantes cinéticas das pseudo-fases do sistema

Os dados que não apresentaram ajustes adequados aos modelos matemáticos monoexponencial ou biexponencial foram analisados mediante a comparação matemática dos valores de eficiência de dissolução, segundo a equação (4).

$$ED = \frac{\int_0^t y \cdot dt}{y_{100} \cdot t} \times 100 \quad \text{equação (4)}$$

$ED$  = eficiência de dissolução

$y$  = percentual de fármaco dissolvido no tempo  $t$

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**







## **5.1 Preparação e caracterização de micropartículas preparadas com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:4 (v/v)**

As micropartículas de P(HBHV) e de blendas de P(HBHV) contendo 10 e 20 % de PCL foram preparadas com base em metodologia proposta por Ré e colaboradores (2004) e em estudos preliminares estabelecidos por Maia e colaboradores (2004). Os autores evidenciaram que o aumento do percentual de PCL na formulação conduziu ao aumento na porosidade das micropartículas. Tendo em vista a possibilidade de aplicação destes sistemas como carreadores de fármacos visando o controle da liberação a partir de micropartículas com diferentes porosidades, foram preparadas micropartículas contendo dexametasona ou acetato de dexametasona como modelos de fármaco.

A seguir estão descritos os resultados da caracterização das micropartículas de P(HBHV) e de blendas de P(HBHV):PCL nas proporções 90:10 e 80:20 sem fármaco e contendo dexametasona ou acetato de dexametasona preparadas com razão entre os volumes da fase orgânica e da fase aquosa de 1:4 (v/v).

### **5.1.1 Rendimento e eficiência de encapsulação**

A fim de avaliar a obtenção de micropartículas através da técnica de emulsificação/evaporação de solvente e verificar a influência da composição de cada formulação o rendimento foi determinado. Após a secagem, as micropartículas apresentaram-se como um pó branco de fluxo livre. A massa resultante foi pesada e os valores de rendimentos calculados estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2. Rendimento de micropartículas sem fármaco e contendo dexametasona ou acetato de dexametasona.

Formulações	Rendimentos
	Média (%) $\pm$ DP
FB-0-10	89 $\pm$ 4
FB-1-10	85 $\pm$ 5
FB-2-10	88 $\pm$ 4
DX-0-10	84 $\pm$ 9
DX-1-10	83 $\pm$ 5
DX-2-10	87 $\pm$ 6
ADX-0-10	88 $\pm$ 8
ADX-1-10	87 $\pm$ 7
ADX-2-10	84 $\pm$ 9

As médias dos valores de rendimento das formulações variaram entre 83 e 89 %. Esses valores de rendimento são satisfatórios, apesar da pequena adesão dos pós sobre a superfície do papel filtrante durante a separação das micropartículas por filtração. Não houve influência da presença de PCL ou da presença e tipo de fármaco no rendimento das micropartículas obtidas. Não houve diferença significativa entre os valores de rendimento [ANOVA ( $p > 0,05$ )].

A fim de verificar a concentração de fármaco associado às micropartículas, foi determinada a eficiência de encapsulação. Na Tabela 3 estão apresentados os valores de eficiência de encapsulação da dexametasona e do acetato de dexametasona nas formulações.

Tabela 3. Valores de eficiência de encapsulação dos fármacos empregados nas formulações.

Formulações	Eficiência de encapsulação	
	Média (%)	
DX-0-10	62 ± 7	
DX-1-10	58 ± 8	
DX-2-10	58 ± 5	
ADX-0-10	82 ± 3	
ADX-1-10	81 ± 1	
ADX-2-10	86 ± 2	

A eficiência de encapsulação da dexametasona foi de aproximadamente 60 % e o acetato de dexametasona apresentou valores em torno de 80 %. Não houve influência significativa da presença de PCL nas formulações para a eficiência de encapsulação de ambos os fármacos [ANOVA ( $p > 0,05$ )] Verifica-se que as formulações preparadas com acetato de dexametasona apresentam valores de encapsulação maiores.

Com o intuito de verificar a razão dos menores valores de encapsulação obtidos para as micropartículas contendo dexametasona, buscou-se analisar as perdas de fármaco durante a obtenção das micropartículas. Constatou-se que, aproximadamente, 20 % da dexametasona permaneceram aderidos às paredes do balão e 20 % foram perdidos na fase aquosa (Tabela 4). Este comportamento foi observado para todas as formulações, contendo dexametasona, independente da presença de PCL.

Tabela 4. Eficiência de encapsulação de dexametasona e percentuais de perdas.

Formulações	Eficiência de encapsulação (%)	Perdas na vidraria (%)	Perdas na fase aquosa (%)
DX-0-10	62	19	20
DX-1-10	58	23	18
DX-2-10	58	19	19

As perdas na vidraria se referem à porção de fármaco associado ao polímero que fica aderido às paredes do balão durante a emulsificação, constituindo um inconveniente difícil de contornar. Quanto às perdas na fase aquosa, este resultado se deve à diferença de solubilidade dos fármacos na fase contínua aquosa. Enquanto a dexametasona apresenta solubilidade em água de 1 mg/mL, o acetato é 10 vezes menos solúvel. Assim, durante a etapa de evaporação do solvente, uma fração da dexametasona tende a difundir para a fase aquosa, enquanto que com o acetato isto ocorre em menor grau.

### **5.1.2 Microscopia óptica**

Com o intuito de visualizar a forma, a presença de cristais, o estado de agregação e alterações após dispersão em água, as micropartículas foram observadas em microscópio óptico, sob luz normal e luz polarizada.

As imagens da Figura 5 mostram as micropartículas sem fármaco FB-0-10, FB-1-10 e FB-2-10, respectivamente. É possível notar a forma esférica e a dispersão granulométrica das micropartículas.

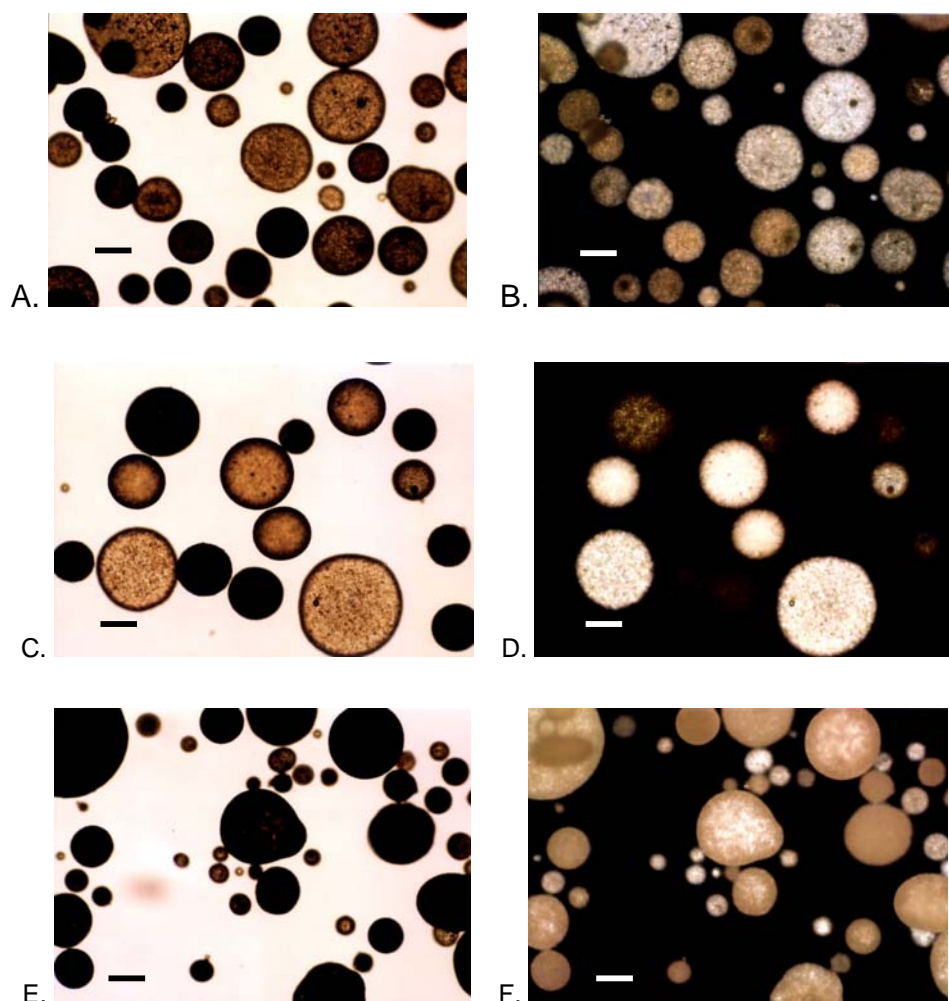


Figura 5. Imagens referentes às formulações FB-0-10 (A e B), FB-1-10 (C e D) e FB-2-10 (E e F), sob luz normal e luz polarizada, respectivamente. A barra indicativa corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

Não foi possível observar diferenças entre as formulações contendo diferentes proporções de PCL. As imagens da Figura 6 mostram as micropartículas da formulação DX-1-10, após dispersão em água e visualização sob luz normal e luz polarizada. Verifica-se a presença de cristais que não haviam sido observados nas micropartículas brancas. Isto sugere esses cristais correspondam ao fármaco não encapsulado. A visualização destes cristais é realçada mediante a observação sob luz polarizada, em função da sua birrefringência.

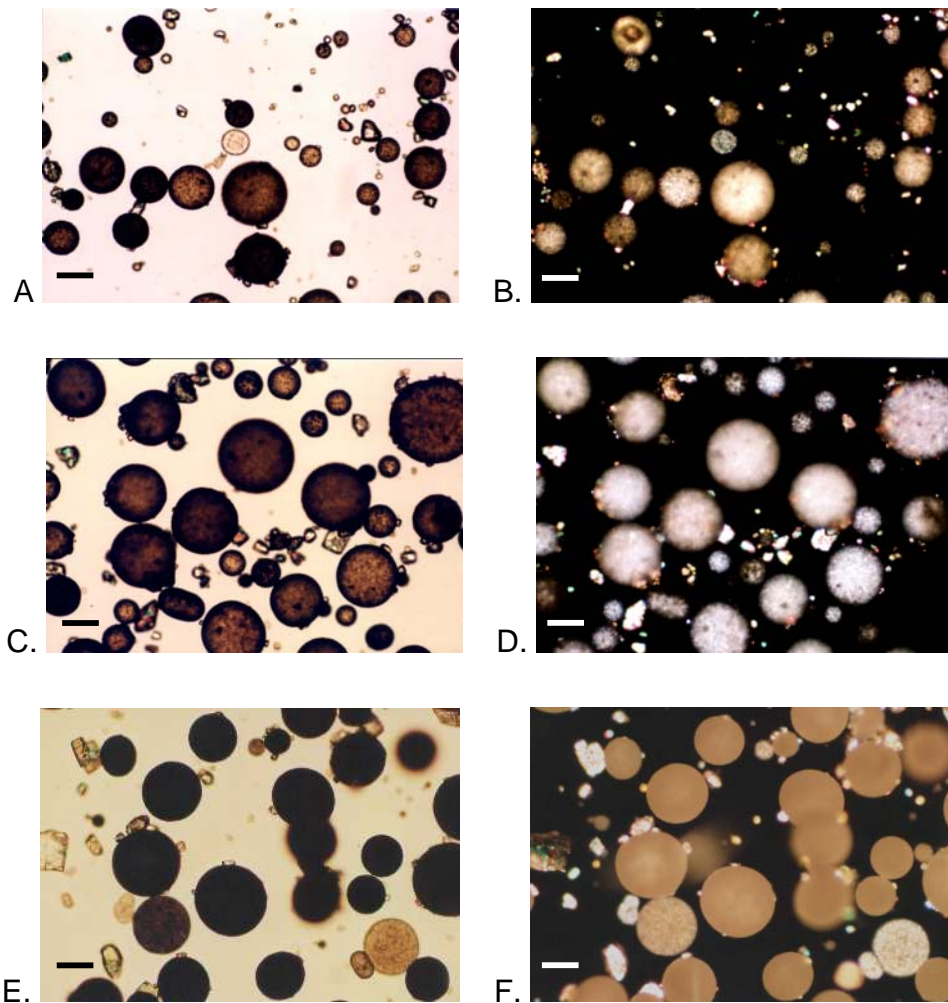


Figura 6. Imagens referentes às formulações DX-0-10 (A e B), DX-1-10 (C e D) e DX-2-10 (E e F), observadas através de luz normal e de luz polarizada, respectivamente. A barra indicativa corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

As micropartículas contendo acetato de dexametasona (Figura 7) também foram visualizadas por microscopia óptica. Nessas formulações igualmente foram observados cristais em forma de agulha que podem corresponder ao fármaco.

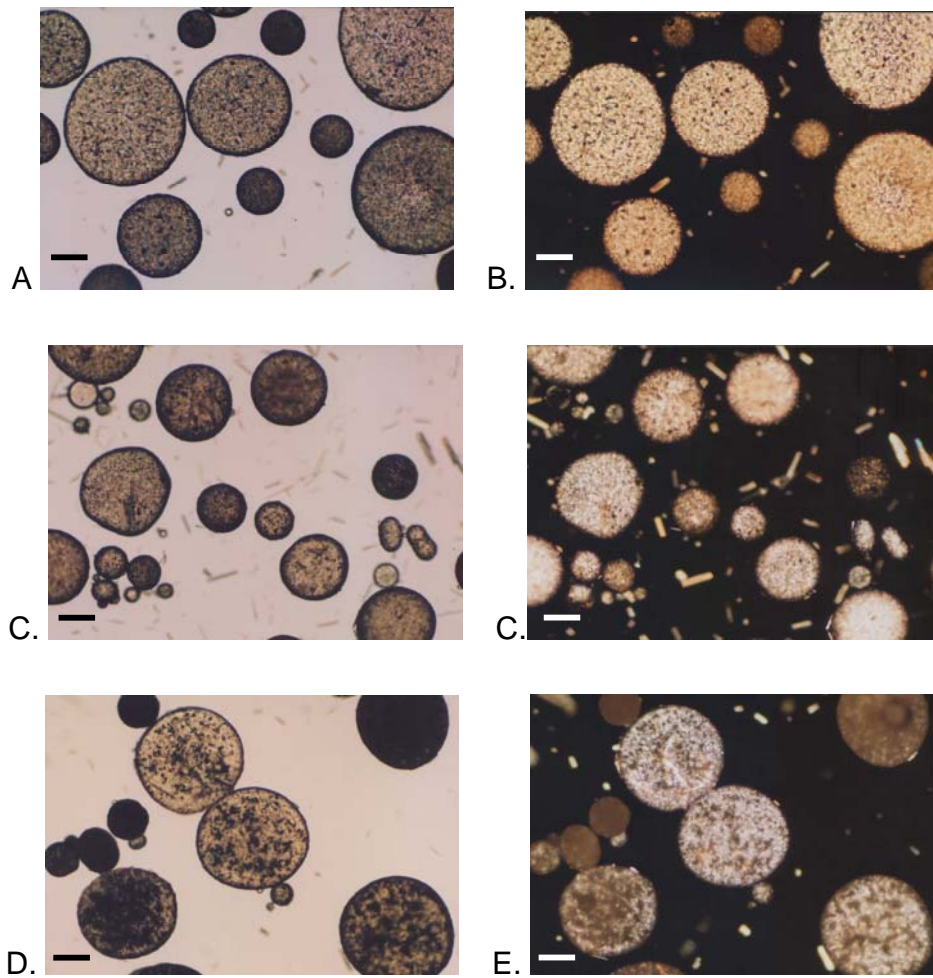


Figura 7. Imagens referentes às formulações ADX-0-10 (A e B), ADX-1-10 (C e D) e ADX-2-10 (E e F), observadas através de luz normal e de luz polarizada, respectivamente. A barra indicativa corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

Observando-se as amostras contendo dexametasona ou acetato de dexametasona, evidencia-se a semelhança morfológica entre as formulações independentemente da concentração de PCL na formulação.

### 5.1.3 Microscopia eletrônica de varredura

A fim de obter informações adicionais, relativas à forma e à topografia, as micropartículas foram observadas em microscópio eletrônico de varredura. Esta técnica de caracterização permite a observação de poros na superfície das micropartículas, sendo de grande importância na análise de estruturas obtidas a partir de blendas poliméricas.

A Figura 8 corresponde a micropartículas sem fármacos de P(HBV), contendo quantidades variáveis de PCL. A micropartícula em destaque na Figura 8 A apresenta a superfície rugosa, característica tipicamente encontrada nesta amostra e decorrente da cristalinidade acentuada do P(HBV) (Gangrade e Price, 1991). As fotomicrografias B e C da Figura 8 são referentes às formulações FB-1-10 e FB-2-10 preparadas a partir de blendas de P(HBV):PCL nas proporções de 90:10 e 80:20 (m/m). É possível observar a ocorrência de poros homogeneamente distribuídos na superfície das micropartículas derivados da presença de PCL na formulação. Estas observações atestam aquelas verificadas anteriormente por Ré e colaboradores (2004), empregando estes mesmos sistemas.

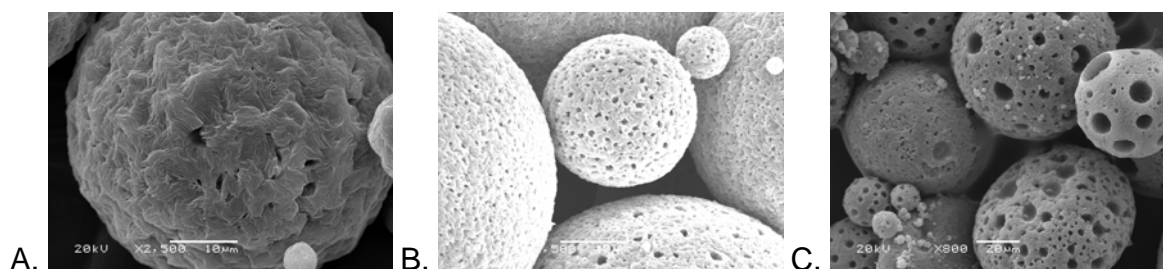


Figura 8. Fotomicrografias de varredura das formulações FB-0-10 (A), FB-1-10 (B) e FB-2-10 (C).

A análise das micropartículas contendo dexametasona (Figura 9) confirma a presença de cristais nas formulações, observados anteriormente por microscopia óptica. Nestas formulações também pode-se observar que o aumento da concentração



de PCL levou à formação de poros homogeneamente distribuídos na superfície das micropartículas.

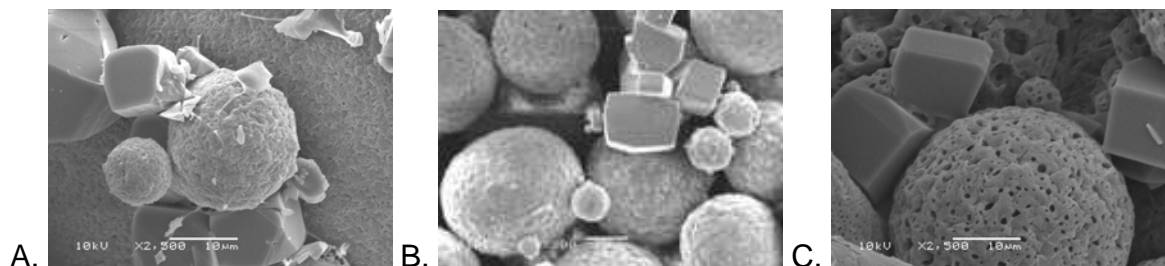


Figura 9. Fotomicrografia de varredura das formulações DX-0-10 (A), DX-1-10 (B) e DX-2-10 (C).

As fotomicrografias das micropartículas contendo acetato de dexametasona (Figura 10) demonstram a presença de cristais em forma de agulha, confirmando os resultados obtidos por microscopia óptica. Para essas formulações também foi possível observar a porosidade das micropartículas.

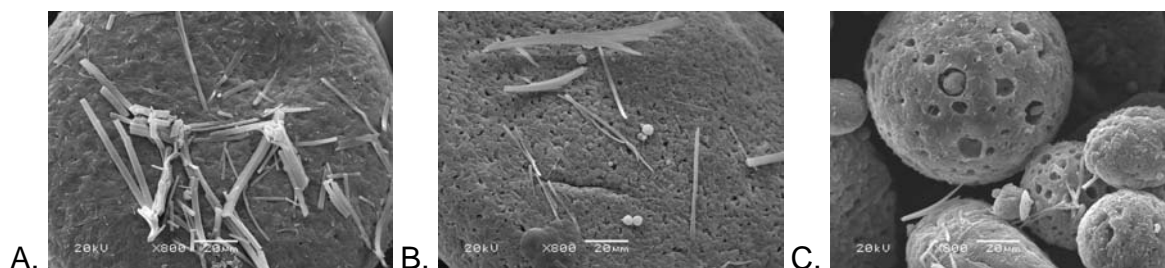


Figura 10. Fotomicrografia de varredura das formulações ADX-0-10 (A), ADX-1-10 (B) e ADX-2-10 (C).

#### 5.1.4 Avaliação da distribuição de tamanhos por difratometria de *laser*

Objetivando caracterizar a distribuição de tamanhos das micropartículas nas diferentes formulações, as amostras foram ressuspensas em solução aquosa de polissorbato 80 e submetidas à análise por difratometria de *laser*.

A Tabela 5 apresenta os valores de diâmetro médio das micropartículas D[4,3] e os correspondentes índices de dispersão (span). Os valores de d(0,1) e d(0,9) expressam a média dos diâmetros de partícula situada nos intervalos abaixo de 10 % e acima de 90 % da curva de distribuição de tamanhos. A análise do percentual de volume *versus* tamanho de partícula gerou uma curva de distribuição normal para todas as amostras, indicando a ocorrência de apenas uma população de partículas (Martin, 1993).

Tabela 5. Análise granulométrica e índices de polidispersão (span) das micropartículas.

Formulações	d(0,1) ( $\mu\text{m}$ )	d(0,9) ( $\mu\text{m}$ )	D[4,3] ( $\mu\text{m}$ )	Span
FB-0-10	76	321	202	1,6
FB-1-10	96	352	207	1,4
FB-2-10	78	436	228	1,9
DX-0-10	72	292	180	1,5
DX-1-10	73	292	170	1,5
DX-2-10	81	303	178	1,4
ADX-0-10	92	365	212	1,4
ADX-1-10	85	330	193	1,4
ADX-2-10	72	282	163	1,5

Os diâmetros médios de partícula variaram de 163 a 228  $\mu\text{m}$  e os índices de dispersão (Span) permaneceram abaixo de 2. Valores de Span abaixo de 2 são preferidos pois denotam baixa dispersão de tamanhos da amostra (Chen e Davis, 2002). Os tamanhos expressos por d(0,1) ficaram entre 72 e 96  $\mu\text{m}$  e os tamanhos expressos por d(0,9) entre 282 e 436  $\mu\text{m}$ .

Nota-se que as micropartículas de blendas contendo dexametasona apresentam tamanhos de partícula significativamente menores do que as correspondentes micropartículas sem fármaco [ANOVA ( $p < 0,05$ )]Possivelmente essa redução nos valores seja proveniente da contribuição da presença de cristais de fármaco nas medidas de diâmetro. Essa suposição baseia-se nas imagens obtidas por microscopia

óptica e eletrônica que evidenciam os tamanhos reduzidos dos cristais de fármaco em relação as micropartículas.

### 5.1.5 Avaliação da área superficial

Tendo em vista as observações feitas por microscopia eletrônica, que demonstraram aumento da porosidade nos sistemas em função da presença de PCL, a análise da área superficial foi conduzida. As micropartículas foram submetidas à degaseificação e analisadas pela técnica de adsorção de nitrogênio. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Área superficial e coeficiente de determinação da equação de BET.

Formulações (%)	Área superficial (m <sup>2</sup> /g)	r <sup>2</sup>
FB-0-10	122	0,9974
FB-1-10	125	0,9578
FB-2-10	156	0,9981
DX-0-10	41	0,9850
DX-1-10	60	0,9736
DX-2-10	120	0,9522
ADX-0-10	34	0,9835
ADX-1-10	49	0,9665
ADX-2-10	70	0,9930

Os valores de área variaram em função da proporção de PCL presente nas micropartículas. Estes achados confirmam as observações feitas por microscopia eletrônica, que indicam aumento da porosidade nas formulações contendo PCL. Comparando-se os resultados com outros encontrados na literatura, foi visto que os valores observados nas formulações FB-0-10, FB-1-10 e FB-2-10 foram superiores aos obtidos por Ré e colaboradores (2004). Essa diferença provavelmente seja devida a

alterações experimentais na metodologia empregada na preparação das micropartículas, como por exemplo, a emulsificação da fase aquosa sobre a fase orgânica, empregada neste trabalho.

Observou-se uma redução significativa nos valores de área superficial das formulações em função da presença de acetato de dexametasona [ANOVA ( $p < 0,05$ )]. A redução é compreensível já que foi verificada a presença de fármaco não encapsulado, de maneira que a amostra constituiu-se de uma mistura de micropartículas (porosas) e fármaco (não poroso). Para a formulação DX-2-10 esse comportamento foi menos evidente, porém as outras formulações contendo dexametasona também apresentaram significativa redução nos valores de área [ANOVA ( $p > 0,05$ )].

#### **5.1.6 Perfis de liberação da dexametasona e do acetato de dexametasona em célula de fluxo**

Mediante caracterização através de microscopia óptica e eletrônica foi possível observar a ocorrência de cristais livres, indicando a presença de fármaco não encapsulado. Adicionalmente, com base nos resultados obtidos através de microscopia eletrônica e pela análise das isotermas de adsorção, foi evidenciado o aumento da porosidade e da área superficial das micropartículas decorrente do incremento de PCL nas formulações. A fim de elucidar se haveriam diferenças nas taxas de liberação dos fármacos a partir das micropartículas obtidas de blendas de P(HBHV):PCL nas proporções de 100:0, 90:10 e 80:20 (m/m) os perfis de liberação foram determinados. As micropartículas foram submetidas ao experimento de dissolução em célula de fluxo, empregando tampão fosfato pH 7,4, como meio, temperatura de 37 °C e fluxo de 1 mL/minuto. A Figura 11 apresenta os perfis de dissolução das formulações DX-0-10, DX-1-10, DX-2-10 bem como do fármaco puro.

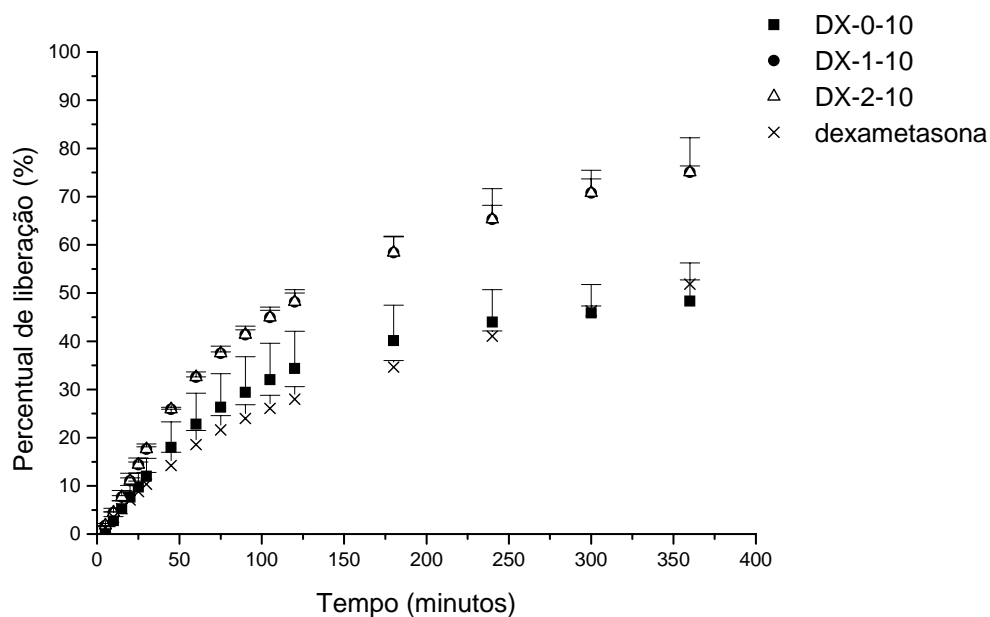


Figura 11. Perfis de liberação das micropartículas contendo dexametasona e do fármaco puro.

O percentual de liberação alcançado pela dexametasona, a partir da formulação DX-0-10, chegou a 50 %, após as 6 horas de experimento. Este comportamento não diferiu do apresentado pela dexametasona pura. Verificou-se que a liberação da dexametasona a partir das micropartículas contendo blenda de P(HBVH):PCL, tanto na proporção 90:10 (DX-1-10), quanto 80:20 (DX-2-10), atingiu 75 % de liberação, após 6 horas. Entre si essas duas formulações não apresentaram diferença, porém, demonstraram liberação mais rápida daquela apresentada pela formulação sem PCL (DX-0-10).

Os perfis apresentados pelas formulações contendo acetato de dexametasona (Figura 12) não permitiram avaliar a influência da formulação na liberação do fármaco, entretanto, apresentaram dissolução bastante inferior daquela exibida pelo fármaco puro.

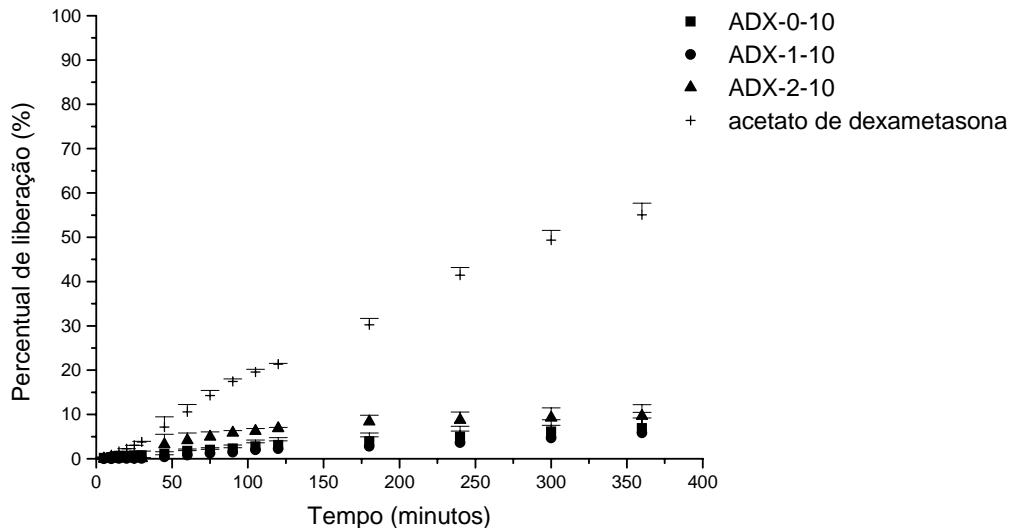


Figura 12. Perfis de liberação das micropartículas contendo acetato de dexametasona e do fármaco puro.

O cálculo da eficiência de dissolução foi determinado a partir da área sob a curva dos perfis de dissolução das micropartículas contendo dexametasona e acetato de dexametasona. Este parâmetro representa uma avaliação modelo-independente e facilita a comparação do percentual de fármaco dissolvido durante certo período de tempo (Costa e Lobo, 2001). A tabela 9 apresenta os valores de eficiência de dissolução dos sistemas testados. Tal como observado nos perfis de liberação, nota-se que a formulação DX-0-10 e a dexametasona pura, bem como as formulações DX-1-10 e DX-2-10 exibiram valores análogos entre si [ANOVA ( $p > 0,05$ )]. As micropartículas preparadas com acetato de dexametasona apresentaram perfis muito semelhantes entre si e valores de dissolução muito baixos (menores de 10 % após 6 horas de experimento). A associação do fármaco a estes dispositivos levou a uma redução acentuada na sua dissolução, uma vez que, a dissolução do fármaco não encapsulado demonstrou ser, em média, 6 vezes maior.

Tabela 7. Eficiência de dissolução das amostras.

Formulações	Eficiência de dissolução (%)
	± DP *
DX-0-10	35 ± 6 <sup>a</sup>
DX-1-10	51 ± 2 <sup>b</sup>
DX-2-10	52 ± 4 <sup>b</sup>
dexametasona	33 ± 1 <sup>a</sup>
ADX-0-10	4 ± 1 <sup>c,d</sup>
ADX-1-10	3 ± 2 <sup>c</sup>
ADX-2-10	7 ± 1 <sup>d</sup>
acetato de dexametasona	31 ± 1 <sup>e</sup>

\* Letra sobrescrita igual indica similaridade dos resultados pela comparação múltipla de Tukey ( $\Delta_{5\%}$ ).

Verifica-se pelos valores de eficiência de dissolução das micropartículas que a presença da PCL na blenda influenciou favoravelmente a dissolução da dexametasona. Entretanto, não foi possível estabelecer relação entre o percentual de PCL e a liberação do acetato de dexametasona.

Após a caracterização das micropartículas, foram conduzidas investigações acerca do motivo da presença de cristais não encapsulados do fármaco. A concentração de fármaco na fase orgânica foi de 0,4 % (m/v) e macroscopicamente apresentou-se como uma solução (Figura 13). Entretanto, as fases orgânicas contendo fármaco foram avaliadas microscopicamente a fim de se determinar a homogeneidade de fase em nível microscópico.

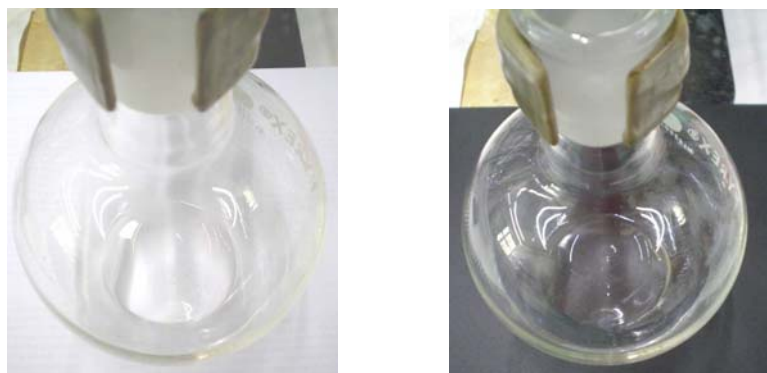


Figura 13. Imagens macroscópicas da fase orgânica contendo dexametasona sobre fundos claro e escuro.

Nota-se na Figura 13, a limpidez da fase orgânica. Entretanto, a avaliação microscópica dessa solução evidencia a ocorrência de uma dispersão do fármaco no solvente (Figura 14). O aumento do volume de fase orgânica de 10 para 40 mL, reduziu a concentração de fármaco para 0,1 % (m/v) e levou à obtenção de uma fase orgânica homogênea em nível microscópico (foto não apresentada).

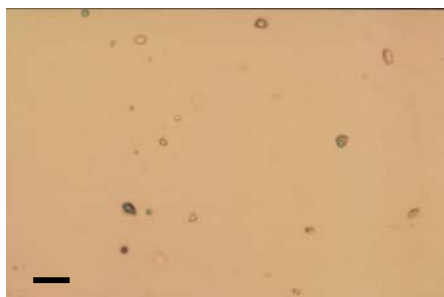


Figura 14. Imagem em nível microscópico da fase orgânica de dexametasona na concentração de 0,4 % m/v, barra corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

Considerando-se essa análise, foram preparadas e caracterizadas micropartículas de dexametasona empregando-se 40 mL de clorofórmio na fase orgânica, ou seja, com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:1 (v/v) e cujos resultados estão expressos a seguir.



## **5.2 Preparação e caracterização de micropartículas preparadas com razão entre as fases orgânica e aquosa de 1:1 (v/v)**

Com o objetivo de obter micropartículas com dexametasona dispersa na matriz polimérica, novas formulações foram desenvolvidas, empregando-se 40 mL de fase orgânica. Esse acréscimo no volume levou à formação de uma fase orgânica homogênea verificada por microscopia óptica. Com propósito de comparação, também foram preparadas micropartículas sem fármaco e contendo acetato de dexametasona.

### **5.2.1 Rendimento e eficiência de encapsulação**

Após a obtenção das micropartículas, as mesmas apresentaram-se como um pó de fluxo livre. O rendimento foi determinado pela pesagem da massa de micropartículas obtida. A Tabela 8 apresenta os valores de rendimento percentual das formulações sem fármaco (FB-0-40, FB-1-40 e FB-2-40) e contendo os fármacos dexametasona (DX-0-40, DX-1-40, DX-2-40) ou acetato de dexametasona (ADX-0-40, ADX-1-40, ADX-2-40).

Os valores médios de rendimento permaneceram entre 79 e 86 %. Não houve influência significativa da presença ou do tipo de fármaco, tampouco da composição quali-quantitativa dos polímeros P(HBHV) e PCL sobre o rendimento das micropartículas [ANOVA ( $p > 0,05$ )].

Tabela 8. Rendimento de micropartículas.

Formulações	Rendimentos
	Média ± DP (%)
FB-0-40	82± 3
FB-1-40	80 ± 1
FB-2-40	79 ± 4
DX-0-40	80 ± 3
DX-1-40	80 ± 6
DX-2-40	81 ± 1
ADX-0-40	82 ± 4
ADX-1-40	83 ± 3
ADX-2-40	86 ± 4

Visando estabelecer a concentração de dexametasona ou de acetato de dexametasona presentes nas diferentes formulações preparadas, foi determinada a eficiência de encapsulação. Esses valores estão apresentados a seguir, na Tabela 9.

Tabela 9. Eficiência de encapsulação de fármaco nas micropartículas obtidas.

Formulações	Eficiência de encapsulação (%) ± DP
DX-0-40	41 ± 9
DX-1-40	32 ± 11
DX-2-40	36 ± 7
ADX-0-40	88 ± 5
ADX-1-40	92 ± 6
ADX-2-40	89 ± 10

As taxas de encapsulação da dexametasona foram baixas, apresentando valores inferiores a 50 %. Por outro lado, os valores de eficiência de encapsulação para as formulações contendo acetato de dexametasona permaneceram em torno de 80 a 90 %. Os valores de eficiência de encapsulação apresentados pelas formulações contendo acetato de dexametasona podem ser considerados altos quando comparados com os

sistemas encontrados na literatura, obtidos empregando-se a mesma técnica de preparação (Gursel e Hasirci, 1995; Hickey *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005).

Comparando-se os resultados de eficiências de encapsulação verificados entre a dexametasona e o acetato de dexametasona, observa-se que o acetato apresentou encapsulação duas vezes maior. Esse resultado também foi visto para as formulações preparadas com 10 mL de fase orgânica. Como já mencionado, pode ser decorrente da maior hidrofobicidade do acetato de dexametasona, pois durante a preparação das micropartículas esse caráter favoreceria sua permanência na fase orgânica remanescente durante a difusão do solvente. Essa suposição é corroborada por outros trabalhos nos quais o êxito na incorporação de fármaco em micropartículas poliméricas esteve associado à baixa solubilidade do fármaco na fase contínua aquosa (Bodmeier e McGinity, 1998; Watts *et al.*, 1990).

### **5.2.2 Microscopia óptica**

Com o intuito de analisar as características morfológicas das micropartículas obtidas, as mesmas foram observadas através de microscópio óptico, sob luz normal e polarizada. Foram obtidas fotomicrografias das amostras e as imagens referentes às formulações FB-0-40, FB-1-40 e FB-2-40 estão apresentadas na Figura 15. Observando todas as formulações, é possível evidenciar o formato esférico e os diversos tamanhos apresentados pelas micropartículas. Comparando-se as três formulações, FB-0-40, FB-1-40 e FB-2-40, sob luz normal, não foi possível verificar diferenças morfológicas. Quando visualizadas sob luz polarizadas, as micropartículas aparecem como estruturas birrefringentes. Vogelsanger (2003) atribuiu a birrefringência de blendas de PHB:PCL à característica semi-cristalina dos polímeros.

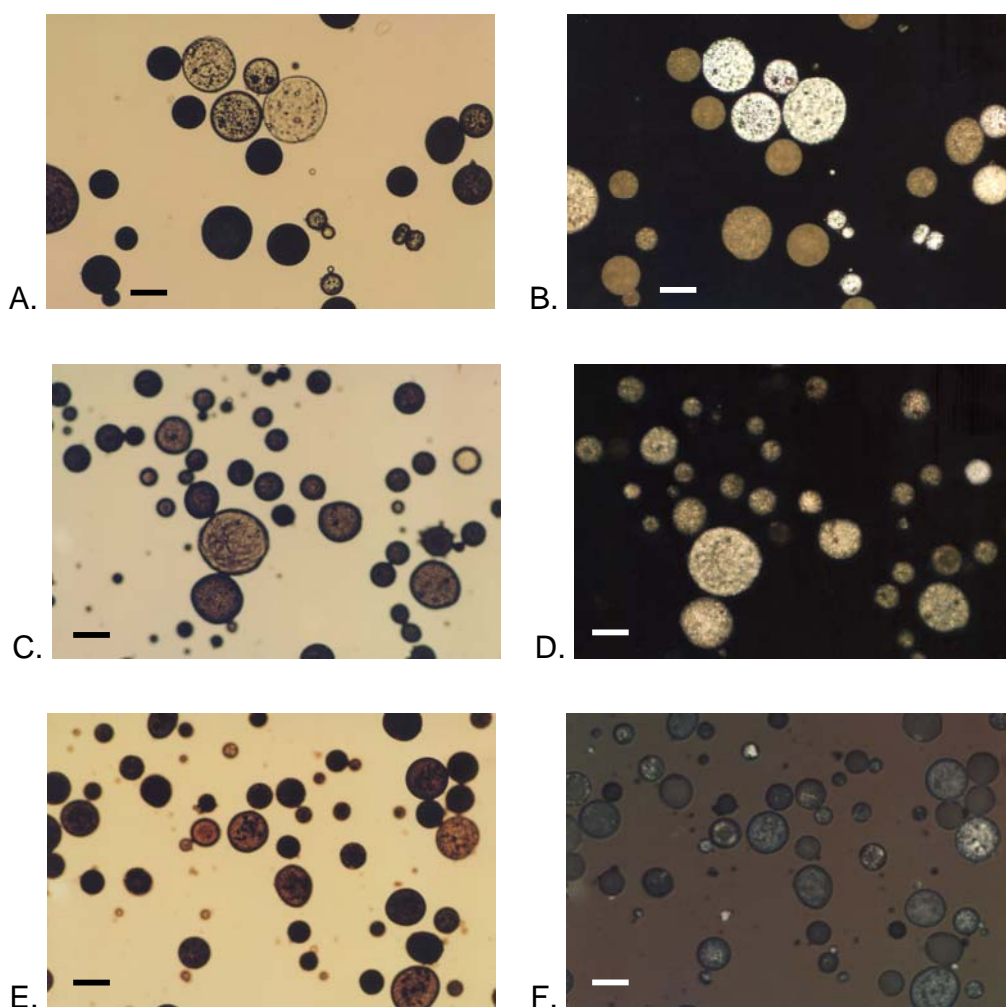


Figura 15. Micropartículas brancas referentes às formulações FB-0-40, sob luz normal (A) e polarizada (B); FB-1-40, sob luz normal (C) e polarizada (D) e FB-2-40, sob luz normal (E) e polarizada (F). Barra indicativa corresponde à 100  $\mu\text{m}$ .

Na Figura 16 estão dispostas as imagens obtidas sob luz normal e polarizada das micropartículas contendo dexametasona, referentes às formulações DX-0-40, DX-10-40 e DX-2-40. A observação das imagens obtidas sob luz normal (Figura 16 A, C, e E) demonstra a presença de estruturas esféricas e de cristais em forma de losango. Esses cristais podem ser evidenciados nas imagens obtidas sob luz polarizada (Figura 16 B, D, e F), nas quais estas estruturas apresentam intensa refração da luz.

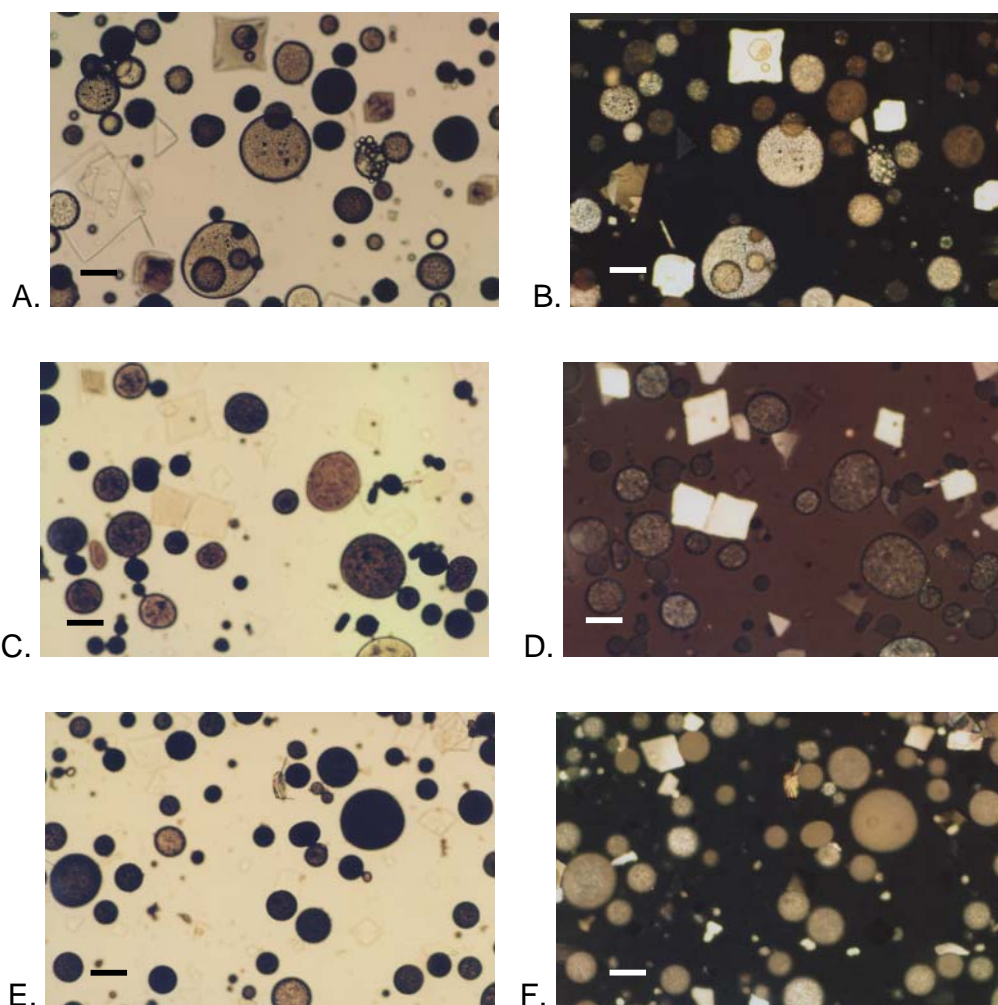


Figura 16. Micropartículas contendo dexametasona, referentes às formulações DX-0-40, sob luz normal (A) e polarizada (B); DX-1-40, sob luz normal (C) e polarizada (D) e DX-2-40, sob luz normal (E) e polarizada (F). Barra indicativa corresponde à 100  $\mu\text{m}$ .

Estes cristais presentes nas amostras podem ser da dexametasona não incorporada nas micropartículas e estão presentes nas três formulações DX-0-40, DX-1-40 e DX-2-40. A sua origem estaria relacionada à solubilização da dexametasona na fase orgânica (clorofórmio) e recristalização na forma de losangos, após a evaporação do solvente durante a etapa de preparação das micropartículas. Para confirmar essa hipótese, a dexametasona foi submetida ao processo e os cristais obtidos após a evaporação do solvente foram observados por microscopia óptica. Para fim de comparação, também foram observados os cristais da dexametasona comercial. As imagens podem ser observadas na Figura 17.

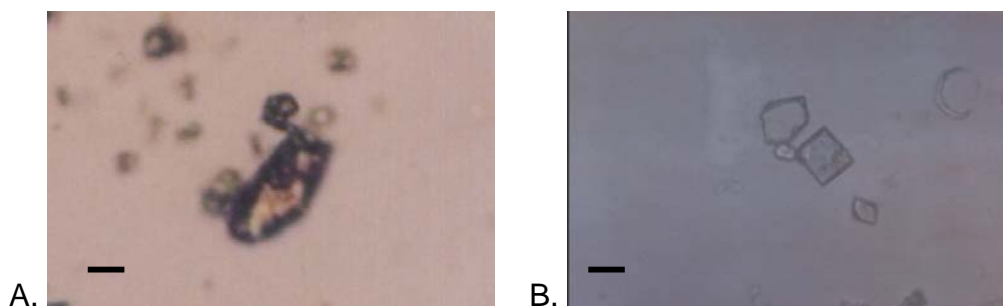


Figura 17. Cristais da dexametasona comercial e da dexametasona recristalizada. Barra indicativa corresponde à 100  $\mu\text{m}$ .

Os cristais obtidos após a solubilização da dexametasona em clorofórmio seguida de evaporação apresentam forma de losango (Figura 17 B), confirmando a hipótese de que os cristais observados nas amostras são derivados do fármaco não encapsulado.

Na Figura 18 estão apresentadas as imagens obtidas das micropartículas preparadas com acetato de dexametasona e se referem às formulações ADX-0-40, ADX-1-40 e ADX-2-40 analisadas sob luz normal e polarizada. Observa-se que as micropartículas apresentam formato esférico, bem como tamanhos menores, em relação as micropartículas das formulações sem fármaco ou contendo dexametasona, analisadas anteriormente.

Examinado-se o grupo de imagens obtidas sob luz polarizada (Figura 18 B, D e F) é possível constatar a presença de alguns cristais livres, em formato de agulha, presentes na formulação ADX-0-40. No entanto, esses cristais livres não foram evidenciados nas formulações ADX-1-40 e ADX-2-40. A ausência de estruturas cristalinas livres indicaria que a presença de PCL nessas duas formulações estaria favorecendo a encapsulação do fármaco na fase polimérica do sistema.

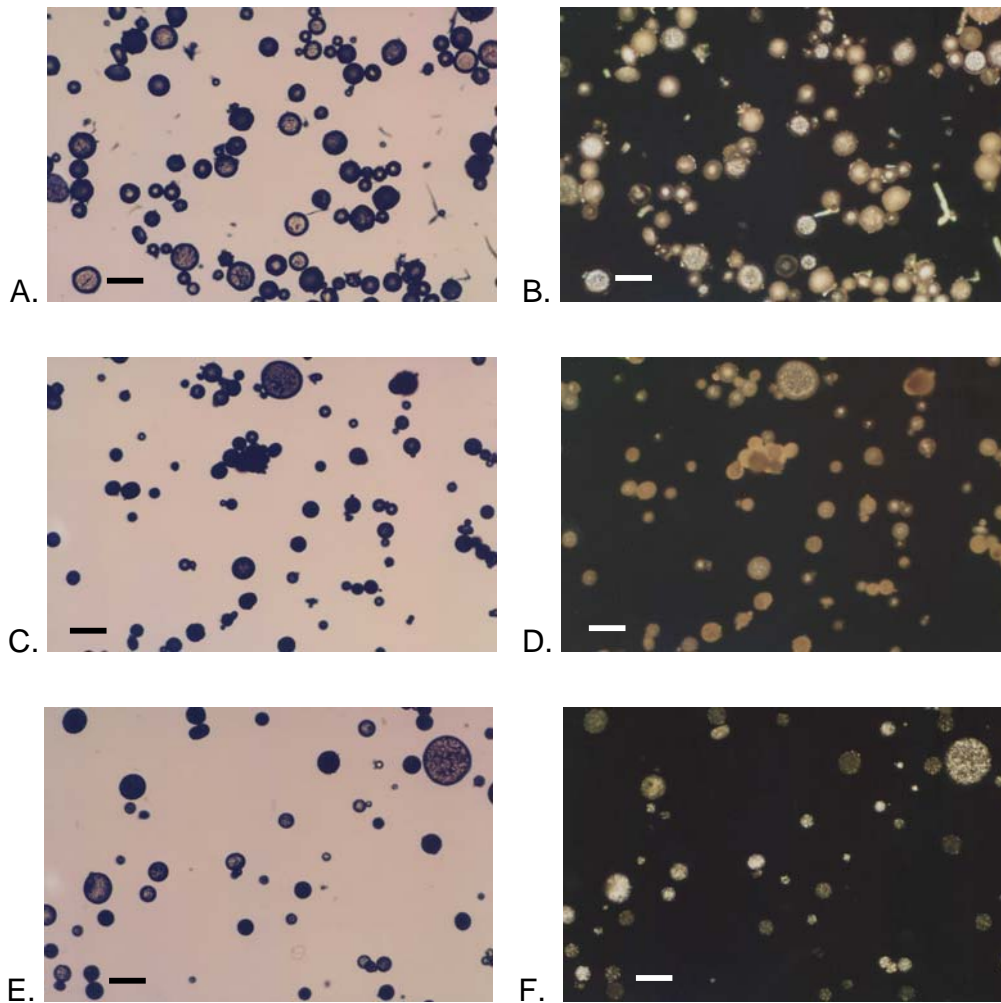


Figura 18. Micropartículas contendo acetato de dexametasona, referentes às formulações ADX-0-40, sob luz normal (A) e polarizada (B); ADX-1-40, sob luz normal (C) e polarizada (D) e ADX-2-40, sob luz normal (E) e polarizada (F). Barra indicativa corresponde à 100 µm.

O uso de blendas para aprimorar as características de sistemas de liberação de fármacos tem demonstrado resultados efetivos (Pitt *et al.*, 1991). A encapsulação de fármacos pode ser aumentada devido à maior compatibilidade apresentada entre o fármaco e a blenda do que aquela verificada empregando-se os polímeros isoladamente (Yeh *et al.*, 1995).

### 5.2.3 Microscopia eletrônica de varredura

A fim de avaliar a influência do aumento do volume da fase orgânica sobre as características superficiais (topografia, poros, cristais) das micropartículas, as amostras foram observadas por MEV. A Figura 19 apresenta as imagens obtidas, com aumentos de 800 e 1500 vezes das formulações sem fármaco FB-0-40, FB-1-40 e FB-2-40.

As micropartículas obtidas com 40 mL de fase orgânica apresentaram superfície rugosa e foram observados poros na superfície de todas as formulações. As formulações FB-0-40 e FB-1-40 apresentaram características de superfície semelhantes, enquanto que a formulação FB-2-40 demonstrou superfície com poros em maior número e tamanho.

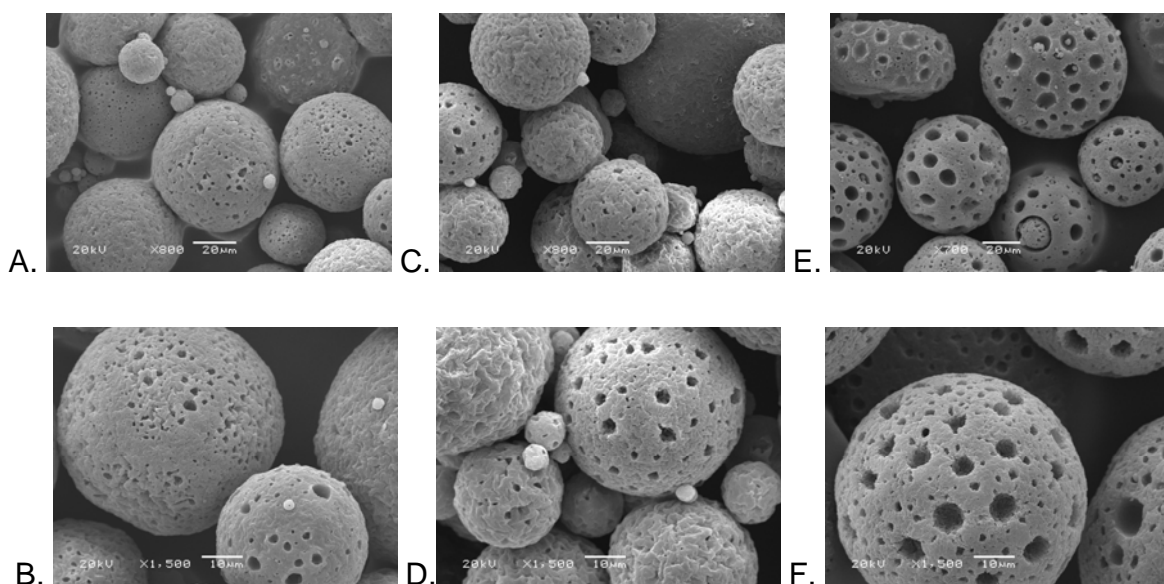


Figura 19. Fotomicrografias de varredura das formulações FB-0-40 (A e B), FB-1-40 (C e D) e FB-2-40 (E e F), observadas em aumento de 800 vezes (A, C e E) e de 1500 vezes (B, D e F).

Na Figura 20 podem ser visualizadas as micropartículas referentes às formulações contendo dexametasona (DX-0-40, DX-1-40 e DX-2-40) em aumento de 800 vezes. Nessas formulações verifica-se a presença de cristais, os quais foram previamente relacionados ao fármaco não encapsulado. Não foi possível evidenciar a



formação de poros em decorrência do aumento da concentração de PCL nas formulações.

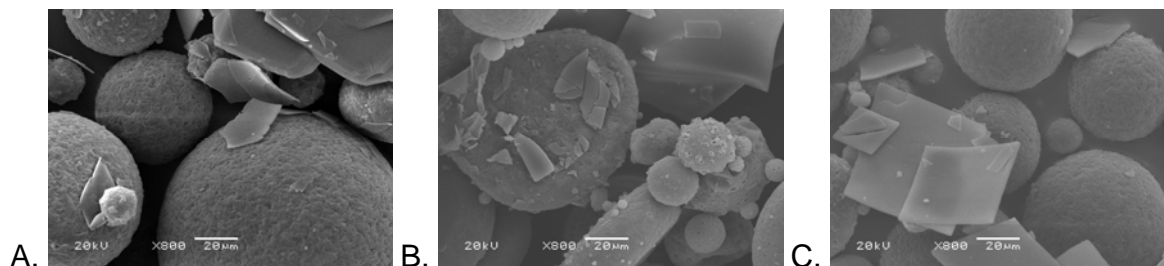


Figura 20. Fotomicrografias de varredura das formulações DX-0-40 (A), DX-1-40 (B) e DX-2-40 (C), observadas em aumento de 800 vezes.

As micropartículas contendo acetato de dexametasona, referentes às formulações ADX-0-40, ADX-1-40 e ADX-2-40 estão representadas na Figura 21, em aumentos de 800 vezes. Estas imagens evidenciam a superfície porosa das micropartículas e a presença de cristais em formato de agulha na amostra ADX-0-40, indicados por setas na Figura 21 A. Por outro lado, nas formulações ADX-1-40 e ADX-2-40 (Figura 21 B e C) não são observados cristais livres.

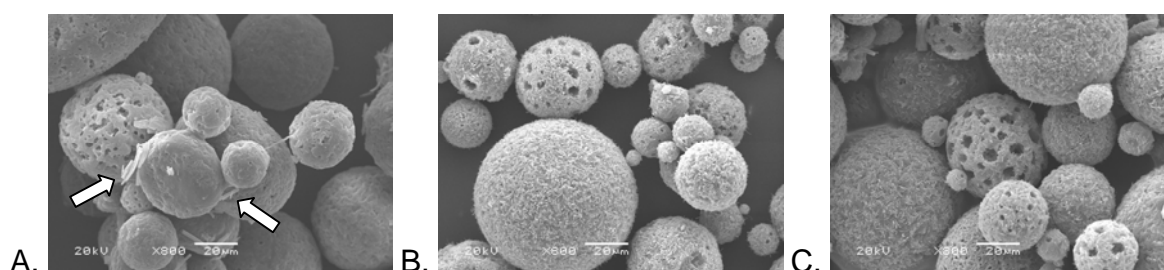


Figura 21. Fotomicrografias de varredura das formulações ADX-0-40 (A), ADX-1-40 (B) e ADX-2-40 (C), observadas em aumento de 800 vezes.

Os resultados de microscopia demonstram que houve, provavelmente, maior associação do acetato de dexametasona à matriz das micropartículas ADX-1-40 e ADX-2-40, constituídas de blendas de P(HBHV) e PCL. A causa deste comportamento pode estar relacionada à diferença de solubilidade entre a PCL e o P(HBHV) na fase orgânica, relatada por Embleton e Tighe (1993). Desse modo, durante a etapa de formação das micropartículas, a difusão do solvente orgânico para fora das gotículas da emulsão levaria à precipitação do polímero menos solúvel (PCL). O aumento da

viscosidade no interior da gotícula reduziria a mobilidade tanto do polímero quanto do fármaco encapsulado, diminuindo sua difusão para a fase aquosa. A seguir, a evaporação do solvente remanescente levaria à precipitação do P(HBV) que está em maior proporção e que formará a estrutura da micropartícula. Por outro lado, no momento da formação das micropartículas constituídas apenas por P(HBV), a precipitação do polímero seria mais lenta, permitindo a difusão do acetato de dexametasona para fora da matriz e formação de cristais na fase contínua aquosa. Esse mecanismo de formação da estrutura das micropartículas obtidas por emulsificação/evaporação de solvente, considerando a diferença de solubilidade dos polímeros constituintes da blenda, foi abordado também por Babak e colaboradores (2004). Os autores ressaltaram a possibilidade de obtenção de micropartículas com uma nanoestrutura espacialmente organizada mediante o ajuste de parâmetros de processo como, por exemplo, a velocidade de evaporação do solvente.

A Figura 22 apresenta as micropartículas das formulações ADX-1-40 e ADX-2-40 em aumento de 1500 vezes, onde é possível observar a presença de cristais finamente dispersos, presentes na superfície das micropartículas.

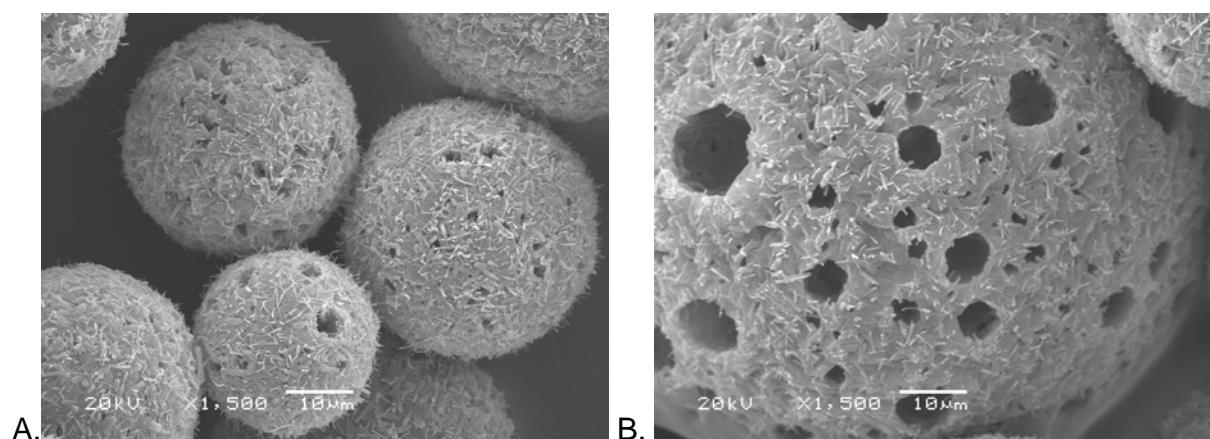


Figura 22. Fotomicrografias de varredura das formulações ADX-1-40 (A) e ADX-2-40 (B), observadas em aumento de 1500 vezes.

A ocorrência de cristais na superfície das micropartículas poliméricas ADX-1-40 e ADX-2-40 também poderia estar relacionada à baixa viscosidade da fase orgânica, em função do elevado volume de solvente (40 mL) que permitiria a migração dos cristais

para a interface da gotícula, durante a extração do solvente. Devido à insolubilidade do fármaco na fase externa aquosa, os cristais permaneceriam na interface até o enrijecimento da partícula. Este fenômeno foi relatado anteriormente em estudos empregando emulsificação/evaporação de solvente (Gibaud *et al.*, 2002; Birnbaum *et al.*, 2000).

#### 5.2.4 Avaliação da distribuição de tamanhos por difratometria de *laser*

Com o intuito de determinar a distribuição de tamanhos das micropartículas e verificar a influência da composição dos sistemas sobre essa característica, a distribuição granulométrica foi realizada por difratometria de *laser* após a dispersão das micropartículas em água e polissorbato 80. Os valores de d(0,1), d(0,9), D[4,3] e span estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10. Medidas de tamanho das micropartículas.

Formulações	d(0,1) ( $\mu\text{m}$ )	d(0,9) ( $\mu\text{m}$ )	D[4,3] ( $\mu\text{m}$ )	Span
FB-0-40	31	161	90	2,0
FB-1-40	38	123	81	1,3
FB-2-40	34	148	86	1,8
DX-0-40	33	131	75	1,5
DX-1-40	46	143	88	1,2
DX-2-40	37	135	79	1,4
ADX-0-40	32	148	87	1,7
ADX-1-40	39	138	91	1,4
ADX-2-40	54	196	116	1,3

A análise do percentual de volume *versus* tamanho de partícula gerou uma curva de distribuição normal para todas as amostras, indicando a ocorrência de apenas uma

população de partículas (Martin, 1993). Os tamanhos expressos por  $d(0,1)$  ficaram entre 31 e 54  $\mu\text{m}$  e os tamanhos expressos por  $d(0,9)$  entre 123 e 196  $\mu\text{m}$ .

Os tamanhos médios de todas as amostras permaneceram entre 75 e 116  $\mu\text{m}$ , sendo que as partículas de maior tamanho foram aquelas provenientes das formulações ADX-1-40 e ADX-2-40. O valor de span refere-se à faixa de distribuição de volume. Este parâmetro indica a dispersão e apresentou valores menores do que 2, atestando a distribuição estreita das amostras (Chen e Davis, 2002). Os valores de diâmetro médio de partícula situam-se dentro das estimativas encontradas em trabalhos que fazem uso da técnica de emulsificação/evaporação de solvente (O'Donnell e McGinity, 1997; Hickey *et al.*, 2002; Rosca *et al.*, 2004; Siepman *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005).

Para as micropartículas sem fármaco e para aquelas contendo dexametasona não houve influência da composição das micropartículas (presença e concentração de PCL) e nos valores de diâmetro médio [ANOVA ( $p > 0,05$ )]. Por outro lado, nas amostras contendo acetato de dexametasona houve uma tendência de correlação entre o diâmetro de partícula e o percentual de PCL na formulação ( $r = 0,923$ ).

### **5.2.5 Avaliação da área superficial**

A determinação dos valores de área superficial das micropartículas é importante e pode variar tanto em função do tamanho de partícula quanto pela presença de poros na estrutura. A área superficial de micropartículas é uma característica que permite explicar o comportamento de liberação de fármacos associados (Martin, 1993).

A análise das isotermas de adsorção de nitrogênio levou aos resultados de área superficial das amostras que estão expressos na Tabela 11. As micropartículas das formulações sem fármaco (FB-0-40, FB-1-40 e FB-2-40) apresentaram valores de área superficial de 15, 21 e 26  $\text{m}^2/\text{g}$ , respectivamente. Com o aumento do percentual de PCL

na blenda houve aumento da área superficial. Estes resultados estão de acordo com aqueles relatados na literatura para micropartículas de PHB, P(HBHV) e blendas de P(HBHV):PCL, preparadas por emulsificação/evaporação de solvente (Maia *et al.*, 2004; Ré *et al.*, 2004).

Comparando-se os resultados de área superficial das micropartículas sem fármaco (FB-0-40, FB-1-40 e FB-2-40) com aquelas referentes às formulações contendo dexametasona (DX-0-40, DX-1-40 e DX-2-40) verificou-se um aumento significativo nos valores. É possível que a presença de cristais de fármaco livre de dexametasona, visualizados por microscopia (Figura 16) tenha sido responsável por este resultado.

Tabela 11. Área superficial, coeficiente de determinação e concentração de fármaco nas micropartículas.

Formulações (%)	Área superficial (m <sup>2</sup> /g)	r <sup>2</sup>
FB-0-40	15	0,9580
FB-1-40	21	0,8860
FB-2-40	26	0,8470
DX-0-40	174	0,9527
DX-1-40	190	0,9948
DX-2-40	124	0,8915
ADX-0-40	43	0,8019
ADX-1-40	28	0,9875
ADX-2-40	22	0,9164

As formulações contendo acetato de dexametasona (ADX-0-40, ADX-1-40 e ADX-2-40) apresentaram valores de área de 43, 28 e 22 m<sup>2</sup>/g, respectivamente. Verificou-se que houve um decréscimo nos valores de área superficial nas amostras contendo PCL, apesar das análises por microscopia terem demonstrado haver aumento da porosidade das micropartículas, decorrente do incremento de PCL nas formulações. Para explicar esse resultado, foi sugerida a hipótese de que, conforme a fração de PCL na blenda foi aumentada, haveria uma maior afinidade do acetato de dexametasona ao

sistema polimérico. Esse comportamento estaria levando ao preenchimento dos poros da estrutura pelo fármaco.

A fim de determinar as interações entre os polímeros e entre o fármaco e os polímeros nas micropartículas, foram realizadas as caracterizações por calorimetria exploratória diferencial.

### **5.2.6 Calorimetria exploratória diferencial**

Considerando a presença de cristais observados por microscopia e a estrutura polimérica das micropartículas é relevante avaliar tanto a influência do fármaco, quanto do processamento e da composição da blenda sobre as propriedades térmicas dos sistemas. Dessa forma, as matérias-primas, as misturas físicas (empregadas nas proporções presentes em cada formulação) e as micropartículas foram submetidas ao aquecimento de  $-20$  a  $300$  °C, com taxa de  $10$  °C/minuto. Os parâmetros térmicos foram obtidos durante o primeiro aquecimento para prevenir que mudanças morfológicas afetassem a interpretação dos eventos. Os termogramas estão apresentados nas Figuras 23, 24, 25 e 26 e os respectivos resultados de temperatura de fusão ( $T_m$ ) do P(HBHV) e da PCL e de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do P(HBHV) estão compilados nas Tabelas 12, 13, 14 e 15. A  $T_g$  da PCL não foi determinada uma vez que relatos na literatura demonstraram a dificuldade de detecção desta transição, em blendas de PHB e PCL (Kumagai e Doi, 1992). Os valores de  $T_g$  encontrados em estudos utilizando a PCL demonstraram valores em torno de  $-70$  °C para o polímero analisado individualmente (Kumagai e Doi, 1992; Vogelsanger *et al.*, 2003).

A temperatura de fusão do P(HBHV), analisado individualmente, foi de  $171$  °C (Figura 23). O processo de obtenção das micropartículas levou à formação de dois picos de fusão para o P(HBHV) (Figuras 24, 25 e 26). Esse comportamento pode estar relacionado com a diferença de tratamento a que o polímero foi submetido (Sandor *et*

*al.*, 2002). Assim, a história térmica do P(HBHV) durante a obtenção da matéria-prima foi diferente daquela ocorrida durante a preparação das micropartículas por emulsificação/evaporação de solvente. Além disso, verificou-se que houve uma leve redução nos valores de temperatura de fusão dos picos referentes ao P(HBHV) nas formulações contendo fármacos, principalmente nas micropartículas contendo acetato de dexametasona.

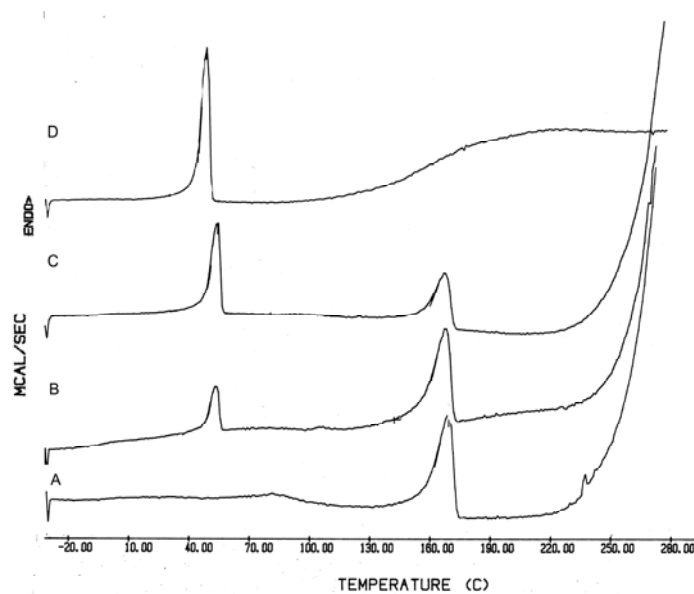


Figura 23. Termograma do P(HBHV) individualmente (A), das misturas físicas P(HBHV):PCL [90:10 (m/m)] (B) e P(HBHV):PCL [80:20 (m/m)] (C) e da PCL individualmente (D).

Tabela 12. Valores de temperatura de fusão (Tm) do P(HBV) e da PCL e temperatura de transição vítrea (Tg) do P(HBV) nas matérias-primas e misturas físicas.

Componentes	PHBV		PCL	Tg (°C)
	P2	P 1		
P(HBV)	-	171	-	-2,1
PCL	-	-	56	-
MFB-1	-	170,20	55,90	-
MFB-2	-	170,04	56,70	-

MFB-1 = P(HBV):PCL [90:10 (m/m)]

MFB-2 = P(HBV):PCL [80:20 (m/m)]

O pico de fusão da PCL, analisada individualmente, foi de 56 °C (Figura 23). Avaliando-se o comportamento térmico da PCL nas micropartículas constatou-se que sua fusão ocorreu entre 51 e 56 °C (Figuras 24, 25 e 26). As formulações contendo acetato de dexametasona apresentaram temperaturas de fusão da PCL (52 a 54 °C) um pouco inferiores daquelas verificadas para o polímero puro e para as formulações sem fármaco (56 °C).

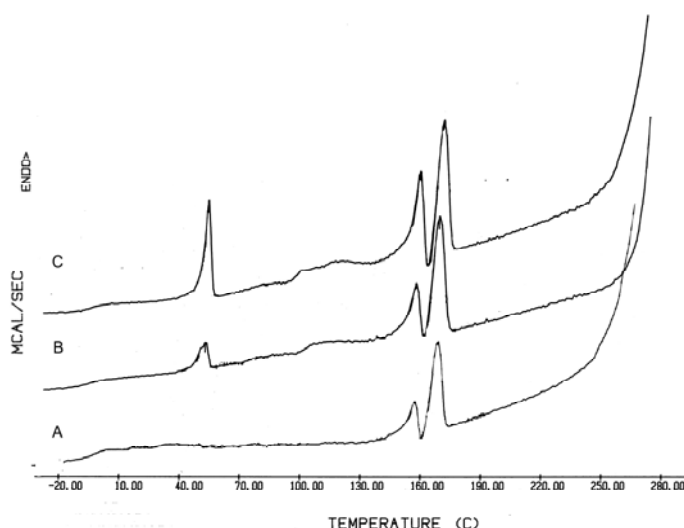


Figura 24. Termograma das amostras FB-0-40 (A), FB-1-40 (B) e FB-2-40 (C).



Tabela 13. Valores de temperatura de fusão (Tm) do P(HBHV) e da PCL e temperatura de transição vítrea (Tg) do P(HBHV) nas formulações sem fármaco.

Componentes	Tm (°C)		PCL	Tg (°C)
	PHBHV			PHBHV
	P2	P 1		
FB-0-40	160	172	-	-2,4
FB-1-40	161	172	56	-2,9
FB-2-40	161	173	56	-2,5

Visando determinar a miscibilidade da blenda e a influência da presença dos fármacos na estrutura polimérica, a variação dos valores de temperatura de transição vítrea do P(HBHV) foram analisadas. A miscibilidade de uma blenda é indicada pela aproximação entre dos valores de Tg de cada um dos polímeros. Nas formulações FB-0-40, FB-1-40 e FB-2-40 verificou-se que os valores de Tg permaneceram em torno de -2,9 e -2,4 °C, sendo bastante próximos ao valor apresentado pelo P(HBHV) analisado individualmente (-2,1 °C), demonstrando a imiscibilidade da blenda P(HBHV):PCL. Dessa forma, pode-se considerar o sistema polimérico constituído por duas fases. Uma delas contendo o P(HBHV) como principal componente e outra fase, dominada pela presença de PCL. Esse modelo de distribuição dos polímeros foi relatado por Embleton e Tighe (1993) e os autores relacionaram essa segregação à diferença de solubilidade de cada polímero na fase orgânica empregada na preparação das micropartículas.

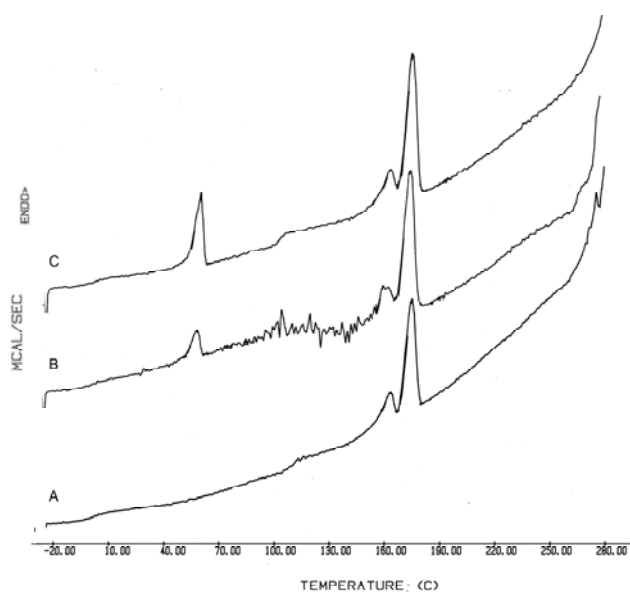


Figura 25. Termograma das amostras DX-0-40 (A), DX-1-40 (B) e DX-2-40 (C).

Tabela 14. Valores de temperatura de fusão ( $T_m$ ) do P(HBHV) e da PCL e temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do P(HBHV) nas formulações contendo dexametasona.

Componentes	$T_m$ (°C)		PCL	$T_g$ (°C)
	PHBHV			PHBHV
	P2	P 1		
DX-0-40	160	171	-	-1,1
DX-1-40	156	170	55	-5,0
DX-2-40	159	171	56	-2,6

O valor de  $T_g$  para o P(HBHV) analisado individualmente foi de  $-2,1$  °C (Figura 12 e Tabela 23). As formulações DX-0-40, DX-1-40 e DX-2-40 apresentaram valores de  $T_g$  do P(HBHV) de  $-1,1$ ,  $-5,0$  e  $-2,6$  °C, respectivamente. Não houve variação evidente na  $T_g$  do P(HBHV) em comparação com os valores apresentados pelas formulações sem fármaco (em torno de  $-2,5$  °C) (Figura 24 e Tabela 13).

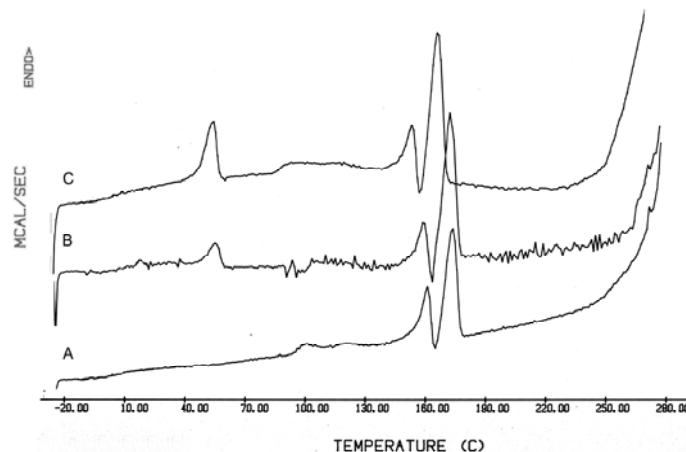


Figura 26. Termograma das amostras ADX-0-40 (A), ADX-1-40 (B) e ADX-240 (C).

Tabela 15. Valores de temperatura de fusão ( $T_m$ ) do P(HBHV) e da PCL e temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do P(HBHV) nas formulações contendo acetato de dexametasona.

Componentes	$T_m$ (°C)		PCL	$T_g$ (°C)
	PHBHV			PHBHV
	P2	P 1		
ADX-0-40	157	169	-	0,3
ADX-1-40	156	168	52	3,7
ADX-2-40	156	169	54	1,5

Por outro lado, nas formulações ADX-0-40, ADX-1-40 e ADX-2-40 os valores de  $T_g$  foram de 0,3, 3,7 e 1,5 °C, respectivamente, sendo bastante superiores àqueles observados nas formulações sem fármaco ou contendo dexametasona. Esse acréscimo dos valores de  $T_g$  verificados para as formulações contendo acetato de dexametasona indicam que este componente estaria causando um efeito antiplastificante, reduzindo a elasticidade e a flexibilidade do P(HBHV). O efeito antiplastificante está relacionado com a supressão das relaxações secundárias, em particular as relaxações  $\beta$  que ocorrem em temperaturas abaixo da  $T_g$ , envolvendo pequenos segmentos da cadeia polimérica nas regiões amorfas do polímero (Zorn *et al.*, 1998). Existem relatos desse

tipo de comportamento envolvendo solutos incorporados em matrizes poliméricas e relacionam a elevação da Tg ao aumento da afinidade soluto-polímero. Este efeito intensifica-se quando os parâmetros de solubilidade do soluto e do polímero são semelhantes (Slark, 1997; Garcia *et al.*, 2004). Solutos que agem como antiplastificantes apresentam algumas características moleculares definidas, quais sejam, baixa massa molar, estrutura relativamente planar e rígida e presença de átomos específicos, tais como halogênios, nitrogênio, oxigênio, entre outros (Slark, 1997). Pode-se sugerir que o acetato de dexametasona esteja interagindo com a porção amorfa do P(HBV), formando uma dispersão molecular do fármaco nessa matriz das micropartículas.

Os pontos de fusão da dexametasona e do acetato de dexametasona, analisados individualmente, foram 261 °C e 232 °C, respectivamente (Figura 27) e estão de acordo com dados de literatura para esses fármacos (Budavari, 1996). A fim de avaliar o comportamento térmico dos cristais com formato de losango verificados por microscopia óptica (Figura 17) após a recristalização do fármaco nas condições empregadas no processo de emulsificação/evaporação de solvente, essa amostra foi analisada e o ponto de fusão encontrado foi de 258 °C (Figura 27 C).

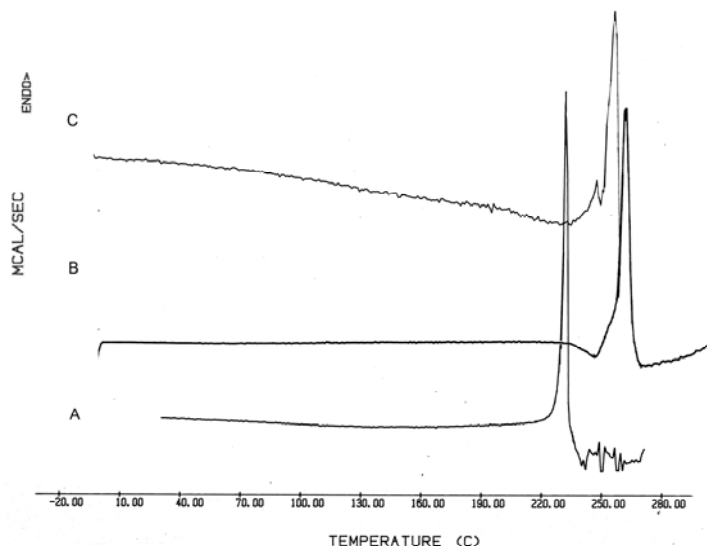


Figura 27. Termograma dos fármacos acetato de dexametasona (A), dexametasona (B) e dexametasona submetida ao processo de emulsificação/evaporação de solvente (C).

No que se refere à ocorrência de pico relativo ao fármaco nas formulações DX-0-40, DX-1-40 e DX-2-40, não foi possível observar a fusão da dexametasona (Figura 25). Este resultado foi devido a um evento endotérmico de degradação característico do polímero, em torno de 250 °C que impede a visualização da temperatura de fusão da dexametasona em torno de 361 °C (Quental e Felisberti, 2001).

Por outro lado, apesar de o acetato de dexametasona apresentar ponto de fusão abaixo do evento de degradação do polímero, o pico referente a este fármaco também não foi observado nos termogramas das micropartículas ADX-0-40, ADX-1-40 e ADX-2-40 (Figura 26). Com o intuito de testar se a análise por DSC teria sensibilidade para detectar a presença de fármaco nas amostras, devido à sua concentração de 10,0 % (m/m), foram preparadas misturas das micropartículas FB-2-40 com acetato de dexametasona nas proporções de 5 e 1 % (m/m) (Figura 28). Constatou-se que até 5 % (m/m) é possível observar-se a temperatura de fusão do fármaco, porém, na mistura contendo 1 % (m/m) de fármaco não se detecta seu pico de fusão. Dessa forma, as análises da série ADX sugerem que a fração de cristais nas micropartículas seria menor do que 5 % (m/m).

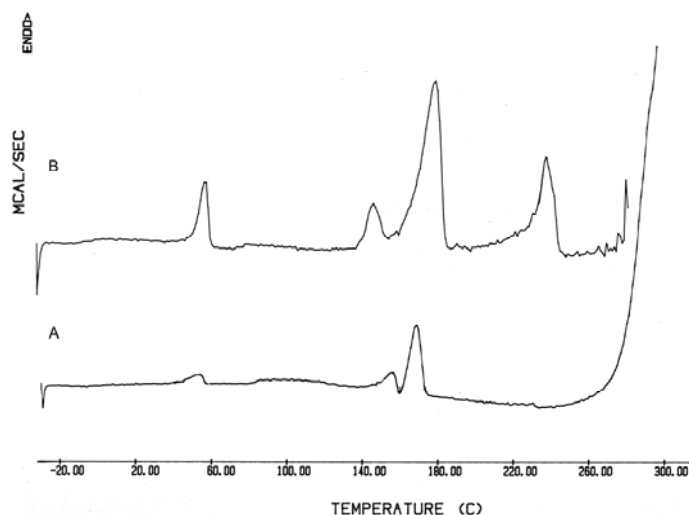


Figura 28. Termograma das amostras FB-2-40, adicionadas de 1 % (m/m) (A) e 5 % (m/m) (B) de acetato de dexametasona.

Além dos parâmetros térmicos de Tg e Tm, é possível calcular-se a cristalinidade ( $\alpha$ ) dos polímeros, empregando os valores de entalpia de fusão fornecidos pelas análises. A cristalinidade é um parâmetro que permite explicar a influência da composição da blenda e da presença de fármacos sobre o crescimento dos cristalitos durante a organização das lamelas do polímero nas micropartículas. O cálculo da cristalinidade (equação 5) envolve os valores de entalpia de fusão experimental ( $\Delta H_f$ ) de cada polímero e a entalpia de fusão no equilíbrio ( $\Delta H_f^0$ ) (PCL = 146 J/g e PHB = 142 J/g, Vogelsanger, 2003). Os valores de  $\Delta H_f$  e os resultados de cristalinidade do P(HBV), da PCL e das formulações estão expressos na Tabela 16. Os valores de  $\Delta H_f$  do P(HBV) foram obtidos a partir da soma dos valores de entalpia de cada um dos dois picos de fusão relativos a este polímero (P1 + P2).

$$\alpha_c = \frac{\Delta H}{\Delta H_f^0} \times 100 \quad (\text{equação 5})$$

Tabela 16. Entalpias de fusão e cristalinidades relativas do P(HBV), da PCL e das formulações.

Componentes e formulações	$\Delta H_f$ (J/g)		$\alpha_c$ (%)	
	P(HBV)(P1 + P2)	PCL	P(HBV)(P1 + P2)	PCL
P(HBV)	41	-	29	-
PCL	-	66	-	45
FB-0-40	47	-	33	-
FB-1-40	39	5,0	28	3,5
FB-2-40	49	13	34	8,6
DX-0-40	32	-	22	-
DX-1-40	28	4,0	20	2,5
DX-2-40	31	13	22	8,7
ADX-0-40	47	-	33	-
ADX-1-40	46	5,0	32	3,2
ADX-2-40	51	14	36	10

Os valores de cristalinidade dos polímeros analisados individualmente foram de 45 % para a PCL e de 29 % para o P(HBV). Os valores de cristalinidade do P(HBV) nas formulações FB-0-40, FB-1-40 e FB-2-40 foram, respectivamente, 33, 28 e 34 %. Nas formulações DX-0-40, DX-1-40 e DX-2-40, a cristalinidade do P(HBV) foi de 22, 20 e 22 %, respectivamente. Por sua vez, as formulações ADX-0-40, ADX-1-40 e ADX-2-40 apresentaram valores de cristalinidade do P(HBV) de 33, 32 e 36 %. Verificou-se para todas as formulações que a presença de PCL nos sistemas não influenciou nos valores de cristalinidade do P(HBV). Por outro lado, no que se refere aos resultados de cristalinidade da PCL, em função da presença de P(HBV), percebe-se que houve uma redução dos valores em função do aumento do conteúdo de P(HBV) na blenda. Assim, a PCL analisada individualmente apresentou cristalinidade de 45 % enquanto que, nas micropartículas preparadas com blends de P(HBV):PCL 80:20 e 90:10 (m/m), a cristalinidade diminuiu para valores em torno de 10 e 3 %, respectivamente. Esse comportamento foi independente da presença ou do tipo de fármaco na formulação, como pode ser visualizado na Figura 29.

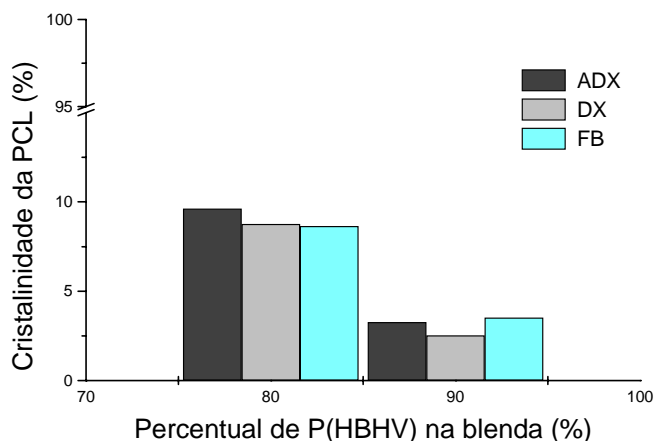


Figura 29. Efeito da presença do P(HBV) na cristalinidade da PCL.

Quanto à influência dos fármacos na cristalinidade dos polímeros, foi observado que tampouco a presença ou o tipo de fármaco afetaram essa propriedade sobre a PCL. Entretanto, a dexametasona apresentou influência sobre a cristalinidade do P(HBV), conduzindo à redução dos valores. Essa influência causada pela adição de

moléculas nas regiões cristalinas de matrizes poliméricas já foi relatada na literatura e foi relacionada às condições de cristalização das cadeias poliméricas na presença destes aditivos. Dessa forma, a redução na cristalinidade causada pela dexametasona estaria relacionada à localização do fármaco nas fronteiras dos cristalitos, reduzindo o seu crescimento. (Akhtar *et al.*, 1992; Ginés *et al.*, 1996).

Avaliando-se os resultados fornecidos pela análise térmica, foi observada a imiscibilidade da blenda, a influência marcante do acetato de dexametasona sobre a Tg e a cristalinidade do P(HBHV) e a influência da presença do P(HBHV) sobre a cristalinidade da PCL. Por outro lado, a cristalinidade da PCL não foi modificada pela presença dos fármacos. Assim, pode-se supor que os fármacos estejam preferencialmente associados aos domínios formados pelo P(HBHV).

### **5.2.7 Perfis de liberação da dexametasona e do acetato de dexametasona em erlenmeyer a partir das micropartículas**

Objetivando avaliar o efeito das diferenças entre as formulações verificadas durante a caracterização físico-química sobre o perfil de liberação da dexametasona e do acetato de dexametasona, a metodologia de dissolução *in vitro*, em tampão pH 7,4 a 37 °C foi realizada.

Estudos preliminares empregando o método de dissolução em célula de fluxo apresentaram limitações, especialmente para a avaliação da liberação do acetato de dexametasona. Dessa forma, a fim de obter perfis adequados optou-se pela escolha do método de liberação em erlenmeyer (Beck *et al.*, 2004). Esta técnica permitiu, ao mesmo tempo, obter coletas de pontos durante um intervalo prolongado de tempo e possibilitou a proteção, frente à luz, do fármaco durante a dissolução. A Figura 30 demonstra os perfis de liberação da dexametasona, durante 360 minutos. A velocidade de liberação do fármaco, a partir das micropartículas, foi superior àquela observada para o fármaco puro. Os percentuais de fármaco dissolvido após 1 e 2 horas de



experimento estão apresentados na Tabela 17. Observou-se que, após uma hora de experimento, houve liberação de mais de 50 % de dexametasona a partir das micropartículas, enquanto que a liberação do fármaco comercial puro foi de apenas 18 %.

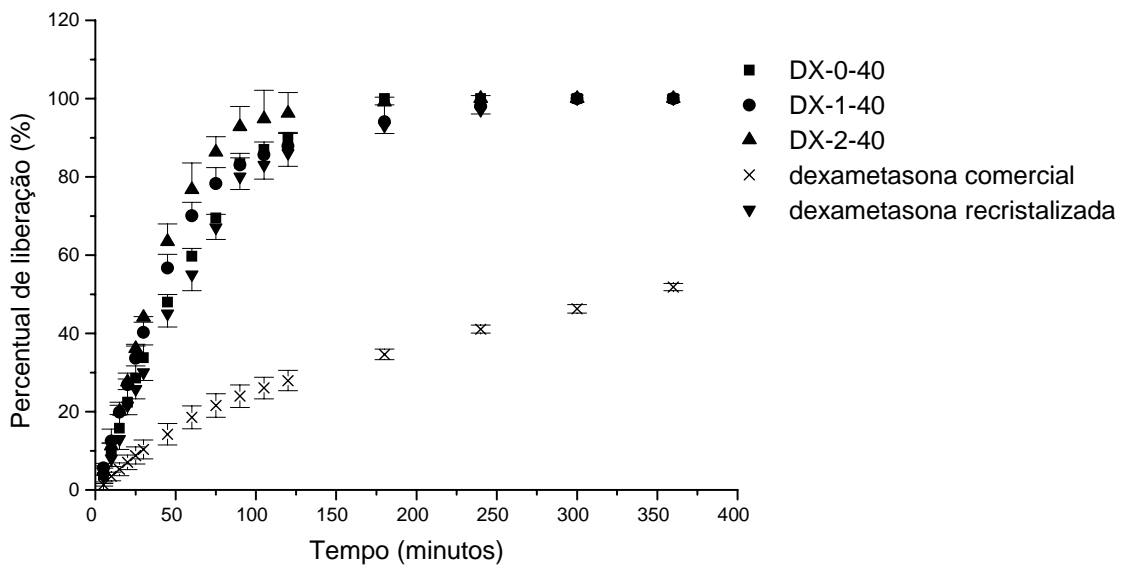


Figura 30. Perfis de liberação da dexametasona comercial, recristalizada e a partir das micropartículas.

Visando determinar se a diferença entre os perfis de liberação das micropartículas em relação à dexametasona comercial fora decorrente da alteração na forma dos cristais do fármaco durante o processo de preparação, a dexametasona foi submetida ao mesmo processo na ausência dos polímeros. Após a obtenção dos cristais de dexametasona pelo processo de emulsificação/evaporação de solvente, os mesmos foram analisados através de microscopia óptica (Figura 17). Verificou-se a formação de cristais em formato de losango, semelhante a apresentada pelos cristais livres vistos nas formulações DX-0-40, DX-1-40 e DX-2-40 (Figura 16). Foi determinada a dissolução desses cristais e verificou-se não haver diferença significativa entre seu

valor de eficiência de dissolução e os valores fornecidos pelas formulações DX-0-40 e DX-1-40 (Tabela 17). A maior velocidade de dissolução do fármaco recristalizado pode estar relacionada à cristalinidade e à redução do tamanho dos cristais, após a sua dissolução em clorofórmio. Além disso, mediante análise térmica do fármaco processado, observou-se uma redução no ponto de fusão em relação à dexametasona comercial de 261,43 °C para 257,75 °C (Figura 27), que pode ser um indício de aumento da velocidade de dissolução do cristal.

Tabela 17. Dissolução da dexametasona pura e a partir das formulações, após 60 e 120 minutos de experimento.

Amostra	Dissolução (%) $\pm$ DP	
	Após 60 minutos	Após 120 minutos
DX-0-40	60 $\pm$ 2,2	90 $\pm$ 1,4
DX-1-40	70 $\pm$ 3,1	88 $\pm$ 2,7
DX-2-40	77 $\pm$ 6,7	96 $\pm$ 5,2
Dexametasona comercial	18 $\pm$ 3,4	28 $\pm$ 2,9
dexametasona recristalizada	55 $\pm$ 3,8	86 $\pm$ 3,0

A rápida liberação da dexametasona foi devida à presença de cristais livres do fármaco, evidenciados nos resultados de caracterização morfológica por microscopia óptica e eletrônica. Além disso, estas formulações apresentaram valores de área superficial bastante elevados, permanecendo em torno de 124 a 190 m<sup>2</sup>/g, favorecendo a dissolução.

A equação que apresentou melhor ajuste matemático (Figura 31) aos perfis de liberação obtidos foi a do modelo monoexponencial. Os parâmetros foram fornecidos pela modelagem matemática realizada empregando o programa Micromath Scientific Software<sup>®</sup>. Os valores de critério de seleção do modelo (MSC), coeficiente de correlação (r), constante de velocidade (k) e os tempos de meia-vida (t<sub>1/2</sub>) dos perfis estão apresentados a seguir (Tabela 17).

A composição polimérica das micropartículas não influenciou as velocidades de liberação da dexametasona [ANOVA (p>0,05)]. Porém, verificou-se uma tendência de

aumento dos valores das constantes de velocidade nas formulações com PCL (Tabela 18), sendo que esse aumento foi proporcional ao incremento deste polímero na blenda.

Tabela 18. Parâmetros obtidos empregando a modelagem dos dados à equação monoexponencial.

Formulações	MSC	r	k ± DP	t <sub>1/2</sub> (minutos)
DX-0-40	3,70	0,998	0,016 ± 0,0010	43,8
DX-1-40	4,95	0,999	0,019 ± 0,0090	36,9
DX-2-40	3,72	0,998	0,020 ± 0,0050	35,5
dexametasona	2,74	0,989	0,0020 ± 0,00010	346
dexametasona recristalizada	4,20	0,997	0,014 ± 0,0040	49,5

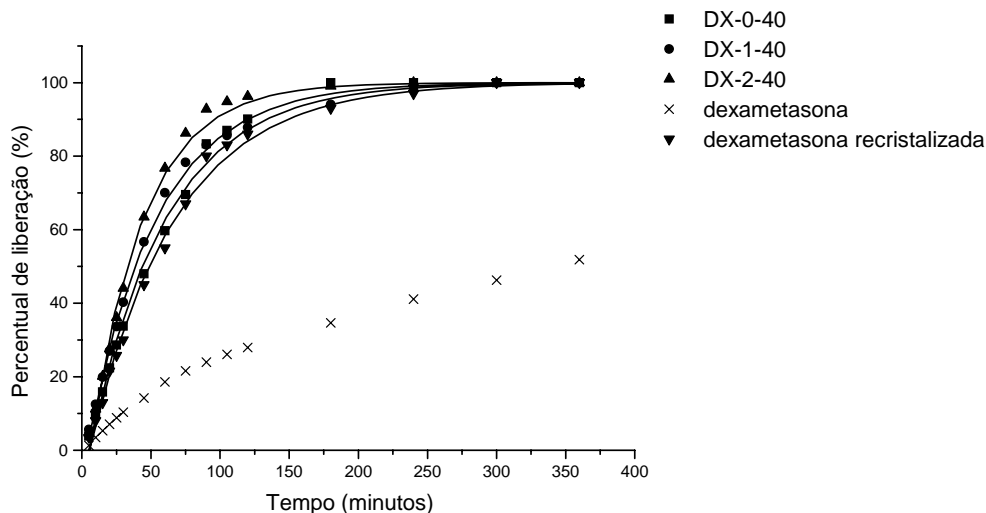


Figura 31. Ajustes gráficos da equação monoexponencial aos perfis de liberação.

No que se refere às formulações ADX-0-40, ADX-1-40 e ADX-2-40, considerando os resultados de caracterização obtidos até o momento, procurou-se estabelecer a influência da composição das micropartículas nos perfis de liberação *in vitro* do fármaco. O experimento de liberação do acetato de dexametasona foi conduzido até a 250 horas. A seguir, na Figura 32, estão apresentados os perfis de dissolução do

acetato de dexametasona não encapsulado e a partir das micropartículas das formulações ADX-0-40, ADX-1-40 e ADX-2-40.

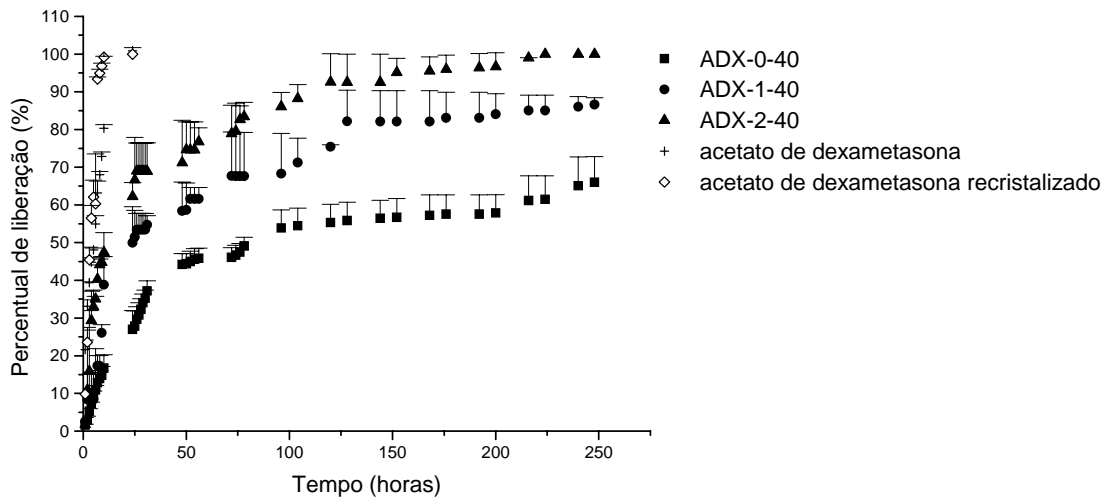


Figura 32. Perfis de liberação do acetato de dexametasona comercial, recristalizado e a partir das micropartículas.

O acetato de dexametasona, quando associado às micropartículas, apresentou velocidades de dissolução menores do que aquelas demonstradas pelo fármaco não encapsulado. Para a formulação ADX-0-40, houve dissolução de 50 % do fármaco nas primeiras 100 horas de experimento, seguida de uma liberação lenta até 250 horas. O efeito *burst* verificado nas primeiras 24 horas foi atribuído à dissolução dos cristais localizados externamente. Foi observado que as formulações ADX-1-40 e ADX-2-40 apresentaram *burst* mais proeminente do que aquele demonstrado pela formulação ADX-0-40. Esse comportamento está relacionado com a dissolução da porção de fármaco adsorvida às micropartículas. Foi observada, através de microscopia eletrônica, a ocorrência de cristais livres na formulação ADX-0-40, cujo tamanho é bastante superior aos cristais finamente dispersos na superfície das micropartículas das formulações ADX-1-40 e ADX-2-40. Assim, a dissolução desses cristais menores foi mais rápida, contribuindo para o maior *burst* evidenciado. Além disso, apesar de não ter havido aumento nos valores de área superficial nas micropartículas de blendas de P(HBHV):PCL, foi verificado por microscopia eletrônica, um aumento na porosidade

(macroporos) das micropartículas em função do aumento da fração de PCL na blenda. Essa característica pode ter favorecido o acesso do meio de dissolução à partícula, favorecendo a liberação do fármaco.

A fim de estabelecer as constantes cinéticas envolvidas na liberação foi realizada a modelagem matemática dos perfis de liberação até 250 horas. A escolha do modelo de melhor ajuste levou em consideração o critério de seleção do modelo (MSC), o coeficiente de determinação ( $r$ ) e o ajuste gráfico. Os parâmetros fornecidos pela modelagem matemática feita empregando o programa Micromath Scientific Software<sup>®</sup> estão apresentados na Tabela 19 e na Figura 23.

Os resultados da modelagem matemática para o experimento indicaram um melhor ajuste dos dados experimentais ao modelo biexponencial. As constantes cinéticas  $k_1$  e  $k_2$  demonstraram diferença significativa entre os valores apresentados pelas três formulações [ANOVA ( $p < 0,05$ )]. A fase rápida apresentou as seguintes constantes cinéticas  $0,052 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,085 \text{ h}^{-1}$  e  $0,216 \text{ h}^{-1}$  para as formulações ADX-0-40, ADX-1-40 e ADX-2-40, respectivamente. Foi verificado que o *burst* observado para as formulações ADX-1-40 e ADX-2-40 foi mais rápido do que para a formulação ADX-0-40. Essa liberação mais rápida é explicada pelo percentual de fármaco adsorvido nas micropartículas, referente ao parâmetro  $a$ , sendo que nas formulações ADX-1-40 e ADX-2-40 esse valor foi em torno de 60 % e na formulação ADX-0-40 foi em torno de 40 %.

A fase sustentada está relacionada à liberação da porção de fármaco disperso no interior da partícula e apresentou constantes cinéticas de  $0,003 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,006 \text{ h}^{-1}$  e  $0,017 \text{ h}^{-1}$  para as formulações ADX-0-40, ADX-1-40 e ADX-2-40, respectivamente. Verifica-se um aumento nas velocidades de liberação conforme o percentual de P(HBV) nas blendas é reduzido. Considerando que o fármaco esteja associado preferencialmente aos domínios de P(HBV) na blenda é possível que aumento da liberação seja devido à maior saturação do fármaco na matriz desse componente. Em estudos empregando micropartículas poliméricas foi visto que o aumento da concentração do fármaco na matriz polimérica é diretamente proporcional à sua difusão a partir do carreador (Higuchi, 1963; Kim, 2000).

Tabela 19. Parâmetros obtidos empregando a modelagem dos dados à equação biexponencial.

Formulação	Parâmetro	$\bar{x}$	DP
ADX-0-40	MSC	4,02	1,19
	<i>r</i>	0,987	0,015
	<i>a</i>	0,382	0,052
	<i>b</i>	0,582	0,064
	<i>k1</i>	0,052	0,012
	<i>k2</i>	0,003	$5,8 \cdot 10^{-4}$
	$t_{1/2 k1}$ (horas)	14,0	3,50
	$t_{1/2 k2}$ (horas)	270	66,7
ADX-1-40	MSC	3,80	0,020
	<i>r</i>	0,990	0,002
	<i>a</i>	0,574	0,123
	<i>b</i>	0,487	0,101
	<i>k1</i>	0,085	0,022
	<i>k2</i>	0,006	$5,8 \cdot 10^{-4}$
	$t_{1/2 k1}$ (horas)	8,51	2,07
	$t_{1/2 k2}$ (horas)	123	13,3
ADX-2-40	MSC	4,43	0,909
	<i>r</i>	0,993	0,004
	<i>a</i>	0,604	0,095
	<i>b</i>	0,494	0,136
	<i>k1</i>	0,216	0,098
	<i>k2</i>	0,017	0,006
	$t_{1/2 k1}$ (horas)	3,65	1,48
	$t_{1/2 k2}$ (horas)	43,5	16,9

Os tempos de meia-vida da fase rápida foram de 14, 8 e 4 horas para ADX-0-40, ADX-1-40 e ADX-2-40 e a fase de liberação sustentada foram de 270, 123 e 43 horas, respectivamente. Para ambas as fases verificou-se que os tempos de meia-vida diminuíram com o incremento de PCL nas formulações.

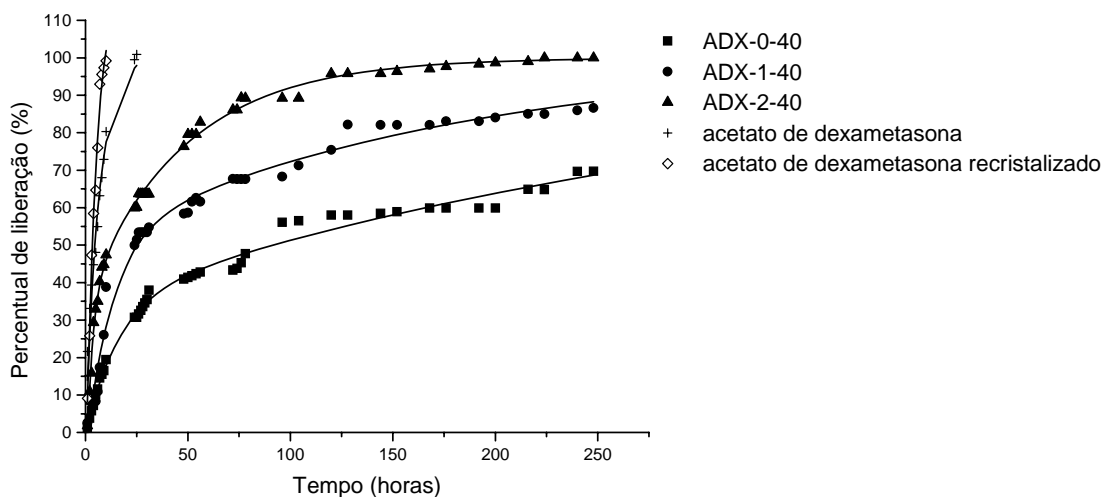


Figura 33. Ajustes gráficos da equação biexponencial aos perfis de liberação das micropartículas e monoexponencial para o fármaco.

A Figura 34 apresenta as imagens das micropartículas após terem sido submetidas ao experimento até dissolução completa do fármaco, após incubação por 15 dias. É possível evidenciar que não houve perda da forma ou alterações na estrutura de poros.

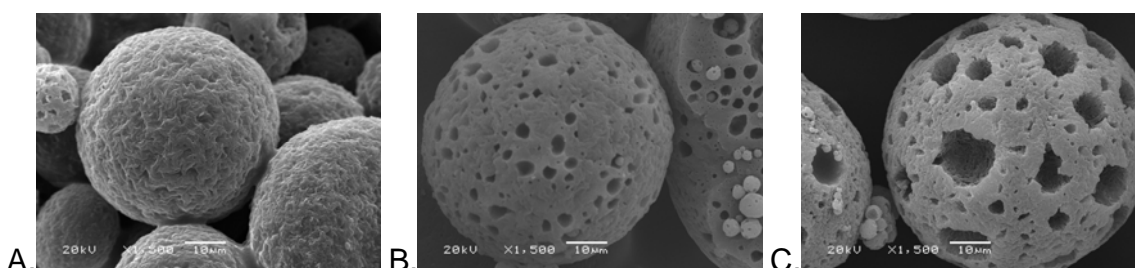


Figura 34. Fotomicrografias de varredura das micropartículas ADX-0-40 (A), ADX-1-40 (B) e ADX-2-40 (C), observadas após 100 % de liberação, em aumento de 1500 vezes.

Além das imagens, foram realizadas medidas de área superficial das micropartículas antes e após o experimento de liberação (Tabela 20). Os valores de área superficial obtidos após a liberação do fármaco foram bastante superiores daqueles verificados para as amostras originais.

Tabela 20. Área superficial e coeficiente de determinação das micropartículas, antes e após o experimento de liberação.

Formulações	Área superficial (m <sup>2</sup> /g)		r <sup>2</sup>	
	Antes	Depois	Antes	Depois
ADX-0-40	43	192	0,802	0,903
ADX-1-40	27	226	0,988	0,879
ADX-2-40	21	182	0,916	0,971

Este aumento foi causado pela formação de poros adicionais, formados pela liberação do fármaco encapsulado na matriz das micropartículas. Esta suposição foi feita considerando que, após 15 dias de incubação não haja degradação significativa da partícula, como demonstrado em estudos relatados na literatura (Atkins e Peacock, 1997; Maia *et al.*, 2004).

Finalmente, o estudo demonstrou que a modulação dos perfis de liberação do acetato de dexametasona pode ser realizada pelo percentual de PCL adicionada nas formulações, ou seja, quanto maior a concentração de PCL na blenda, mais rápida a liberação desse fármaco. Além disso, pode-se produzir sistemas, nos quais a liberação do acetato de dexametasona foi sustentada. Os dados de modelagem sugerem que 40 a 60 % da concentração inicial do fármaco contribuíram para o efeito *burst*, enquanto que o restante foi responsável pelos tempos de meia-vida entre 43 e 270 horas, dependendo da concentração de PCL. Os dados de DSC sugerem que a porção do acetato de dexametasona que contribuiu para a liberação sustentada esteja molecularmente dispersa na porção amorfa do P(HBHV).



## **6. CONCLUSÕES**





Foram obtidas micropartículas de P(HBHV) e de blendas de P(HBHV):PCL contendo dexametasona ou acetato de dexametasona através do método de emulsificação/evaporação de solvente, empregando-se razões entre fase orgânica/fase aquosa de 1:4 e 1:1 (v/v), com rendimento e eficiência de encapsulação satisfatórios.

Houve diferença entre os perfis de liberação da dexametasona até 360 minutos a partir das micropartículas DX-0, DX-1 e DX-2 preparadas com razão entre fase orgânica/fase aquosa de 1:4 (v/v), em comparação à dissolução do fármaco puro, em função da presença de cristais de fármaco não encapsulado. Por outro lado, as formulações ADX-0, ADX-1 e ADX-2 apresentaram redução da liberação do acetato de dexametasona em relação ao fármaco puro.

Os diâmetros de partícula permaneceram em torno de 100 a 200  $\mu\text{m}$  e variaram em função do volume de fase orgânica e a área superficial foi afetada pelo percentual de PCL na blenda e pela presença de cristais do fármaco nas formulações.

O aumento da razão entre fase orgânica/fase aquosa de 1:4 para 1:1 (v/v) propiciou a obtenção de micropartículas com maior eficiência de encapsulação nas formulações ADX-0-40, ADX-1-40 e ADX-2-40. Entretanto, para as formulações DX-0-40, DX-1-40 e DX-2-40, o aumento do volume de fase orgânica não demonstrou aumento na encapsulação da dexametasona.

A análise térmica das amostras demonstrou que o processo de obtenção das micropartículas alterou a estrutura cristalina do P(HBHV). A variação dos parâmetros térmicos do P(HBHV) causada pela encapsulação dos fármacos denotou a associação preferencial do fármaco a este componente da blenda.

Os perfis de dissolução da dexametasona a partir das micropartículas DX-0-40, DX-1-40 e DX-2-40 apresentaram ajustes adequados ao modelo monoexponencial e foram semelhantes aos perfis apresentados pelo fármaco recristalizado.

Para as formulações ADX-0, ADX-1 e ADX-2 houve liberação sustentada do fármaco por até 250 horas quando associado aos sistemas e os perfis de liberação foram bifásicos. As fases rápidas apresentaram  $k_1$  de  $0,052 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,085 \text{ h}^{-1}$  e  $0,216 \text{ h}^{-1}$  e as fases sustentadas apresentaram  $k_2$  de  $0,003 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,006 \text{ h}^{-1}$  e  $0,017 \text{ h}^{-1}$  para as formulações ADX-0, ADX-1 e ADX-2, respectivamente. O aumento das constantes de liberação esteve relacionado ao aumento do percentual de PCL nas formulações.

O aumento da área superficial específica das micropartículas após a liberação de 100 % do fármaco e os dados de DSC sugere que a porção encapsulada do acetato de dexametasona está dissolvida na parte amorfa do P(HBHV) das micropartículas (formulações ADX-0, ADX-1 e ADX-2).

## **7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**





AKHTAR, S.; POUTON, C. W.; NOTARIANNI, L. J. Crystallization behaviour and drug release from bacterial polyhydroxyalkanoates. **Polymer**, v. 33, n. 1, p. 117-126, 1992.

ALLEMÁNN, E.; LEROUX, J.; GURNY, R. Polymeric nano- and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 34, p. 171-189, 1998.

AL-GIBALY, I.; MEKI, A. M. A.; ABDEL-GHAFFAR, S. K. Novel B melatonin-loaded chitosan microcapsules: in vitro characterization and antiapoptosis efficacy for aflatoxin B1-induced apoptosis in rat liver. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, n. 1, p. 4-22, 2003.

ARSHADY, R. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules 2. Polylactides and related polyesters. **Journal of Controlled Release**, v. 17, n. 1, p. 1-21, 1991.

ATKINS, T. W.; PEACOCK, S. J. *In vitro* biodegradation of polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate microcapsules exposed to Hank's buffer, newborn calf serum, pancreatin and synthetic gastric juice. **Journal of Microencapsulation**, v. 14, n. 1, p. 35-49, 1997.

BABAK, V. G.; CHERNYSHEVA, YU. V.; KILDEEVA, N. R.; TIKHONOV, V. E.; BAROS, F.; DUMAS, D.; UBRICH, N.; MAINCENT, Ph. Colloid aspects of nano- and microencapsulation of bioactive substances by emulsification-solvent evaporation method. XII International Workshop on Bioencapsulation, Vitoria-Gasteiz. **Livro de Resumos**, 2004. v. único. p. 41-44.

BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; LIONZO, M.I. Z., COSTA, T. M. H.; BENVENUTTI, E. V.; RE, M. I.; GALLAS, M. R.; GUTERRES, S. S. Micropartículas nanorrevestidas: tamanho médio, microscopia óptica, e difração de raios-X. In: XI Encontro de Química da Região Sul, 2003, Pelotas. **Livro de Resumos**, 2003. v. único. p. Q1-20.

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.

BERKLAND, C.; KIM, K. K.; PACK, D. W. Fabrication of PLG microspheres with precisely controlled and monodisperse size distributions. **Journal of Controlled Release**, v. 73, p. 59-74, 2001.

BIRNBAUM, D. T.; KOSMALA, J. D.; HENTHORN, D. B.; BRANNON-PEPPAS, L. Controlled release of b-estradiol from PLGA microparticles: The effect of organic solvent on encapsulation and release. **Journal of Controlled Release**, v.65, p. 375-387, 2000

BODMEIER, R.; CHEN, H. Preparation of biodegradable poly( $\pm$ )lactide microparticles using a spray-drying technique. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 20, p. 754-757, 1988.

BODMEYER, R.; MCGINITY, J. W. Solvent selection on the preparation of poly(D,L-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 43, n. 1-2, p. 179-186, 1988.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária, Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, 2 de junho de 2003.

BRAUNNEG, G., LEFEBVRE, G., GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 65, p. 127-161, 1998.

BROPHY, M. R.; DEASY, P. B. In vitro and in vivo studies on biodegradable polyester microparticles containing sulphamethizole. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 29, p. 223-231, 1986.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, p. 309-320, 1938.

BUDAVARI, S. (Ed.) **The Merck Index**, 12<sup>th</sup> ed., Whitehouse Station: Merck, 1996. Merck, 1996.



BURGER, J. J.; TOMLINSON, E.; MULDER, E. M. A.; MCVIE, J.G. Albumin microspheres for ultra-arterial tumour targeting. I. Pharmaceutical aspects. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 23, n. 3, p. 333-344, 1985.

CHA, Y.; PITT, C. G. The biodegradability of polyester blends. **Biomaterials** v. 11, p. 108, 1990.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. **Progress in Polymer Sciences**, v. 23, p. 1273-1335, 1998.

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.

CHO, K. Y.; CHOI, S. H.; KIM, C. H.; NAM, Y. S.; PARK, T. G.; PARK, J. K. J. Protein release microparticles based on the blend of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) and oligo-ethylene glycol grafted poly(L-lactide) **Journal of Controlled Release**, v. 76, pg. 275-284, 2001.

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

CONWAY, B. R.; EYLES, J. E.; ALPAR, H. O. A comparative study on the immune responses to antigens in PLA and PHB microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 49, p. 1-9, 1997.

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

COUVREUR, P.; BLANCO-PRIETO, M. J.; PUISIEUX, F.; ROQUES, B.; FATTAL, E. Multiple emulsion technology for the design of microspheres containing peptides and oligopeptides. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, p. 85-96, 1997.

DOI, Y.; KUNIOKA, M.; NAKAMURA, Y.; SOGA, K. Nuclear magnetic resonance studies on unusual copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate. **Macromolecules**, v. 21, 2722-2727, 1988.

DOUDOROFF, M.; STANIER, R. Y. Role of poly-hydroxybutyric acid in the assimilation of carbon by bacteria. **Nature**, v. 183, p. 1440-1442, 1959.

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

EINMAHL, S.; ZIGNANI, M.; VARESIO, E.; HELLER, J.; VEUTHEY, J. L.; Tabatabay, C.; Gurny, R. Concomitant and controlled release of dexamethasone and 5-fluorouracil from poly(ortho ester). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 185, p. 189-198, 1999.

FAISANT, N.; SIEPMAN, J.; BENOIT J. P. PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p. 355-366, 2002.

FLOREY, K. **Analytical profiles of drug substances**. San Diego, Academic, 1973.

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

FOWLES, G. R. **Introduction to modern optics**. 2<sup>a</sup> ed., New York, Dover, 1975.

FRANK, A.; RATH, S. K.; VENKATRAMAN, S. S. Controlled release from bioerdbile polymers: effect of drug type and polymer composition. **Journal of Controlled Release**, v. 102, p. 333-344, 2005.

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

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal of Controlled Release**, v. 102, p. 313-332, 2005.

GARCIA, A.; IRIARTE, M.; URIARTE, C. IRUIN, J. J.; ETXEBERRIA, A.; DEL RIO, J. Antiplasticization of a polyamide. A positron annihilation lifetime spectroscopy study. **Polymer** v. 45, p. 2949-2957, 2004.

GANGRADE, N.; PRICE, J. C. Poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) microspheres containing progesterone: preparation, morphology and release properties. **Journal of Microencapsulation**, v. 8, n. 2, p. 185-202, 1991.

GASSNER, F.; OWEN, A. J. Physical properties of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate)-poly( $\epsilon$ -caprolactone) blends. **Polymer**, v. 35, n. 10, p. 2233-2236, 1994.

GENNARO, A. R. (Ed.) **Remington A Ciência e a Prática na Farmácia**. 20 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004, 2208 p.

GENTA, I.; PERUGINI, P.; PAVANETTO, F. Different molecular weight chitosan microspheres: Influence on drug loading and drug release. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 8, p. 779-784, 1998.

GENTA, I. PERUGINI, P. CONTI, B., PAVANETTO, F. A multiple emulsion method to entrap a lipophilic compound into chitosan microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 152, p. 237-246, 1997.

GIBAUD, S.; BONNEVILLE, A.; ASTIER, A. Preparation of 3,4-diaminopyridine microparticles by solvent-evaporation methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v 242, p. 197-201, 2002.

GINÉS, J. M. Thermal investigation of crystallization of polyethylene glycols in solid dispersions containing oxazepam. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 143. p. 247-253, 1996.

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

GÜRSEL, I.; KORKUSUZ, F.; TÜRESIN, F.; ALAEDDINOGLU, N. G.; HASIRCI, V. In vivo application of biodegradable controlled antibiotic release system for the treatment of implant-related osteomyelitis. **Biomaterials**, v. 22, p. 73-80, 2001.

HATAKEYAMA, T.; QUINN, F. X. **Thermal Analysis and Applications to Polymer Science**. 2<sup>th</sup> ed. Chichester: Wiley, 1999.

HERRMANN, J.; BODMEIER, R. The effect of particle microstructure on the somatostatin release from poly(lactide) microspheres prepared by a slow solvent evaporation method. **Journal of Controlled Release**, v. 36, p.63-71, 1995.

HICKEY, T.; KREUTZER, D.; BURGESS D. J. ; MOUSSY, F. Dexamethasone/PLGA microspheres for continuous delivery of an anti-inflammatory drug for implantable medical devices. **Biomaterials**, v. 23, p. 1649-1656, 2002.

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, n. 12, p. 1145-1149, 1963.

HOLLAND, S. J.; TIGHE, B. J.; GOULD, P. L Polymers for biodegradable medical devices. I. The potential of polyesters as controlled macromolecular release systems. **Journal of Controlled Release**, v. 4, p. 155-180, 1986.

HOLMES, P. A. Applications of PHB – A microbially produced biodegradable thermoplastic. **Physics in Technology**, v. 16, p. 32-36, 1985.

ICH, **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, Validation of analytical procedures: methodology, 1996.

JAIN, R.; RHODES, C.T.; RAILKAR, A. M. ; MALICK, A. W. ; SHAH, N. H. Controlled release of drugs from injectable in situ formed biodegradable PLGA microspheres. Effect of various formulation variables. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 257-262, 2000.

KAWAGUSHI, H. Functional polymer microspheres. **Progress in Polymer Sciences**, v.25, p. 1171-1210, 2000.

KIM, C. **Controlled Release dosage form design**. 1 ed. Lancaster: Technomic, 2000, 301 p.

KING, P. P. Biotechnology, an industrial review. **Journal of Chemical Technology Biotechnology** v. 32, p. 2-8, 1982.

KOMURO, T.; YOMOTA, C.; KIMURA T. In vitro dissolution properties of indomethacin extended release capsules. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 43, n. 2, p. 79-82, 1991.

KOROLKOVAS, A.; DE FRANÇA, F. F. A. C. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001-2002.

KORTESUO, P.; AHOLA, M.; KANGAS, M.; LEINO, T.; LAAKSO, S.; VUORILEHTO, L.; YLI-URPO, A.; KIESVAARA, J.; MARLOVA, M. Alkyl-substituted sílica gel as a carrier in the controlled release of dexmedetomidine. **Journal of Controlled Release**, v. 76, p. 227-238, 2001.

KORSATKO, W. WABNEGG, B., BRAUNEGG, G., LAFFERTY R.M. AND STREMPFL F. Poly-o-(-)3-hydroxy- butyric acid (polyHBA) a biodegradable carrier for long term medication dosage. I. Development of parenteral matrix tablets for long-term administration of pharmaceuticals. **Pharmaceutical Industry**, v. 45, p. 525-527, 1983.

KUMAGAI, Y.; DOI, Y. **Polymer Degradation and Stability**, v. 36, n.3, p. 241, 1992.

LAVELLE, E. C.; YEH, M. K.; COOMBES, A. G. A.; DAVIS, S. S. The stability and immunogenicity of a protein antigen encapsulated in biodegradable microparticles based on blend of lactide polymers and polyethylene glycol. **Vaccine**, v. 17, p. 512-529, 1999.

LIGGINS, R. T.; BURT, H. M. Paclitaxel-loaded poly(L-lactic acid) microspheres 3. Blending low and high molecular weight polymers to control morphology and drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, p. 61-71, 2004.

LIN, W-J., LEE, H-G. Design of a microporous controlled delivery system for theophylline tablets. **Journal of Controlled Release**, v. 89, p. 179-187, 2003.

LIU, R.; MA, G.; WAN, Y.; SU, Z. Influence of process parameters on the size distribution of PLA microcapsules prepared by combining membrane emulsification technique and double emulsion-solvent evaporation method. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 45, p. 144-153, 2005.

LOWELL, S.; SHIELDS, J. S. **Powder Surface Area and Porosity**. 3<sup>th</sup> ed. New York: Chapman & Hall, 1991.

LUAN, X.; BODMEIER, R. In situ forming microparticle system for controlled delivery of leuprolide acetate : influence of the formulation and processing parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 27, p. 143-149, 2006.

LUZIER, W. D. Materials derived from biomass biodegradable materials. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 89, p. 839-42, 1992.

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, 1-12, 2004.

MARTIN, A. (Org.) **Physical Pharmacy Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences**. Philadelphia:Lea & Febiger, 1993. 637 p

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**, v. 17, p. 111-116, 2000.

MARTINDALE, **The Extra Pharmacopoeia**. 31<sup>th</sup> ed. New York, 1996.

MATSUMOTO, M.; SUMI, N.; OHMORI, K.; KONDO, K. Immobilization of lipase in microcapsules prepared by organic and inorganic materials. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 5, p. 535-540, 1998.

MEYER A. Praktikum der botanischen bakterienkunde. Jena, 1903. *apud* Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Sciences**, v. 25, p. 1503-1555, 2000.

MOLLER, H.; WIRBITZKI, E. Regulatory aspects of modified release dosage forms: special cases of dissolution testing using the flow-through system. **Bolletino Chimico Farmaceutico**, v. 132, p. 105-115, 1993.

MORALES, M. E.; LARA, V. G.; CALPENA, A. C.; DOMONÉCH, J.; RUIZ, M. A. Comparative study of morphine diffusion for sustained release polymeric suspensions. **Journal of Controlled Release**, v. 95, p. 75-81, 2004.

MÜLLER, 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.

MÜLLER, C. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DE LUCCA FREITAS, L.; PESCE DA SILVEIRA, N.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Spray-dried diclofenac poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. **Pharmazie**, v. 56, n. 11, p. 864-867, 2001.

MUZZIO, F. J.; SHINBROT, T.; GLASSER, B. J. Powder technology in the pharmaceutical industry: the need to catch up fast. **Powder Technology**, v. 124, p. 1-7, 2002.

O'DONNELL, P. B.; MCGINITY, J. W. Preparation of microspheres by solvent evaporation technique. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, p. 25-42, 1997.

OLABISI, O.; ROBESON, L. M.; SHAW, M. T. **Polymer-polymer Miscibility**. New York: Academic, 1979. 370 p.

PITT, C. G.; CHA, Y.; SHAH, S. S.; ZHU, K. J. Blends of PVA and PLGA: control of the permeability and degradability of hydrogels by blending. **Journal of Controlled Release**, v. 19, p. 189-200, 1992.

POUTON, C. W.; AKHTAR, S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18, p. 133-162, 1996.

POWELL, J. J.; HARVEY, R. S. J.; Ashwood, P.; Wolstencroft, R.; Gershwin, M. E.; Thompson, R. P. H. Immune potentiation of ultrafine dietary particles in normal subjects and patients with inflammatory bowel disease. **Journal of Autoimmunity**, v. 14, p. 99-105, 2000.

RE, M. I.; BISCANS, B. Preparation of microspheres of ketoprofen with acrylic polymers by a quasi-emulsion solvent diffusion method. **Powder Technology**, v. 101, p. 120-133, 1999.

RÉ, M. I.; MAIA, J. L.; DERÓBIO, L. I.; LIONZO, M. I. Z.; BENVENUTTI, E. V.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Preparation and characterization of

poly(hydroxybutyrate-co-valerate)-poly(epsilon-caprolactone) blended microspheres with controlled porosity, Vitoria-Gasteiz. **Livro de Resumos**, 2004. v. único. p. 283-286.

ROSCA, I. D.; WATARI, 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.

ROSSI, B. **Fundamentos de Óptica**. Barcelona: Reverté, 1966.

SANDOR, M; BAILEY, N. A.; MATHIOWITZ, E. Characterization of polyanhydride microsphere degradation by DSC. **Polymer**, v. 43, p. 279-288, 2002.

SANSDRAP, P.; MOES, A. J. Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 98, p. 157-164, 1993.

SANTINHO, A. J. P.; PEREIRA, N. L.; DE FREITAS, O.; COLLETT, J. H. Influence of formulation on the physicochemical properties of casein microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 186, p. 191-198, 1999.

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

SIEPMAN, J.; FAISANT, N.; AKIKI, J.; RICHARD, J.; BENOIT, J. P. Effect of size of biodegradable microparticles on drug release: experiment and theory. **Journal of Controlled Release**, v. 96, p. 123-134, 2004.

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.

SONG, M.; LI, N.; SUN, S.; TIEDT, L. R.; LIEBENBERG, W.; DE VILLIERS, M. M. Effect of viscosity and concentration of wall former, emulsifier and pore-inducer on the properties of amoxicillin microcapsules prepared by emulsion solvent evaporation. **II Pharmaco**, v. 60, p. 261-267, 2005.

STEPEK, J.; DAOUST, H. **Additives for plastics. Polymers properties and applications**. 5 ed., New York, Springer-Verlag, 1983.



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

TRAPANI, G.; LOPEDOTA, A.; BOGHETICH, G.; LATROFA, A.; FRANCO, M. SANNA, E.; LISO, G. Encapsulation and release of the hypnotic agent zolpidem from biodegradable polymer microparticles containing hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 268, p. 47-57, 2003.

UEDA, H.; TABATA, Y. Polyhydroxyalkanoate derivatives in current clinical applications and trials. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 501-518, 2003.

UNGER, K.; RUPPRECHT, H.; VALENTIN, A.; KIRCHER, W. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 9, p. 69-91. 1983.

VERHOOGT, H.; RAMSAY, B. A.; FAVIS, B. D. Polymer blends containing poly(3-hydroxyalkanoate)s. **Polymer**, v. 35, n. 24, p. 5155-5169, 1994.

VOGELSANGER, N.; FORMOLO, M. C.; PEZZIN, A. P. T.; SCHNEIDER, A. L. S.; FURLAN, S. A.; BERNARDO, H. P.; PEZZIN, S. H.; PIRES, A. T. N.; DUEK, E. A. R. Blendas biodegradáveis de poli(3-OH-butilato)/poli( $\epsilon$ -caprolactona). Obtenção e estudos de miscibilidade. **Material Research**, v. 6, n. 3, p. 359-365, 2003.

VOLODKIN, D. V.; PETROV, A. I.; PREVOT, M.; SUKHORUKOV, G. B Matrix polyelectrolyte microcapsules: New system for macromolecular encapsulation **Langmuir**, v. 20, n. 8, p. 3398-3406, 2004.

WANG, C.; HE, C.; TONG, Z.; LIU, X.; REN, B.; ZENG, F. Combination of absorption by porous CaCO<sub>3</sub> microparticles and encapsulation by polyelectrolyte multilayer films for sustained drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 308, p. 160-167, 2006.

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.

WIMBERGER-FRIEDL, R. The assessment of orientation, stress and density distributions in injection-molded amorphous polymers by optical techniques. **Progress in Polymer Sciences**, v 20, p. 369-401, 1995.

YANG, J. F.; QIU, L. Y., JIN, Y.; ZHANG, J. X. Thymosin-loaded enteric microspheres for oral administration: Preparation and in vitro release studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, p. 41-47, 2005.

YASIN, M., HOLLAND, S. J.; TIGHE, B. J. Polymers for biodegradable medical devices. V. Hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers: effects of polymer processing on hydrolytic degradation. **Biomaterials**, v. 11, p. 451-454, 1990.

YEH, M. K.; JENKINS, P. G.; DAVIS, S. S; COOMBES, A. G. A. Improving the delivery capacity of microparticle system using blends of poly(D,L-lactide-co-glycolide) and poly(ethylene glycol). **Journal of Controlled Release**, v. 37, p. 1-9, 1995.

YOSHIZAWA, H; UEMURA, Y.; KAWANO, Y.; HATALE, Y. Regeneration of styrene-divinylbenzene copolymer microcapsules containing tri-n-octyl-amine. **Journal of Chemistry and Engineering of Japan**, v. 26, p. 692-697, 1993.

YUKSEL, N.; TINÇER, T.; BAYKARA, T. Interaction between nicardipine hydrochloride and polymeric microspheres for a controlled release system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 140, p. 145-154, 1996.

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.

ZORN, R.; ALEGRÍA, A.; ARBE, A.; COLMENERO, J.; RICHTER, D.; FRICK, B. Fast-dynamics in plasticized poly(vinyl chloride). **Journal of Non-crystalline Solids**, v. 235-237, p. 169-172, 1998.

**8.ANEXOS**





## **Anexo 1 Validação**

A validação analítica deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade nos resultados (Brasil, 2003).

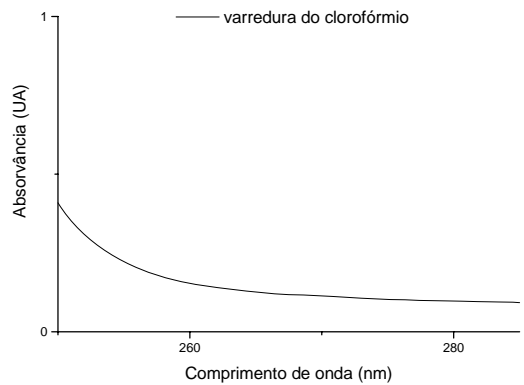
### **Validação da metodologia analítica para determinação da eficiência de encapsulação**

A validação analítica seguiu os parâmetros indicados para a metodologia em questão propostos pelo ICH (1996). Os critérios empregados incluíram a especificidade, a linearidade, a precisão e a exatidão.

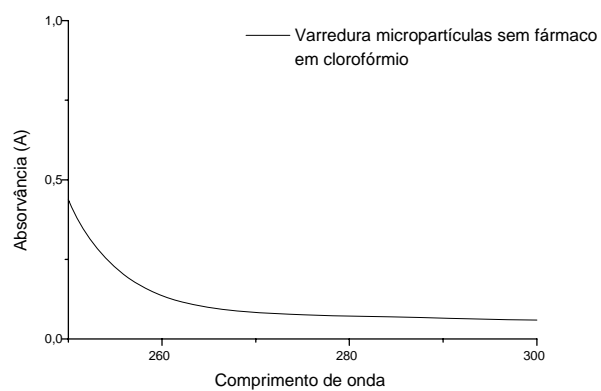
#### **Linearidade**

Os pontos da curva foram obtidos através da preparação de 3 soluções de dexametasona em clorofórmio, na concentração 0,5 mg/mL. A partir de cada uma destas soluções foram retiradas alíquotas e diluídas em clorofórmio, a fim de fornecer soluções nas concentrações referentes aos pontos da curva.

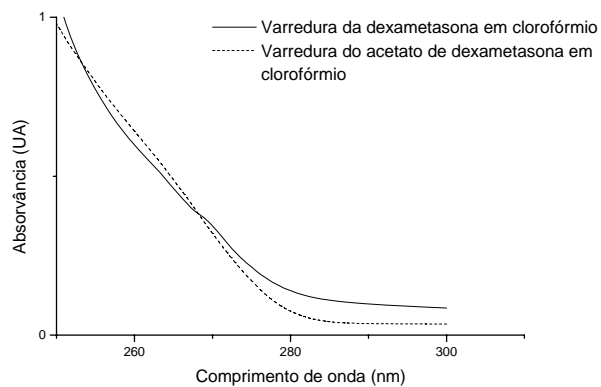
As medidas de absorvância foram efetuadas no comprimento de onda de 260 nm. Na Figura A1 estão representados os espectros de varredura do clorofórmio, de uma solução de micropartículas (FB-2-10) e da sobreposição dos espectros de uma solução contendo 30 µg/mL de dexametasona e de uma solução contendo 33,2 µg/mL de acetato de dexametasona em clorofórmio.



(A)



(B)



(C)

Figura A1 Espectros de varredura do clorofórmio (A), de uma solução de micropartículas sem fármaco em clorofórmio (B) e da dexametasona e acetato de dexametasona sobrepostos em clorofórmio (C).

A linearidade foi avaliada através da análise de regressão dos mínimos quadrados de curvas-padrão, totalizando nove curvas contendo cinco pontos (10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 e 35,0  $\mu\text{g/mL}$ ), cujas médias estão apresentadas na Figura A2. As leituras foram feitas em espectrofotômetro (Instituto de Química – UFRGS).

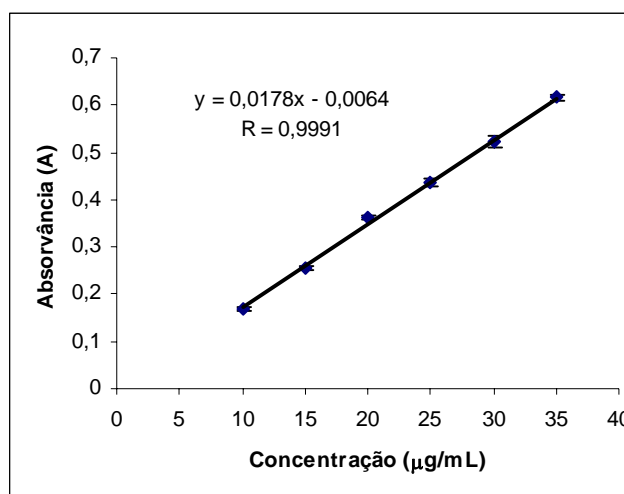


Figura A2. Média das três curvas, coeficiente de correlação médio e equação da reta.

O coeficiente de correlação foi maior do que 0,99, indicando linearidade funcional entre a concentração do analito e a relação  $A_A/A_{PI}$  (Brasil, 2003). Os resultados foram avaliados com base na análise de variância dos parâmetros, que estão apresentados na tabela A1.

Tabela A1. Parâmetros para avaliação da curva de resposta da dexametasona.

Parâmetro	Valor	Limites de Confiança
F (desvio da linearidade)	0,666	
$F_{\text{tab}}$ (desvio da linearidade)	0,656	
R	0,999	
b (intersecção)	- 0,0064	-0,0265 a 0,0137

O valor de F da ANOVA da regressão (0,666) foi maior que F tabelado, para  $\alpha = 0,05$ , indicando a ajuste adequado a um modelo linear. Os limites de confiança da intersecção incluíram o zero, excluindo a possibilidade de erro sistemático constante. Além disso, a análise dos resíduos não mostrou tendência na distribuição dos mesmos.

## 1 Precisão

A precisão foi verificada empregando amostras de micropartículas das formulações DX-2 preparadas empregando razão fase orgânica/fase aquosa de 1:4 (v/v), com teor conhecido de dexametasona. Foram preparadas 3 soluções contendo o equivalente a 25,0 µg/mL de dexametasona. Para tanto foram pesadas massas definidas de micropartículas (em função do teor de fármaco contido na formulação) correspondentes a 25 mg de dexametasona, transferidas para balões de 100 mL e solubilizadas em clorofórmio. As soluções foram deixadas sob agitação por uma hora e lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. As amostras foram lidas contra uma solução, em clorofórmio, contendo apenas micropartículas brancas (FB-2) preparadas empregando razão fase orgânica/fase aquosa de 1:4 (v/v). Foi preparada uma solução-padrão de dexametasona, em clorofórmio, na concentração de 25,0 µg/mL. O procedimento foi realizado em triplicata e em dias diferentes.

A concentração de dexametasona presente nas amostras foi calculada, em função dos valores de absorvância obtidos e da concentração da solução-padrão de dexametasona, empregando a seguinte fórmula:

$$Ca = \frac{Aa \times Cp}{Ap}$$

$Ca$  = concentração da amostra (µg/mL)

$Cp$  = concentração da solução-padrão (µg/mL)

$Aa$  = absorvância da amostra

$Ap$  = absorvância da solução-padrão

A tabela A2 apresenta os valores de concentração obtidos das amostras e os desvios.



Tabela A2. Concentrações teóricas e reais, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) das amostras analisadas.

	Concentração do padrão ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentrações obtidas ( $\mu\text{g/mL}$ )			Concentrações médias obtidas ( $\mu\text{g/mL}$ )	DP ( $\mu\text{g/mL}$ )	DPR (%)
Dia 1	25,0	22,3	22,6	22,0	22,3	0,30	1,2
Dia 2	25,0	25,9	25,7	25,2	25,6	0,36	1,4

Para atender as exigências de precisão, o valor de DPR não deve ser superior a 5 % (Brasil, 2003).

## 2 Exatidão

A exatidão foi verificada empregando amostras de micropartículas das formulações DX-2 preparadas empregando razão fase orgânica/fase aquosa de 1:4 (v/v), com teor conhecido de dexametasona. Foram preparadas 3 soluções-amostra (S1, S2 e S3), contendo o equivalente a 5,0  $\mu\text{g/mL}$  de dexametasona. Para tanto foram pesadas massas definidas de micropartículas (em função do teor de fármaco contido na formulação), transferidas para balões de 100 mL e solubilizadas em clorofórmio.

Foi preparada uma solução referência de dexametasona, em clorofórmio, na concentração de 0,5 mg/mL. Foram adicionados alíquotas crescentes da solução referência de dexametasona nas soluções-amostra, contemplando 3 concentrações (tabela A3). As soluções foram mantidas sob agitação por uma hora e lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. As amostras foram lidas contra uma solução contendo apenas micropartículas brancas (FB-2) preparadas empregando razão fase orgânica/fase aquosa de 1:4 (v/v). O procedimento foi realizado em duplicata e em dias diferentes.

**Tabela A3. Volumes das alíquotas empregadas na preparação e concentrações finais das soluções S1, S2 e S3.**

Solução-amostra	Volumes de solução referêcia adicionados (mL)	Concentração (µg/mL)
S1	1,0	10,0
S2	4,0	25,0
S3	6,0	35,0

O percentual de recuperação de dexametasona presente nas amostras foi calculado empregando-se a seguinte fórmula:

$$R\% = \frac{(CT - AS) \times 100}{SP}$$

*R%* = Percentual de recuperação da dexametasona

*CT* = Concentração teórica (µg/mL)

*AS* = Concentração final da solução amostra (µg/mL)

*SP* = Concentração da solução padrão adicionada (µg/mL)

Os valores obtidos na análise da exatidão estão expressos na tabela A4. Considerando-se os resultados obtidos na validação dos parâmetros selecionados, a metodologia de determinação da eficiência de encapsulação da dexametasona por espectroscopia na região do ultravioleta encontra-se validada para os fins a que se destina.

Tabela A4. Concentrações teóricas e reais, desvio padrão, desvio padrão relativo e recuperação (R%) das amostras analisadas.

Concentrações teóricas ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentrações obtidas ( $\mu\text{g/mL}$ )		Concentrações médias obtidas ( $\mu\text{g/mL}$ )	DP ( $\mu\text{g/mL}$ )	DPR (%)	R %
	Dia 1	Dia 2				
10,0	10,3	10,8	10,5	0,35	3,33	105,0
25,0	25,0	25,5	25,2	0,35	1,39	100,8
35,0	37,0	36,6	36,8	0,28	0,76	105,1

## **Anexo 2 Validação**

### **Validação da metodologia analítica para a determinação dos perfis de liberação**

A validação analítica seguiu os parâmetros indicados para a metodologia em questão propostos pelo ICH (1994). Os critérios empregados incluíram a linearidade, a precisão, a exatidão e o limite de quantificação.

#### **3 Faixa de linearidade (Curva de Ringbom)**

A faixa de linearidade foi estabelecida mediante a análise da média dos valores de transmitância (T) de soluções contendo diferentes concentrações do fármaco. As soluções foram preparadas a partir de uma solução estoque de dexametasona em metanol, da qual foram retiradas alíquotas que foram subseqüentemente diluídas em tampão fosfato pH 7,4. As concentrações das soluções analisadas foram 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 9,0; 12,0; 15,0; 18,0; 21,0; 24,0; 27,0; 30,0; 33,0; 36,0; 39,0; 42,0; 45,0; 48,0; 51,0; 54,0; 57,0; 60,0; 63,0; 66,0; 69,0; 72,0 e 75,0  $\mu\text{g/mL}$ . Os valores de  $100 - T$  versus  $\log C$  estão representados pela curva de Ringbom, na figura A3.

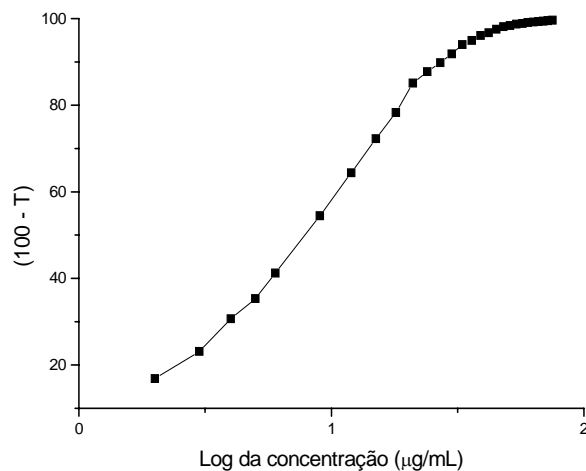


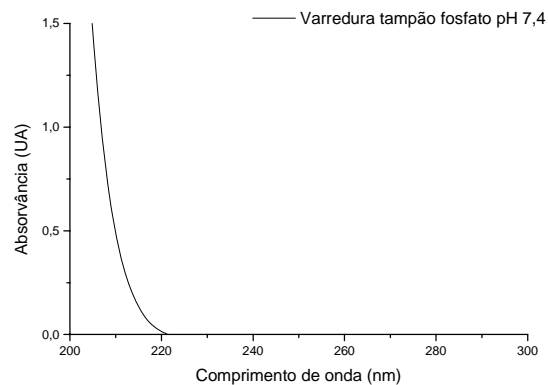
Figura A3. Curva de Ringbom, obtida através dos valores de transmitância e concentração para avaliar a faixa de linearidade.

A faixa de linearidade encontrada foi referente aos valores de concentração entre 3 e 40 µg/mL.

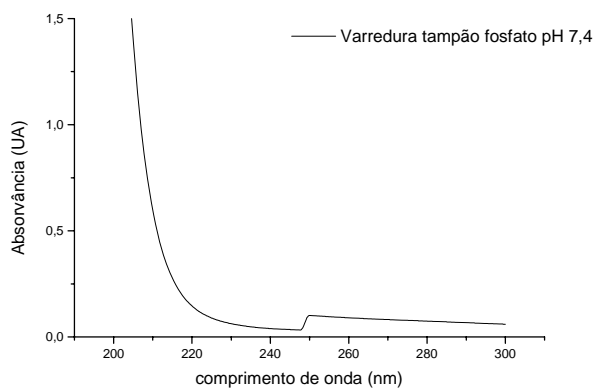
#### 4 Linearidade

Os pontos da curva foram obtidos através da preparação de 3 soluções de dexametasona em metanol, na concentração 0,5 mg/mL. A partir de cada uma destas soluções, foram retiradas alíquotas e diluídas em tampão fosfato pH 7,4, a fim de fornecer soluções nas concentrações referentes aos pontos da curva.

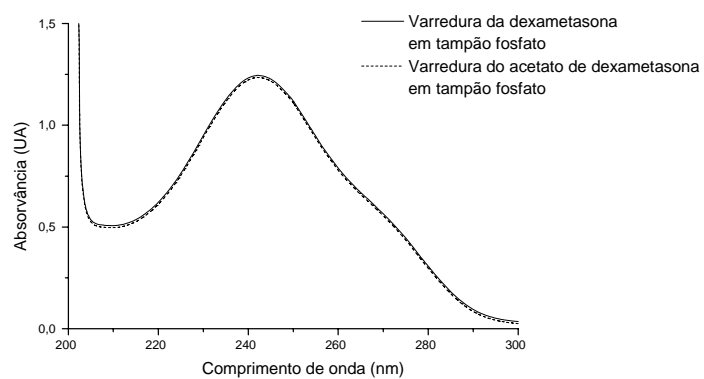
As medidas de absorvância foram efetuadas no comprimento de onda de 242 nm. Na Figura A4 estão representados os espectros de varredura do tampão fosfato pH 7,4, de uma solução de micropartículas brancas (FB-2-10) em tampão fosfato pH 7,4 e a sobreposição dos espectros de uma solução contendo 30 µg/mL de dexametasona e de uma solução contendo 33,2 µg/mL de acetato de dexametasona em tampão fosfato pH 7,4.



(A)



(B)



(C)

Figura A4 Espectros de varredura do tampão fosfato (A), de uma solução de micropartículas sem fármaco em tampão (B) e da dexametasona e acetato de dexametasona sobrepostos em tampão fosfato (C).

A linearidade foi avaliada através da análise de regressão dos mínimos quadrados de curvas-padrão, totalizando nove curvas contendo cinco pontos (5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0  $\mu\text{g/mL}$ ), cujas médias estão apresentadas na figura A5.

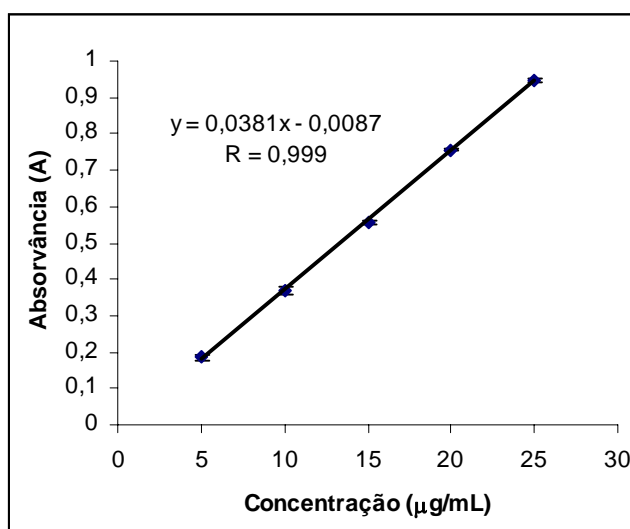


Figura A5. Média das nove curvas, coeficiente de correlação médio e equação da reta.

O coeficiente de correlação foi maior do que 0,99, indicando linearidade funcional entre a concentração do analito e a relação  $A_A/A_{PI}$  (Brasil, 2003). Os resultados foram avaliados com base na análise de variância dos parâmetros, que estão apresentados na tabela A5.

Tabela A5. Parâmetros para avaliação da curva de resposta da indometacina

Parâmetro	Valor	Limites de Confiança
F (desvio da linearidade)	1,27	
$F_{\text{tab}}$ (desvio da linearidade)	0,337	
R	0,999	
b (interseção)	- 0,0087	-0,0180 a 0,0007

Significativo para  $\alpha = 0,05$

O valor de F da ANOVA da regressão (1,27) foi maior que F tabelado, para  $\alpha$  de 0,05, indicando a ajuste adequado a um modelo linear. Os limites de confiança da intersecção incluíram o zero, excluindo a possibilidade de erro sistemático constante ( $p > 0,05$ ). Além disso, a análise dos resíduos não mostrou tendência na distribuição dos mesmos.

## 5 Precisão

A precisão foi verificada empregando amostras de micropartículas das formulações DX-2, com teor conhecido de dexametasona. Foram preparadas 3 soluções contendo o equivalente a 15  $\mu\text{g/mL}$  de dexametasona. Para tanto foram pesados cerca de 25 mg de micropartículas, transferidas para balão de 100 mL e solubilizadas em uma mistura metanol:tampão 7,4 (20:80 v/v). As soluções foram deixadas sob agitação por uma hora e lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 242 nm. Foi preparada uma solução-padrão de dexametasona, em metanol:tampão pH 7,4 (20:80 v/v), na concentração de 15,0  $\mu\text{g/mL}$ . O procedimento foi realizado em triplicata e em dias diferentes.

A concentração de dexametasona presente nas amostras foi calculada, em função dos valores de absorvância obtidos e da concentração da solução-padrão de dexametasona, empregando a seguinte fórmula:

$$Ca = \frac{Aa \times Cp}{Ap}$$

$Ca$  = concentração da amostra ( $\mu\text{g/mL}$ )

$Cp$  = concentração da solução-padrão ( $\mu\text{g/mL}$ )

$Aa$  = absorvância da amostra

$Ap$  = absorvância da solução-padrão



**A tabela A6 apresenta os valores de concentração obtidos das amostras e os desvios.**

Tabela A6. Concentrações teóricas e reais, desvio padrão e desvio padrão relativo das amostras analisadas.

	Concentração do padrão ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentrações obtidas ( $\mu\text{g/mL}$ )			Concentrações médias obtidas ( $\mu\text{g/mL}$ )	DP ( $\mu\text{g/mL}$ )	DPR (%)
Dia 1	15,0	13,8	13,6	14,2	13,9	0,30	2,2
Dia 2	15,0	12,8	13,6	13,0	13,1	0,42	3,2

Para atender as exigências de precisão, o valor de DPR não deve ser superior a 5 % (Brasil, 2003).

## 6 Exatidão

A exatidão foi verificada empregando amostras de micropartículas da formulação DX-2, com teor conhecido de dexametasona. Foram preparadas 3 soluções-amostra (S1, S2 e S3), contendo o equivalente a 2,5  $\mu\text{g/mL}$  de dexametasona. Para tanto foram pesadas massas definidas de micropartículas e solubilizadas em uma mistura metanol:tampão 7,4 (20:80 v/v).

Foi preparada uma solução referência de dexametasona, em uma mistura metanol:tampão 7,4 (20:80 v/v), na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$ . Foram adicionados alíquotas crescentes desta solução referência de dexametasona nas soluções-amostra, contemplando 3 concentrações (tabela A7). As soluções foram mantidas sob agitação por uma hora e lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 242 nm. As amostras foram lidas contra uma solução contendo apenas micropartículas brancas (FB-2). O procedimento foi realizado em duplicata e em dias diferentes. Este parâmetro

foi avaliado em 3 dias diferentes a fim de obter resultados de recuperação mais representativos.

**Tabela A7. Volumes das alíquotas empregadas na preparação e concentrações finais das soluções S1, S2 e S3.**

Solução-amostra	Volumes de solução referência adicionados (mL)	Concentração (µg/mL)
S1	1,0	5,0
S2	5,0	15,0
S3	9,0	25,0

O percentual de recuperação de dexametasona presente nas amostras foi calculado empregando-se a seguinte fórmula:

$$R\% = \frac{(CT - AS) \times 100}{SP}$$

*R%* = Percentual de recuperação da dexametasona

*CT* = Concentração teórica (µg/mL)

*AS* = Concentração final da solução amostra (µg/mL)

*SP* = Concentração da solução padrão adicionada (µg/mL)

Os valores obtidos na análise da exatidão estão expressos na tabela A8.

**Tabela A8. Concentrações teóricas e reais, desvio padrão, desvio padrão relativo e recuperação das amostras analisadas.**

Concentrações teóricas (µg/mL)	Concentrações obtidas (µg/mL)			Concentrações médias obtidas (µg/mL)	DP (µg/mL)	DPR (%)	R %
	Dia 1	Dia 2	Dia 3				
5,0	4,7	4,4	4,5	4,5	0,15	3,3	90,0
15,0	13,9	12,9	14,2	13,7	0,68	4,9	91,3
25,0	22,0	20,9	24,3	22,4	1,7	7,59	89,6

## 7 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi avaliado, pois a metodologia de determinação dos perfis de liberação apresenta, algumas vezes, valores de concentração do fármaco bastante baixos, especialmente nos últimos pontos de coleta.

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito, em uma amostra, que pode ser determinada, com precisão e exatidão aceitas sob condições experimentais estabelecidas. Pode ser expresso pela equação:

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

*DP* = desvio padrão do intercepto com o eixo Y da curva padrão

*IC* = Inclinação da curva padrão

O limite de quantificação teórico obtido empregando-se a equação acima e os valores das curvas de calibração da linearidade foi de 1,6 µg/mL, correspondendo a uma absorvância de 0,054 A. A partir deste valor, foram construídas curvas padrão contendo valores próximos ao LQ, a fim de determinar experimentalmente tal limite.

Intercepto, inclinação e coeficiente de correlação foram determinados e estão apresentados na figura A6.

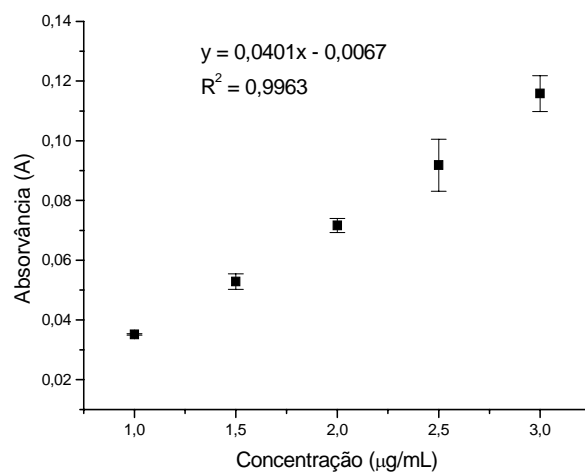


Figura A6. Curva padrão contendo concentrações próximas ao suposto LQ.

Para avaliar a linearidade também se pode considerar DRP dos pontos (tabela A9), admitindo-se até 5 % para os pontos da curva padrão (Brasil, 2003).

Tabela A9. Coeficientes de variação intradia e interdias de cada ponto da curva padrão.

Pontos (µg/mL)	DRP % (intradia)	
	Curva 1	Curva 2
1,0	2,9	4,3
1,5	2,1	3,4
2,0	0,8	4,3
2,5	3,9	3,4
3,0	3,8	3,8

O LQ foi de até 1,0 µg/mL, correspondente a uma absorvância próxima de 0,035 A. Considerando-se os resultados obtidos na validação dos parâmetros selecionados, a metodologia de determinação dos perfis de liberação da dexametasona por espectroscopia na região do ultravioleta, encontra-se validada para os fins a que se destina.