



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**DESENVOLVIMENTO DE MICROESFERAS DE DICLOFENACO DE SÓDIO DE
LIBERAÇÃO PROLONGADA – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DE
BLENDAS DE ACETOBUTIRATO DE CELULOSE E POLOXAMERS NA
MODULAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO**

Daniela Cristina de Medeiros

Florianópolis, 2009

Daniela Cristina de Medeiros

**DESENVOLVIMENTO DE MICROESFERAS DE DICLOFENACO DE SÓDIO DE
LIBERAÇÃO PROLONGADA – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO
DE BLENDS DE ACETOBUTIRATO DE CELULOSE E POLOXAMERS NA
MODULAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (área de concentração: Fármaco-Medicamentos) da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Elenara Lemos-Senna

Co-orientador: Prof. Dr. Anicleto Poli

Florianópolis, 2009

**“DESENVOLVIMENTO DE MICROESFERAS DE
DICLOFENACO DE SÓDIO DE LIBERAÇÃO
PROLONGADA – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE
UTILIZAÇÃO DE BLENDS DE ACETOBUTIRATO DE
CELULOSE E POLAXAMERS NA MODULAÇÃO DO
PERFIL DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO”**

POR

DANIELA CRISTINA DE MEDEIROS

Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo Orientador e
membros da Banca Examinadora,
composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:


Teresa Dalla Costa (UFRGS- Membro Titular)


Mauro Laranjeira (Depto Química UFSC- Membro Titular)


Ângela Machado de Campos (CIF/CCS/UFSC – Membro Titular)


Elenara Maria Teixeira Lemos Senna (CIF/CCS/UFSC-Orientadora)

Prof.ª Dra. Tânia Silvia Fröde
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 30 de maio de 2003.

Para
Minha Mãe

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Elenara Lemos-Senna, pela paciência e dedicação nestes quase cinco anos de trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Anicleto Poli (Dep. Farmacologia, CCB – UFSC), que abriu mão de suas férias para me acompanhar no laboratório, e conseguiu manter o bom humor naqueles ensaios intermináveis com os cães.

Aos colaboradores deste trabalho:

Prof. Dr. Valdir Soldi (Dep. Química – UFSC)

Profa. Dra. Valquíria Link Bassani (Dep. Farmácia – UFRGS)

Doutoranda Letícia Koester (Dep. Farmácia – UFRGS)

Profa. Dra. Adriana R. Pohlmann (Instituto de Química – UFRGS)

Prof. Dr. Edílson V. Benvenuto (Instituto de Química – UFRGS)

Doutorando Tiago Brandão (Dep. Química – UFSC)

Mestrando Teófilo (Pós Graduação em Farmácia – UFSC)

Ao Biotério Central, pelas facilidades criadas para os ensaios em cães.

A CAPES, pela bolsa concedida.

Aos membros do colegiado do PGFAR, pelo aprendizado.

A minha orientadora de estágio de docência, Profa. Dra. Ângela Campos.

Ao Prof. Dr. Marcos Segatto, pela assistência e amizade nestes anos de convivência.

Aos colegas de lab: Betina, Cris, Bea e Taty.

A Taty e a Cris, que me ajudaram nos ensaios com os cães.

As técnicas Sandra e Solange.

Aos amigos:

Teca, por ser a Teca, e por ter me ensinado tanta coisa nestes seis anos de convivência.

Tiago, meu anjo da guarda.

Virgínia, por compartilhar de minhas angústias, pessoais e profissionais.

Evandro por ter me ensinado a ver mais além.

Giovana e Bianca.

Gabi, Lucinha e Carlinha.

Vila e Lena, por tudo que fizeram por mim.

Vitor, por me receber em sua casa nas minhas várias idas a Porto Alegre.

Melissa por estar sempre do meu lado (estando perto ou longe), e meu afilhado Gabriel, por me fazer sorrir nos momentos mais inusitados.

Ao pessoal da salinha de estudos (em especial Aline, Téo, Marcelo e Alexandre) pelos momentos de descontração.

Aos companheiros da APG (Gilmar, Giuliano, Guihel, Evandro, Ricardo e Douglas), este último por ter sempre uma posição crítica em relação as minhas atitudes e opiniões.

Ao GESC (Flávia, Giovana, Fernanda, Bianca, Mariliz, Boing, Douglas, Gabriel, Pedro) por me ajudar a preencher uma lacuna da minha formação profissional.

A minha família, em especial:

Meus irmãos, Diego e Daniel, pelos ótimos momentos de diversão.

Meu pai

Minha mãe, e grande amiga, a quem eu dedico este trabalho.

A Ciência, a ciência, a ciência...

Ah, como tudo é nulo e vão!

A pobreza da inteligência

Ante a riqueza da emoção!

Fernando Pessoa

RESUMO

O diclofenaco de sódio (DFS) é um antiinflamatório não-esteroidal (AINE), empregado para aliviar a dor e o desconforto generalizado das condições inflamatórias como artrite reumatóide, a osteoartrite e a espondilite alquilosante. Este fármaco é rapidamente e quase completamente absorvido no trato gastrointestinal, apresentando um tempo de meia-vida biológica relativamente curto ($t_{1/2} = 2$ horas). A necessidade de administração de várias doses diárias do DFS leva a flutuações na concentração plasmática, causando reações adversas como dor de cabeça, tontura, efeitos sobre o sistema nervoso central, disfunção renal, reações hepáticas graves e erupção cutânea, entre outros (McEvoy, 1990). Devido as suas características biofarmacêuticas, este fármaco apresenta potencial para utilização em formas farmacêuticas de liberação prolongada e, portanto, foi testado para encapsulação nas microesferas. Recentemente, a associação de polímeros em sistemas matriciais tem-se mostrado como uma importante estratégia farmacotécnica na busca da modulação do perfil de liberação de fármacos, pois conduz a alterações na permeabilidade e conduta de degradação do sistema, fornecendo assim um meio para controlar a velocidade com que o fármaco é liberado a partir da matriz. Desta maneira, o potencial de utilização de blendas de acetobutirato de celulose e Pluronic F68 na modulação do perfil de liberação do diclofenaco de sódio foi avaliado. As microesferas foram preparadas pela técnica de emulsificação e evaporação de um solvente volátil, empregando-se a acetona e a vaselina líquida como fases interna e externa da emulsão, respectivamente. Um delineamento fatorial do tipo 2x2 foi utilizado para avaliar a influência dos fatores de formulação, relação fármaco/polímero (1:8 e 1:4) e adição de Pluronic F68 na fase interna da emulsão (presença e ausência), sobre o teor de fármaco e a velocidade de liberação do fármaco a partir das microesferas. A concentração total de polímero na fase interna da emulsão foi mantida em 5% (p/V), e nas formulações em que o Pluronic F68 foi adicionado, a relação ABC/Pluronic F68 preliminarmente selecionada foi 3:1. Partículas esféricas foram obtidas conforme demonstrado nas micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A presença de cristais, possivelmente de DFS, foi observada na superfície das microesferas, quando a relação fármaco:polímero de 1:4 foi empregada sem a adição de Pluronic F68 na formulação. Entretanto, naquelas microesferas preparadas com adição de Pluronic F68, a superfície das partículas mostrou-se mais rugosa e porosa não tendo sido observado a presença de cristais de fármaco. Na visualização das micrografias das micropartículas seccionadas transversalmente não foi observada a presença de cristais de DFS no interior mesmas. Na micrografia do corte transversal do filme preparado com uma mistura de ABC e Pluronic F68 na proporção de 3:1 foi observada uma estrutura de bicamada que parece estar reproduzida nas partículas, sugerindo a formação de uma estrutura mista de microcápsula e microesfera. O diâmetro médio das partículas, obtido após medição do diâmetro de Ferret das microesferas visualizadas nas micrografias obtidas por MEV, variou entre 467,7 e 1016,5 μm . A eficiência de encapsulação e o teor de DFS nas microesferas, obtidos após análise por espectroscopia de absorção no UV a 284nm, variaram entre 40-70% e 4,5-13,0 mg/100mg, respectivamente. A análise de variância demonstrou que ambos parâmetros avaliados exerceram influência significativa no teor de fármaco encapsulado. A composição das microesferas foi avaliada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). Pela análise por FTIR não foi possível a determinação da quantidade de Pluronic F68 nas partículas, mas a análise por DSC indicou a presença deste polímero nas mesmas. O estudo de dissolução, realizado conforme descrito na USP XXIII, demonstrou uma velocidade de liberação significativamente maior do diclofenaco de sódio a partir das microesferas preparadas com adição de Pluronic F68. O fator relação fármaco:polímero também influenciou significativamente a liberação do fármaco. A liberação do fármaco ocorreu por um fenômeno de difusão, independente da presença ou ausência de Pluronic F68. O aumento na velocidade de liberação do diclofenaco de sódio pareceu estar relacionado à eluição do Pluronic F68 durante ensaio de dissolução e à estrutura matricial em bicamada das microesferas. Entretanto, a influência do aumento do conteúdo de água nas microesferas proporcionada pela presença do Pluronic F68, sobre a velocidade de liberação não foi descartada. O perfil farmacocinético das microesferas preparadas com adição de Pluronic F68 e relação fármaco polímero 1:4 foi comparado com o perfil do Voltaren SR75 (referência), utilizando cães da raça Beagle como modelo experimental. A formulação na forma de microesferas apresentou biodisponibilidade de cerca de 65% da formulação referência.

Palavras-Chave: diclofenaco de sódio, microesferas, blendas poliméricas, liberação prolongada, biodisponibilidade.

ABSTRACT

Diclofenac sodium (DFS) is a non steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), employed to relieve the pain and the generalized discomfort caused by inflammatory conditions like rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. This drug is fast and almost completely absorbed in the gastrointestinal tract, presenting a short biological half-life ($t_{1/2} = 2$ hours). The necessity of several daily dose administrations of DFS leads to fluctuations in the drug plasma concentration, causing adverse effects like headache, dizziness, central nervous system effects, renal dysfunction, liver reactions and rash, among others (McEvoy, 1990). Due to its biopharmaceutical properties, this drug can be considered a good candidate to be used in prolonged release dosage forms. Therefore, the encapsulation of this drug in microspheres was performed. Recently, the association of polymers in matricial systems have been demonstrated to be an interesting strategy to modulate the drug release profile. The introduction of a second polymer in the matrix leads to changes in the permeability and degradation pattern of the system, providing a way to control the rate of the drug release. For this reason, the potential use of cellulose acetate butyrate (CAB) and Pluronic F68 blends in the modulation of the diclofenac sodium release from microspheres was evaluated. The microspheres were prepared by the emulsification/evaporation method, using acetone and mineral oil as internal and external phases, respectively. A 2x2 factorial design was used to evaluate the influence of the independent variables on the microspheres drug content and the release rate. The independent variables selected were the drug to polymer ratio (1:8 e 1:4) and the addition of Pluronic F68 in the internal phase of emulsion (presence or absence). The whole polymer concentration in the internal phase of emulsion was 5% (w/v) for all formulations. When Pluronic F68 was added, the CAB to Pluronic F68 ratio was previously selected to be 3:1. The micrographs obtained from scanning electron microscopy demonstrated the presence of spherical particles. The presence of crystals, probably of DFS, was observed in the surface of microspheres, when the relation drug to polymer ratio as 1:4 and the microspheres were prepared in the absence of Pluronic F68. However, when the microspheres were prepared using CAB and Pluronic F68 blends, the surface of particles were rougher and more porous. In this case, the presence of crystals of drug were not observed. The examination of transversal sectioned micrographs demonstrated the absence of DFS crystal inside of the particles. Furthermore, similar to the film prepared with the mixture of CAB e Pluronic F68 (3:1), the presence of two polymer layers was observed in the sectioned particles, suggesting the formation of a mixed structure of microcapsules and microspheres. The mean diameter were obtained by measuring the Ferret's diameter of the particles visualised by MEV and varied from 467,7 to 1016,5 μm . The encapsulation efficiency and DFS content in the microspheres were estimated after determination of the drug by ultra-violet absorption spectrometry at 284 nm and was found to varied from 40 to 70% and from 4,5 to 13,0 mg/100mg, respectively. The analysis of variance demonstrated that both independent variables affected significantly the DFS content in the microspheres. The composition of particles was evaluated by Fourier transform infrared (FTIR) spectrometer and differential scanning calorimetry (DSC). It was not possible to determine the amount of Pluronic F68 in the particles by FTIR. On the other hand, the thermograms obtained by DSC indicated the presence of this polymer in the matrix. The results obtained from dissolution assays demonstrated the faster release of diclofenac sodium from the microspheres prepared in the presence of Pluronic F68. The drug to polymer ratio also affected significantly the rate of drug release. The faster drug release was related to the Pluronic F68 elution during the dissolution assay and also to the internal structure of the particles that allowed a better diffusion of the DFS. However, the increasing of the water content in the microspheres provided by the presence of Pluronic F68 probably also affected the drug release. The pharmacokinetic profile of the microspheres prepared with the presence of Pluronic F68 and a 1:4 drug to polymer ratio was compared with that obtained from Voltaren SR75 using beagle dogs as in vivo model. The microspheres showed a bioavailability corresponding to 65% to the reference formulation.

Kay words: diclofenac sodium, microspheres, blends, prolonged release, bioavailability.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	17
1.1 INTRODUÇÃO	17
1.2 OBJETIVOS.....	21
1.2.1. Objetivo Geral.....	21
1.2.2. Objetivos Específicos	21
2. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	22
2.1 DICLOFENACO DE SÓDIO.....	22
2.2 PLURONIC F68	28
2.3 ACETOBUTIRATO DE CELULOSE.....	30
2.4 MICROENCAPSULAÇÃO	32
2.4.1. Microencapsulação do Diclofenaco de Sódio	35
2.4.2. Blendas Poliméricas	39
3. MATERIAIS.....	44
3.1. MATÉRIAS-PRIMAS.....	44
3.2. REAGENTES E SOLVENTES	44
3.3. EQUIPAMENTOS	44
4. METODOLOGIA	46
4.1. ESTUDOS PRELIMINARES DAS CONDIÇÕES DE PREPARAÇÃO DAS MICROESFERAS	46
4.1.1. Preparação das Microesferas com Diferentes Proporções de Acetobutirato de Celulose e Pluronic F68.....	46
4.1.2. Determinação da Eficiência de Encapsulação e do Teor de Diclofenaco de Sódio nas Microesferas.....	46
4.1.3. Avaliação dos Perfis de Liberação do Diclofenaco de Sódio a partir das Microesferas	47
4.2. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS DE FORMULAÇÃO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS MICROESFERAS E	

SOBRE A VELOCIDADE DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO DICLOFENACO DE SÓDIO.....	47
4.2.1. Preparação das Microesferas.....	47
4.2.2. Delineamento Estatístico.....	47
4.2.3. Caracterização Química e Físico-Química das Microesferas	49
4.2.3.1. Avaliação da morfologia das partículas	49
4.2.3.2. Determinação do diâmetro médio e da distribuição granulométrica.....	49
4.2.3.3. Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de diclofenaco de sódio nas microesferas	49
4.2.3.3.1. Preparação de curva de calibração	49
4.2.3.3.2. Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de DFS nas microesferas.....	50
4.2.3.4. Análise das microesferas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	50
4.2.3.5. Análise das microesferas por calorimetria exploratória diferencial.....	50
4.2.4. Avaliação dos Perfis de Liberação <i>in vitro</i> do Diclofenaco de Sódio.....	51
4.3. AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DO DICLOFENACO DE SÓDIO.....	51
4.3.1. Condições Cromatográficas.....	52
4.3.2. Preparação dos Padrões	53
4.3.3. Extração das Amostras.....	53
4.3.4. Curva de Calibração.....	53
4.3.5. Análise Farmacocinética e Estatística.....	54
4.3.6. Validação do Método.....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1. ESTUDOS PRELIMINARES DAS CONDIÇÕES DE PREPARAÇÃO DAS MICROESFERAS	56
5.2. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS DE FORMULAÇÃO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS MICROESFERAS E SOBRE A VELOCIDADE DE LIBERAÇÃO DO DICLOFENACO DE SÓDIO	61
5.2.1. Preparação das Microesferas.....	61
5.2.2. Caracterização Química e Físico-Química das Microesferas	62

5.2.2.1. Avaliação da morfologia	62
5.2.2.2. Determinação do diâmetro médio e da distribuição granulométrica.....	68
5.2.2.3. Determinação da eficiência de encapsulação (%) e do teor de diclofenaco de sódio (mg/100mg) nas microesferas	71
5.2.2.4. Análise das microesferas por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	75
5.2.2.5. Análise das microesferas por calorimetria exploratória diferencial (DSC)	79
5.2.3. Avaliação dos Perfis de Liberação in Vitro do Diclofenaco de Sódio a partir das Microesferas	82
5.3. AVALIAÇÃO DO PERFIL FRAMACOCINÉTICO DO DICLOFENACO DE SÓDIO.....	90
5.3.1. Determinação Cromatográfica de DFS em Plasma de Cão. Padronização e Validação do Método	94
5.3.2. Aplicação do Método na Avaliação da Biodisponibilidade do DFS em cães	101
6. CONCLUSÕES	107
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
ANEXO 1.....	119
ANEXO 2.....	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do diclofenaco de sódio.....	22
Figura 2	Representação esquemática dos copolímeros em bloco da série dos poloxameros (Pluronic). OE = óxido de etileno e OP= óxido de propileno.....	29
Figura 3	Estrutura química do acetobutirato de celulose.....	31
Figura 4	Perfis de liberação do DFS a partir das microesferas preparadas com proporções de ABC:Pluronic F68 3:1; 9:1; 1:0	60
Figura 5	Micrografias obtidas por MEV das microesferas de acetobutirato de celulose preparadas sem adição de Pluronic F68: (a) relação fármaco:polímero 1:8 e (b) relação fármaco:polímero 1:4.....	64
Figura 6	Micrografias obtidos por MEV dos microesferas de acetobutirato de celulose preparadas com adição Pluronic F68: (a) relação fármaco:polímero 1:8 e (b) relação fármaco:polímero 1:4.....	65
Figura 7	Micrografias obtidas por MEV das microesferas seccionadas, preparadas (a) com adição de Pluronic F68 e relação fármaco:polímero 1:4 e (b) sem adição de Pluronic F68 e com relação fármaco:polímero 1:8.....	66
Figura 8	Micrografias obtidas por MEV de filmes preparados com: (I) ABC puro e (II) mistura de ABC e Pluronic F68 na proporção 3:1; (a) superfície do filme e (b) corte transversal	67
Figura 9	Distribuição granulométrica das microesferas (a) relação fármaco:polímero 1:8 e (b) relação fármaco:polímero 1:4; ■ sem adição de Pluronic F68 e □ com adição de Pluronic F68.....	70
Figura 10	Espectro de varredura de uma solução de ABC:Pluronic F68 (3:1) em diclorometano:metanol (1:1).....	71
Figura 11	Curva de calibração do DFS em diclorometano:metanol (1:2,5).....	72
Figura 12	Relação entre a quantidade de ABC e Pluronic F68 versus a relação entre as intensidades das bandas CH e C=O nas misturas físicas de ABC e Pluronic F68	76
Figura 13	Espectros de infra-vermelho com transformada de Fourier de : (A) microesferas brancas de ABC; (B) microesferas de ABC com adição de Pluronic F68; (C) ABC puro; (E) Pluronic F68 puro	77

Figura 14	Termogramas de DSC obtidos para as amostras: (A) Pluronic F68 puro; (B) micrografias de ABC com adição de Pluronic F68; (C) microesferas brancas de ABC; (D) ABC puro	79
Figura 15	Termogramas de DSC obtidos para as amostras: (A) microesferas de ABC contendo DFS na proporção 1:4; (B) microesferas de ABC contendo DFS na proporção 1:8; (D) microesferas de ABC com adição de Pluronic F68 contendo DFS na proporção 1:4; (E) microesferas após o ensaio de dissolução	81
Figura 16	Perfis de dissolução do diclofenaco de sódio a partir das microesferas preparadas com (a) relação fármaco:polímero 1:4 e (b) relação fármaco:polímero 1:8; (■) sem adição de Pluronic F68 e (●) com adição de Pluronic F68	84
Figura 17	Micrografias obtidas por MEV das microesferas após ensaio de dissolução (a) microesferas preparadas sem adição de Pluronic F68 (b) microesferas preparadas com adição de Pluronic F68.....	86
Figura 18	Perfis de dissolução do diclofenaco de sódio a partir de : (●) microesferas preparadas com relação fármaco:polímero 1:4 e adição de Pluronic F68 (▲) Voltaren SR75	90
Figura 19	Exemplos de cromatogramas obtidos por HPLC. (a) amostra de plasma branco; (b) plasma branco contaminado com DFS na concentração de 2,0 µg/mL; (c) plasma obtido de cão 30 min após administração oral de 75mg de DFS na forma de microesferas.....	96
Figura 20	Curva de calibração média do DFS obtida em plasma de cão na análise por HPLC. Cada ponto representa a média ± D.P.....	97
Figura 21	Curvas das concentrações plasmáticas de DFS em função do tempo (média ± EP), obtidas em cães da raça Beagle após a administração oral de 75mg de DFS na forma de microesferas ou VoltarenSR75. Análise por HPLC.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Propriedades físico-químicas do diclofenaco de sódio.....	23
Tabela 2	Especialidades farmacêuticas do diclofenaco de sódio.....	27
Tabela 3	Denotação numérica dos tensoativos poliméricos da série dos poloxameros.....	29
Tabela 4	Plano experimental (Delineamento fatorial 2x2	48
Tabela 5	Formulações das microesferas de ABC ou ABC e Pluronic F68 contendo diclofenaco de sódio empregadas no delineamento estatístico	48
Tabela 6	Valores de eficiência de encapsulação (%) e teor de DFS (mg/100mg) obtidos no estudo preliminar	59
Tabela 7	Valores obtidos na determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica das partículas	69
Tabela 8	Valores de eficiência de encapsulação (%) e teor de diclofenaco de sódio (mg/100mg) nas microesferas	73
Tabela 9	Análise de variância realizada no estudo da influência dos fatores de formulação sobre o teor de fármaco.....	74
Tabela 10	Valores das intensidades das bandas de CH ₂ e C=O e da relação entre estas intensidades, obtidas nos espectros de FTIR.	78
Tabela 11	Valores de área sob a curva (AUC) das formulações, estimados pelo método trapezoidal.....	85
Tabela 12	Análise de variância realizada no estudo da influência dos fatores de formulação sobre a AUC	85
Tabela 13	Dados de regressão obtidos após aplicação dos modelos de Higushi, Banker-Lonsdale e Katzhendler nos perfis de liberação do DFS a partir das microesferas	88
Tabela 14	Cálculo do coeficiente de variação do inter-ensaio para o diclofenaco de sódio (DFS) e indometacina (IND) obtido em plasma de cão na análise por HPLC.....	99
Tabela 15	Cálculo do coeficiente de variação do intra-ensaio e da porcentagem de recuperação para o diclofenaco de sódio (DFS) e indometacina (IND) obtido em plasma de cão na análise por HPLC	100

Tabela 16 Parâmetros farmacocinéticos obtidos em estudos de biodisponibilidade realizado com 6 cães da raça Beagle após a administração oral de 75mg de diclofenaco de sódio em cápsulas contendo microesferas (formulação teste) ou comprimidos de Voltaren SR75 (formulação referência 104

Tabela 17 Análise estatística das razões individuais da AUC (0-48);,AUC (0-00), C_{máx}, K_e e t_{1/2} e das diferenças individuais de t_{máx} entre as duas formulações de diclofenaco de sódio (microesferas e Voltaren SR75), em estudos de biodisponibilidade/ bioequivalência..... 105

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABC - Acetobutirato de celulose

AINEs - Antiinflamatórios não-esteroidais

AVE – acetato vinil etileno

DFS – Diclofenaco de sódio

PLURONIC F68 – Pluronic F68®

COX-1 – Cicloxigenase-1

COX-2 – Cicloxigenase-2

PGs – Prostaglandinas

OE – Óxido de etileno

OP – Óxido de propileno

FTIR – Fourier transform infrared spectroscopy (espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier)

DSC – Diferencial scanning calorimetry (calorimetria exploratória diferencial)

UV – Ultravioleta

DEF – Dicionário de Especialidades Farmacêuticas

EHL – Equilíbrio hidrófilo-lipófilo

O/A – óleo/água

A/O – água/óleo

A/O/A – água/óleo/água

PLAGA – Poli ácido láctico-co-glicólico

PLA – ácido polilático

PVA – Álcool polivinílico

PEG – Polietilenoglicol

RPM – Rotações por minuto

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

HPLC – High performance liquid chromatographic (cromatografia líquida de alta eficiência)

IND – Indometacina

PI – Padrão interno

AUC - Área sob a curva da concentração plasmática em função do tempo

CV – Coeficiente de variação

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

O tratamento medicamentoso das diferentes patologias envolve a periódica administração do agente terapêutico em uma forma de apresentação obtida por meio de técnicas apropriadas e com o emprego de substâncias auxiliares ou adjuvantes, de maneira a garantir a estabilidade, biodisponibilidade e eficácia terapêutica do produto final. A resposta biológica, após a administração do medicamento, é conseqüência de uma interação entre o fármaco e os receptores celulares ou sistemas enzimáticos. A magnitude com que ocorre esta resposta está relacionada com a concentração do fármaco que alcança o sítio de ação que depende, por sua vez, da extensão com que ocorre a sua absorção, distribuição e eliminação no organismo (ANSEL *et al.*, 1995). Para uma ampla variedade de substâncias ativas, a formulação em formas farmacêuticas convencionais tem levado à obtenção do efeito terapêutico desejado. Entretanto, muitos outros fármacos apresentam particularidades que comprometem a eficácia do tratamento tais como toxicidade elevada, estreita faixa terapêutica, rápida metabolização ou ainda são empregados em esquemas terapêuticos de longa duração. Em todos estes casos, a elaboração de especialidades farmacêuticas que permitam a liberação contínua de substâncias ativas torna-se desejável. A utilização de formas farmacêuticas de ação prolongada apresenta a vantagem de redução do número de doses diárias do medicamento, levando à redução das flutuações das concentrações séricas dos fármacos e à manutenção da concentração plasmática em níveis terapêuticos, além de favorecer a adesão do paciente ao tratamento.

Neste contexto, o desenvolvimento de microesferas a partir de polímeros naturais ou sintéticos tem sido considerado uma boa estratégia para obter formas farmacêuticas de ação prolongada. Estas partículas apresentam um diâmetro médio variando entre 1 μm a algumas centenas de micrometros, apresentando uma estrutura compacta constituída por uma rede polimérica na qual a substância ativa encontra-se distribuída no seu estado sólido ou molecular. O mecanismo de liberação do fármaco encapsulado no interior da partícula envolve processos de

natureza difusional e/ou a degradação enzimática da rede polimérica previamente formada (LINHARD, 1988, BATYCKY *et al.*, 1997). A versatilidade das técnicas implicadas no uso desta tecnologia permite uma ampla adequabilidade no que se refere às classes de medicamentos, uma vez que fatores passíveis de otimização, tais como as características físico-químicas do polímero e do fármaco empregados e os parâmetros relacionados com a técnica de preparação, determinam as propriedades do produto final.

Vários polímeros têm sido empregados na preparação de microesferas. Pode-se citar entre eles os homopolímeros do ácido lático e do ácido glicólico, a ϵ -caprolactona, os co-polímeros do ácido metacrílico e dos ésteres acrilatos, além de diferentes polissacarídeos, tais como a celulose e seus derivados, os alginatos e as quitosanas (LINHARD, 1988, HOLLINGER e RANADE, 1996, LACASSE *et al.*, 1997, FELT, O. *et al.*, 1998). A celulose é um polímero de origem vegetal constituído por unidades glicosídicas amplamente empregado na fabricação de formas farmacêuticas sólidas destinadas à administração por via oral, tais como as cápsulas e os comprimidos (WADE e WELLER, 1994). A presença de grupamentos hidroxilas primários e secundários das unidades de glicose da molécula tem possibilitado o desenvolvimento de uma grande variedade de derivados por meio de reações que conduzem a formação de éteres e ésteres destes polímeros. Os derivados obtidos apresentam propriedades físico-químicas adaptáveis a aplicações farmacêuticas diversas, entre elas a utilização na obtenção de formas farmacêuticas de ação prolongada (KUMAR e BANKER, 1993). Para a preparação de microesferas, a etilcelulose, a hidroxipropilcelulose e os ésteres acetato, acetato-propionato, acetato-ftalato de celulose têm sido empregados com sucesso no prolongamento da liberação de fármacos devido a sua excelente capacidade de formar filmes hidrofóbicos aplicáveis à microencapsulação. Entretanto, a utilização destes polímeros tem conduzido à obtenção de perfis de liberação muito lentos, pois dificultam a entrada de água na matriz, dificultando a dissolução e posterior difusão do fármaco.

Recentemente, a associação de polímeros em sistemas matriciais tem-se mostrado como uma importante estratégia farmacotécnica na busca da modulação do perfil de liberação de fármacos. A utilização de blendas poliméricas em sistemas matriciais tem demonstrado ser efetiva para alterar as propriedades físicas e

mecânicas de cada polímero individualmente, levando a alterações na permeabilidade e conduta de degradação do sistema, fornecendo assim um meio para controlar a velocidade com que o fármaco é liberado a partir da matriz. Para tal, os poloxameros, copolímeros não iônicos constituídos de unidades de polioxietileno e polioxipropileno, fornecem várias possibilidades na modulação da velocidade de liberação de fármacos, uma vez que são disponíveis em uma ampla faixa de pesos moleculares e diferentes graus de hidrofilia. Assim, esta classe de polímeros foi estudada, quanto ao seu potencial em alterar a velocidade de liberação de fármaco a partir de matrizes de acetobutirato de celulose (ABC).

Fármacos de uso contínuo, destinados à terapia de doenças crônicas degenerativas são fortes candidatos à obtenção de formas farmacêuticas de ação prolongada, onde a administração por via oral, mais segura e mais cômoda, é empregada. Os antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs), uma classe de substâncias utilizadas para aliviar a dor e o desconforto generalizado das condições inflamatórias como a artrite reumatóide, a osteoartrite e espondilite alquilosante, são fármacos que se enquadram perfeitamente nesta categoria (REYNOLDS, 1989). Entretanto, na escolha do fármaco, as suas características farmacocinéticas devem ser levadas em consideração. Substâncias ativas que apresentam um tempo de meia-vida plasmática muito curto ou muito longo, um extenso metabolismo de primeira passagem ou uma absorção pobre pelo trato gastrointestinal são geralmente considerados como inaceitáveis para desenvolvimento de formulações de liberação prolongada (HOLLINGER e RANADE, 1996).

O diclofenaco de sódio é um antiinflamatório não esteroide utilizado no tratamento da artrite reumatóide crônica e aguda. Uma vez que sua meia-vida biológica ocorre 1-2 horas após administração oral, a manutenção da concentração deste fármaco dentro da faixa terapêutica em todo o período de 24 horas requer a administração de doses múltiplas do medicamento. Além disso, efeitos colaterais indesejáveis estão relacionados provavelmente às flutuações séricas deste fármaco. Neste sentido, a adesão do paciente ao tratamento dependeria não somente da simplificação do regime de administração, mas também da aceitação da própria medicação em termos de tolerabilidade. Diante disso, o desenvolvimento de preparações de liberação prolongada é desejável, uma vez que o fármaco seria liberado gradualmente a partir da forma farmacêutica, diminuindo não somente o

número de doses diárias, mas igualmente as flutuações plasmáticas causadas pela liberação imediata de grande quantidade do fármaco.

Este fármaco apresenta os requisitos desejados para a elaboração de formas farmacêuticas de liberação prolongada, e foi empregado neste trabalho para a encapsulacao em microesferas.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver microesferas contendo diclofenaco de sódio a partir de blendas de acetobutirato de celulose e Pluronic F68, com o propósito de modular a velocidade de liberação do diclofenaco de sódio e, portanto, as suas propriedades biofarmacêuticas.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Preparar e caracterizar microesferas contendo diclofenaco de sódio de liberação prolongada, empregando-se o acetobutirato de celulose isoladamente e blendas deste polímero com o Pluronic F68, para a obtenção da matriz.
- b) Avaliar a influência dos parâmetros de formulação, relação fármaco/polímero e a presença de Pluronic F68, sobre as propriedades químicas e físico-químicas das partículas;
- c) Avaliar o potencial de utilização de Pluronic F68 para modular a velocidade de liberação do diclofenaco de sódio a partir das microesferas.
- d) Comparar os resultados obtidos na avaliação das microesferas preparadas em diferentes condições no que se refere à modulação da liberação *in vitro* do diclofenaco de sódio;
- e) Avaliar o perfil farmacocinético do diclofenaco de sódio a partir das microesferas, comparando-o com o perfil farmacocinético de uma formulação referência (Voltaren SR 75) através de ensaios de bioequivalência em cães.

2. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

2.1. DICLOFENACO DE SÓDIO

O diclofenaco (ácido [2-(2,6-dicloroanilino) fenil] acético) é um AINE potente, pertencente ao grupo derivado do ácido fenilacético, amplamente empregado, na forma de sal sódico (Figura 1), nas condições inflamatórias, sendo indicado, sobretudo, para o tratamento da artrite reumatóide, a osteoartrite e a espondilite anquilosante (MICROMEDEX, 2003). O diclofenaco de sódio (DFS) exibe também atividades analgésica, antipirética e anti-dismenorrêica (McEVOY, 2000). Este fármaco ocorre como um pó cristalino levemente higroscópico, praticamente inodoro, de cor amarelo fraco à bege brilhante. Suas principais propriedades físico-químicas estão mostradas na Tabela 1.

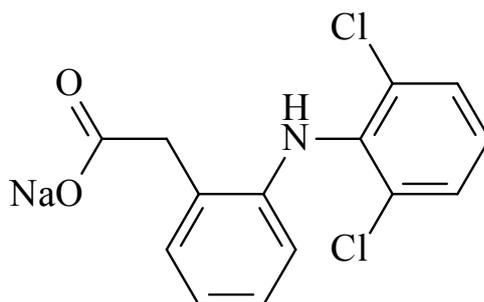


Figura 1. Estrutura química do diclofenaco de sódio

Duas características importantes são relacionadas ao diclofenaco de sódio. Primeiramente, sua solubilidade depende do pH da solução (Tabela 1). Em soluções ácidas, a solubilidade do diclofenaco de sódio é menor que 1 mg/mL e aumenta em valores de pH acima de 6,5. Além disso, o diclofenaco de sódio sofre ciclização intramolecular no meio ácido encontrado no suco gástrico, podendo causar a sua inativação. Como consequência desta ciclização, o sódio é eliminado levando a diminuição de sua solubilidade. Apesar da ciclização inativar o fármaco, esta reação parece ser reversível, não necessitando da sua proteção contra a ação do suco gástrico (PALOMO *et al.*, 1999).

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do diclofenaco de sódio (McEVOY,1990; PALOMO *et al.*, 1999)

Solubilidade (mg/mL; 25°C)	
água (pH 7,68)	21,0
água (pH 5,2)	>9
Acetona	6
Acetonitrila	<1
Ciclohexano	<1
HCl pH 1,1	<1
tampão fosfato (pH 7,2)	6,0
pKa	4,0
Coeficiente de partição (n-octanol/tampão aquoso, pH 7,4)	13,4
PF	283-285°C
Absorção UV _{máx} (nm)	
Metanol	283 (ϵ 1,05 x 10 ⁻⁵)
Tampão fosfato pH 7,2	276 (ϵ 1,01 x 10 ⁻⁵)

Sua ação farmacológica é similar àquela dos outros AINEs. Os AINEs inibem a atividade da enzima cicloxigenase, resultando no decréscimo da formação dos precursores de prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidônico (MICROMEDEX, 2003, McEVOY 2000). Existem pelo menos duas isoenzimas, a cicloxigenase-1 (COX-1) e cicloxigenase-2 (COX-2) que catalizam a formação das prostaglandinas. Embora os exatos mecanismos não tenham sido claramente elucidados, os AINEs parecem exercer atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética principalmente por meio da inibição da isoenzima COX-2. A inibição da isoenzima COX-1 é provavelmente responsável pelos efeitos indesejáveis destes fármacos sobre a mucosa gastro-intestinal e agregação plaquetária (McEVOY, 2000).

O principal problema associado à terapia com AINEs reside na capacidade de estes fármacos induzirem injúria da mucosa gastroduodenal, com o possível surgimento de úlcera gástrica, sangramento e perfuração da mucosa, bem como

risco aumentado de sangramento em portadores de úlcera péptica (HAWKEY, 1994). Ainda, sob certas condições, a toxicidade renal pode ocorrer, embora menos freqüente (CLIVE e STOFF, 1984). Assim, a inibição da biossíntese de prostaglandinas tem um papel relevante na injúria da mucosa gástrica induzida pelos AINEs, enquanto que a inibição da síntese de tromboxano nas plaquetas, com prejuízos da agregação plaquetária, pode contribuir para o sangramento das úlceras (HAWKEY, 1994).

As prostaglandinas (PGs) desempenham uma função protetora da mucosa do estômago e do duodeno, pois estimulam a secreção de muco e bicarbonato, aumentam a hidrofobicidade na superfície das células epiteliais e aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa. As PGs são, também, protetoras da microvasculatura e podem aumentar o fluxo de água da camada serosa para a mucosa, o que possibilita a diluição das substâncias lesivas. A abolição destas propriedades deixa a mucosa mais vulnerável à injúria.

Inúmeros mecanismos de reparação, incluindo a divisão da célula epitelial e possivelmente, angiogênese, são dependentes de PGs. Conseqüentemente, danos agudos e úlceras desenvolvem-se mais facilmente, e as úlceras cicatrizam mais lentamente em indivíduos que utilizam AINEs (HUDSON *et al.*, 1992).

Por outro lado, o risco individual de toxicidade pelos AINEs é baixo, porém, considerando-se o amplo uso destas drogas, o número de casos é grande e com gravidade considerável. Os fatores de risco para os pacientes são: idade superior a 65 anos, doenças associadas, história prévia de úlcera péptica, uso concorrente de corticosteróide ou anticoagulante, doses altas ou uso múltiplo de AINEs (McNEIL, 1993).

O diclofenaco de sódio é rapidamente e quase completamente absorvido a partir do trato gastrointestinal, entretanto, este fármaco sofre extenso metabolismo de primeira passagem no fígado, com apenas cerca de 50-60% da dose alcançando a circulação sistêmica na sua forma inalterada. O diclofenaco também é absorvido na circulação sistêmica após administração retal, percutânea e administração tópica na pele quando incorporado em um gel. O pico de concentração plasmática do diclofenaco geralmente ocorre dentro de 1 hora e de 10-30 minutos após administração oral de comprimidos convencionais e de solução, respectivamente. Para comprimidos de liberação retardada, a concentração

plasmática máxima varia segundo a dose, ocorrendo após 1,5–3 horas e atingindo concentrações de 0,5-1, 1-1,5, 2 e 2,5 µg/mL após a administração de 25, 50, 75 ou 150 mg de diclofenaco, respectivamente. A administração de uma única dose de comprimidos de liberação estendida conduz ao aparecimento de um pico de concentração plasmática média de 417 ng/mL, ocorrendo geralmente dentro de 5-6 horas após administração (McEVOY, 2000).

A distribuição do diclofenaco de sódio nos fluidos e tecidos do corpo humano não está completamente caracterizada. Após administração intravenosa em ratos, o fármaco é amplamente distribuído, alcançando concentrações mais altas na bile, fígado, sangue, coração, pulmões e rins e concentrações mais baixas nas glândulas adrenais, tireóides e salivares, bem como no pâncreas, baço, músculos, cérebro e espinha dorsal. De modo semelhante aos outros AINEs, o diclofenaco é distribuído para o líquido sinovial, alcançando um pico de concentração correspondente a 60-70% do pico plasmático após administração oral. Entretanto, as concentrações deste fármaco e dos seus metabólitos no fluido sinovial são excedidas substancialmente àquelas do plasma após 3-6 horas. Em adultos saudáveis o volume de distribuição total aparente médio é 0,12-0,55 L/kg e o volume de distribuição no compartimento central (V_c) é aproximadamente 0,04 L/Kg (McEVOY, 2000).

A concentração de diclofenaco no plasma parece diminuir de maneira trifásica. Após administração intravenosa em adultos saudáveis, o diclofenaco apresenta tempo de meia-vida plasmática ($t_{1/2}$) de cerca de 3 minutos na fase inicial de distribuição; aproximadamente 16 minutos na fase intermediária (redistribuição) e por volta de 1-2 horas na fase terminal (eliminação). Após administração oral de comprimidos de diclofenaco de sódio de liberação retardada em indivíduos saudáveis ou em pacientes com artrite reumatóide, a meia-vida de eliminação do fármaco foi entre 1,2-2 horas. A meia-vida de eliminação em pacientes com dano renal moderado parece ser similar àquela observada em pacientes com função renal normal, podendo ser prolongada nos casos que apresentam dano renal grave. O mecanismo exato de eliminação do diclofenaco não está completamente elucidado, mas o fármaco é rapidamente e extensivamente metabolizado no fígado. Após administração oral ou intravenosa de diclofenaco em adultos saudáveis, cerca de 50-70% da dose é excretada na urina e aproximadamente 30-35% é excretada nas

fezes, com apenas uma quantidade mínima sendo excretada na sua forma inalterada (McEVOY,2000).

Algumas das especialidades farmacêuticas do diclofenaco de sódio disponíveis no Brasil encontram-se listadas na Tabela 2. Entre elas, a forma farmacêutica mais comumente encontrada no mercado são os comprimidos, que podem ser de liberação imediata, entéricos de liberação retardada ou de liberação prolongada. Os comprimidos de liberação imediata ou convencionais são destinados a ser ingeridos e liberar a substância ativa no trato gastrointestinal, para exercer uma ação sistêmica, com prévia absorção do fármaco. Os comprimidos convencionais são indicados unicamente para a dor e dismenorréia primária, podendo também ser usados para aliviar ataques agudos de gota ou doenças de deposição de pirofosfato (pseudogota), assim como para aliviar dores associadas às condições inflamatórias não reumáticas ou cefaléias vasculares (MICROMEDEX, 2003).

A introdução de novos materiais, especialmente polímeros, permite controlar o processo de liberação, sendo possível diminuir as doses diárias e melhorar o rendimento terapêutico do medicamento. Assim, os comprimidos entéricos de liberação retardada são aqueles que apresentam um revestimento polimérico resistente ao suco gástrico que garante a sua integridade durante a passagem pelo estômago, mantendo-se impermeável e insolúvel em pH ácido (VILA JATO,1997).

Os comprimidos de liberação prolongada ou estendida podem apresentar-se de duas formas. No primeiro caso, o processo de liberação ocorre de forma mais lenta que as formulações convencionais, sendo a substância ativa liberada durante um período prolongado de tempo. No segundo caso a liberação se modula de tal forma que os níveis plasmáticos terapêuticos se mantêm constantes durante um período de tempo. Neste último caso têm-se comprimidos de liberação controlada (VILA JATO, 1997). Estas formas farmacêuticas de liberação estendida, não são usadas na fase inicial do tratamento; a dose de manutenção diária deve ser determinada empregando-se formulações de liberação imediata ou retardada (MICROMEDEX, 2003).

Tabela 2. Especialidades farmacêuticas do diclofenaco de sódio (DEF, 99/00).

Forma Farmacêutica	Dose (mg)	Especialidade farmacêutica (Laboratório)
Comprimidos de liberação imediata	25	DICLOFENACO SÓDICO (Sanval)
	50	ANAFLEX (Günther)
		BENEVRAN (Legrand)
		BIOFENAC (Ache)
		FENBURIL (De Mayo)
		FISIOREN (Ducto)
		INFLAMAX (Elofar)
		INFLAREN (Cibran)
	LUPAREN (Luper)	
	VOLTAREN (Novartis)	
75	FENBURIL (De Mayo)	
100	ARTREN (Merck)	
	FENBURIL (De Mayo)	
	VOLTAFLEX (SME)	
Comprimido de desagregação instantânea	50	BIOFENAC DI (Aché)
Comprimido de ação prolongada	50 e 100	BIOFENAC LP (Aché)
		DELTAFLIGIN (Delta)
	75	VOLTAREN SR 75 (Novartis)
Comprimido Retard	100	INFLAREN RETARD (Cibran)
		ORTOFLAN RETARD (Medley)
	VOLTAREN RETARD (Novartis)	
	50	VENDREX (IQB)
Comprimido de crono liberação	75	BIOFENAC CLR (Aché)

Tabela 2. Especialidades farmacêuticas do diclofenaco de sódio (DEF, 99/00).

Forma Farmacêutica	Dose (mg)	Especialidade farmacêutica (Laboratório)
Injetável	75	ANA-FLEX (Günther) ARTREN (Merck) BENEVRAN (Legrand) FENBURIL (De Mayo) VOLTAREN (Novartis)
Supositório	50	ANA-FLEX (Günther) ARTREN (Merck) INFLAREN (Cibran) VOLTAREN (Novartis)
Solução	15	FENBURIL (De Mayo) VOLTAFLEX (SME)
Emulgel		VOLTAREN EMULGEL (Novartis)

2.2. PLURONIC F68

Os tensoativos poliméricos não iônicos em bloco são moléculas obtidas pela adição seqüencial de dois ou mais óxidos de alcenos a um composto orgânico hidrossolúvel de baixo peso molecular contendo um ou mais átomos de hidrogênio ativo. Dentro desta classe de compostos encontram-se os Pluronicos (BASF Co., 2003), substâncias comercialmente disponíveis, conhecidas pelo nome genérico de poloxameros, que são co-polímeros em bloco do óxido de etileno (OE) e óxido de propileno (OP) (Figura 2).

A síntese dos Pluronicos é realizada em duas etapas. Primeiramente é obtida uma porção hidrofóbica de peso molecular desejado pela adição controlada de óxido de propileno aos dois grupamentos hidroxilas do propilenoglicol. Após, o óxido de etileno é adicionado de maneira a encaixar a porção hidrofóbica entre os grupamentos hidrofílicos. Assim, a vantagem destes compostos reside na variação de suas propriedades físico-químicas proporcionada pela alteração da estrutura co-polimérica, que permite ampla flexibilidade no desenvolvimento de formulações, atendendo muitas necessidades e exigências específicas (BASF Co., 2003).

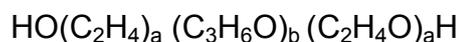


Figura 2. Representação esquemática dos copolímeros em bloco da série dos Poloxameros (Pluronic). OE = óxido de etileno e OP = óxido de propileno.

Desde que existe um grande número de tensoativos poliméricos diferentes, estes compostos foram denotados por um número indicando as suas características. Para os poloxameros, os dois primeiros dígitos, quando multiplicados por 100, indicam a massa molar aproximada da porção hidrofóbica e o último dígito, quando multiplicado por 10, fornece a percentagem de óxido de etileno (Tabela 3). Similarmente, para a marca comercial Pluronic, o primeiro e segundo dígitos representam a massa molar da porção óxido de propileno e a percentagem em peso da porção óxido de etileno, respectivamente. As letras L, P e F indicam a forma física da matéria-prima como sendo líquida, pastosa ou em flocos, respectivamente (SCHMOLKA, 1977; WADE e WELLER, 1994).

Tabela 3. Denotação numérica dos tensoativos poliméricos da série dos polaxamers (SCHMOLKA, 1977; BASF Co., 2003).

Massa molar porção hidrofóbica	Poloxamer (Pluronic)							
4000	401 (L121)	402 (L122)	403 (P123)	-	-	-	407 (F127)	-
3250	331 (L101)	-	333 (P103)	334 (P104)	335 (P105)	-	-	338 (F108)
2750	-	282 (L92)	-	284	-	-	-	288 (F98)
2250	231 (L81)	-	-	234 (P84)	235 (P85)	-	237 (F87)	238 (F88)
2050	-	212 (L72)	-	-	215 (P75)	-	217 (F77)	-

Massa molar porção hidrofóbica	Poloxamer (Pluronic)							
	10	20	30	40	50	60	70	80
1750	181 (L61)	182 (L62)	183 (L63)	184 (L64)	185 (P65)	-	-	188 (F68)
1200	-	122 (L42)	123 (L43)	124 (L44)	-	-	-	-
950	101 (L31)	-	-	-	105 (L35)	-	-	108 (F38)
% Óxido de etileno	10	20	30	40	50	60	70	80

Poloxameros são usados em uma variedade de formulações farmacêuticas, via oral, parenteral e tópica e, geralmente, não são materiais tóxicos e irritantes. Poloxameros não são metabolizados no corpo. São usados como agentes emulsificantes em emulsões intravenosas oleosas, e como solubilizantes e agentes estabilizantes para manter a clareza de elixires e xaropes. Podem ser usados como agentes molhantes em pomadas, bases de supositórios, géis, e como revestimento de comprimidos. Para uma mesma série de polímeros em bloco, a toxicidade diminui à medida que a razão entre as unidades de óxido de etileno e óxido de propileno e o peso molecular da porção hidrofóbica aumentam (SCHMOLKA, 1977).

2.3. ACETOBUTIRATO DE CELULOSE

A celulose é um polímero de origem vegetal constituído por unidades glicosídicas e amplamente empregada na fabricação de formas farmacêuticas sólidas destinadas à administração por via oral, tais como cápsulas e comprimidos (WADE e WELLER, 1994). A presença de grupamentos hidroxilas primários e secundários das unidades de glicose da molécula têm possibilitado o desenvolvimento de uma grande variedade de derivados por meio de reações que conduzem a formação de éteres e ésteres destes polímeros. Os derivados obtidos apresentam propriedades físico-químicas adaptáveis a aplicações farmacêuticas

diversas, entre elas, a utilização na obtenção de formas farmacêuticas de ação prolongada (KUMAR e BANKER, 1993). Especialmente os derivados etilcelulose e acetato, acetobutirato, acetopropionato e ftalato de celulose têm sido empregados com sucesso na preparação de microesferas visando à liberação prolongada de fármacos.

O acetobutirato de celulose (Figura 3) é um polímero insolúvel em água, cuja hidrofobicidade aumenta à medida que aumenta o número de grupamentos butirila. É disponível em vários graus de viscosidade, em função do seu peso molecular.

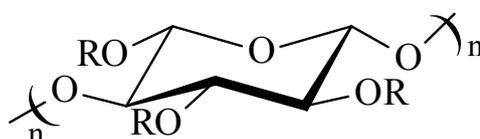


Figura 3. Estrutura química do acetobutirato de celulose

Este polímero tem sido usado em formulações de liberação sustentada de vitamina C e cloridrato de difenidramina preparadas pela técnica de compressão direta, além da utilização como membranas semi-permeáveis em sistemas de bomba osmótica (EASTMAN, 2000). Adicionalmente, YUAN e WU (2001) demonstraram a viabilidade do uso do acetobutirato de celulose na formulação de comprimidos de liberação prolongada de teofilina e de cloridrato de difenidramina obtidos por compressão direta. Os resultados demonstraram que os comprimidos exibem uma velocidade de liberação mais lenta quando o ABC foi empregado na obtenção da matriz, sugerindo a influência do radical butirila do ABC, mais hidrofóbico, nos perfis de liberação dos fármacos.

A aplicação de ABC na preparação de microesferas pelo método de emulsificação/evaporação do solvente tem sido intensamente investigada (KUMAR e BANKER, 1993). Entre os fármacos que têm sido encapsulados nestas micropartículas poliméricas inclue-se o ácido meclofenâmico (KHIRD *et al.*, 1995), disopiramida (RADWAN, *et al.*, 1995), teofilina (SHUKLA e PRINCE *et al.*, 1989), cloridrato de propranolol (CHIAO e PRINCE, 1994), cloridrato de metoclopramida (KHIRD, *et al.*, 1995), zidovudina (KHAWLA *et al.*, 1996), carbamazepina (ARNAUD

et al., 1996; ZANETTI *et al.*, 2002), entre outros.

2.4. MICROENCAPSULAÇÃO

O desenvolvimento de novas formas de liberação de fármacos, amplamente empregados na farmacoterapêutica, tem-se constituído nos últimos anos numa estratégia promissora para a melhoria do perfil biofarmacêutico de medicamentos. A obtenção de perfis plasmáticos mais constantes e de efeitos mais prolongados tem se revelado como características importantes para adesão do paciente aos tratamentos, sobretudo, em regimes em que múltiplas doses diárias são necessárias, além de ocasionar redução de efeitos colaterais.

Microcápsulas e microesferas têm sido desenvolvidas com esse objetivo, utilizando-se diferentes matrizes poliméricas e uma diversidade de metodologias. Enquanto as microcápsulas são formadas pelo revestimento de gotículas, dispersões ou pequenas partículas sólidas por uma camada ou “parede” polimérica (DEASY, 1984), as microesferas são partículas de formato esférico, em que o fármaco encontra-se dissolvido ou disperso em uma matriz. As dimensões das micropartículas são, em regra, cerca de 10 μm , podendo alcançar até 2500 μm (PRISTA *et al.*, 1996).

Várias técnicas são descritas na literatura para a preparação de microesferas. Sob o termo de coacervação ou separação de fases estão agrupadas uma série de técnicas de microencapsulação baseadas na desolvatação do polímero induzida por algum procedimento que conduza à alteração das características do meio. Entre os procedimentos capazes de induzir a precipitação do polímero sob a forma de microesferas destacam-se a mudança de temperatura, a modificação do pH e a adição de um não solvente, sal ou de outro polímero incompatível (VILA JATO, 1997). Em alguns casos, principalmente quando polímeros hidrossolúveis são empregados, a formação das partículas ocorre mediante reticulação das cadeias poliméricas, com utilização de alguns agentes reticulantes tais como formaldeído e o glutaraldeído.

A aspensão em torre de secagem, também chamada de nebulização ou *spray-drying*, é um procedimento de microencapsulação que se baseia na pulverização de uma solução do polímero contendo o fármaco em uma câmara de

secagem. O fármaco é dissolvido ou disperso na solução do polímero e a mistura líquida é dividida sob a forma de finíssimas gotículas para dentro da câmara de secagem cujo interior circula ar aquecido. Este por sua vez, é capaz de diminuir a temperatura de vaporização necessária para a eliminação do solvente, obtendo-se assim o produto microencapsulado (VILA JATO, 1997).

Para preparação de microesferas a técnica de emulsificação seguida da evaporação do solvente tem sido freqüentemente empregada face à simplicidade dos procedimentos envolvidos na obtenção das partículas e às possibilidades de modulação das características físicas e físico-químicas das mesmas, por meio da escolha dos componentes da formulação e das condições de preparação (BHARDWAJ *et al.*, 1995, KHIDR *et al.*, 1998, SILVA E FERREIRA, 1999). Neste método, o fármaco é dissolvido ou disperso em uma solução de um polímero em um solvente orgânico volátil. A fase orgânica é então emulsificada em uma fase aquosa, contendo um estabilizante da dispersão. O solvente é removido a partir dos glóbulos da fase interna pela aplicação de calor, vácuo ou ainda, pela sua evaporação em temperatura ambiente levando a formação de partículas esféricas contendo o fármaco no seu interior. As microesferas formadas são separadas por filtração ou centrifugação, lavadas com um solvente apropriado e colocadas em estufa para completa secagem das partículas (DEASY, 1984, WATTS *et al.*, 1990).

A formação das microesferas pode ser influenciada por diversos fatores, destacando-se, entre eles, a natureza dos solventes empregados na preparação. A capacidade de dissolução do polímero e, preferencialmente, de dissolução do fármaco são características desejáveis do solvente da fase interna. Além dessas características, o solvente deve ser imiscível na fase contínua e apresentar baixo ponto de ebulição. Contrariamente, o fármaco e o polímero devem ser insolúveis na fase externa de modo a garantir a formação das partículas e proporcionar uma elevada taxa de encapsulação (WATTS *et al.*, 1990).

A estrutura final e composição das microesferas são resultantes de uma complexa contribuição das características físico-químicas do polímero, fármaco, solventes e agentes emulsificantes. Estes últimos têm como função estabilizar a dispersão dos glóbulos na forma de emulsão, prevenindo a agregação e a coalescência. Entretanto, esta estabilização é requerida somente por um curto período de tempo, uma vez que após a evaporação de parte do solvente ocorre a

formação de glóbulos relativamente compactos pela presença do polímero. Para emulsões cuja fase externa é aquosa, estabilizantes poliméricos como o álcool polivinílico, a metilcelulose e a gelatina têm sido utilizados, estabilizando a emulsão por meio do aumento da viscosidade da mesma. Por outro lado, quando a fase externa é oleosa, a obtenção de emulsões pode ser conseguida pela adição de tensoativos de baixo valor de EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo), como o monooleato de sorbitano. Finalmente, o diâmetro médio final das partículas depende, em grande extensão, da velocidade de agitação, do tipo de equipamento empregado e da concentração de polímero na fase interna da emulsão (WATTS *et al.*, 1990).

A eficiência de encapsulação de fármacos é estimada como sendo a diferença percentual entre a concentração de fármaco inicialmente adicionado na formulação e a concentração retida no interior das partículas, após determinação quantitativa do mesmo nas microesferas. A eficiência de encapsulação é influenciada pelo coeficiente de partição do fármaco entre a fase interna e externa da emulsão. Fármacos caracterizados por uma baixa hidrossolubilidade podem ser encapsulados com sucesso pela formação de uma emulsão O/A (óleo em água). Entretanto, quando fármacos que apresentam uma elevada hidrossolubilidade são empregados, uma baixa taxa de encapsulação tem sido observada. Neste sentido, a encapsulação de fármacos hidrofílicos tem sido obtida por meio da formação de emulsões A/O (água/óleo), onde um solvente polar contendo o fármaco e o polímero é emulsificado em uma fase oleosa, como o óleo mineral (SHUKLA, *et al.*, 1989). Uma segunda alternativa para contornar esta limitação da técnica é a formação de uma emulsão múltipla A/O/A (água/óleo/água) (OGAWA *et al.*, 1988). Neste caso, um solvente orgânico contendo o polímero é disperso em uma fase aquosa contendo o fármaco, formando uma emulsão primária, do tipo A/O que, por sua vez, é emulsificada em uma fase aquosa (WATTS *et al.*, 1990).

Os sistemas de liberação controlada podem ser classificados em sistemas monolíticos ou matriciais, sistemas reservatórios, sistemas ativados por solventes e sistemas controlados quimicamente. Os principais mecanismos que governam a liberação de um fármaco a partir de um sistema de liberação controlada são a difusão e a erosão (VILA-JATO, 1997). Para os sistemas matriciais, a liberação do fármaco pode ser dirigida por um certo número de processos. Entre eles, o fármaco pode se difundir na matriz sólida, a qual mantém a sua integridade estrutural. Apesar

de o fármaco poder ser liberado a partir de nanopartículas em minutos ou horas, a velocidade deste processo é extremamente baixa para sistemas de liberação macroscópicos, tais como as micropartículas. Neste último caso o que é mais freqüentemente observado é a penetração do solvente na partícula, seguida da dissolução do fármaco que posteriormente se difunde em solução para o meio externo. O solvente pode penetrar por percolação através dos poros ou produzir a hidratação da partícula. O primeiro caso pode ser também acompanhado de entumescimento do polímero, resultando em uma camada viscosa por onde o fármaco se difunde (WASHINGTON, 1990).

Finalmente, o polímero formador da matriz pode se degradar ou se dissolver, liberando e acumulando o fármaco na fase contínua. Na prática, o perfil de liberação pode ser o resultado da combinação destes mecanismos, podendo ser usado não somente como meio de assegurar a qualidade da preparação, mas principalmente para descrever a estrutura do sistema e a conduta da formulação.

Entre os vários parâmetros de formulação que influenciam no perfil de liberação da substância ativa encapsulada no interior das partículas encontram-se a natureza química do polímero empregado bem como o seu peso molecular (BHARDWAJ *et al.*, 1995, ARABI *et al.*, 1996), a relação substância ativa/polímero na fase interna ou dispersa da emulsão (KHAWLA *et al.*, 1996), as características de solubilidade da substância ativa (SILVA e FERREIRA, 1999), o tamanho da partícula e a velocidade de agitação (CHIAO e PRICE, 1994, KHIRD *et al.*, 1998).

2.4.1. Microencapsulação do Diclofenaco de Sódio

A preparação de microesferas contendo diclofenaco de sódio tem sido objeto de estudo por diversos autores, sobretudo na busca da obtenção de formas de liberação controlada deste fármaco. Entre os polímeros comumente testados destacam-se os derivados de celulose. Muitos destes estudos referem-se a reticulação de derivados de celulose hidrossolúveis para a obtenção de sistemas matriciais. ARICA e colaboradores (1996) prepararam microesferas de carboximetilcelulose sódica usando, para a formação das partículas, o cloreto de alumínio como agente de reticulação. As microesferas foram posteriormente revestidas com Eudragit® S-100, para obtenção de formas farmacêuticas de

liberação entérica.

A reticulação da carboximetilcelulose sódica pelo cloreto de alumínio também foi testada por HOSNY e colaboradores (1998) na preparação de esferas contendo DFS, revestidas com alginato de sódio. Neste estudo, duas variáveis foram estudadas, a concentração do agente reticulante (20, 40 e 60% p/V) e o tempo para o revestimento (15, 30 e 60 min). Os autores verificaram que, nas maiores concentrações de cloreto de alumínio testadas (40 e 60%), partículas mais esféricas e uniformes foram produzidas. O tamanho das partículas não diminuiu significativamente ($P > 0,05$) com aumento da concentração do agente reticulante. O tempo de revestimento não afetou o tamanho das partículas para a mesma concentração de cloreto de alumínio. Estudos de dissolução demonstraram que a velocidade de liberação do diclofenaco aumenta com aumento da concentração de cloreto de alumínio e diminui após revestimento com alginato.

O efeito combinado de variáveis independentes no tempo de dissolução de 80% do fármaco (t_{80}) a partir de microesferas de alginato de sódio, obtidas por emulsão água/óleo, seguida de reticulação com cloreto de cálcio, foi avaliado por GOHEL e AMIN (1998) por meio de um delineamento fatorial 3^3 . As variáveis estudadas foram velocidade de agitação, concentração de cloreto de cálcio e porcentagem de parafina líquida na fase externa da emulsão. Os resultados da análise estatística demonstraram que para o prolongamento da liberação do fármaco, as microesferas devem ser preparadas com uma baixa velocidade de agitação, alta concentração de cloreto de cálcio, e alta porcentagem de parafina líquida.

GOHEL e AMIN (1999) também empregaram o delineamento estatístico fatorial 2^2 , para a otimização da preparação de microesferas de DFS de liberação prolongada. As microesferas foram preparadas a partir do álcool polivinílico (PVA) pela formação de ligações químicas covalentes entre as cadeias poliméricas com glutaraldeído. A influência dos fatores relação DFS:PVA e concentração de glutaraldeído sobre o tempo requerido para liberação de 50% de DFS (t_{50}) em tampão fosfato foi avaliada neste estudo, sendo o prolongamento da liberação obtido quando ambos os fatores apresentavam-se em níveis superiores.

CHAWLA e colaboradores (2000) utilizaram álcool polivinílico (PVA) para a preparação de microesferas contendo DFS, pela técnica da emulsão seguida de

reticulação. Um estudo estatístico foi usado para avaliar quais das variáveis estudadas afetavam a preparação das microesferas e o perfil de liberação do DFS. Os autores concluíram que uma alta concentração de PVA, elevada velocidades de agitação e baixa concentração de glutaraldeído demonstraram ser fatores importantes para a obtenção de partículas esféricas de tamanho reduzido. A concentração de PVA e a quantidade de parafina líquida de alto peso molecular (utilizada como fase externa na emulsão) mostraram ser fatores críticos que influenciam no valor de t_{50} .

Enquanto a preparação de microesferas a partir de polímeros hidrofílicos pode ser realizada somente mediante a utilização de técnicas que envolvem a reticulação, a técnica de emulsão/evaporação do solvente pode ser facilmente aplicada quando derivados de celulose hidrofóbicos são empregados para a obtenção da matriz polimérica. JANI e GOHEL (1997) utilizaram esta técnica para a encapsulação do diclofenaco de sódio em microesferas de etilcelulose. Neste estudo os autores avaliaram, por meio de um delineamento fatorial 3^2 , a influência das variáveis independentes, quantidade de diclorometano (DCM) na fase interna da emulsão e tipo de estabilizante empregado, sobre o teor de fármaco nas microesferas e diâmetro médio das partículas. O aumento do teor de fármaco nas microesferas foi verificado com a diminuição da quantidade de DCM e aumento da concentração do estabilizante (pectina ou alginato) utilizado nas formulações. O diâmetro das partículas não foi afetado pelos fatores estudados.

O poli-ácido láctico-co-glicólico (PLAGA) foi usado por CHANDASHEKAR e UDUPA (1996) na preparação de microesferas destinadas à administração parenteral, e em sistemas de implante na forma de gel *in situ*, ambos contendo DFS e destinados à injeção subcutânea. Estudos farmacocinéticos demonstraram que as microesferas proporcionaram níveis terapêuticos constantes do fármaco no plasma por 16 dias após uma injeção subcutânea. Porém, a utilização do gel *in situ* produziu uma concentração plasmática significativamente maior, bem como a manutenção do efeito inibidor da inflamação durante dez dias.

MEDEIROS e LEMOS-SENNA (2001) utilizaram a técnica de emulsão/evaporação do solvente para obtenção de microesferas contendo diclofenaco de sódio, empregando o acetobutirato de celulose para obtenção da matriz polimérica. Após análise estatística, os autores verificaram que, para uma

mesma quantidade de diclofenaco de sódio, quanto maior a concentração de polímero adicionado à formulação, maior é o teor de fármaco encontrado nas partículas. Por outro lado, a alteração da relação fármaco/polímero de 1:8 para 1:4 conduziu à diminuição da eficiência de encapsulação. O efeito sobre o diâmetro das partículas foi verificado somente com o aumento da relação fármaco/polímero.

A quitosana também tem sido utilizada como material polimérico para a preparação de microesferas de DFS. ACIKGOZ e colaboradores (1995) empregaram este polissacarídeo para a microencapsulação do fármaco na busca da obtenção de perfis de liberação prolongados e da redução da irritação do trato gastrointestinal. A preparação das microesferas foi realizada mediante um procedimento de extrusão capilar que consistiu no gotejamento de uma solução de quitosana contendo DFS em ácido acético em uma segunda solução de tripolifosfato. Apesar do perfil de liberação do DFS ter sido similar ao da preparação comercial e ter proporcionado melhorias na atividade antiinflamatória, o uso das microesferas de quitosana não demonstrou ser menos ulcerogênico quando coelhos foram empregados como modelos animais nos estudos *in vivo*.

A preparação de microesferas de quitosana contendo DFS por meio de reticulação das cadeias polissacarídicas foi realizada por KUMBAR e colaboradores (2002). Estes autores avaliaram a influência de três diferentes agentes reticulantes, glutaraldeído, ácido sulfúrico e tratamento com calor sobre o teor e o perfil de liberação do diclofenaco de sódio. O maior teor de DFS foi obtido com o uso de ácido sulfúrico. Entretanto, perfis de liberação mais lentos foram verificados com o emprego de glutaraldeído como agente reticulante.

Com o objetivo de obter suspensões farmacêuticas de liberação prolongada, LEWIS e colaboradores (1998a) prepararam microesferas de diclofenaco de sódio empregando a técnica de dispersão/solidificação, a partir de ceras graxas. Neste estudo, os autores avaliaram a influência da composição de uma mistura de dois emulgentes, hidrofílico e hidrofóbico, em diferentes proporções, sobre a liberação do fármaco. As microesferas demonstraram-se estáveis física e quimicamente em temperatura ambiente, mas quando expostas em temperaturas acima de 45 °C exibiram perfis de liberação do fármaco mais lentos devido à fusão da superfície das partículas (LEWIS *et al*, 1998b).

2.4.2. Blendas Poliméricas

A associação de polímeros em sistemas matriciais tem-se mostrado recentemente como importante estratégia farmacotécnica na busca da modificação e do perfil de liberação de fármacos. Blendas podem ser efetivas para alterar as propriedades físicas e mecânicas de cada polímero individualmente. Dependendo das propriedades termodinâmicas e da escolha dos polímeros, diferentes graus de separação de fases podem ser observados nas blendas poliméricas, levando a uma variação no seu comportamento de degradação (MI *et al.*, 2002). Nos sistemas de liberação, o uso de blendas permite a variação sistemática da permeabilidade de micropartículas (CHA e PITT, 1988), além de fornecer um meio de modular a velocidade de biodegradação da matriz polimérica (CHA e PITT, 1990).

Talvez o exemplo mais clássico do emprego promissor de blendas poliméricas refere-se aos co-polímeros do ácido láctico e glicólico (PLAGA). Estes polímeros são amplamente conhecidos pela sua propriedade de biodegradabilidade, os quais são hidrolizados na ausência de enzimas e metabolizados no organismo. A velocidade de degradação e, conseqüentemente, o perfil de liberação de fármacos microencapsulados pode ser regulado alterando a massa molar, a proporção de ácido láctico e glicólico e o grau de cristalinidade do co-polímero (LE CORRE *et al.*, 1994, GRANDFILS *et al.*, 1996, HYON, 2000, PILLAI e PANCHAGNULA, 2001).

BURT e colaboradores (1995) também utilizaram estas blendas para a encapsulação do taxol em microesferas destinadas a quimioembolização. Blendas de AVE (acetato vinil etileno) e PLA (poliácido láctico) têm demonstrado ser imiscíveis ou bicontínuas em uma faixa de 30 a 70% de AVE na mistura. Nos estudos de degradação, após um período de latência, o PLA foi hidrolizado e eliminado da matriz polimérica levando a um esqueleto semelhante a uma esponja. Embora a erosão do PLA na blenda de PLA:AVE (50:50) tenha ocorrido dentro de 50 dias de ensaio *in vitro*, o mecanismo principal de liberação do taxol foi a difusão pelos poros da matriz. Durante este período 10-13% da quantidade total de taxol foi liberado a partir das microesferas. Esta quantidade foi suficiente para produzir regressão vascular e inibição da angiogênese.

Combinações de poliésteres alifáticos com diferentes pesos moleculares têm sido igualmente testados na busca da modulação da liberação de fármacos a

partir de microesferas. BAIN e colaboradores (1999) demonstraram que misturas racêmicas de poli-D, L- ácido lático de baixo (PM=2000) e moderado (PM=9000) peso molecular podem ser usados na preparação de microesferas de rifampicina apresentando perfis de liberação previsíveis, pela técnica de aspersão em torre de secagem (*spray-drying*). Estas microesferas apresentaram perfis de liberação dependentes da temperatura, sendo aplicáveis à liberação de fármacos no sítio específico de ação.

YANG e colaboradores (2000) avaliaram o efeito das condições de preparação sobre a morfologia e os perfis de liberação da albumina sérica bovina (BSA) a partir de microesferas de poliácido lático (PLA), poli ácido lático-co-glicólico (PLAGA) e blendas de poli ácido lático-co-glicólico e polietilenoglicol (PLAGA:PEG; 65:35), utilizando uma técnica de dupla emulsão modificada. Os autores demonstraram que a eficiência de encapsulação, o efeito de liberação inicial (efeito *burst*), e o perfil de liberação da proteína, podem ser modulados variando-se as condições de preparação, tais como temperatura, velocidade de remoção do solvente, proporção entre a fase oleosa e a fase interna aquosa e concentração do polímero.

MI e colaboradores (2002) prepararam microesferas utilizando blendas de quitina e poliácido lático-co-glicólico (PLAGA 50:50) visando a encapsulação de fármacos anti-cancerosos. Os autores sugeriram a ocorrência de separação dos polímeros em duas fases, estando o PLAGA disperso na forma de partículas numa matriz contínua de quitina. A velocidade de degradação da matriz demonstrou ser dependente de ambas, erosão da quitina e hidrólise do PLAGA. A velocidade de liberação do clorambucil a partir das microesferas de quitina/PLAGA ocorreu em dois estágios. A liberação inicial do fármaco aumentou com o aumento do teor de quitina, devido à hidratação e erosão superficial da partícula, e foi seguida de uma liberação prolongada resultante da hidrólise da porção PLAGA, mais hidrofóbica.

Os polietilenoglicóis são polímeros hidrofílicos. A incorporação destes polímeros em matrizes hidrofóbicas tem sido realizada com o objetivo de modificar a velocidade de erosão bem como a permeabilidade da matriz. Estas alterações conduzem ao aumento da velocidade de liberação do fármaco, podendo ser modulada pelo ajuste da massa molar e da proporção de polímeros na mistura.

YEH e colaboradores (1995) desenvolveram micropartículas contendo ovoalbumina bovina a partir de blendas de poli ácido láctico-co-glicólico e polietilenoglicol 8000 usando uma técnica de emulsão A/O/O (água/diclorometano/metanol), seguida de extração do solvente. Esta técnica foi desenvolvida com intuito de contornar os problemas relacionados à baixa taxa de encapsulação de peptídeos e proteínas e ao efeito de liberação inicial importante, freqüentemente observado quando a técnica de microencapsulação de dupla emulsão A/O/A é empregada. Além do aumento da quantidade de proteína nas microesferas, os autores observaram a redução do efeito *burst* e do tempo de latência devido à formação de poros e canais induzida pela dissolução do polietilenoglicol na mistura. Os autores sugeriram que o desenvolvimento de poros pode ser controlado pelo ajuste da quantidade e pela escolha da massa molar do PEG usado na mistura.

YEH e colaboradores (2000) igualmente empregaram a técnica descrita acima para preparar microesferas contendo insulina a partir de blendas de poli ácido láctico/polietilenoglicol (PLA/PEG) e poli ácido glicólico/polietilenoglicol (PLG/PEG). Neste estudo, os autores buscavam não somente a manutenção de perfis de liberação prolongados, mas também a redução da desnaturação e agregação deste peptídeo causada pela geração de um microambiente ácido no interior da partícula, que por sua vez é proveniente da degradação do polímero. Estes objetivos foram atingidos com o uso de blendas PLA/PEG para a preparação das microesferas.

ZANETTI e colaboradores (2002) avaliaram o efeito da adição de polietilenoglicóis (PEGs) nas formulações de microesferas de acetobutirato de celulose (ABC) sobre a eficiência de encapsulação da carbamazepina e morfologia das partículas, usando a técnica de emulsão O/O (acetona/óleo mineral) seguida da evaporação do solvente. Neste estudo, os autores verificaram o aumento da porosidade das partículas e concomitante decréscimo do teor de carbamazepina nas microesferas com o aumento da concentração de PEG nas formulações. A influência do peso molecular do ABC (30000 e 70000) e da adição de PEG 1500 às formulações, sobre o diâmetro médio das partículas e velocidade de liberação da carbamazepina foi posteriormente avaliada num delineamento fatorial do tipo 2^2 (ZANETTI, 2001). Neste caso, perfis de liberação apropriados foram obtidos a partir das microesferas preparadas com ABC de menor peso molecular e com adição de

PEG 1500, demonstrando a interação entre os dois fatores estudados. A maior velocidade de liberação da carbamazepina foi atribuída a maior porosidade das partículas, proporcionada pela adição de PEG 1500. Estudos de DSC e FTIR comprovaram a inexistência de PEG 1500 nas microesferas produzidas tendo sido postulado que este polímero foi removido durante a preparação das microesferas.

Copolímeros anfífilicos em bloco constituído de unidades de polietilenoglicol (PEG) e polibuteno tereftalato (PBT) foram empregados por BEZEMER e colaboradores (2000) na preparação de microesferas destinadas à liberação de proteínas. Os autores demonstraram que a liberação de lisozima pode ser modulada pela variação do grau de intumescimento da matriz e do diâmetro das partículas. Estas características foram alteradas pela composição do co-polímero e concentração do mesmo nas formulações, respectivamente. Neste caso a liberação da proteína foi atribuída à combinação de ambos processos de difusão e degradação da matriz polimérica.

Visando igualmente a encapsulação de proteínas, matrizes poliméricas têm sido preparadas a partir de blendas de poli-ácido láctico e co-polímeros do óxido de etileno (POE) e óxido propileno (POP) (PARK *et al.*, 1992). Neste trabalho foi demonstrado que a quantidade e o grau de hidrofília do co-polímero POE-POP-POE foram fatores importantes para o grau de hidratação e remoção do mesmo a partir da matriz. A utilização de misturas destes polímeros resultou na redução do efeito burst inicial e prolongamento da liberação da proteína por mais de 80 dias.

HUATAN e colaboradores (1995) demonstraram que a liberação de uma proteína modelo, a albumina sérica bovina, foi maior a partir de matrizes preparadas com misturas ternárias de poli- ϵ -caprolactona (PCL) de alto e baixo peso molecular e Synperonic L61 do que a partir de matrizes preparadas com misturas de poli- ϵ -caprolactona unicamente. A maior taxa de liberação foi atribuída ao aumento do conteúdo de água na matriz para difusão da proteína e à eliminação do Synperonic L61, causando um notável desvio do modelo de Fick.

YEH e colaboradores (1996) investigaram a capacidade de co-polímeros em bloco POE-POP-POE (Pluronic) em alterar as características de liberação e a quantidade da proteína ovoalbumina liberada a partir de micropartículas de poli-ácido láctico-co-glicólico (PLAGA), preparadas pela técnica da dupla emulsão A/O/O. Neste estudo, perfis de liberação lineares da proteína foram obtidos por mais de 25

dias de ensaio *in vitro*, nas formulações contendo Pluronic F127. Com o uso de Pluronic L121, mais hidrofóbico, o perfil de liberação da ovoalbumina demonstrou um platô após 10 dias de ensaio. Neste caso, a capacidade de liberação da proteína de micropartículas preparadas a partir de blendas PLAGA/Pluronic 127 (1:2) foi maior do que a partir de partículas preparadas unicamente com PLAGA. Os autores atribuíram estes resultados à rápida dissolução do Pluronic a partir da micropartícula e extração da proteína, eliminando o período de latência do perfil de liberação.

Várias outras misturas de polímeros têm sido igualmente testadas na busca da modificação do perfil de liberação de fármacos microencapsulados. GIUNCHEDI e colaboradores (1996) prepararam microesferas contendo cetoprofeno a partir de blendas de acetotrimelitato de celulose e etilcelulose por aspersão em torre de secagem de uma solução orgânica contendo os dois polímeros. Neste estudo os autores verificaram a diminuição da velocidade de liberação do fármaco com o aumento da quantidade de etilcelulose nas microesferas.

Finalmente, o desenvolvimento de microesferas injetáveis de liberação prolongada a partir de polianidridos bioerosíveis foi realizado por KIPPER e colaboradores (2002). Estes autores verificaram que o uso de blendas de poli-[1,6-bis (p-carboxifenoxi) hexano] e polianidrido sebácico 50:50 conduziu à diminuição do efeito de liberação inicial (efeito *burst*), seguido do prolongamento da liberação da p-nitroanilina por mais um mês. A diferença no perfil de liberação foi atribuída à alteração na velocidade de erosão da matriz e características de distribuição do fármaco nas microesferas, quando comparado com os resultados obtidos com as microesferas preparadas com os polímeros isoladamente.

3.MATERIAIS

3.1. Matérias-primas

- Diclofenaco de sódio (Novartis RS)
- Indometacina (Sigma – Aldrich Chemical Co.)
- Imosec (Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda)
- Voltaren SR75 (Novartis)
- Heparina (Liquemine)
- Soro Fisiológico (NaCl 0,9%)
- Acetobutirato de celulose PM 70000 (37% de grupamentos butirila e 13,5% de grupamentos acetila) (Aldrich Chemical Company, Inc, USA);
- Pluronic F68 (BASF Corporation, USA)
- Monooleato de sorbitano (SPAN 80; Beraca Ind. Com. LTDA);
- Vaselina Líquida (Importadora Química Delaware LTDA);

3.2. Reagentes e Solventes

- Acetona (Vetec);
- Ácido Fosfórico 5M (Nuclear);
- Acetonitrila (Nuclear);
- Ácido Acético 0,1M (Nuclear);
- Sulfato de sódio anidro (Vetec);
- N-hexano (Tedia);
- Metanol (Vetec);
- Diclorometano (Vetec);
- Ácido Clorídrico (Nuclear);
- Hidróxido de Sódio (Nuclear);
- Fosfato de Sódio tribásico (Nuclear).

3.3. Equipamentos

- Potenciômetro digital (Analyser 300);
- Agitador magnético Fisaton, modelo 702AC;

- Espectrofotômetro UV/VIS Perkin Elmer, modelo Lambda 10;
- Espectrofotômetro IV Perkin Elmer, modelo 16 PC FT-IR;
- Aparelho de dissolução Pharmatest modelo PTWS3, acoplado a espectrofotômetro HP 8452A, Programa Dissolution Testing Software, HP, Revision 03.01, 1989-1993, Windows 3.11;
- Balança Analítica Ohaus Corporation AS200S;
- Estufa à vácuo Napco;
- Microscópio eletrônico de varredura Philips XL30;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu equipado com uma bomba LC10AS, detector UV SPD-10A, com integrador Chromatopac C-R6A;
- Vórtice Biomixer, modelo Mult-Mixer MVS-1;
- Ultrassom Unique, modelo USC 1400;
- Centrífuga HT, modelo Centribio;
- Centrífuga Sigma, modelo 2K15, rotor número 12148.

4. METODOLOGIA

4.1. ESTUDOS PRELIMINARES DAS CONDIÇÕES DE PREPARAÇÃO DAS MICROESFERAS

4.1.1. Preparação das Microesferas com Diferentes Proporções de Acetobutirato de Celulose e Pluronic F68

A preparação das microesferas foi realizada pela metodologia de emulsão e evaporação do solvente descrita na literatura (WATTS *et al.*, 1990). Assim, 10 mL de uma solução acetônica de acetobutirato de celulose (ABC, PM 70000) ou acetobutirato e pluronic F68, contendo diclofenaco de sódio previamente dissolvido (fase dispersa ou interna) foram emulsionados em 100 mL de vaselina líquida contendo Span 80 1% (p/V) como estabilizante (fase dispersante ou externa). A vaselina líquida foi previamente saturada com o solvente da fase interna, a acetona. A emulsão formada foi mantida sob agitação de 650 rpm em temperatura ambiente durante 24 h para completa evaporação do solvente da fase interna. As microesferas formadas foram filtradas, lavadas três vezes com cerca de 50 mL de n- hexano e secas em estufa sob pressão reduzida durante 4 h a temperatura ambiente.

Neste estudo preliminar a concentração total de polímero (acetobutorato de celulose ou a mistura de acetobutirato e Pluronic F68) na fase interna e a relação fármaco:polímero foram mantidos em 5% e 1:8, respectivamente. Foram testadas três formulações com concentrações de 1: 0, 9: 1, 3:1 e 1:1 (ABC: Pluronic F68).

4.1.2. Determinação da Eficiência de Encapsulação e do Teor de Diclofenaco de Sódio nas Microesferas

Cerca de 30 mg de microesferas, exatamente pesadas, foram colocadas em 25,0 mL de metanol e a mistura foi mantida sob agitação magnética por 2 horas. A mistura foi então filtrada quantitativamente para um balão de 50,0 mL e o volume foi completado com metanol. Esta solução foi diluída três vezes e então analisada no ultravioleta a 284 nm. A concentração de DFS foi estimada comparando-se a

absorção obtida com a absorção de uma solução padrão do fármaco de concentração conhecida (10 µg/mL). A eficiência de encapsulação do fármaco (%) foi calculada relacionando-se a quantidade de DFS encontrado nas microesferas com a quantidade inicialmente adicionada às formulações. O teor de fármaco (mg/100 mg microesferas) foi igualmente estimado.

4.1.3. Avaliação dos Perfis de Liberação do Diclofenaco de Sódio a partir das Microesferas

Microesferas em quantidade correspondente a 25 mg de diclofenaco de sódio foram exatamente pesadas e transferidas para o interior de cápsulas de gelatina dura e colocadas em 300 mL de meio tampão fosfato pH 7,5 +/- 0,1. O meio de liberação foi mantido a 37⁰C sob agitação magnética. Alíquotas de 0,5mL do meio de liberação foram retiradas no tempo zero e após 0,5; 1; 2; 3; 4; 8 e 12 horas de ensaio e analisadas por espectrofotometria de absorção no ultravioleta a 284 nm. Os valores de absorção obtidos foram comparados com a absorção de uma solução padrão de DFS de concentração conhecida. A partir destes resultados as curvas de liberação expressas em % de fármaco liberado *versus* tempo (min) foram plotadas.

4.2. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS DE FORMULAÇÃO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS MICROESFERAS E SOBRE A VELOCIDADE DE LIBERAÇÃO DO DICLOFENACO DE SÓDIO

4.2.1. Preparação das Microesferas

A preparação das microesferas foi realizada conforme descrito em 4.1.1, com aumento da proporção dos componentes em cinco vezes.

4.2.2. Delineamento Estatístico

O plano de experimentação fatorial do tipo 2x2 foi utilizado para avaliar a influência de dois fatores de formulação sobre o diâmetro médio das partículas, o

teor de fármaco e sobre a velocidade de liberação do fármaco a partir das microesferas. Os dois fatores selecionados foram relação fármaco/polímero (fator A) e adição de Pluronic F68 (fator B). Estes fatores foram avaliados em dois níveis, superior (+) e inferior (-). Assim, para o fator A, o nível superior (+) estabelecido foi 1:4 e o nível inferior (-) foi 1:8; para o fator B o nível superior (+) foi com adição de Pluronic F68 e o inferior (-) foi sem a adição de Pluronic F68. O plano de experimentação realizado neste estudo encontra-se demonstrado na Tabela 4 e as formulações testadas podem ser visualizadas na Tabela 5. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 4. Plano Experimental (Delineamento fatorial 2x2).

Experimento	Fator A (relação fármaco/polímero)	Fator B (Pluronic F68)
1	-	-
a	+	-
b	-	+
ab	+	+

Tabela 5. Formulações das microesferas de ABC ou ABC e Pluronic F68 contendo diclofenaco de sódio empregadas no delineamento estatístico.

Formulação		Experimento (Fator A; Fator B)			
		1 (-/-)	a (+;-)	b (-/+)	ab (+/+)
Fase interna	Diclofenaco de sódio (g)	0,625	1,250	0,625	1,250
	ABC 70 000 (g)	5,0	5,0	3,75	3,75
	Pluronic F68 (g)	0	0	1,25	1,25
	Acetona qsp (ml)	100	100	100	100
Fase externa	SPAN 80 (g)	5,0	5,0	5,0	5,0
	Vaselina líquida qsp	500	500	500	500
Fator A: Relação fármaco:polímero		1:8	1:4	1:8	1:4
Fator B: Adição de Pluronic F68		nao	nao	sim	sim

4.2.3. Caracterização Química e Físico-Química das Microesferas

4.2.3.1. Avaliação da morfologia das partículas

A avaliação da morfologia das partículas, bem como das propriedades de superfície, foi realizada pela observação das micrografias obtidas em microscópio eletrônico da varredura Philips XL 30. As microesferas foram fixadas com fita dupla-face em suportes de alumínio e recobertas com uma camada de ouro de 350 Å de espessura em um aparelho à vácuo Polaron E 5000. As micrografias foram obtidas com papel térmico Sony UPP-110HD em aumentos de 15, 80, 120, 500 e 2000 vezes.

4.2.3.2. Determinação do diâmetro médio e da distribuição granulométrica

O diâmetro médio e a distribuição granulométrica das microesferas foram determinados por medição, pelo diâmetro de Ferret, das partículas visualizadas nas micrografias ampliadas obtidas por microscopia eletrônica (VILA JATO, 1997).

4.2.3.3. Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de diclofenaco de sódio nas microesferas

4.2.3.3.1. Preparação da curva de calibração

Cerca de 50 mg de diclofenaco de sódio, exatamente pesados, foram transferidos para um balão volumétrico de 50,0 mL e dissolvidos em 20 mL de diclorometano. O volume final foi completado com metanol. Uma alíquota de 2,5 mL desta solução foi retirado e dissolvido em 10 mL de diclorometano e o volume completado com metanol para 25,0 mL. A partir desta solução foram preparadas soluções nas concentrações de 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 e 20 µg/mL mantendo-se a mesma proporção diclorometano:metanol (1:2,5). Estas soluções foram analisadas por espectroscopia de absorção no ultravioleta a 284 nm. As soluções foram

preparadas em duplicata e a média das absorções referentes a cada concentração foi plotada em gráfico de concentração versus absorção. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados pela análise da regressão linear.

4.2.3.3.2. Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de DFS nas microesferas

A determinação da eficiência de encapsulação foi realizada conforme descrito em 4.1.2, utilizando como solvente uma mistura de diclorometano:metanol 1:1,5 em substituição ao metanol.

4.2.3.4. Análise das microesferas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A composição das micropartículas produzidas a partir de ABC ou da mistura de ABC e Pluronic F68 foi analisada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). A análise foi realizada num espectrofotômetro Shimadzu, modelo FTIR 8300. A região de coleta de dados foi $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Os espectros foram obtidos no modo de transmissão em pastilhas de KBr. Misturas físicas de ABC: Pluronic F68 nas proporções de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 foram utilizadas para construção da curva de calibração. Amostras das microesferas foram trituradas e misturadas a KBr para preparação das pastilhas. A composição das micropartículas foi estimada pela comparação da altura dos picos correspondentes a carbonila (C=O) em 1759, característica do ABC, e CH_2 em 2870, presente no polioxietileno, componente do Pluronic F68.

4.2.3.5. Análise das microesferas por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A composição das microesferas foi avaliada por calorimetria exploratória diferencial realizada em um equipamento Shimadzu DSC-50 com uma velocidade de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, $50 \text{ mL}/\text{min}$. Cerca de 4-10 mg de amostras foram utilizadas nos experimentos.

4.2.4. Avaliação dos Perfis de Liberação *in vitro* do Diclofenaco de Sódio a partir das Microesferas

Microesferas em quantidade correspondente a 75 mg de diclofenaco de sódio foram exatamente pesadas e transferidas para o interior de cápsulas de gelatina dura nº 00 incolor e submetidas ao ensaio de dissolução num equipamento Pharmatest de acordo com o método da pá (USP XXIII). As cápsulas foram colocadas em cubas contendo 750 mL de ácido clorídrico 0,1 M nas duas primeiras horas, seguido da adição de 250 mL de tampão fosfato pH 6,8 e 14 mL de hidróxido de sódio 5M nas 10 horas seguintes. O meio de liberação foi mantido a 37°C com agitação de 100 rpm. Alíquotas de 3 mL do meio de liberação foram retiradas no tempo zero e a cada 15 minutos com auxílio de uma bomba peristáltica, e analisadas por espectrofotometria no ultravioleta a 278 nm. O volume retirado era posteriormente devolvido para o meio. A partir destes resultados as curvas de liberação expressas em % de fármaco liberado versus tempo (min) foram plotadas.

As áreas sob as curvas correspondendo a 12 h de ensaio de dissolução foram calculadas empregando-se o método da regra linear trapezoidal.

4.3. AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DO DICLOFENACO DE SÓDIO

A formulação que apresentou o melhor perfil de liberação *in vitro* (formulação ab) foi selecionada para o estudo. O perfil farmacocinético do diclofenaco de sódio das microsferas (formulação teste) foi comparado com o perfil deste princípio ativo de uma formulação de referência (Voltaren SR75, drágea de liberação controlada). O estudo consistiu de um protocolo de duas sessões, separadas por um intervalo de pelo menos 14 dias entre os tratamentos. Para tal, 6 cães saudáveis da raça Beagle, com um ano de idade, pesando entre 10 e 12 kg foram selecionados ao acaso e mantidos com água potável e comida à vontade até o início da experimentação. Para adequar o modelo experimental ao estudo farmacocinético de formulações de liberação controlada (YAMADA, *et al*; 1995) os animais receberam, 30 min antes da administração da formulação em estudo, um comprimido de 2 mg de Loperamida (Imosec[®]), por via oral, seguido de 10 ml de

água potável. Em cada sessão experimental os cães receberam uma das formulações, em estudo cruzado, em dose única equivalente a 75 mg de diclofenaco, administrada por via oral, seguida de 20 ml de água potável.

As amostras de sangue (2 mL) foram coletadas da veia safena lateral, em tubos de vidro contendo EDTA imediatamente antes (tempo 0); e às 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 24,0; 48,0 horas após administração do diclofenaco. Estas foram centrifugadas a 4000 rpm (ca. 2000g) por 10 minutos e o plasma removido e estocado a -20°C até ser usado no ensaio.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC – CEUA (Certificado de Credenciamento do Protocolo de Pesquisa Nº 185, Anexo 1) com base nos princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

As concentrações plasmáticas de diclofenaco foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa, com detecção ultravioleta, a 280 nm (BAGBROUGH *et al.*, 1992 e MENDES *et al.*, 1994, com modificações).

4.3.1. Condições Cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada com um sistema para CLAE da marca Shimadzu Co., Japão, constituído de uma bomba (LC– 10 AS), detector UV (SPD–10 A) e integrador (Chromatopac C–R6A). As amostras foram injetadas manualmente através de uma válvula injetora Rheodyne, modelo 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, EUA) numa coluna analítica de fase-reversa, tipo C18 (Supelcosil 250 x 4,6 mm), precedida de guarda-coluna (20x2mm, Alltech).

A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila e ácido acético 0,1M/ 38:62. O pH foi ajustado para 5,6 com hidróxido de sódio 5M. A fase móvel, depois de desgaseificada por ultra-som e filtrada a vácuo em membrana de nylon com 0,45 μm de porosidade foi bombeada de modo isocrático, através da coluna cromatográfica, a um fluxo de 1,2 ml/min, em temperatura ambiente. Uma alíquota de 80 μl da amostra, obtida após a reconstituição do resíduo com 200 μl de acetonitrila pura, foi injetada no cromatógrafo líquido. Os picos foram analisados por

detecção ultravioleta a 280 nm, sendo a sensibilidade do detector ajustada em 0,005 AUFS.

4.3.2. Preparação dos Padrões

As soluções estoque dos padrões analíticos foram preparadas em metanol-água 50% (v/v). Todas as soluções foram mantidas a -20°C, até o momento da utilização, quando foram deixadas à temperatura ambiente (~22°C) para descongelar e entrar em equilíbrio, antes de serem utilizadas.

4.3.3. Preparo das Amostras

O preparo das amostras foi realizado em tubos de 15 ml, contendo 0,5mL de plasma livre de diclofenaco contaminado com quantidades conhecidas deste fármaco (curva de calibração) ou amostras de plasma do animal, 100 µl da solução 10 µg/ml de indometacina (padrão interno) e 200 µl de solução a 5% (v/v) de ácido ortofosfórico. Após a homogeneização da mistura as amostras foram tratadas com 4 ml de acetonitrila para precipitar as proteínas, na presença de 1g de Na₂SO₄ anidro, agitando-se vigorosamente em vórtice durante 1 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 4 000 rpm por 10 min, e o sobrenadante foi removido e evaporado em banho-maria a 37°C sob uma corrente suave de N₂. O resíduo foi reconstituído com 200 µl de acetonitrila, centrifugado a 14 000 rpm por 10 min e 80 µl foram injetados no cromatógrafo líquido.

4.3.4. Curva de Calibração

As soluções padrão utilizadas na construção da curva de calibração foram preparadas contaminando-se plasma livre de diclofenaco obtido do sangue de animais sadios com quantidades conhecidas deste fármaco (utilizando-se as soluções estoques dos padrões previamente preparadas em metanol 50%). As concentrações estabelecidas para a curva de calibração foram: 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 µg/ml. As soluções da curva de calibração e as amostras dos animais foram extraídas e analisadas pelo mesmo procedimento simultaneamente.

As concentrações de diclofenaco foram calculadas pela equação da curva (reta) de calibração obtida por regressão linear baseada nos métodos dos mínimos quadrados, considerando-se a razão entre a altura do pico do diclofenaco e a altura do pico do padrão interno (LAU *et al.*, 1987).

4.3.5. Análise Farmacocinética e Estatística

As curvas individuais de concentração plasmática de diclofenaco em função do tempo foram obtidas para cada animal, em cada fase do estudo. A concentração plasmática máxima observada (C_{max}) e o tempo necessário para atingí-la (t_{max}) foram obtidos a partir de cada curva.

A área sob cada curva individual de concentração do fármaco *versus* tempo de 0 a 24h ($AUC_{[0-24]}$) foi calculada usando-se o método trapezoidal. A extrapolação da $AUC_{[0-24]}$ ao infinito ($AUC_{[0-\infty]}$) foi obtida pela adição do valor C_{24} / k_e à $AUC_{[0-24]}$ calculada (onde C_{24} corresponde à concentração plasmática 24 horas após a administração do fármaco).

A constante de velocidade de eliminação terminal de primeira ordem (K_e) foi estimada pelo cálculo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, utilizando-se as concentrações que compõem a fase de decaimento terminal. O tempo de meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) foi derivado do K_e onde $t_{1/2} = \ln 2 / K_e$.

A análise estatística empregada para avaliar a biodisponibilidade das formulações baseia-se na metodologia sugerida por STEINIJANS *et al.* (1991). Assim, a biodisponibilidade das formulações de diclofenaco de sódio foi analisada através do cálculo das razões individuais da formulação Teste / formulação Referência (Microsféricas / Voltaren SR) para $AUC_{[0-24]}$, $AUC_{[0-\infty]}$, C_{max} , $t_{1/2}$, e K_e e das diferenças individuais para t_{max} , juntamente com as médias e os intervalos de confiança de 90% (I. C. 90%). A inclusão dos valores dos I. C. 90% para as razões percentuais dentro do intervalo de bioequivalência de 80 - 125% e a inclusão do valor "zero" dentro do I. C. 90% para as diferenças, foram as condições adotadas para aceitar-se a bioequivalência das formulações. Para tal, os parâmetros farmacocinéticos foram analisados empregando-se testes paramétricos (ANOVA para dados não transformados e transformados por logaritmo) e não paramétricos (teste de Wilcoxon de soma dos escores, de acordo com HAUSCHKE *et al.*, 1990),

com o auxílio do programa de computador “Bioequivalence Program for two-Period Crossover Studies”, versão 3.4, de Herman P. Wijnand.

4.3.6. Validação do Método

O intra-ensaio, realizado numa única bateria, foi idealizado para avaliar a repetibilidade do método analítico. A precisão expressa pelo coeficiente de variação (%), e a exatidão (%) foram calculadas. Para tal, 5 repetições de amostras de plasma contaminadas com 0,3; 3,0 e 6,0 $\mu\text{g/mL}$ de DFS foram processadas e analisadas como amostras desconhecidas. Para calcular a recuperação (%) do analito pelo processo de extração as respostas obtidas com as amostras acima foram comparadas com aquelas obtidas com a injeção de 5 repetições de soluções padrões de concentrações equivalentes de DFS, preparadas em metanol/água a 50% (sem extração) e injetadas diretamente no cromatógrafo.

A variabilidade e a linearidade das curvas de calibração, preparadas em cada ensaio, em dias sucessivos, foram calculadas para avaliar a variação do inter-ensaio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ESTUDOS PRELIMINARES DAS CONDIÇÕES DE PREPARAÇÃO DAS MICROESFERAS

O diclofenaco de sódio é um antiinflamatório não esteroidal utilizado no tratamento da artrite reumatóide crônica e aguda. Uma vez que sua meia-vida biológica ocorre 1-2 horas após administração oral, a manutenção da concentração deste fármaco dentro da faixa terapêutica em todo o período de 24 horas requer a administração de doses múltiplas do medicamento. Além disso, efeitos colaterais indesejáveis estão relacionados provavelmente às flutuações séricas deste fármaco. Neste sentido, a adesão do paciente ao tratamento dependeria não somente da simplificação do regime de administração, mas também da aceitação da própria medicação em termos de tolerabilidade. Diante disso, o desenvolvimento de preparações de liberação prolongada é desejável, uma vez que o fármaco seria liberado gradualmente a partir da forma farmacêutica, diminuindo não somente o número de doses diárias, mas igualmente as flutuações plasmáticas causadas pela liberação imediata de grande quantidade do fármaco. O desenvolvimento de novas formas de liberação, amplamente empregadas na farmacoterapêutica, tem-se constituído nos últimos anos, uma estratégia promissora para a melhoria do perfil biofarmacêutico de medicamentos.

Microcápsulas e microesferas têm sido desenvolvidas com esse objetivo, utilizando-se diferentes matrizes poliméricas (DEASY, 1984) e uma diversidade de metodologias. Assim, a estratégia empregada neste trabalho consistiu em encapsular o diclofenaco de sódio em microesferas preparadas a partir do acetobutirato de celulose. Este polímero é um éster de celulose disponível comercialmente em vários graus de viscosidade em função do seu peso molecular, que tem sido empregado por sua excelente propriedade de formação de filmes hidrofóbicos aplicáveis à microencapsulação de fármacos. Entretanto, a utilização de polímeros muito hidrofóbicos para a microencapsulação conduz à obtenção de perfis de liberação lentos, pois dificultam a entrada de água na matriz, dificultando a dissolução e posterior difusão do fármaco. Esta característica foi evidenciada por

ZANETTI (2001), na utilização de acetobutirato de celulose de diferentes pesos moleculares (PM 30000 e 70000) na preparação de microesferas de carbamazepina. Apesar de que a utilização de um polímero de menor peso molecular tenha conduzido ao ligeiro aumento da velocidade de liberação, decorrente da sua maior permeabilidade, ambos polímeros conduziram à obtenção perfis de liberação muito lentos do fármaco, inadequados à administração pela via oral.

O acetobutirato de celulose 70000 foi igualmente utilizado por MEDEIROS e LEMOS-SENNA (2001) na preparação de microesferas de liberação prolongada de diclofenaco de sódio. Neste estudo foi utilizado um delineamento fatorial 2^2 para avaliar a influência de dois fatores de formulação, concentração do polímero na fase interna (5% e 10%, p/v) e relação fármaco:polímero (1:8 e 1:4), sobre a eficiência de encapsulação e sobre o diâmetro médio das partículas. A eficiência de encapsulação do DFS aumentou com o aumento da concentração de polímero da fase interna e diminuiu com a alteração da relação fármaco:polímero de 1:8 para 1:4. Por outro lado o diâmetro médio das partículas foi alterado unicamente pela mudança da relação fármaco:polímero na formulação. Em estudos preliminares de dissolução estes autores obtiveram a liberação de unicamente 30% do fármaco após 12 horas de ensaio.

Uma das alternativas que têm sido propostas para contornar os problemas decorrentes da baixa velocidade de liberação de fármacos consiste na associação de polímeros para a obtenção de sistemas matriciais. Nas microesferas, a adição de um segundo polímero à formulação resulta em modificações estruturais e físico-químicas da matriz que conduzem a alterações nas características de tamanho, eficiência de encapsulação, velocidade de liberação e, conseqüentemente, nas propriedades biofarmacêuticas do medicamento (YEH *et al.*, 1995; YEH *et al.*, 1996; KHIRD *et al.*, 1998).

Neste trabalho, um polímero da classe dos poloxameros foi escolhido como adjuvante para modificar o perfil de liberação do diclofenaco de sódio a partir das microesferas de acetobutirato de celulose. Os poloxameros são copolímeros do polioxietileno e polioxipropileno, usados primariamente em formulações farmacêuticas como emulsificantes ou agentes solubilizantes. O polioxietileno é o segmento hidrofílico, enquanto o polioxipropileno é o segmento hidrofóbico da molécula. Todos os poloxameros têm composição química similar, diferindo apenas

na quantidade relativa de óxido de etileno e propileno e na sua massa molar, podendo ser empregados pela via oral, parenteral e tópica, por serem materiais atóxicos e não irritantes (WADE e WELLER, 1994). O Poloxamer 188 (Pluronic F68, BASF Co.), polímero mais hidrofílico desta classe, foi testado na preparação das microesferas, pois este poderia alterar afinidade da partícula pela água, aumentando a velocidade de liberação do diclofenaco de sódio.

A preparação das microesferas foi realizada pela técnica de emulsificação de um solvente orgânico volátil contendo o polímero e o fármaco em um solvente não volátil, seguido da evaporação do primeiro. O principal critério para a microencapsulação empregando a técnica de emulsão/evaporação reside na seleção dos solventes das fases interna e externa. Idealmente, o solvente da fase interna deve ser capaz de dissolver o polímero, entretanto, o fármaco pode se encontrar tanto dissolvido como disperso na forma de cristais. Segundo WATTS (1990), para a preparação de microesferas a partir de ésteres de celulose, a acetona tem sido amplamente empregada como fase interna, sendo esta emulsificada em vaselina líquida previamente saturada com o mesmo solvente. A saturação do solvente da fase externa impede a rápida difusão da acetona, evitando precipitações do polímero, além de favorecer a encapsulação do fármaco (KITAJEMA *et al.*, 1973). Neste caso, a emulsão formada pode ser classificada como sendo óleo em óleo (O/O) e é estabilizada pela adição de um tensoativo com baixo valor de EHL. Assim, o monooleato de sorbitano 1% p/v (SPAN 80, EHL = 4,3) foi empregado como agente estabilizante. O diclofenaco de sódio manteve-se solubilizado na fase interna, nas concentrações utilizadas.

Em um estudo preliminar, ABC puro e misturas de ABC e Pluronic F68 em diferentes proporções (9:1, 3:1, 1:1) foram testadas, mantendo-se em todos os casos a mesma concentração total de polímero na fase interna da emulsão e a mesma relação fármaco polímero (1:8). Igualmente, o volume de fase interna e fase externa, velocidade de agitação e temperatura foram mantidos constantes em todas as formulações testadas, para que não influenciassem nas características finais das microesferas. Este estudo foi realizado com intuito de verificar a viabilidade da adição de Pluronic F68 na preparação das microesferas, bem como o efeito da adição do mesmo sobre a velocidade de liberação do DFS. Assim, aquela

concentração que produzisse o melhor perfil de liberação seria escolhida para realização dos estudos de formulação posteriores.

Com exceção da formulação contendo ABC e Pluronic F68 na proporção de 1:1, as outras formulações testadas conduziram à formação de partículas esféricas de tamanho micrométrico. Quando a mistura ABC:Pluronic F68 (1:1) foi empregada, ocorreu a precipitação de uma massa polimérica, sendo este efeito relacionado à elevada concentração do polímero hidrofílico na preparação. Desta maneira, pode ser concluído que para a obtenção das partículas esféricas, o acetobutirato de celulose deve estar presente em maior quantidade. YEH e colaboradores (1996), utilizando blendas de PLAGA e poloxameros para preparação de microesferas contendo ovoalbumina, evidenciaram este mesmo fenômeno, para concentrações de PLAGA menores que 25%.

O teor de fármaco nas microesferas foi determinado conforme descrito em 4.2.3.3.2. A eficiência de encapsulação (%) foi calculada relacionando-se a quantidade de DFS encontrado nas microesferas com a quantidade inicialmente adicionada às formulações. Os valores obtidos de eficiência de encapsulação e teor de DFS podem ser visualizados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de eficiência de encapsulação (%) e teor de DFS (mg/100 mg) obtidos no estudo preliminar.

Formulação	Relação ABC:Pluronic	Eficiência de encapsulação (%)	Teor de DFS (mg/100mg)
1	1: 0	54,78	6,09
2	9: 1	72,09	8,00
3	3: 1	75,37	8,38
4	1:1	nd	nd

nd: não determinado

Em comparação com a formulação contendo unicamente ABC, a adição de Pluronic F68 na formulação provocou um aumento na eficiência de encapsulação e no teor de fármaco nas partículas. Provavelmente, a adição de Pluronic F68 tenha levado à formação de partículas mais hidrofílicas, aumentando assim a afinidade do diclofenaco de sódio pela matriz polimérica.

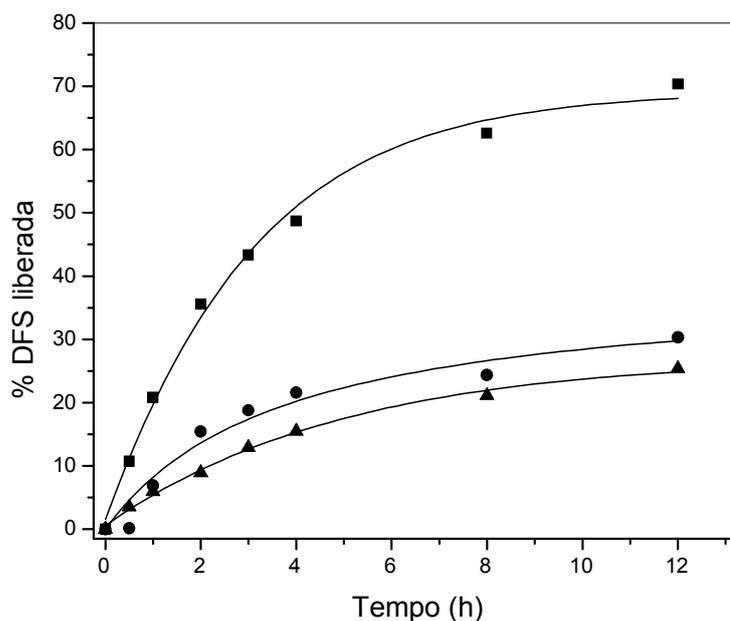


Figura 4. Perfis de liberação do DFS a partir das microesferas preparadas com proporção ABC: Pluronic F68: (■) 3:1, (●) 9: 1, (▲) 1: 0 em tampão fosfato pH 7,5.

Os resultados obtidos no estudo preliminar de liberação do DFS a partir das microesferas preparadas com blendas de ABC e Pluronic F68 em diferentes proporções podem ser visualizados na Figura 4. Nestes resultados pode ser observado que o emprego de Pluronic F68 conduz à liberação mais rápida do DFS, quando comparado com microesferas preparadas somente a partir de ABC. A diferença na velocidade de liberação proporcionada pela utilização de Pluronic F68 nas formulações pôde ser nitidamente visualizada com o aumento da quantidade do mesmo. Neste caso, enquanto as microesferas preparadas apenas com ABC conduziram à liberação de 25% do fármaco encapsulado após 12 horas de ensaio, as microesferas preparadas com relação ABC:Pluronic 9:1 e 3:1 conduziram à liberação de 30% e 70% do fármaco, respectivamente, no mesmo período.

Esses resultados fornecem bons indicativos do potencial que a adição de Pluronic F68 apresenta em alterar o perfil de liberação do DFS, contribuindo ainda para o aumento da quantidade de fármaco encapsulado. O ajuste da concentração de Pluronic F68 em matrizes de acetobutirato de celulose permitiria a modulação da velocidade de liberação do fármaco. Entretanto, sendo a formulação proposta destinada à administração oral, a utilização da proporção ABC:Pluronic F68 3:1

pareceu ser mais adequada para a continuidade deste trabalho, e foi adotada nos estudos de formulação.

5.2. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS DE FORMULAÇÃO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS MICROESFERAS E SOBRE A VELOCIDADE DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO DICLOFENACO DE SÓDIO

5.2.1. Preparação das Microesferas

Conforme observado no estudo preliminar, a adição de Pluronic F68 às formulações conduziu ao aumento na velocidade de liberação do fármaco. Entretanto, no intuito de avaliar estatisticamente o efeito que este parâmetro, assim como o efeito que a relação fármaco:polímero exercem sobre o teor de fármaco das microesferas e sobre a velocidade de liberação do DFS, um delineamento fatorial do tipo 2x2 foi realizado, totalizando 4 tratamentos. A quantidade inicial de fármaco tem sido considerada como um fator influente no perfil de liberação e por esta razão este segundo parâmetro de formulação foi escolhido na análise estatística (CHIAO e PRICE, 1994).

Desta maneira, a relação fármaco:polímero foi designada como sendo fator A e a adição de Pluronic F68 na fase interna da emulsão foi designada como sendo fator B. Os níveis inferiores e superiores foram 1:8 (-) e 1:4 (+) para o fator A e *sem adição* de Pluronic F68 (-) e *com adição* de Pluronic F68 (+) para o fator B, respectivamente. As microesferas foram preparadas nas condições descritas em 4.2.2.1. Visando a obtenção de quantidade suficiente de microesferas para a realização de todos os ensaios, a proporção dos componentes foi aumentada 5 vezes em relação às formulações do estudo preliminar. Para minimizar a influência das variações climáticas sobre o processo de formação das partículas e garantir a completa eliminação do solvente, a temperatura durante a preparação foi mantida em 37 °C.

5.2.2. Caracterização Química e Físico-Química das Microesferas

5.2.2.1. Avaliação da morfologia

A morfologia das microesferas pode ser visualizada nas micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstradas nas Figuras 5 e 6. A obtenção de partículas perfeitamente esféricas foi observada em todas as formulações testadas. Entretanto, diferenças foram encontradas nas características de superfície das partículas em função da relação fármaco:polímero utilizada e pela presença de Pluronic F68. Contrariamente à obtenção de partículas de superfície lisa e compacta observada nas microesferas preparadas sem a adição de Pluronic F68 e relação fármaco:polímero 1:8 (Figura 5a), a presença de cristais, provavelmente de diclofenaco de sódio, foi visualizada com o aumento da quantidade de fármaco adicionada à formulação (Figura 5b).

O processo de remoção do solvente volátil envolve a difusão, a partir da fase interna para a externa, seguida da sua evaporação na interface líquido-ar. A velocidade de eliminação do solvente não é constante durante o procedimento de evaporação. À medida que é eliminado, as gotículas da emulsão tornam-se mais viscosas com o aumento da concentração de polímero, levando à formação do estado gel e a concomitante redução da velocidade de extração do solvente (LI *et al.*, 1995; BAHL *et al.*, 2000). A velocidade com que ocorre a eliminação do solvente afeta significativamente as características de superfície das partículas, tais como rugosidade e a porosidade (RADWAN *et al.*, 1995). Este efeito foi observado por ZANETTI (2001) na preparação de microesferas de ABC de diferentes pesos moleculares. A utilização de acetobutirato de celulose de menor peso molecular conduziu à obtenção de soluções menos viscosas que proporcionaram a mais rápida eliminação do solvente e, conseqüentemente, a obtenção de partículas mais rugosas.

A maior rugosidade decorrente da diminuição da viscosidade da fase interna da emulsão também parece ter sido observada nas formulações de microesferas contendo Pluronic F68. A adição deste polímero conduziu à formação de partículas com superfície mais rugosa (Figura 6), quando comparado com a superfície das microesferas contendo unicamente ABC (Figura 7). Além disso, uma

pequena porosidade na superfície pode ser visualizada nas microesferas preparadas com relação fármaco:polímero 1:8 (Figura 6a). Nas microesferas preparadas com uma relação fármaco:polímero 1:4, a superfície parece ser bastante rugosa, mas a presença de poros não foi observada (Figura 6b).

Após visualização das microesferas seccionadas transversalmente não foi observada a presença de cristais de diclofenaco de sódio no interior das partículas (Figura 7). Este resultado está provavelmente relacionado à obtenção de soluções de DFS, nas quais foram empregadas como fase interna da emulsão. Assim, o fármaco parece estar dissolvido na sua forma molecular, nas matrizes obtidas tanto na ausência como na presença de Pluronic F68 e em ambas quantidades de fármaco inicialmente adicionadas às formulações.

Por outro lado as micrografias das microesferas demonstraram a obtenção de matrizes apresentando uma aparente maior porosidade e homogeneidade quando unicamente o ABC é empregado na preparação (Figura 7b). Para avaliar a miscibilidade dos dois polímeros e o efeito desta característica sobre a estrutura da matriz, filmes de ABC puro (Figura 8I) e a partir de uma mistura de ABC e Pluronic F68 na proporção de 3:1 (Figura 8II) foram preparados e visualizados por MEV. Na micrografia obtida a partir do corte transversal do filme preparado na ausência de Pluronic F68 (Figura 8Ib) observa-se uma camada compacta apresentando poros menores, enquanto que a micrografia obtida a partir do corte transversal do filme preparado a partir da mistura de ABC e Pluronic F68 pode-se visualizar a presença de duas camadas distintas de polímeros, uma superior mais fina e compacta e uma inferior apresentando poros maiores com provavelmente maior permeabilidade (Figura 8IIb). Esta estrutura de bicamada parece estar reproduzida nas partículas, conforme visualizado na micrografia obtida a partir da microesfera seccionada transversalmente. Nesta micrografia observa-se a presença de uma camada externa compacta, provavelmente de acetobutirato de celulose, e de um núcleo interno poroso, sugerindo a formação de uma estrutura mista de microcápsula e microesfera (Figura 7a). A presença destas duas diferentes camadas de polímeros sugere a maior liberação do DFS a partir das microesferas. Desta maneira, a porosidade observada nas partículas seccionadas transversalmente talvez não seja o único fator que definirá o perfil de liberação do fármaco.

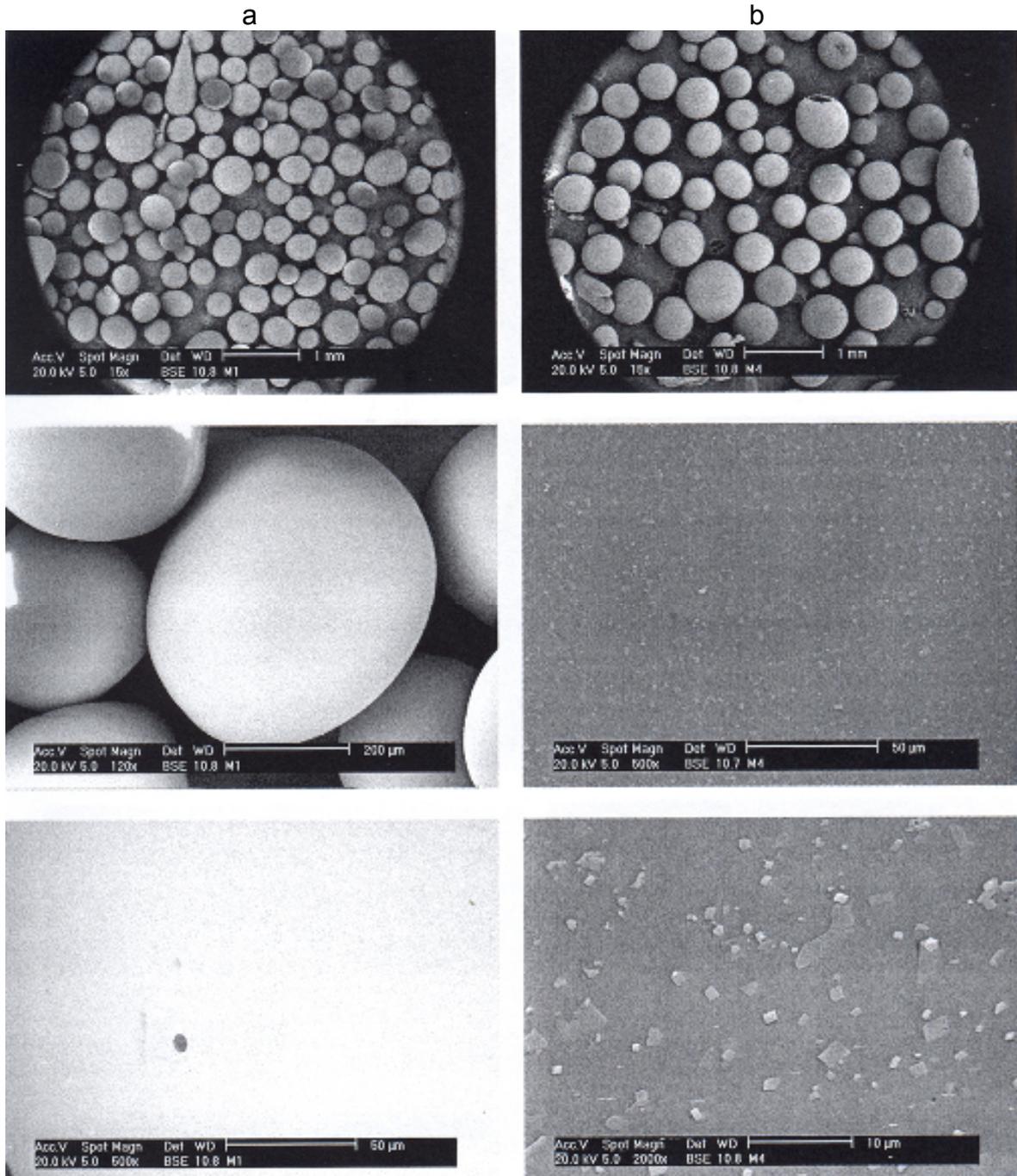


Figura 5. Micrografias obtidas por MEV das microesferas de acetobutirato de celulose preparadas sem a adição de Pluronic F68: (a) relação fármaco: polímero 1:8 e (b) relação fármaco: polímero 1:4.

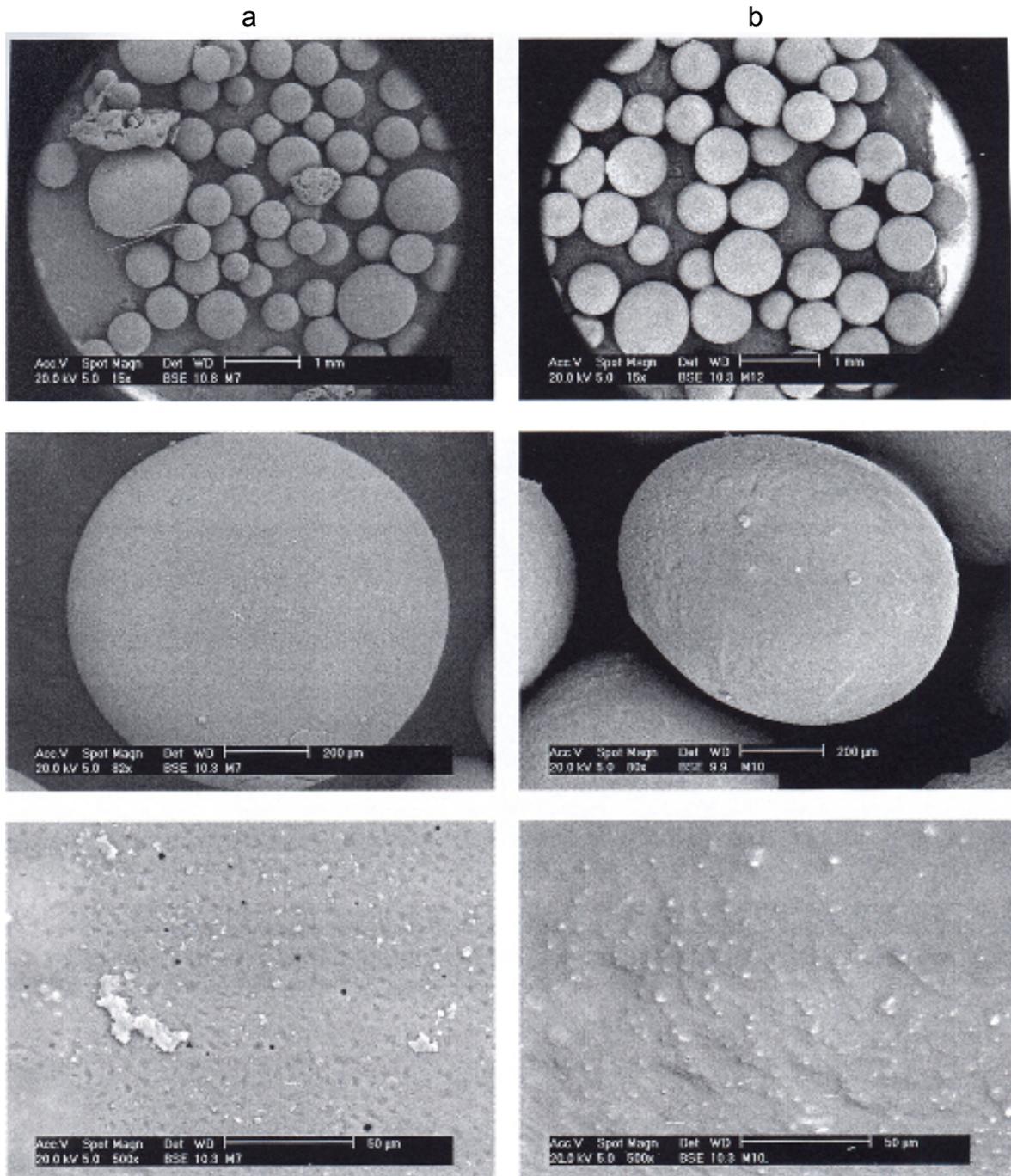


Figura 6. Micrografias obtidas por MEV das microesferas de acetobutirato de celulose preparadas sem a adição de Pluronic F68: (a) relação fármaco: polímero 1:8 e (b) relação fármaco: polímero 1:4.

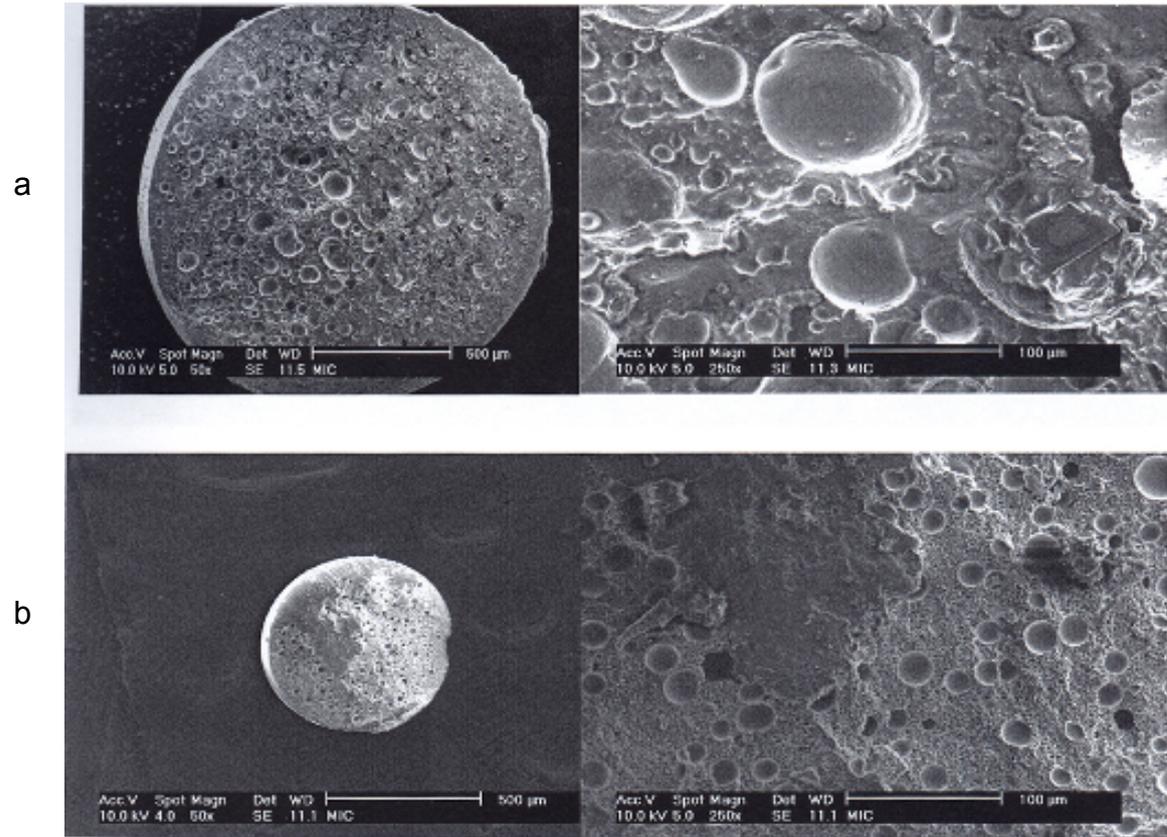


Figura 7. Micrografias obtidas por MEV das microesferas seccionadas, preparadas: (a) com a adição de Pluronic F68 e relação fármaco: polímero 1:4. e (b) sem a adição de Pluronic F68 e com relação fármaco polímero 1:8.

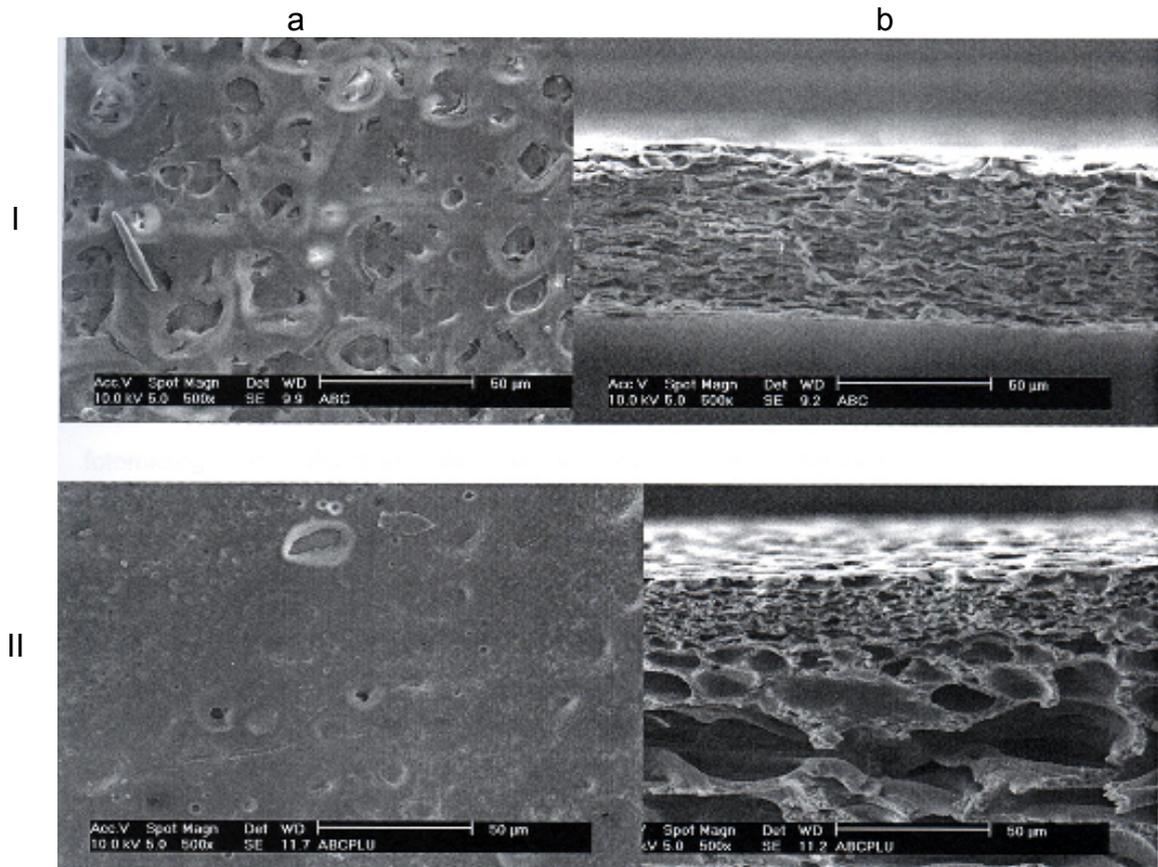


Figura 8. Micrografias obtidas por MEV de filmes preparados com: (I) ABC puro e (II) mistura de ABC e Pluronic F68 na proporção de 3:1; (a) superfície do filme e (b) corte transversal.

5.2.2.2. Determinação do diâmetro médio e da distribuição granulométrica

Diversas técnicas de análise podem ser empregadas na determinação do diâmetro médio e da distribuição granulométrica de microesferas, destacando-se, entre elas, a tamisação, a medição em contadores eletrônicos do tipo Coulter e a microscopia ótica ou eletrônica. Dada a grande diferença entre os fundamentos de cada uma destas técnicas, o critério da seleção daquela mais apropriada deve residir nos parâmetros de intervalo de tamanho de partícula na qual é aplicável e na quantidade de amostras disponíveis para análise (VILA JATO, 1997). Tendo em vista a obtenção de partículas de centenas de micrômetros e a pequena quantidade produzida por lote, o diâmetro médio e a distribuição granulométrica foram determinados após medição das partículas visualizadas nas micrografias obtidas por MEV, empregando-se para medida o diâmetro de Ferret.

Os valores de diâmetro médio das partículas, obtidos para cada um dos lotes de microesferas, encontram-se demonstrados na Tabela 7. A distribuição granulométrica das mesmas expressa como frequência (%) pode ser observada na Figura 9. Segundo os resultados obtidos, os valores de diâmetro médio variaram de 467,7 a 1016,5 μm , em função das condições de preparação empregadas.

Tabela 7. Valores obtidos na determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica das partículas.

Formulação (Fator A/Fator B)	Diâmetro médio das partículas (μm)	$M \pm \sigma$ (n=3)
1 (-/-)	657,4	843,7 \pm 165,3
	900,8	
	972,96	
2 (-/+)	624,1	761,5 \pm 179,9
	695,25	
	965,17	
3 (+/-)	567,70	720,5 \pm 167,6
	693,86	
	899,8	
4 (+/+)	1016,5	722,4 \pm 277,4
	465,5	
	685,2	

Fator A: (-) relação fármaco polímero 1:8; (+) relação fármaco polímero 1:4.
Fator B: (-) sem adição de Pluronic F68; (+) com adição de Pluronic F68.

A obtenção de partículas a partir de ésteres de celulose, apresentando algumas centenas de micrômetros está de acordo com resultados encontrados na literatura, quando a acetona e a vaselina líquida são empregadas como fase interna e externa, respectivamente. A obtenção de partículas com esta magnitude de tamanho tem sido relacionada à resistência oferecida pela elevada viscosidade da vaselina líquida à ruptura da solução acetônica em pequenas gotículas na dispersão (CHIAO e PRICE, 1994; BHARDWAJ *et al.*, 1995, SILVA e FERREIRA, 1999, ZANETTI, 2001). Adicionalmente, o diâmetro médio das partículas depende da massa molar do polímero. Ésteres de celulose apresentando maior massa molar tem conduzido à obtenção de soluções acetônicas de maior viscosidade e, conseqüentemente, à obtenção de partículas de maior tamanho (ZANETTI, 2001).

Além disso, pode ser verificada na Tabela 7 uma variação importante no diâmetro médio das partículas preparadas nas mesmas condições. Este resultado fornece indicativos de que outros fatores relacionados à técnica de preparação afetam as características finais das microesferas. Entre eles, a velocidade de adição da fase interna na fase externa para a formação da emulsão, dificilmente controlada

em escala laboratorial, pode ter contribuído para a obtenção das variações observadas.

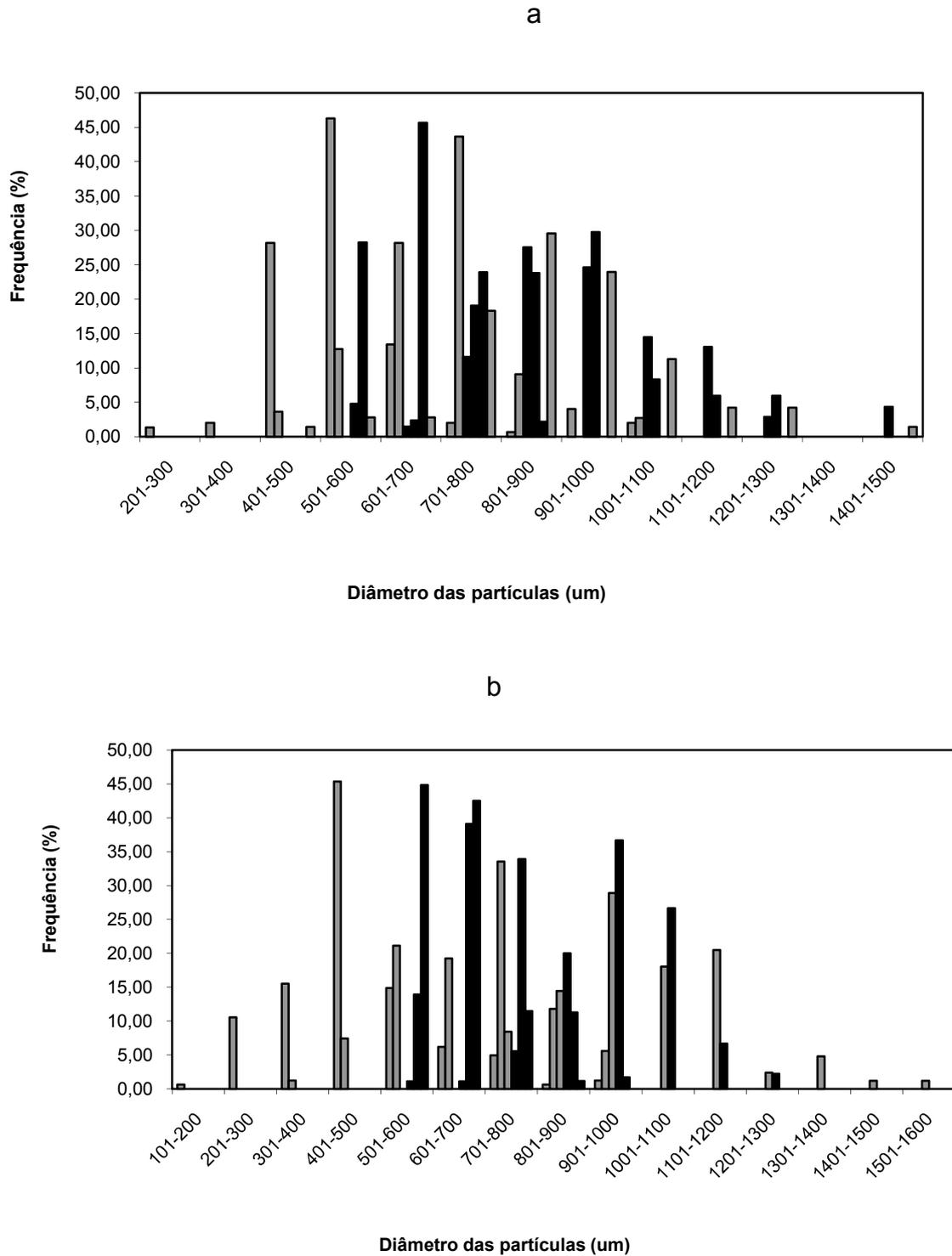


Figura 9. Distribuição granulométrica das microesferas. (a) Relação fármaco: polímero 1:8 e (b) Relação fármaco: polímero 1:4. ■ sem adição de Pluronic F68 ■ com adição de Pluronic F68.

5.2.2.3. Determinação da eficiência de encapsulação (%) e do teor de diclofenaco de sódio (mg/100mg) nas microesferas

A eficiência de encapsulação e o teor de DFS nas formulações estudadas foram determinados conforme descrito em 4.2.3.3.2. O uso de uma mistura de metanol e diclorometano neste doseamento, em detrimento ao metanol puro que foi utilizado no estudo preliminar, foi preferido para proporcionar a completa dissolução das microesferas, evitando o processo de extração prévio do fármaco. A interferência dos polímeros no doseamento do diclofenaco de sódio, no comprimento de onda utilizado, não foi verificada como pode ser observado na Figura 10.

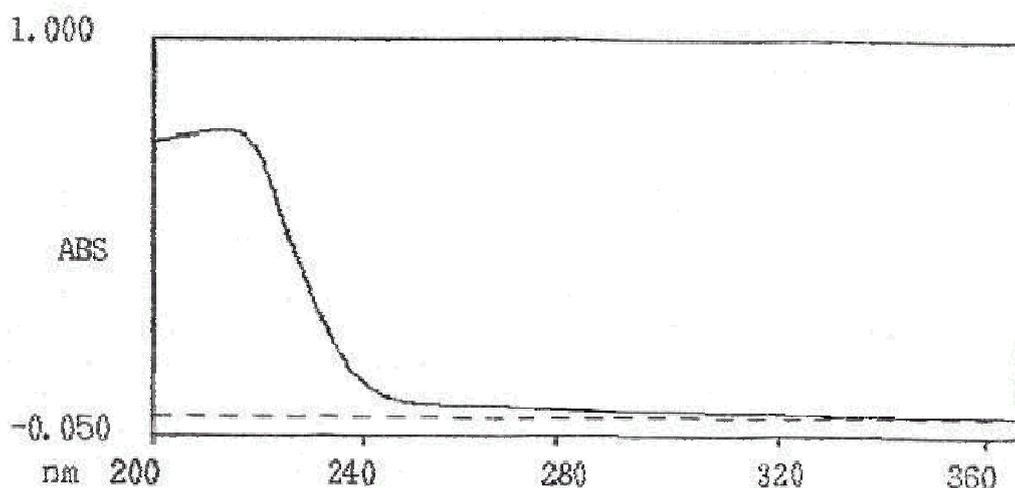


Figura 10. Espectro de varredura de uma solução de ABC:Pluronic F68 (3:1) em diclorometano:metanol (1:1).

Para elaboração da curva de calibração foram utilizadas soluções de DFS em concentrações de 5 a 20 $\mu\text{g/mL}$. A curva de calibração, bem como a equação da reta obtida pela regressão linear e o coeficiente de correlação podem ser visualizados na Figura 11. Na faixa de concentração testada foi demonstrada a linearidade da metodologia utilizada.

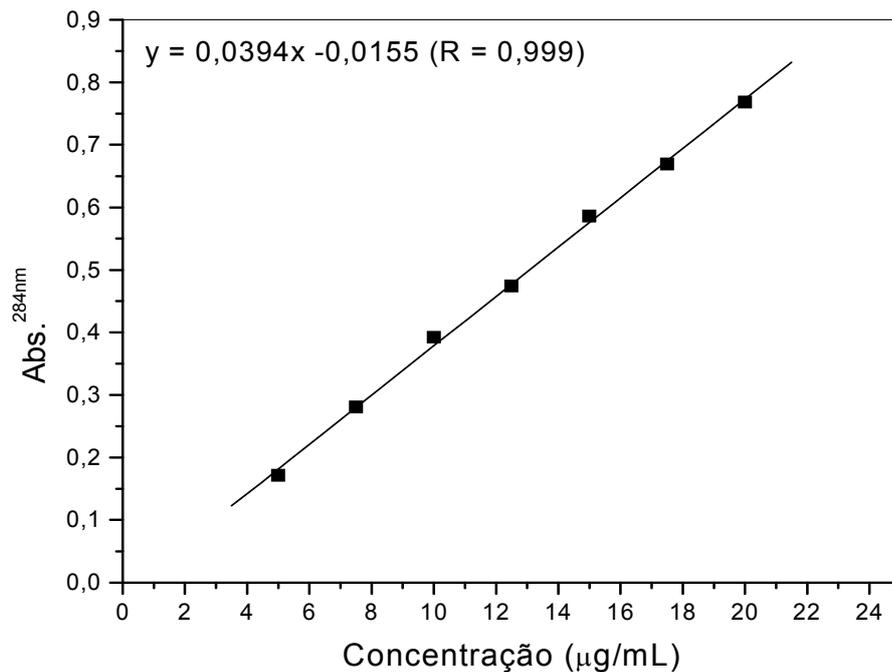


Figura 11. Curva de calibração do DFS em diclorometano:metanol (1: 2,5).

Quando a técnica de emulsão/evaporação do solvente é empregada, vários outros fatores tais como volume da fase interna, tipo e concentração de estabilizante (JANI e GOHEL, 1997), velocidade de remoção do solvente e temperatura (YANG et al., 2000), podem interferir na eficiência de encapsulação e no teor de fármaco das microesferas. Todos estes parâmetros de formulação foram mantidos constantes para permitir a avaliação do efeito da adição de Pluronic F68 e da relação fármaco:polímero sobre a encapsulação do DFS. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 8. Como pode ser verificado nesta tabela, a eficiência de encapsulação e o teor de fármaco nas formulações variaram entre 40% e 70% e 4,5 e 13,0 mg/100 mg, respectivamente.

Tabela 8. Valores de eficiência de encapsulação (%) e teor de diclofenaco de sódio (mg/100 mg) nas microesferas.

Formulação (Fator A/FatorB)	Eficiência de encapsulação (%)	Teor de DFS (mg/100mg)
1 (-/-)	40,60	4,51
	46,16	5,13
	45,77	5,08
2 (-/+)	46,62	9,32
	43,41	8,68
	50,61	10,12
3 (+/-)	70,27	7,80
	67,61	7,51
	67,83	7,53
4 (+/+)	66,72	13,34
	65,87	13,17
	65,38	13,07

Fator A: (-) relação fármaco polímero 1:8; (+) relação fármaco polímero 1:4.
 Fator B: (-) sem adição de Pluronic F68; (+) com adição de Pluronic F68.

A análise da variância foi realizada para avaliar o efeito dos fatores estudados sobre o teor de DFS. Os resultados estão demonstrados na Tabela 9. Como pode ser observado, o valor de F é significativo para ambos os fatores (A e B) e para a interação entre eles (AB), quando comparado com o valor de F tabelado de 4,07, para um nível de significância de 5%. Neste caso, portanto, a mudança da relação fármaco:polímero de 1:8 para 1:4 alterou significativamente o teor de fármaco encapsulado, aumentando-o. Esta característica foi também significativamente aumentada pela adição de Pluronic F68 na formulação.

Tabela 9. Análise de variância realizada no estudo da influência dos fatores de formulação sobre o teor de fármaco.

Causas de Variação	Soma dos Quadrados	GL	Média dos Quadrados	Teste F
A	31,95	1	31,95	187,94*
B	75,71	1	75,71	445,35*
A x B	0,92	1	0,92	5,41*
Tratamento	108,58	3	36,19	212,88
Residual	1,36	8	0,17	
Total	109,94	11		

A = relação fármaco:polímero na formulação (1:8 ou 1:4); B = Adição de Pluronic F68 (sem ou com adição); A x B = interação entre os fatores; GL = graus de liberdade; F = F calculado; $F_{\text{tab}} = 4,07$ ($\alpha = 0,05$).

O aumento observado no teor de DFS das microesferas, com o aumento da quantidade inicial de fármaco e com a adição de Pluronic F68, pode ser atribuído ao fenômeno de partição do mesmo entre ambas as fases da emulsão. No segundo caso, a adição de um polímero hidrofílico aumentou a afinidade do DFS pela fase interna, aumentando a sua concentração em favor da mesma. A influência da adição de um segundo polímero nas formulações sobre o teor de fármaco tem sido relatada na literatura. YEH e colaboradores (1996) obtiveram um aumento significativo na quantidade de ovoalbumina encapsulada nas microesferas de PLAGA, com o acréscimo de Pluronic F127 nas formulações. Por outro lado, o decréscimo do teor de carbamazepina, substância de elevada hidrofobicidade, foi observado nas formulações preparadas a partir de misturas de acetobutirato de celulose e polietilenoglicol, quando comparado com os valores encontrados para as microesferas preparadas unicamente com ABC (ZANETTI *et al.*, 2002). Assim, os resultados observados para o diclofenaco de sódio reforçam a proposição do efeito provocado pela adição de um segundo polímero sobre as características de encapsulação de substâncias, estando este relacionado com a natureza química de ambos, polímero e fármaco.

5.2.2.4. Análise das microesferas por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise por espectroscopia de absorção no infra-vermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada com intuito de avaliar a composição das microesferas e a quantidade de Pluronic F68 remanescente nas mesmas, comparando com a quantidade utilizada para preparação das partículas. A realização deste experimento auxiliaria na elucidação dos mecanismos envolvidos na liberação do DFS a partir das microesferas. Assim, para a construção de uma curva de calibração, misturas físicas de diferentes proporções de ABC:Pluronic F68 foram preparadas e analisadas por FTIR. As relações entre as intensidades das bandas características do grupamento carbonila do ABC em 1754 cm^{-1} e do grupamento CH_2 em 2870 cm^{-1} , presente em ambos polímeros, foram determinadas e plotadas contra a proporção ABC:Pluronic F68 presente nas misturas. A curva de calibração obtida encontra-se demonstrada na Figura 12. Como pode ser observado nesta figura, os valores obtidos para curva de calibração ajustam-se a uma exponencial de primeira-ordem.

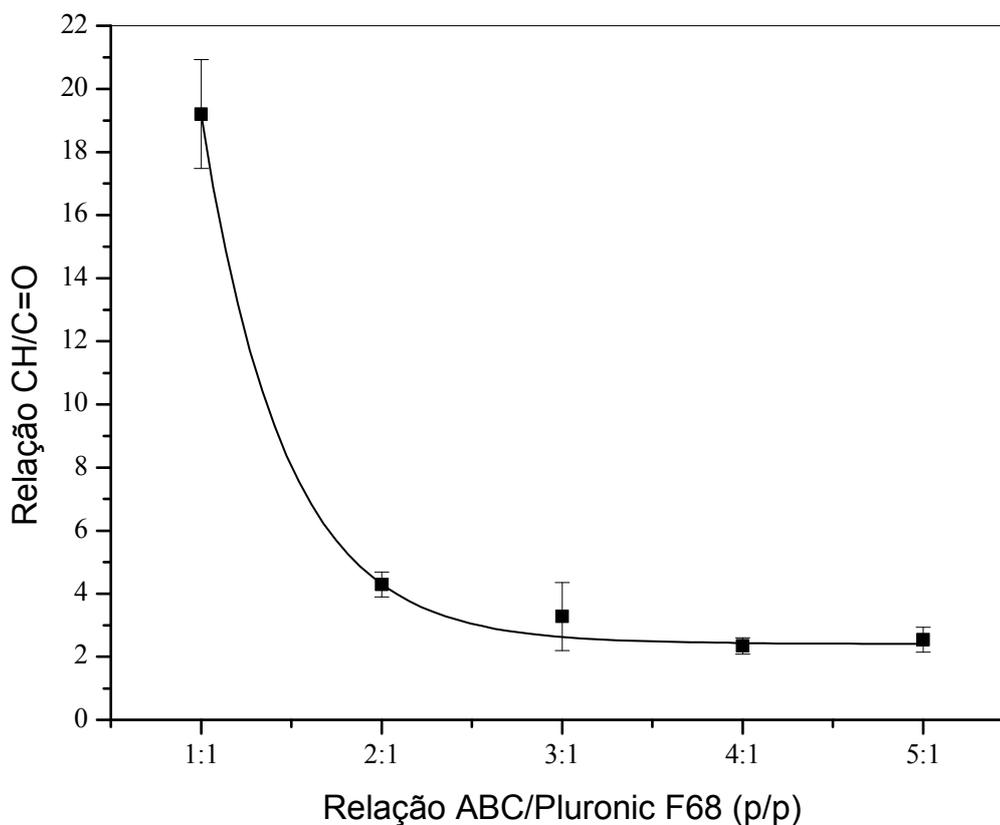


Figura 12. Relação entre a quantidade de ABC e Pluronic F68 *versus* a relação entre as intensidades das bandas CH e C=O nas misturas físicas de ABC e Pluronic F68.

Os espectros de FTIR obtidos para as microesferas na ausência de fármaco são demonstrados na Figura 13. Nesta figura pode ser visualizada a presença das bandas referentes aos grupamentos carbonila do acetobutirato de celulose e do grupamento CH_2 presente nos dois polímeros. A banda característica do grupamento carbonila não parece ser afetada pela presença de Pluronic F68, sugerindo a ausência de interação entre os polímeros da mistura (Figura 13B).

O diclofenaco de sódio apresenta uma banda característica do grupamento carbonila em 1600 cm^{-1} . Entretanto, para que o fármaco não influenciasse na determinação da quantidade de Pluronic F68, somente as microesferas brancas foram empregadas na análise. Os valores da relação da intensidade das bandas CH/C=O obtidos nas microesferas estão demonstrados na Tabela 10.

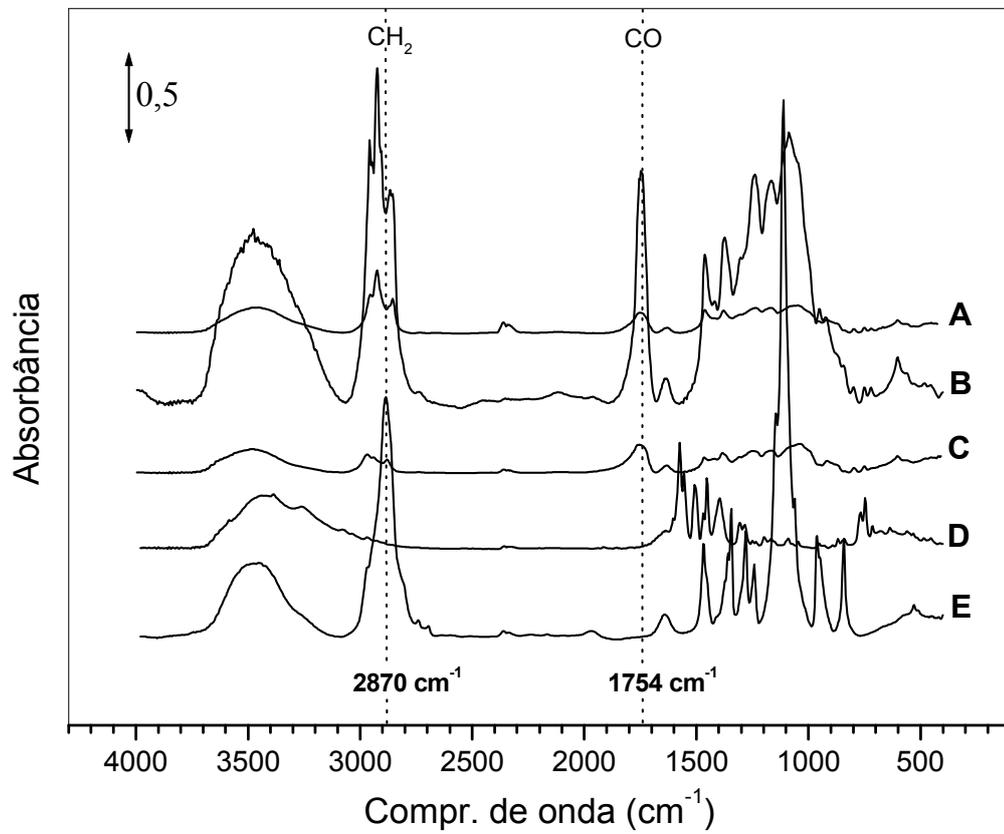


Figura 13. Espectros de infravermelho com transformada de Fourier de: (A) Microesferas brancas de ABC; (B) Microesferas de ABC com adição de Pluronic F68; (C) ABC puro; (D) DFS puro; (E) Pluronic F68 puro.

Tabela 10. Valores das intensidades das bandas de CH₂ e C=O e da relação entre as intensidades de CH e C=O, obtidas nos espectros de FTIR.

	Amostras	C-H	C=O	CH/CO
1	ABC puro	10,74	15,30	0,70
2	MIC _{ABC}	30,15	9,80	3,08
3	MIC _{ABC}	53,54	16,88	3,17
4	MIC _{ABC-PLU}	200,64	78,63	2,55
5	MIC _{ABC-PLU}	289,79	135,56	2,14

MIC_{ABC}: Microesferas preparadas unicamente com acetobutirato de celulose; MIC_{ABC-PLU}: microesferas preparadas com a mistura acetobutirato de celulose e Pluronic 3:1.

Como demonstrado na Tabela 10, quando a relação entre as intensidades das bandas CH e CO obtidas com ABC puro (amostra 1) e com microesferas brancas de ABC (amostras 2 e 3) são comparados, observa-se um aumento considerável neste valor. Visto que o único componente da preparação é o acetobutirato de celulose, este resultado fornece indicativos de que alguma outra substância está presente nas microesferas. O aumento no valor da relação CH/CO está relacionado ao aumento da proporção de grupamentos C-H na mistura e não de carbonila, o que descartaria a presença de resíduos de acetona nas partículas. Entretanto não pode ser excluída a possibilidade da presença de resíduos de vaselina líquida, usada como fase externa, ou do n-hexano, empregado na lavagem das microesferas. Além disso, a formação de depressões, provavelmente produzidas pela presença de um líquido, conforme observado nas micrografias das microesferas de ABC seccionadas (Figura 7), poderia estar associada à penetração de vaselina no interior das gotículas da fase interna e/ou das partículas.

Quando as microesferas preparadas com a mistura de ABC e Pluronic F68 foram analisadas, a obtenção de valores menores para a relação das intensidades entre as duas bandas CH e CO pode estar relacionada com um fenômeno de repulsão da vaselina proporcionada pela presença de um polímero hidrofílico. Por outro lado, quando a relação entre as intensidades das bandas CH e CO obtidas nas microesferas preparadas na presença de Pluronic F68 são comparadas com aquela obtida para o ABC puro, observa-se um aumento neste valor sugerindo a presença do mesmo nas partículas. Entretanto, não foi possível quantificar o teor de Pluronic 68 nas microesferas por FTIR.

5.2.2.5. Análise das microesferas por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC) permite caracterizar o estado físico do polímero e do fármaco antes e após a preparação das microesferas, identificar a presença de polimorfos e verificar a possível interação entre os componentes. Neste estudo, o DSC foi utilizado como técnica alternativa para verificar a composição das microesferas, principalmente no que diz respeito à presença ou ausência de Pluronic F68 nas partículas. Os termogramas obtidos por DSC a partir das microesferas brancas e contendo diclofenaco de sódio, encontram-se demonstrados nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

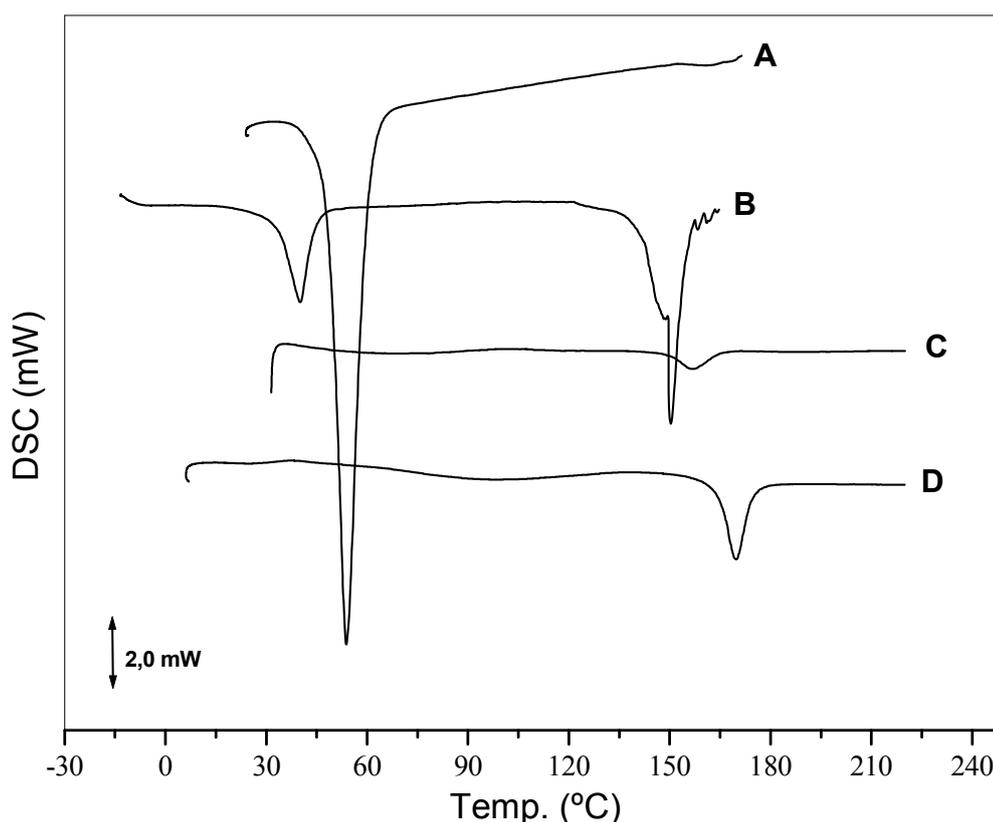


Figura 14. Termogramas de DSC obtidos para as amostras: (A) Pluronic F68 puro; (B) Microesferas de ABC com adição de Pluronic F68; (C) Microesferas brancas de ABC; (D) ABC puro.

Conforme demonstrado na Figura 14D, o ABC puro apresentou ponto de fusão em 170 °C. A diminuição do ponto de fusão deste polímero para 157 °C (Figura 14C) foi observada nas microesferas, podendo esta variação estar relacionada com a mudança na forma cristalina do ABC em virtude da técnica de microencapsulação empregada.

O Pluronic F68 apresenta, segundo a literatura uma endoterma de fusão a 52 °C (WADE e WELLER, 1994), que pode ser também verificada no termograma obtido para este polímero (Figura 14A). Quando as microesferas preparadas com a adição de Pluronic F68 na fase interna da emulsão foram analisadas, a endoterma de fusão deste polímero apareceu deslocada para 40 °C, e o pico correspondente à fusão do ABC apareceu deslocado para 147 °C. O aparecimento do pico correspondente ao Pluronic F68 indica a presença deste polímero nas partículas, sendo que os deslocamentos observados, para ambos polímeros, sugerem influência de um componente em relação ao outro na mistura, afetando a forma cristalina dos mesmos. Adicionalmente, a presença de Pluronic F68 provavelmente afeta a estabilidade do ABC, conforme observado na Figura 14B, onde a degradação começa a ocorrer em aproximadamente 160 °C.

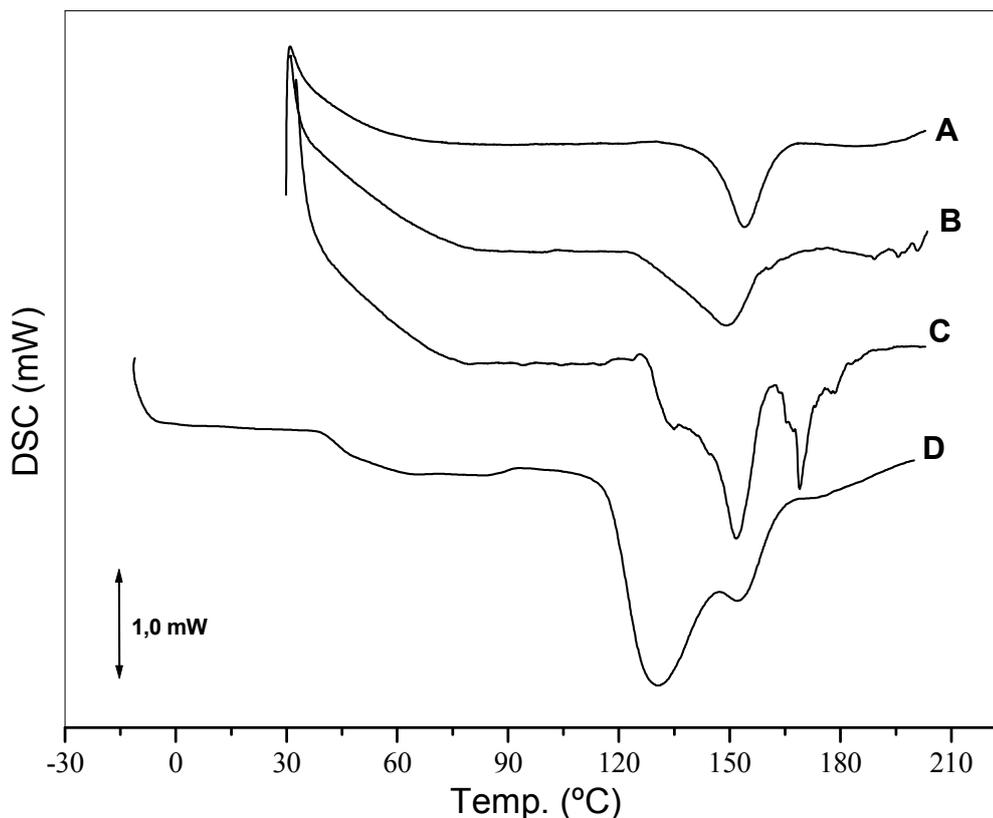


Figura 15. Termogramas de DSC obtidos para as amostras: (A) Microesferas de ABC contendo DFS na proporção 1:4; (B) Microesferas de ABC contendo DFS na proporção 1:8; (C) Microesferas de ABC com adição de Pluronic F68 contendo DFS na proporção 1:8; (D) Microesferas de ABC com adição de Pluronic F68 contendo DFS na proporção 1:4.

Conforme descrito na literatura (McEVOY, 2000) e confirmado nestas análises (termograma não mostrado) o DFS apresenta ponto de fusão em 288 °C. Uma vez que o acetobutirato de celulose sofre fusão seguida de degradação, a presença de DFS nas microesferas não pôde ser detectada por esta técnica. Por outro lado, o acréscimo de DFS às formulações (Figura 15) parece afetar ainda mais a forma cristalina do ABC, primeiramente produzida pela presença de Pluronic F68, conforme pode ser observado na Figura 15D. Nesta figura, é possível observar a presença de duas diferentes formas cristalinas do ABC, entretanto, o pico correspondente à fusão do Pluronic F68 não é visualizado, indicando que este polímero provavelmente encontra-se na forma amorfa nas microesferas A amorfização do Pluronic F68 nas microesferas pode estar relacionada à existência

de uma interação entre o fármaco e este polímero.

5.2.3. Avaliação dos perfis de liberação *in vitro* do diclofenaco de sódio a partir das microesferas

A determinação da velocidade de dissolução de fármacos apresenta várias aplicações. Os resultados obtidos podem ser empregados com objetivo de: controlar a qualidade do produto manufaturado assegurando a constância do perfil de liberação; elucidar a estrutura do sistema bem como os mecanismos envolvidos na liberação; ou ainda prever a conduta deste sistema *in vivo*.

A liberação de um fármaco a partir de uma microesfera consiste na combinação de várias etapas de transferência do mesmo entre os diferentes sítios da partícula. O fármaco se desloca através da microesfera por meio de um fenômeno de difusão pelos poros ou por entre as cadeias poliméricas alcançando a superfície até atravessar a camada interfacial em direção a fase contínua. Se disperso na matriz polimérica na forma de cristais, necessita ser previamente dissolvido, sendo a capacidade de hidratação da partícula importante nestas situações. Conseqüentemente, a velocidade determinada experimentalmente é o resultado do conjunto destes processos, embora apenas um seja considerado o limitante, dominando a cinética de liberação. O mecanismo de liberação do fármaco torna-se mais complexo quando a degradação da microesfera ocorre concomitante com o fenômeno de difusão (WASHINGTON, 1996).

O teste de dissolução das formulações desenvolvidas foi realizado conforme descrito em 4.2.2.5. Nestes ensaios, foi utilizado como meio de dissolução, uma solução de ácido clorídrico 0,1M para as primeiras 2h de ensaio, seguida da adição de uma solução tampão fosfato pH 6,8 e de hidróxido de sódio 5M para as 10h seguintes, conforme descrito pela USP XXIII. A escolha deste meio de dissolução com alteração de pH durante o ensaio foi realizada tendo em vista a variação do pH dos fluídos ao longo do trato gastrintestinal, uma vez que as microesferas são destinadas à administração oral. Nestas condições, o efeito da adição do Pluronic F68 e da relação fármaco:polímero sobre a velocidade de liberação do diclofenaco de sódio foram avaliados. Os resultados obtidos no teste de dissolução, expressos em percentagem de fármaco liberado *versus* tempo (minutos),

são demonstrados na Figura 16.

Nos perfis de dissolução obtidos pode ser observada a baixa liberação do DFS nas primeiras duas horas de ensaio. Em meio ácido cerca de 5 a 30% do DFS contido nas partículas é liberado em função da formulação testada, sendo que as microesferas preparadas na presença de Pluronic F68 aparentemente conduziram a uma maior liberação do fármaco. Esta característica tem sido associada à baixa solubilidade do DFS em meio ácido (< 1 mg/mL). Em estudos anteriores, a liberação deste fármaco a partir de microesferas de alginato demonstrou ser desprezível em ácido clorídrico 0,1M (HOSNY *et al.*, 1997, 1998). Assim sendo, a maior quantidade de fármaco liberada, conforme observado na Figura 16, pode estar relacionada ao efeito solubilizante proporcionado pela presença de Pluronic F68 na preparação. Finalmente, o aumento do pH do meio de dissolução conduziu ao aumento da velocidade de liberação, uma vez que o DFS é altamente solúvel em pH alcalino.

Uma análise da variância foi realizada para avaliar a influência da relação fármaco:polímero e da adição de Pluronic F68 na liberação do DFS a partir das microesferas, usando como variável dependente a área sob a curva obtida nos perfis de dissolução do fármaco em tampão fosfato pH 6,8. Os valores de área sob a curva, estimados pelo método trapezoidal, e os valores de F, obtidos na análise da variância, estão demonstrados nas Tabelas 11 e 12, respectivamente.

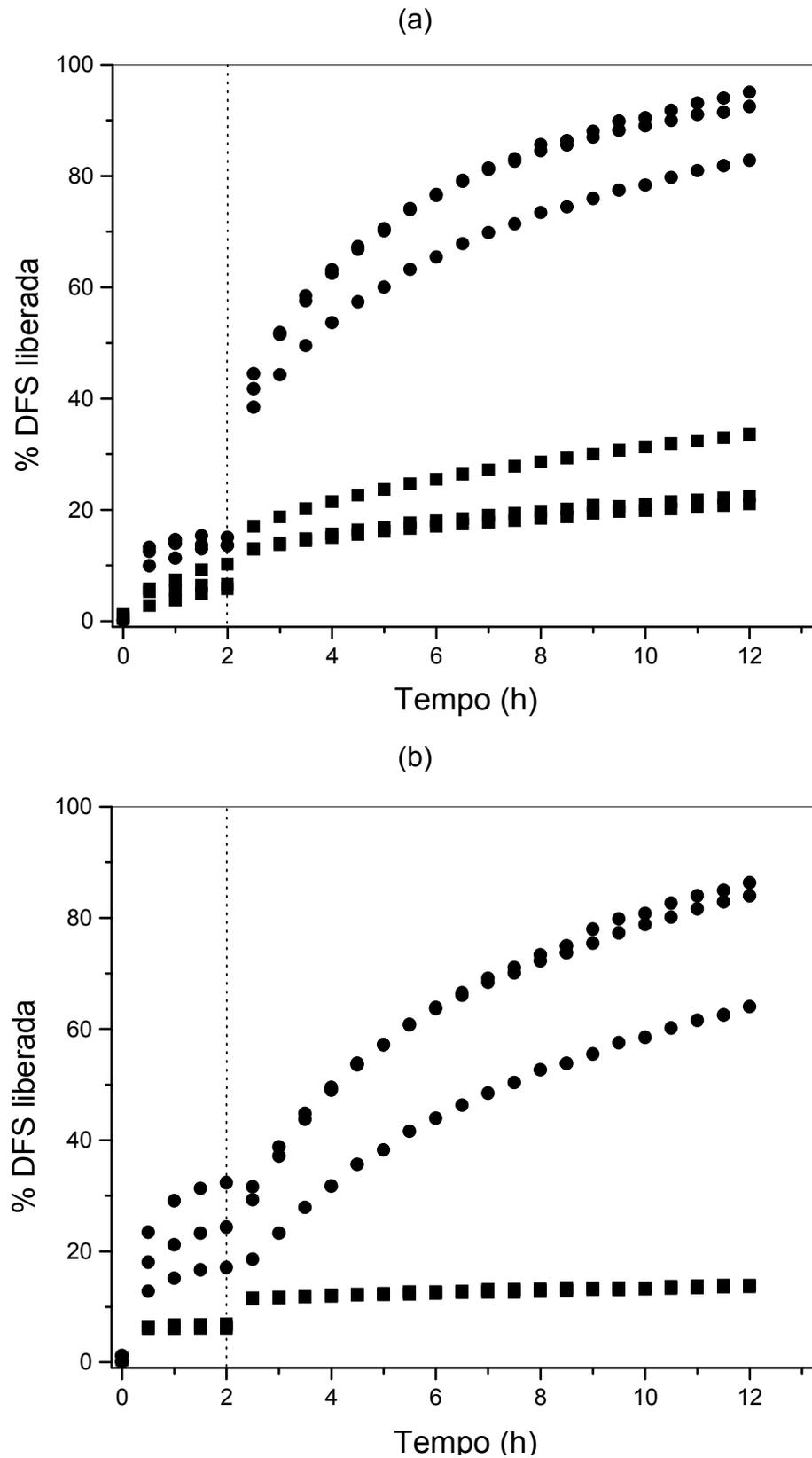


Figura 16. Perfis de dissolução do diclofenaco de sódio a partir das microesferas preparadas com (a) relação fármaco polímero 1:4 e (b) relação fármaco:polímero 1:8. (■) sem adição de Pluronic F68 e (●) com adição de Pluronic F68.

Tabela 11. Valores de área sob a curva (AUC) das formulações, estimados pelo método trapezoidal.

Formulação	1 (-/-)	2 (-/+)	3 (+/-)	4 (+/+)
AUC	8191,084	11384,75	41128,66	40572,09
	8325,98	16560,57	41570,87	46627,39
	8235,944	11020,56	28877,6	47144,48

Tabela 12. Análise de variância realizada no estudo da influência dos fatores de formulação sobre a AUC.

Causas de Variação	Soma dos Quadrados	GL	Média dos Quadrados	Teste F
A	0,113959	1	0,1139569	6,0888724*
B	2,7664704	1	2,7664704	147,81628*
A x B	0,0060948	1	0,0060948	0,3256534
Tratamento	2,8865264	3	0,99621754	51,410342
Residual	0,149725	8	0,0187156	
Total	0,0362514	11		

A = relação fármaco:polímero na formulação (1:8 ou 1:4); B = Adição de Pluronic F68 (sem ou com adição); A x B = interação entre os fatores; GL = graus de liberdade; F = F calculado; $F_{\text{tab}} = 4,07$ ($\alpha = 0,05$).

Como pode ser observado, o valor de F calculado é significativo para ambos os fatores (A e B), mas não é significativo para a interação entre eles (AB), quando comparado com o valor de F tabelado de 4,07, para um nível de significância de 5%. Neste caso, tanto a mudança da relação fármaco:polímero de 1:8 para 1:4 como a adição de Pluronic F68 aumentaram significativamente a liberação do DFS. O efeito do teor de fármaco nas microesferas sobre a velocidade de liberação tem sido descrito em termos de quantidade de polímero que age como barreira à difusão. O aumento da quantidade de fármaco sem alterar a quantidade de polímero levaria a mais rápida liberação devido à diminuição do caminho a ser percorrido pelo mesmo no interior das partículas (CHIAO e PRICE, 1994, KHIRD *et al.*, 1995). Entretanto, o efeito preponderante da adição de Pluronic F68 sobre a velocidade de liberação do fármaco pode ser nitidamente observado na Tabela 12. Este fato provavelmente está relacionado com formação de poros deixados pela eluição do Pluronic F68 durante o ensaio de dissolução, facilitando a difusão do

fármaco. Estes poros podem ser nitidamente visualizados nas micrografias de microesferas após o ensaio de dissolução (Figura 17). Além disso, não deve ser descartado o aumento do conteúdo de água nas partículas, proporcionado pela maior hidrofília do Pluronic F68. Ambos efeitos, aumento da porosidade e do conteúdo de água, têm sido considerados responsáveis pelo aumento da velocidade de liberação de fármacos a partir de matrizes de poliésteres alifáticos, onde o Pluronic F68 foi adicionado como segundo polímero (HUATAN *et al.*, 1995, YEH *et al.*, 1996). Além disso, a relativa imiscibilidade dos polímeros visualizada nas micrografias obtidas por MEV (Figura 8IIb), onde duas camadas poliméricas distintas foram observadas, pode ter contribuído de modo significativo para a maior velocidade de liberação do DFS a partir das microesferas.

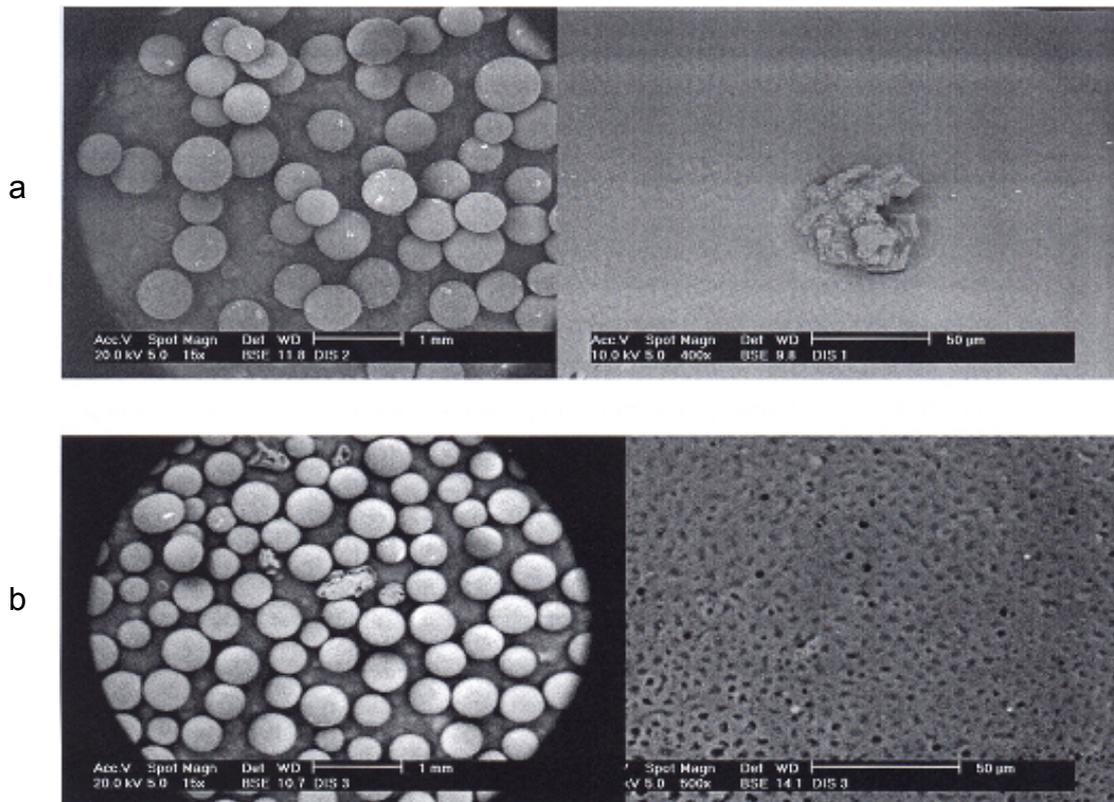


Figura 17. Micrografias obtidas por MEV das microesferas após o ensaio de dissolução: (a) microesferas preparadas sem a adição de Pluronic F68 (b) microesferas preparadas com a adição de Pluronic F68.

A liberação do fármaco a partir de sistemas de liberação modificada tem sido matematicamente descrita por vários modelos cinéticos (COSTA, 2002). O modelo mais simples assume que o fármaco é liberado a partir de uma matriz homogênea com um coeficiente de difusão constante. De modo geral, é possível resumir o modelo de Higuchi à expressão:

$$F = K_H t^{1/2}$$

onde F é a fração de fármaco liberada no tempo t; e K_H é a constante de liberação de Higuchi. Assim, este modelo descreve a liberação de um fármaco como um processo de difusão baseado na Lei de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo. Esta relação, primeiramente proposta por HIGUCHI (1963), pode ser aplicada para várias formas farmacêuticas.

Entretanto, o modelo que tem sido mais aplicado à liberação de fármacos a partir de microesferas é o modelo de Baker-Lonsdale. Este modelo foi desenvolvido a partir do modelo de Higuchi, e descreve a liberação controlada de fármacos a partir de uma matriz esférica heterogênea. O modelo de Baker-Lonsdale é descrito como sendo:

$$3/2 [1 - (1 - F)^{2/3}] - F = K_{B-L} t$$

onde F é a fração de fármaco liberado no tempo t; e K_{B-L} é a constante de Baker-Lonsdale. Deste modo, um gráfico relacionando a parte esquerda da equação e o tempo será linear se as condições estabelecidas forem cumpridas, e a constante de liberação k correspondendo à inclinação da reta.

Finalmente, o modelo proposto por KATZHENDLER e colaboradores (1997) assume que a liberação não é influenciada pela difusão interna e externa à matriz, mas que o passo limitante é a erosão da rede polimérica. O modelo matemático para matrizes planas, esféricas e cilíndricas apresentando erosão heterogênea é dada pela equação:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_o \cdot t}{C_o \cdot a_o} \right]^n$$

onde: M_t/M_∞ corresponde à fração de fármaco liberada durante o tempo t , k_0 é a constante de erosão, C_0 é a concentração inicial de fármaco na matriz e a_0 é o raio inicial das microesferas. O valor de n é 2 para sistemas esféricos.

Tabela 13. Dados de regressão obtidos após aplicação dos modelos de Higuchi, Baker-Lonsdale e Katzhendler nos perfis de liberação do DFS a partir das microesferas.

Modelo	Formulação (Fator A/Fator B)			
	1 (-/-)	2 (+/-)	3 (-/+)	4 (+/+)
Higuchi (1963) $F=K_H t^{1/2}$	$Y=0,0015x+0,0964$ $R^2=0,9947$	$Y=0,076x+0,0555$ $R^2=0,9960$	$Y=0,0371x-0,0933$ $R^2=0,9751$	$Y=0,031x+0,1107$ $R^2=0,957$
BakerLonsdale (1974) $3/2 [1-(1-F)^{2/3}]$ $F=K_{B-L}t$	$Y=2 \cdot 10^{-6}x+0,0021$ $R^2=0,9853$	$Y=2 \cdot 10^{-5}x+0,0018$ $R^2=0,9947$	$Y=0,0004x+0,0406$ $R^2=0,9991$	$Y=0,0004x-0,0141$ $R^2=0,9927$
Katzhendler (1997) $\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 \cdot t}{C_0 \cdot a_0} \right]^n$	$Y=-7969x+2 \cdot 10^{-6}$ $R^2=0,9641$	$Y=-1 \cdot 10^{-8}x+2 \cdot 10^{-7}$ $R^2=0,8935$	$Y=-278006x+7738$ $R^2=0,9824$	$Y=-2 \cdot 10^{-7}x+1 \cdot 10^{-7}$ $R^2=0,7887$

Fator A: (-) relação fármaco polímero 1:8; (+) relação fármaco polímero 1:4.

Fator B: (-) sem adição de Pluronic F68; (+) com adição de Pluronic F68

Os coeficientes de correlação obtidos após a linearização dos perfis de dissolução das formulações testadas, pelos três modelos matemáticos descritos acima, são demonstrados na Tabela 13. Estas linearizações foram unicamente obtidas a partir dos dados de liberação do DFS em tampão fosfato pH 6,8, uma vez que para a aplicação destes modelos matemáticos devem ser obedecidas as condições *sink*, onde a solubilidade do fármaco no meio não é um fator limitante para a dissolução. Conforme observado na Tabela 13, os valores de coeficiente de correlação obtidos com os modelos de Higuchi e Baker-Lonsdale indicam que o

fenômeno de difusão é responsável pela liberação do DFS a partir das microesferas em tampão fosfato pH 6,8, tanto para aquelas preparadas na ausência como na presença de Pluronic F68. Este resultado é claramente demonstrado após avaliação dos dados de correlação obtidos pela aplicação do modelo de KATZHENDLER *et al.* (1997). Os baixos valores de coeficiente de correlação obtidos descartam o fenômeno de erosão como sendo um processo limitante. Entretanto, é possível considerar que a eluição do Pluronic F68 tenha ocorrido em meio ácido, nas primeiras duas horas de ensaio. Neste caso, o Pluronic F68, polímero hidrossolúvel, seria eliminado das microesferas deixando poros na matriz que facilitaria a difusão do DFS. Este fenômeno auxiliaria na elucidação da maior velocidade de dissolução do DFS a partir das microesferas preparadas a partir da mistura de acetobutirato de celulose e Pluronic F68.

O conjunto de resultados indica que a maior velocidade de dissolução do DFS ocorre quando as microesferas são preparadas com relação fármaco:polímero 1:4 e com adição de Pluronic F68 (Formulação 4). Nenhuma das formulações apresentou um perfil de dissolução próximo daquele obtido a partir do VOLTAREN SR75, forma farmacêutica de liberação prolongada do DFS comercialmente disponível. Este forma farmacêutica apresentou uma liberação próxima a 50% no final do ensaio de dissolução (Figura 18).

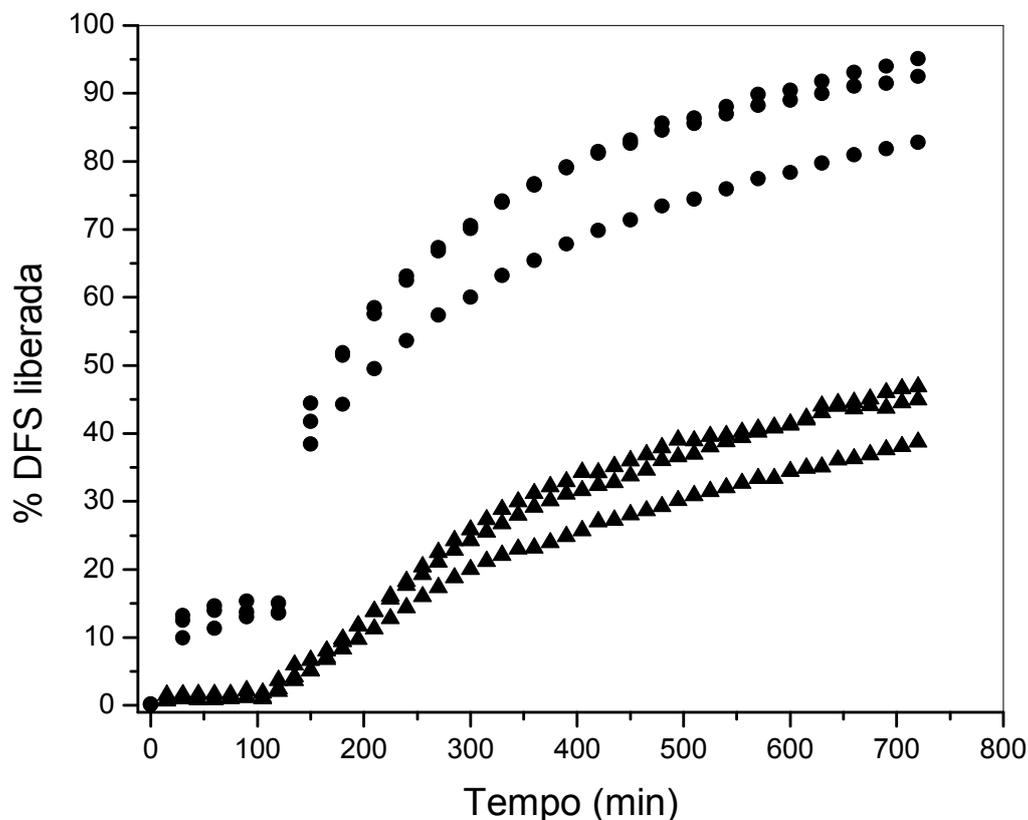


Figura 18. Perfis de dissolução do diclofenaco de sódio a partir de: (●) microesferas preparadas com relação fármaco:polímero 1:4 e adição de Pluronic F68; (▲) Voltaren SR 75.

5.3. AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DO DICLOFENACO DE SÓDIO

A administração de um fármaco contido numa forma farmacêutica tem por finalidade obter um efeito farmacoterapêutico. A resposta biológica, após a administração do medicamento, é consequência de uma interação entre o fármaco e os receptores celulares ou sistemas enzimáticos. A magnitude com que ocorre esta resposta está relacionada com a concentração do fármaco que alcança o sítio de ação que depende, por sua vez, da extensão com que ocorre a sua absorção, distribuição e eliminação no organismo (ANSEL *et al.*, 1995).

As etapas desde a administração do fármaco até a obtenção do efeito farmacológico podem ser divididas em três fases: a fase biofarmacêutica (disponibilização da substância ativa ao organismo); fase farmacocinética (absorção, distribuição, metabolização e eliminação do fármaco); e a fase farmacodinâmica (resposta resultante da interação do princípio ativo com o receptor) (LE BLANC *et al.*, 1997).

A farmacocinética, segundo Wagner (1975), é o estudo das velocidades de troca das concentrações de fármacos e seus metabólitos nos fluidos biológicos, tecidos e excretas, representados pela construção de modelos adequados para a interpretação de tais resultados.

No ramo da farmacocinética, a biodisponibilidade é definida como a quantidade relativa de substância ativa, absorvida a partir de uma forma farmacêutica, que atinge a circulação sistêmica (LE BLANC *et al.*, 1997). É avaliada por meio de parâmetros farmacocinéticos capazes de estimar a velocidade e a extensão (quantidade) de uma forma farmacêutica que, sendo absorvida a partir de uma via de administração, se torna disponível no organismo (SHARGEL e YU, 1993).

Numerosos pesquisadores têm demonstrado que a biodisponibilidade de fármacos contidos em formulações farmacêuticas pode ser muito variada. Tal variabilidade, geralmente resultante de problema na absorção do fármaco, pode ter implicações terapêuticas relevantes para o paciente, diante da possibilidade de reduzir o efeito terapêutico ou produzir efeitos tóxicos (CÁRCAMO, 1982). Por isso a importância dos estudos de biodisponibilidade, para determinar-se o padrão de absorção do fármaco a partir da formulação farmacêutica.

No desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação prolongada, em especial, os estudos de biodisponibilidade são importantes para determinar a velocidade com que o fármaco está sendo liberado da mesma, e se a quantidade que está sendo disponibilizada ao organismo é suficiente para produzir o efeito terapêutico desejado. Neste sentido, os fatores que podem interferir na absorção do fármaco podem estar relacionados principalmente à deficiência na liberação da substância ativa, causada por problemas na formulação devido à aplicação inadequada da tecnologia de obtenção da forma farmacêutica (CÁRCAMO, 1982).

O FDA estabelece que a biodisponibilidade *in vivo* de uma dada formulação farmacêutica pode ser determinada pela medida dos níveis plasmáticos da molécula do fármaco, componente ativo ou metabólitos ativos em função do tempo, ou através da quantificação de algum efeito farmacológico agudo (Food and Drug Administration, 1993).

A biodisponibilidade de um novo produto farmacêutico (formulação teste) pode ainda ser comparada com a biodisponibilidade de um produto padrão (formulação referência), cuja segurança e eficácia clínica tenham sido amplamente evidenciadas. Neste aspecto, para determinar a biodisponibilidade e estabelecer a bioequivalência de produtos farmacêuticos que sejam administrados em esquema de dose única, os parâmetros farmacocinéticos seguintes são recomendados. Em ordem de importância temos:

- Área sob a curva de concentração do fármaco versus tempo (AUC);
- Concentração máxima atingida no plasma (C_{max});
- Tempo necessário para atingir a concentração sanguínea máxima (t_{max});
- Meia-vida de eliminação terminal do fármaco ($t_{1/2}$);
- Constante de eliminação terminal (K_e).

A análise estatística comparativa entre as formulações (teste x referência), em relação aos três parâmetros farmacocinéticos padrões (AUC, C_{max} e t_{max}), é requisito fundamental, e quase sempre suficiente, para que se possa concluir sobre a biodisponibilidade relativa e bioequivalência de produtos farmacêuticos, avaliadas quanto à velocidade e a extensão da absorção do fármaco em estudo (HAUSCHKE *et al.*, 1990; STEINIJANS *et al.*, 1991; SALMONSON, 1996). Neste aspecto, a área sob a curva de concentração do fármaco versus tempo (AUC) é um parâmetro adequado para a medida da extensão da absorção, enquanto que no caso de formulações de liberação imediata, a concentração máxima atingida no plasma (C_{max}) e/ou o tempo em que esta ocorre (t_{max}) pode caracterizar a velocidade de absorção (STEINIJANS, *et al.*, 1991).

De acordo com as recomendações internacionais, aceitas por amplo consenso, um produto farmacêutico teste é bioequivalente a outro, tido como referência, quando a razão entre as médias destes parâmetros (teste/ referência) não exceder o limite de $\pm 20\%$, considerando-se um intervalo de confiança (IC) de 90%, com os dados baseados na distribuição de t de Student. O limite de $\pm 20\%$,

compreende o intervalo de confiança da média das razões individuais entre 0,80-1,25, para cada parâmetro, ou seja, entre 80-125%, quando as médias dos parâmetros farmacocinéticos são expressas pelas razões percentuais (SCHALL *et al.*, 1994). Assim, para a avaliação de bioequivalência, são recomendados métodos estatísticos que se baseiam no cálculo das razões individuais teste/referência, para os parâmetros C_{max} e AUC, e das diferenças individuais para t_{max} , juntamente com as médias aritméticas (dados não transformados) ou médias geométricas (dados log-transformados) e os respectivos intervalos de confiança de 90%. Com base nesta análise, a inclusão do IC 90% das médias das razões individuais relativas (%) dentro do intervalo 80-125%, para o C_{max} e a AUC, e a inclusão do valor “zero” dentro do IC 90% para as diferenças de t_{max} , são as condições requeridas para que se possa concluir pela bioequivalência de produtos farmacêuticos. Finalmente, para a análise estatística, o emprego de testes paramétricos (ANOVA para dados não transformados e transformados por logaritmo) e não-paramétrico (teste de Wilcoxon de soma dos escores, de acordo com HAUSCHKE *et al.*, 1990), têm sido os mais recomendados.

Os estudos de bioequivalência realizados com voluntários sadios são os preferidos. Entretanto, o estudo com humanos, em geral são dispendiosos demais para que sejam empregados em larga escala. Nestas circunstâncias, a escolha de um modelo animal pode oferecer inúmeras facilidades, como disponibilidade e custos mais baixos. A despeito das controvérsias que existem sobre o uso de modelos animais de biodisponibilidade sua utilidade já foi comprovada. Neste aspecto a escolha da espécie é naturalmente essencial, dado que importa escolher um animal cujas características fisiológicas e de metabolismo sejam o mais assemelhado possível àquelas do homem. O cão e o coelho são os animais utilizados com maior frequência (LEBLANC, *et al.*, 1997). Por maior disponibilidade e viabilidade econômica, o cão foi o modelo animal escolhido para realização deste trabalho. Além disso, HOSNY e colaboradores (1997 e 1998) utilizaram cães da raça Beagle para realização de estudos farmacocinéticos de formulações de liberação prolongada contendo diclofenaco.

Embora os cães da raça Beagle sejam constantemente usados como modelo animal para avaliar a biodisponibilidade de fármacos, nem sempre se observa boa correlação com a biodisponibilidade em humanos. Algumas

discrepâncias entre cães e humanos quanto à biodisponibilidade de fármacos administrados por via oral, têm sido atribuídas a diferenças na fisiologia do trato gastrointestinal entre as duas espécies, em particular, diferenças no volume de secreção de ácido gástrico e na motilidade do trato digestivo. Neste sentido, a velocidade de esvaziamento gástrico e do trânsito gastrointestinal tem se mostrado um fator determinante na avaliação da biodisponibilidade de formulações de liberação prolongada. YAMADA e colaboradores (1995) demonstraram que os cães apresentam uma velocidade de trânsito gastrointestinal maior que a dos humanos, isto é, esvaziam o trato digestivo mais rapidamente. Assim sendo, para a validação do modelo tem sido proposto uma modificação da fisiologia do trato digestivo do cão. Entre as várias proposições, o aumento do tempo de esvaziamento gástrico e a redução do peristaltismo pela administração de Loperamida têm se mostrado bastante apropriados. Por esta razão, pré-tratamos os cães com um comprimido de 2 mg de cloridrato de loperamida, por via oral, 30 min antes da administração do diclofenaco.

5.3.1. Determinação Cromatográfica de DFS em Plasma de Cão. Padronização e Validação do Método.

O método de HPLC com detecção ultravioleta que padronizamos e validamos para a determinação de diclofenaco tem como base alguns métodos descritos na literatura por SANTOS e colaboradores (1992), e GIAGOUDAKIS e MARKANTONIS (1998). Entretanto, o processo de extração foi particularmente desenvolvido para este método.

Os métodos de detecção por absorvância no ultravioleta (UV) geralmente são bastante simples e práticos, sendo a sensibilidade da técnica pouco influenciada por mudanças nas condições ambientais de temperatura e de umidade. Por estas razões, o uso destes métodos apresenta vantagens sobre outros, quando um controle rígido destas variáveis não pode ser adotado (GUIMARÃES & COLLINS, 1993).

O método que desenvolvemos e padronizamos para a análise de DFS, à semelhança de algumas metodologias citadas anteriormente, combina o uso de reagentes de fácil aquisição, fase móvel de composição simples e extração

relativamente fácil. Ainda, os reagentes e solventes utilizados apresentam as vantagens de terem baixo custo, fácil acesso, estabilidade à temperatura ambiente, baixa volatilidade, alto grau de pureza, baixa absorção de luz ultravioleta e baixa toxicidade.

O DFS e a IND presentes nas soluções padrão mantidas sob refrigeração mantiveram-se estáveis durante todo o período do ensaio, como comprovada pela injeção no cromatógrafo de alíquotas destas soluções em cada corrida e análise comparativa das áreas dos picos de cada sessão.

No tratamento das amostras foram testados vários solventes incluindo acetato de etila, acetonitrila e diclorometano em plasma acidificado com ácido acético ou ácido fosfórico. A precipitação de proteínas com acetonitrila e a acidificação com ácido fosfórico apresentou o melhor resultado para a análise do DFS. Além disso, a adição de sulfato de sódio anidro para saturar a fase aquosa diminuiu a interferência de picos de compostos endógenos do plasma.

A análise por HPLC em fase reversa e detecção por UV permitiu a separação adequada do DFS e da indometacina (P.I.) em amostras de plasma de cão. A Figura 19 apresenta exemplos de cromatogramas obtidos nestas condições, para: (a) uma amostra de plasma branco; (b) plasma branco contaminado com DFS na concentração de 2,0 µg/mL; e (c) plasma obtido de cão 30 min após a administração oral de 75 mg de DFS na forma de microesferas. Nestas condições, uma corrida cromatográfica se completava em 15 min com tempos de retenção de 11 e 13,5 min para o diclofenaco e indometacina (P.I.), respectivamente.

As curvas de calibração calculadas por regressão linear apresentaram boa linearidade na faixa de concentrações de DFS adicionadas ao plasma de cão (100, 250, 500, 1000, 2000, 4000 e 8000 ng/mL), sendo os coeficientes de regressão linear (r) iguais ou maiores que 0,958. A Figura 20 mostra a curva de calibração média para o DFS nas condições acima mencionadas.

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ, com $CV \leq 20\%$) foram de 0,05 e 0,1 µg/mL, respectivamente. Assim, a sensibilidade do método mostrou-se adequada e suficiente para o objetivo pretendido, pois é possível quantificar concentrações superiores a 0,1 µg/mL para este fármaco.

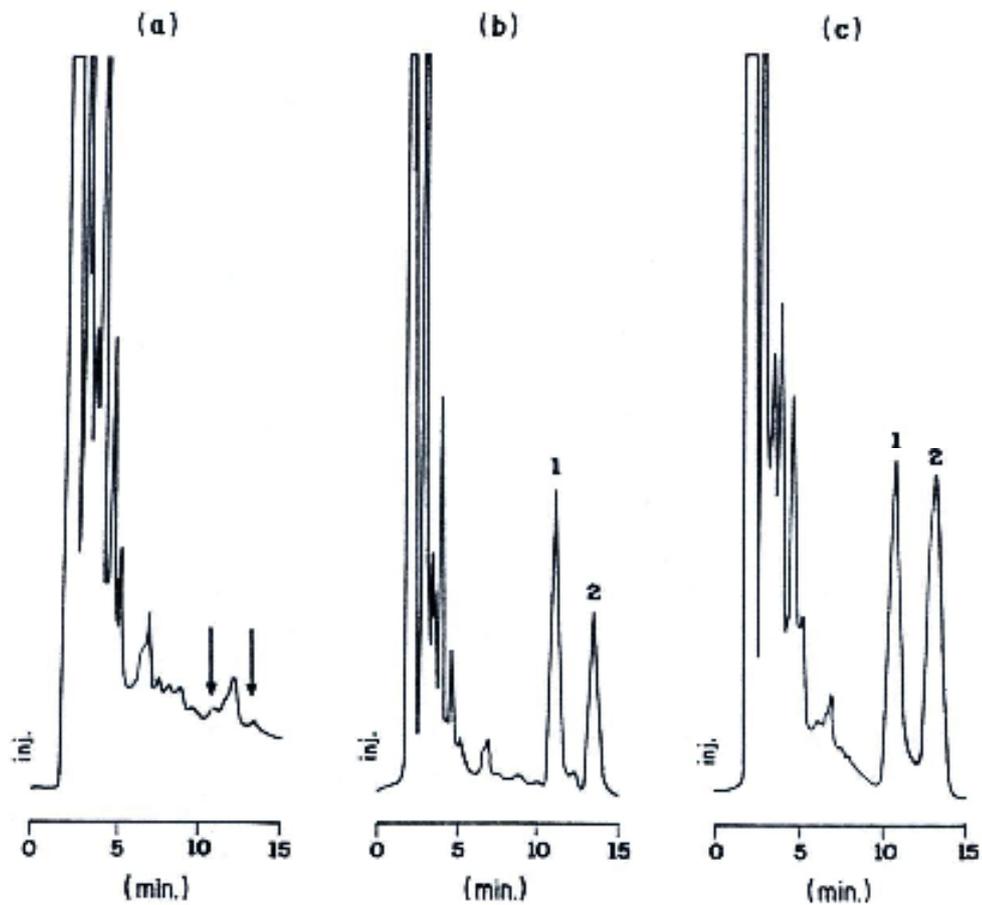


Figura 19. Exemplos de cromatogramas obtidos por HPLC. (a) amostra de plasma branco; (b) plasma branco contaminado com DFS na concentração de $2 \mu\text{g/mL}$; (c) plasma obtido de cão 30 min após administração oral de 75mg de DFS na forma de microesferas.

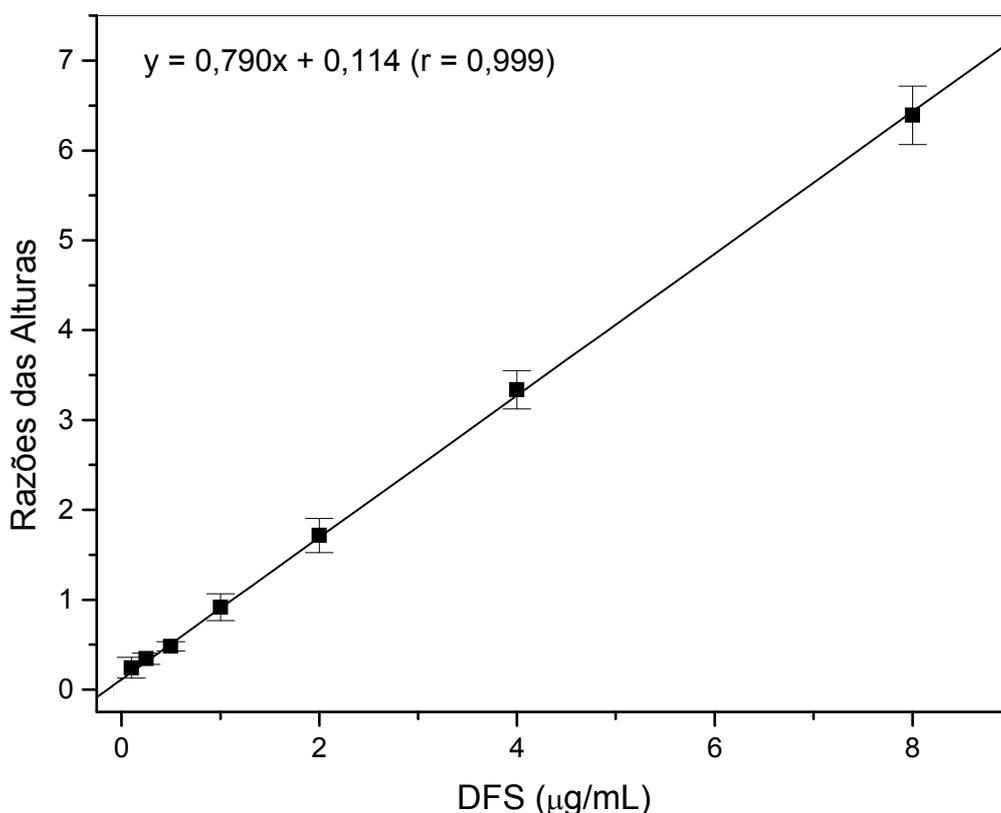


Figura 20. Curva de calibração média obtida em plasma de cão para o DFS na análise por HPLC. Cada ponto representa a média \pm D.P.

A variabilidade do método, avaliada através do cálculo da precisão no interensaio e no intra-ensaio, juntamente com os valores de recuperação e da exatidão no intra-ensaio, são mostrados nas Tabelas 14 e 15. Os valores de coeficiente de variação (C.V.%) obtidos no interensaio foram de : 14,2; 15,3; 9,3; 6,2; 5,5; 3,2 e 1,0%, para as concentrações plasmáticas de 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 $\mu\text{g/mL}$ de DFS (Tabela 14). Nota-se que os coeficientes de variabilidade mais altos são observados com as menores concentrações, enquanto que estes valores decrescem à medida que as concentrações aumentam.

A variação no intra-ensaio, determinada pela análise de cinco amostras de plasma de cada concentração (0,3; 3,0 e 6,0 $\mu\text{g/mL}$) dentro de uma mesma corrida, originou os seguintes valores de coeficiente de variação: 12,0; 2,7 e 6,1% para o DFS (Tabela 15). Para estas mesmas amostras, a exatidão do intra-ensaio, expressa em porcentagem (%) foi de $139,2 \pm 16,8$; $93,5 \pm 2,5$ e $89,2 \pm 5,5$ % (média

\pm DP), respectivamente. Ainda neste ensaio, o procedimento de extração com acetonitrila assegurou uma recuperação (% de fármaco extraído) de $74,4 \pm 11,8$; $57,8 \pm 2,0$ e $55,5 \pm 2,3\%$ (média \pm D. P.), respectivamente para as concentrações de DFS acima citadas. O coeficiente de variação (C. V. %) e a recuperação do padrão interno (IND, 2 μ g/mL) foi de 2,92% e $51,7 \pm 1,5\%$ (média \pm D. P.), respectivamente (Tabela 15).

Todos os valores dos coeficientes de variação encontrados nos 2 ensaios de validação do método são inferiores ao limite de 15%, considerado aceitável para a validação de métodos analíticos por inúmeras agências reguladoras (como recomendado em SHAH *et al.*, 1992).

A recuperação analítica pela extração com acetonitrila, tanto do DFS quanto do padrão interno (IND) foi superior a 50%. Estes valores estão dentro do limite aceitável, especialmente por se tratar de extração de fármaco em material biológico (plasma). Embora seja desejável obter-se valores de recuperação tão próximo quanto possível de 100%, isto não é necessário para fornecer boa precisão e exatidão se uma detecção adequada pode ser atingida (KARNES *et al.*, 1991).

Os compostos analisados mantiveram-se estáveis em soluções de metanol/água 50% e em plasma mantidos sob refrigeração entre 4 e 8°C, por um período superior a um mês. Quanto a indometacina, cuidados foram tomados para evitar-se a exposição à luz intensa ou a temperaturas superiores à 45°C, pois pode decompor-se.

Tabela 14. Cálculo do coeficiente de variação do interensaio para o diclofenaco de sódio (DFS) e indometacina (IND) obtido em plasma de cão na análise por HPLC.

Concentração adicionada	Concentração obtida ($\mu\text{g/ml}$)	
	Média \pm D. P. (n)	C. V. (%)
DFS		
0,1	0,14 \pm 0,02 (9)	14,2
0,25	0,30 \pm 0,05 (8)	15,3
0,5	0,53 \pm 0,05 (9)	9,3
1,0	1,03 \pm 0,06 (9)	6,2
2,0	2,02 \pm 0,11 (9)	5,5
4,0	4,02 \pm 0,13 (9)	3,2
8,0	8,0 \pm 0,08 (4)	1,0

D. P. = Desvio Padrão, n = número de amostras, C. V. = Coeficiente de Variação, C. V. (%) = D. P. / Média x 100.

Tabela 15. Cálculo do coeficiente de variação do intra-ensaio e da porcentagem de recuperação para o diclofenaco de sódio (DFS) e indometacina (IND) obtido em plasma de cão na análise por HPLC.

Concentração adicionada ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperação (%) Média \pm D. P. (n = 5)	Precisão		Exatidão (%) Média \pm D. P.
		Conc. Obtida ($\mu\text{g/ml}$, n = 5) Média \pm D. P.	C. V. (%)	
DFS				
0,3	74,4 \pm 11,8	0,42 \pm 0,05	12,0	139,2 \pm 16,8
3,0	57,8 \pm 2,0	2,8 \pm 0,08	2,7	93,5 \pm 2,5
6,0	55,5 \pm 2,3	5,4 \pm 0,33	6,1	89,2 \pm 5,5
Média \pm D. P.	62,56 \pm 10,9			107,3 \pm 25,3
INDO (P. I.)^a				
2,0	51,7 \pm 1,5		2,9	

(a) = Indometacina (P. I.), padrão interno; D. P. = Desvio Padrão; C. V. = Coeficiente de Variação; n = número de amostras.

5.3.2 Aplicação do Método na Avaliação da Biodisponibilidade do DFS em Cães.

O ensaio de biodisponibilidade foi realizado conforme descrito em 4.3. A administração oral de 75 mg de DFS na forma de microesferas foi bem tolerada pelos cães, não sendo observados efeitos adversos após o tratamento. Porém, após a administração oral da formulação referência (Voltaren SR 75), dois cães vomitaram durante o ensaio, e apresentaram diarreia e sangue nas fezes. A ausência de efeitos adversos com a administração das microesferas pode estar associado a menor biodisponibilidade encontrada para estas formulações quando comparada a biodisponibilidade do Voltaren SR. Por outro lado, a injúria do trato gastrointestinal com o aparecimento de náusea, vômitos, diarreia, sangramento e úlcera está entre os efeitos colaterais mais freqüentes dos antiinflamatórias não-esteroidais em diferentes espécies animais (HAWKEY, 1994).

Os principais parâmetros farmacocinéticos derivados das curvas de concentração sérica de DFS versus tempo e analisados na comparação das biodisponibilidades das microesferas (teste) e do Voltaren (referência) são apresentados na Tabela 16. Como pode ser observado nesta tabela, as médias geométricas e os respectivos intervalos de confiança de 90% das razões da $AUC_{[0-24]}$ foram de 20,4 $\mu\text{g/mL.h}$ (17,0 – 24,6) para as microesferas, e de 33,5 $\mu\text{g/mL.h}$ (26,0 – 43,1) para o Voltaren. Os valores de $AUC_{[0-\infty]}$ foram de 22,3 $\mu\text{g/mL.h}$ (18,7-26,6) e 35,5 $\mu\text{g/mL.h}$ (27,9 – 45,3), respectivamente para as microesferas e para o Voltaren.

A análise estatística paramétrica revelou que a média geométrica das razões individuais Teste/Referência (Microesfera/Voltaren) foi de 61,0% (I.C. 90% = 50,6 – 73,5) para $AUC_{[0-24]}$ e 62,8% (I.C. 90%= 53,2-74,2) para a $AUC_{[0-\infty]}$ (Tabela 17). Como observado, estes valores não estão incluídos no intervalo de 80 - 125%, proposto por inúmeras agências de regulamentação (ANVISA, FDA - Food and Drug Administration, 1993). Estes resultados revelam que a formulação na forma de microesferas apresenta as AUCs com aproximadamente 65% dos valores das AUCs do Voltaren (Formulação referência), denotando uma menor biodisponibilidade da formulação teste, não sendo portanto bioequivalente a formulação referência quanto à extensão da absorção do DFS.

HOSNY e colaboradores (1997) trabalhando no desenvolvimento de microesferas de alginato de sódio e de carboximetilcelulose sódica contendo 100 mg de DFS e obtiveram $AUC_{[0-24]}$ de $48,99 \pm 11,07 \mu\text{g/mL.h}$ e $39,82 \pm 26,61 \mu\text{g/mL.h}$, respectivamente. Já a $AUC_{[0-24]}$ do Voltaren Retard 100, utilizado como referência, foi de $83,02 \pm 18,31 \mu\text{g/mL.h}$. Os resultados descritos por estes autores apontam na mesma direção dos resultados por nós obtidos, ou seja, para uma diminuição da biodisponibilidade da formulação de microesferas em relação ao comprimido, tido como referência. Neste sentido, a redução na biodisponibilidade da microesfera pode estar relacionada ao processo de liberação *in vivo* da substância ativa a partir destas partículas, embora os resultados obtidos nos estudos *in vitro* apontam em direção oposta.

Entretanto, resultados na direção oposta, isto é, com aumento da biodisponibilidade do fármaco da formulação teste em relação à referência, também podem ser encontrados. HOSNY e colaboradores (1998) avaliaram a biodisponibilidade do DFS em cães da raça Beagle, a partir de microesferas de Eudragit L100. Obtiveram uma biodisponibilidade de 197,54% relativa ao Voltaren (comprimido revestido contendo 50 mg de DFS, utilizado como referência).

A média geométrica das razões de C_{max} para as microesferas foi de 3,04 (IC 90%= 2,11 - 4,37) e para o Voltaren foi de 5,59 (IC 90%= 3,49 - 8,95), e equivale a 54,4% (I.C.90%= 35,8-82,4) da média da referência (Análise paramétrica). Neste sentido, o parâmetro C_{max} teve um comportamento semelhante a AUC, isto é, apresentou redução da biodisponibilidade da formulação de microesferas (teste) em relação ao comprimido de Voltaren (referência).

Por outro lado, a mediana de t_{max} foi de 3,0 horas para ambas as formulações (faixa de valores de 0,5 - 6,0 para microesferas e 3,0 - 6,0 para Voltaren) (Tabela 16). Neste caso, O intervalo de confiança da média aritmética das diferenças individuais de t_{max} (Microsferas – Voltaren) inclui o valor “zero”. Embora não se possa concluir sobre a bioequivalência de formulação farmacêutica com base unicamente no valor de t_{max} , o fato deste parâmetro não diferir entre as formulações pode sugerir, em parte, que as microesferas apresentam características de liberação prolongada. De fato, formulações de liberação imediata apresentam t_{max} próximo a 1 hora (McEVOY, 2000).

Em estudos de biodisponibilidade/bioequivalência os três parâmetros essenciais, AUC, C_{max} e t_{max} , precisam ser bioequivalentes, ou seja, ter biodisponibilidade semelhante para concluir-se sobre a bioequivalência de formulações farmacêuticas. AUC e C_{max} , parâmetros que avaliam a intensidade (extensão) da absorção, apresentou uma menor biodisponibilidade do diclofenaco de sódio a partir das microesferas do que a partir do Voltaren.

Quanto à velocidade de absorção do fármaco, representada pelo parâmetro t_{max} , este foi similar para ambas as formulações (teste x referência), permitindo-nos concluir pela bioequivalência deste parâmetro. Entretanto, este dado é considerado insuficiente para concluir-se sobre a bioequivalência de formulações farmacêuticas.

A extensão da absorção do diclofenaco de sódio foi menor a partir das microesferas do que a partir do Voltaren, como determinado pela AUC e C_{max} . A obtenção de concentrações mais elevadas de DFS após a administração de Voltaren pode explicar o aparecimento de efeitos colaterais nos cães tratados com esta última formulação, efeitos que não foram observados com a formulação em microesferas.

Os parâmetros relacionados à eliminação do DFS nestes ensaios (K_e e $t_{1/2}$), como observado, apresentam as médias geométricas das razões individuais teste/referência incluídas no intervalo de bioequivalência de 80 - 125%. Entretanto, os valores dos intervalos de confiança de 90% destes parâmetros excedem os limites inferiores e superiores do intervalo acima indicado (80–125%) (Tabela 17). Estes resultados sugerem a necessidade de aumento do número de animais para reduzir a variabilidade e podermos concluir sobre a bioequivalência destes parâmetros farmacocinéticos.

A Figura 21 ilustra as curvas das médias das concentrações plasmáticas em função do tempo para o DFS, a partir das microesferas e do Voltaren, nas condições já descritas. Como pode ser observado, o perfil das curvas obtido a partir das duas formulações apresentam padrões diferentes. Com relação à curva do Voltaren, observam-se concentrações mais elevadas de DFS entre 2 e 8 horas após sua administração, enquanto o perfil da curva de DFS a partir das microesferas parece apresentar um duplo pico de liberação.

Tabela 16. Parâmetros farmacocinéticos obtidos em estudo de biodisponibilidade realizado com 6 cães da raça Beagle, após a administração oral de 75 mg de diclofenaco de sódio em cápsulas de microesferas (formulação teste) ou comprimidos de Voltaren SR75[®] (formulação referência).

Parâmetros	Teste	Referência
	Microesferas	Voltaren SR75 [®]
AUC_[0-24] ($\mu\text{g h ml}^{-1}$)		
Média geométrica	20,4	33,5
I. C. 90%	17,0 – 24,6	26,0 – 43,1
AUC_[0-∞] ($\mu\text{g h ml}^{-1}$)		
Média geométrica	22,3	35,5
I. C. 90%	18,7 – 26,6	27,9 – 45,3
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)		
Média geométrica	3,04	5,59
I. C. 90%	2,11 – 4,37	3,49 – 8,95
K_e (h^{-1})		
Média geométrica	0,177	0,187
I. C. 90%	0,135 - 0,231	0,126 - 0,277
t_{1/2} (h)		
Média geométrica	3,923	3,708
I. C. 90%	2,997 – 5,134	2,501 – 5,498
t_{max} (h)		
Mediana	3,0	3,0
Faixa de valores	0,5 – 6,0	3,0 – 6,0

IC. - Intervalo de Confiança.

Tabela 17. Análise estatística das razões individuais da AUC_[0-48], AUC_[0-∞], C_{max}, K_e e t_{1/2} e das diferenças individuais de t_{max} entre as duas formulações de diclofenaco de sódio (microesferas e Voltaren SR75[®]), em estudo de biodisponibilidade/bioequivalência.

Microesferas/ Voltaren	Análise paramétrica	
	Média geom.	I. C. 90%
AUC_[0-24]		
% Razão	61,0	50,6 – 73,5
AUC_[0-∞]		
% Razão	62,8	53,2 – 74,2
C_{max}		
% Razão	54,4	35,8 – 82,4
K_e		
% Razão	94,7	55,6 – 161,3
t_{1/2}		
%Razão	105,8	62,1 – 180,2
t_{max}[*]		
Diferença (h)	- 0,75 ^{**}	- 2,2 – 0,5

Microesferas = Formulação teste, Voltaren = comprimidos (Formulação referência);
I. C. - intervalo de confiança.

(*) Análise Não-paramétrica; (**) Ponto estimado.

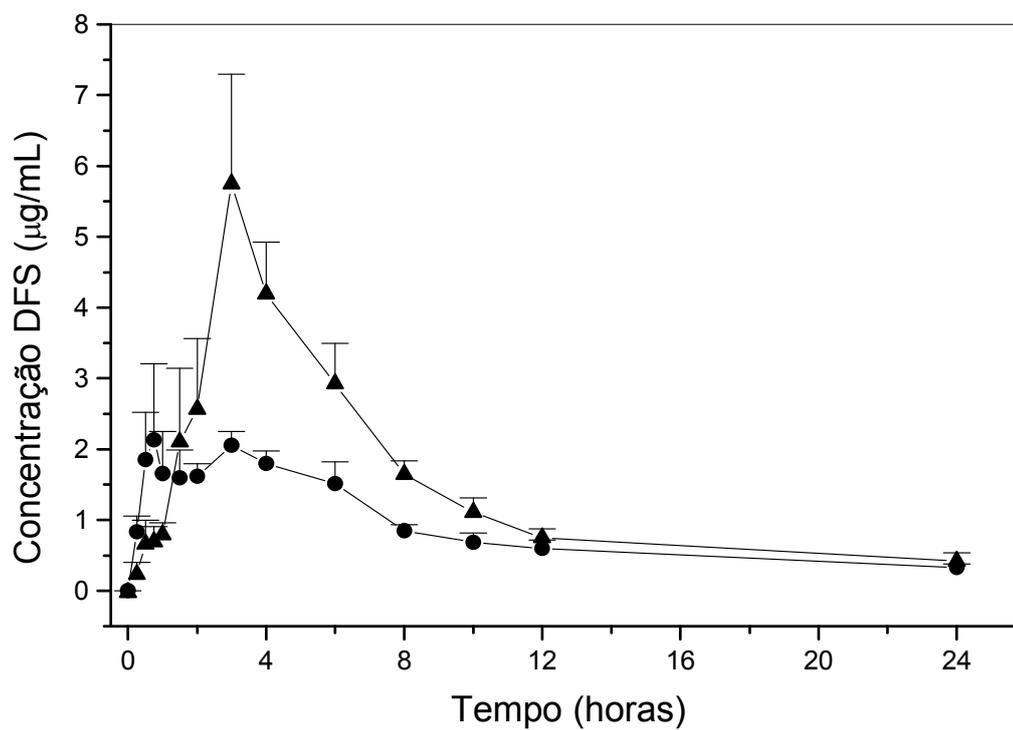


Figura 21. Curvas das concentrações plasmáticas de DFS em função do tempo (Média \pm EP.), obtidas em cães da raça Beagle após a administração oral de 75 mg de diclofenaco de sódio na forma de (●) microesferas ou (▲) Voltaren. Análise por HPLC.

CONCLUSÕES

- A preparação de microesferas de acetobutirato de celulose contendo diclofenaco de sódio, pela técnica de emulsificação/ evaporação do solvente, mostrou-se viável empregando-se a acetona e a vaselina líquida como solventes das fases interna e externa, respectivamente.
- A preparação de microesferas a partir de blendas de acetobutirato de celulose e Pluronic F68 foi viável nas proporções de 9:1 e 3:1. As partículas não foram formadas quando a proporção dos polímeros foi 1:1.
- A técnica empregada conduziu a obtenção de partículas esféricas, tanto para as microesferas preparadas somente com ABC, quanto aquelas preparadas com blendas de ABC e Pluronic F68;
- Partículas preparadas unicamente com ABC demonstraram-se de superfície lisa e compacta, enquanto blendas de ABC e Pluronic F68 deram origem a microesferas com superfície mais rugosa;
- Na visualização das micrografias das micropartículas seccionadas transversalmente não foi observada a presença de cristais de DFS no interior das partículas, sugerindo que o mesmo encontra-se dissolvido na matriz polimérica;
- A utilização de blendas de ABC e Pluronic F68 conduziu à formação de micropartículas apresentando uma estrutura de bicamada, sugerindo a formação de uma estrutura mista de microcápsula e microesfera. Esta estrutura está provavelmente relacionada à relativa imiscibilidade entre os dois polímeros, igualmente visualizada nos filmes preparados com os mesmos.
- O diâmetro médio das partículas não pareceu ser afetado pelas condições empregadas nas formulações de microesferas.
- A eficiência de encapsulação e o teor de DFS nas microesferas variaram entre 40-70% e 4,5-13,0mg/100mg, respectivamente. A análise de variância demonstrou que ambos parâmetros avaliados exerceram influência significativa no teor de fármaco encapsulado.
- Resultados obtidos nas análises de FTIR fornecem indicativos da presença de alguma outra substância na estrutura matricial das

microesferas, podendo ser tanto resíduos de n-hexano ou a vaselina líquida empregada como fase externa.

- Nas microesferas preparadas na ausência de DFS, os resultados obtidos na análise por DSC indicaram a presença de Pluronic F68 nas partículas;
- Tanto a presença de Pluronic F68 como de DFS pareceu afetar a forma cristalina do acetobutirato de celulose nas microesferas. Entretanto, a ausência do pico de fusão do Pluronic F68 forneceu indicativos de que este polímero encontra-se na forma amorfa nas partículas.
- A adição de Pluronic F68 nas formulações conduziu ao aumento significativo na liberação do fármaco, sendo o fator preponderante sobre a velocidade de liberação. O fator relação fármaco:polímero também influenciou significativamente a liberação do DFS. A interação entre os fatores não foi observada;
- Os valores de coeficiente de correlação obtidos com os modelos de Higuchi e Baker-Lonsdale indicam que o fenômeno de difusão é responsável pela liberação do DFS a partir das microesferas em tampão fosfato pH 6,8, tanto para aquelas preparadas na ausência como na presença de Pluronic F68;
- O aumento da velocidade de liberação do DFS proporcionado pela presença de Pluronic F68 nas partículas pareceu estar relacionado com a formação de poros deixados pela eluição do Pluronic F68 durante o ensaio de dissolução, bem como a estrutura em bicamada das micropartículas, favorecendo a mais rápida difusão do fármaco. Entretanto, o aumento do conteúdo de água nas partículas, proporcionado pela maior hidrofília do Pluronic F68 também pode ter contribuído de modo significativo para a maior velocidade de liberação do DFS a partir das microesferas;
- A maior velocidade de dissolução do DFS foi obtida a partir de microesferas preparadas com relação fármaco:polímero 1:4 e adição de Pluronic F68. Nenhuma das formulações apresentou um perfil de dissolução próximo daquele obtido a partir do VOLTAREN SR75, forma farmacêutica de liberação prolongada do DFS comercialmente disponível.

- O método de HPLC descrito neste trabalho para a determinação de DFS em plasma de cão é simples, rápido, econômico, suficientemente sensível e reprodutível.
- No estudo de bioequivalência a formulação de microesfera (teste) apresentou biodisponibilidade de aproximadamente 61% daquela do Voltaren SR75 (referência) para AUC, e C_{max} não sendo portanto bioequivalente em relação à extensão da absorção. Entretanto como o valor de t_{max} da formulação de microesfera não deferiu daquele do Voltaren SR75 conclui-se que ambas são bioequivalentes em relação à velocidade de absorção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIKGOZ, M., KAS, H. S., HASCELIK, Z., MILLI, U., HINCAL, A. A. Chitosan microspheres of diclofenac sodium. In vitro and in vivo evaluation. **Pharmazie**, n. 550 (Apr), p. 275-277, 1995.

ALTMAN, R. International experience with diclofenac in osteoarthritis. **American Journal of Medicine**, v. 80, p.48-52, 1986.

ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G., ALLEN, L. V. Dosage Form Design: Biopharmaceutical Considerations. In: _____. **Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1995. p.55-98.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução no. 391/99.

ARABI, H., HASHEMI, S.A., FOOLADI, M. Microencapsulation of allopurinol by solvent evaporation and controlled release investigation of drugs. **Journal of Microencapsulation**, v. 13, n. 5, p. 527-535, 1996.

ARICA, B., ARICA, M. Y., KAS, H. S., HINCAL, A. A., HASIR, C. V. In vitro studies of enteric coated diclofenac sodium-carboxymethylcellulose microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 13, n. 6, p. 689-99, 1996.

ARNAUD, P.; BOUÉ, C.; CHAUMEIL, C. Cellulose acetate butyrate microparticles for controlled release of carbamazepine. **Journal of Microencapsulation**, v. 13, n. 4, p. 407-417, 1996.

BAHL, Y. and SAH, H. Dynamic changes in size distribution of emulsion droplets during ethyl acetate-based microencapsulation process. **AAPS PharmaSciTech**, v. 1, n. 1, artigo 5, 2000.

BAIN, D. F.; MUNDAY, D. L.; SMITH, A. Solvent influence on spray-dried biodegradable microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, n. 4, p. 453-474, 1999.

BASF CORPORATION. Pluronic® and Pluronic® R Block Copolymer Surfactants. Disponível em: <<http://www.basf.com>> Acessado em abril de 2003.

BATYCKY, R. P., HANES, J., LANGER, R. and EDWARDS, D. A. A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 2, p. 1464-1477, 1997.

BEZEMER, J. M.; RADERSMA, R.; GRIJPMA, D. W.; DIJKSTRA, P. J.; BLITTERSWIJK, C. A.; FEIJEN, J. Microspheres for protein delivery prepared from amphiphilic multiblock copolymers. 2. Modulation of release rate. **Journal of Controlled Release**, v. 67, p. 249-260, 2000.

BHARDWAJ, S. B, SHUKLA, A. J., COLLINS, C.C. Effect of varying drug loading on particle size distribution and drug release kinetics of verapamil hydrochloride microspheres prepared with cellulose esters. **Journal of Microencapsulation**, v. 12, n. 1, p. 71-81, 1995.

BLAGBROUGH, I. S.; DAYKIN, M. M.; DOHERTY, M.; PATTRICK, M.; & SHAW, P. N. High-performance liquid chromatographic determination of naproxen, ibuprofen and diclofenac in plasma and synovial fluid in man. **Journal of Chromatography**, v. 578, p. 251-257, 1992.

BROOKS, P. M. & DAY, R. O. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: differences and similarities. **New England Journal of Medicine**, v. 324, p. 1716-1725, 1991.

BURT, H. M.; JACKSON, J. K.; BAINS, S. K.; LIGGINS, R. T.; OKTABA, A. C.; ARSENAULT, A. L.; HUNTER, W. L. Controlled delivery of taxol from microspheres composed of a blend of ethylene-vinyl acetate copolymer and poly (D, L- lactic acid). **Cancer Letters**, v. 88, p. 73-79, 1995.

CALABRO, J. J. Efficacy of diclofenac in ankylosing spondylitis. **American Journal of Medicine**, v. 80, p. 58-63, 1986.

CÁRCAMO E. C. **Introducción a la Farmacocinética**. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington, D. C., 1982.

CARSTENSEN, J. T. **Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms**. Pennsylvania: Technomic Publishing Company, Inc. 1993. p.215-216.

CHA, Y. and PITT, C. G. A one week subdermal delivery system for L-methadone based on biodegradable microcapsules. **Journal of Controlled Release**, v. 7, p. 69-78, 1988.

CHA, Y. and PITT, C. G. The biodegradability of polyester blends. **Biomaterials**, v. 11, p. 108-112, 1990.

CHANDRASHEKAR, G.; UDUPA, N. Biodegradable injectable implant systems for long term drug delivery using poly(lactic-co-glycolic) acid copolymers. **Journal of Pharmacy. and Pharmacology**, v.48, p. 669-674, 1996.

CHAWLA, V.; TIWARY, A. K.; GUPTA, S. Characterization of polyvinylalcohol microspheres of diclofenac sodium: application of statistical design. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.26, n.6, p. 675-680, 2000.

CHIAO, C. S. and PRICE, J. C. Formulation, preparation and dissolution characteristics of propranolol hydrochloride microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 11, n. 2, p. 153-9, 1994.

COSTA, P. J. C. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n.2, p. 141-152, 2002.

CLIVE, D. M. & STOFF, J. S. Renal syndromes associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **New England Journal of Medicine** v. 310, p. 563-572, 1984.

DEASY, P. B. **Drug and The Pharmaceutical Sciences: Microencapsulation and Related Drug Process**. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 361.

EASTMAN. Cellulose esters for pharmaceutical drug delivery. Disponível em: <<http://www.eastman.com>>. Acessado em dezembro de 2000.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *In vivo* bioequivalence guidances. **Pharmacopeial Forum**, v. 19, p. 6501-6508, 1993.

FELT, O, BURI, P. and GURNY, R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 11, p. 979-993, 1998.

GIUNCHEDI, P.; TORRE, M. L.; MAGGI, L.; CONTI, B.; CONTE, U. Cellulose acetate trimellitate ethylcellulose blends for non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 13, n. 1, p. 89-98, 1996.

GIAGOUDAKIS, G. and MAEKANTONIS, S.L. An alternative high-performance liquid-chromatographic method for the determination of diclofenac and flurbiprofen in plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, p. 897-901, 1998.

GOHEL, M. C. and AMIN, A. F. Formulation optimization of controlled release diclofenac sodium microspheres using factorial design. **Journal of Controlled Release**, v. 51, p. 115-122, 1998.

GOHEL, M. C., AMIN, A. F. Formulation design and optimization of modified-release microspheres of diclofenac sodium. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 2, p. 247-51, 1999.

GRANDFILS, C.; FLANDROY, P.; JÉRÔME, R. Control of the biodegradation rate of poly(DL-lactide) microparticles intended as chemoembolization materials. **Journal of Controlled Release**, v. 38, p.109-122, 1996.

GUIMARÃES, L. F. L. & COLLINS, C. H. **Cromatografia líquida de alta eficiência. Detectores usados em CLAE**. In: COLLINS, C. H. BRAGA, G. L. & BONATO, P. S. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas, Editora da UNICAMP, 1993, p. 218-223.

HAWKEY, C. J. Healing and prevention of NSAID-induced peptic ulcers. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 201, p. 42-44, 1994.

HAUSCHKE, D.; STEINIJANS, V. W. & DILETTI, E. A distribution-free procedure for the statistical analysis of bioequivalence studies. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.**, v. 28, p. 72-78, 1990.

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

HOLLINGER, M. A., RANADE, M. A. Role of polymers in drug delivery systems. In: **Drug delivery systems**. Boca Raton: CRC Press, 1996. p. 53-94.

HOSNY E. A.; AL-HELW, A. R. M. & AL-DARDIRI, M. A. Comparative study of in-vitro release and bioavailability of sustained release diclofenac sodium from certain hydrophilic polymers and commercial tablets in beagle dogs **Pharmaceutica Acta Helveticae** v. 72, p. 159-164, 1997.

HOSNY E. A.; EL-MAHROUK, G. M. & GOUDA, M. W.. Formulation and in-vitro and in vivo availability of diclofenac sodium enteric-coated beads. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 661-666, 1998.

HOSNY, E. A., AL-HELW, A. A. M. Effect of coating of aluminum carboxymethylcellulose beads on the release and bioavailability of diclofenac sodium. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v. 72, p. 255-261, 1998.

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

HUDSON, N.; HAWTHORNE, A. B.; COLE, A. T.; JONES, P. D. & HAWKEY, C. J. Mechanisms of gastric and duodenal damage and protection. **Hepatogastroenterology (Suppl. 1)**, v. 39, p. 31-36, 1992.

HYON, S. Biodegradable poly (lactic acid) microspheres for drug delivery systems. **Yonsei Medical Journal**, v. 41, n.6, p. 720-734, 2000.

JANI, G. K.; GOHEL, M. C. Effects of selected formulation parameters on the entrapment of diclofenac sodium in ethyl cellulose microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 43, p. 245-250, 1997.

KATZHENDLER, I.; AZOURY, R.; FRIEDMAN, M. Crystalline properties of carbamazepine in sustained release hydrophilic matrix tablets based on hydroxypropyl methylcellulose. **Journal of Controlled Release**, v. 54, p. 69-85, 1998.

KARNES, H. T.; SHIU, G.; SHAH, V. P. Validation of bioanalytical methods. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 4, p. 421-426, 1991.

KHAWLA, A A, CONTRERAS, L. G. and LU, D. R. Preparation and Evaluation of Sustained Release AZT-loaded Microspheres: Optimization of the Release Characteristics Using Response Surface Methodology. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 2, p. 144-149, 1996.

KIPPER, M. J.; SHEN, E.; DETERMAN, A.; NARASIMHAN, B. Design of an injectable system based on bioerodible polyanhydride microspheres for sustained drug delivery. **Biomaterials**, v. 23, p. 4405-4412, 2002.

KHIDR, S. H., NIAZY, E. M., EL-SAYED, V. M. Preparation and evaluation of sustained-release metoclopramine hydrochloride microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 12, n. 6, p. 651-660, 1995.

KHIDR, S. H., NIAZY, E. M., EL-SAYED, V. M. Development and in vitro evaluation of sustained release meclofenamic acid microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 15, n. 2, p. 153-62, 1998.

KITAJEMA, M.; KONDO, N.; MORISHITA, M.; ABEL, J. **U. S. Patent**, v. 3, p. 714, 1973.

KUMAR, V., BANKER, G. S. Chemically modified cellulosic polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 19, n. 1-2, p. 1-31, 1993.

KUMBAR, S. G.; KULKARNI, A. R.; AMINABHAVI, M. Crosslinked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of crosslinking agent. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 2, p. 173-180, 2002.

LACASSE, F. X., HILDGEN, P., PERODIN, J., ESCHER, E., PHILLIPS, N. and McMULLEN, J. N. Improved activity of a new angiotensin receptor antagonist by an injectable spray-dried polymer microsphere preparation. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 7, p. 887-891, 1997.

LAU, C. E.; DOLAN, S. & TANG, M. Microsample determination of diazepam and its three metabolites in serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography Biomedical Application**, v. 416, p. 212-218, 1987.

LE CORRE, P.; LE GUEVELLO, P.; GAJAN, J.; CHEVANNE, F.; LE VERGE, R. Preparation and characterization of bupivacaine-loaded polylactide and polylactide-co-glycolide microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 107, p. 41-49, 1994.

LE BLANC, P-P.; AIACHE, J-M.; BESNER, J-G.; BURI, P.; LESNE, M. **Tratado de Biofarmácia e Farmacocinética**. Montreal: Instituto Piaget, 1997, p. 135-151.

LEWIS, L., BONI, R. L., ADEYEYE, C. M. Effect of emulsifier blend on the characteristics of sustained release diclofenac microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 15, n. 3, p. 283-98, 1998a.

LEWIS, L., BONI, R. L., ADEYEYE, C. M. The physical and chemical stability of suspensions of sustained-release diclofenac microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 15, n. 5, p. 555-67, 1998b.

LI, W. I.; ANDERSON, K. W.; DELUCCA, P. P. Kinetic and thermodynamic modeling of the formation of polymeric microspheres using solvent extraction/ evaporation method. **Journal of Controlled Release**, v. 17, p.187-198, 1995.

LINHARD, R. Biodegradable polymers for controlled release of drugs. In: ROSOFF, M. **Controlled Release of Drugs: Polymers and aggregate systems**. New York: VCH Publisher Inc., 1988. p.53-85.

MEDEIROS, D.C.; LEMOS-SENNA, E. Desenvolvimento de sistemas de liberação microparticulares de antiinflamatórios não esteroidais como formas farmacêuticas intermediárias na preparação de cápsulas de gelatina dura de ação prolongada. **53º Reunião Anual da SBPC, 8º Jornada Nacional de Iniciação Científica**. Salvador-BA, 2001, p. 60.

MENDES, G. B. B.; FRANCO, L. M.; MORENO, R. A.; FERNANDES, A. G.; MUSCARÁ, M. N. & DE NUCCI, G. Comparative bioavailability of two suspension formulations of potassium diclofenac in healthy male volunteers. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 26, p. 399-405, 1994.

McEVOY, G. K. **AHFS Drug Information**. Bethesda: American Society of Hospital Pharmacists, Inc., 1990. p. 1008-1013.

McEVOY, G. K. **AHFS Drug Information**. Bethesda: American Society of Hospital Pharmacists, Inc., 2000.

McNEIL, V. NSAIDS - A double-edged sword. **Hosp. Pharm.**, v.28, p.53-55, 1993.

MELO, J. M. S. (Ed.). **(DEF) Dicionário de Especialidades Farmacêuticas**. 28ed. Rio de Janeiro: Editora de publicações científicas LTDA, 1999.

MI, F.; LIN, Y.; WU, Y.; SHYU, S.; TSAI, Y. Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug-delivery system: phase-separation, degradation and release behavior. **Biomaterials**, v. 23, p. 3257-3267, 2002.

MICROMEDEX. Anti-inflammatory drugs, nonsteroidal (systemic). Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acessado em março de 2003.

OGAWA, Y., YAMAMOTO, M., OKADA, H., YASHIKI, T., SHIMAMOTO, T. A new technique to efficiently entrapment leuprolide acetate into microcapsules of polyactic acid or copoly (lactic/glycolic) acid. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 36, p. 1095, 1988.

PALOMO, M. E.; BALLESTEROS, M. P.; FRUTOS, P. Analysis of diclofenac sodium and derivatives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.21, p. 83-94, 1999.

PARK, T. G.; COHEN, S.; LANGER, R. Poly L-lactic acid: Pluronic blends. Characterisation of phase separation behaviour, degradation and morphology and use as protein releasing matrices. **Macromolecules**, v. 25, p. 116-122, 1992.

PILLAI, O. and PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Current Opinion in**

Chemical Biology, v.5, p. 447-451, 2001.

PRISTA, L. N., ALVES, A. C., MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 5ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. v.2. p. 662.

RADWAN, M. A.; PRICE, J. C.; TACKETT, R. L. In vitro release of disopyramide from cellulose acetate butyrate microspheres. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 12, n. 21, p. 1453-1462, 1995.

REYNOLDS, J. E. F. **Martindale. The Extra Pharmacopoeia**. 29ed. London: The Pharmaceutical Press, 1989. p. 12-21.

SALMONSON, T. Current practice of bioavailability/bioequivalence requirements for immediate release products in European Union. In: MIDHA, K. K. & NAGAI, T. **Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics Studies**. International Conferences of International Pharmaceutical Federation "Bio-International '96", Tokyo, Business Center for Academic Societies Japan (BCASJ), 1996, p. 51-55.

SANTOS, S. R. C. J.; DONZELLA, H.; BERTOLINE, M. A.; PEREIRA, M. D.; OMOZAKO, C. E.; PORTA, V. Simplified micromethod for the HPLC measurement of diclofenac in plasma. **Brazilian Journal Medicine Biological Research**, v.25, p. 125-128, 1992.

SCHALL, R.; LUUS, H. G.; STEINIJANS, V. W.; HAUSCHKE, D. Choice of characteristics and their bioequivalence ranges for the comparison of absorption rates of immediate-release drug formulations. **Internacional Journal Clinical Pharmacology Therapeutical**, v. 32, n. 7, p. 323-328, 1994.

SCHOMOLKA, I. R. A review of block polymer surfactants. **Journal of the American oil Chemists Society**, v. 54, p. 110-116, 1977.

SHARGEL, L. & YU, A. B. C. Physiologic factors related to drug absorption. In: **Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics**. Norwalk, Connecticut, USA, Appleton & Lange, 3rd edition, 1993, cap.7, p. 111-134.

SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I. J.; SKELLY, J. P.; YACOBI, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C. T.; COOK, C. E.; MCDOWELL, R. D.; PITTMAN, K.A. & SPECTOR, S. Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 82 p.1-7, 1992.

SHUKLA, A J. and PRICE, J. C. Effect of Drug (Core) Particle Size on the Dissolution of Theophylline from Microspheres Made from Low Molecular Weight Cellulose Acetate Propionate. **Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 5, p. 418-421, 1989.

SILVA, J. P., FERREIRA, J. P. Effect of drug properties on the release from CAP microspheres prepared by solvent evaporation method. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, n.1, p. 95-103, 1999.

SOLL, A. H.; WEISTEIN, W. M.; KURATA, J. & McCARTHY, D. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peptic ulcer disease. **Ann. Intern. Med.**, v. 114, p.307-319, 1991.

STEINIJANS, V. W.; HARTMANN, M.; HUBER, R. & RADKE, H. W. Lack of pharmacokinetic interaction as an equivalence problem. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.**, v. 29, p. 323-328, 1991.

VILA JATO, J. L. (Ed). **Tecnología farmacéutica – Formas farmacéuticas**. 5ed. Madrid: Editorial Síntesis, S. A.,v.2, 1997.

WADE, A., WELLER, P. S. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 2. Ed. London: The Pharmaceutical Press, 1994.

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

WATTS, P. J. DAVIES, M. C. MELIA, C. D. Microencapsulation using emulsification/solvente evaporation: An Overview of techniques and applications. **Critical. Review. Therapy. Drug Carrier System**, v. 7, n.3, p. 235-259, 1990.

YAMADA, K.; FURUYA, A.; AKIMOTO, M.; MAKI, T. SUWA, T & OGATA, H. Evaluation of gastrointestinal transit controlled-beagle dog as a suitable animal model for bioavailability testing of sustained-release acetaminophen dosage form. **Internacional Journal Pharmaceutical**, v.119, p.1-10, 1995.

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

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

YEH, M.; DAVIS, S. S.; COOMBES, A. G. A. Improving protein delivery from microparticles using blends of poly(DL lactide co-glycolide) and poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) copolymers. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 11, p. 1693-1698, 1996.

YEH, M. The stability of insulin in biodegradable microparticles based on blends of lactide polymers and polyethylene glycol. **Journal of Microencapsulation**, v. 17, n. 6, p. 743-756, 2000.

YUAN, J.; WU, S. H. Comprimidos de liberação controlada via compressão direta: Um estudo de viabilidade usando acetato de celulose e acetato butirato de celulose. **Pharmaceutical Technology**, p.34-42, 2001.

ZANETTI, B. G. **Desenvolvimento de microesferas de carbamazepina visando o prolongamento da liberação do fármaco**. Florianópolis, 2001.(dissertação de

mestrado). Curso de Pós Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina.

ZANETTI, B. G.; SOLDI, V.; LEMOS-SENNA, E. Efeito da adição de polietilenoglicóis nas formulações de microesferas de acetobutirato de celulose sobre a eficiência de encapsulação da carbamazepina e morfologia das partículas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n.2, p. 229-235, 2002.

**ANEXO 1 - PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO NA COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAIS (CEUA).**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética no Uso de Animais

Fone: (048) 331-9206 Fax: (048) 331-9599

e-mail: dap@reitoria.ufsc.br

Ofício nº 117/CEUA/DAP/PRPG

Florianópolis, 09 de dezembro de 2002.

Senhor Professor,

Em relação ao Protocolo de pesquisa cadastrado sob os nºs 185 e 23080.019170/2002-91, intitulado “**Estudo de biodisponibilidade de formulações farmacêuticas de captopril, carbamazepina e diclofenaco de sódio em cães**”, em reunião do 06/12./2002 a CEUA, deliberou o seguinte:

- APROVADO por 2 (dois) anos, a partir dessa data, para utilização de 12 cães beagle, durante o período.

O pedido de revalidação do presente credenciamento, caso seja do interesse de V.Sa, deverá vir acompanhado de relatório detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido à resultados objetivos (por exemplo, anexando cópias dos resultados obtidos tais como trabalhos em revistas indexadas ou não, teses ou dissertações, resumos em congressos, capítulos de livros, processos e patentes, etc.) e/ou benefícios resultantes da pesquisa para seres humanos e/ou para animais, sejam estes benefícios de natureza acadêmica, aplicada, industrial, etc.

Atenciosamente,

Presidente-CEUA/PRPG/UFSC
Prof. Dr. Jamil Assreuy



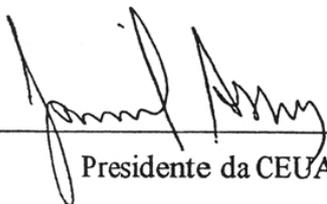
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética no Uso de Animais
Fone: (048) 331-9206 - Fax: (048) 331-9599
e-mail: prpg@reitoria.ufsc.br

CERTIFICADO DE CREDENCIAMENTO

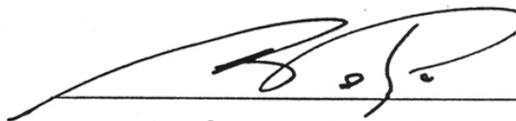
Certificamos que o Protocolo de Pesquisa/Ensino cadastrado sob os números 185/CEUA e 23080.019170/2002-91, intitulado “**Estudo de biodisponibilidade de formulações farmacêuticas de captropil, carbamazepina e diclofenaco de sódio em cães**”, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a) **Anicleto Poli**, do Departamento de Farmacologia, do Centro de Ciências Biológicas; está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA)/UFSC, em 06 de dezembro de 2002.

Este certificado expira em 06/12/2004.

Florianópolis, 09 de dezembro de 2002.



Presidente da CEUA



Professor responsável

ANEXO 2 - CURVAS DE CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA INDIVIDUAL E PRINCIPAIS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS OBTIDOS NOS ESTUDOS DE BIODISPONIBILIDADE DE CÃES DA RAÇA BEAGLE APÓS ADMINISTRAÇÃO DE DFS NA FORMA DE MICROESFERAS E VOLTAREN SR75.

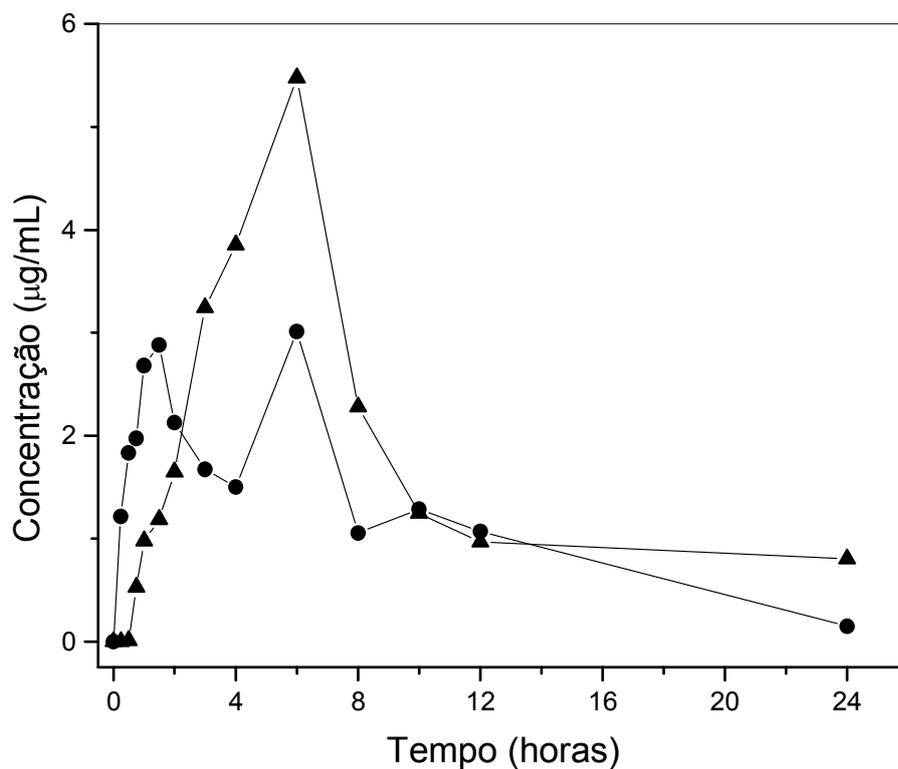


Figura 1. Curvas das concentrações plasmáticas de DFS em função do tempo obtidas em cão (n° 62) da raça Beagle após a administração oral de 75 mg de diclofenaco de sódio na forma de (●) microesferas e (▲) Voltaren SR 75. Análise por HPLC.

Tabela 1. Principais parâmetros farmacocinéticos obtidos no estudo de biodisponibilidade realizado no cão n° 62 após administração de DFS na forma de microesferas e Voltaren SR75.

Cão 62	DFS	
	Microesferas	Voltaren
$AUC_{[0-24]} (\mu g h ml^{-1})$	28,32	40,94
$AUC_{[0-\infty]} (\mu g h ml^{-1})$	29,30	43,71
$C_{max} (\mu g/mL)$	3,01	5,48
$t_{max} (h)$	6,0	6,0

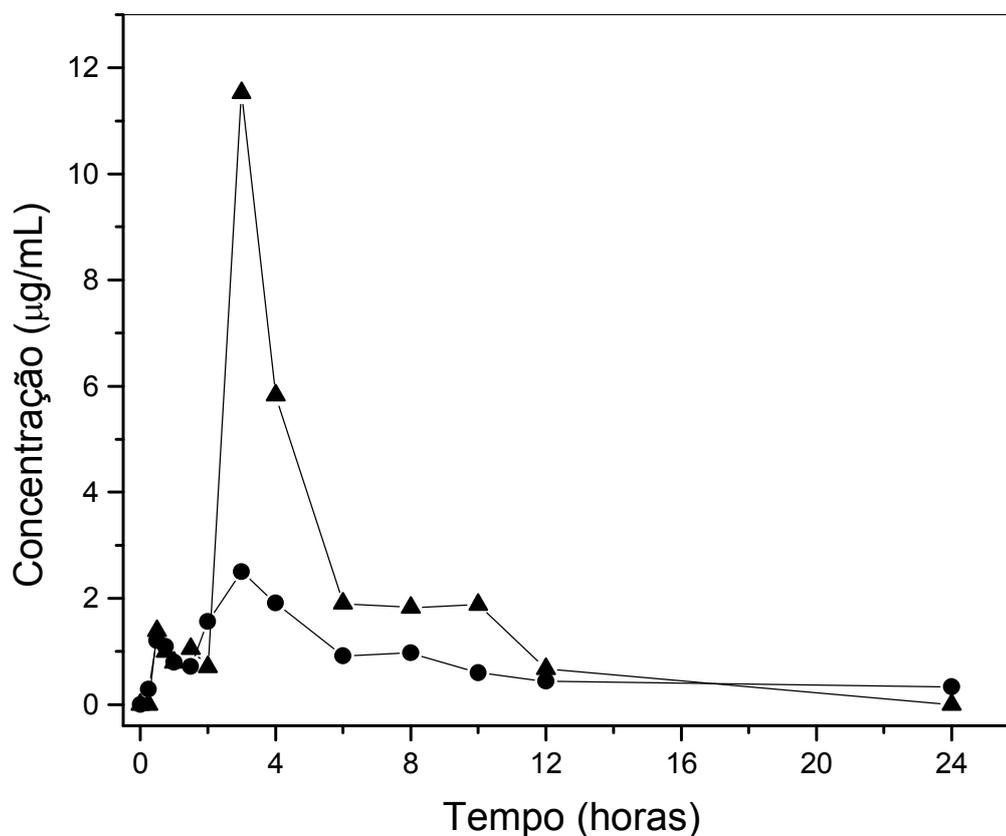


Figura 2. Curvas das concentrações plasmáticas de DFS em função do tempo obtidas em cão (n° 45) da raça Beagle após a administração oral de 75 mg de diclofenaco de sódio na forma de (●) microesferas ou (▲) Voltaren. Análise por HPLC.

Tabela 2. Principais parâmetros farmacocinéticos obtidos no estudo de biodisponibilidade realizado no cão n° 45 após administração de DFS na forma de microesferas e Voltaren SR75.

Cão 45	DFS	
	Microesferas	Voltaren
$AUC_{[0-24]} (\mu g h ml^{-1})$	17,87	38,10
$AUC_{[0-\infty]} (\mu g h ml^{-1})$	19,84	38,10
$C_{max} (\mu g/mL)$	2,51	11,52
$t_{max} (h)$	3,0	3,0

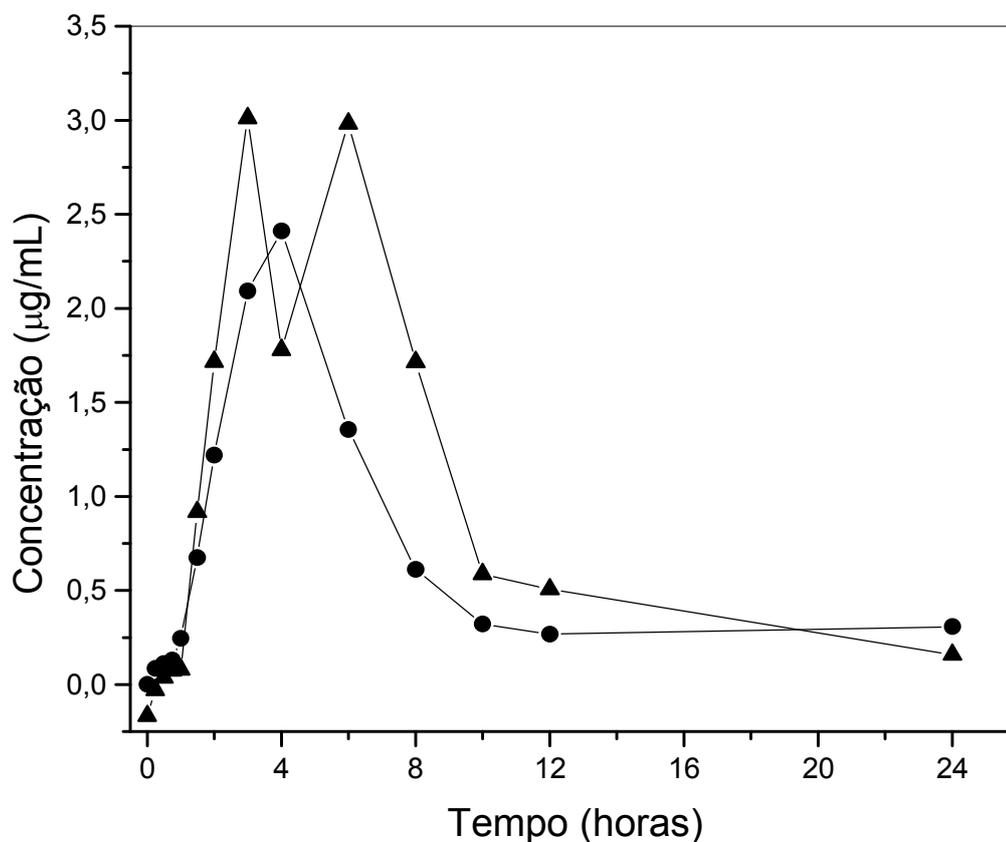


Figura 3. Curvas das concentrações plasmáticas de DFS em função do tempo obtidas em cão (n^o 66) da raça Beagle após a administração oral de 75 mg de diclofenaco de sódio na forma de (●) microesferas e (▲) Voltaren. Análise por HPLC.

Tabela 3. Principais parâmetros farmacocinéticos obtidos no estudo de biodisponibilidade realizado no cão n^o 66 após administração de DFS na forma de microesferas e Voltaren SR75.

Cão 66	DFS	
	Microesferas	Voltaren
$AUC_{[0-24]} (\mu g h ml^{-1})$	15,42	24,40
$AUC_{[0-\infty]} (\mu g h ml^{-1})$	16,47	26,08
$C_{max} (\mu g/mL)$	2,41	3,01
$t_{max} (h)$	4,0	3,0

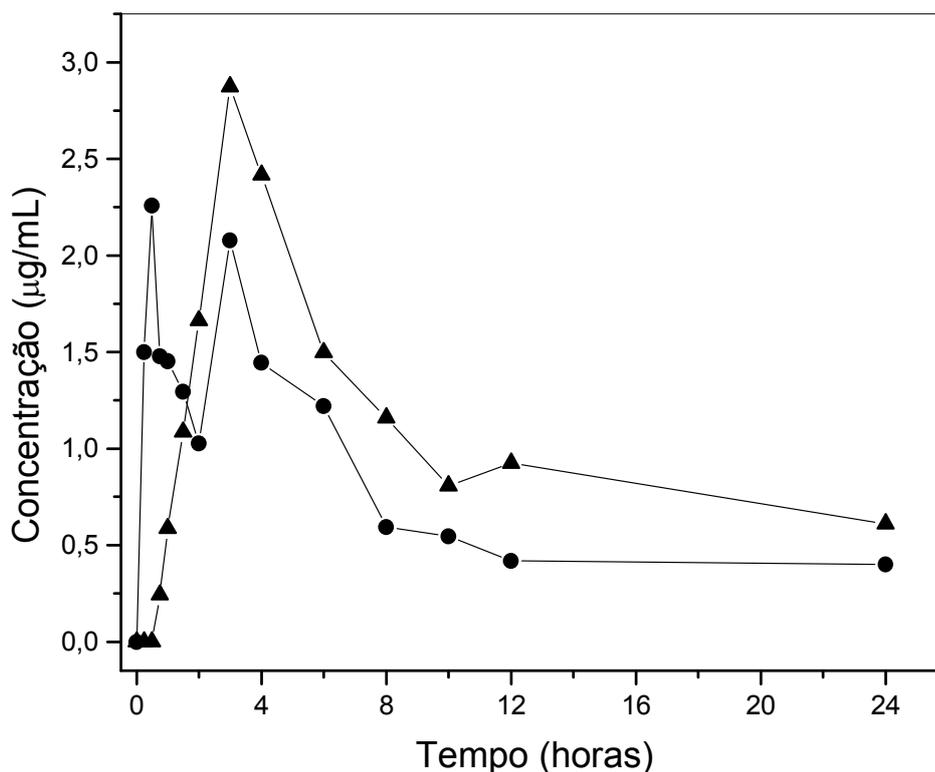


Figura 4. Curvas das concentrações plasmáticas de DFS em função do tempo obtidas em cão (n° 50) da raça Beagle após a administração oral de 75 mg de diclofenaco de sódio na forma de (●) microesferas e (▲) Voltaren. Análise por HPLC.

Tabela 4. Principais parâmetros farmacocinéticos obtidos no estudo de biodisponibilidade realizado no cão n° 50 após administração de DFS na forma de microesferas e Voltaren SR75.

Cão 50	DFS	
	Microesferas	Voltaren
$AUC_{[0-24]} (\mu g h ml^{-1})$	17,58	25,64
$AUC_{[0-\infty]} (\mu g h ml^{-1})$	19,84	29,01
$C_{max} (\mu g/mL)$	2,26	2,87
$t_{max} (h)$	0,50	3,0

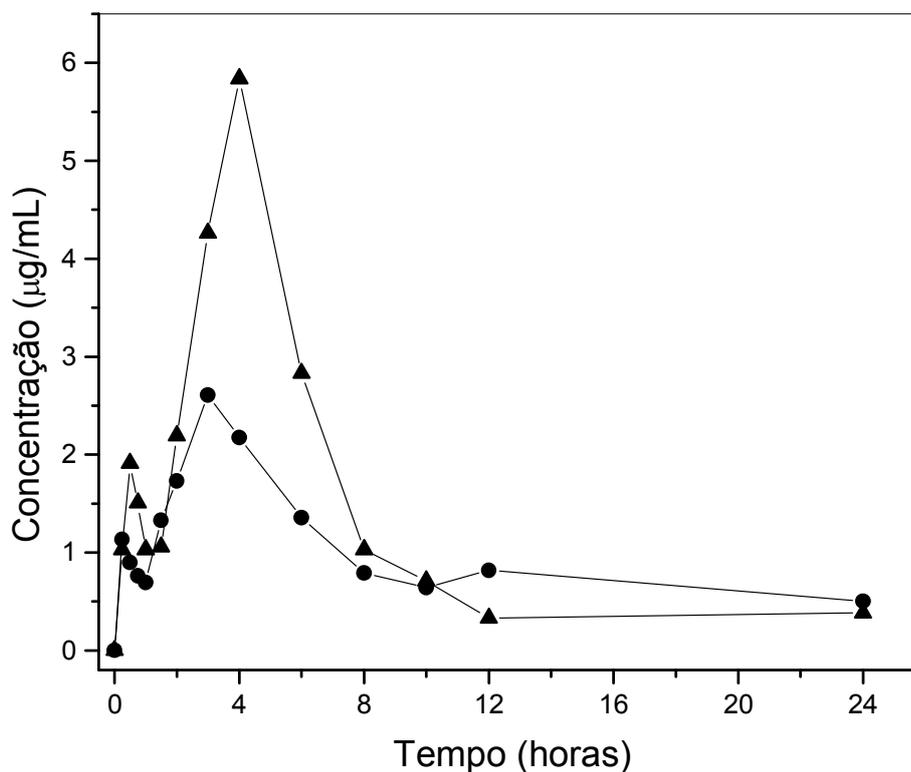


Figura 5. Curvas das concentrações plasmáticas de DFS em função do tempo obtidas em cão (n° 92) da raça Beagle após a administração oral de 75 mg de diclofenaco de sódio na forma de (●) microesferas e (▲) Voltaren. Análise por HPLC.

Tabela 5. Principais parâmetros farmacocinéticos obtidos no estudo de biodisponibilidade realizado no cão n° 92 após administração de DFS na forma de microesferas e Voltaren SR75.

Cão 92	DFS	
	Microesferas	Voltaren
$AUC_{[0-48]} (\mu g h ml^{-1})$	23,08	30,43
$AUC_{[0-\infty]} (\mu g h ml^{-1})$	25,45	31,50
$C_{max} (\mu g/mL)$	2,61	5,84
$t_{max} (h)$	3,0	4,0

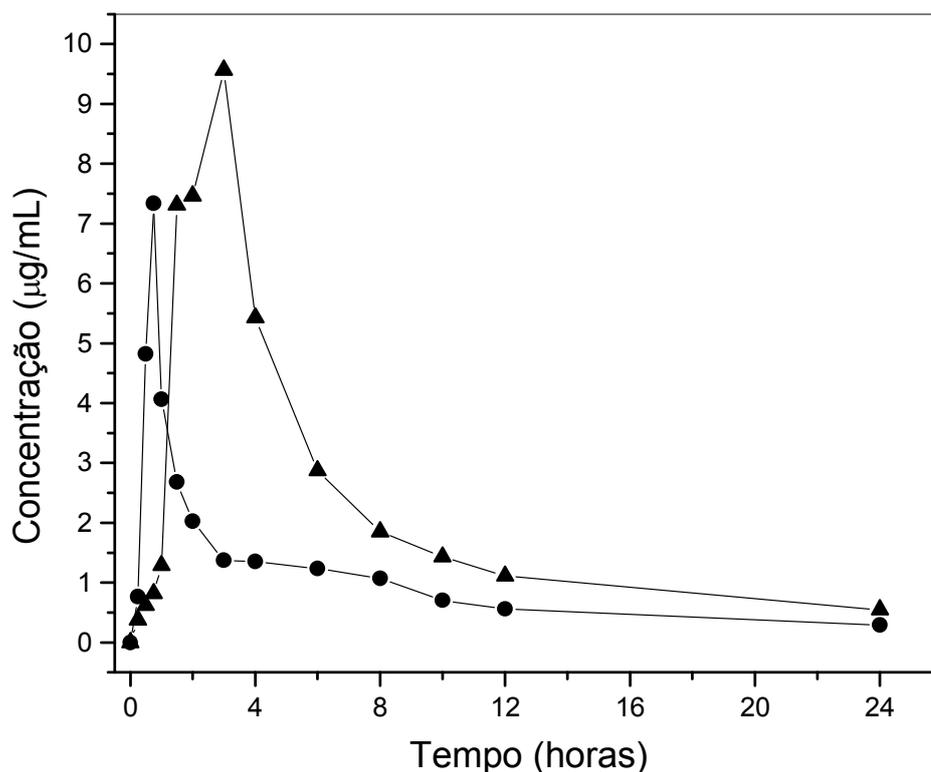


Figura 6. Curvas das concentrações plasmáticas de DFS em função do tempo obtidas em cão (n^o P) da raça Beagle após a administração oral de 75 mg de diclofenaco de sódio na forma de (●) microesferas e (▲) Voltaren. Análise por HPLC.

Tabela 6. Principais parâmetros farmacocinéticos obtidos no estudo de biodisponibilidade realizado no cão n^o P após administração de DFS na forma de microesferas e Voltaren SR75.

Cão P	DFS	
	Microesferas	Voltaren
AUC _[0-24] ($\mu\text{g h mL}^{-1}$)	22,88	51,25
AUC _[0-∞] ($\mu\text{g h mL}^{-1}$)	25,57	54,71
C _{max} ($\mu\text{g/mL}$)	7,34	9,56
t _{max} (h)	0,75	3,0