



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

**DESENVOLVIMENTO DE MICROESFERAS DE IBUPROFENO
A PARTIR DOS BIOPOLÍMEROS POLIHIDROXIALCANOATOS.
ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS
DAS MICROESFERAS SOBRE O PERFIL DE LIBERAÇÃO DO
FÁRMACO E DEGRADAÇÃO DAS PARTÍCULAS.**

FRANÇOISE CARMIGNAN

**FLORIANÓPOLIS
2006**



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

**DESENVOLVIMENTO DE MICROESFERAS DE IBUPROFENO
A PARTIR DOS BIOPOLÍMEROS POLIHIDROXIALCANOATOS.
ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS
DAS MICROESFERAS SOBRE O PERFIL DE LIBERAÇÃO DO
FÁRMACO E DEGRADAÇÃO DAS PARTÍCULAS.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Farmácia como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em
Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Elenara M.
T. Lemos-Senna

FRANÇOISE CARMIGNAN

**FLORIANÓPOLIS
2006**

***Aos meus pais,
Gessi e Aldir.***

Agradecimentos

À Profa. Dra. Elenara Lemos-Senna pela orientação, dedicação, oportunidades e paciência em todos os momentos desta caminhada.

À Profa. Dra. Angela Campos e ao Prof. Dr. Valdir Soldi pelos ensinamentos, contribuições e disponibilidades.

À Marli Soldi pelos conselhos e auxílios prestados nas análises, em especial, no programa Origin.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Farmacêuticas, principalmente a Sandra, Nilson e Solange pela atenção, amizade e ajuda fornecida durante a realização do trabalho.

Aos amigos e colegas do mestrado, especialmente Geci, Taty morena, Márcia, Andréa e Taty loira pelo companheirismo, colaboração, bons momentos compartilhados, almoços e cafés regados a conversas interessantes, inteligentes e engraçadas.

Aos meus pais que proporcionaram e incentivaram do começo ao fim mais esta etapa de minha vida.

Aos amigos (de fora do mestrado) que no decorrer deste processo fui conhecendo e ajudaram no meu crescimento pessoal, em especial a Rafa, Leila, Vivi, Cyntia e Zé.

Obrigada!!!!

***“E sem saber
que não podia fazê-lo
foi lá e fez”***

(Autor desconhecido)

SUMÁRIO

| | |
|---|--------------|
| LISTA DE TABELA | X |
| LISTA DE FIGURAS | XII |
| LISTA DE SIGLAS E ABREVEATURAS | XV |
| RESUMO | XVII |
| ABSTRACT | XVIII |
| 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS | 19 |
| 1.1 Introdução | 20 |
| 1.2 Objetivo | 23 |
| 1.2.1 Objetivo Geral | 23 |
| 1.2.2 Objetivos Específicos | 23 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 25 |
| 2.1 Microencapsulação | 26 |
| 2.1.1 Definições, interesses e técnicas | 26 |
| 2.1.2 Ibuprofeno | 28 |
| 2.2 Polihidroxicanoatos | 32 |
| 2.2.1 Revisão histórica | 32 |
| 2.2.2 Biossíntese dos polihidroxicanoatos | 35 |
| 2.2.3 Características físicas e físico-químicas | 40 |
| 2.2.4 Degradabilidade dos polihidroxicanoatos | 42 |
| 2.2.4.2 Degradação enzimática | 44 |
| 2.2.5 Toxicidade e biocompatibilidade dos polihidroxicanoatos | 45 |
| 2.2.6 Emprego dos polihidroxicanoatos no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos | 47 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 54 |
| 3.1 Materiais | 55 |
| 3.1.1 Matérias-primas | 55 |
| 3.1.2 Reagentes e solventes | 55 |
| 3.1.3 Equipamentos | 56 |
| 3.2 Metodologia | 57 |
| 3.2.1 Preparação das microesferas | 57 |
| 3.2.1.1 Preparação de microesferas brancas e contendo ibuprofeno | 57 |
| 3.2.2 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação de | |

| | |
|--|----|
| ibuprofeno nas microesferas utilizando espectrofotometria de absorção no ultravioleta | 58 |
| 3.2.2.1 Preparação da curva de calibração do ibuprofeno | 58 |
| 3.2.2.2 Determinação do tempo de extração do ibuprofeno a partir das microesferas | 59 |
| 3.2.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de ibuprofeno nas microesferas | 59 |
| 3.2.2.4 Análise estatística | 59 |
| 3.2.3. Caracterização físico-química das microesferas | 60 |
| 3.2.3.1 Avaliação da morfologia das partículas | 60 |
| 3.2.3.2 Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica das partículas | 60 |
| 3.2.3.3 Determinação da porosidade das partículas | 60 |
| 3.2.3.4 Análise Térmica | 61 |
| 3.2.3.4.1 Calorimetria Exploratória Diferencial | 61 |
| 3.2.3.4.2 Termogravimetria | 61 |
| 3.2.3.5 Difração de Raio-X | 61 |
| 3.2.3.6 Espectrofotometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier | 62 |
| 3.2.4 Avaliação do perfil de liberação do ibuprofeno a partir das microesferas | 62 |
| 3.2.4.1 Determinação do ibuprofeno por cromatografia líquida de alta eficiência | 62 |
| 3.2.4.1.1 Condições cromatográficas | 62 |
| 3.2.4.1.2 Preparação da curva de calibração | 62 |
| 3.2.4.2 Determinação da solubilidade do ibuprofeno em solução tampão fosfato (0,02 M) pH 7,4 | 63 |
| 3.2.4.3 Avaliação do perfil de liberação do ibuprofeno a partir das microesferas | 63 |
| 3.2.5 Estudo de degradação <i>in vitro</i> das microesferas de PLAGA, P(3HB) e P(3HB-co-3HV) | 64 |
| 3.2.5.1 Ensaio de degradação térmica <i>in vitro</i> das microesferas | 64 |
| 3.2.5.2 Ensaio de degradação <i>in vitro</i> das microesferas em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C | 64 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.5.3. Caracterização dos produtos de degradação | 65 |
| 3.2.5.3.1 Determinação do pH | 65 |
| 3.2.5.3.2 Análise dos monômeros no meio de degradação | 65 |
| 3.2.5.3.2.1 Análise do ácido glicólico e ácido lático por CLAE | 65 |
| 3.2.5.3.2.1.1 Condições cromatográficas | 65 |
| 3.2.5.3.2.1.2 Preparação da solução padrão de ácido glicólico e ácido lático | 65 |
| 3.2.5.3.2.2 Análise do ácido butírico, ácido crotônico e ácido valérico por CLAE | 66 |
| 3.2.5.3.2.2.1 Condições cromatográficas | 66 |
| 3.2.5.3.2.2.2 Preparação da solução padrão de ácido butírico, ácido crotônico e ácido valérico | 66 |
| 3.2.5.4 Caracterização das microesferas após ensaio de degradação.. | 66 |
| 3.2.5.4.1 Avaliação da morfologia | 66 |
| 3.2.5.4.2 Análise por calorimetria exploratória diferencial | 66 |
| 3.2.5.4.3 Difração de Raio-X | 67 |
| 3.2.5.4.4 Análise por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier | 67 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 68 |
| 4.1 Preparação das microesferas | 69 |
| 4.1.1 Preparação das microesferas | 69 |
| 4.2 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de fármaco nas microesferas de ibuprofeno | 71 |
| 4.3 Caracterização físico-química das microesferas | 77 |
| 4.3.1 Avaliação da morfologia | 77 |
| 4.3.2 Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica das partículas | 82 |
| 4.3.3. Análise da porosidade das partículas por adsorção de gás | 84 |
| 4.3.4 Análise Térmica | 87 |
| 4.3.4.1 Calorimetria Exploratória Diferencial | 87 |
| 4.3.4.2 Termogravimetria | 95 |
| 4.3.5 Difração de Raio-X | 96 |
| 4.3.6 Espectrofotometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier | 100 |

| | |
|--|------------|
| 4.4 Avaliação do perfil de liberação do ibuprofeno das microesferas | 103 |
| 4.4.1 Determinação do ibuprofeno por CLAE | 104 |
| 4.4.2 Avaliação do perfil de liberação do ibuprofeno a partir das microesferas | 106 |
| 4.5. Estudo de degradação <i>in vitro</i> das microesferas de PLAGA, P(3HB) e P(3HB-co-3HV) | 111 |
| 4.5.1 Caracterização dos produtos de degradação | 114 |
| 4.5.1.1 Determinação do pH | 114 |
| 4.5.1.2. Determinação dos produtos de degradação por CLAE | 115 |
| 4.5.2 Caracterização das microesferas após degradação | 121 |
| 4.5.2.1 Avaliação da morfologia das partículas | 121 |
| 4.5.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial | 127 |
| 4.5.2.3 Difração de Raio-X | 128 |
| 4.5.2.4 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier | 130 |
| 5 CONCLUSÕES | 133 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 137 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|--|----|
| TABELA 1 | Propriedades físico-químicas do ibuprofeno..... | 29 |
| TABELA 2 | Produção do polihidroxicanoato por várias bactérias..... | 37 |
| TABELA 3 | Absorbâncias das soluções de ibuprofeno obtidas por espectrofotometria de absorção no ultravioleta | 72 |
| TABELA 4 | Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração do ibuprofeno | 73 |
| TABELA 6 | Valores de eficiência de encapsulação e teor de fármaco nas microesferas..... | 74 |
| TABELA 7 | Tratamento das respostas obtidas na análise fatorial da eficiência de encapsulação (%)...... | 75 |
| TABELA 8 | Análise de variância realizada no estudo da influência dos fatores de formulação sobre os valores de eficiência de encapsulação das microesferas..... | 75 |
| TABELA 9 | Valores médios de eficiência de encapsulação e diferenças absolutas entre as médias obtidas em cada um dos tratamentos..... | 76 |
| TABELA 10 | Valores obtidos na determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica das microesferas por granulometria laser..... | 83 |
| TABELA 11 | Valores obtidos após determinação da porosidade das partículas por adsorção a gás..... | 87 |
| TABELA 12 | Resultados obtidos após análise das microesferas de PLAGA brancas e contendo ibuprofeno por DSC..... | 90 |
| TABELA 13 | Resultados obtidos após análise das microesferas de PHB e PHBV brancas e contendo ibuprofeno por DSC..... | 93 |
| TABELA 14 | Valores de temperatura de T _{pico} e percentuais de perda de massa dos materiais puros e das microesferas..... | 96 |
| TABELA 15 | Valores de intensidade dos picos de difração de raios-x obtidos a partir dos espectros do fármaco, polímeros e microesferas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV)..... | 99 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| TABELA 16 | Áreas de pico obtidas após análise das soluções do ibuprofeno padrão por CLAE | 105 |
| TABELA 17 | Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração do ibuprofeno por CLAE | 106 |
| TABELA 18 | Dados de regressão obtidos após aplicação do modelo de Higushi nos perfis de liberação do ibuprofeno a partir das microesferas..... | 111 |
| TABELA 19 | Valores de pH do meio de degradação no início e 30 e 90 dias de ensaio | 114 |
| TABELA 20 | Resultados obtidos após análise das microesferas de PLAGA brancas por DSC, antes e após incubação | 127 |
| TABELA 21 | Resultados obtidos após análise das microesferas de P(3HB) brancas por DSC, antes e após incubação | 128 |
| TABELA 22 | Resultados obtidos após análise das microesferas de P(3HB-co-3HV) brancas por DSC, antes e após incubação ... | 128 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| FIGURA 1 | Estrutura química do ibuprofeno..... | 29 |
| FIGURA 2 | Rota biossintética da produção de P(3HB)..... | 38 |
| FIGURA 3 | Estrutura química geral dos polihidroxicanoatos..... | 40 |
| FIGURA 4 | Esquema de preparação das microesferas de PLAGA, P(3HB) e P(3HB-co-3HV) brancas e contendo ibuprofeno | 58 |
| FIGURA 5 | Curva de calibração de ibuprofeno obtida por espectrofotometria de absorção no ultravioleta..... | 72 |
| FIGURA 6 | Micrografias obtidas por MEV das microesferas de PLAGA, P(3HB) e P(3HB-co-3HV) brancas | 79 |
| FIGURA 7 | Micrografias obtidas por MEV das microesferas de PLAGA, P(3HB) e P(3HB-co-3HV) contendo ibuprofeno (1:2) | 80 |
| FIGURA 8 | Micrografias obtidas por MEV das microesferas de PLAGA, P(3HB) e P(3HB-co-3HV) contendo ibuprofeno (1:4) | 81 |
| FIGURA 9 | Representação gráfica da distribuição granulométrica das microesferas obtida pela técnica de difração a laser..... | 83 |
| FIGURA 10 | Curvas de DSC obtidas a partir do ibuprofeno, PLAGA e microesferas de PLAGA brancas e contendo ibuprofeno (1:2) e (1:4) | 90 |
| FIGURA 11 | Curvas de DSC obtidas a partir do ibuprofeno, P(3HB) e microesferas de P(3HB) brancas e contendo ibuprofeno (1:2) e (1:4)..... | 92 |
| FIGURA 12 | Curvas de DSC obtidas a partir do ibuprofeno, P(3HB-co-3HV) e microesferas de P(3HB-co-3HV) brancas e contendo ibuprofeno (1:2) e (1:4)..... | 93 |
| FIGURA 13 | Espectros de difração do raio-x obtidos a partir do ibuprofeno, PLAGA e microesferas de IBF:PLAGA (1:4)..... | 97 |
| FIGURA 14 | Espectros de difração do raio-x obtidos a partir do ibuprofeno, P(3HB), P(3HB) tratado e microesferas de IBF:P(3HB) (1:4)..... | 98 |
| FIGURA 15 | Espectros de difração do raio-x obtidos a partir do ibuprofeno, P(3HB-co-3HV) e microesferas de IBF:P(3HB-co-3HV) (1:4)..... | 99 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| FIGURA 16 | Espectros FT-IR obtidos a partir de microesferas brancas e de IBF:PLAGA (1:2), ibuprofeno e PLAGA | 101 |
| FIGURA 17 | Espectros FT-IR obtidos a partir de microesferas brancas e de IBF:P(3HB) (1:2), ibuprofeno, P(3HB)..... | 102 |
| FIGURA 18 | Espectros FT-IR obtidos a partir de microesferas brancas e de IBF:P(3HB-co-3HV) (1:2), ibuprofeno e P(3HB-co-3HV)..... | 102 |
| FIGURA 19 | Curva de calibração do ibuprofeno obtida por CLAE..... | 105 |
| FIGURA 20 | Perfis de liberação do ibuprofeno a partir das microesferas de PLAGA, P(3HB) e P(3HB-co-3HV)..... | 108 |
| FIGURA 21 | Cromatogramas da solução dos padrões de ácido glicólico e ácido láctico e da solução obtida após degradação térmica das microesferas brancas de PLAGA | 117 |
| FIGURA 22 | Cromatogramas da solução dos padrões de ácido butírico, ácido valérico e ácido crotonico, solução coletada após 90 dias de degradação e solução obtida após degradação térmica das microesferas de P(3HB)..... | 120 |
| FIGURA 23 | Cromatogramas da solução dos padrões de ácido butírico e ácido valérico, solução coletada após 90 dias de degradação e solução obtida após degradação térmica das microesferas de P(3HB-co-3HV)..... | 121 |
| FIGURA 24 | Micrografias obtidas por MEV das microesferas de PLAGA brancas e contendo ibuprofeno em 0 dia e após 90 dias de incubação | 123 |
| FIGURA 25 | Micrografias obtidas por MEV das microesferas de P(3HB) brancas e contendo ibuprofeno em 0 dia e após 90 dias de incubação | 125 |
| FIGURA 26 | Micrografias obtidas por MEV das microesferas de P(3HB-co-3HV) brancas e contendo ibuprofeno em 0 dia e após 90 dias de incubação | 126 |
| FIGURA 27 | Espectros de raio-x obtidos a partir das microesferas de PLAGA antes e após a incubação..... | 129 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| FIGURA 28 | Espectros de raio-x obtidos a partir das microesferas de P(3HB) antes e após a incubação..... | 129 |
| FIGURA 29 | Espectros de raio-x obtidos a partir das microesferas de P(3HB-co-3HV) antes e após a incubação..... | 129 |
| FIGURA 30 | Espectros de FT-IR obtidos a partir das microesferas de PLAGA antes e após a incubação | 130 |
| FIGURA 31 | Espectros de FT-IR obtidos a partir das microesferas de P(3HB) antes e após a incubação..... | 131 |
| FIGURA 32 | Espectros de FT-IR obtidos a partir das microesferas de P(3HB-co-3HV) antes e após a incubação | 131 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVEATURAS

| | |
|----------------------|---|
| Å | Angstrom |
| σ | Desvio padrão |
| q | Nível de significância do teste de Tukey |
| ΔH_{exp} | Entalpia de fusão encontrada no experimento |
| 3HH | 3-hidroxihexanoato |
| 3HB | 3-hidroxibutírico |
| 3HV | 3-hidroxivalérico |
| AINES | Antiinflamatórios não esteroidais |
| BET | Brunauer, Emmet e Teller |
| BJH | Barret, Joyner e Halenda |
| BSA | Albumina sérica bovina |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| CV% | Coeficiente de variação |
| d.m.s. | Diferença mínima significativa |
| DSC | Calorimetria exploratória diferencial |
| FDA | Food and drug administration |
| FT-IR | Infravermelho com transformada de Fourier |
| GL | Grau de liberdade |
| IBF | Ibuprofeno |
| M | Molar |
| MEV | Microscopia eletrônica de varredura |
| n | Número de repetições dos tratamentos |
| PCL | Poli-caprolactona |
| PEG | Polietilenoglicol |
| PHA | Polihidroxialcanoatos |
| P(3HB) | Poli(3-hidroxibutirato) |
| P(3HB)tr | Poli(3-hidroxibutirato) após tratamento térmico |
| P(3HB-co-3HV) | Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) |
| P(3HB-co-3HV-co-4HB) | Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato-co-4-hidroxibutirato) |
| P(3HV) | Poli(3-hidroxivalerato) |

| | |
|---------|-------------------------------------|
| PLA | Poli(ácido láctico) |
| PLAGA | Poli(DL-ácido láctico-co-glicólico) |
| PM | Peso molecular |
| P/P_0 | Pressão relativa |
| p/p | Peso por peso |
| p/V | Peso por volume |
| PVA | Álcool polivinílico |
| QMR | Quadrado médio do resíduo |
| R^2 | Coeficiente de regressão |
| rpm | Rotações por minuto |
| TG | Termogravimetria |
| T_m | Temperatura de fusão |
| T_g | Transição vítrea |
| UV | Ultravioleta |
| v/v | Volume por volume |
| X_c | Grau de cristalinidade estimado |

RESUMO

Polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres de hidroxiácidos estereoregulares encontrados em uma ampla variedade de bactérias, constituindo reserva de carbono e poder redutor para estes microorganismos. As suas características de biodegradabilidade e biocompatibilidade os tornam materiais promissores para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos. Ibuprofeno (IBF) é um antiinflamatório não esteroidal (AINES) utilizado para o tratamento da osteoartrite e artrite reumatóide aguda e crônica. Este fármaco apresenta baixa meia vida biológica, necessitando de várias administrações e, portanto, é um bom candidato para a microencapsulação. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver microesferas de IBF de liberação prolongada para a administração parenteral a partir dos PHAs, como o poli(3-hidroxiбутирато) (P(3HB)) e seu copolímero poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiуалерато) (P(3HB-co-3HV)). O perfil de liberação do IBF a partir das microesferas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) e de degradação das partículas foram avaliados e comparados com aqueles obtidos com as formulações de microesferas preparadas a partir do poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLAGA). A técnica de emulsão/evaporação do solvente foi utilizada para a preparação de microesferas, empregando-se o diclorometano e água como fase interna e externa, respectivamente. A proporção fármaco para polímero foi de 1:4 e 1:2. A eficiência de encapsulação e teor do IBF nas microesferas foi estimada após determinação da concentração do fármaco por espectrofotometria de absorção no ultravioleta a 265 nm. As microesferas foram caracterizadas quanto à morfologia das partículas, tamanho e distribuição granulométrica, porosidade, área superficial, tamanho e volume de poros. Partículas esféricas foram obtidas para todas as formulações testadas. Em contraste à superfície lisa das microesferas de PLAGA, as microesferas de PHAs apresentaram-se porosas. Igualmente, maiores valores de eficiência de encapsulação foram obtidos para as microesferas de PHAs, quando comparado com aqueles das microesferas de PLAGA. Os resultados obtidos por DSC e raio-x indicaram que o IBF encontra-se parcialmente disperso na forma molecular na matriz polimérica, quando a proporção de fármaco:polímero 1:4 foi empregada. Entretanto, as microesferas de PLAGA demonstraram ser amorfas, enquanto a natureza semicristalina foi verificada na matriz de PHAs. A liberação do IBF a partir das microesferas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) foi cerca de 69 e 58%, respectivamente, nas primeiras horas. O maior controle de liberação foi obtido com o uso do PLAGA. A porosidade e a localização do fármaco nas partículas pareceram ser os fatores responsáveis pela rápida liberação do IBF, a partir das microesferas de PHAs. Finalmente, a degradação *in vitro* das microesferas foi realizada em condições fisiológicas (pH 7,4) por 90 dias. O conjunto dos resultados obtidos no estudo de degradação indicou, sobretudo a partir da análise morfológica, DSC e medidas de pH do meio após incubação, que as microesferas de PLAGA sofreram maior degradação hidrolítica, sendo que a mesma foi acelerada pela presença do IBF. Apesar da CLAE ter indicado a formação de produtos de degradação do P(3HB) e P(3HB-co-3HV) em temperatura elevada, estes produtos não foram identificados após 90 dias de incubação das microesferas em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C, mesmo na presença do fármaco. Por outro lado, estudos de MEV sugeriram que regiões amorfas das microesferas de P(3HB) sofreram degradação, uma vez que grandes poros foram visualizados nas partículas. A incorporação de 5% de HV no copolímero não pareceu alterar o perfil de degradação das microesferas.

Palavras-chave: microesferas, ibuprofeno, polihidroxicanoatos

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are stereoregular hydroxyacid polyesters produced by many bacteria, useful as a storage form of carbon and energy. These polymers are biodegradable and biocompatible and they have been considered promising materials for controlled delivery of therapeutic drugs. Ibuprofen (IBF) is a nonsteroidal antiinflammatory drug (NSAID) that can be used for the treatment of acute and chronic rheumatoid arthritis and osteoarthritis. This drug displays a short half-life, requiring several daily administrations. Therefore, the aim of this work was to prepare prolonged release ibuprofen-loaded microspheres for parenteral administration from poly (3-hydroxybutyrate) (P(3HB)) and its copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (P(3HB-co-3HV)). IBF release profile as well as particle degradation were evaluated and compared with those obtained for PLAGA microspheres formulations. The water in oil solvent/evaporation method was used to prepare the microspheres, employing methylene chloride and water as internal and external phase, respectively. The initial ratio of drug to polymer was 1:4 and 1:2. The encapsulation efficiency and IBF content were determined spectrophotometrically at 265 nm. The microspheres were characterized in respect of its morphology, mean diameter and size distribution, and porosity. Spherical particles were obtained for all formulations tested. In contrast to the smooth surface of the PLAGA, the PHAs microspheres presented a porous surface. Also, higher encapsulation efficiency values were obtained when PHAs were used as polymeric materials. The results obtained by DSC and X-ray indicated that the drug is partially dispersed in the molecular form in the matrix. However, the PLAGA microspheres demonstrated to be amorphous, while the semi crystalline property was verified for PHAs microspheres. The IBF release from P(3HB) and P(3HB-co-3HV) microspheres was around 69 and 58%, respectively, in the first hour. The control of the drug released was obtained using PLAGA to prepare the microspheres. Finally, *in vitro* degradation study of particles was realized in physiological conditions (pH 7,4) during 90 days. The results taken together indicated that PLAGA microspheres are degraded faster as evidenced by SEM, DSC. In this case, the presence of IBF accelerated the particle degradation. In spite of the degradation products of P(3HB) e P(3HB-co-3HV) have been identified by HPLC after exposition of microspheres at high temperatures, these products were not verified after 90 days of incubation in buffer phosphate pH 7.4 at 37 °C, even in the presence of the drug. On other hand, SEM suggested that amorphous regions of the P(3HB) microspheres underwent degradation, as large pores are visualized in the particles. The incorporation of 5% valerate to form the copolymer not appeared to change the degradation profile of microspheres.

Keywords: microspheres, ibuprofen, polyhydroxyalkanoates

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

O contínuo crescimento da área de medicamentos tem levado ao desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, principalmente os sistemas de liberação prolongada. Estes novos sistemas oferecem inúmeras vantagens de emprego, quando comparados com as formas farmacêuticas convencionais, as quais inclui, a melhoria na eficácia, redução da toxicidade, melhoria do conforto e adesão do paciente ao tratamento. Entre as várias estratégias empregadas para prolongar a liberação de fármacos, destaca-se a microencapsulação. Esta estratégia tem por objetivo encapsular sólidos ou líquidos dentro de matrizes ou sistemas reservatórios poliméricos (WATTS *et al.*, 1990).

Vários polímeros têm sido empregados na preparação de microesferas. Pode-se citar entre eles os poliésteres alifáticos, os copolímeros 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). Para a administração parenteral de micropartículas, polímeros biodegradáveis são claramente os materiais de escolha. Além disso, os requisitos de segurança, biocompatibilidade e baixa toxicidade do polímero e de seus produtos de degradação devem ser considerados no desenvolvimento destas formulações (WATHELEY, 1993). Enquanto a biodegradação é um processo natural pelo qual compostos orgânicos são convertidos a moléculas mais simples no ambiente biológico, o termo biocompatibilidade refere-se a aceitabilidade mútua entre o polímero e o ambiente fisiológico. Assim, a biocompatibilidade envolve tanto a influência do meio biológico sobre a degradação do polímero, quanto a resposta tecidual provocada pela presença do mesmo (POUTON & AKHTAR, 1996; CHANDRA & RUSTGI, 1998).

Poliésteres alifáticos biodegradáveis, tais como poli(ácido lático) (PLA) e seu copolímero poli(ácido lático-co-glicólico) (PLAGA), são freqüentemente usados na preparação de sistemas de liberação microparticulados. Estes polímeros sofrem hidrólise química ou enzimática de suas ligações ésteres no meio aquoso dos fluidos biológicos, formando produtos de degradação nos

quais são metabolizados à dióxido de carbono e água, via ciclo de Krebs, ou que são excretados pelos rins. Fatores como configuração da cadeia polimérica, teor de ácido glicólico no copolímero e massa molar podem ser alterados com o objetivo de modular a velocidade de biodegradação desses polímeros e, conseqüentemente, a velocidade de liberação do fármaco. Além disso, o tamanho da partícula da microesfera afeta a velocidade de degradação. Partículas menores que 5 µm, quando administradas podem sofrer fagocitose por macrófagos e células gigantes sendo rapidamente biodegradadas (GRANDFILS *et al.*, 1996; ANDERSON & SHIVE, 1997).

Uma outra classe de polímeros genericamente conhecida como polihidroxicanoatos (PHAs) tem representado imenso potencial para aplicação farmacêutica, uma vez que oferecem uma alternativa como matéria prima para a obtenção de formas farmacêuticas de liberação controlada para a via parenteral. Estes polímeros são poliésteres de hidroxiácidos estereoregulares opticamente ativos, não sendo produzidos por síntese química, mas biossinteticamente por bactérias a partir de matérias primas naturais, podendo ser prontamente degradados por microorganismos em diferentes condições. O mais comum dos PHAs, é o homopolímero poli (3-hidroxi butirato) (P(3HB)) e seu copolímero com hidroxivalerato (P(3HB-co-3HV)) (LEE, 1996; POUTON & AKHTAR, 1996; ZINN *et al.*, 2001).

O P(3HB) foi descoberto primeiramente em *Bacillus megaterium* por Lemoigne em meados de 1920, tendo sido subseqüentemente encontrado em vários microorganismos incluindo bactérias do solo, microflora estuária e algas verdes-azuis. A maior função do P(3HB) nos microorganismos é para servir como uma fonte de energia intracelular e forma de armazenamento de carbono. O polímero é acumulado em grânulos na membrana celular da bactéria, da qual pode ser extraído diretamente com solventes orgânicos como o clorofórmio, ou por técnicas de ruptura mecânica, química e enzimática da parede celular. A percentagem de P(3HB) na célula bacteriana é baixa, cerca de 1 a 30%, mas sob condições de fermentação controlada de excesso de carbono e limitação de nitrogênio, há uma super produção do polímero,

podendo alcançar cerca de 80% de massa de célula seca (POUTON & AKHTAR, 1996).

A degradação hidrolítica do P(3HB) leva à formação do monômero ácido D-(-)-3-hidroxi-butírico. Este ácido é um constituinte normal do sangue e, em comum com acetoacetato e acetona, é uma das três cetonas corporais produzidas endogenamente por um processo conhecido como cetogênese. A degradação *in vitro* do P(3HB) tem demonstrado ser relativamente lenta quando comparada à degradação do PLAGA, mas os copolímeros P(3HB-co-3HV)s demonstraram ser mais rapidamente degradados do que o homopolímero. Além disso, estudos evidenciaram que a composição do copolímero, massa molar, técnica de fabricação, pH, temperatura, além, da presença dos constituintes do plasma afetam a velocidade de degradação (ZINN *et al.*, 2001). Desta maneira é possível esperar que a velocidade de degradação das microesferas preparadas a partir desses polímeros, assim como, a velocidade de liberação de fármacos encapsulados seja passível de ser modulada. Além disso, a obtenção a nível nacional, destes produtos, os tornam mais acessíveis e econômicos no desenvolvimento de novos sistemas de liberação.

O ibuprofeno é um antiinflamatório não esteroide (AINES) utilizado para o tratamento da osteoartrite e artrite reumatóide aguda e crônica. Este fármaco possui efeitos adversos, em comum com outros AINES, tais como diarreia, náuseas, vômitos e irritação gástrica (CLARKE, 2004). Devido a sua meia vida biológica relativamente curta, de cerca de 1 a 3 horas, e devido a seus efeitos colaterais, o ibuprofeno é um potencial candidato para a obtenção de formas farmacêuticas de liberação prolongada, principalmente para a administração intramuscular, na forma de depósitos que liberariam o fármaco numa velocidade constante. Por outro lado, especial interesse tem sido dado à administração intra-articular de AINES, como alternativa ao uso de corticosteróides. Entretanto, seu curto tempo de meia vida no líquido sinovial faz com que eles sejam administrados várias vezes, para a manutenção dos níveis intra-articulares terapêuticos. Neste sentido, a obtenção de microesferas

de liberação prolongada, com vistas à administração intra-articular deste fármaco, também parece ser um objetivo interessante a ser alcançado.

Diante das considerações descritas acima, este trabalho visa preparar e caracterizar microesferas de ibuprofeno, com vistas à administração parenteral, empregando-se uma nova classe de biopolímeros biocompatíveis e biodegradáveis, denominada de polihidroxialcanoatos, para a obtenção da matriz polimérica. A possibilidade de prolongamento da liberação do fármaco será avaliada e relacionada às características físico-químicas das microesferas, e ao tipo de polímero empregado. Os resultados de degradação *in vitro* e liberação do fármaco serão comparados com aqueles obtidos para as microesferas fabricadas a partir do PLAGA.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Preparar microesferas de ibuprofeno, com vistas à administração parenteral, usando polihidroxialcanoatos P(3HB) e P(3HB-co-3HV), assim como o PLAGA para a obtenção da matriz polimérica, e avaliar as características de liberação e de degradação das partículas.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar microesferas de ibuprofeno utilizando a técnica de emulsão/evaporação do solvente a partir dos polímeros PLAGA e dos polihidroxialcanoatos, P(3HB) e P(3HB-co-3HV).
- Caracterizar e comparar as diferentes formulações de microesferas quanto ao tamanho, morfologia, eficiência de encapsulação e teor do fármaco.

- Avaliar e comparar as características de cristalinidade das diferentes formulações de microesferas.
- Avaliar os perfis de liberação do ibuprofeno *in vitro* a partir das microesferas preparadas com diferentes poliésteres alifáticos.
- Comparar os resultados obtidos com as diferentes formulações no que se refere ao prolongamento da liberação do fármaco.
- Avaliar a degradação *in vitro* das microesferas brancas e contendo ibuprofeno em pH fisiológico.
- Comparar os perfis de liberação do ibuprofeno a partir das microesferas correlacionando com as suas características de degradação *in vitro*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROENCAPSULAÇÃO

2.1.1 Definições, interesses e técnicas

As limitações das formas farmacêuticas convencionais para a liberação de fármaco são bem conhecidas. Quando uma dose é administrada, a concentração plasmática do fármaco aumenta até obtenção de um pico, decrescendo rapidamente após sua metabolização e excreção. A administração de uma nova dose produz um segundo pico plasmático e um modelo cíclico pode ser assim estabelecido, conduzindo a flutuações na concentração do fármaco e ao aparecimento de possíveis efeitos tóxicos (SWARBRICK & BOYLAN, 1990). Dessa forma, a utilização de sistemas de liberação prolongada tem como propósito manter os níveis plasmáticos constantes na faixa de concentração terapêutica, por meio da contínua liberação do fármaco, reduzindo o número de doses e os efeitos adversos, e melhorando a adesão do paciente ao tratamento. Neste intuito, a adesão do paciente, relaciona-se não somente à simplificação do regime de administração, como também, à aceitação do medicamento em termos de um perfil favorável de tolerabilidade (WATTS *et al.*, 1990).

Neste contexto, a microencapsulação de fármacos, empregando polímeros naturais ou sintéticos, tem sido considerada uma boa estratégia para a obtenção de formas farmacêuticas de liberação prolongada, melhoria da estabilidade de fármacos ou ainda, para a vetorização de substâncias ativas em sítios específicos; as micropartículas resultantes podem ser administradas por via tópica, oral ou parenteral. Estas partículas possuem formato esférico, apresentando diâmetro médio entre 1 μm a algumas centenas de micrômetros, podendo ser classificadas segundo a sua estrutura em microesferas ou microcápsulas. São denominadas microesferas, as partículas compactas constituídas por uma matriz polimérica na qual a substância ativa encontra-se distribuída no seu estado sólido ou molecular e, microcápsulas são partículas constituídas por um núcleo interno contendo o fármaco, recoberto por uma camada de polímero de espessura variável (LI *et al.*, 1995; LINHARDT, 1998).

Várias técnicas são descritas na literatura para a preparação de microesferas. A aspersão em torre de secagem, também chamada de nebulização ou spray drying, é um procedimento que se baseia na pulverização de uma solução polimérica contendo o fármaco em uma câmara de secagem. Sob o termo de coacervação ou separação de fases estão agrupadas outra série de técnicas de microencapsulação envolvendo a desolvatação do polímero, induzida por algum procedimento que conduza à alteração das características do meio, tais como pela mudança de temperatura, pH ou adição de um não solvente, sal ou outro polímero incompatível (VILA JATO, 1997).

Entre as técnicas de microencapsulação de fármacos, o método de emulsificação/evaporação do solvente tem sido freqüentemente empregado face à simplicidade dos procedimentos envolvidos na obtenção das partículas e à possibilidade de modulação das características físicas e físico-químicas das mesmas. A versatilidade desta técnica permite uma ampla adequabilidade no que se refere a classes de medicamentos e estrutura do sistema, uma vez que há fatores passíveis de otimização, tais como as características físico-químicas das substâncias empregadas, que determinam as propriedades do produto final. Esta técnica consiste em emulsificar uma solução orgânica do polímero e fármaco (fase interna) em uma solução aquosa contendo agente emulsificante (fase externa). O solvente é removido pela aplicação de calor, vácuo ou ainda pela evaporação em temperatura ambiente, com auxílio de agitação, levando a formação de partículas esféricas. Estas, por sua vez, são separadas por filtração ou centrifugação, lavadas com solvente apropriado e liofilizadas (WATTS *et al.*, 1990).

A estrutura final e composição das microesferas são resultantes de uma complexa contribuição das características físicas e físico-químicas do polímero, fármaco, solvente e agente emulsificante, bem como os parâmetros envolvidos na preparação, como agitação, temperatura, volume e concentração das substâncias empregadas (WATTS *et al.*, 1990).

A liberação do fármaco a partir de uma matriz polimérica consiste na combinação de várias etapas de transferência do mesmo entre os diferentes sítios da partícula. Por outro lado, a liberação de fármacos pode estar associada à erosão da matriz, tornando-se mais complexo o mecanismo de liberação, quando a degradação da microesfera ocorre concomitante com o fenômeno de difusão (LI *et al.*, 1995; LINHARDT, 1998; FREIBERG & ZHU, 2004). A relação fármaco/polímero, as características de solubilidade, cristalinidade e distribuição do fármaco, bem como o tamanho, a distribuição granulométrica e a porosidade das partículas são parâmetros a serem correlacionados com o perfil de liberação. Além disso, fatores como configuração da cadeia polimérica, peso molecular, pH, presença e composição do copolímero, podem ser avaliados com o objetivo de modular a velocidade de biodegradação dos polímeros e, conseqüentemente o perfil de liberação do fármaco (ANDERSON & SHIVE, 1997).

2.1.2 Ibuprofeno

O ibuprofeno ou o ácido 2-(4-isobutilfenil) propiônico (Figura 1) é um fármaco pertencente à classe dos antiinflamatórios não esteroidais (AINES), apresentando propriedades antipiréticas, analgésicas e antiinflamatórias. Encontra-se comercialmente disponível como uma mistura racêmica de dois isômeros ópticos, sendo que somente L-isômero do ibuprofeno apresenta atividade terapêutica. Entretanto, o D-isômero considerado clinicamente inativo é lentamente e incompletamente (cerca de 60%) convertido ao L-isômero *in vivo*, sugerindo que esta forma inativa atue como um reservatório circulante do fármaco (Mc EVOY, 2000). Este fármaco ocorre como um pó branco e cristalino, apresentando um leve odor característico. Suas principais propriedades físico-químicas encontram-se listadas na Tabela 1.

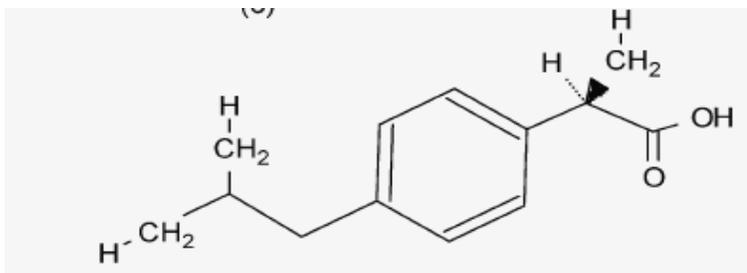


FIGURA 1. Estrutura química do ibuprofeno

TABELA 1. Propriedades físico-químicas do ibuprofeno (CLARKE, 2004).

| | | |
|--------------------------------|-------------|------------------------|
| Solubilidade | Água | Praticamente insolúvel |
| | Etanol | Solúvel 1:5 |
| | Clorofórmio | Solúvel 1:1 |
| | Éter | Solúvel 1:2 |
| Peso molecular | | 206,3 |
| Constante de dissociação (pKa) | | 4,4; 5,2 |
| Ponto de fusão (°C) | | 75 –77 °C |

O ibuprofeno é utilizado especialmente nos casos de dor e inflamação em processos articulares ou musculoesqueléticos, cefaléias, dismenorréia, dor e febre associada ao resfriado comum. Em doses mais elevadas tem sido utilizado no tratamento de doenças reumáticas. Como em outros AINES, o mecanismo de ação do ibuprofeno parece estar relacionado à inibição de prostaglandinas. Como analgésico, pode bloquear o impulso doloroso mediante ação periférica com redução da atividade da prostaglandina e de outras substâncias que sensibilizam os receptores da dor. Como antiinflamatório, pode atuar periféricamente no tecido inflamado, reduzindo a ação das prostaglandinas e de outros mediadores da resposta inflamatória. Atua como antitérmico por ação no centro hipotalâmico, regulador da temperatura, produzindo vasodilatação periférica, aumento da sudorese e perda de calor. O ibuprofeno age na dismenorréia, diminuindo a contração uterina, aumentando a

perfusão do útero e aliviando a dor por inibição da síntese de prostaglandinas intra-uterinas (GILMAN, 1996).

O ibuprofeno é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, atingindo a concentração plasmática máxima de 23-45 µg/mL e 56-66 µg/mL com doses de 400 mg e 800 mg, respectivamente. Possui meia-vida plasmática de curta duração, de cerca de 1-3 horas. Este fármaco liga-se extensivamente (cerca de 99%) às proteínas plasmáticas e passa lentamente para os espaços sinoviais, podendo permanecer em concentrações mais elevadas nestes locais, à medida que os níveis plasmáticos diminuem. Sofre biotransformação hepática e sua excreção é rápida e completa, mais de 90% da dose ingerida são excretados pela urina, sendo menos de 1% na forma inalterada e aproximadamente 99% como metabólitos, principalmente um composto hidroxilado e outro carboxilado (GILMAN, 1996; CLARKE, 2004).

O ibuprofeno tem sido utilizado em pacientes com úlcera péptica reconhecida ou história de intolerância gastrointestinal aos outros AINES. No entanto, o tratamento precisa ser interrompido em 10 a 15% dos pacientes, devido à intolerância ao fármaco. Os efeitos colaterais gastrointestinais ocorrem em 5 a 15% dos pacientes que usam ibuprofeno; dor epigástrica, náusea, vômito, diarreia, azia, cefaléia e pirose são as dificuldades habituais. Outros efeitos colaterais têm sido relatados com menos frequência, entre eles estão incluídos trombocitopenia, exantemas cutâneos, vertigem e visão embaçada (GILMAN, 1996).

Diante das considerações descritas acima, o ibuprofeno é um fármaco que apresenta características adequadas para o desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação prolongada. Vários estudos têm demonstrado o interesse da microencapsulação como estratégia para prolongar a liberação do ibuprofeno após administração oral e reduzir os danos provocados pelo fármaco à mucosa gastrointestinal. Entre os materiais testados para a obtenção das micropartículas encontram-se as resinas acrílicas da série Eudragit (KAWASHIMA *et al.*, 1991, 1993; PERUMAL, 2001; BOLOURTCHIAN *et al.*, 2005), derivados de celulose (DALAL & NARURKAR, 1991; DUBERNET *et al.*,

1991), álcoois e ésteres de ácidos graxos (ADEYEYE & PRICE, 1994; AL-KASSAS *et al.*, 1993; KAMBLE *et al.*, 2004) e derivados de metacrilatos (ORIENTI *et al.*, 1995).

Por outro lado, a administração parenteral, em particular a via intramuscular, produz um efeito geralmente mais rápido que a administração oral, sendo uma via promissora para utilização de sistemas microparticulados. Por esta via é possível formar depósitos do medicamento que permitem a manutenção da concentração plasmática em níveis mais constantes, reduzindo número de administrações diárias e, conseqüentemente, melhorando a adesão do paciente ao tratamento. Em adição, especial interesse tem sido dado à administração intra-articular de AINES, como alternativa ao uso de corticosteróides, que quando injetados podem provocar sérios efeitos adversos como a degeneração da cartilagem, riscos de reação anafilática e síndrome de Cushing. Entretanto, o curto tempo de meia-vida dos AINES no líquido sinovial requer administrações freqüentes para a manutenção dos níveis intra-articulares terapêuticos. Neste caso, sistemas de liberação prolongada, preparados a partir de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, parece ser uma estratégia interessante para a administração intra-articular de medicamentos.

Neste sentido, microesferas de ibuprofeno foram preparadas a partir do poli(ácido láctico-co-gliólico) PLAGA (50:50) apresentando vários pesos moleculares, pela técnica de emulsão evaporação do solvente. O Labrafil, um derivado de polietilenoglicol (PEG), foi adicionado à formulação com o intuito de modular a velocidade de liberação do fármaco e reduzir o efeito de liberação inicial ou efeito *burst*. Perfis de liberação aceitáveis, resultando em concentrações terapêuticas *in vitro* (8 µg/mL), foram conseguidos com a utilização de PLAGA de peso molecular de 34.000 daltons na presença de Labrafil (FERNANDEZ-CABALLIDO *et al.*, 2004).

ZHU e colaboradores (2005) prepararam microesferas de ibuprofeno pelo método de emulsificação/evaporação do solvente empregando o poli(ácido láctico) (PLA), poli-caprolactona (PCL) e seu copolímero em bloco P(LA-CL)

para a obtenção da matriz polimérica. Estudos de liberação mostraram que as microesferas de PCL conduziam à obtenção de um extenso efeito *burst* (80%), em comparação as microesferas de P(LA-CL) (50%) e PLA (18%). A obtenção de diferentes perfis de liberação do ibuprofeno, a partir das diferentes formulações, foi atribuída à diferença na cristalinidade dos polímeros estudados e ao estado físico do fármaco disperso na matriz polimérica.

2.2 POLIHIDROXIALCANOATOS

2.2.1 Revisão histórica

Polihidroxicanoatos (PHAs) são estocados na forma de grânulos por bactérias. A observação microscópica destes grânulos, como corpos refratários em bactérias, remonta a Beijerinck em 1888. Entretanto, a primeira determinação da composição de um PHA aconteceu somente em meados de 1927, com o trabalho de Lemoigne. Em bacilo *Bacillus megaterium*, a degradação anaeróbica de um material não conhecido levou a excreção de ácido 3-hidroxi-butírico. Lemoigne identificou este material como sendo o homopolímero do 3-hidroxi-butirato, ou poli-3-hidroxi-butirato (P(3HB)), e descreveu-o como um provável material de reserva. Durante os trinta anos seguintes, o interesse no P(3HB) ficou restrito à descrição de métodos de detecção e determinação do teor nas células e das condições de cultura que levasse a sua síntese e degradação pelo bacilo.

Uma convincente hipótese sobre a funcionalidade do P(3HB) foi primeiramente descrita por Macrae & Wilkinson em 1958. Estes pesquisadores observaram que *B. megaterium* estocava o homopolímero especialmente quando as reservas de glicose e nitrogênio no meio de cultivo eram altas, e que a subsequente degradação pelo *Bacillus areus* e *B. megaterium* ocorria rapidamente na ausência de carbono exógeno e de fonte de energia. Concluíram, então, que P(3HB) era um material de reserva para a obtenção de carbono e energia e sua síntese ocorria com o envolvimento dos complexos acetato e coenzima A. A partir destes resultados, o interesse no estudo do

P(3HB) aumentou drasticamente, ocorrendo importantes avanços no conhecimento sobre a ocorrência disseminada deste polímero em outros microorganismos, características físico-químicas, métodos de extração, detecção ou quantificação, metabolismo e regulação, e degradação (BRAUNEGG *et al.*, 1998).

O campo dos PHAs estava, então, bem desenvolvido, mas o interesse nos biopolímeros permaneceu direcionado somente a sua significância fisiológica, como substância de origem microbiológica. O interesse na utilização do P(3HB) como um tipo alternativo de material plástico surgiu somente na década de 70, em decorrência do aumento do preço e da escassez do petróleo, não somente porque poderia ser sintetizado a partir de fontes renováveis, mas também devido à semelhança das suas propriedades com o polipropileno. Outras características, particularmente de biodegradabilidade e biocompatibilidade, sustentaram o interesse da utilização do P(3HB), mesmo após a crise do petróleo ter passado (LEE, 1996; BRAUNEGG *et al.*, 1998).

Em 1974, Wallen e Rodwedder relataram o isolamento de um poliéster contendo unidades de ácido 3-hidroxi-valérico (3HV) e 3-hidroxi-butírico (3HB) como principais componentes, além de unidades de ácido 3-hidroxi-hexanóico e 3-hidroxi-heptanóico em menor quantidade. O interesse nestes polímeros, em particular nos copolímeros do 3HB e 3HV, formando o poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (P(3HB-co-3HV)), deve-se ao fato de apresentarem ponto de fusão mais baixo e serem menos cristalinos. Isto torna-os menos densos e mais maleáveis quando comparados ao P(3HB), tornando-os materiais mais promissores para sua aplicação em diversas áreas (BRAUNEGG *et al.*, 1998). Atualmente, uma variedade de P(3HB-co-3HV)s com diferentes teores de 3HV, produzidos pela bactéria *Ralstonia eutropha*, é fabricada com marca registrada BIOPOL® (Monsanto).

No Brasil, o desenvolvimento da tecnologia para a produção de PHAs como plásticos biodegradáveis e biocompatíveis teve início em meados da década de 90, através de um projeto cooperativo desenvolvido pelo Instituto de

Pesquisa e Tecnologia (IPT), Copersucar e Universidade de São Paulo, e usando carboidratos como material de partida, em especial derivados da cana-de-açúcar. Duas estratégias de busca do microorganismo ideal, em solo brasileiro, foram adotadas. A primeira visava a utilização de uma linhagem de coleção de culturas capazes de produzir o P(3HB) a partir de glicose e frutose, mas não a partir de sacarose. O Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo desenvolveu um trabalho de melhoramento genético da bactéria de modo a torná-la capaz de acumular o polímero utilizando a sacarose. Simultaneamente, o IPT partiu para um programa de isolamento e seleção de bactérias de solo capazes de utilizar a sacarose e produzir o P(3HB) com alta eficiência. Finalmente, o Laboratório de Fermentação Industrial desenvolveu uma estratégia de cultivo e acúmulo de PHA em biorreatores e, junto com a Copersucar, um processo de separação do polímero e ampliação de escala (IPT, 2006).

Em 1996, uma unidade piloto de produção foi instalada nas dependências da Usina da Pedra, interior do Estado de São Paulo, utilizando a tecnologia desenvolvida no país. A produção é realizada em tanques agitados e aerados, em condições controladas de pH, temperatura, oxigênio e aporte de matérias-primas. O copolímero P(3HB-co-3HV) é produzido pela adição concomitante de ácido propiônico e açúcar. O processo de separação e purificação do produto garante a obtenção de polímeros de alta pureza e peso molecular adequados. Dando prosseguimento ao projeto, um melhoramento genético foi realizado em *Burkholderia sacchari* IPT 101, obtendo-se um mutante IPT 189 que tem maior capacidade de acúmulo do copolímero P(3HB-co-3HV), quando alimentado com sacarose e ácido propiônico (IPT, 2006).

Outros inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos por diferentes grupos de pesquisa brasileiros. DINIZ e colaboradores (2004) obtiveram PHAs a partir de *Pseudomonas putida* IPT 046, utilizando como substrato carboidratos da cana-de-açúcar. PHAs de cadeia pequena foram obtidos a partir da *Ralstonia pickettii* por BONATTO e colaboradores, no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2004). A produção concomitante de P(3HB) e de álcool, por fermentação bacteriana,

vem sendo pesquisada pelo Centro de Tecnologia Copersucar de Piracicaba, usando o açúcar de cana invertido, sendo a energia necessária para a produção gerada pelo emprego de bagaço de cana (ROSSEL *et al.*, 2002).

Além de propriedades termoplásticas, que lhes permitem serem moldados ou transformados em filmes para aplicações diversas, os PHAs são também biocompatíveis. Em meados de 1990, estes polímeros tornaram-se importantes materiais para a aplicação médica e farmacêutica, principalmente para a utilização como suturas, próteses, suportes de culturas de tecido para implantes, e obtenção de formas farmacêuticas de liberação prolongada. O P(3HB) foi o polímero inicialmente estudado, bem como seu copolímero P(3HB-co-3HV). A utilização destes polímeros representa um custo muito menor, quando comparado aos polímeros sintéticos biodegradáveis convencionais, como o PLAGA, sem ressaltar a necessidade do desenvolvimento de novos materiais para aplicação médica, visto que muitos dos atualmente empregados podem causar efeitos malignos e câncer (IPT, 2006).

Entre as diferentes aplicações dos PHAs na área da saúde, destaca-se a obtenção de formas farmacêuticas de liberação prolongada, como as microesferas. O potencial de aplicação destes polímeros para a obtenção de matrizes poliméricas vem sendo extensivamente estudado pelo fato de representar uma alternativa para o desenvolvimento de novos medicamentos. Este interesse vem ao encontro da produção de novas formas farmacêuticas utilizando fármacos conhecidos, levando a novas perspectivas de utilização, com a redução do custo do seu desenvolvimento, particularmente em nível nacional.

2.2.2 Biossíntese dos polihidroxicanoatos

A principal função dos PHAs nos microorganismos é armazenar, dentro da célula, materiais que possam servir de reserva, como fonte de carbono e energia. Os polímeros são sintetizados e acumulados na forma de grânulos intracelulares, geralmente com limitação de um componente essencial ao

crescimento, como nitrogênio, fosfato, enxofre, oxigênio ou magnésio, na presença de um excesso de uma fonte de carbono (SALEHIZADEH & LOOSDRECHT, 2004). Os grânulos são esféricos; o número por célula e o tamanho podem variar conforme as diferentes espécies. Geralmente, são formados 8 a 13 grânulos por célula apresentando diâmetro médio de 100–800 nm, os quais encontram-se envolvidos por um tipo de micela monolamelar de aproximadamente 2-4 nm de espessura. Estes grânulos são sólidos e constituídos de 98% de polímero e 2% de proteína. A percentagem de PHAs na bactéria é baixa, cerca de 1 a 30%, mas sob condições de fermentação controlada, há uma super produção do polímero, podendo alcançar cerca de 80% de massa celular seca (POUTON & AKHTAR, 1996; KHANNA & SRIVASTANA, 2005).

Uma ampla variedade de microorganismos produzem PHAs (Tabela 2), incluindo bactérias do solo, microflora estuária e algas verdes-azuis (POUTON & AKHTAR, 1996; REDDY *et al.*, 2003). Dependendo do número de átomos de carbono da cadeia, dois tipos de PHAs podem ser obtidos: (i) cadeia curta (3–5 átomos de carbono) e (ii) cadeia média (6–14 átomos de carbono). Esta diferença ocorre principalmente devido à especificidade frente ao substrato, na síntese do polímero. Por exemplo, na síntese de PHAs, o *Alcaligenes eutophus* pode polimerizar 3HAs apresentando de 3 a 5 átomos de carbono, enquanto o *Pseudomonas oleovorans* podem somente aceitar 3HAs de 6 a 14 átomos de carbono (LEE, 1996; KHANNA & SRIVASTANA, 2005).

TABELA 2. Produção de PHAs por várias bactérias (REDDY, 2003).

| Microorganismos | Fonte de carbono | PHA | Teor de PHA (%, p/v) |
|-------------------------------------|------------------|--------|-------------------------|
| <i>Alcaligenes eutrophus</i> | Gluconato | P(3HB) | 46-85 |
| | Propionato | P(3HB) | 26-36 |
| | Octanoato | P(3HB) | 38-45 |
| <i>Bacillus megaterium</i> | Glucose | P(3HB) | 20 |
| <i>Klebsiella aerogenes recom</i> | Molasse | P(3HB) | 65 |
| <i>Methilobacterium rhodesianum</i> | Frutose/metanol | P(3HB) | 30 |
| <i>M. extorquens</i> | Metanol | P(3HB) | 40-46 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Óleo de rícino | PHA | 20-30 |
| <i>P. denitrificans</i> | Metanol | P(3HV) | 0.02 |
| | Pentanol | P(3HV) | 55 |
| <i>P. oleovorans</i> | Gluconato | P(3HB) | 1.1-5.0 |
| | Octanoato | P(3HB) | 50-68 |
| <i>P. putida GPP104</i> | Octanoato | P(3HB) | 14-22 |
| <i>P. putida</i> | Óleo de amêndoa | PHA | 37 |
| | Ácido láurico | PHA | 25 |
| | Ácido mirístico | PHA | 28 |
| | Ácido oléico | PHA | 19 |
| <i>Sphaerotilus natans</i> | Glucose | P(3HB) | 40 |

A rota biossintética de produção de P(3HB), o principal representante da classe dos PHAs, consiste de três reações enzimáticas catalisadas por três enzimas diferentes (Figura 2). A primeira reação consiste na condensação de duas moléculas de acetilcoenzima A (acetil-CoA) a acetoacetil-CoA pela β -cetoacil-CoA tiolase (codificada pelo gene *phbA*). A segunda reação consiste na redução da acetoacetil-CoA a (R)-3-hidroxiacetil-CoA por uma acetoacetil-CoA desidrogenase NADPH-dependente (codificada pelo gene *phbB*). Finalmente, os monômeros (R)-3-hidroxiacetil-CoA são polimerizados a P(3HB), pela P(3HB) polimerase, codificada pelo gene *phbC* (REDDY *et al.*, 2003).

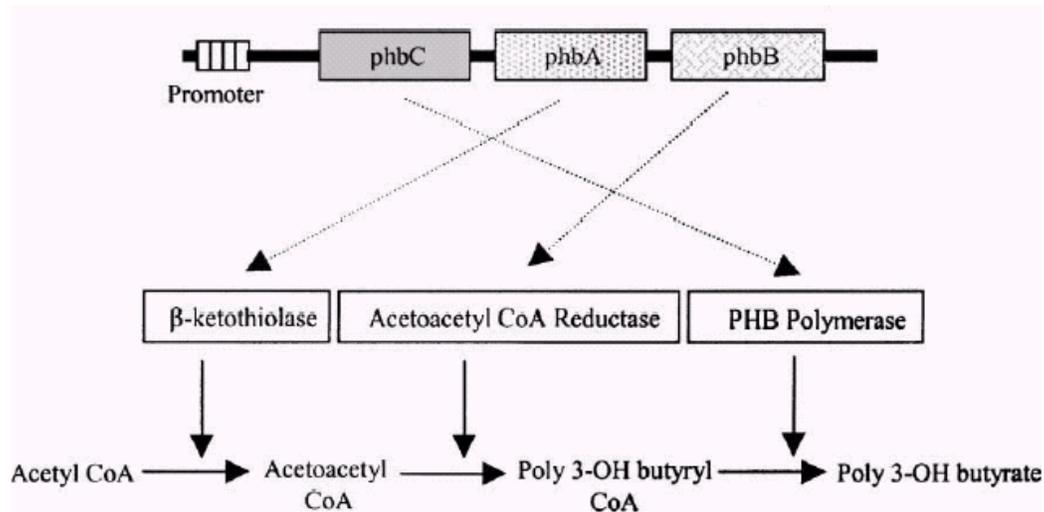


FIGURA 2. Rota biossintética da produção de P(3HB) (REDDY, 2003).

As bactérias empregadas na sua produção podem ser divididas em dois grupos, baseados nas condições de cultura requeridas para síntese desses polímeros. O primeiro grupo de bactérias requer a limitação de um nutriente essencial, como nitrogênio, fósforo, magnésio ou enxofre com um excesso de fonte de carbono. As bactérias incluídas neste grupo são *Alcaligenes eutrophus*, *Protomonas extorquens* e *Protomonas oleovarans*. O segundo grupo de bactérias, das quais incluem *Alcaligenes latus* e uma cepa mutante da *Azobacter vinelandii* e a *Escherichia coli* recombinante, não requerem limitação de nutriente e podem acumular polímero durante o crescimento (KHANNA & SRIVASTAVA, 2005). Com os atuais avanços nas pesquisas nesta área, concentrações superiores a 80 g.L^{-1} e uma produtividade acima de 2 g.L^{-1} têm sido obtidas em laboratório. Similarmente, métodos de recuperação permitem a obtenção de PHAs com vários graus de pureza (SALEHIZADEH & LOOSDRECHT, 2004).

A alta produtividade de PHAs pode ser obtida através da fermentação semi-contínua (*fed-batch*) ou fermentação contínua. Para cultura de bactérias pertencente ao primeiro grupo, o método de cultivo mais empregado ocorre em duas etapas. Inicialmente, uma concentração desejada de biomassa é obtida com limitação de nutriente (primeira etapa) e após isso, um nutriente essencial

é mantido em uma concentração limitada para permitir uma síntese eficiente do PHA. Durante a etapa de limitação de nutrientes, a concentração residual celular, definida como a concentração celular menos a concentração de PHA, permanece quase constante, e a concentração celular aumenta somente por causa do acúmulo intracelular de polímero (KHANNA & SRIVASTAVA, 2005).

A seleção de microorganismos para a produção de PHA é baseada em vários fatores, incluindo a capacidade celular para utilizar fontes de carbono de custo reduzido, proporção de crescimento, síntese polimérica, e acúmulo de polímero. A recuperação do PHA deve ser considerada, uma vez que, do ponto de vista econômico, afeta significativamente a produção (KHANNA & SRIVASTAVA, 2005). No Brasil, entre as bactérias produtoras de PHAs, a *Ralstonia eutropha*, e o *Chromobacterium violaceum* tem sido extensivamente estudados. A *Ralstonia eutropha*, recentemente renomeada a *A. eutrophus*, é capaz de acumular grande quantidade de P(3HB), usando uma fonte de carbono simples, como por exemplo, glicose, frutose e ácido acético. O P(3HB) tem sido produzido em grande escala a partir de glicose, e P(3HB-co-3HV) a partir de uma mistura de glicose e ácido propiônico. O terpolímero poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato-co-4-hidroxi butirato) (P(3HB-co-3HV-co-4HB)) também está sendo produzido nas culturas de *A. eutrophus*, usando glicose, ácido propiônico e ácido 4-hidroxi butírico ou butirolactona como fontes de carbono (MADDEN *et al.*, 2000). Por outro lado, se somente o ácido propiônico for usado como fonte de carbono, a proporção do monômero 3HV no copolímero alcança 90%.

O *C. violaceum* é uma bactéria gram-negativa presente na águas e leitos de rios brasileiros, conhecido por produzir um pigmento característico chamado violaceína, o qual tem sido estudado, por suas propriedades antibiótica, antitumoral e tripanocida (DURAN *et al.*, 1994). *C. violaceum* é conhecido por acumular polímero constituído primariamente de 3HB e 3HV, mas pode produzir um homopolímero de 3HV quando o crescimento com ácido propiônico é realizado. Por causa da sua capacidade de acumular altos níveis do monômero 3HV, é possível que sua PHA sintetase possa também aumentar a incorporação de monômeros 3-hidroxi hexanoato (3HH), formando o poli(3-

hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato), outro PHA com propriedades atrativas. Portanto, estudos genéticos com *C. violaceum* estão sendo realizados objetivando a clonagem e análise molecular do gene ácido polihidroxicanoico sintetase (*phaC_{cv}*), bem como a tentativa de expressão do clone do gene em *E. coli*, *Pseudomonas putida* e *A. eutrophus* (KOLIBACHUK *et al.*, 1999).

2.2.3 Características químicas e físico-químicas

A maioria dos PHAs são poliésteres alifáticos do carbono, oxigênio e hidrogênio. Sua fórmula geral é mostrada na Figura 3. A composição da cadeia lateral ou átomo R e valor de x identificam conjuntamente uma unidade monomérica. Para P(3HB) o mais comum dos PHAs, x = 1. O P(3HB) é composto de monômeros com um grupamento metila na cadeia lateral, e as unidades 3HV contém um grupamento etila no carbono 3 (BRAUNEGG *et al.*, 1998). A composição e a massa molar desses polímeros variam entre 2×10^5 a 3×10^6 daltons, dependendo do microorganismo, das condições de produção tais como, tempo de fermentação, velocidade de crescimento e concentração da fonte de carbono, e do método de extração. Entretanto, alguns PHAs, como o homopolímero poli(3-hidroxivalerato) (P(3HV)), apresentam massas molares de 60.000 daltons ou menos (LEE, 1996).

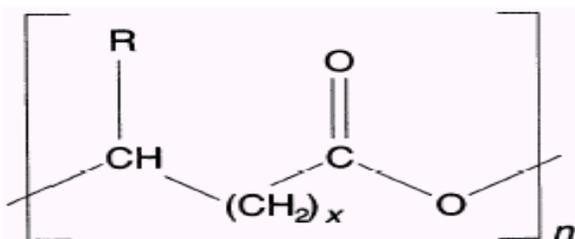


FIGURA 3. Estrutura geral dos polihidroxicanoatos

No estado sólido, o P(3HB) apresenta-se na forma de uma hélice com duas unidades monoméricas completando uma volta. As forças envolvidas nesta conformação são principalmente interações do tipo Van der Waals entre os oxigênios dos grupamentos carbonilas e metilas. A estereoregularidade do

P(3HB) torna-o um material altamente cristalino. É opticamente ativo, com o carbono quiral apresentando-se sempre na configuração R, quando obtido biologicamente (LEE, 1996).

O P(3HB) tem várias propriedades úteis tais como resistência à umidade, pureza óptica e piezoelectricidade. Porém, apresenta duas grandes limitações. Primeiro, o P(3HB) apresenta baixa estabilidade frente à fusão, pois se decompõe em aproximadamente 200 °C, ou seja, numa temperatura próxima a temperatura de fusão. Segundo, P(3HB) torna-se quebradiço em alguns dias de armazenamento sob certas condições ambientais (LEE, 1996).

O grau de cristalinidade é o parâmetro básico mais importante na caracterização de polímeros semicristalinos. A cristalinidade afeta várias propriedades dos polímeros incluindo as mecânicas, físicas, termodinâmicas e ópticas. Na perspectiva farmacêutica, a cristalinidade dos materiais poliméricos afeta as propriedades de degradação e liberação do fármaco (LEE, 1996; POUTON & AKHTAR, 1996).

A estrutura cristal do copolímero P(3HB-co-3HV) é semelhante a do P(3HB). Entretanto, alguns autores constataram que a cristalinidade do copolímero diminuiu com o aumento da fração molar das unidades 3HV. As características de menor cristalinidade e mais baixas temperaturas de transição vítrea conferem aos P(3HB-co-3HV) melhores propriedades mecânicas, como menor dureza, tornando-os termoplásticos mais interessantes que o P(3HB) puro.

O homopolímero P(3HB) é solúvel em vários solventes orgânicos. Como esperado, a solubilidade é dependente da massa molar do polímero e da temperatura. Clorofórmio e diclorometano são os solventes mais comumente empregados para o P(3HB) e P(3HB-co-3HV). A solubilização completa de concentrações modestas (como 2%, p/v) necessita de refluxo com o solvente a aproximadamente 62 °C por 24 horas (POUTON & AKHTAR, 1996).

Estudos de calorimetria exploratória diferencial têm demonstrado que a faixa de fusão do P(3HB) varia entre 160-180 °C, dependendo do peso molecular e história térmica da amostra. A temperatura de fusão decresce com o aumento da fração de 3HV, podendo alcançar até 80 °C, sem afetar a temperatura de degradação. A temperatura de transição vítrea do P(3HB) e do copolímero P(3HB-co-3HV) é de aproximadamente -5 a +20 °C. As propriedades dos materiais podem ser controladas ajustando a fração de 3HV durante a fermentação (LEE, 1996; POUTON & AKHTAR, 1996; SUDESH *et al.*, 2000).

2.2.4 Degradabilidade dos polihidroxicanoatos

O planejamento e desenvolvimento de microesferas a partir de polímeros biodegradáveis contendo agentes bioativos para aplicação terapêutica requer um entendimento fundamental do fenômeno de biodegradação, bem como uma apreciação das respostas teciduais e celulares dois quais determinam a biocompatibilidade das microesferas degradáveis. O conhecimento físico-químico do processo de degradação e erosão polimérica é a chave para o melhor entendimento de possíveis problemas e talvez também para suas soluções (GOPFERICH, 1996).

No processo de degradação ocorre a deterioração das propriedades do polímero pela clivagem das cadeias poliméricas para formar oligômeros e, posteriormente, monômeros. Existem diferentes tipos de degradação polimérica tais como foto, térmica, mecânica e química, sendo esta última a mais importante (GOPFERICH, 1996).

Estudos de degradação química dos PHAs tem sido realizados, utilizando filmes preparados a partir destes materiais. A degradação *in vitro* de P(3HB) tem demonstrado ser relativamente lenta quando comparada à degradação do PLAGA. Estudos de degradação sugerem que a perda de massa de filmes finos (85 µm) a 37 °C e pH 7,4 ocorre com uma meia vida de aproximadamente 152 semanas. Entretanto, a degradação de filmes constituídos do copolímero P(3HB-co-3HV) demonstrou ser mais rápida do que

a do homopolímero. A penetração da água dentro do polímero foi muito pequena para ser analisada precisamente, o que levou aos autores concluírem que o mecanismo de degradação *in vitro* do P(3HB-co-3HV) procedeu através do processo de erosão superficial (POUTON & AKHTAR, 1996).

O desenvolvimento de materiais absorvíveis a partir do P(3HB) (PM ~600.000 daltons), para o reparo de lesões gastrintestinais, foi estudado por FREIER e colaboradores (2002). Com o intuito de verificar o efeito da utilização de blendas sobre o tempo de degradação, vários filmes foram preparados contendo P(3HB)s de diferentes pesos moleculares ou plastificantes. Os filmes preparados a partir do P(3HB) puro tiveram o peso molecular reduzido à metade após um ano, em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C. A redução do peso molecular foi maior quando blendas de P(3HB) com P(3HB) atático foram utilizadas, enquanto nenhuma influência foi verificada quando P(3HB) de baixo peso molecular foi empregado na blenda. A velocidade de degradação do P(3HB) foi acelerada ou reduzida com adição de plastificantes. Neste caso, a utilização de compostos hidrossolúveis levou a um leve aumento da degradabilidade, enquanto compostos hidrofóbicos conduziram à desaceleração da degradação.

A biodegradabilidade de fibras de P(3HB) e seu copolímero P(3HB-co-3HV) foi investigada por SHISHATSKAYA e colaboradores (2005), em solução tampão e em meio biológico. As fibras de ambos polímeros demonstraram resistência frente à degradação em solução tampão com pH variando entre 4,5 e 7,0, a 38 °C por 180 dias. A biodegradação das fibras *in vitro*, em sangue e plasma, e *in vivo* foi acompanhada de perda de peso e de mudanças mínimas na microestrutura, com nenhuma perda significativa na sua resistência, após 180 dias. A velocidade de degradação do copolímero menos cristalino foi 1,4 a 2,0 vezes maior que a do homopolímero. Igualmente, a degradação das fibras *in vivo* foi influenciada pelas enzimas do fluido tecidual e celulares. As fibras sofreram erosão somente na superfície sem nenhum efeito drástico na sua performance mecânica.

Estudos realizados com o P(3HB-co-3HV) evidenciaram que a composição do copolímero, massa molar, técnica de fabricação, pH, temperatura, e a presença de constituintes do plasma afetam a velocidade de degradação *in vitro* (ZINN *et al.*, 2001). Desta maneira, é possível esperar que a velocidade de degradação das microesferas preparadas a partir desses polímeros, assim como, a velocidade de liberação de fármacos encapsulados, seja passível de ser modulada.

2.2.4.2 Degradação enzimática

Desde que os PHAs são polímeros de elevada massa molar e incapazes de serem transportados através da parede celular, vários microorganismos excretam PHB-depolimerases extracelulares que os hidrolisam em monômeros e oligômeros solúveis em água, que são posteriormente utilizados como nutrientes (SUDESH *et al.*, 2000). O efeito da estrutura química e das características do estado sólido sobre a degradabilidade enzimática do P((R)-3HB) e seus copolímeros foram investigadas por ABE & DOI (1999). Filmes de diferentes poliésteres foram fabricados e colocados na presença da PHB-depolimerase de *A. faecalis*. Estes autores demonstraram que a velocidade de hidrólise enzimática foi fortemente dependente da estrutura química da segunda e terceira unidade monomérica da cadeia do polímero, diminuindo à medida em que o comprimento da cadeia lateral aumentava. A velocidade de degradação enzimática também diminuiu com o aumento da cristalinidade do filme. A PHB-depolimerase inicialmente hidrolisa cadeias de poliésteres amorfas na superfície e subseqüentemente provoca a erosão das cadeias poliméricas no estado cristalino.

Estudos de degradação enzimática de copolímeros de 3HB e 3HV com diferentes proporções de 3HV (17 a 60 mol%) foram realizados por CHOI e colaboradores (2004). Os filmes preparados a partir destes copolímeros foram degradados pela ação da depolimerase extracelular de *Emericellopsis menina* w2. Entretanto, a velocidade de degradação enzimática foi mais dependente da cristalinidade do que do grau de hidrofobicidade, sendo esta relacionada ao teor de 3HV do copoliéster. A velocidade de degradação enzimática do P(3HB-co-

3HV) também demonstrou ser dependente da concentração de enzima e PHA, assim como da área superficial e forma das amostras, as quais afetam a adsorção e combinação da enzima ao substrato (ZHENG *et al.*, 2002).

A dependência da cristalinidade sobre a ação de uma PHB-depolimerase extracelular de *Alcaligenes faecalis* também foi demonstrada por KUSAKA e colaboradores (1999), em estudos de degradação de P(3HB) de alto peso molecular. Neste estudo, a velocidade de erosão dos filmes de P(3HB) não foi afetada pelo peso molecular do polímero.

O efeito da radiação gama sobre as propriedades mecânicas e biodegradabilidade de filmes de P(3HB) com diferentes peso molecular foi avaliado por MIYASAKI e colaboradores (2003). Estes autores demonstraram que a radiação aumentou a fragilidade do filme das amostras com alto peso molecular e a biodegradabilidade aumentou com o tempo e alcançou cerca de 95% após 18 dias.

A degradação térmica foi estudada por LI e colaboradores (2003). A cinética de degradação térmica do P(3HB) e P(3HB-co-3HV), sob atmosfera de nitrogênio, foi determinada por termogravimetria. Os resultados demonstraram que o P(3HB-co-3HV) foi termicamente mais estável do que o P(3HB). O mecanismo de degradação térmica destes polímeros foi também investigado por TG-FTIR e Py-GC/MS. Os resultados mostraram que os produtos de degradação do P(3HB) foram, principalmente, propeno, ácido 2-butenóico, propenil-2-butenato e butírico-2-butenato; enquanto, os do P(3HB-co-3HV) foram principalmente propeno, ácido 2-butenóico, ácido 2-pentenóico, propenil-2-butenato, propenil-2-pentenato, butírico-2-butenato, pentanóico-2-pentenato e gás carbônico. A degradação foi iniciada provavelmente através da cisão das cadeias das ligações ésteres.

2.2.5. Toxicidade e biocompatibilidade dos polihidroxicanoatos

A biodegradação é um processo natural pelo qual composto orgânico é convertido a moléculas mais simples em um ambiente biológico. O termo

biocompatibilidade se refere à aceitabilidade mútua entre o polímero e seu ambiente fisiológico, envolvendo tanto a influência do meio biológico sobre a degradação do polímero, quanto a resposta tecidual provocada pela presença do mesmo (POUTON & AKHTAR, 1996; CHANDRA & RUSTGI, 1998). Os PHAs são biopolímeros não tóxicos, biocompatíveis e 100% biodegradáveis, aplicáveis na elaboração de sistemas complexos de liberação controlada e prolongada de fármacos, entre eles os sistemas nano e microparticulados (REDDY *et al.*, 2003).

A degradação do P(3HB) *in vitro* leva à formação do monômero ácido D-(-)-3-hidroxi-butírico. Este ácido é um constituinte normal do sangue e, em comum com acetoacetato e acetona, é uma das três cetonas corporais produzidas endogenamente por um processo conhecido como cetogênese (POUTON & AKHTAR, 1996; REUSCH, 2000; ZIN *et al.*, 2001; CHEN & WU, 2005). Além disso, PHAs de baixo peso molecular complexados com outras macromoléculas encontram-se amplamente distribuídos nas células biológicas. A complexação modifica as suas propriedades físicas e químicas, permitindo que ele atravesse regiões tanto aquosas quanto lipídicas, fazendo com que ele seja encontrado no citoplasma e fluidos intracelulares, bem como nas membranas e lipoproteínas (FREIER *et al.*, 2002; CHEN & WU, 2005). Com estas descobertas, têm-se admitido que o P(3HB), seus oligômeros e monômeros não sejam tóxicos às células.

Estudos demonstram que propriedades nutricionais ou terapêuticas são obtidas pelo aumento dos níveis das cetonas corporais, na forma de oligômeros lineares ou cíclicos e/ou derivados de 3-hidroxiácidos, particularmente aqueles constituídos de 3-hidroxi-butirato, 3-hidroxi-valerato, 3-hidroxi-hexanoato e 3-hidroxi-heptanoato. Administrados oralmente, na forma de suplementos alimentares ou por via parenteral, estes compostos são úteis no controle dos ataques epiléticos, doenças metabólicas, redução do catabolismo das proteínas, tratamento do diabetes, aumento da eficiência cardíaca e distúrbios neurodegenerativos. Igualmente o uso de oligômeros e monômeros 4-hidroxi-butíricos é proposto para o tratamento de numerosas doenças.

Portanto, além de não serem tóxicos, os PHAs podem ainda fornecer alguns benefícios nutricionais e terapêuticos (CHEN & WU, 2005).

A biocompatibilidade do P(3HB) e P(3HB-co-3HV) foi avaliada por meio do monitoramento da resposta inflamatória, após a injeção intramuscular de microesferas poliméricas (20-40 μm) em ratas. Neste estudo, a inflamação aguda e crônica foi monitorada empregando-se a fosfatase ácida e alcalina, respectivamente. Embora uma resposta inflamatória aguda tenha sido observada, ela poderia ser atribuída ao trauma inicial da injeção. A inflamação crônica não foi detectada pelo método enzimático (POUTON & AKHTAR, 1996).

A biocompatibilidade dos polímeros também foi avaliada em cultura de células. O efeito do P(3HB-co-3HV) sobre o crescimento das células de ovário de hamster chinês foi monitorado durante 60 horas. O polímero, na forma de filme, não inibiu o crescimento das células neste período, sugerindo boas características de compatibilidade (POUTON e AKHTAR, 1996). Em um outro estudo, CHOI e colaboradores (2005) avaliaram a biocompatibilidade do P(3HB-co-3HV) contendo 17 a 60 mol% de 3HV por meio do crescimento de células de ovário de hamster chinês, bem como pela adsorção de proteínas sanguíneas e plaquetas na superfície do filme. O número de células que aderiram e cresceram nestes filmes aumentou com o aumento do teor de 3HV no copolímero. Em contrapartida, a tendência de proteínas sanguíneas e plaquetas se aderirem à superfície do copoliéster decresceu significativamente com o aumento do teor de 3HV. A avaliação da morfologia dos filmes, usando microscópio de força atômica, revelou que a rugosidade foi um fator importante na determinação da biocompatibilidade deste copoliéster. Os resultados obtidos neste estudo sugeriram que o P(3HB-co-3HV) com mais que 30 mol% de 3HV, pode ser útil para aplicação biomédica.

2.2.6 Emprego dos polihidroxicanoatos no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos

Os PHAs têm sido considerados potenciais candidatos para a elaboração de sistemas de liberação controlada de fármacos, em decorrência de suas características de biodegradabilidade e biocompatibilidade. O uso de micropartículas de PHAs como forma de obter o prolongamento da liberação de fármacos e conseqüentemente, reduzir o número de doses administradas e a incidência de efeitos adversos, tem sido testado por diversos autores. O controle da liberação é uma característica desejável e esperada, mas são muitos os fatores que a afetam, envolvendo a estrutura da matriz onde o fármaco está inserido e as propriedades físicas e químicas de ambos polímero e fármaco. Como o objetivo de obter formas farmacêuticas de liberação prolongada, microesferas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) contendo progesterona foram preparadas pela técnica de emulsão/evaporação do solvente usando gelatina como agente emulsificante. Estudos de liberação demonstraram a redução da velocidade de liberação quando o copolímero contendo 9% de 3HV foi empregado (GANGRADE & PRICE, 1991). A velocidade de liberação também foi afetada pelo grau de lipofilicidade do fármaco e pela massa molar do polímero, conforme demonstrado por KAWAGUCHI e colaboradores (1992), em estudos de encapsulação de pró-fármacos de 2'-3'-diacil-5-fluoro-2'-deoxiuridina em microesferas de P(3HB) de diferentes massas molares (65, 135 e 450 kD). Por outro lado, a porosidade de matrizes esféricas compostas de P(3HB-co-3HV) (330 kD; 10,8 mol% de 3HV) e 20% de PCL afetou a duração da liberação *in vitro* da albumina sérica bovina (BSA) (ATKINS & PEACOCK, 1997).

Com o intuito de obter uma forma farmacêutica de liberação prolongada, a encapsulação do 5-fluorouracila em microesferas de P(3HB-co-3HV) (15 mol% 3HV) foi testada, empregando-se as técnicas de emulsão/evaporação do solvente óleo em água (o/a) e óleo em óleo (o/o), e a técnica de dupla emulsão a/o/a. A eficiência de encapsulação deste fármaco foi significativamente maior quando a técnica o/o foi empregada, mas o perfil de liberação mais desejável foi obtido quando a técnica o/a foi usada, devido ao efeito co-solvente (KHANG *et al.*, 2001).

EMBLENTOM & TIGHE (2002) desenvolveram microesferas de hidrocortisona pela técnica de emulsão/evaporação do solvente, empregando-se o copolímero P(3HB-co-3HV) com diferentes massas molares e proporções de 3HV. O teor de fármaco incorporado foi afetado pela massa molar do copolímero, mas o efeito predominante observado com a encapsulação da hidrocortisona foi o aumento da porosidade das partículas. Os autores concluem que partículas apresentando diferentes características morfológicas e com potencial para o controle da liberação de fármaco podem ser obtidas por meio da seleção da composição e da massa molar do copolímero, temperatura do processo, e incorporação de PCL na forma de blendas.

O tramadol é um analgésico que atua no sistema nervoso central que apresenta curta duração de ação, necessitando da administração de doses repetidas ou infusão contínua para obtenção de um efeito prolongado. Assim, SALMAN e colaboradores (2003) propuseram a encapsulação do tramadol em microesferas de P(3HB), obtido a partir do *Hyphomicrobium zavarzinii*, como forma de controlar a sua liberação pela via epidural. A liberação *in vitro* do tramadol, em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C, foi observada por mais de 6 dias. A atividade *analgésica in vivo* das microesferas foi avaliada usando ensaio de analgesia em cauda de ratos, antes e até 30 horas após a injeção. O efeito analgésico das microesferas de P(3HB) contendo tramadol foi observado por 21 horas, enquanto uma dose equivalente de tramadol livre foi efetiva por menos de 5 horas.

Alguns dos estudos realizados com os PHAs enfocam a liberação de antibióticos no local da infecção, uma vez que ainda ela é considerada um dos problemas mais graves na cirurgia de implantes. A utilização de sistemas carreadores de antibióticos em procedimentos cirúrgicos ofereceria, além dos benefícios terapêuticos, a redução da utilização da antibioticoterapia sistêmica. Neste contexto, estudos de encapsulação da tetraciclina em microcápsulas de P(3HB-co-3HV) contendo diferentes teores de 3HV (7, 14 e 22%, PM 400.000 – 750.000) foram realizados, visando seu implante em bolsas periodontais, para o tratamento localizado da gengivite e periodontite. As microcápsulas foram preparadas por meio da técnica da dupla emulsão a/o/a e caracterizadas

quanto à eficiência de encapsulação, perfil de liberação e morfologia. Fatores, como tipo de emulsificante e forma química do fármaco, afetaram a eficiência de encapsulação. Os dados de liberação foram mais bem expressos pela equação de Higuchi, indicando que o fármaco é liberado por um mecanismo de difusão (SENDIL *et al.*, 1999).

Com o objetivo de obter agentes para a quimioembolização, microesferas de P(3HB) contendo rifampicina foram preparadas pela técnica de emulsão/evaporação do solvente. Neste caso, a rápida liberação do fármaco foi observada, atingindo cerca de 90% nas primeiras 24 horas. Entretanto, tamanho de partícula e teor de fármaco demonstraram ser fatores passíveis de otimização, com vista no controle da velocidade de liberação. Angiogramas renais e análises histopatológicas, obtidas após administração em cães, demonstraram a viabilidade de utilização destes sistemas como agentes de quimioembolização (KASSAB *et al.*, 1997, 1999).

Um sistema carreador de sulfabactama e cefoperazona preparado a partir do P(3HB-co-3HV) (22 mol% de 3HV) foi testado para o tratamento da osteomielite crônica e relacionada a implantes. O carreador contendo os fármacos foi implantado no sítio da infecção, previamente induzida pela inoculação de *Staphylococcus aureus* na tíbia de coelhos. A efetividade do sistema foi verificada por métodos macroscópicos, radiográficos, bacteriológicos e histológicos. A infecção subsidiu no 15º dia, e a remissão foi quase completa no 30º dia de tratamento, indicando que o sistema biodegradável desenvolvido pode ser usado com sucesso no tratamento de infecções ósseas severas (YAGMURLU *et al.*, 1999).

O implante de próteses osteopáticas em pacientes com articulações comprometidas devido ao dano ou artrite tem se tornado cada vez mais comum. Entretanto, tal procedimento envolve riscos de ocorrência de artrite séptica, infecções bacterianas profundas e bacteremia, fazendo com que os pacientes tenham que receber antibióticos por um período prolongado. Como meio de prevenir a adesão de bactérias ao implante, discos ortopédicos foram revestidos com um complexo de gentamicina e P(3HB-co-3HV) contendo 8 ou

12% de 3HV. Neste caso, o aumento do teor de 3HV levou ao aumento da velocidade de liberação da gentamicina. A redução significativa do número de *S. aureus* aderido aos discos ortopédicos, após 48 horas de exposição em cultura de células demonstrou a eficácia deste sistema. Além disso, a alteração da hemodinâmica de amostras de sangue não foi observada, confirmando a biocompatibilidade dos implantes (ROSSI *et al.*, 2004).

Formulações de microesferas constituídas de compósitos de P(3HB-co-3HV) (3 mol% 3HV, PM 300,000) e volastonita foram propostas como sistemas de liberação controlada de gentamicina, especialmente no reparo ósseo, não somente para promover o crescimento tecidual, mas também para minimizar o risco de infecções. As microesferas foram preparadas pela técnica da emulsão sólido em óleo em água (s/o/a) seguida da evaporação do solvente, e a gentamicina foi incorporada por imersão das partículas numa solução do fármaco em PBS pH 7,4. A análise morfológica das partículas e os estudos de liberação em PBS e meio fisiológico simulado revelaram a formação de uma camada microporosa de apatita na superfície das microesferas, na qual permitiu o controle da liberação da gentamicina. Nestas condições, a completa liberação do fármaco a partir das microesferas constituídas de compósitos ocorreu em 22 dias, um período cerca de três vezes maior quando as microesferas foram preparadas unicamente a partir do poliéster biodegradável (LI & CHANG, 2005).

Em um recente estudo, microesferas de progesterona foram preparadas a partir do PLA, PLA-PEG e P(3HB-co-3HV), usando o método de emulsão/evaporação do solvente. O efeito do tipo de polímero sobre a eficiência de encapsulação, morfologia e perfil de liberação do fármaco foi avaliado e comparado. Os resultados demonstraram que partículas de P(3HB-co-3HV) apresentaram maior porosidade que aquelas preparadas a partir do PLA e PLA-PEG, sem alteração significativa do diâmetro médio. Além disso, estudos de liberação, em solução hidroalcoólica a 37 °C, demonstram a rápida liberação da progesterona a partir das microesferas de P(3HB-co-3HV), alcançando 90% nas duas primeiras horas de ensaio (PENA *et al.*, 2005).

Recentes estudos têm demonstrado o interesse da utilização de PHAs na obtenção de sistemas de liberação transdérmicos. Adesivos transdérmicos preparados a partir de PHAs de cadeia média (8 mol% de 3HH e 92 mol% de 3-hidroxiocetanoato), obtidos a partir da *Pseudomonas putida* KT2442, foram testados *in vitro* usando a tamsulosina como fármaco modelo. O cloridrato de tamsulosina é uma sulfonamida apresentando atividade antagonista a-adrenoceptora, atualmente usada na clínica para o alívio dos sinais e sintomas da obstrução uretral causada pela hiperplasia prostática benigna. Sua característica de apresentar carga impede sua permeação através do estrato córneo. Por esta razão, o efeito promotor de absorção do fármaco pelo tratamento prévio da pele com dendrímeros foi avaliado pelos autores. Por meio da utilização de dendrímeros, a matriz de PHA proporcionou a permeação de quantidades clinicamente requeridas de tamsulosina em ensaio *in vitro*. Em decorrência destes resultados promissores, adesivos transdérmicos a base de PHAs também foram testados na liberação de clonidina e cetoprofeno. O conjunto dos resultados indicou que estes biopolímeros ainda são aplicáveis para a liberação transdérmica de fármacos (WANG *et al.*, 2003a, 2003b).

Com o intuito de preparar conjugados de nanopartículas e fármacos, como antitumorais, anti-infecciosos e analgésicos, e obter sistemas de liberação sítio-específicos, copolímeros do poli(3-hidroxiocetanoato) contendo grupamentos carboxílicos nas cadeias carbonadas laterais foram preparados por modificação química de poliésteres bacterianos. Igualmente, copolímeros de PHAs de cadeia média, ligados covalentemente com unidades de PEG e PLA, têm sido preparados visando à obtenção de sistemas nanoparticulados. Em ambos casos, as nanopartículas foram obtidas pela técnica de deslocamento do solvente, com e sem a adição de estabilizantes. A presença dos grupamentos carboxílicos, assim como de unidades de PEG na superfície das partículas proporcionou melhorias na estabilidade das mesmas frente à agregação (KURTH *et al.*, 2002, RENARD *et al.*, 2003).

Finalmente, um sistema de liberação controlada usando P(3HB), obtido pela técnica de revestimento por compressão, foi desenvolvido por KORSATKO-WABNEGG (1990). Investigações demonstraram que o

revestimento de núcleos contendo o fármaco com uma matriz de P(3HB) e um agente de formação de canais, tal como o cloreto de sódio, nitrato de potássio ou lactose, conduz a obtenção de cinéticas de liberação de ordem zero, podendo ser aplicáveis tanto para a administração oral como parenteral.

Os estudos relatados acima demonstram o grande potencial de utilização de PHAs na elaboração de sistemas de liberação de fármacos, tanto para a via oral como parenteral. Entretanto, estudos relacionados à obtenção de sistemas microparticulados são escassos e contraditórios, provavelmente devido à grande variabilidade das características físico-químicas dos polímeros empregados. Todos estes estudos indicam a possibilidade da preparação de microesferas a partir dos PHAs, geralmente apresentando superfícies muito porosas, mas o efeito provocado sobre o perfil de liberação do fármaco e degradação das partículas, ainda não está bem esclarecido. Embora a liberação de fármacos das microesferas de PHAs tem demonstrado ser rápida, em alguns estudos a velocidade pôde ser controlada. Portanto, pesquisas ainda são necessárias para determinar a aplicabilidade destes polímeros como matéria-prima na obtenção de formas farmacêuticas de liberação prolongada. Neste sentido, este trabalho visa contribuir para um melhor entendimento dos fatores passíveis de modulação que estão envolvidos na encapsulação e liberação de fármacos, assim como na degradação das microesferas de PHAs.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Matérias-primas

- Álcool Polivinílico P.S. (Vetec, RJ);
- Poli (D,L ácido láctico-co-glicólico) (PLAGA) 75:25, PM 75.000 (Boehringer Ingelheim, Alemanha);
- Ibuprofeno (IBF), lote 63602203, origem Índia (Fraccionata Distribuidora de Matérias-Primas LTDA, SP);
- Poli (3-ácido hidroxibutírico) (P(3HB)), origem natural, PM maior que 300.000, Tm 172 °C (DSC) (Sigma-Aldrich Chemical Company, EUA);
- Poli (3-ácido hidroxibutírico-co-hidroxivalérico) (P(3HB-co-3HV)), origem natural com 5% de hidroxivalerato, PM 680.000, Tm 165 °C (DSC) (Sigma-Aldrich Chemical Company, EUA).

3.1.2 Reagentes e solventes

Todos os solventes, com exceção daqueles utilizados na análise por CLAE, possuíam grau de pureza para análise (p.a).

- DL-ácido láctico 85% (w/w), d 1,209 (Sigma-Aldrich Chemical Company, EUA);
- N-ácido valérico, PM 102,1 (Sigma-Aldrich Chemical Company, EUA);
- Ácido butírico 99+%, d 0,964 (Sigma-Aldrich Chemical Company, EUA);
- Ácido crotônico 98% (Sigma-Aldrich Chemical Company, EUA);
- Ácido glicólico, mínimo 98% titration, PM 76,05 (Sigma-Aldrich Chemical Company, EUA);
- Ácido ortofosfórico (Vetec, RJ);
- Brometo de potássio (Vetec, RJ);
- Clorofórmio (Vetec, RJ);
- Diclorometano (Vetec, RJ);
- Fosfato monobásico de potássio (Vetec, RJ);
- Hidróxido de sódio (Vetec, RJ);
- Imidazolidiniluréia (Viafarma LTDA, SP);

- Metanol (Vetec, RJ);
- Nipagin (Viafarma LTDA, SP);
- Tween 80 (Importadora Química Delaware LTDA, RS).

3.1.3 Equipamentos

- Agitador magnético Fisatom, modelo 702 AC;
- Analisador Termogravimétrico, detector tipo TGA-50 (Shimadzu);
- Balança analítica Ohaus Corporation AS200S;
- Banho de Ultrasom Ultrasoniccleaner USC700;
- Banho Maria Dubnoff CT 232 (Cientec);
- Calorímetro diferencial de varredura, detector tipo DSC-50 (Shimadzu);
- Centrífuga Sigma 4K 15;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, equipado com duas bombas LC-10AD VP, detector UV/VIS SPD-10AV VP, workstation Class-VP (Shimadzu);
- Difractômetro de raio-X Rigaku Miniflex;
- Espectrofotômetro Infravermelho Perkin Elmer 16PC FT-IR;
- Espectrofotômetro UV/VIS Perkin Elmer Lambda 10;
- Freezer Nuaire Ultralow;
- Granulômetro a laser Cilas, modelo 1060;
- Liofilizador Micromodulyo E-C (Shimadzu);
- Microscópio eletrônico de varredura Philips XL 30;
- Quantachrome AUTOSORB-1C, equipado com software AUTOSORB;
- Viscosímetro Cannon Fenske AS 350 (Schott);
- Vortex Mixer, modelo VS-1300V.

3.2. METODOLOGIA

3.2.1 Preparação das microesferas

3.2.1.1 Preparação de microesferas brancas e contendo ibuprofeno

O método de emulsão/evaporação do solvente foi empregado na preparação das microesferas, segundo descrito na literatura (WATTS *et al.*, 1990). Esta técnica consistiu na emulsificação de 20 mL de uma solução contendo 200 mg de polímero em diclorometano (fase interna) em 100 mL de uma solução aquosa de álcool polivinílico 1% (p/V) acidificada a pH 5,0 (fase externa). A emulsão formada foi mantida sob agitação na velocidade de 300 rpm, em temperatura ambiente, durante quatro horas para a evaporação do solvente orgânico e, em seguida, as microesferas foram centrifugadas a 3000 rpm por três minutos, lavadas três vezes com cerca de 10 mL de água destilada e liofilizadas (Figura 4).

Os polímeros empregados para a obtenção das microesferas foram o poli (D,L ácido láctico-co-glicólico) (PLAGA 75:25, PM 75.000), poli (3-ácido hidroxibutírico) (P(3HB), PM maior que 300.000), poli (3-ácido hidroxibutírico-co-hidroxivalérico) (P(3HB-co-3HV), 5% de hidroxivalerato, PM 680.000). Ambos, P(3HB) e P(3HB-co-3HV) sofreram tratamento térmico para permitir sua solubilização em diclorometano. O P(3HB) foi aquecido em estufa a 200 °C e imediatamente resfriado a -2 °C. O P(3HB-co-3HV) foi aquecido a 60 °C sob refluxo com diclorometano por duas horas. Para a preparação de microesferas contendo ibuprofeno, 50 ou 100 mg deste fármaco foram adicionados a fase orgânica da formulação, correspondentes à proporção fármaco:polímero de 1:4 (p/p) e 1:2 (p/p), respectivamente. Todas as formulações foram preparadas em triplicata.

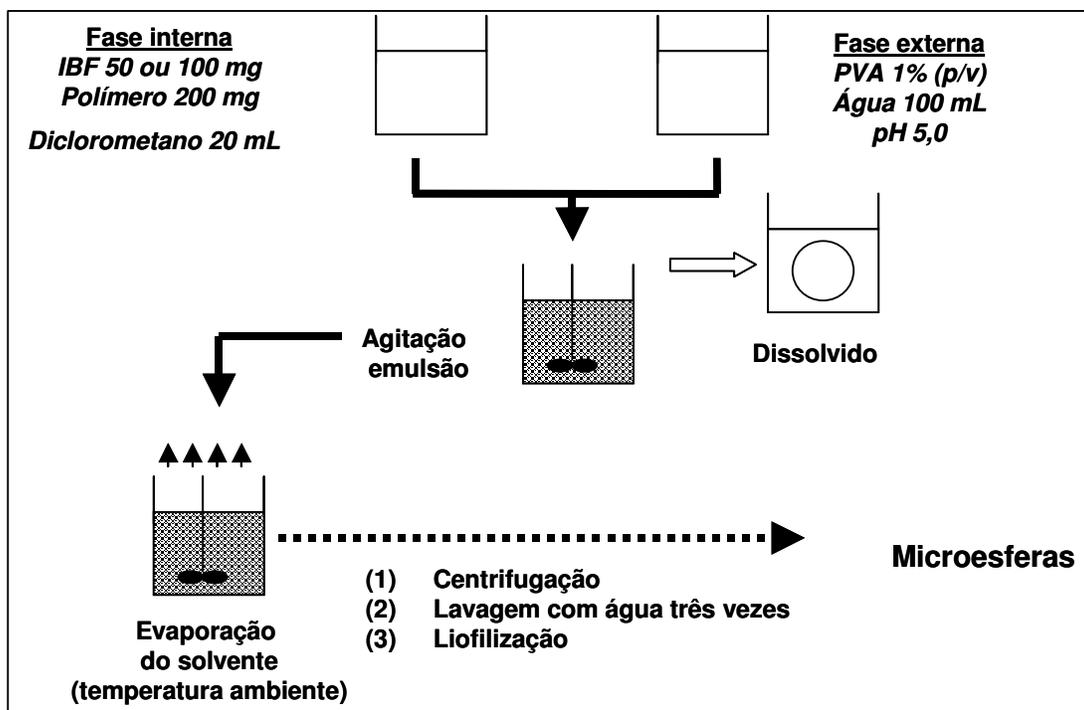


FIGURA 4. Esquema de preparação das microesferas de PLAGA, P(3HB) e P(3HB-co-3HV) brancas e contendo ibuprofeno.

3.2.2 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação de ibuprofeno nas microesferas utilizando espectrofotometria de absorção no ultravioleta

3.2.2.1 Preparação da curva de calibração do ibuprofeno

Cerca de 500 mg de ibuprofeno, exatamente pesados, foram dissolvidos em metanol e o volume completado até 50,0 mL em balão volumétrico. Esta solução foi diluída para obter soluções de ibuprofeno em metanol, nas concentrações de 350, 450, 500, 550, 600, 650 $\mu\text{g/mL}$. As soluções foram preparadas em triplicata e analisadas por espectrofotometria de absorção no ultravioleta no comprimento de onda de 265 nm contra o mesmo solvente. As médias das absorbâncias referentes a cada concentração foram utilizadas para a construção de uma curva de calibração. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados pela análise de regressão linear.

3.2.2.2 Determinação do tempo de extração do ibuprofeno a partir das microesferas

Cerca de 50 mg de microesferas brancas e contendo o ibuprofeno, foram exatamente pesados em balão volumétrico de 25,0 mL e o volume final completado com metanol. As amostras foram mantidas sob agitação magnética em temperatura ambiente e nos tempos 0, 1, 2 e 4 horas, alíquotas foram retiradas e analisadas por espectrofotometria de absorção no ultravioleta a 265 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de ibuprofeno nas microesferas

Cerca de 50 mg de microesferas contendo ibuprofeno, foram exatamente pesados para o interior de balão volumétrico e o volume completado até 50,0 mL com metanol. As amostras foram mantidas sob agitação magnética durante duas horas em temperatura ambiente. Após este período, os sobrenadantes foram coletados e analisados espectrofotometricamente a 265 nm, contra metanol. A concentração de ibuprofeno foi determinada com auxílio de uma solução padrão, de concentração conhecida, analisada nas mesmas condições. A eficiência de encapsulação (%) foi estimada correlacionando-se a quantidade de fármaco inicialmente adicionada nas formulações e aquela encontrada na solução obtida após a extração. O teor de ibuprofeno foi estimado como sendo o peso percentual (%;p/p) de fármaco encontrado nas microesferas.

3.2.2.4 Análise estatística

A influência dos parâmetros de formulação sobre a eficiência de encapsulação e teor de fármaco das microesferas foi avaliada empregando-se um delineamento fatorial 3 x 2. Os dois fatores selecionados foram o tipo de polímero (fator A) e a proporção fármaco:polímero (fator B) empregado nas formulações. O tipo de polímero empregado (fator A) foi avaliado em três níveis, PLAGA, P(3HB) e P(3HB-co-3HV), enquanto a proporção

fármaco:polímero (fator B) foi avaliada em dois níveis, 1:4 e 1:2. Os experimentos foram realizados em triplicata e o valor F foi interpretado ao nível de significância de 5%.

3.2.3. Caracterização físico-química das microesferas

3.2.3.1 Avaliação da morfologia das partículas

A avaliação morfológica das microesferas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura em microscópio Philips XL30. As amostras foram fixadas com fita dupla-face em suportes de alumínio, e recobertas com uma fina camada de ouro de 350 Å de espessura em um aparelho a vácuo Polaron E 500. As micrografias foram obtidas em aumentos de 100 a 1500 vezes.

3.2.3.2 Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica das partículas

O diâmetro médio e a distribuição granulométrica das partículas foram determinados por granulometria a laser em equipamento Cilas modelo 1060.

3.2.3.3 Determinação da porosidade das partículas

Para a determinação das características de porosidade das microesferas, cerca de 500 mg de amostra, exatamente pesadas, foram colocados no interior de uma célula na qual foi purgada com gás hélio a 40 °C por 4 horas, sob vácuo. Em seguida, procedeu-se a introdução de gás nitrogênio sob pressão atmosférica (-196 °C). Isotermas de adsorção foram então construídas e a área superficial, assim como o volume de poros e tamanho médio de poros, foram determinados pelo método proposto por Brunauer, Emmett e Teller (BET) e por Barret, Joyner e Halenda (BJH), respectivamente, utilizando software AUTOSORRB (TEIXEIRA *et al.*, 2001).

3.2.3.4 Análise Térmica

Microesferas brancas e contendo ibuprofeno, assim como os polímeros e o fármaco puros foram analisados por calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria.

3.2.3.4.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Cerca de 5 mg de cada amostra, exatamente pesadas em cápsula de alumínio selada, foram resfriadas a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e então aquecidas até $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ na velocidade de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera de nitrogênio, em um aparelho DSC-50 (Shimadzu), calibrado com índio metálico ($T_m\ 156,6\text{ }^{\circ}\text{C}$) e zinco ($T_m\ 419,5\text{ }^{\circ}\text{C}$). A temperatura de transição vítrea (T_g) foi obtida a partir do ponto médio entre as linhas de base antes e após a transição, e a temperatura de fusão (T_m) foi obtida a partir do pico do sinal endotérmico.

3.2.3.4.2 Termogravimetria (TG)

Cerca de 3 a 8 mg de amostra, exatamente pesadas, foram aquecidas em cápsula de platina na faixa de temperatura de 10 a $600\text{ }^{\circ}\text{C}$, na velocidade de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, utilizando termobalança TGA-50 (Shimadzu), sob atmosfera de nitrogênio, calibrado com padrão de oxalato de cálcio.

3.2.3.5 Difração de Raio-X

O estado físico do ibuprofeno nas microesferas, bem como a cristalinidade dos polímeros e fármaco foram avaliadas utilizando difratômetro de raio-X da marca Rigaku, modelo Miniflex, equipado com tubo de cobre ($\lambda = 1,5418\text{ \AA}$). A faixa angular investigada foi de $10^{\circ} < 2\theta < 100^{\circ}$ com passo de $0,05^{\circ}$ e tempo de 1 segundo.

3.2.3.6 Espectrofotometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Cerca de 0,5–1,0 mg de ibuprofeno, polímeros puros ou microesferas, exatamente pesados, foram misturados com 100 mg de brometo de potássio seco pulverizado. A mistura foi prensada a 700 a 1.050 kg/cm² até formação de disco transparente. Os espectros de absorção no infravermelho com transformada de Fourier foram obtidos empregando-se um equipamento Perkin Elmer 16PC FT-IR, os dados foram coletados na região de 4000-400 cm⁻¹.

3.2.4 Avaliação do perfil de liberação do ibuprofeno a partir das microesferas

3.2.4.1 Determinação do ibuprofeno por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

3.2.4.1.1 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência SLCA VP, equipado com duas bombas LC-10AD VP, detector UV/VIS APD-10AV VC e workstation Class-VP (Shimadzu), utilizando sistema de fase reversa e modo isocrático. As condições cromatográficas foram as seguintes: coluna Metasil C8 (250 cm x 4,6 mm ID, 5 µm); fase móvel, metanol:água (65:35 v/v) ajustado a pH 3,0 com ácido ortofosfórico; fluxo, 1,0 mL/min; volume de injeção, 20 µL e detecção no ultravioleta, 222 nm.

3.2.4.1.2 Preparação da curva de calibração

Para a construção da curva de calibração, soluções metanólicas de ibuprofeno foram preparadas nas concentrações de 1,0 mg/mL e 10,0 mg/mL. Estas soluções foram diluídas para obter soluções de ibuprofeno nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300 e 500 µg/mL em tampão fosfato (0,02 M) pH 7,4.

As soluções foram analisadas por CLAE conforme em 3.2.4.1.1. As soluções foram injetadas em triplicata e as médias das áreas referentes a cada concentração foram plotadas em gráfico de concentração *versus* área. A equação da reta e o coeficiente de correlação, foram calculados pela análise da regressão linear.

3.2.4.2 Determinação da solubilidade do ibuprofeno em solução tampão fosfato (0,02 M) pH 7,4

Cerca de 5 mg de ibuprofeno, foram colocados em 20 mL de tampão fosfato (0,02 M) pH 7,4 e mantido em banho de ultrassom durante seis horas. Após este período, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm. Uma alíquota de 0,500 mL do sobrenadante foi transferida para um balão volumétrico e o volume completado até 5,0 mL com solução tampão fosfato (0,02 M) pH 7,4. Esta amostra foi analisada por CLAE conforme descrito em 3.2.4.1.1. A análise foi realizada em triplicata e a concentração das soluções foi determinada por meio da comparação da área dos picos referente ao ibuprofeno obtida no cromatograma, com aquela obtida após a injeção de uma solução padrão de ibuprofeno de concentração conhecida, analisada nas mesmas condições.

3.2.4.3 Avaliação do perfil de liberação do ibuprofeno a partir das microesferas

Cerca de 75 mg de microesferas de PLAGA, P(3HB) ou P(3HB-co-3HV) contendo ibuprofeno, exatamente pesadas, foram colocadas em 20 mL de tampão fosfato (0,02 M) pH 7,4 contendo Tween 80 0,05% (p/p) e imidazolinidiluréia 0,1% (p/p). As amostras foram mantidas sob agitação mecânica a 37 °C e nos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 168 horas, alíquotas de 1,0 mL foram coletadas e analisadas por CLAE conforme descrito em 3.2.4.1.1.

Após cada coleta, o volume removido foi repostado para o meio de liberação. Os ensaios foram realizados em quadruplicata e a concentração de

ibuprofeno nas das soluções foi determinada por meio da comparação da área do pico referente ao ibuprofeno obtida no cromatograma, com aquela obtida após a injeção de uma solução padrão de ibuprofeno de concentração conhecida, analisada nas mesmas condições. A partir destes resultados, curvas de liberação do ibuprofeno, expressas em porcentagem (%) de fármaco liberado *versus* tempo (horas), foram construídas.

3.2.5 Estudo de degradação *in vitro* das microesferas de PLAGA, P(3HB) e P(3HB-co-3HV)

3.2.5.1 Ensaio de degradação térmica *in vitro* das microesferas

Cerca de 100 mg de microesferas brancas de PLAGA, P(3HB) ou P(3HB-co-3HV), exatamente pesadas, foram transferidas para balão de fundo redondo na qual foram adicionados 25 mL de tampão fosfato (0,02 M) pH 7,4. As amostras foram submetidas ao refluxo por 24 horas a 100 °C. Após o refluxo, o líquido sobrenadante foi coletado e analisado por CLAE nas condições cromatográficas descritas em 3.2.5.3.2.1 e 3.2.5.3.2.2.

3.2.5.2 Ensaio de degradação *in vitro* das microesferas em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C

Cerca de 75 mg de microesferas de PLAGA, P(3HB) ou P(3HB-co-3HV) brancas e contendo ibuprofeno, exatamente pesadas, foram adicionadas em 20 mL de tampão fosfato (0,02 M) pH 7,4, contendo tween 80 0,05% (p/p) e imidazolinidiluréia 0,1% (p/p). As amostras foram mantidas sob agitação mecânica em banho de água a 37 °C. Nos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 168 horas e 14, 30, 60, 90 dias, alíquotas de 1,0 mL foram retiradas do meio, e, analisadas por CLAE conforme descrito em 3.2.5.3.2.1 e 3.2.5.3.2.2. Após cada coleta, o volume removido foi repostado para o meio de degradação. Após 90 dias de ensaio, as microesferas resultantes foram lavadas três vezes com água destilada, centrifugadas e liofilizadas. As partículas foram então analisadas por MEV, DSC e FT-IR.

3.2.5.3. Caracterização dos produtos de degradação

3.2.5.3.1 Determinação do pH

O pH da solução tampão fosfato foi determinado ao longo do ensaio de degradação, utilizando potenciômetro Labmeter modelo PH2, calibrado com soluções pH a 6,8 e 4,01.

3.2.5.3.2 Análise dos monômeros no meio de degradação

3.2.5.3.2.1 Análise do ácido glicólico e ácido lático por CLAE

3.2.5.3.2.1.1 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência SLCA VP, equipado com duas bombas LC-10AD VP, detector UV/VIS APD-10AV VC e workstation Class-VP (Shimadzu), utilizando sistema de fase reversa e modo isocrático. As condições cromatográficas foram as seguintes: coluna Metasil C8 (250 cm x 4,6 mm ID, 5 μ m); fase móvel, metanol:tampão fosfato 0,02 M (10:90 v/v) ajustado a pH 3,0 com ácido ortofosfórico; fluxo, 1,0 mL/min; volume de injeção, 20 μ L e detecção no ultravioleta, 210 nm.

3.2.5.3.2.1.2 Preparação da solução padrão de ácido glicólico e ácido lático

Para a análise da solução padrão do ácido glicólico e ácido lático, solução em tampão fosfato (0,02 M) pH 3,0 foi preparada na concentração de 10,0 mg/mL. Esta solução foi diluída para obter solução de ácido glicólico e ácido lático na concentração de 500 μ g/mL em tampão fosfato (0,02 M) pH 3,0. A solução foi analisada por CLAE como descrito no item 3.2.5.3.2.1.1.

3.2.5.3.2.2 Análise do ácido butírico, ácido crotonico e ácido valérico por CLAE

3.2.5.3.2.2.1 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência SLCA VP, equipado com duas bombas LC-10AD VP, detector UV/VIS APD-10AV VC e workstation Class-VP (Shimadzu), utilizando sistema de fase reversa e modo isocrático. As condições cromatográficas foram as seguintes: coluna Metasil C8 (250 cm x 4,6 mm ID, 5 µm); fase móvel, metanol:tampão fosfato 0,02M (20:80 v/v) ajustado a pH 3,0 com ácido ortofosfórico; fluxo, 1,0 mL/min; volume de injeção, 20 µL e detecção no ultravioleta, 210 nm.

3.2.5.3.2.2.2 Preparação da solução padrão de ácido butírico, ácido crotonico e ácido valérico

Para a análise da solução padrão do ácido butírico e ácido valérico, solução em tampão fosfato (0,02 M) pH 3,0 foi preparada na concentração de 10,0 mg/mL. Esta solução foi diluída para obter solução de ácido butírico e ácido valérico na concentração de 500 µg/mL em tampão fosfato (0,02 M) pH 3,0. Da mesma forma foi preparada a solução padrão de ácido crotonico. As soluções foram analisadas por CLAE como descrito no item 3.2.5.3.2.2.1.

3.2.5.4 Caracterização das microesferas após ensaio de degradação

3.2.5.4.1 Avaliação da morfologia

A morfologia das microesferas após degradação foi realizada conforme método descrito em 3.2.3.1.

3.2.5.4.2 Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A avaliação das microesferas obtidos após degradação por calorimetria exploratória diferencial foi realizada conforme método descrito em 3.2.3.4.1.

3.2.5.4.3 Difração de Raio-X

As análises das microesferas obtidas após degradação por difração de raio-x foi realizada conforme método descrito em 3.2.3.5.

3.2.5.4.4 Análise por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A análise das microesferas obtidas após degradação por FT-IR foi realizada conforme método descrito em 3.2.3.6.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparação das microesferas

4.1.1 Preparação das microesferas

Diversas técnicas são descritas na literatura para a preparação de microesferas, entre elas, a técnica de emulsificação seguida da evaporação do solvente tem sido amplamente empregada face a simplicidade dos procedimentos envolvidos na obtenção das partículas e as possibilidades de modulação das características físicas e físico-químicas das mesmas. Além disso, trata-se de um procedimento versátil uma vez que permite a encapsulação de substâncias de natureza hidrofóbica ou hidrofílica, pela escolha dos solventes da fase externa (WATTS *et al.*, 1990).

O desenvolvimento de microesferas tem sido considerado uma boa estratégia para a obtenção de formas farmacêuticas de liberação prolongada para via intramuscular. Esta via produz um efeito geralmente mais rápido que a administração oral, uma vez que é possível formar depósitos do fármaco que permitam a possibilidade de manutenção da concentração plasmática em níveis mais constantes, reduzindo o número de administrações diárias e conseqüentemente melhorando a adesão do paciente ao tratamento. Por outro lado, a utilização da via intramuscular necessita impreterivelmente do emprego de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis que gerem produtos de degradação assimiláveis pelo organismo. PHAs aparecem como uma classe de polímeros em alternativa a utilização de poliésteres alifáticos, como o PLAGA, freqüentemente usado na preparação de sistemas microparticulados, como por exemplo de bromocriptina, disponível comercialmente com o nome de Parlodel®, entre outros. Surgem, também, a partir da necessidade de pesquisa de novos materiais para substituição ou otimização de matérias primas tradicionalmente utilizadas.

Neste estudo os polímeros empregados para a formação das microesferas foram poli (D,L ácido láctico-co-glicólico) (PLAGA, PM cerca de 75.000 daltons, 75% de ácido láctico e 25% de ácido glicólico), poli (3-ácido

hidroxibutírico) (P(3HB), PM maior que 300.000 daltons) e seu copolímero com 5% de hidroxivalerato (P(3HB-co-3HV), PM 680.000 daltons) sendo utilizada a quantidade de 200 mg dos polímeros para preparação de todas as formulações. Com o intuito de avaliar a capacidade para o desenvolvimento de microesferas de liberação prolongada a partir dos PHAs, os resultados obtidos serão comparados com as microesferas preparadas com PLAGA.

Os PHAs são polímeros com grau de cristalinidade alto, em especial o P(3HB) e, por terem esta característica, existe dificuldade em sua solubilização. Para solucionar este problema foi necessário fazer um tratamento térmico no P(3HB). Este tratamento consistiu no aquecimento do P(3HB) por cerca de três minutos a 190-200 °C em estufa seguido de um rápido resfriamento a - 2 °C e então solubilizado com facilidade em diclorometano. Para o seu copolímero P(3HB-co-3HV), o aquecimento a 60 °C sob refluxo com diclorometano por duas horas foi suficiente, uma vez que possui unidades de 3HV em sua estrutura tornando-o menos cristalino quando comparado ao P(3HB) (BIOMER, 2006).

Vários fatores afetam as características finais das microesferas, quando a técnica de emulsão/evaporação do solvente é empregada. A adição de PVA na fase externa conduz ao aumento da viscosidade, evitando a coalescência das gotículas da fase interna e estabilizando a emulsão. A sua concentração pode afetar o tamanho das partículas, geralmente reduzindo-o a medida que esta aumenta (LEO *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2001). O diâmetro médio das partículas também depende da concentração do polímero da fase interna, estando diretamente relacionada a viscosidade da mesma, geralmente quanto maior é a concentração de polímero, maior é a viscosidade da solução e menor a tendência à fragmentação, conduzindo, assim, a obtenção de partículas maiores. A velocidade de agitação também afeta o diâmetro médio e a distribuição granulométrica das partículas (DONNEL & MCGINITY, 1997). Com o objetivo de avaliar o efeito do tipo de polímero empregado na preparação das microesferas sobre as características físico-químicas das partículas e sobre a encapsulação do ibuprofeno, os diversos parâmetros de formulação que poderiam ser variados, como tipo e concentração de estabilizante, volume da

fase orgânica e velocidade de agitação, entre outros, foram mantidos constantes.

O ibuprofeno é um antiinflamatório não esteroide, lipofílico, cuja solubilidade é dependente do pH. A solubilidade aquosa do ibuprofeno a 37 °C em pH 4,0 é de 0,35 g/L não sendo significativamente aumentada com o aumento do pH até 5,5. Um aumento acentuado na solubilidade ocorre entre pH 6,0 e 7,0, alcançando a concentração máxima de 5,6 g/L (GOSH *et al.*,1998). Assim, com o objetivo de maximizar a eficiência de encapsulação do ibuprofeno e assegurar a obtenção de elevados teores de fármaco nas microesferas, a fase externa da formulação foi ajustada a pH 5,0. Com o intuito de avaliar o efeito da quantidade de ibuprofeno inicialmente adicionada sobre a eficiência de encapsulação e teor de fármaco, foram preparadas microesferas com 50 ou 100 mg de fármaco, perfazendo a proporção fármaco:polímero de 1:4 (p/p) e 1:2 (p/p), respectivamente.

4.2 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de fármaco nas microesferas de ibuprofeno

Várias metodologias têm sido descritas na literatura para determinação do ibuprofeno, entre elas encontra-se a espectrofotometria de absorção no ultravioleta, utilizando o comprimento de onda de 265 nm (CLARKE, 2004). Para tal, uma curva de calibração do fármaco foi construída utilizando soluções metanólicas de ibuprofeno nas concentrações variando entre 350 a 650 µg/mL, conforme descrito no item 3.2.2.1. Na Tabela 3. encontra-se demonstrado as absorvâncias obtidas para o ibuprofeno nas diferentes concentrações. A curva de concentração do ibuprofeno *versus* as absorvâncias, assim como a equação da reta e coeficiente de correlação encontra-se demonstrado na Figura 5.

TABELA 3. Absorbâncias obtidas após análise das soluções de ibuprofeno padrão obtidas por espectrofotometria de absorção no ultravioleta

| Concentração de ibuprofeno (µg/mL) | Absorbância ± σ | CV (%) |
|---------------------------------------|-----------------|--------|
| 350 | 0,4690 ± 0,0029 | 0,62 |
| 450 | 0,6027 ± 0,0033 | 0,56 |
| 500 | 0,6590 ± 0,0042 | 0,64 |
| 550 | 0,7270 ± 0,0014 | 0,19 |
| 600 | 0,7903 ± 0,0012 | 0,15 |
| 650 | 0,8603 ± 0,0030 | 0,35 |

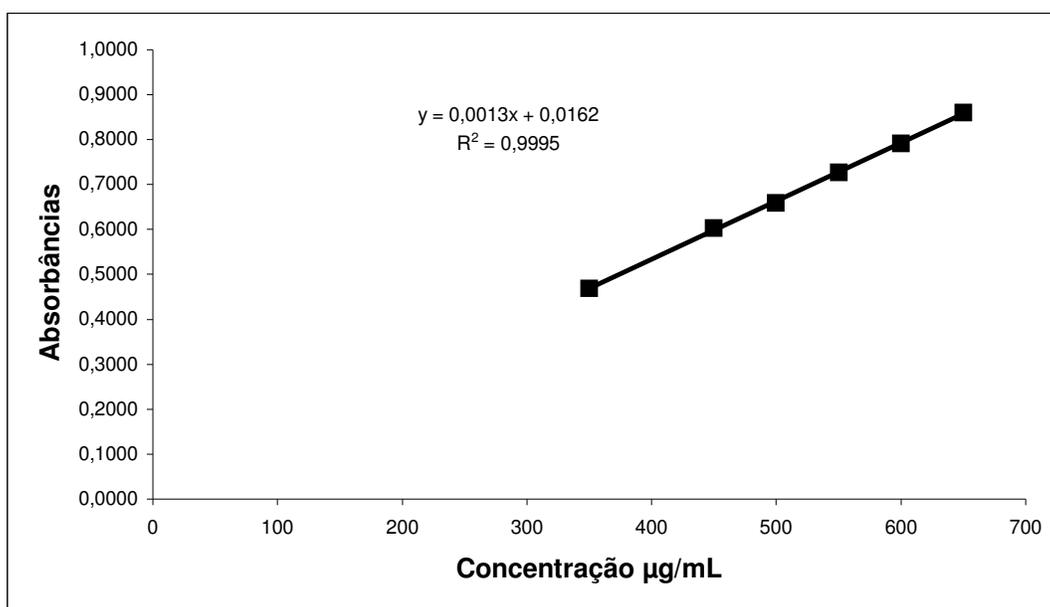


FIGURA 5. Curva de calibração de ibuprofeno obtida por espectrofotometria de absorção no ultravioleta

A avaliação do coeficiente de regressão calculado evidenciou a existência de um comportamento linear significativo. A análise do ponto de intersecção e a determinação dos limites de confiança demonstram a ausência de erro sistemático constante, onde o fator de variação é independente da concentração dos componentes analisados (FUNCK *et al.*, 1992). Uma vez que os limites de confiança incluem o valor zero, este tipo de erro não foi verificado

com a metodologia de espectrofotometria de absorção no ultravioleta empregada (Tabela 4).

TABELA 4. Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração do ibuprofeno por espectrofotometria de absorção no ultravioleta

| Parâmetros de regressão | Valores |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| Intercepto (intervalo de confiança) | 0,0162 (-0,76036 a 0,09385) |
| Inclinação (intervalo de confiança) | 0,0013 (0,00123 a 1,36027) |
| R^2 | 0,9995 |

Para a determinação do teor de ibuprofeno nas microesferas, o fármaco foi previamente extraído com metanol, conforme descrito em 3.2.2.2. Este procedimento foi previamente validado, determinando-se a concentração de ibuprofeno no líquido extrator em função do tempo de agitação.

Nas microesferas, a eficiência de encapsulação e o teor do fármaco foram estimados com a determinação da concentração do ibuprofeno nas soluções obtidas após extração das partículas com metanol por espectrofotometria de absorção no ultravioleta a 265 nm, empregando-se uma solução do fármaco na concentração de 500 µg/mL como padrão externo, analisado sob as mesmas condições. Os valores de eficiência de encapsulação e teor do ibuprofeno variaram entre 42,10 a 86,04% e 8,45 a 26,68 mg/100mg, respectivamente e estão demonstrados na Tabela 6.

TABELA 6. Valores de eficiência de encapsulação e teor de fármaco nas microesferas

| Tipos de microesferas | Eficiência de encapsulação (%) $\pm \sigma$ | Teor do fármaco (mg/100mg) $\pm \sigma$ |
|------------------------------|---|---|
| IBF: PLAGA (1:2) | 58,68 \pm 3,30 | 19,53 \pm 1,08 |
| IBF: PLAGA (1:4) | 42,10 \pm 5,17 | 8,45 \pm 0,99 |
| IBF: P(3HB) (1:2) | 86,04 \pm 2,39 | 26,68 \pm 0,79 |
| IBF: P(3HB) (1:4) | 65,75 \pm 6,15 | 13,15 \pm 1,22 |
| IBF: P(3HB-co-3HV) (1:2) | 76,15 \pm 2,89 | 25,35 \pm 0,93 |
| IBF: P(3HB-co-3HV) (1:4) | 60,03 \pm 5,90 | 12,01 \pm 1,17 |

Vários fatores podem interferir na eficiência de encapsulação do fármaco tais como, a natureza do solvente da fase interna e externa, a relação fármaco: polímero e o tipo e concentração do estabilizante. De modo geral, elevados níveis de encapsulação são observados quando o coeficiente de partição do fármaco encontra-se em favor da fase interna da emulsão, sendo a fração não encapsulada freqüentemente eliminada nos processos de lavagem e centrifugação (WATTS *et al.*, 1990; DONNEL & MCGINITY, 1997; FREIBERG & ZHU, 2004).

Neste trabalho, a influência dos parâmetros de formulação sobre a eficiência de encapsulação e conseqüentemente sobre o teor de fármaco das microesferas foi avaliada estatisticamente empregando-se um delineamento fatorial 3 X 2. Os dois fatores selecionados foram o tipo de polímero e a proporção fármaco:polímero empregado nas formulações. O tipo de polímero empregado (fator A) foi avaliado em três níveis, PLAGA, P(3HB) ou P(3HB-co-3HV), enquanto a proporção fármaco:polímero (fator B) foi avaliado em dois níveis, 1:4 ou 1:2. Os tratamentos das respostas obtidas e a análise de variância podem ser visualizados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

TABELA 7. Tratamento das respostas obtidas na análise fatorial da eficiência de encapsulação (%)

| | Fator A (tipo de polímero) | | | | | | Total | |
|--|----------------------------|-------|--------|-------|---------------|-------|---------|--------|
| | PLAGA | | P(3HB) | | P(3HB-co-3HV) | | | |
| Fator B (fármaco: polímero) | 1:4 | 38,00 | | 66,66 | | 68,35 | | 503,67 |
| | | 38,90 | 126,30 | 72,80 | 197,26 | 56,56 | 180,11 | |
| | | 49,40 | | 57,80 | | 55,20 | | |
| | 1:2 | 62,81 | | 82,90 | | 80,00 | | |
| | | 54,73 | 176,04 | 86,50 | 258,12 | 75,47 | 228,47 | |
| | | 58,50 | | 88,72 | | 73,00 | | |
| Total | 302,34 | | 455,38 | | 408,58 | | 1166,30 | |

TABELA 8. Análise de variância realizada no estudo da influência dos fatores de formulação sobre os valores de eficiência de encapsulação das microesferas.

| Causas de variação | GL | Soma dos Quadrados | Média dos Quadrados | F |
|--------------------|----|--------------------|---------------------|--------|
| A | 2 | 2049,91 | 1024,55 | 32,89* |
| B | 1 | 1403,79 | 1403,79 | 45,06* |
| A x B | 2 | 15,65 | 7,83 | 0,251 |
| Tratamento | 5 | 3469,35 | 693,87 | |
| Resíduo | 12 | 373,81 | 31,15 | |
| Total | 17 | 3843,16 | | |

A = tipo de polímeros (PLAGA, PHB ou PHBV); B = proporção fármaco:polímero (1:4 ou 1:2); A x B = interação entre os fatores; GL = graus de liberdade; F_{tabelado} (graus de liberdade = 5,12; $\alpha = 0,05$) = 3,11; *Significativo

Como pode ser observado, o valor de F calculado é maior que o valor de F tabelado ($F_{5,12} = 3,11$) para ambos fatores estudados, indicando que eles afetam a eficiência de encapsulação do ibuprofeno. Entretanto, não foi observada interação entre os dois fatores.

Com o intuito de verificar quais valores de eficiência de encapsulação são estatisticamente diferentes entre si, a diferença mínima significativa entre as médias foi calculada usando o teste de Tukey. Neste teste, o valor da diferença mínima significativa (d.m.s.) é calculado pela seguinte equação:

$$\text{d.m.s.} = q \times \sqrt{\text{QMR} / n}$$

onde:

QMR é o quadrado médio do resíduo da análise de variância;

n é o número de repetições de cada um dos tratamentos

q é o valor dado na tabela ao nível de significância estabelecida.

De acordo com este teste, duas médias são estatisticamente diferentes toda vez que o valor absoluto da diferença entre elas for igual ou maior que a d.m.s.. Neste caso, o valor de d.m.s. após aplicação do teste de Tukey foi igual a 15,30, para um valor de q igual a 4,75. As diferenças entre as médias de eficiência de encapsulação para cada um dos tratamentos podem ser visualizadas na Tabela 9.

TABELA 9. Valores médios de eficiência de encapsulação e diferenças absolutas entre as médias obtidas em cada um dos tratamentos.

| | Fator B | | Diferença (1:4) – (1:2) | |
|-------------------|-----------------------------|--------|----------------------------|--------|
| | 1:4 | 1:2 | | |
| Fator A | PLAGA | 42,10 | 58,68 | 16,58* |
| | P(3HB) | 65,75 | 86,04 | 20,29* |
| | P(3HB-co-3HV) | 60,03 | 76,15 | 16,20* |
| | PLAGA-P(3HB) | 23,65* | 27,36* | |
| Diferenças | PLAGA-P(3HB-co-3HV) | 18,20* | 17,47* | - |
| | P(3HB)-P(3HB-co-3HV) | 5,72 | 9,89 | |

* d.m.s. = 15,30

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 9, pode-se concluir que a mudança da proporção fármaco polímero de 1:4 para 1:2 conduziu ao aumento da eficiência de encapsulação e conseqüentemente do teor de fármaco nas microesferas. Um aumento significativo nos valores de eficiência de encapsulação foi observado quando os dois PHAs foram empregados na preparação das microesferas, em relação aos valores obtidos com o PLAGA. Entretanto, não foi verificada diferença significativa nos valores de eficiência de encapsulação quando P(3HB) e P(3HB-co-3HV) foram comparados.

Podemos observar que os valores de eficiência de encapsulação e teor de fármaco aumentaram com o aumento da quantidade inicial de fármaco adicionado para todas as formulações. Entretanto, a eficiência de encapsulação e o teor do fármaco foram maiores quando o P(3HB) e P(3HB-co-3HV) foi empregado. Já para as microesferas de PLAGA foram obtidos os menores valores de eficiência de encapsulação e teor de fármaco para ambas proporções de fármaco para polímero.

4.3 Caracterização físico-química das microesferas

A caracterização físico-química das microesferas tem como objetivo avaliar a morfologia, tamanho, distribuição granulométrica, porosidade e grau de cristalinidade das partículas, bem como verificar a presença de interações entre fármaco e matriz polimérica, uma vez que estas características estão correlacionadas com a velocidade de liberação do fármaco, podendo elucidar o mecanismo pelo qual é liberado da partícula.

4.3.1 Avaliação da morfologia

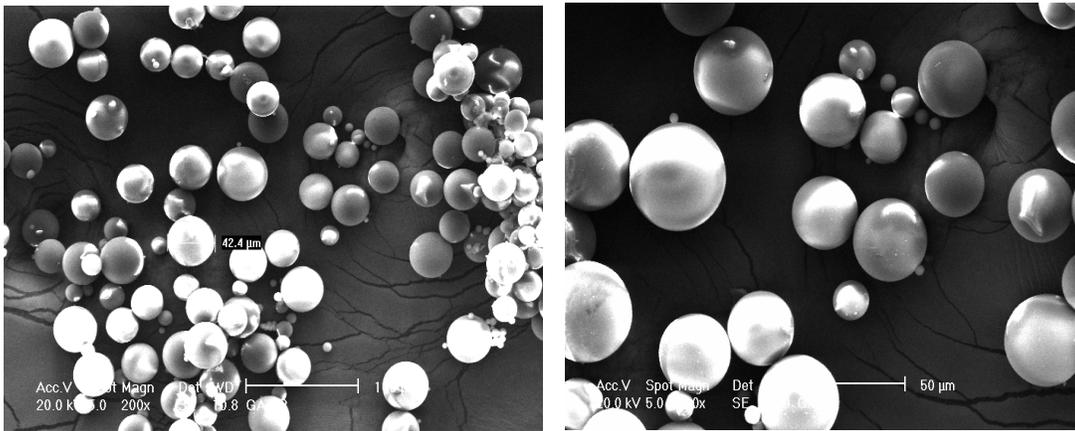
A morfologia das microesferas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), conforme descrito no item 3.2.2.2. As micrografias obtidas a partir das microesferas brancas e preparadas usando a proporção

fármaco:polímero de 1:4 e 1:2, podem ser observadas nas Figuras 6, 7 e 8, respectivamente.

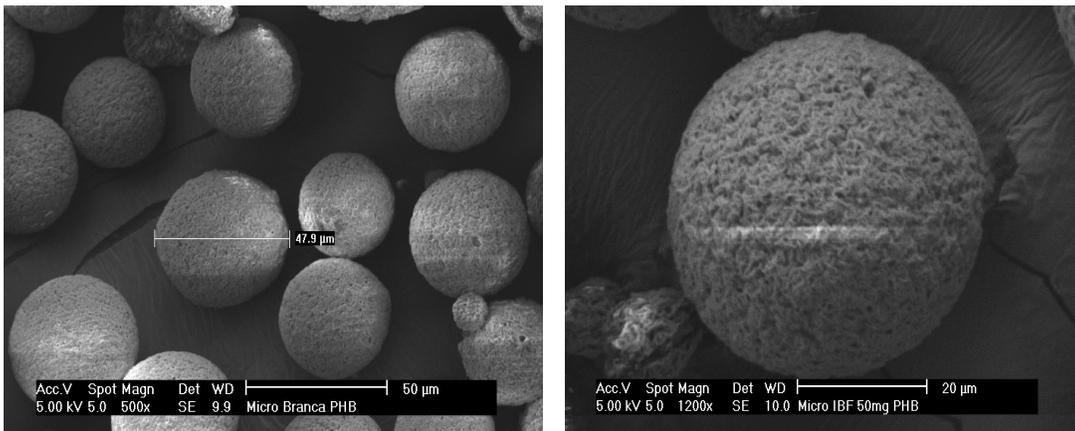
Como pode ser observado nas figuras, a técnica de emulsificação/evaporação do solvente empregada conduziu à obtenção de partículas esféricas independente do polímero empregado. Além disso, partículas apresentando tamanho médio em torno de 30 a 50 μm foram obtidas. A utilização do PLAGA conduziu à obtenção de partículas de superfície lisa, enquanto aquelas preparadas a partir do P(3HB) e P(3HB-co-3HV) demonstraram uma superfície mais rugosa e porosa. Segundo alguns autores, micropartículas preparadas com polímeros amorfos como o PLAGA, poliestireno e resinas acrílicas tem levado a formação de partículas com superfície lisa em comparação com o P(3HB) e P(3HB-co-3HV). Isto sugere que as porções cristalinas do P(3HB) e P(3HB-co-3HV) determinam o comportamento, apesar da mobilidade das cadeias de sua porção amorfa devido as suas baixas temperaturas de transição vítrea (MARTIN *et al.*, 2000).

Através das micrografias não foi possível verificar diferença visível na superfície das microesferas com a utilização de fármaco:polímero na proporção de 1:4 em relação as microesferas brancas. Por outro lado, é possível verificar a presença de cristais de fármaco não encapsulados nas micrografias obtidas a partir da formulação contendo a proporção de fármaco:polímero de 1:2, indicando que ocorreu a saturação do carreador para esta proporção (Figura 8). A presença destes cristais pode justificar a maior eficiência de encapsulação e teor de fármaco, quando esta proporção foi empregada. Uma vez sendo um fármaco pouco solúvel em água, os procedimentos empregados para a lavagem das microesferas não foram suficientes para a remoção destes. Visto que a presença de cristais de fármaco não encapsulado não é desejável, somente as microesferas preparadas com a proporção fármaco:polímero (1:4) foram posteriormente empregadas nos ensaios de liberação e degradação *in vitro*.

(a)



(b)



(c)

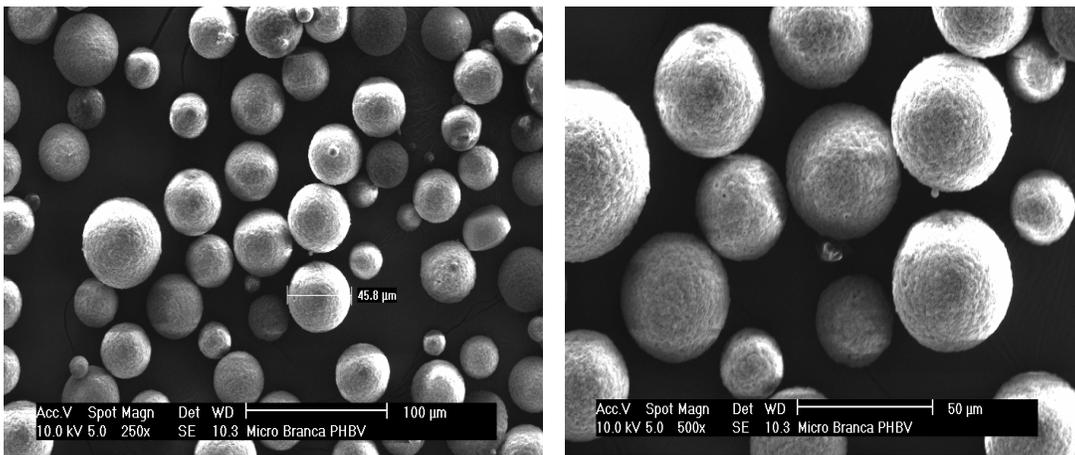


FIGURA 6. Micrografias obtidas por MEV das microesferas brancas de (a) PLAGA, (b) P(3HB) e (c) P(3HB-co-3HV).

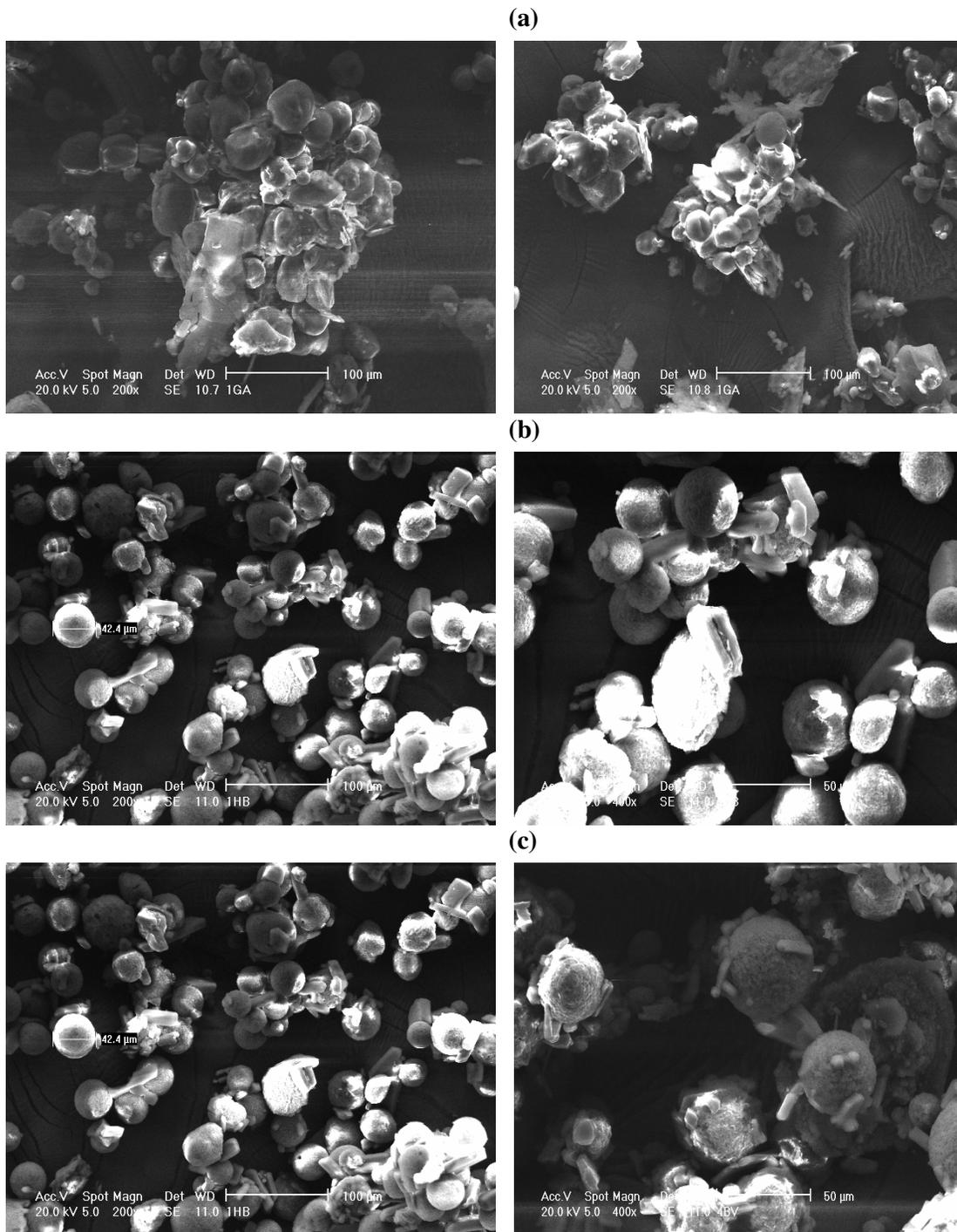


FIGURA 7. Micrografias obtidas por MEV por microsferas contendo IBF, preparadas com proporção de 1:2, a partir do (a) PLAGA, (b) P(3HB) e (c) P(3HB-co-3HV).

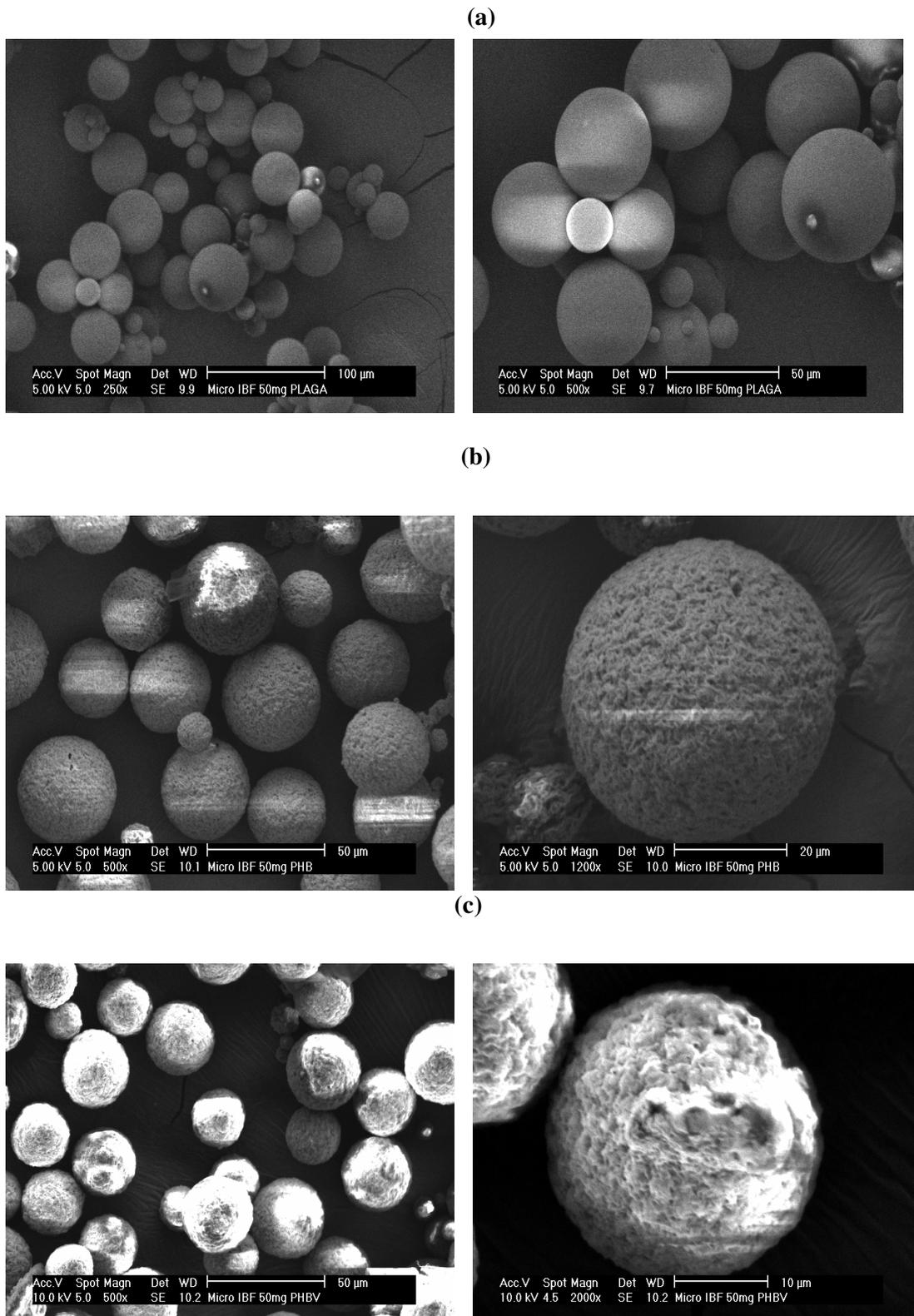


FIGURA 8. Micrografias obtidas por MEV por microesferas contendo IBF, preparadas com proporção de 1:4, a partir do (a) PLAGA, (b) P(3HB) e (c) P(3HB-co-3HV).

4.3.2 Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica das partículas

Quando a técnica de emulsão/evaporação do solvente é empregada, o diâmetro médio das microesferas resultantes é afetado por diversos fatores, incluindo concentração de polímero e viscosidade da fase interna, temperatura, velocidade de agitação e tipo e concentração de estabilizante da fase externa (FREIBERG & ZHU, 2004). Trata-se de um parâmetro importante para a caracterização destes sistemas, uma vez que está diretamente correlacionado com a velocidade de liberação do fármaco, além de condicionar o modo de administração. A obtenção de partículas com tamanho de até 100 μm é requerida para a injeção intramuscular de suspensões de microesferas, devido as suas propriedades de seringabilidade, evitando o entupimento da agulha e os inconvenientes ao paciente durante a administração (VILA JATO, 1997).

Os valores de diâmetro médio e a representação gráfica da distribuição granulométrica das partículas encontram-se demonstrados na Tabela 10 e Figura 9, respectivamente. Conforme pode ser observado, o diâmetro médio das microesferas brancas de PLAGA foi 27,10 μm , menor do que aqueles obtidos para as microesferas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) que apresentaram diâmetro médio em torno de 40 μm . Do ponto de vista da aplicabilidade para a administração parenteral, o tamanho obtido para as microesferas de PLAGA, P(3HB) e P(3HB-co-3HV) foi considerado satisfatório. A diferença encontrada nos valores de diâmetro médio está provavelmente relacionada às características físicas e químicas dos polímeros, particularmente seu peso molecular, visto que todas as outras condições de preparação foram mantidas constantes. A adição de ibuprofeno nas formulações, na proporção de fármaco:polímero (1:4), não pareceu afetar o diâmetro médio das microesferas.

TABELA 10. Valores obtidos na determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica das microesferas por volume pelo granulômetro a laser

| Microesfera | Diâmetro 10% (μm) | Diâmetro 50% (μm) | Diâmetro 90% (μm) | Diâmetro médio (μm) |
|--------------------------|--|--|--|--|
| PLAGA branca | 3,39 | 29,34 | 41,08 | 27,10 |
| IBF: PLAGA (1:4) | - | - | - | - |
| P(3HB) branca | 23,55 | 38,08 | 61,74 | 40,14 |
| IBF: P(3HB) (1:4) | 26,91 | 38,82 | 60,12 | 41,30 |
| P(3HB-co-3HV) branca | 26,98 | 38,41 | 56,21 | 40,27 |
| IBF: P(3HB-co-3HV) (1:4) | 23,95 | 39,25 | 69,39 | 42,94 |

(-) = não detectado

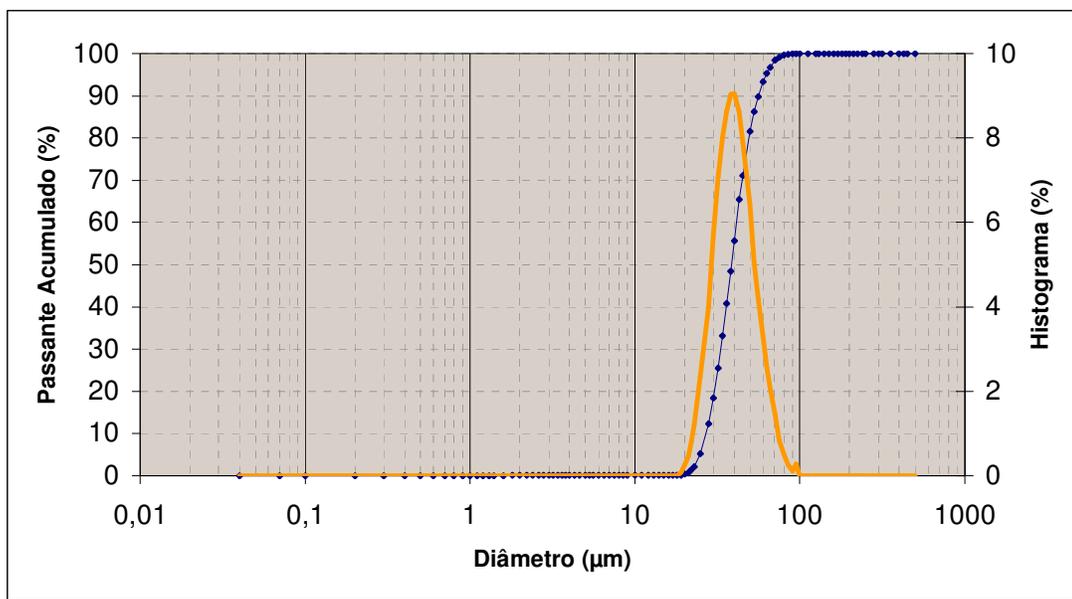


FIGURA 9. Representação gráfica da distribuição granulométrica das microesferas obtida pela técnica de difração a laser.

4.3.3. Análise da porosidade das partículas por adsorção de gás

PAYNAN e colaboradores (2003) relataram a importância da análise da área superficial das micropartículas, correlacionando ao seu tamanho. Quando o tamanho da partícula é reduzido, a área de superfície por volume de sólido aumenta, facilitando o contato e/ou penetração de líquido no seu interior (meio de liberação/degradação) e favorecendo a liberação de fármaco encapsulado e/ou degradação do material polimérico. A distribuição do tamanho dos poros é um parâmetro importante para o estudo da estrutura porosa, uma vez que está intimamente relacionada com a área total do sólido. A área superficial da partícula, por sua vez, está correlacionada à porosidade, pois quanto maior for a porosidade da partícula maior será sua área superficial. Dessa maneira, a porosidade da partícula facilita a difusão de fármacos e o acesso do meio líquido às ligações hidrolisáveis do polímero, podendo influenciar na cinética de liberação do fármaco bem como na degradação polimérica.

Os principais parâmetros utilizados na caracterização da estrutura porosa das partículas são a área específica, tamanho e volume de poros e, para determiná-los quantitativamente várias técnicas foram desenvolvidas, em especial a adsorção de nitrogênio. Portanto, quando um sólido é exposto a um gás ou vapor em um sistema fechado à temperatura constante, o sólido passa a adsorver o gás, ocorrendo assim um aumento da massa do sólido e um decréscimo da pressão do gás. A quantidade de gás adsorvida pode ser calculada pela diminuição da pressão por meio da aplicação das leis dos gases ou pela massa de gás adsorvida pelo sólido. Com o objetivo de se obter informações sobre as características porosas, vários métodos foram desenvolvidos com base em modelos empíricos e teóricos.

O fenômeno de adsorção é realizado para de se obter informações sobre a área específica e a estrutura porosa de um sólido e, para tal, a construção de uma isoterma de adsorção é de fundamental importância, pois sua forma revela muitos detalhes sobre as características do material. Assim, a isoterma mostra a quantidade molar de gás adsorvida ou dessorvida por um sólido a uma temperatura constante, em função da pressão de gás. Por

convenção, costuma-se expressar a quantidade de gás adsorvida pelo seu volume em condição padrão de temperatura e pressão, enquanto a pressão é expressa pela pressão relativa P/P_0 , ou seja, a relação entre a pressão de trabalho e a pressão de vapor na temperatura utilizada (TEIXEIRA *et al.*, 2001).

Um dos métodos mais comuns para a determinação da área específica de um sólido se baseia na determinação da quantidade de adsorvato necessária para recobrir a superfície de um adsorvente. Na década de 30, Brunauer, Emmett e Teller derivaram uma equação para a adsorção de gases em multicamadas na superfície de sólidos. A equação, denominada BET, se baseia na hipótese de que as forças responsáveis pela condensação do gás são também responsáveis pela atração de várias moléculas para a formação de multicamadas (TEIXEIRA *et al.*, 2001).

A distribuição de tamanho e de volume de poros, em função do diâmetro de poro, pode ser calculada a partir da pressão relativa na qual os poros são preenchidos com o líquido proveniente da condensação de um gás. O processo inverso, ou seja, a evaporação do líquido contido no poro também pode ser utilizada. Em 1951, Barret, Joyner e Halenda propuseram um método matemático denominado BJH que é utilizado até hoje no cálculo da distribuição do tamanho de poros. O método emprega a equação de Kelvin e assume o esvaziamento progressivo dos poros cheios de líquido com o decréscimo da pressão. Pode ser aplicado tanto no ramo da adsorção como no da dessorção da isoterma, desde que o decréscimo da pressão se inicie do ponto onde os poros sejam considerados totalmente preenchidos, normalmente para pressão relativa P/P_0 igual a 0,95 ou numa pressão igual a 95% da pressão de saturação. A quantidade de adsorvato evaporada a cada decréscimo de pressão, após a conversão de volume de gás para volume de líquido representa o volume de poro sem considerar o filme de adsorvente nas paredes de sólido (TEIXEIRA, *et al.*, 2001).

Desta maneira, a porosidade das microesferas foi avaliada por meio da determinação da quantidade de gás nitrogênio adsorvido ou dessorvido da superfície das partículas, com pressão de vapor no equilíbrio pelo método volumétrico estático. Os dados foram obtidos após adição ou remoção de uma quantidade conhecida de gás dentro e fora de uma célula contendo uma amostra do sólido, mantida numa temperatura constante abaixo da temperatura crítica do adsorvato. A quantidade de gás adsorvido ou dessorvido é a diferença entre a quantidade de gás adicionado ou removido e a quantidade requerida para preencher o espaço ao redor do adsorvente. A determinação da área específica foi analisada pelo método BET, enquanto o volume total de poros e a distribuição do tamanho de poros foram analisados pelo método BJH. Estes métodos consistem na aplicação de equações e relações cujos cálculos foram realizados em um sistema computacional chamado Autosorb.

Na Tabela 11 encontram-se os valores referentes à área de superfície das partículas, volume e tamanho médio de poro. Como pode ser observado nesta tabela, maiores valores de área superficial e de volume de poros foram obtidos para as microesferas preparadas a partir dos PHAs. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por MEV (item 4.3.1), onde partículas mais porosas são visualizadas nas micrografias obtidas a partir das microesferas de PHAs, contrastando com a superfície lisa das microesferas de PLAGA. Mesmo com a obtenção de partículas de maior tamanho (item 4.3.2), as microesferas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) apresentaram maior área superficial, em decorrência de sua maior porosidade. FREIBERG & ZHU (2004) relataram que a porosidade é uma importante característica das microesferas, podendo ser controlada por mudanças na técnica de preparação das partículas. Neste estudo, entretanto, a variação observada na estrutura porosa das partículas ocorreu devido às características dos polímeros, uma vez que os demais parâmetros de preparação empregados foram mantidos constantes.

TABELA 11. Valores obtidos após determinação da porosidade das partículas por adsorção a gás, calculados pelo método BET e BJH adsorção.

| Microesfera | Área superficial (m²/g) (método BET) | Volume de poros (cc/g) (método BJH) | Tamanho médio do poro (Å) (método BJH) |
|--------------------|--|--|---|
| PLAGA branca | $8,75 \times 10^{-2}$ | $3,52 \times 10^{-3}$ | 14,08 |
| IBF: PLAGA (1:4) | $4,59 \times 10^{-2}$ | $3,95 \times 10^{-3}$ | 14,08 |
| P(3HB) branca | $4,66 \times 10^{-1}$ | $1,36 \times 10^{-2}$ | 14,08 |
| IBF: P(3HB) (1:4) | $5,46 \times 10^{-1}$ | $6,18 \times 10^{-3}$ | 15,43 |
| PHBV branca | $7,16 \times 10^{-1}$ | $6,44 \times 10^{-3}$ | 15,43 |
| IBF: PHBV (1:4) | $2,25 \times 10^{-1}$ | $6,92 \times 10^{-3}$ | 15,43 |

PHBV = P(3HB-co-3HV)

4.3.4 Análise Térmica

4.3.4.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise térmica engloba um grupo de técnicas nas quais uma propriedade da amostra é analisada em função do tempo ou temperatura, enquanto ela é aquecida ou resfriada, em uma atmosfera específica, numa proporção fixa de mudança de temperatura ou temperatura constante. A aplicação de métodos térmicos de análise, em especial a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a termogravimetria (TG) tem sido de fundamental importância no estudo de caracterização das matérias-primas e desenvolvimento de produtos farmacêuticos (GIRON, 2002).

Na área de microencapsulação, a análise por DSC é empregada com o intuito de avaliar o grau de cristalinidade dos materiais empregados, bem como verificar a presença de interações entre fármaco e matriz polimérica. As curvas de DSC obtidas a partir das microesferas de PLAGA e PHAs encontram-se demonstradas nas Figuras 10, 11 e 12 e os dados obtidos a partir destas curvas encontram-se sumarizados nas Tabelas 12 e 13, respectivamente.

A análise térmica do PLAGA por DSC (Figura 10b, Tabela 12) revelou uma temperatura de transição vítrea (T_g) de 56,09 °C, não apresentando evento endotérmico referente à fusão, caracterizando a sua natureza amorfa. O valor de T_g do polímero nas microesferas brancas foi 50,59 °C e nas microesferas contendo ibuprofeno preparadas com as proporções de fármaco:polímero de 1:4 e 1:2, os valores de T_g encontrados foram 26,86 °C e 41,1 °C, respectivamente. Portanto, o processo de formação das microesferas levou à redução da T_g do polímero, especialmente quando o fármaco foi incorporado, podendo ser uma indicação de que o ibuprofeno atuou como um plastificante para o PLAGA (DUBERNET, 1995; FERNANDEZ-CARBALLIDO *et al.*, 2004). A ação plastificante pode ter ocorrido em decorrência do alojamento das moléculas do fármaco entre as cadeias poliméricas, afastando-as uma das outras. Este afastamento reduz as forças de atração intermoleculares secundárias, levando à redução do nível energético necessário para dar mobilidade às cadeias e, conseqüentemente, conduzindo à diminuição da T_g do polímero (LUCAS *et al.*, 2001).

O ibuprofeno foi caracterizado termicamente e sua curva de DSC (Figura 10a e Tabela 12) apresentou um evento endotérmico correspondente à fusão do fármaco na temperatura de 77,05 °C, estando de acordo com a literatura (XU *et al.*, 2004). As curvas de DSC das microesferas de PLAGA contendo o fármaco demonstraram um evento endotérmico referente à fusão do ibuprofeno a 74,21 °C e 75,99 °C, quando as mesmas foram preparadas com uma proporção de fármaco:polímero de 1:4 e 1:2, respectivamente. Podemos observar, contudo, que o evento endotérmico demonstrado após análise das microesferas de IBF:PLAGA (1:4) foi largo e pouco expressivo em comparação aquele observado na curva de DSC obtida a partir das microesferas de IBF:PLAGA (1:2), sugerindo que o fármaco está parcialmente disperso na forma molecular na matriz polimérica. FERNANDEZ-CARBALLIDO e colaboradores (2004) obtiveram resultados semelhantes para microesferas de PLAGA contendo ibuprofeno, pois neste estudo o termograma não apresentou o pico característico de fármaco, indicando, dessa forma, a mudança no estado físico do mesmo.

DSC pode ser empregada para avaliar o grau de cristalinidade do fármaco nas microesferas, uma vez que a mudança da mesma pode ser caracterizada por uma diminuição do ponto de fusão (WILLIANS *et al.*, 2005). Uma estimativa da cristalinidade do ibuprofeno pode ser feita usando a diferença entre a entalpia de fusão experimental e teórica através da equação adaptada de PIKAL e colaboradores (1978), assumindo que o fármaco puro é 100% cristalino. Esta estimativa é calculada pela seguinte equação:

$$X_c \% = 100 \times \Delta H_m / [\Delta H_m^0]$$

onde:

$X_c\%$ é o grau de cristalinidade relativa (%)

ΔH_m é a entalpia de fusão do ibuprofeno na microesfera

ΔH_m^0 é a entalpia de fusão do ibuprofeno puro

Logo, para as microesferas de IBF:PLAGA (1:4) ocorreu uma acentuada redução na cristalinidade do fármaco, quando estimado usando a equação acima, sendo encontrado somente cerca de 0,43% na forma cristalina (Tabela 12). Contrariamente, para as microesferas preparadas com uma proporção de fármaco:polímero de 1:2, o ibuprofeno apresentou um evento endotérmico de fusão semelhante ao evento do fármaco puro, indicando a presença de cristais. Entretanto, o ibuprofeno encapsulado também se encontra parcialmente disperso na forma molecular, uma vez que o grau de cristalinidade obtido foi de 24,77%.

Um fármaco que se encontra molecularmente disperso numa matriz polimérica pode se apresentar na forma de uma dispersão molecular metaestável ou de uma solução sólida estável. Contudo, a presença de solução sólida estável é indicada pela ação plastificante do ibuprofeno nas cadeias poliméricas macromoleculares, podendo, portanto, esta forma ser atribuída ao fármaco contido nas microesferas de PLAGA (DUBERNET *et al.*, 1991).

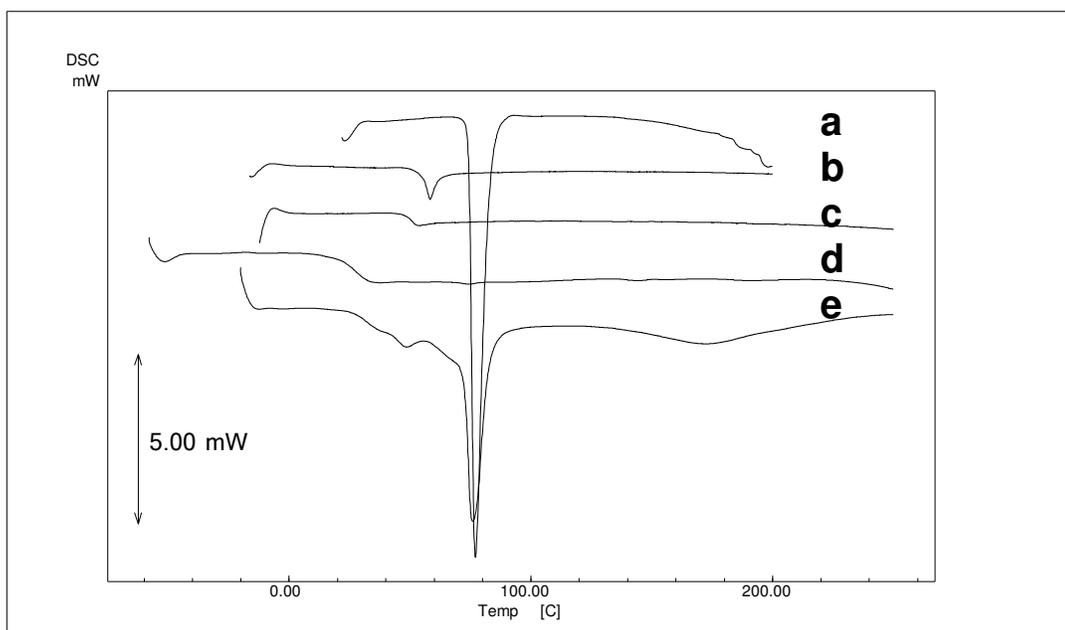


FIGURA 10. Curvas de DSC obtidas a partir do (a) IBF, (b) PLAGA, (c) microsferas de PLAGA brancas, (d) microsferas de IBF:PLAGA (1:4), (e) microsferas de IBF: PLAGA (1:2).

TABELA 12. Resultados obtidos após análise das microsferas de PLAGA brancas e contendo IBF por DSC.

| | Tg (°C) | Tm (°C) | Tm (°C) | ΔH_{exp} (J/g) | X _c (%) |
|-----------------|---------|---------|---------|------------------------|--------------------|
| | PLAGA | PLAGA | IBF | IBF | IBF |
| IBF | - | - | 77,05 | 108,55 | 100,00 |
| PLAGA | 56,09 | - | - | - | - |
| PLAGA branca | 50,59 | - | - | - | - |
| IBF:PLAGA (1:4) | 26,86 | - | 74,21 | 0,462 | 0,426 |
| IBF:PLAGA (1:2) | 41,71 | - | 75,99 | 29,89 | 24,77 |

(-) = não detectado, Tg = transição vítrea; Tm = temperatura de fusão; ΔH_{exp} = entalpia de fusão encontrada no experimento; X_c = grau de cristalinidade estimado

Os termogramas obtidos na análise por DSC das microsferas preparadas a partir do P(3HB) e P(3HB-co-3HV) podem ser visualizados na

Figura 11 e 12 e os dados obtidos a partir das curvas de DSC encontram-se sumarizados na Tabela 13. Similarmente aos resultados obtidos com as microesferas de PLAGA, o baixo grau de cristalinidade do fármaco obtido para as microesferas de P(3HB) (2,81%) e P(3HB-co-3HV) (8,77%), preparadas com uma proporção de fármaco:polímero de 1:4, indicou que o mesmo encontra-se parcialmente disperso na forma molecular na matriz polimérica. Entretanto, estes valores demonstraram ser maiores que aquele obtido nas microesferas de PLAGA (0,43%) para uma mesma proporção inicial de fármaco:polímero, indicando que o polímero afeta o modo de associação do ibuprofeno. Os valores de grau de cristalinidade igualmente aumentaram com o aumento da quantidade inicial de fármaco, correspondente a presença de cristais de ibuprofeno não encapsulado, conforme demonstrado nas micrografias obtidas por MEV.

A curva de DSC obtida a partir do P(3HB) puro (Figura 11b) demonstrou uma Tg de 4,63 °C, conforme descrito na literatura. O valor de Tg do polímero nas microesferas brancas foi de 6,67 °C, não ocorrendo mudanças significativas com o processo de formação das microesferas. Entretanto, não foi possível verificar a Tg do polímero nas curvas de DSC referentes as microesferas contendo ibuprofeno.

As curvas de DSC do P(3HB) puro também demonstram um evento exotérmico referente à recristalização do polímero em 0 °C e um evento endotérmico referente a sua fusão a 175,48 °C, com um valor de ΔH_{exp} de 101,50 J/g, evidenciando a sua cristalinidade, em comparação a natureza amorfa do PLAGA. Da mesma forma que para o fármaco, o grau de cristalinidade do polímero pode ser estimado usando o valor de ΔH de referência igual a 146 J/g, correspondente a 100% de cristalinidade (GUNARATNE & SHANKS, 2005). Os resultados obtidos nestes cálculos revelaram que o polímero puro apresenta 69,52% de cristalinidade. O grau de cristalinidade demonstrou ser reduzido após o processo de microencapsulação, alcançando o valor de 57,08% nas microesferas brancas, e 31,55% e 45,84% para as microesferas preparadas com uma proporção de fármaco:polímero de 1:4 e 1:2, respectivamente (Tabela 13). Adicionalmente, o evento endotérmico

referente à fusão do polímero nas microesferas brancas ocorreu numa temperatura similar ao P(3HB) puro (175,97 °C). Entretanto, a presença do ibuprofeno nas microesferas deslocou a endoterma de fusão do P(3HB) para temperaturas mais baixas (160,09 °C e 153,98 °C), sugerindo a presença de interação entre fármaco e o polímero.

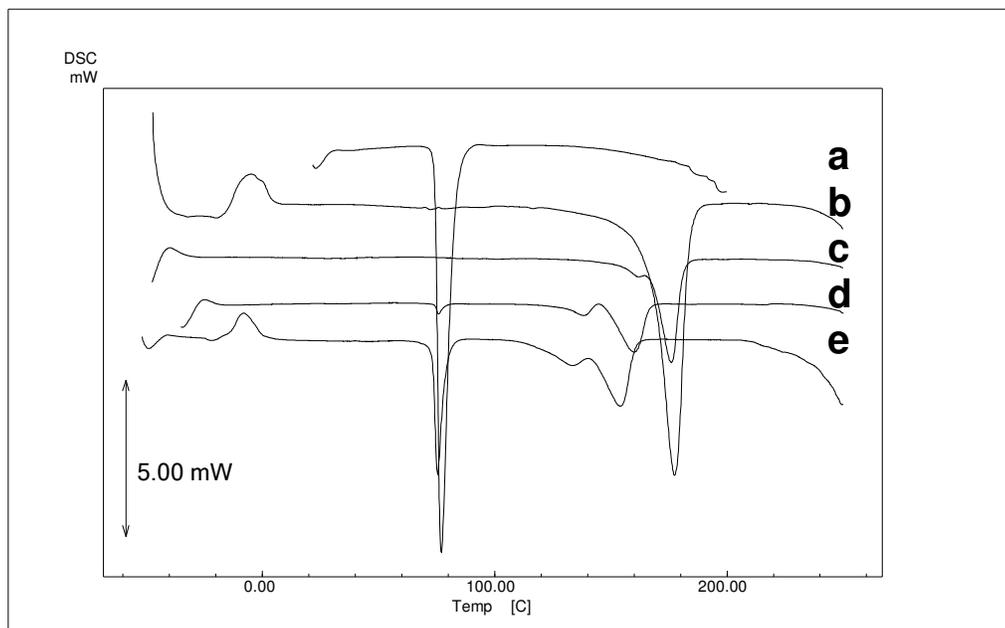


FIGURA 11. Curvas de DSC obtidas a partir do (a) IBF, (b) P(3HB), (c) microesferas de P(3HB) brancas, (d) microesferas de IBF:P(3HB) (1:4), (e) microesferas de IBF:P(3HB) (1:2).

A Figura 12b demonstra a curva de DSC obtida a partir do P(3HB-co-3HV) puro, apresentando uma temperatura de transição vítrea de 8,50 °C, diferente daquela relatada na literatura de aproximadamente 1 °C para o copolímero apresentando 5 mol% de 3HV (SAVENKOVA *et al.*, 2000). A Tg do copolímero nas microesferas brancas pôde ser visualizada a 24,61 °C, ou seja, numa temperatura superior quando comparada àquela obtida para o P(3HB-co-3HV) puro. Nas microesferas contendo o ibuprofeno não foi possível observar a Tg do copolímero.

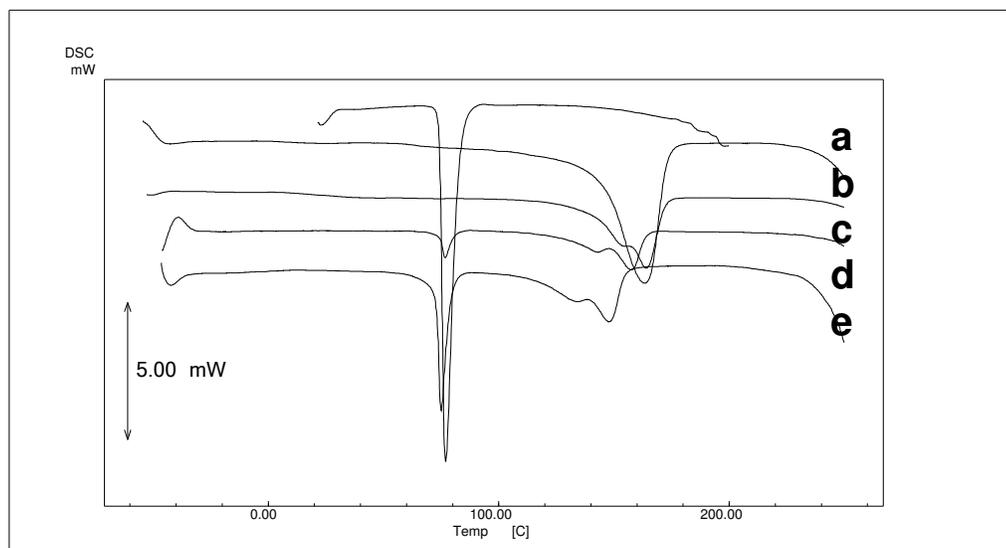


FIGURA 12. Curvas de DSC obtidas a partir do (a) IBF, (b) P(3HB-co-3HV), (c) microesferas de P(3HB-co-3HV) brancas, (d) microesferas de IBF:P(3HB-co-3HV) (1:4), (e) microesferas de IBF:P(3HB-co-3HV) (1:2)

TABELA 13. Resultados obtidos após análise das microesferas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) brancas e contendo IBF por DSC.

| | Polímero | | | | Ibuprofeno | | |
|------------------|---------------------|---------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|-------------------------|--------------------|
| | T _g (°C) | T _m (°C) | ΔH _{exp} (J/g) | X _c (%) | T _m (°C) | ΔH _{exp} (J/g) | X _c (%) |
| IBF | - | - | - | - | 77,05 | 108,55 | 100,00 |
| P(3HB) | 4,63 | 175,48 | 101,50 | 69,52 | - | - | - |
| P(3HB) branca | 6,57 | 175,97 | 83,34 | 57,08 | - | - | - |
| IBF:P(3HB) (1:4) | - | 160,09 | 46,06 | 31,55 | 75,92 | 3,05 | 2,81 |
| IBF:P(3HB) (1:2) | - | 153,98 | 66,93 | 45,84 | 75,41 | 28,51 | 26,26 |
| PHBV | 8,50 | 163,30 | 76,52 | 52,41 | - | - | - |
| PHBV branca | 24,61 | 163,97 | 70,15 | 48,05 | - | - | - |
| IBF:PHBV (1:4) | - | 157,51 | 56,31 | 38,56 | 76,73 | 9,52 | 8,77 |
| IBF:PHBV (1:2) | - | 147,80 | 49,71 | 34,05 | 75,12 | 29,00 | 26,72 |

(-) = não detectado; T_g = transição vítrea; T_m = temperatura de fusão; ΔH_{exp} = entalpia de fusão encontrada no experimento; X_c = grau de cristalinidade estimado; PHBV = P(3HB-co-3HV)

Igualmente, as curvas de DSC evidenciaram um evento endotérmico referente à fusão do polímero a 163,30 °C e ΔH_{exp} de 76,52 J/g. Portanto, é possível observar a diminuição na temperatura de fusão do P(3HB-co-3HV) contendo 5% de 3HV, quando comparado ao homopolímero P(3HB) (175,48 °C). Este resultado está de acordo com os dados da literatura que demonstram uma diminuição na temperatura de fusão do copolímero com o aumento do teor de 3HV. O mais baixo valor de temperatura de fusão relatado foi 75 °C para aproximadamente 40 mol% de 3HV no copolímero. A entalpia de fusão do P(3HB-co-3HV) (76,52 J/g) também foi menor do que aquela observada para o P(3HB) (101,50 J/g), podendo ser atribuída à formação de lamelas mais finas devido à presença de hidroxivalerato (SAVENSKOVA *et al.*, 2000; GUNARATNE & SHANKS, 2005).

O comportamento térmico do P(3HB-co-3HV) nas microesferas demonstrou ser semelhante aquele observado pelo P(3HB). A obtenção de microesferas brancas pela técnica de emulsão/evaporação do solvente não afetou a temperatura de fusão do polímero (Figura 12c e Tabela 13). Nas curvas de DSC obtidas a partir das microesferas contendo ibuprofeno, preparadas em ambas proporções de fármaco:polímero, foram visualizados dois eventos endotérmicos (Figura 12c e 12d). O primeiro evento é atribuído à fusão do ibuprofeno em temperaturas semelhantes a do fármaco puro, conforme demonstrado na Tabela 13. O segundo evento é referente à fusão do polímero, o qual foi deslocado para temperaturas mais baixas, sugerindo a presença de interações entre o fármaco e P(3HB-co-3HV). Da mesma forma que o resultado observado para o P(3HB), o grau de cristalinidade do P(3HB-co-3HV), estimado através da equação acima descrita com valores de 100% segundo GUNARATNE & SHANKS (2005), pareceu ser afetado pela técnica de obtenção das microesferas e pela presença de fármaco nas partículas.

4.3.4.2 Termogravimetria (TG)

A termogravimetria é um método termoanalítico empregado para avaliar mudanças de massa permitindo determinações específicas, bem como analisar a decomposição térmica das amostras. Em muitos estudos, esta técnica também tem sido utilizada para determinar a presença ou ausência de solvente residual nas microesferas preparadas pela técnica de emulsificação/evaporação do solvente (DUBERNET *et al.*, 1991; DUBERNET, 1995; GIRON, 2002). A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos nas análises termogravimétricas do fármaco e polímeros puros e das microesferas brancas e contendo ibuprofeno.

A análise termogravimétrica do PLAGA apresentou dois eventos podendo ser indicativo da sua decomposição. O primeiro ocorreu em 323,98 °C com perda de massa de 42,754% e o segundo evento ocorreu em 393,98 °C com perda de massa de 54,238%. As curvas termogravimétricas do P(3HB) e P(3HB-co-3HV) evidenciaram um único evento em 307,08 °C e 303,98 °C, respectivamente, atribuída à decomposição destes polímeros, conforme descrito na literatura (POUTON & AKHTAR, 1996).

A curva termogravimétrica do ibuprofeno apresentou um evento bem definido na temperatura de 257,94 °C com perda de massa de 99,939%. De acordo com XU e colaboradores (2004) este evento é decorrente da degradação do fármaco. Nas análises termogravimétricas das microesferas de PLAGA, P(3HB) ou P(3HB-co-3HV) contendo ibuprofeno, podemos observar dois eventos, sendo o primeiro atribuído à decomposição do fármaco em temperaturas que variaram de 211 °C a 227 °C e o segundo referente à decomposição do polímero. As perdas de peso referentes ao ibuprofeno nas microesferas variaram de 9,95% a 27,04%, correspondendo ao teor de fármaco presente nas mesmas. E para as perdas de peso total nas microesferas variaram de 96,57% a 99,9%, sugerindo que a quantidade de solvente residual nas microesferas não ultrapassou 3,43%.

TABELA 14. Valores de temperatura de máxima velocidade de perda de massa (Tpico) e percentuais de perda de massa obtidos após análise dos materiais puros e das microesferas.

| Tipos de material | T (°C) | T (°C) | Perda de massa (%) | Perda de massa total (%) |
|--------------------------|--------|----------|--------------------|--------------------------|
| | IBF | polímero | | |
| IBF | 257,94 | | 99,939 | 99,939 |
| PLAGA | - | 323,98 | 42,754 | |
| | | 393,81 | 54,238 | 96,992 |
| PLAGA branca | - | 363,17 | 99,236 | 99,236 |
| IBF:PLAGA (1:4) | 227,13 | - | 9,953 | |
| | - | 394,04 | 88,183 | 98,136 |
| IBF:PLAGA (1:2) | 219,80 | | 23,983 | |
| | - | 396,01 | 73,604 | 97,587 |
| P(3HB) | - | 307,09 | 95,378 | 95,378 |
| P(3HB) branca | - | 260,71 | 99,844 | 99,844 |
| IBF:P(3HB) (1:4) | 211,48 | - | 17,696 | |
| | - | 302,72 | 82,249 | 99,945 |
| IBF:P(3HB) (1:2) | 217,69 | - | 24,664 | |
| | - | 284,08 | 75,316 | 99,980 |
| P(3HB-co-3HV) | - | 303,98 | 98,683 | 98,683 |
| P(3HB-co-3HV) branca | - | 313,27 | 100,01 | 100,01 |
| IBF: P(3HB-co-3HV) (1:4) | 217,73 | - | 13,004 | |
| | - | 295,59 | 86,489 | 99,49 |
| IBF: P(3HB-co-3HV) (1:2) | 213,61 | - | 27,041 | |
| | - | 292,57 | 69,529 | 96,57 |

4.3.5 Difração de Raio-X

A análise por difração de raio-x foi realizada com o objetivo de verificar as propriedades de cristalinidade dos polímeros, ibuprofeno e microesferas que podem afetar a cinética de liberação do fármaco e a velocidade de degradação da matriz polimérica. Os difratogramas de raio-x obtidos encontram-se

demonstrados nas Figuras 13, 14 e 15 e os valores de máximo de difração encontram-se sumarizados na Tabela 15.

A análise do ibuprofeno revelou a presença de picos de difração característicos de substância cristalina em $2^\circ \theta$ aproximadamente a 6° , 12° , 16° , 20° e 22° (NOVOA *et al.*, 2005). Por outro lado, o PLAGA puro (Figura 13b) apresenta um modelo de difração que corresponde a uma substância amorfa, não apresentando picos característicos. A natureza amorfa do PLAGA também é observada nos difratogramas de raios-x obtidos para as microesferas preparadas com uma proporção de fármaco:polímero de 1:4 (Figura 13c). Entretanto, o modelo de difração do ibuprofeno não é demonstrado neste espectro indicando que o fármaco associado às partículas encontra-se predominantemente na forma de dispersão molecular. Este resultado confirma aquele demonstrado pelas curvas de DSC, onde foi estimado que somente 0,43% do ibuprofeno presente nas microesferas encontra-se na forma cristalina. FERNANDEZ-CARBALLIDO e colaboradores (2004) obtiveram resultados semelhantes nas análises de difração de raios-x das microesferas de PLAGA 50:50 (PM 34.000 daltons) contendo ibuprofeno preparadas na proporção de fármaco:polímero de 20:100, sendo a interação do fármaco com o polímero confirmada por DSC.

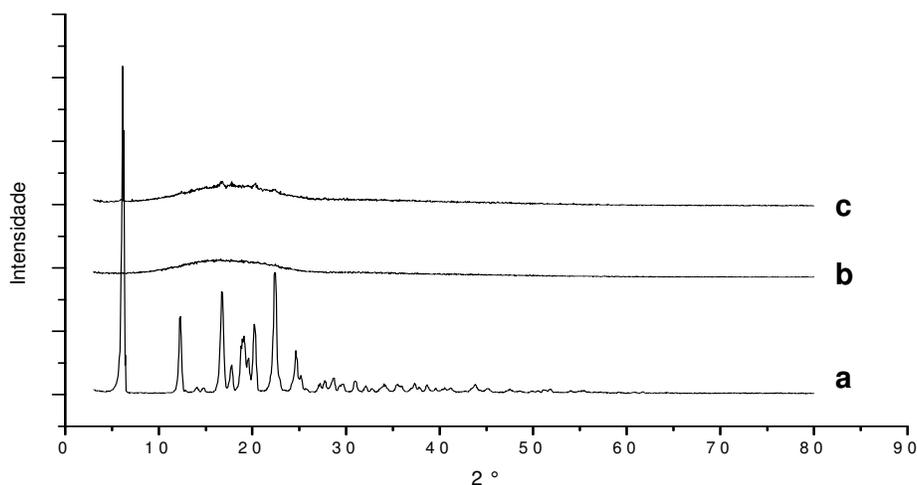


FIGURA 13. Difratogramas de difração do raio-x obtidos a partir do (a) ibuprofeno, (b) PLAGA e (c) microesferas de IBF:PLAGA (1:4)

Os difratogramas de raios-x dos PHAs encontram-se demonstrados nas Figuras 14 e 15. Conforme descrito por GALEGO e colaboradores (2000), estes poliésteres são caracterizados pela sua natureza semi-cristalina, apresentando uma única fase cristalina, independentemente de sua composição. Os picos de elevada difração do P(3HB) ocorreram em valores de $2^\circ \theta$ aproximadamente a 13° , 16° , 21° , 21° , 22° e 25° , estando de acordo com os dados obtidos da literatura. O mesmo modelo de difração do P(3HB) foi obtido quando o polímero foi submetido ao aquecimento a 200°C seguido de resfriamento a -2°C , para permitir a sua solubilização no solvente da fase interna da emulsão. Entretanto, a cristalinidade do P(3HB) pareceu ser reduzida após este tratamento térmico sendo novamente recuperada nas microesferas contendo o fármaco, conforme pode ser visualizado na Figura 14 e Tabela 15. Além disso, dois picos correspondentes em $2^\circ \theta$ aproximadamente a 6° e 12° podem ser visualizados no difratograma obtido a partir das microesferas contendo ibuprofeno, sendo provavelmente atribuídos à presença de cristais de fármaco nas partículas.

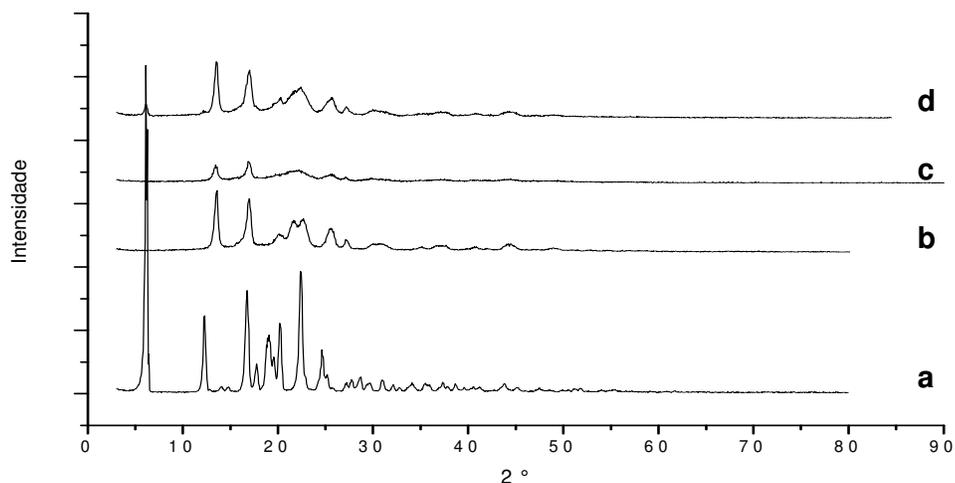


FIGURA 14. Difratogramas do raio-x obtidos a partir do (a) ibuprofeno, (b) P(3HB) (c) P(3HB) tratado e (d) microesferas de IBF:P(3HB) (1:4)

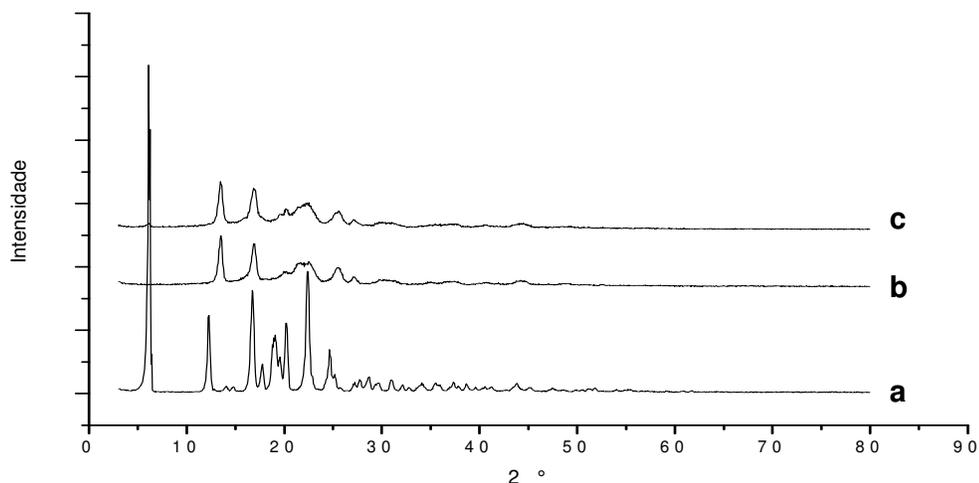


FIGURA 15. Difratomogramas do raio-x obtidos a partir do (a) ibuprofeno, (b) P(3HB-co-3HV) e (c) microsferas de IBF:P(3HB-co-3HV) (1:4)

TABELA 15. Valores em porcentagem da intensidade dos picos de difração de raios-x obtidos a partir dos difratogramas do fármaco, polímeros e microsferas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV).

| 2° θ | Intensidade (%) | | | | | |
|------|-----------------|--------|----------|---------------------------|--------|-------------------------|
| | IBF | P(3HB) | P(3HB)tr | Microsferas IBF:P(3HB) | PHBV | Microsferas IBF:PHBV |
| 6 | 100,00 | - | - | 26,02 | - | 14,46 |
| 12 | 23,82 | - | - | 15,20 | - | 13,94 |
| 13 | - | 100,00 | 83,42 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| 16,7 | 31,49 | - | - | - | - | - |
| 16,9 | - | 87,26 | 100,00 | 85,30 | 84,28 | 86,58 |
| 20 | 21,44 | - | - | - | - | - |
| 21,6 | - | 52,32 | 57,02 | 48,70 | 48,32 | 48,69 |
| 21,7 | - | 51,45 | 57,86 | 49,64 | 47,28 | 51,90 |
| 22,4 | 37,24 | - | - | - | - | - |
| 22,6 | - | 54,81 | 49,72 | 47,59 | 49,78 | 57,40 |
| 25 | - | 39,48 | 43,84 | 37,55 | 38,04 | 39,80 |

(-) não detectado, PHBtr: poli-(3-hidroxibutirato) após tratamento térmico, PHBV = P(3HB-co-3HV)

A análise de difração de raio-x do copolímero P(3HB-co-3HV) revelou o mesmo modelo de difração verificado para o homopolímero (Figura 15). Entretanto, os picos de difração demonstraram ser mais largos e menos definidos. A expansão de alguns dos picos de alta difração tem demonstrado ocorrer em função do aumento do teor de 3HV no copolímero sem alteração da estrutura do cristal (GALEGO *et al.*, 2000). De fato, a obtenção de copolímeros de 3HB e com outros monômeros, como 3HV e 3HH, tem sido extensivamente estudada como forma de reduzir a cristalinidade e melhorar as propriedades físicas dos PHAs, aumentando o seu espectro de aplicações (SATO *et al.*, 2006). As microesferas de P(3HB-co-3HV) contendo o fármaco apresentaram os mesmos picos característicos do polímero e um pico em $2^\circ \theta$ aproximadamente a 6,08 que pode ser atribuído a presença de cristais do fármaco. Uma vez que a quantidade de polímero é cerca de sete vezes maior que a de ibuprofeno, a presença de outros picos do fármaco pode ter sido impedida pelo limite de detecção da análise e pela sobreposição dos mesmos com os picos do polímero.

4.3.6 Espectrofotometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de FT-IR obtidos a partir do ibuprofeno, polímero puro e das microesferas de PLAGA brancas e contendo fármaco encontram-se demonstrados na Figura 16. Como pode ser observado, o ibuprofeno apresenta picos característicos situados a 1721 cm^{-1} e 1185 cm^{-1} , representando o grupamento C=O e C-O do grupamento carboxila da molécula, além dos picos situados a 1273, 1232, 870, 779 cm^{-1} referentes à presença de hidrocarboneto aromático, com deformação angular no plano C-H (CLARKE, 2004). O espectro de FT-IR obtido a partir do PLAGA puro e das microesferas brancas mostra picos a 1750 e 1130, 1090 cm^{-1} , referentes ao grupamento C=O e C-O, da ligação éster, e a 1450, 1360 e 750 cm^{-1} referente aos grupamentos C-H na molécula (KIREMITCI-GUMUSDERELIOGLU & DENIZ, 1999). Além desses, mostra picos também a 3500 cm^{-1} (O-H), 2850 e 2400 cm^{-1} (C-H). O espectro de FT-IR obtido a partir das microesferas contendo o fármaco revela a

presença dos picos característicos do fármaco, sobrepostos aos do polímero, sem alteração visível nos seus comprimentos de onda.

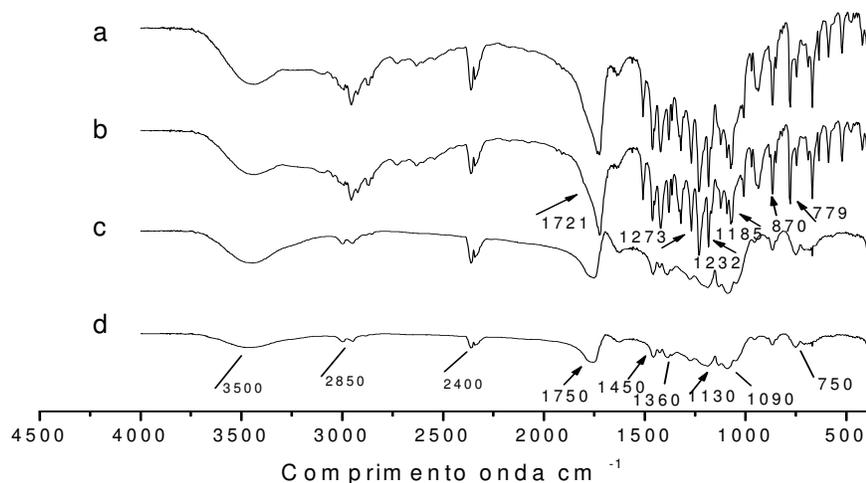


FIGURA 16. Espectros de FT-IR obtidos a partir de (a) microesferas de IBF:PLAGA (1:2), (b) IBF, (c) microesferas de PLAGA brancas, (d) PLAGA.

Os espectros de FT-IR obtidos a partir dos polímeros puros e das microesferas brancas e contendo ibuprofeno, preparadas com o P(3HB) e P(3HB-co-3HV), encontram-se demonstrados nas Figuras 17 e 18, respectivamente. O P(3HB) e seu copolímero P(3HB-co-3HV) apresentam espectros similares, demonstrando picos a 1720 e 1278 cm⁻¹ referentes aos grupamentos C=O e C-O da ligação éster, respectivamente, assim como pico correspondente ao estiramento C-H do grupamento metila a 1380 cm⁻¹. (CHEN & YU, 2005). Os espectros das microesferas brancas (figura 17c e 18c) foram similares aos polímeros puros. Igualmente, os espectros obtidos a partir das microesferas contendo ibuprofeno evidenciaram a presença dos picos característicos do fármaco sobrepostos aos do polímero, sem alteração visível nos comprimentos de onda.

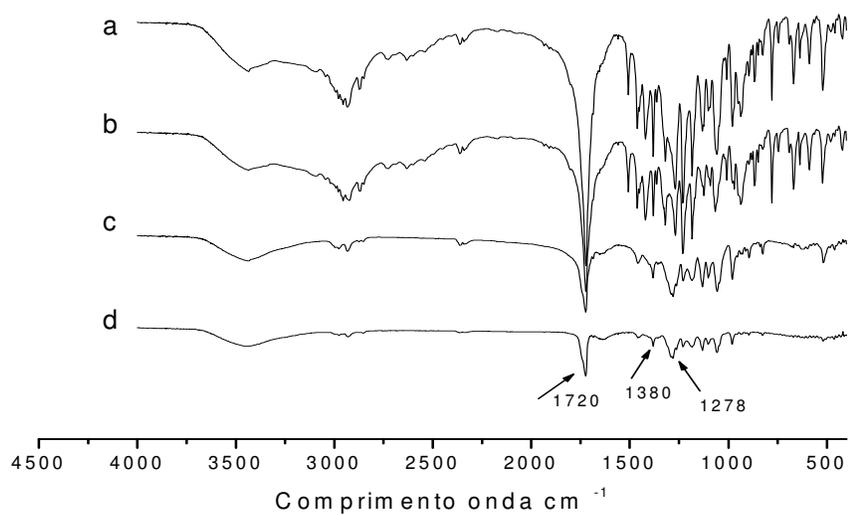


FIGURA 17. Espectros FT-IR obtidos a partir de (a) microsferas de IBF:P(3HB) (1:2), (b) IBF, (c) microsferas de P(3HB) brancas, (d) P(3HB).

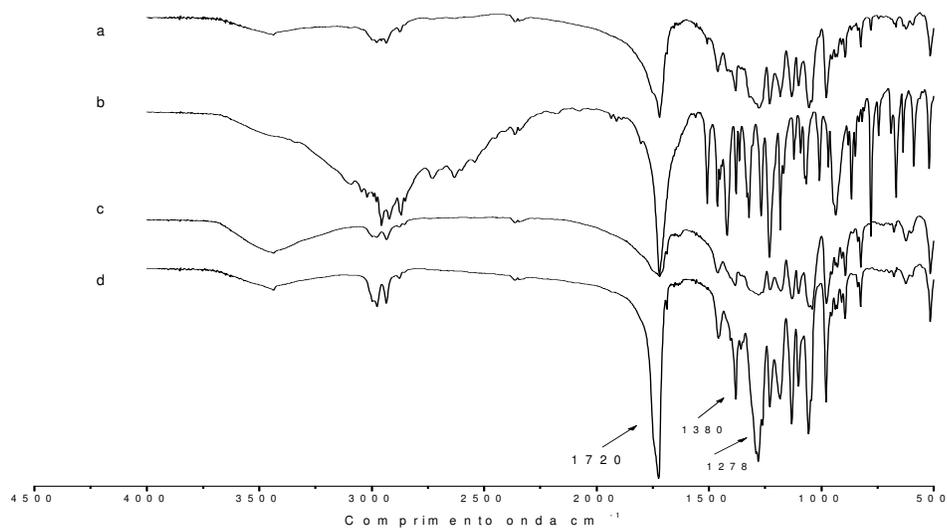


FIGURA 18. Espectros FT-IR obtidos a partir de (a) microsferas de IBF:P(3HB-co-3HV) (1:2), (b) IBF, (c) microsferas de P(3HB-co-3HV) brancas, (d) P(3HB-co-3HV).

4.4 Avaliação do perfil de liberação do ibuprofeno 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 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*.

Vários fatores podem afetar a liberação de fármacos a partir de sistemas particulados. Fármacos são liberados por difusão, erosão, desintegração, ou degradação química e enzimática do material que constitui a matriz. A liberação de um fármaco por difusão, 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 a camada interfacial e a fase contínua. Se ele se encontra disperso na matriz polimérica na forma de cristais, necessita ser previamente dissolvido, sendo a capacidade de hidratação das partículas 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 (WASHINGTON, 1996). As propriedades físico-químicas do fármaco, incluindo peso molecular e solubilidade nos fluidos biológicos, podem influenciar profundamente a cinética de liberação por difusão, pois afeta diretamente as suas características de difusão (HOMBREIRO-PEREZ *et al.*, 2003).

O mecanismo de liberação torna-se mais complexo quando ocorrem fenômenos de degradação/erosão da matriz polimérica. A degradação *in vitro* e *in vivo* de homo- e copolímeros de α -hidroxiácidos depende de muitos fatores, tais como estrutura e composição química, massa molar, presença de compostos de baixo peso molecular (monômeros, oligômeros), tamanho e morfologia das partículas, grau de cristalinidade e mecanismo de hidrólise (GOPFERICH, 1996; SIEPMANN & GOPFERICH, 2001; LEMAIRE *et al.*,

2003). É evidente que a erosão da matriz polimérica desempenha um importante papel na liberação de fármacos. Entretanto, na maioria das vezes não é o único processo que contribui para o controle da liberação. Após a embebição das partículas pela água, a dissolução do fármaco e a clivagem das ligações hidroliticamente instáveis geralmente ocorrem simultaneamente (FAISANT *et al.*, 2002).

Neste contexto, estudos de liberação foram realizados com o objetivo de compreender os mecanismos e os fatores responsáveis pela liberação do ibuprofeno a partir das microesferas de PHAs, e compará-los com aqueles verificados para as microesferas de PLAGA. Os resultados serão demonstrados a seguir.

4.4.1 Determinação do ibuprofeno por CLAE

A cinética de liberação do ibuprofeno a partir das microesferas foi avaliada após determinação da concentração do fármaco no meio de liberação por cromatografia líquida de alta eficiência. Para isto, uma curva de calibração foi construída após análise por CLAE de soluções de ibuprofeno em concentrações variando entre 10 e 500 µg/mL, usando tampão fosfato 0,02 M pH 7,4 como diluente. As áreas dos picos obtidas a partir dos cromatogramas, após injeção das soluções padrões, encontram-se demonstradas na Tabela 16. A curva de concentração de ibuprofeno *versus* área, bem como a equação da reta e o coeficiente de correlação obtidos após análise da regressão linear, podem ser visualizados na Figura 19. O tempo de retenção do ibuprofeno nas condições empregadas foi de 8,51 minutos.

TABELA 16. Áreas de pico obtidas após análise das soluções do ibuprofeno padrão por CLAE

| Concentração de ibuprofeno (µg/mL) | Área do pico ± σ | CV (%) |
|------------------------------------|----------------------|--------|
| 10 | 644994 ± 10483,35 | 1,62 |
| 20 | 1164113 ± 24275,23 | 2,08 |
| 30 | 1718985 ± 6333,56 | 0,36 |
| 40 | 2218442 ± 8716,25 | 0,39 |
| 50 | 2694868 ± 990,00 | 0,03 |
| 100 | 4912123 ± 16625,43 | 0,33 |
| 200 | 9301191 ± 327833,00 | 3,52 |
| 300 | 14577855 ± 120615,70 | 0,83 |
| 500 | 24345169 ± 242709,10 | 0,99 |

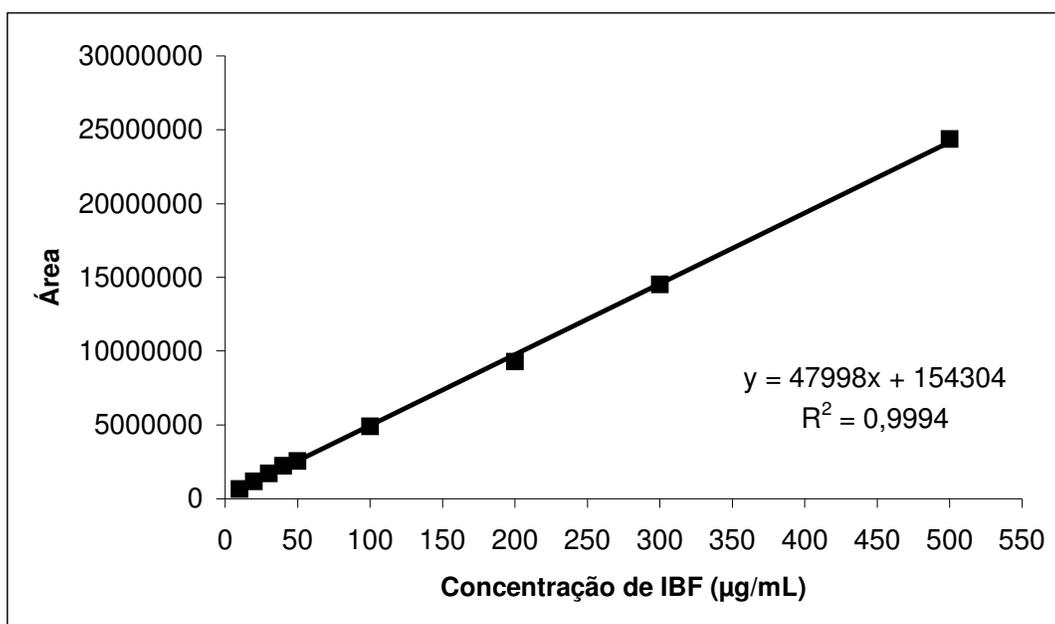


FIGURA 19. Curva de calibração do ibuprofeno obtida por CLAE

TABELA 17. Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração do ibuprofeno por CLAE

| Parâmetros de regressão | Valores |
|-------------------------------------|------------------------------|
| Intercepto (intervalo de confiança) | 154304 (-65036,0 a 373644,0) |
| Inclinação (intervalo de confiança) | 47998 (46472,4 a 49523,5) |
| R ² | 0,9994 |

A avaliação do coeficiente de regressão calculado evidenciou a existência de um comportamento linear significativo, na faixa de concentração empregada. A análise do ponto de intersecção da reta e a determinação dos limites de confiança demonstram a ausência de erro sistemático constante, onde o fator de variação é independente da concentração dos componentes analisados, uma vez que os valores incluíram o zero (Tabela 17) (FUNCK *et al.*, 1992).

4.4.2 Avaliação do perfil de liberação do ibuprofeno a partir das microesferas

O processo de transferência do fármaco, através das microesferas alcançando a superfície em direção à fase contínua, pode também ser descrita em sentido contrário, se a concentração do fármaco no meio de liberação for suficientemente alta. Nestas condições, o equilíbrio natural do fenômeno de difusão será atingido e, para evitá-lo, o emprego das condições *sink* torna-se desejável, simplificando a interpretação dos dados experimentais. Para a obtenção das condições perfeitamente *sink* preconiza-se que a concentração máxima de fármaco dissolvida na fase contínua não exceda 20% da sua concentração de saturação (WASHINGTON, 1996).

O ensaio de liberação do ibuprofeno a partir das microesferas de PLAGA, P(3HB) ou P(3HB-co-3HV) na proporção 1:4 (fármaco:polímero) foi realizado conforme descrito no item 3.2.4.3. O meio de liberação empregado foi tampão fosfato (0,02 M) pH 7.4 contendo Tween 80 0,05% (p/p) e imidazolinidiluréia 0,01% (p/p) como conservante. O Tween 80 foi adicionado

ao meio de liberação por suas propriedades tensoativas, com o objetivo de melhorar as características de dispersão das partículas, evitando a agregação das mesmas. A quantidade de microesferas adicionadas ao meio de liberação foi calculada em função do teor de IBF nas partículas. A solubilidade deste fármaco no meio de liberação, determinada por CLAE, foi $2,535 \pm 0,006$ mg/mL. Uma vez que a concentração máxima de IBF, correspondente a 100% de liberação, não excedeu 0,506 mg/mL, pode-se afirmar que o ensaio foi realizado em condições *sink*.

Os resultados obtidos no ensaio de liberação, expressos em porcentagem de fármaco liberado *versus* tempo (horas), podem ser visualizados na Figura 20. Como pode ser observado nesta figura, a porcentagem de ibuprofeno liberado a partir das microesferas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) foi cerca de 69,52% e 58,81%, respectivamente, na primeira hora de ensaio, contrastando com os resultados observados para as microesferas de PLAGA, onde somente cerca de 25,34% do fármaco foi liberado no mesmo período. Após 24 horas, a porcentagem de ibuprofeno liberada a partir das microesferas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) não pareceu alterar significativamente, enquanto que as microesferas de PLAGA proporcionaram um maior controle da liberação do fármaco. Entretanto, após 7 dias de ensaio, um novo aumento na quantidade de ibuprofeno liberada a partir das microesferas de P(3HB-co-3HV) foi verificado, alcançando 85%, sendo comparável ao valor obtido para as microesferas de PLAGA, que proporcionaram uma liberação de cerca de 92% do fármaco no mesmo período. Em contrapartida, este aumento não foi observado para as microesferas de P(3HB).

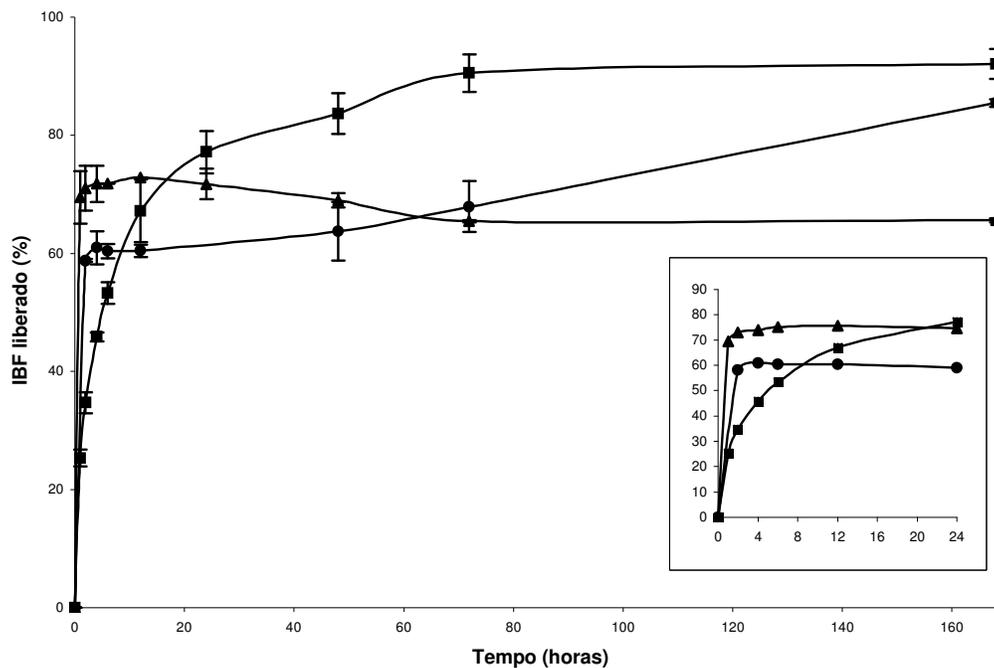


FIGURA 20. Perfis de liberação do ibuprofeno a partir das microesferas de (■) PLAGA, (●) P(3HB) e (▲) P(3HB-co-3HV). O gráfico menor se refere às primeiras 24 horas de ensaio.

Vários fatores podem estar implicados nos perfis de liberação observados. Diversos autores têm atribuído o efeito de liberação inicial de fármacos a partir das microesferas, à presença de poros na superfície das partículas. Microesferas porosas apresentam elevada área superficial, permitindo o maior contato com o meio e levando ao aumento considerável na velocidade de liberação (YANG *et al.*, 2000). Portanto, a maior porosidade das microesferas obtidas a partir dos PHAs pode ter favorecido a liberação do ibuprofeno. Contudo, a maneira pela qual o fármaco encontra-se distribuído nas microesferas pode, também, afetar o perfil de liberação. O fármaco liberado nas primeiras horas pode estar localizado na superfície ou nas camadas mais externas da partícula e, desse modo, a pequena distância

difusional existente entre a sua localização e o meio pode ter conduzido à liberação mais rápida (FREIBERG & ZHU, 2004).

O tamanho da partícula é um parâmetro a ser considerado na cinética de liberação do fármaco, uma vez que partículas menores podem facilitar a difusão do fármaco, enquanto que para as partículas maiores, o fármaco tem uma distância difusional maior para percorrer até a superfície da partícula (DUNNE *et al.*, 2000; PAYNAN *et al.*, 2003). Apesar das microesferas de PLAGA terem diâmetro médio menor quando comparadas as microesferas de PHAs, a sua cinética de liberação do fármaco foi mais controlada. Da mesma forma, ocorre quando é considerado o peso molecular do polímero, pois partículas preparadas com polímeros de alto peso molecular, como é o caso dos PHAs, tendem a diminuir a cinética de liberação do fármaco, o que não ocorreu neste estudo. Estes fatos podem estar relacionados a maior influência da porosidade das microesferas dos PHAs, fazendo com que estas partículas fiquem mais expostas ao meio, facilitando a liberação do fármaco.

Por outro lado, o grau de cristalinidade do polímero e do fármaco e a interação fármaco-polímero também podem ter afetado o perfil de liberação do ibuprofeno. Estudos sugerem que as partículas mais amorfas liberam o fármaco mais lentamente do que partículas cristalinas. A baixa cristalinidade polimérica proporciona melhor dispersão do fármaco e aumento da interação fármaco-polímero, proporcionando, portanto, a redução da velocidade de liberação (FREIBERG & ZHU, 2004). Isto pode explicar, em parte, a mais lenta velocidade de liberação do ibuprofeno a partir das microesferas de PLAGA.

Em adição, conforme foi relatado anteriormente, a introdução de unidades 3HV para formação do copolímero P(3HB-co-3HV) leva à redução da cristalinidade da molécula, em comparação ao homopolímero, diminuindo, igualmente, a cristalinidade das partículas. Desta forma, é possível que o ibuprofeno esteja localizado nas regiões amorfas da matriz polimérica de P(3HB-co-3HV), sendo liberado mais lentamente, e explicando, portanto, a diferença encontrada no percentual de fármaco liberado nas duas primeiras

horas, para as microesferas preparadas a partir dos dois PHAs (GRANGADE & PRICE, 1991; SENDIL *et al.*, 1999; LI & CHANG, 2005).

A interpretação quantitativa de valores obtidos nos métodos de dissolução é facilitada pelo uso de uma equação genérica que traduz matematicamente a curva de dissolução, em função de alguns parâmetros relacionados com as microesferas. Vários modelos matemáticos podem ser empregados na tentativa de melhor caracterizar o perfil de liberação do fármaco a partir de um sistema de liberação. O modelo mais simples assume que o fármaco é liberado através de uma matriz homogênea com um coeficiente de difusão constante. Neste caso, a velocidade de liberação inicial é inversamente independente do tamanho da partícula, e proporcional à raiz quadrada do tempo. Esta relação, primeiramente proposta por Higuchi (1963), pode ser aplicada para várias formulações farmacêuticas. De modo geral é possível resumir o modelo de Higuchi com a 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 (COSTA & LOBO, 2001).

Os coeficientes de correlação obtidos após linearização dos perfis de liberação das formulações estudadas, pelo modelo matemático descrito acima, são demonstrados na Tabela 18.

TABELA 18. Dados de regressão obtidos após aplicação do modelo de Higushi nos perfis de liberação do ibuprofeno a partir das microesferas.

| Tempo | Microesferas | Coefficiente de correlação (R^2) | Inclinação da reta | Intercepto |
|-----------|---------------|--------------------------------------|--------------------|------------|
| 24 horas | PLAGA | 0,9955 | 0,0104 | 0,1419 |
| 24 horas | P(3HB) | 0,7044 | 0,0101 | 0,7001 |
| 24 horas | P(3HB-co-3HV) | 0,0004 | 0,0001 | 0,599 |
| 168 horas | PLAGA | 0,7761 | 0,0548 | 0,368 |
| 168 horas | P(3HB) | 0,3016 | 0,0081 | 0,7539 |
| 168 horas | P(3HB-co-3HV) | 0,5640 | 0,0274 | 0,5227 |

Conforme a Tabela 18, um coeficiente de correlação (R^2) próximo de 1,0 (0,9955) foi obtido somente após a linearização da curva de liberação do ibuprofeno obtida nas primeiras 24 horas, a partir das microesferas de PLAGA, indicando que, neste caso, a difusão é o principal fenômeno que governa a cinética de liberação. Após este período e em todos os resultados obtidos para as microesferas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV), baixos valores de coeficiente de correlação foram obtidos indicando que outros mecanismos e/ou fatores estejam envolvidos na liberação do fármaco.

4.5. Estudo de degradação *in vitro* das microesferas de PLAGA, P(3HB) e P(3HB-co-3HV)

Os processo de degradação e erosão são de fundamental importância na área de materiais poliméricos. Enquanto o primeiro processo descreve a cisão das cadeias levando à formação de oligômeros e posteriormente de monômeros, o segundo se refere à perda de massa do polímero. A degradação polimérica é, portanto, o processo chave para a erosão (GOPFERICH, 1996).

Dois caminhos principais pelos quais as cadeias poliméricas podem ser clivadas são descritos: por hidrólise passiva ou por reação enzimática. Para a

maioria dos polímeros biodegradáveis, a hidrólise química é o mecanismo mais importante de degradação. A degradação por hidrólise é uma reação bimolecular na qual a água e o grupo funcional hidrolisável do polímero estão envolvidos. Existem vários fatores que influenciam a velocidade desta reação. Entre eles destacam-se o tipo de ligação química, pH, composição do copolímero e a captura pela água.

O processo envolvendo a erosão de matrizes poliméricas degradáveis é mais complexo, pois depende de outros processos, como intumescimento, dissolução, difusão de oligômeros e monômeros e alterações morfológicas. A água penetra no polímero, podendo ocorrer o intumescimento da matriz. A penetração da água leva à degradação química do polímero, levando à formação de oligômeros e monômeros. Mudanças progressivas na degradação levam à formação de poros na microestrutura polimérica, via pela qual estes oligômeros e monômeros são liberados, conduzindo à perda de massa do polímero (GOPFERICH, 1996).

De uma forma geral, dois tipos de erosão podem ser distinguidos nas matrizes poliméricas: (i) superficial ou heterogênea e (ii) em toda sua massa (*bulk*) ou homogênea. No processo de erosão superficial, a degradação polimérica é muito mais rápida que a penetração de água na matriz. Então, a degradação ocorre predominantemente nas camadas mais externas. Conseqüentemente, a erosão afeta somente a superfície da matriz, e não sua porção interna. Do contrário, em matrizes cuja erosão ocorre em toda a massa polimérica, ou erosão *bulk*, a velocidade de degradação do polímero é menor que a velocidade de penetração de água. Então, o sistema inteiro é rapidamente hidratado e as cadeias poliméricas são clivadas de forma homogênea. Como regra básica, polímeros constituídos de grupos funcionais muito reativos tendem a ser rapidamente degradados e sofrer erosão superficial, enquanto aqueles contendo grupos funcionais menos reativos tendem a sofrer erosão homogênea. Entretanto, a classificação quanto ao tipo de erosão sofrido pelas matrizes poliméricas é arbitrária, pois os polímeros degradáveis podem sofrer erosão por ambos processos, quando as condições

ou a geometria do sistema são apropriadas (SIEPMANN & GOPFERICH, 2001).

Estudos da cinética de degradação de polímeros têm sido extensivamente realizados. Entretanto, desde que várias características físicas do sistema de liberação, como tamanho, área superficial, porosidade e cristalinidade, podem afetar a velocidade de degradação, é importante que processo de degradação seja avaliado no produto final (GIUNCHEDI *et al.*, 1998). O conhecimento do tipo e quantidade, bem como da evolução dos produtos de degradação hidrossolúveis em função do tempo, é essencial não somente para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos, mas também pelo fato de que a natureza e concentração destes produtos afetam a degradação no ambiente fisiológico (MARCATO *et al.*, 1996).

Vários trabalhos têm mostrado que a escolha das condições nas quais o estudo de liberação é realizado pode também afetar a degradação. Desta maneira, para elucidar os mecanismos que determinam a liberação do fármaco, parece ser essencial a avaliação do perfil de degradação das partículas. Assim, estudos de degradação das microesferas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV), brancas e contendo ibuprofeno, foram realizados usando as mesmas condições utilizadas no estudo de liberação, ou seja, em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C. Com o intuito de verificar os produtos de degradação destes polímeros, um ensaio de degradação acelerada foi realizado usando o mesmo meio, mas na temperatura de 100 °C. Estudos de degradação das microesferas de PLAGA foram também realizados, visando comparar as características de degradação deste polímero com aquelas verificadas para as microesferas obtidas a partir dos PHAs. A determinação do pH, análise dos produtos de degradação por CLAE e técnicas como MEV, DSC, raio-x e FT-IR foram utilizadas para caracterizar os fenômenos transcorridos durante o ensaio de degradação. Os resultados obtidos serão demonstrados a seguir.

4.5.1 Caracterização dos produtos de degradação

4.5.1.1 Determinação do pH

Para muitos polímeros cujo emprego em farmácia é relevante, a cinética de degradação é fortemente afetada pelo pH do microambiente. Assim, deslocamentos nos valores de pH durante a degradação podem conduzir à alteração da velocidade de reação. A hidrólise de polímeros como o PLA e PLAGA conduz à formação de monômeros apresentando grupamentos funcionais carboxílicos, os quais podem acelerar a degradação do polímero pela redução do pH. Além disso, a presença de substâncias ativas e/ou outros excipientes podem alterar a velocidade de hidrólise das cadeias poliméricas (SIEPMANN & GOPEFERICH, 2001).

Em nosso estudo, a determinação do pH do meio durante a degradação das microesferas de PLAGA, P(3HB) ou P(3HB-co-3HV) brancas ou contendo ibuprofeno, em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C, foi realizada no início e após 30 e 90 dias de ensaio. Os valores de pH obtidos para todas as formulações, no início do experimento e após 30 dias, foram próximas a 7,4. Porém, após 90 dias de degradação das microesferas de PLAGA contendo ibuprofeno, o pH do meio caiu para 3,7, enquanto para as microesferas brancas, o pH do meio manteve-se inalterado (Tabela 19).

TABELA 19. Valores de pH do meio de degradação no início e 30 e 90 dias de ensaio

| tempo (dias) | PLAGA | | P(3HB) | | P(3HB-co-HV) | |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|-----------|
| | brancas | IBF | brancas | IBF | brancas | IBF |
| 0 | 7,40±0,02 | 7,40±0,02 | 7,40±0,01 | 7,40±0,07 | 7,40±0,04 | 7,40±0,04 |
| 30 | 7,47±0,02 | 7,39±0,02 | 7,48±0,01 | 7,53±0,07 | 7,57±0,07 | 7,60±0,06 |
| 90 | 7,36±0,04 | 3,72±0,50 | 7,51±0,04 | 7,55±0,07 | 7,57±0,06 | 7,60±0,03 |

Os monômeros gerados pela degradação do PLAGA são o ácido láctico e o ácido glicólico, sendo caracterizados como ácidos fortes. Sua alta solubilidade aquosa em combinação com seus baixos valores de pKas podem levar a mudanças no pH do microambiente dentro dos poros da matriz polimérica durante a erosão. Dessa maneira, podem causar efeito autocatalítico, levando a uma aceleração da degradação do polímero dentro do sistema, em comparação com a sua superfície. Porém, a difusão de íons hidróxido do meio de degradação externo (tampão fosfato pH 7,4) para o interior do sistema é relativamente baixa. Entretanto, a proporção na qual os íons hidróxido difundem pode ser suficientemente alta para neutralizar íons hidrogênio livres dos produtos de degradação, resultando em uma supressão da autocatálise (SIEPMAN & GOPFERICH, 2001). Este efeito parece ter sido observado para as microesferas brancas de PLAGA. Entretanto, a introdução de ibuprofeno, um fármaco que apresenta um grupamento carboxílico, pode ter induzido a cisão das cadeias poliméricas, acelerando, dessa forma, a degradação do PLAGA.

As formulações preparadas a partir dos PHAs, brancas ou contendo ibuprofeno, não conduziram a mudanças significativas do pH do meio de degradação, podendo indicar a baixa concentração de oligômeros e monômeros formados, nas condições empregadas.

4.5.1.2. Determinação dos produtos de degradação por CLAE

O PLAGA é um poliéster alifático que tem recebido considerável interesse no desenvolvimento de novos medicamentos. Sua degradação *in vivo* leva à formação de ácido láctico ($C_3H_6O_3$) e ácido glicólico ($C_2H_4O_3$), os quais são eliminados como gás carbônico e água, via ciclo de Krebs. Estes polímeros se degradam por hidrólise simples das ligações éster, processo pelo qual é catalisado por ambos, ácido e base, bem como pela ação de enzimas (DUNNE *et al.*, 2000).

Muitas técnicas têm sido empregadas para estudar a cinética de degradação destes poliésteres. Entre elas, o monitoramento dos produtos de degradação pelo uso de técnicas cromatográficas pode ser considerado um modo simples e rápido, permitindo a análise qualitativa e quantitativa dos mesmos (MARCATO *et al.*, 1996). Em estudos de degradação do PLAGA, a determinação simultânea de ácido láctico e glicólico tem sido possibilitada pela seleção das condições cromatográficas, geralmente em métodos baseados na utilização de sistemas de fase reversa e misturas de metanol e tampão fosfato, com ou sem a adição de substâncias formadoras de pares iônicos, como eluente (GIUNCHEDI *et al.*, 1998). Neste trabalho, uma solução metanol:tampão fosfato 0,02 M (10:90), ajustado a pH 3,0 foi utilizada como fase móvel. O ajuste do pH foi realizado com o intuito de favorecer a formação da forma ácida dos monômeros, evitando a sua dissociação e, portanto, favorecendo a obtenção de picos estreitos e bem definidos. Os tempos de retenção do ácido glicólico e ácido láctico, nas condições utilizadas, foram determinados após injeção de uma solução contendo os monômeros puros na concentração de 500 µg/mL. Igualmente, as soluções obtidas após degradação hidrolítica e térmica das microesferas foram analisadas nas condições descritas em 3.2.5.3.2.1.

Os padrões de ácido glicólico e ácido láctico demonstram picos simétricos e bem resolvidos, apresentando tempo de retenção de 2,96 e 3,30 minutos, respectivamente, conforme demonstrado no cromatograma obtido após injeção de uma solução contendo uma mistura dos dois monômeros (Figura 21-1). Entretanto, os cromatogramas referentes às alíquotas retiradas do meio de degradação das microesferas em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C não levaram a resultados conclusivos, uma vez que a utilização do conservante, imidazolinidiluréia, interferiu na área do pico do ácido glicólico e láctico (resultado não demonstrado). Por outro lado, o cromatograma obtido após injeção do meio de degradação das microesferas que foram submetidas ao refluxo por 24 horas a 100 °C, demonstrou a presença de dois picos com tempos de retenção de 2,8 e 3,3 minutos que podem ser atribuídos ao ácido glicólico e láctico, respectivamente.

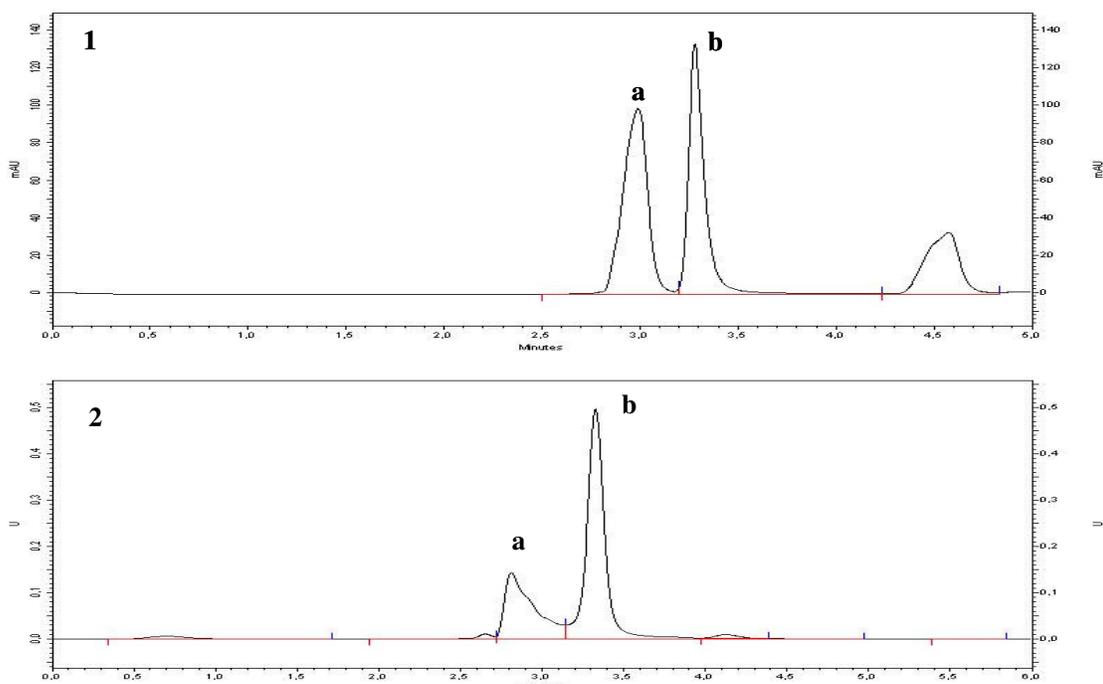


FIGURA 21. Cromatogramas obtidos após injeção da (1) solução dos padrões de ácido glicólico (a) e ácido láctico (b) na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e (2) da solução obtida após degradação térmica das microesferas brancas de PLAGA.

A degradação dos PHAs, como outros poliésteres, procede por um ou vários mecanismos incluindo hidrólise química, catálise enzimática e degradação térmica, sendo o mecanismo predominante dependente das condições ambientais. A hidrólise abiótica do P(3HB) tem sido descrita como um processo relativamente lento sob condições amenas, mas fatores como pH, temperatura e grau de cristalinidade podem afetá-la profundamente. Em geral, tem-se aceito que o P(3HB) pode ser hidrolisado em ambas soluções alcalina e ácida, com a reação progredindo via cisão randômica das ligações ésteres, formação de oligômeros solúveis em insolúveis e, subseqüentemente, formação de monômeros (YU & MARCHESSAULT, 2000). Entretanto, recentes estudos de degradação de filmes, grânulos e precipitados de P(3HB) revelaram que os produtos monoméricos não são detectados em meio ácido (0,1 a 4 N H^+), mas puderam ser determinados em meio alcalino (0,1 a 4 N OH^-). Este resultado foi relacionado ao fato de que o próton (H^+) pode promover tanto a

hidrólise de uma ligação éster, como a esterificação entre álcoois e ácidos, e a esterificação reversa pode ter sido favorecida pela proximidade dos grupamentos ácido e álcool na matriz (CHEN & YU, 2005).

O mecanismo de degradação do P(3HB) tem sido assunto de inúmeros trabalhos, embora quase todos tenham sido realizados utilizando filmes destes polímeros. Além do ácido butírico (3HB), o ácido 2-butenóico ou ácido crotônico tem sido identificado como o segundo produto de degradação do P(3HB) em meio alcalino. YU e colaboradores (2005) propuseram que a formação do ácido crotônico ocorre principalmente pela desidratação e hidrólise da porção terminal das cadeias poliméricas, sendo a proporção final dos dois monômeros dependente da velocidade da reação de desidratação e hidrólise. Para o copolímero P(3HB-co-3HV), o ácido valérico (3HV) tem sido descrito também como produto de degradação. No estudo de SCANDOLA e colaboradores (1997), a análise obtida por CLAE de soluções acidificadas de produtos de degradação de blendas de P(3HB-co-3HV)/P(3HB) atático revelaram a presença de 3HB, porém não foi detectada a presença de 3HV, provavelmente devido ao fato que o copolímero empregado para a preparação da blenda continha somente 10% de unidades de 3HV.

Neste trabalho, a cromatografia líquida foi também empregada com o intuito de avaliar a cinética de degradação das microesferas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) e identificar os produtos de degradação, quando estas são colocadas em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C ou submetidas à degradação térmica. As mesmas condições cromatográficas descritas para a determinação dos produtos de degradação do PLAGA foram utilizadas, com exceção do emprego de uma maior proporção de solvente orgânico na fase móvel para reduzir os tempos de retenção dos monômeros.

Os padrões de ácido butírico e valérico, na concentração de 500 µg/mL, demonstraram picos apresentando tempo de retenção de 6,40 e 12,42 minutos, respectivamente (Figuras 22-1 e 23-1), conforme demonstrado nos cromatogramas obtidos após a injeção de uma solução contendo uma mistura destes monômeros. Nas mesmas condições de análise, o ácido crotônico

demonstrou um tempo de retenção de 5,99 minutos (Figura 22-2). Entretanto, a presença destes picos não foi constatada nos cromatogramas referentes às alíquotas retiradas durante a degradação das microesferas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C, mesmo após 90 dias de ensaio (Figura 22-3 e 23-2). Este resultado pode estar relacionado a degradação muito lenta destas partículas nestas condições e ao não aparecimento dos produtos de degradação no período testado. Quando as microesferas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) foram submetidas à degradação térmica, um pico com tempo de retenção de 6,2 minutos pode ser verificado no cromatograma (Figuras 22-4 e 23-3), podendo ser atribuído ao ácido butírico e/ou crotônico. A pequena proporção de 3HV (5%) no copolímero pode ter dificultado a sua identificação como produto de degradação térmica do P(3HB-co-3HV) e, portanto, a presença deste monômero não pôde ser visualizada neste caso.

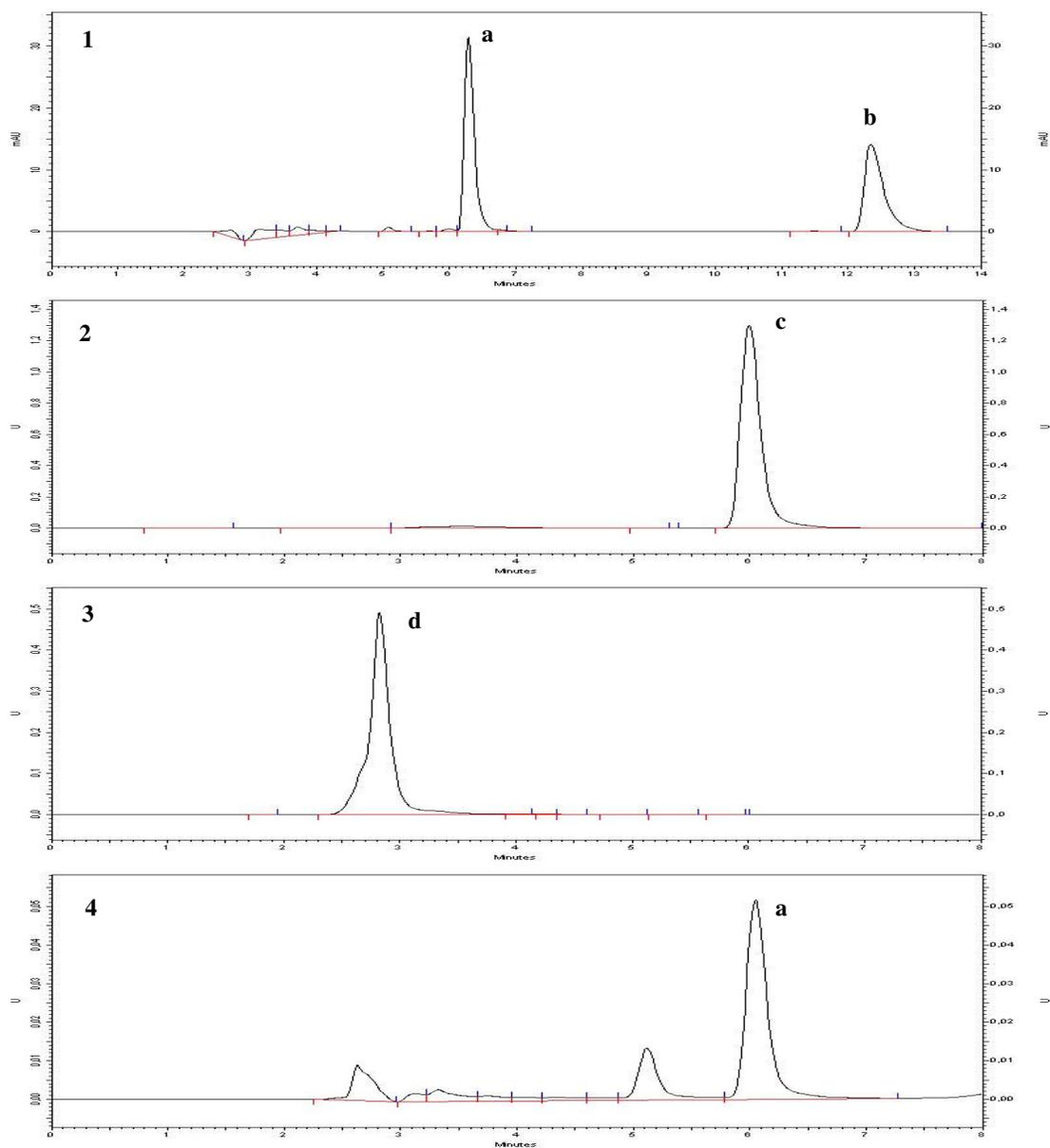


FIGURA 22. Cromatogramas obtidos após injeção da (1) solução dos padrões de ácido butírico (a) e ácido valérico (b) na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (2) solução padrão de ácido crotonico (c) de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (3) solução tampão fosfato com conservante (c) coletada após 90 dias de ensaio de degradação das microesferas de P(3HB), (4) solução obtida após degradação térmica das microesferas de P(3HB).

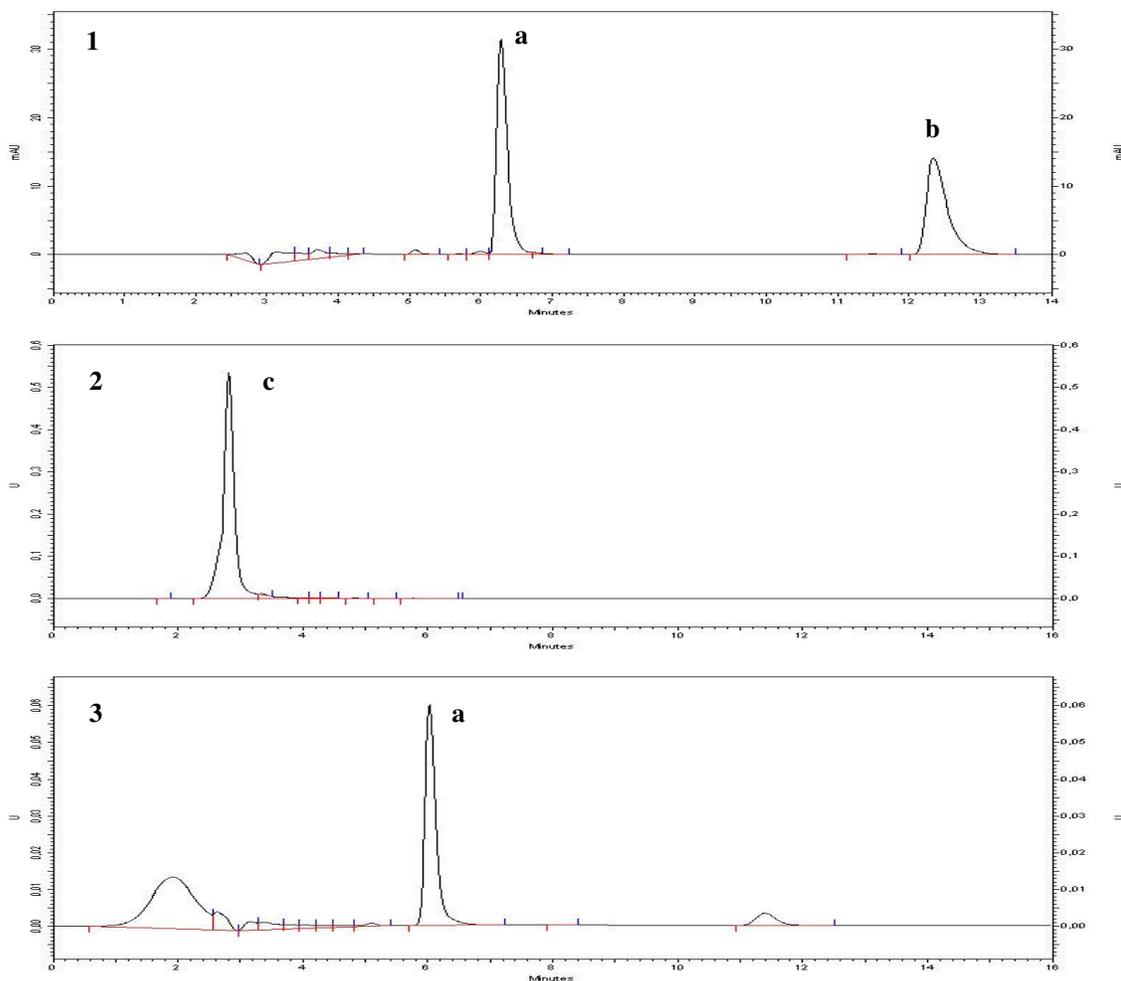


FIGURA 23. Cromatogramas obtidos após injeção da (1) solução dos padrões de ácido butírico (a) e ácido valérico (b) na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, (2) solução tampão fosfato com conservante (c) coletada após 90 dias de ensaio de degradação das microesferas de P(3HB-co-3HV), (3) solução obtida após degradação térmica das microesferas de P(3HB-co-3HV).

4.5.2 Caracterização das microesferas após degradação

4.5.2.1 Avaliação da morfologia das partículas

Após incubação em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C durante 90 dias, as microesferas de PLAGA, P(3HB) ou P(3HB-co-3HV) brancas e contendo ibuprofeno, foram lavadas com água, centrifugadas e liofilizadas. A morfologia

destas partículas foi avaliada a partir de micrografias obtidas por MEV, conforme descrito no item 3.2.5.5.2.

As micrografias obtidas a partir das microesferas de PLAGA, antes e após a incubação, podem ser visualizadas na Figura 24. Como pode ser observado nesta figura, a incubação das microesferas brancas de PLAGA, em tampão fosfato a 37 °C durante 90 dias, provocou a perda do formato esférico e o aumento da porosidade das partículas. Este resultado, também observado por outros autores, tem sido atribuído ao tipo de erosão sofrido pelas microesferas de PLAGA. Geralmente, os polímeros apresentando alto peso molecular sofrem degradação heterogênea e tendem a manter sua forma devido a sua Tg estar acima de 37 °C, o que os torna relativamente impermeáveis (DUNNE *et al.*, 2000; PAYNAN *et al.*, 2003). Por outro lado, quando o ibuprofeno encontra-se incorporado nas microesferas, pode-se observar a completa fusão das partículas no mesmo período. Este resultado evidencia a aceleração do processo de degradação hidrolítica do polímero causada pela presença do fármaco, que pode estar relacionada ao fato deste apresentar um grupamento ácido em sua estrutura, conforme discutido em 4.5.1.1, mas também à redução da Tg do polímero conforme demonstrado por DSC em 4.3.4.1. Ambos fatores parecem contribuir para a mais rápida degradação da partícula na presença de fármaco.

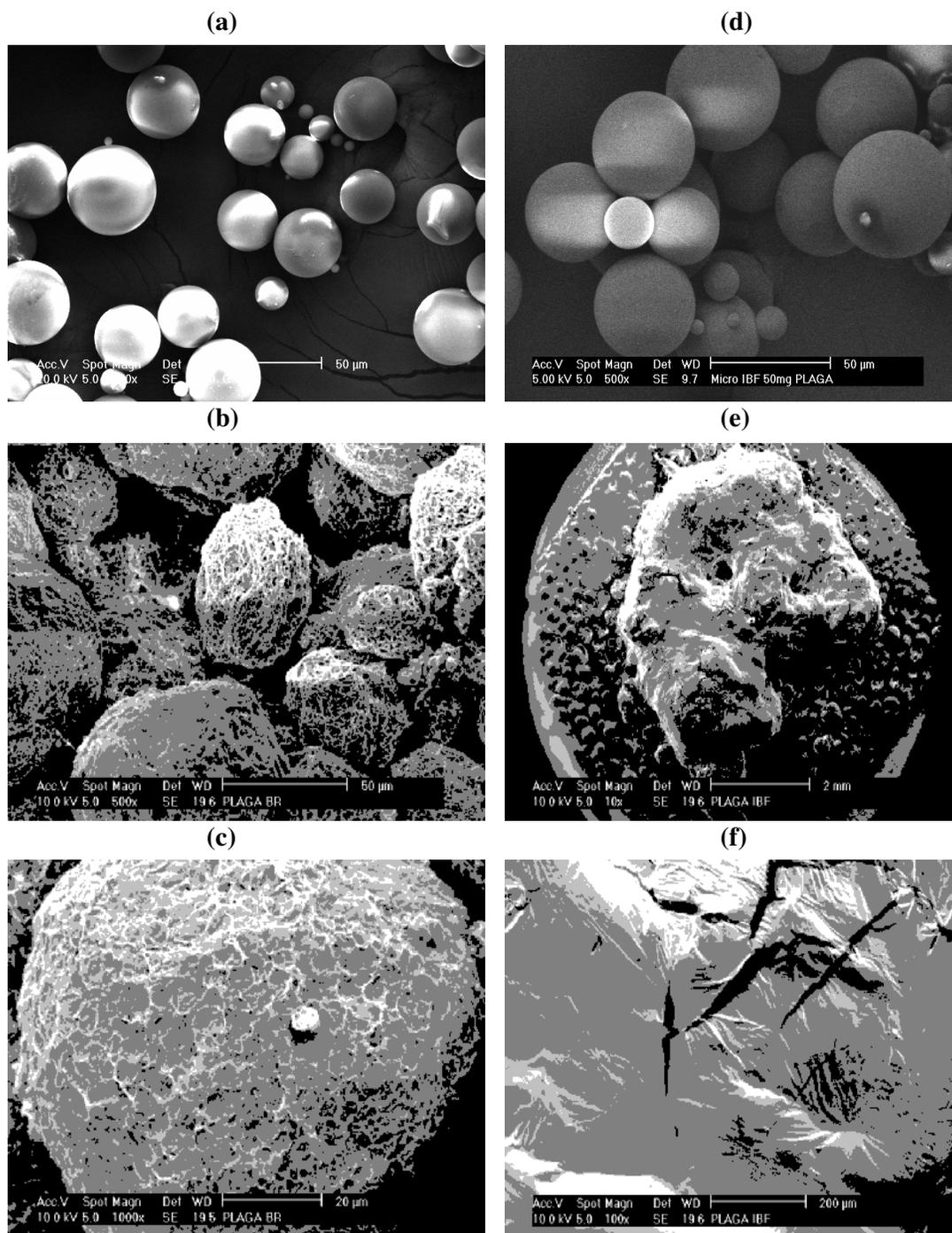


FIGURA 24. Micrografias obtidas por MEV a partir das microesferas de PLGA: (a) brancas, 0 dia de incubação, (b) e (c) brancas, após 90 dias de incubação em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C, (d) contendo IBF, 0 dia de incubação, (e) e (f) após 90 dias de incubação em tampão fosfato pH 7,4 a 37° C.

Contrariamente, os resultados observados nas micrografias obtidas a partir das microesferas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) demonstram a manutenção do formato esférico das partículas, após 90 dias de incubação, mesmo na presença de fármaco (Figuras 25 e 26). Estes resultados estão em concordância com MAIA e colaboradores (2003) que relataram a lenta degradação de microesferas de PHAs em um meio similar. Enquanto, SHISHATSKAYA e colaboradores (2005) observaram que filmes de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) demonstraram resistência a degradação hidrolítica em condições ambientais semelhantes. Por outro lado, a presença de grandes poros é observada após 90 dias de incubação, principalmente nas microesferas de P(3HB). Este resultado pode estar relacionado a mais rápida degradação das regiões amorfas do polímero (EDLUND & ALBERSTSSON, 2000). Neste caso, a elevada cristalinidade e o peso molecular parecem ter sido os fatores que predominantemente afetaram a degradação *in vitro* destes polímeros. Igualmente, o uso de um copolímero contendo 5% de 3HV, não pareceu afetar a velocidade de degradação das partículas no período testado. Em adição a este resultado, alguns autores observaram aumento progressivo da velocidade de degradação com conteúdo de 3HV no copolímero acima de 20 mol% (POUTON & AKHTAR, 1996).

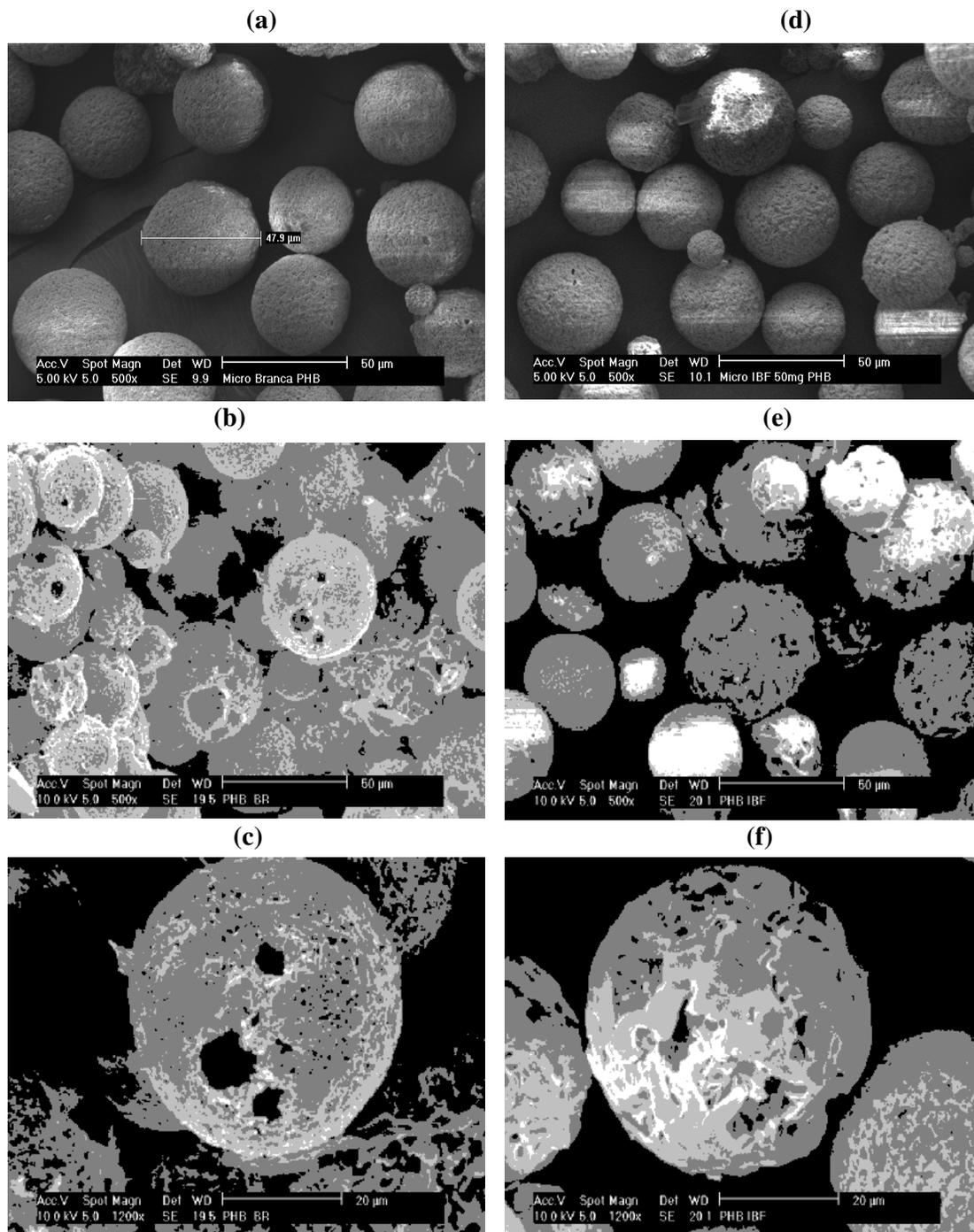


FIGURA 25. Micrografias obtidas por MEV a partir das microsferas de P(3HB): (a) brancas, 0 dia de incubação, (b) e (c) brancas, após 90 dias de incubação em tampão fosfato pH 7,4 a 37° C, (d) contendo IBF, 0 dia de incubação, (e) e (f) após 90 dias de incubação em tampão fosfato pH 7,4 a 37° C.

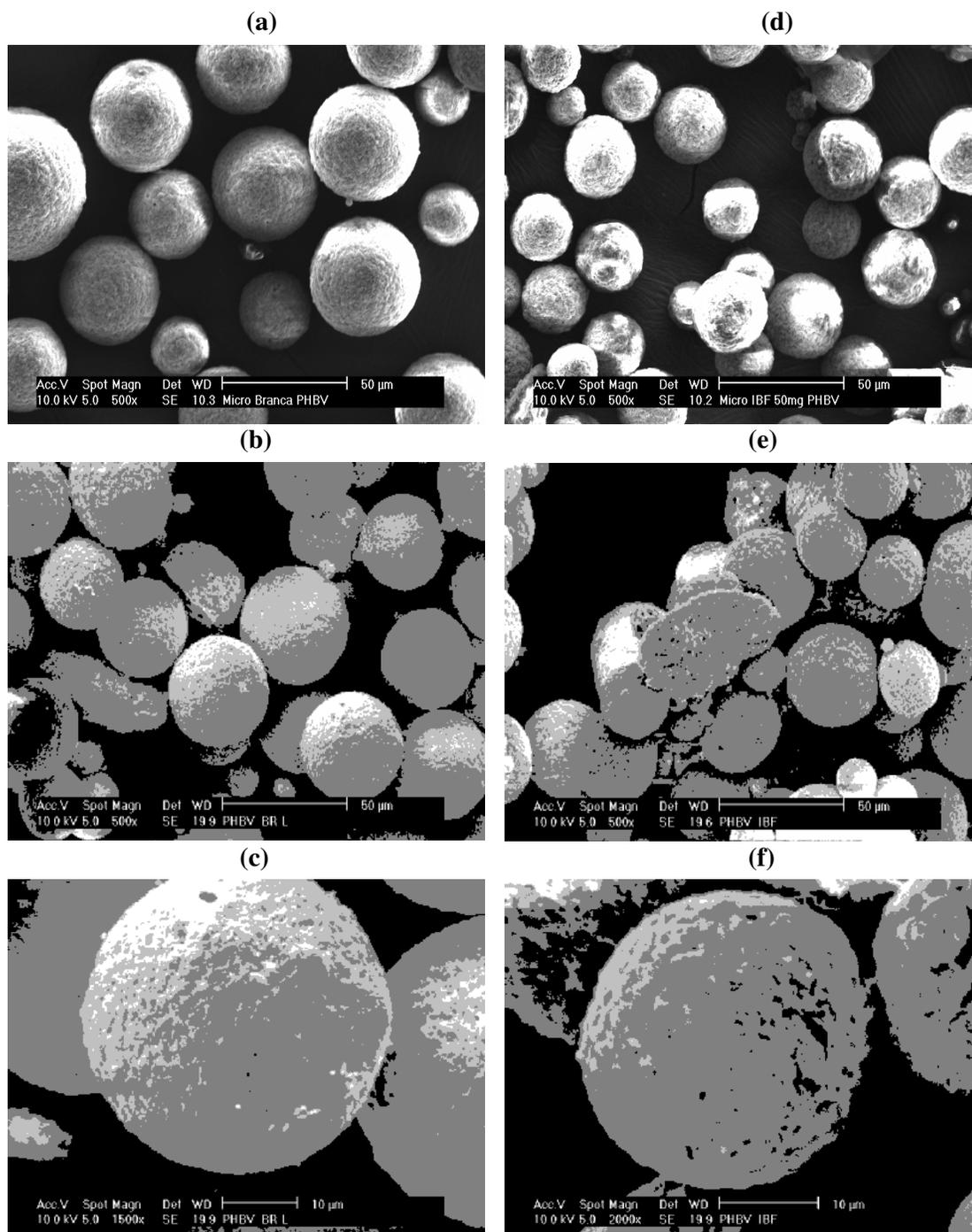


FIGURA 26. Micrografias obtidas por MEV a partir das microesferas de P(3HB-co-3HV): (a) brancas, 0 dia de incubação, (b) e (c) brancas, após 90 dias de incubação em tampão fosfato pH 7,4 a 37° C, (d) contendo IBF, 0 dia de incubação, (e) e (f) após 90 dias de incubação em tampão fosfato pH 7,4 a 37° C.

4.5.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial foi empregada com o intuito de verificar o comportamento térmico das partículas após terem sido submetidas a um período prolongado de incubação em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C. A redução da transição vítrea de poliésteres tem sido associada à degradação do polímero, uma vez que está diretamente relacionada à captura de água pelas partículas e redução do peso molecular. Esta diminuição pode resultar na deformação das partículas, em decorrência da formação de um polímero mais flexível e macio, propenso à agregação (DUNNE *et al.*, 2000; PANYAM *et al.*, 2003). Desta maneira, a degradação das microesferas brancas de PLAGA pôde ser verificada por DSC, visto que houve a redução da Tg do polímero em cerca de 12 °C, após incubação (Tabela 20), estando este resultado de acordo com aqueles visualizados por microscopia eletrônica.

TABELA 20. Resultados obtidos após análise das microesferas de PLAGA brancas por DSC, antes e após incubação em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C.

| Tempo de incubação (dias) | Tg (°C) |
|---------------------------|---------|
| 0 | 50,59 |
| 90 | 37,98 |

Tg = transição vítrea.

Da mesma forma, a redução da Tg também foi verificada após a incubação das microesferas brancas de P(3HB), mas o seu grau de cristalinidade foi similar aquele obtido antes da degradação (Tabela 21). Em contrapartida, para as microesferas de P(3HB-co-3HV) não foi observado alteração nos valores de Tg (Tabela 22). Estes resultados corroboram com a baixa degradabilidade das microesferas, nas condições testadas.

TABELA 21. Resultados obtidos após análise das microesferas de P(3HB) brancas por DSC, antes e após incubação em tampão fosfato pH 7,4 a 37° C.

| Tempo de incubação (dias) | T _g (°C) | T _m (°C) | ΔH exp (J/g) | χ _c (%) |
|------------------------------|---------------------|---------------------|--------------|--------------------|
| 0 | 6,57 | 175,97 | 83,34 | 57,08 |
| 90 | -2,18 | 162,43 | 84,22 | 57,68 |

T_g = transição vítrea; T_m = temperatura de fusão; ΔH exp = entalpia de fusão encontrada no experimento; X_c = grau de cristalinidade estimado

TABELA 22. Resultados obtidos após análise das microesferas de P(3HB-co-3HV) brancas por DSC, antes e após incubação em tampão fosfato pH 7,4 a 37°C.

| Tempo de incubação (dias) | T _g (°C) | T _m (°C) | ΔH exp (J/g) | χ _c (%) |
|------------------------------|---------------------|---------------------|--------------|--------------------|
| 0 | 24,61 | 163,97 | 70,15 | 48,05 |
| 90 | 25,62 | 165,69 | 66,08 | 45,26 |

T_g = transição vítrea; T_m = temperatura de fusão; ΔH exp = entalpia de fusão encontrada no experimento; X_c = grau de cristalinidade estimado

4.5.2.3 Difração de Raio-X

Possíveis alterações na cristalinidade das partículas também foram avaliadas após a obtenção dos difratogramas de raio-x das amostras de microesferas submetidas à incubação. Os difratogramas de difração de raio-x foram obtidos conforme descrito no item 3.2.3.5 e encontram-se demonstrados nas Figuras 27, 28 e 29. Conforme pode ser observado, nenhuma alteração ocorreu nos modelos de difração e, portanto, na cristalinidade das microesferas, após o ensaio de degradação, para os três polímeros estudados, estando estes resultados de acordo com aqueles obtidos por DSC.

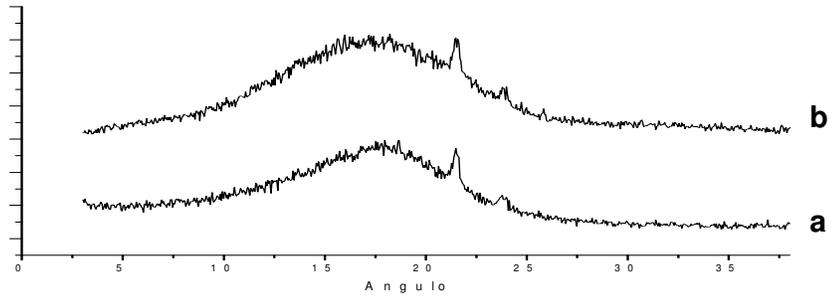


FIGURA 27. Difratogramas de raio x obtidos a partir das microesferas de PLAGA (a) antes e (b) após a incubação em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C.

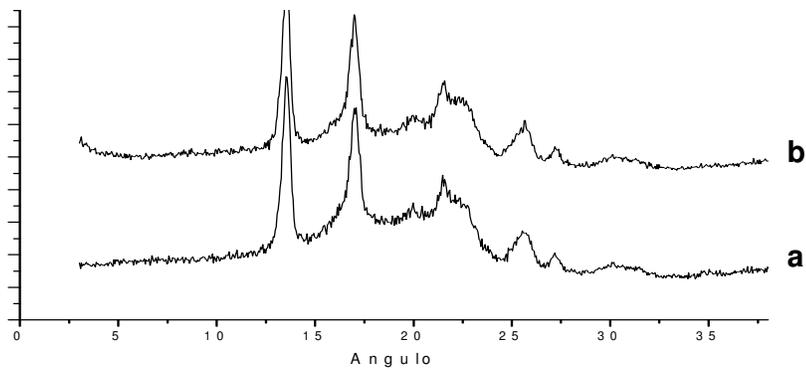


FIGURA 28. Difratogramas de raio x obtidos a partir das microesferas de P(3HB) (a) antes e (b) após a incubação em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C.

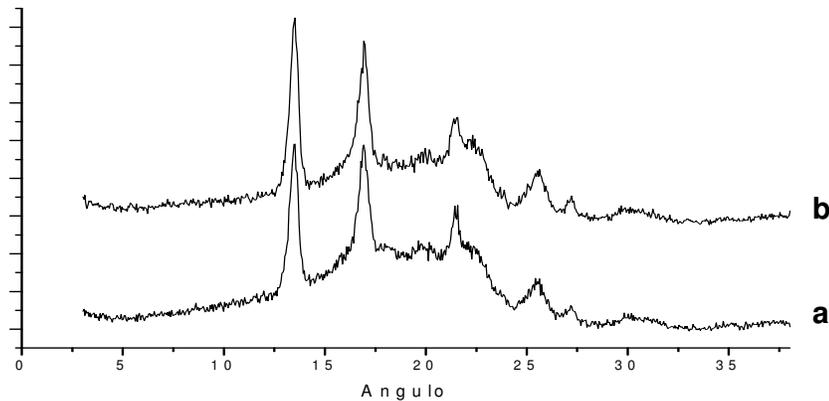


FIGURA 29. Difratogramas de raio x obtidos a partir das microesferas de P(3HB-co-3HV) (a) antes e (b) após a incubação em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C.

4.5.2.4 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A espectrofotometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) também foi utilizada para a caracterização das microesferas brancas, antes e após a incubação em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C. É possível observar nos espectros obtidos a partir das microesferas brancas de PLAGA, antes e após o ensaio de degradação do PLAGA (Figura 30), a 1750 e 1130, 1090 cm^{-1} , referentes ao grupamento C=O e C-O, da ligação éster, e a 1450, 1360 e 750 cm^{-1} referente aos grupamentos C-H na molécula (KIREMITCI-GUMUSDERELIOGLU & DENIZ, 1999). Além desses, mostra picos também a 3500 cm^{-1} (O-H), indicando que o processo de degradação não afetou a estrutura química do polímero, não formando, dessa maneira, novos compostos.

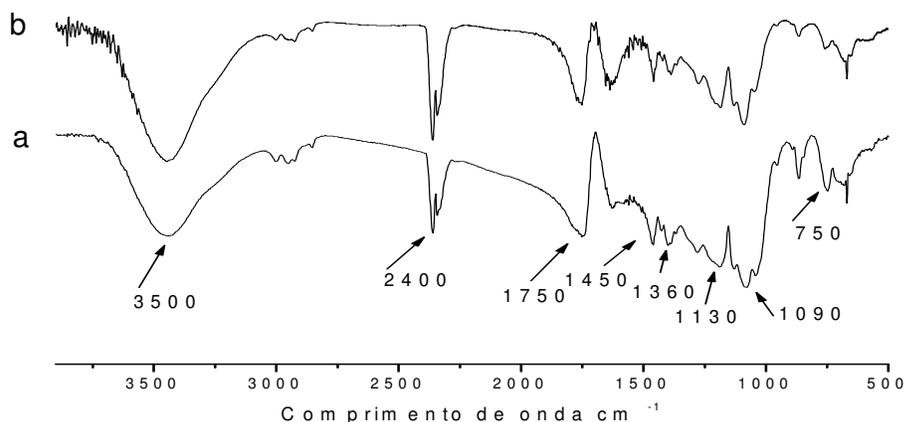


FIGURA 30. Espectros de FT-IR obtidos a partir das microesferas de PLAGA (a) antes e (b) após a incubação em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C.

Igualmente, para as microesferas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV), os espectros demonstram picos característicos a 1720 cm^{-1} e 1278 cm^{-1} ,

referentes ao grupamento C=O e C-O, da ligação éster, antes e após terem sido submetidas à incubação. Estes espectros não apresentam as absorções características dos produtos de hidrólise, como o estiramento referente ao anion COO^- a 1444 cm^{-1} e o estiramento C=C a 1654 cm^{-1} , que seria esperado observar com a reação de desidratação da porção terminal da cadeia polimérica, e subsequente formação de ácido crotônico (Figuras 31 e 32). (CHEN & YU, 2005). Portanto, os espectros sugerem que a estrutura química das microesferas não sofreu alteração induzida pela incubação.

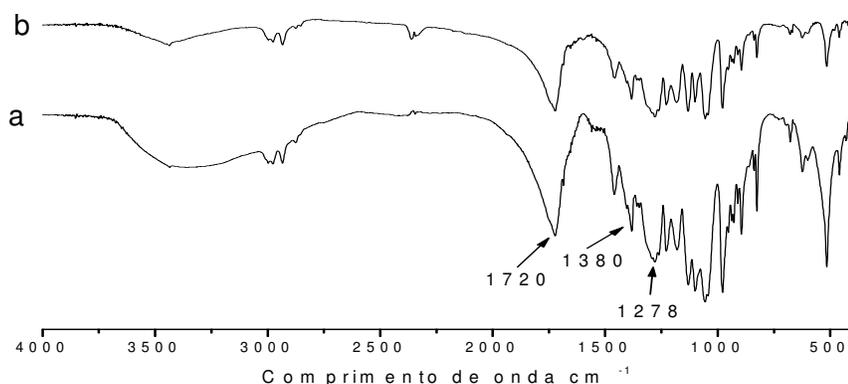


FIGURA 31. Espectros de FT-IR obtidos a partir das microesferas de P(3HB) (a) antes e (b) após a incubação em tampão fosfato pH 7,4 a $37\text{ }^\circ\text{C}$.

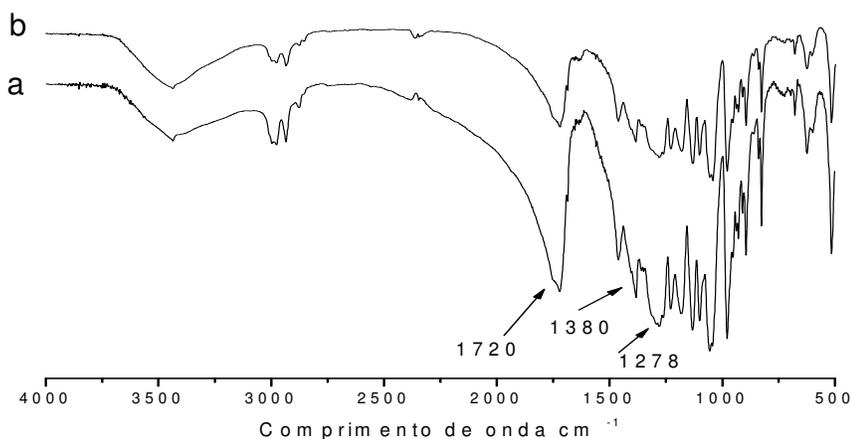


FIGURA 32. Espectros de FT-IR obtidos a partir das microesferas de P(3HB-co-3HV) (a) antes e (b) após a incubação em tampão fosfato pH 7,4 a $37\text{ }^\circ\text{C}$.

Considerando o conjunto dos resultados é possível concluir, sobretudo a partir da análise morfológica, DSC e medidas de pH do meio após incubação, que as microesferas de PLAGA sofreram maior degradação hidrolítica, sendo a mesma tendo sido acelerada pela presença do ibuprofeno. Apesar da CLAE ter indicado a formação de produtos de degradação do P(3HB) e P(3HB-co-3HV) em temperatura elevada, estes produtos não foram identificados após 90 dias de incubação das microesferas em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C, mesmo na presença do fármaco. Além disso, a incorporação de 5% de 3HV, para formação do copolímero P(3HB-co-3HV), não provocou alteração visível no perfil de degradação das microesferas, conforme seria esperado. Do contrário, as micrografias obtidas por MEV sugerem uma maior degradação das microesferas de P(3HB), a qual pode estar correlacionada à mudança do grau de cristalinidade do polímero após tratamento térmico, realizado para permitir a sua dissolução em diclorometano. Assim, o grau de cristalinidade do polímero formador da matriz e o peso molecular demonstraram ser os principais fatores que definiram a degradação das microesferas de PHAs, apontando, portanto, para o emprego de estratégias que visem alterar estas características para tornar estes polímeros aplicáveis ao desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos.

5. CONCLUSÕES

- A preparação de microesferas de PLAGA, P(3HB) e seu copolímero P(3HB-co-3HV), pela técnica de emulsificação/evaporação do solvente, mostrou-se viável, empregando-se diclorometano e água como solventes da fase interna e externa, respectivamente.
- A eficiência de encapsulação e o teor de ibuprofeno nas partículas foram maiores quando os PHAs foram empregados para a obtenção da matriz polimérica.
- As formulações contendo a proporção fármaco:polímero de 1:2 apresentaram cristais de fármaco não encapsulados, conforme observado pelas micrografias obtidas por MEV, indicando que ocorreu a saturação dos carreadores para esta proporção.
- As microesferas de PHAs apresentaram diâmetro médio maior (cerca de 40 μm) quando comparadas àquelas preparadas com PLAGA (cerca de 27 μm); o tamanho das microesferas obtido foi satisfatório para a administração intramuscular.
- A técnica empregada conduziu a obtenção de partículas esféricas independente do polímero utilizado. Entretanto, a utilização do PLAGA conduziu à obtenção de partículas de superfície lisa, enquanto aquelas preparadas com os PHAs apresentaram superfície mais rugosa e porosa.
- As microesferas obtidas a partir dos PHAs apresentaram área superficial maior quando comparadas àquelas preparadas com PLAGA, em decorrência de sua maior porosidade.
- As técnicas de DSC e raio-x evidenciaram a natureza amorfa do PLAGA e das microesferas preparadas a partir deste polímero. Por outro lado, ambos P(3HB) e P(3HB-co-3HV) puros e as microesferas obtidas a partir destes polímeros apresentaram-se como materiais semicristalinos.

- O grau de cristalinidade do ibuprofeno em todas as formulações preparadas com a proporção fármaco:polímero de 1:4 foi baixo, indicando que o fármaco encontra-se preferencialmente disperso na forma molecular na matriz polimérica. Quando o PLAGA foi empregado para a obtenção da matriz polimérica, a introdução do ibuprofeno conduziu ao abaixamento significativo da Tg do polímero.
- A interação fármaco-polímero nas microesferas não pode ser demonstrada pelo emprego da técnica de FT-IR.
- O perfil de liberação do ibuprofeno a partir das microesferas de PLAGA demonstrou ser mais lento e controlado quando comparado as microesferas de PHAs, que proporcionaram uma rápida liberação do fármaco nas duas primeiras horas. A elevada porosidade das partículas de PHAs e a localização do fármaco no carreador parecem ter sido os fatores que determinaram esta rápida liberação.
- Os estudos de degradação *in vitro*, realizado em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C, evidenciaram a mais rápida degradação das microesferas de PLAGA, quando comparadas com aquelas obtidas a partir dos PHAs. Por outro lado, quando a degradação foi realizada em temperatura elevada, os produtos de degradação dos três polímeros utilizados foram evidenciados por CLAE.
- A presença de ibuprofeno acelerou a degradação das microesferas de PLAGA, conforme demonstrado por MEV e DSC. Esta aceleração pode ser atribuída ao caráter ácido deste fármaco e ao abaixamento da Tg do polímero.
- Após 90 dias de degradação em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C, as microesferas de ambos PHAs mantiveram a sua estrutura esférica. Entretanto, a presença de grandes poros foi observada nas microesferas

de P(3HB) após este período, sugerindo que houve a degradação de regiões amorfas do polímero.

- O uso de um copolímero apresentando 5% de 3HV não pareceu alterar o perfil de degradação das microesferas.
- O conjunto dos resultados indicou que a maior cristalinidade, em relação ao PLAGA, e provavelmente o elevado peso molecular dos PHAs foram os fatores responsáveis pela sua lenta degradação. Desta maneira, estratégias que visem alterar estas características devem ser usadas para tornar estes polímeros aplicáveis à administração parenteral.

6.REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ADEYEYE, C. M., PRICE, J. C. Development and evaluation of sustained-release ibuprofen-wax microspheres. II. In vitro dissolution studies. *Pharmaceutical Research*. v. 11, p. 575-579, 1994.
- ABE, H., DOI, Y. Structural effects on enzymatic degradabilities for poly((R)-3-hydroxybutyric acid) and its copolymers; mini-review. *International Journal of Biology Macromolecules*. v. 25, p. 185-192, 1999.
- AL-KASSAS, R. S., GILLIGAN, C. A., LIWANPO, A. Processing factors affecting particle size and in vitro drug release of sustained-release ibuprofen microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 94, p. 59-67, 1993.
- ANDERSON, J. M., SHIVE, M. S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 28, p. 5 – 24, 1997.
- ATKINS, T. W., PEACOCK, S. J. In vitro biodegradation of polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate microcapsules expose to Hank's buffer, newborn calf serum, pancreatin and synthetic gastric juice. *Journal of Microencapsulation* v. 14, p. 35-49, 1997.
- BIOMER. Disponível em: www.biomer.de. Acesso em 07 fev 2006.
- BOLOURTCHIAN, N., KARIMI, K., ABOOFAZELI, R. Preparation and characterization of ibuprofen microspheres. *Journal of Microencapsulation*. v. 22, p. 529-538, 2005.
- BONATTO, D., MATIAS, F., LISBOA, M. P., BOGDAWA, H. M., HENRIQUES, J. A. P. Production of short side chain-polyhydroxyalkanoate by a newly isolated *Ralstonia pickettii*. *World Journal of Microbiology and Biotchnology*. v. 20, p. 395-403, 2004.

- BRAUNEGG, G., LEFEBVRE, G., GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*. v. 65, p. 127-161, 1998.
- CHANDRA, R., RUSTGI, R. Biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.* v. 23, p.1273-1335, 1998.
- CHEN, L. X. L., YU, J. Abiotic hydrolysis of poly(R-3-hydroxybutyrate) in acidic and alkaline media. *Macromol. Symp.* v. 224, p. 35-46, 2005.
- CHENG, G. Q., WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*. v. 26, p. 6565-6578, 2005.
- CHOI, G. G., KIM, H. W., RHEE, Y. H. Enzymatic and non-enzymatic degradation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolyesters produced by *Alcaligenes sp.* MT-16. *J. Microbiol.* v. 42, p. 346-352, 2004.
- CHOI, G. G., KIM, H. W., KIM, Y. B., RHEE, Y. H. Biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolyesters produced by *Alcaligenes sp.* MT-16. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. v. 10, p. 540-545, 2005.
- COSTA, P., LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 13, p. 123-133, 2001.
- Clarke's Analysis of Drug and Poisons (book on CD-ROM). Based on: Galichet L. Y., editor. Clarke's Analysis of Drug and Poisons. London: Pharmaceutical Press, 2004.
- DALAL, P. S., NARURKAR, M. M. In vitro and in vivo evaluation of sustained release suspensions of ibuprofen. *Internacional Journal of Phamaceutics*. v. 73, p. 157-162, 1991.

- DINIZ, S. C., TACIRO, M. K., GOMEZ, J. G. C., PRADELLA, J. G. C. High-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* IPT 046 and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from sugarcane carbohydrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 119, p. 51-70, 2004.
- DONNELL, P. B., MCGINITY, J. W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v.28, p. 25-42, 1997.
- DUBERNET, C., ROULAND, J. C., BENOIT, J. P. Ibuprofen-loaded ethylcellulose microspheres: analysis of the matrix structure by thermal analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 80, p. 1029-1033, 1991.
- DUBERNET, C. Thermoanalysis of microspheres. *Thermochimica Acta*. v. 248, p. 259-269, 1995.
- DUNNE, M., CORRIGAN, O. I., RAMTOOLA, Z. Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials*. v. 21, p. 1659-1668, 2000.
- DURAN, N., ANTONIO, R. V., HAUN, M., PILLI, R. A. Biosíntesis of a trypanocide by *Chromobacterium violaceum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* v. 10, p. 686-690, 1994.
- EDLUND, U., ALBERSTSSON, A. C. Morphology engineering of a novel poly(L-lactide)/poly(1,5-dioxepane-2-one) microsphere system for controlled drug delivery. *J. Polym. Sci.: Part A: Pol Chem*. v. 38, p. 786-796, 2000.
- EMBLETON, J. K., TIGHE, B. J. Polymers for biodegradable medical devices XI. Microencapsulation studies: characterization of hydrocortisone-loaded poly-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate microspheres. *Journal of Microencapsulation*. v.19, p. 737-752, 2002.

- FAISANT, N., SIEPMANN, J., BENOIT, J. P. PLAGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 15, p. 355-366, 2002.
- FERNANDEZ-CARBALLIDO, A., HERRERO-VANRELL, R., MOLINA-MARTINEZ, I. T., PASTORIZA, P. Biodegradable ibuprofen-loaded PLAGA microspheres for intraarticular administration. Effect of Labrafil addition on release in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 279, p. 33-41, 2004.
- FREIBERG, S., ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*. v.282, p. 1-18, 2004.
- FREIER, T., KUNZE, C., NISCHAN, C., KRAMER, S., STERNBERG, K., SAB, M., HOPT, U. T., SCHMITZ, K. P. In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate). *Biomaterials*. v. 23, p. 2649-2657, 2002.
- FUNCK, W., DAMMANN, V., DONNEVERT, G. *Qualitätssicherung in der analytischen chemie*. Weinheim: VHC, 1992.
- GILMAN, A. G. Fármacos analgésico-antipiréticos e antiinflamatórios e medicamentos usados no tratamento da gota. In: *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1996, p. 465 – 467.
- GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. v. 68, p. 335-357, 2002.
- GIUNCHEDI, P., CONTI, B., SCALIA, S., CONTE, U. In vitro degradation study of polyester microspheres by a new HPLC method for monomer release determination. *Journal of Controlled Release*. v. 56, p. 53-62, 1998.

- GOPFERICH, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*. v. 17, p. 103-114, 1996.
- GOSH, L. K., GOSH, N. C., CHATTERJEE, M., GUPTA, B. K. Product development studies on the tablet formulation of ibuprofen to improve bioavailability. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. v. 24, p. 473-477, 1998.
- GRANDFILS, C., FLANDROY, P., JEROME, R. Control of the biodegradation rate of poly (DL-lactide) microparticles intended as chemoembolization materials. *Journal of Controlled Release*. v. 38, p. 109-122, 1995.
- GRANGADE, N., PRICE, J. C. Poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) microspheres containing progesterone: preparation, morphology and release properties. *Journal of Microencapsulation*. v. 8, p. 185-202, 1991.
- GUNARATNE, L. M. W. K., SHANKS, R. A. Multiple melting behaviour of poly(3-hydroxyvalerate) using step-scan DSC. *European Polymer Journal*. v. 41, p. 2980-2988, 2005.
- HOMBRERO-PEREZ, M., SIEPMANN, J., ZINUTTI, C., LAMPRECHT, A., UBRICH, N., HOFFMAN, M., BODMEIER, R., MAINCENT, P. Non-degradable microparticles containing a hydrophilic and/or a lipophilic drug: preparation, characterization and drug release modeling. *Journal of Controlled Release*. v. 88, p. 413-428, 2003.
- IPT. Instituto de Pesquisa e Tecnologia. Biodiversidade. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/biodiversidade/bio15.htm>. Acesso em 07jan.2006.
- KAMBLE, R., MAHESHWARI, M., PARADKAR, A., KADAM, S. Melt solidification technique: incorporation of higher wax content in ibuprofen beads. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* v. 5, p. e61, 2004.

- KASSAB, A. C., XU, K., DENKBAS, E. B., DOU, Y., ZHAO, S., PISKIN, E. Rifampicin carrying polyhydroxybutyrate microspheres as a potential chemoembolization agent. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* v. 8, p. 947-961, 1997.
- KASSAB, A. C., PEIAKEIN, E., BEILGEIASC, S., DENKBAA, E. B., XU, K. Embolization with polyhydroxybutyrate (PHB) microspheres: in vivo studies. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers.* v. 14, p. 291-303, 1999.
- KAWAGUSHI, T., TSUGANE, A., HIGASHIDE, K., ENDOH, H., HASEGAWA, T., KANNO, H., SEKI, T., JUNI, K., FUKUSHIMA, S., NAKANO, M. Control of drug release with a combination of prodrug and polymer matrix: antitumor activity and release profiles of 2',3'-diacyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine from poly(3-hydroxybutyrate) microspheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* v. 81, p. 508-512, 1992.
- KAWASHIMA, Y., NIWWA, T., TAKEUCHI, H., HINO, T., ITO, Y. Control of prolonged drug release and compression properties of ibuprofen microspheres with acrylic polymer, Eudragit RS, by changing their intraparticle porosity. *Chemical Pharmaceutical Bulletin.* v. 40, p. 196-201, 1991.
- KHANG, G., KIM, S. W., CHO, J. C., RHEE, J. M., YOON, S. C., LEE, H. B. Preparation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) microspheres for the sustained release of 5-fluoruracil. *Biomed. Mater. Eng.* v. 11, p. 89-103, 2001.
- KHANNA, S., SHIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry.* v. 40, p. 607-619, 2005.
- KIREMITÇI-GUMUSDERELIOGLU, M., DENIZ, G. Synthesis, characterization and in vitro degradation of poly(DL-lactide-co-glycolide) films. *Turk. J. Chem.* v. 23, p. 153-161, 1999.

- KOLIBACHUK, D., MILLER, A., DENNIS, D. Cloning, molecular analysis, and expression of the polyhydroxyalkanoic acid synthase gene from *Chromobacterium violaceum*. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 65, p. 3561-3565, 1999.
- KORSATTO-WABNEGG, B. Development of press-coated tablets with controlled-release effect with a base of poly-d(-)-3-hydroxybutyric acid. *Pharmazie*. v. 45, p. 842-844, 1990.
- KURTH, N., RENARD, E., BRACHET, F., ROBIC, D., GUERIN, Ph., BOURBOUZE, R. Poly(3-hydroxyoctanoate) containing pendant carboxylic groups for the preparation of nanoparticles aimed at drug transport and release. *Polymer*. v. 43, p. 1095-1101, 2002.
- KUSAKA, S., IWATA, T., DOI, Y. Properties and biodegradability of ultra-high-molecular-weight poly((R)-hydroxybutyrate) produced by a recombinant *Escherichia coli*. *Int. J. Biol. Macromol.* v. 25, p. 87-94, 1999.
- LEE, S. Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 49, p. 1-14, 1996.
- LEMAIRE, V., BELAIR, J., HILDGEN, P. Structural modeling of drug release from degradable porous matrices based on a combined diffusion/erosion process. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 258, p. 98-107, 2003.
- LEO, E., FORNI, F., BERNABEI, M. T. Surface drug removal from ibuprofen-loaded PLA microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 196, p. 1-9, 2000.
- LI, W. I., ANDERSON, K. W., DELUCA, P. Kinetic and thermodynamic modeling of the formation of polymeric microspheres using solvent extraction/evaporation method. *Journal of Controlled Release*. v. 37, p.187 – 198, 1995.

- LI, S. D., HE, J. D., YU, P. H., CHEUNG, M. K. Thermal degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) as studied by Tg, TG-FTIR, and Py-GC/MS. *Journal of Applied Polymer Science*. v. 89, p. 1530-1536, 2003.
- LI, H., CHANG, J. Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from PHBV/wollastonite composite. *Journal of Controlled Release*. v. 107, p. 463-473, 2005.
- LINHARDT, 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.
- LUCAS, E. F., SOARES, B. G., MONTEIRO, E.(Ed) Análise térmica diferencial e calorimetria diferencial de varredura In: Caracterização de polímeros. Rio de Janeiro: E-Papers, 2001.
- MADEN, L. A., ANDERSON, A. J., ASRAR, J., BERGER, P., GARRET, P. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Ralstonia eutropha* in fed-batch cultures. *Polymer*. v. 41, p. 3499-3505, 2000.
- MAIA, J. L., SANTANA, M. H. A., RE, M. I. The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by emulsion solvent evaporation process. *Brasilian Journal of Chemical Engineering*. v. 21, p. 1-21, 2004.
- MARCATO, B., PAGANETTO, G., FERRARA, G., CECCHIN, G. High performance liquid chromatographic determination of some of the hydrolytic decomposition products of poly(alpha-hydroxyacid)s. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* v. 682, p. 147-156, 1996.
- MARTIN, M. A., MIGUENS, F. C., RIEUMONT, J., SANCHEZ, R. Tailoring of the external and internal morphology of poly-3-hydroxy butyrate

- microparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 17, p. 111-116, 2000.
- Mc EVOY, G. (Ed). Information AHFS drug. In: American Society of health System Pharmacists. Bethesda, 2000.
- MIYASAKI, S. S., YEP, A. R., KOLTON, F., HERMIDA, E. B., POVOLO, F., FERNANDES E. G., CHIellini, E. Biodegradable polymeric films based on microbial poly(3-hydroxybutyrate). Effect of gamma-radiation on mechanical properties and biodegradability. *Macromolecular symposia*. v. 197, p. 57-64, 2003.
- NOVOA, G. A. G., HEINAMAKI, J., MRZA, S., ANTIKAINEN, O., COLARTE, A. I., PAZ, A. S., YLIRUUSI, J. Physical solid-state properties and dissolution of sustained-release matrices of polyvinylacetate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v. 59, p. 343-350, 2005.
- PANYAM, J., DALI, M. M., SAHOO, S. K., MA, W., CHAKRAVARTHI, S. S., AMIDON, G. L., LEVY, R. J., LABHASETWAR, V. Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microspheres. *Journal of Controlled Release*. v. 92, p. 173-187, 2003.
- PENNA, L. M. R., PEREIRA, N. N., RE, M. I. Progesterone-loaded biodegradable microspheres: preparation, morphology and release properties. In: V INTERNATIONAL CONGRESS OF PHARMACEUTICAL SCIENCES-CIFARP, 2005, Ribeirão Preto. *Brasilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005, v. 41, p. 438.
- PERUMAL, D. Microencapsulation of ibuprofen and Eudragit® RS 100 by the emulsion solvent diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 218, p. 1-11, 2001.

- PIKAL, M. J., LANG, J. E., GAINES, K. Quantitative crystallinity determinations for B-lactam antibiotics by solution calorimetry: correlation with stability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.67, p. 767-773, 1978.
- PIORIER, Y., NAWRATH, C., SOMERVILLE, C. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacterial and plant. *Biotechnol.* v. 13, p. 142-150, 1995.
- POUTON, C. W., AKHTAR, S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Advanced Drug Deivery Reviews*. v. 18, p. 133 – 162, 1996.
- REDDY, C. D. K., GHAI, R., RAMISHI, KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*. v. 87, p. 137-146, 2003.
- RENARD, E., TANGUY, P. Y., SAMAIN, E., GUERIN, P. Synthesis of novel graft polyhydroxyalkanoates. *Macromolecular Symposia*. v. 197, p. 11-18, 2003.
- REUSH, R. N. Transmembrane ion transport by polyphosphate poly-3-hydroxybutyrate complexes. *Biochem. Engl. Trans.* v. 65, p. 280-295, 2000.
- ROSSEL, C. E. V., NONATO, R. V., MANTELATTO, P. E., LEAL, M. R. L. V. Production of biodegradable plastic (PHB), sugar and ethanol in a sugar mill. *International Sugar Journal*. v. 104, p. 321-323, 2002.
- ROSSI, S., AZGHANI, A. O., OMRI, A. Antimicrobial efficacy of a new antibiotic-loaded poly(3-hydroxybutyric-co-hydroxyvaleric acid) controlled release system. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 54, p. 1013-1018, 2004.
- SALEHIZADEH, H., LOOSDRECHT, M. C. M. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*. v. 22, p. 261-279, 2004.

- SALMAN, M. A., SAHIN, A., ONUR, M. A., OGE, K., KASSAB, A., AYPAR, U. Tramadol encapsulated into polyhydroxybutyrate microspheres; in vitro release and epidural analgesic effect in rats. *Acta Anaesthesiol Scand.* v. 47, p. 1006-1012, 2003.
- SAVENKOVA, L., GERCBEGA, Z., BIBERS, I., KALNIN, M. Effect of 3-hydroxy valerate content on some physical and mechanical properties of polyhydroxyalkanoates produced by *Azotobacter chroococcum*. *Process Biochemistry.* v. 36, p. 445-450, 2000.
- SCANDOLA, M., FOCARETE, M., ADAMUS, G., SIKORSKA, W., BARANOWSKA, I., SWIERCZEK, S., GNTOWSKI, M., KOWALCZUK, M., JEDLINSKI, Z. Polymer blends of natural poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and a synthetic atactic poly(3-hydroxybutyrate). Characterization and biodegradation studies. *Macromolecules.* v. 30, p. 2568-2574, 1997.
- SENDIL, D., GURSEL, I., WISE, D. L., HASIRCI, V. Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles. *Journal of Controlled Release.* v. 59, p. 207-217, 1999.
- SHISHATSKAYA, E. I., VOLOVA, T. G., GORDEEV, S. A., PUZYR, A. P. Degradation of P(3HB) and P(3HB-co-3HV) in biological media. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* v. 16, p. 643-657, 2005.
- SIEPMANN, J., GOPFERICH, A. Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews.* v. 48, p. 229-247, 2001.
- SUDESH, K., ABE, H., DOI, Y. Síntesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science.* v. 25, p. 1503-1555, 2000.

- SWARBRICK, J., BOYLAN, J. (Ed). Controlled- and modulated-release drug-delivery systems. In: Encyclopdia of Pharmaceutical Tecnology. v. 3. New York: Marcel Dekker Inc., 1990, p. 281-313.
- TEIXEIRA, V. G., COUTINHO, F. M. B., GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resina à base de divinilbenzeno. *Química Nova*. v. 24, p. 808-818, 2001.
- VILA JATO, J. L. (Ed). Microencapsulación de medicamentos. In: Tecnologia Farmacêutica. Aspectos fundamentals de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. Madrid: editorial Síntesis S.A., 1997, p. 577-608.
- WANG, Z., ITOH, Y., HOSAKA, Y., KOBAYASHI, I., NAKANO, Y., MAEDA, I., YAMAKAWA, J., NISHIMINE, M., SUENOBU, T., FUKUZUMI, S., KAWASE, M., YAGI, K. Novel trnsdermal drug delivery system with polyhydroxyalkanoate and starburst polyamidoamine dendrimer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v. 95, p. 541-543, 2003.
- WANG, Z., ITOH, Y., HOSAKA, Y., KOBAYASHI, I., NAKANO, Y., MAEDA, I., YAMAKAWA, J., NISHIMINE, M., SUENOBU, T., FUKUZUMI, S., KAWASE, M., YAGI, K. Mechanism of enhancement effect of dendrimer on transdermal drug permeation through polyhydroxyalkanoate matrix. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v. 96, p. 537-540, 2003.
- WASHINGTON, C. Drug release from microparticle systems. In: BENITA, S. (Ed). Microencapsulation methods and industrial applications. New York: Marcel Dekker, INC. 1996, p. 155-181.
- WHATELEY, T. L. Biodegradable microspheres for controlled drug delivery. In: KARSA, D. R., STEPHENSON, R. A. Encapsulation and Controlled Release. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1993. p. 52-65.
- WATTS, P. J., DAVIES, M. C., MELIA, C. D. Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: an overview of techniques and

- applications. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. v. 7, n. 3, p. 235-259, 1990.
- WILLIAMS, A. C., TIMMINS, P., LU, M., FORBES, R. T. Disorder and dissolution enhancement: deposition of ibuprofen on to insoluble polymers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 26, p. 288-294, 2005.
- XU, F., SUN, L. X., TAN, Z. C., LIANG, J. G., LI, L. R. Thermodynamic study of ibuprofen by adiabatic calorimetry and thermal analysis. *Thermochimica Acta*. v. 412, p. 33-37, 2004.
- YAGMURLU, M. F., KORKUSUZ, F., GURSEL, I., KORKUSUZ, P., ORS, U., HASIRCI, V. Sulbactam-cefoperazone polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) local antibiotic delivery system: in vivo effectiveness and biocompatibility in the treatment of implant-related experimental osteomyelitis. *J. Biomed. Mater. Res*. v. 46, p. 494-503, 1999.
- YANG, Y. Y., BAI, X. L., CHAN, W. K. Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. *Chem. Eng. Sci*. v. 55, p. 2223-2236, 2000.
- YANG, Y. Y., CHUNG, T. S., NG, N. P. Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials*. v. 22, p. 231-241, 2001.
- YU, G., MARCHESSAULT, R. H. Characterization of low molecular weight poly(β -hydroxybutyrate)s from alkaline and acid hydrolysis. *Polymer*. v. 41, p. 1087-1098, 2000.
- YU, J., PLACKETT, D., CHEN, L. X. L. Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly((R)-3-hydroxybutyrate)

under acidic and alkaline conditions. *Polymer Degradation and Stability*. v. 89, p. 289-299, 2005.

ZHENG, Y. D., WANG, Y. J., WU, G., CHEN, X. F., ZHONG, Q. H. Kinetics study for enzymatic degradation of polyhydroxyalkanoates. *Acta polymerica Sinica*. v. 6, p. 760-763, 2002.

ZHU, K. J., JIANG, H. L., YASUDA, H., ICHIMARU, A., YAMAMOTO, K., LECOMTE, P., JEROME, R. Preparation, characterization and in vitro release properties of ibuprofen-loaded microspheres based on polylactide, poly(epsilon-caprolactone) and their copolymers. *Journal of Microencapsulation*. v. 22, p. 25-36, 2005.

ZINN, M., WITHOLT, B., EGLI, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 53, p. 5-21, 2001.