

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Piroxicam e cetoprofeno utilizados como fármacos modelo em micropartículas
de PHB e PHB/quitosana: preparação, caracterização e avaliação do
perfil de liberação**

Giovana Carolina Bazzo

Florianópolis

2008

Giovana Carolina Bazzo

Piroxicam e cetoprofeno utilizados como fármacos modelo em micropartículas de PHB e PHB/quitosana: preparação, caracterização e avaliação do perfil de liberação

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Química, área de concentração de Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo T. N. Pires

Co-orientadora: Profa. Dra. Elenara M. T. Lemos-Senna

Florianópolis

2008

Giovana Carolina Bazzo

**PIROXICAM E CETOPROFENO UTILIZADOS COMO FÁRMACOS MODELO EM
MICROPARTÍCULAS DE PHB E PHB/QUITOSANA: PREPARAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Doutor em Química**
no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa
Catarina

Florianópolis, 13 de agosto de 2008.

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alfredo T. N. Pires
Orientador

Profa. Dra. Elenara Lemos Senna
Co-orientadora

Profa. Dra. Silvia S. Guterres
(Dep. de Farmácia – UFRGS)

Prof. Dr. Marcos Lopes Dias
(Instituto de Macromoléculas – UFRJ)

Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento
(Departamento de Química – USFC)

Prof. Dr. Luiz Fernando D. Probst
(Departamento de Química – USFC)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Alfredo T. N. Pires, por ter me aceitado como orientanda e ter compartilhado seus conhecimentos. Obrigada pela orientação, carinho e atenção.

À Profa. Elenara Lemos Senna, pela co-orientação e inúmeras contribuições para a realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Química da UFSC (Prof. Valdir Soldi, Prof. Luiz Fernando Probst, Prof. Josiel Domingos, Prof. José Carlos Gesser) e à Marly Soldi, que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

À Profa. Maria do Carmo Gonçalves, do Instituto de Química (UNICAMP), pela atenção e pela execução das análises de microscopia eletrônica.

A todos os colegas do POLIMAT, que compartilharam comigo momentos de trabalho e distração.

Aos meus amigos da UNIVILLE (Bia, Mel e Soares), pelo apoio em todos os momentos.

Aos órgãos de fomento e à UFSC.

Aos meus queridos pais, à minha família (tia Vera, vó Dina, tio Miguel, Julinha e Cacá) e ao Junior, pelo amor, carinho e incentivo.

SUMÁRIO

Lista de figuras	vii
Lista de tabelas	x
Lista de siglas e abreviaturas	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2	
OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos específicos	4
CAPÍTULO 3	
REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 Microencapsulação de fármacos	5
3.2 Métodos para a obtenção de micropartículas	6
3.3 Micropartículas compostas	9
3.4 Poli(hidroxiclcanoatos)	11
3.5 Quitosana	13
3.6 Piroxicam e cetoprofeno	16
CAPÍTULO 4	
OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE PHB CONTENDO PIROXICAM E CETOPROFENO	
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1.1 Materiais	18
4.1.2 Obtenção das microesferas de PHB/PXC	19
4.1.3 Obtenção das microesferas de PHB/CET	21
4.1.4 Determinação do teor de fármaco e da eficiência de encapsulação.	21
4.1.5 Avaliação da morfologia das micropartículas	22
4.1.6 Avaliação do diâmetro das micropartículas	22
4.1.7 Calorimetria exploratória diferencial	22
4.1.8 Difração de raios-X de pó	23

4.1.9 Distribuição do tamanho de poros	23
4.1.10 Perfil de liberação do fármaco <i>in vitro</i>	23
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.2.1 Determinação do teor de fármaco e da eficiência de encapsulação.	24
4.2.2 Caracterização das micropartículas	28
4.2.2.1 Morfologia	28
4.2.2.2 Calorimetria exploratória diferencial e difração de raios-X	31
4.2.2.3 Perfil de liberação do fármaco <i>in vitro</i>	34
CONCLUSÕES PARCIAIS	38
CAPÍTULO 5	
OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS	
COMPOSTAS DE PHB E QUITOSANA	39
5.1 MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1.1 Materiais	39
5.1.2 Preparo das micropartículas compostas	39
5.1.3 Preparo das micropartículas reticuladas	40
5.1.4 Determinação do teor de fármaco	41
5.1.5 Morfologia das micropartículas	41
5.1.6 Perfil de liberação do fármaco <i>in vitro</i>	42
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.2.1 Morfologia das micropartículas	43
5.2.2 Teor de fármaco nas micropartículas	48
5.2.3 Perfil de liberação dos fármacos <i>in vitro</i>	49
CONCLUSÕES PARCIAIS	57
CAPÍTULO 6	
CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
Publicações relacionadas com o tema da tese	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática de microesferas e microcápsulas poliméricas, indicando possíveis distribuições do fármaco.....	6
Figura 2.	Representação esquemática de uma micropartícula do tipo <i>core-shell</i> e de uma micropartícula do tipo reservatório.....	9
Figura 3.	Fórmula estrutural da unidade monomérica dos poli (hidroxialcanoatos)	11
Figura 4.	Fórmula estrutural da unidade monomérica da quitosana.....	14
Figura 5.	Esquema da reação de reticulação da quitosana com glutaraldeído.	15
Figura 6.	Estrutura química das diferentes formas polimórficas do piroxicam (I, II) e do cetoprofeno (III).....	17
Figura 7.	Esquema de obtenção das microesferas através do método de emulsão e evaporação do solvente O/A.....	19
Figura 8.	Fotografias de microscopia óptica ilustrando diferentes tempos do processo de preparo das micropartículas (formulação 5): A (início do processo, aumento de 100X); B (após 1 h de agitação, aumento de 100X); C (após 1 h de agitação, aumento de 400X); D (final do processo, aumento de 100X); E (final do processo, aumento de 400X). As setas indicam os cristais de fármaco não encapsulado.....	26
Figura 9.	Fotografias de microscopia óptica ilustrando diferentes tempos do preparo das micropartículas de PHB/CET (formulação 5): A (início do processo, aumento de 100X); B (final do processo, aumento de 100X).....	28
Figura 10.	Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de PHB/PXC obtidas a partir da formulação F2: A (corte transversal) e B (superfície).....	28
Figura 11.	Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de PHB/PXC obtidas a partir da formulação F7: A (microesfera), B (corte da micropartícula inserida em uma resina) e C (superfície com maior aumento).....	29
Figura 12.	Curvas de distribuição de tamanho de poros calculadas a partir do método BJH das micropartículas obtidas a partir das formulações F2 e F7. $D_v(d)$ corresponde à derivada da função que descreve o volume em função do diâmetro do poro.....	30

Figura 13. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de PHB/CET.....	31
Figura 14. Curvas de DSC do PHB, dos fármacos e das micropartículas.....	33
Figura 15. Difratogramas do [A] PXC (forma monoidratada); [B] PHB e das micropartículas: [C] F2 e [D] F7.....	34
Figura 16. Perfis de liberação dos fármacos a partir das micropartículas de PHB/PXC F2 (O) e F7 (Δ), e PHB/CET (\square).....	35
Figura 17. Curvas de distribuição de tamanho de poros calculadas a partir do método BJH das micropartículas obtidas a partir das formulações F2 e F7 após o ensaio de liberação. Para comparação, são inseridos os gráficos obtidos antes do ensaio de liberação.....	36
Figura 18. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das microesferas de PHB/PXC (F2 e F7) e de PHB/CET, após o ensaio de liberação.....	37
Figura 19. Linearização dos dados de dissolução de acordo com o modelo matemático de Baker-Lonsdale.....	38
Figura 20. Representação esquemática do processo de preparação sólido-água-óleo utilizado no preparo das micropartículas compostas.....	40
Figura 21. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas compostas MC1: (A) e (D) preparadas a partir das microesferas de PHB/PXC; (B) e (E) a partir das microesferas de PHB/CET; (C) microesferas preparadas apenas com quitosana, utilizando as mesmas condições descritas no preparo das micropartículas MC1.....	44
Figura 22. Fotografia de microscopia óptica do início do preparo das micropartículas compostas, utilizando solução de quitosana 1%.....	44
Figura 23. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas compostas MC2: (A) e (C) preparadas a partir das microesferas de PHB/PXC; (B) e (D) a partir das microesferas de PHB/CET.....	45
Figura 24. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas compostas MC3: (A) e (B) preparadas a partir das microesferas de PHB/PXC; (C) e (D) a partir das microesferas de PHB/CET.....	46

Figura 25. Fotografias de microscopia óptica do início do preparo das micropartículas compostas, utilizando solução de quitosana 2% e 3%.....	47
Figura 26. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas compostas MC3 reticuladas com 1,0 % de glutaraldeído: A (PXC) e B (CET).....	47
Figura 27. Perfis de liberação do piroxicam a partir das micropartículas compostas, em tampão fosfato pH 7,4. O gráfico menor apresenta a faixa de tempo de 0 a 5 h.....	50
Figura 28. Perfis de liberação do cetoprofeno a partir das micropartículas compostas, em tampão fosfato pH 7,4. O gráfico menor apresenta a faixa de tempo de 0 a 5 h.....	51
Figura 29. Quantidade de fármaco liberado nos primeiros 45 min de ensaio a partir das microesferas de PHB/fármaco e micropartículas compostas.....	52
Figura 30. Perfis de liberação do piroxicam a partir das micropartículas compostas não reticuladas (■) e reticuladas com 0,1% (□) e 1,0% (○) de glutaraldeído, em tampão fosfato pH 7,4. Os gráficos menores apresentam a faixa de tempo de 0 a 30 h.....	53
Figura 31. Perfis de liberação do cetoprofeno a partir das micropartículas compostas não reticuladas (■) e reticuladas com 0,1% (□) e 1,0% (○) de glutaraldeído, em tampão fosfato pH 7,4. Os gráficos menores apresentam a faixa de tempo de 0 a 30 h.....	54
Figura 32. Quantidade de PXC e CET liberados após 45 min, em tampão fosfato pH 7,4.....	55
Figura 33. Eficiências de dissolução em 168 h das micropartículas reticuladas.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Variáveis independentes e seus níveis investigados no preparo das micropartículas de PHB contendo PXC.....	20
Tabela 2.	Experimentos realizados de acordo com o planejamento fatorial 2^3	21
Tabela 3.	Eficiência de encapsulação e teor de piroxicam nas micropartículas de PHB.....	25
Tabela 4.	Resultados da análise de variância obtidos utilizando os valores de eficiência de encapsulação como variável dependente.....	25
Tabela 5.	Eficiência de encapsulação e teor de cetoprofeno nas microesferas de PHB.....	27
Tabela 6.	Temperaturas e entalpias de fusão dos fármacos e do PHB.....	33
Tabela 7.	Variáveis independentes e seus níveis investigados no preparo das micropartículas compostas.....	42
Tabela 8.	Eficiência de encapsulação e teor de fármaco nas micropartículas compostas.....	48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ΔH_f	variação da entalpia de fusão
AINEs	antiinflamatórios não-esteroidais
ANOVA	análise de variância
BJH	Barret, Joyner e Hallenda
CET	cetoprofeno
dms	diferença mínima significativa
DSC	calorimetria exploratória diferencial
ED ₁₆₈	eficiência de dissolução em 168 h
EE %	eficiência de encapsulação
HPLC	high performance liquid chromatography
k	constante de velocidade de dissolução
MEV	microscopia eletrônica de varredura
PEG	polietilenoglicol
PDDA	poli(dimetil dialil cloreto de amônio)
PDLLA	poli(D,L ácido lático)
PHAs	poli(hidroxicanoatos)
PHB	poli(3-hidroxi butirato)
PHBHHx	poli(3-hidroxi butirato-co-hidroxiexanoato)
PHBV	poli(3-hidroxi butirato-co-hidroxi valerato)
PLA	poli(ácido lático)
PLG	poli(ácido glicólico)
PLGA	poli(ácido glicólico-co-ácido lático)
PLLA	poli(L-ácido lático)
PSS	poli(estireno sulfonato)
PVA	poli(álcool vinílico)
PXC	piroxicam
Q ₄₅	quantidade de fármaco liberado após 45 min
r	coeficiente de correlação linear
T _f	temperatura de fusão
UV	ultravioleta
X _c	grau de cristalinidade

RESUMO

No presente estudo foram preparadas micropartículas de poli(3-hidroxi-butilato) contendo piroxicam e cetoprofeno como fármacos modelo através da técnica de emulsão-evaporação do solvente O/A. A influência de alguns parâmetros do processo sobre a eficiência de encapsulação do piroxicam foi avaliada através de um planejamento fatorial do tipo 2^3 . A eficiência de encapsulação do fármaco variou de 5,5 a 89,8 %. Micropartículas ocas e irregulares, contendo cristais de fármaco na superfície foram obtidas quando se utilizou 5 mL de clorofórmio como fase interna da emulsão. Através do ensaio de liberação *in vitro* evidenciou-se que, após 8 h, todo o fármaco havia sido liberado para o meio. Micropartículas esféricas, com superfície externa rugosa e porosa foram obtidas quando se utilizou 20 mL de diclorometano como fase interna e adicionou-se isopropanol à fase externa da emulsão. Estas microesferas foram capazes de controlar a liberação do piroxicam durante 50 h. Utilizando essas condições, foi possível obter microesferas contendo cetoprofeno com as mesmas características morfológicas. No entanto, a liberação apresentou um pronunciado efeito *burst* inicial, seguido da liberação da totalidade do fármaco após 24 h.

Micropartículas compostas contendo microesferas de PHB revestidas ou inseridas em uma matriz de quitosana foram preparadas através da técnica de emulsão-evaporação do solvente S/A/O com o objetivo de diminuir o efeito *burst* e prolongar a liberação dos fármacos. A utilização de diferentes concentrações de quitosana na fase interna da emulsão influenciou as características morfológicas e o tamanho das micropartículas compostas. Micropartículas contendo diversas microesferas de PHB inseridas em uma matriz de quitosana foram obtidas quando se utilizou uma solução contendo 3 % do polissacarídeo como fase interna. A influência da concentração de quitosana e de reticulante (glutaraldeído) sobre a quantidade de piroxicam e cetoprofeno liberados após 45 min e sobre a eficiência de dissolução em 168 h foi avaliada através de planejamento fatorial, indicando que ambas as variáveis influenciaram as respostas. Uma diminuição significativa do efeito *burst* e um prolongamento da liberação dos fármacos foram observados especialmente quando maiores concentrações de quitosana e de glutaraldeído foram empregadas.

ABSTRACT

In this study, poly(3-hydroxybutyrate) microparticles containing piroxicam were prepared by the oil-in-water emulsion-solvent evaporation method. The effects of some process conditions on drug encapsulation efficiency were determined using a 2^3 factorial design. The piroxicam loading efficiency varied from 5.5 to 89.8 %. Hollow and irregular microparticles with drug crystals on their surfaces were obtained when 5 mL of chloroform was used as the internal phase. In the release study, all of the piroxicam was released to the dissolution medium (phosphate buffer pH 7.4) after 8 h. Small spherical microspheres with a rough and porous polymeric matrix were obtained when 20 mL of dichloromethane was used as the internal phase and isopropanol was added to the external aqueous phase. These microspheres controlled the piroxicam release for approximately 50 h. It was possible to obtain ketoprofen microspheres with the same morphological characteristics by using the same conditions, but a high burst release was observed, followed by the release of the total amount of the drug after 24 h.

PHB/chitosan composite microparticles were prepared by solid-water-oil emulsion solvent evaporation technique with the aim to reduce the burst effect and to prolong the drug release. The size and the morphological characteristics of the composite microparticles were influenced by the chitosan concentration in the emulsion internal phase. Reservoir-type microparticles, composed by various PHB microspheres into a chitosan matrix were obtained when a 3% of chitosan solution was used as internal phase. In order to determine the effect of chitosan and cross linker (glutaraldehyde) concentration on the piroxicam and ketoprofen release after 45 min and on the dissolution efficiency at 168 h, the experiments were performed using a factorial design, indicating that both independent variables influenced the responses. A significant reduction of burst effect and a prolonging of drug release were observed, especially when high chitosan and glutaraldehyde concentrations were used.

INTRODUÇÃO

O crescimento da área de medicamentos tem levado ao desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, a qual tem sido uma área de intensa pesquisa nos últimos anos e de grande interesse para a indústria farmacêutica. Os sistemas de liberação prolongada de fármacos apresentam uma série de vantagens, como a diminuição no número de administrações diárias do medicamento, a redução dos efeitos adversos locais ou sistêmicos e a redução da toxicidade, tornando possível obter-se uma melhoria na adesão dos pacientes ao tratamento¹. Diversas estratégias tecnológicas vêm sendo estudadas para a elaboração desses sistemas, entre elas a microencapsulação. As micropartículas apresentam como principal vantagem a versatilidade de aplicação através de diferentes vias de administração, principalmente através das vias oral, ocular, intramuscular e intra-articular.

Diversos polímeros têm sido utilizados no preparo de micropartículas para uso farmacêutico, entre eles os polimetacrilatos, polímeros e copolímeros do ácido lático e do ácido glicólico (PLA, PLG e PLGA), poli(ϵ -caprolactona), derivados celulósicos (etilcelulose, metilcelulose, acetobutirato de celulose), entre outros. Especialmente quando a via parenteral é almejada, os polímeros utilizados na elaboração das micropartículas devem ser biocompatíveis e biodegradáveis, os quais devem sofrer degradação *in vivo* originando produtos toxicologicamente seguros que serão eliminados pelas vias metabólicas normais.

Os poli(hidroxicanoatos) [PHAs] são poliésteres sintetizados por bactérias a partir de substratos naturais e são considerados polímeros promissores para utilização em sistemas de liberação de fármacos, especialmente devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade. Entre os principais polímeros que fazem parte deste grupo estão o poli(3-hidroxiбутирато) [PHB] e o poli(hidroxiбутирато-co-hidroxiуаlerato) [PHBV]². O PHB vem sendo amplamente produzido no Brasil utilizando matérias-primas de baixo custo como o açúcar da cana, tornando-se uma alternativa interessante e de custo acessível para utilização em sistemas de liberação de fármacos. No entanto, uma das limitações quanto ao emprego desse polímero é o elevado grau de cristalinidade e a alta velocidade de cristalização^{3,4}, o

que resulta na obtenção de micropartículas com matriz rugosa e porosa, promovendo a rápida liberação do fármaco e dificultando o controle da sua liberação⁵⁻⁷.

A liberação de grande quantidade da substância ativa nos primeiros minutos após o contato com o meio aquoso, conhecida como *burst release*, é comumente observada em micropartículas preparadas a partir de diversos polímeros e pode ser ocasionada por inúmeros fatores, como a presença de fármaco próximo à superfície das partículas e as características da matriz polimérica, como porosidade⁸. O efeito *burst*, mesmo quando visto como uma conseqüência desejável, é imprevisível e difícil de controlar, podendo levar ao aparecimento de efeitos adversos⁹.

Entre as estratégias que podem ser utilizadas para reduzir o efeito *burst* e prolongar a liberação de fármacos a partir de sistemas microparticulados destacam-se a otimização das condições do processo de preparação das microesferas e também a elaboração de sistemas mais complexos, como micropartículas compostas, formadas por diversas microesferas inseridas em uma matriz polimérica ou por uma única microesfera recoberta por uma camada de polímero. Esses sistemas apresentam uma barreira adicional à difusão do fármaco, possibilitando a redução do efeito *burst* e o prolongamento da sua liberação¹⁰.

Neste trabalho propôs-se, em uma primeira etapa, a avaliação das condições do preparo de microesferas de PHB contendo os antiinflamatórios não esteroidais piroxicam (PXC) e cetoprofeno (CET) como fármacos modelo, através da técnica de emulsão/evaporação do solvente, de forma a obter microesferas de PHB que apresentassem características adequadas e que permitissem o controle da liberação dos fármacos. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) causam irritação da mucosa gastrintestinal quando administrados por via oral, fato que justifica a sua utilização na forma de sistemas de liberação controlada, especialmente na forma de sistemas multiparticulados, os quais tendem a se espalhar uniformemente no trato gastrintestinal, evitando a concentração do ativo em um único local e diminuindo, desta forma, a irritação local¹¹. Além disso, esses fármacos podem ser administrados através de outras vias, como a intramuscular e a intra-articular, as quais justificam a sua incorporação em micropartículas preparadas a partir de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, especialmente sistemas capazes de prolongar a liberação desses fármacos, diminuindo a freqüência de administração e os efeitos adversos.

A outra proposta deste estudo foi desenvolver uma técnica para o preparo de micropartículas compostas de PHB e quitosana, com o objetivo de diminuir o efeito *burst* e prolongar a liberação dos fármacos. A quitosana também é um polímero de origem natural, biocompatível, biodegradável, atóxico e amplamente utilizado na área farmacêutica^{12,13}. Assim como o PHB, a quitosana é produzida no Brasil, o que torna acessível a sua aquisição, sem a necessidade de importação.

Considerando a crescente busca por novos materiais com características adequadas para serem utilizados em sistemas de liberação controlada de ativos, as vantagens relacionadas à utilização do PHB e da quitosana e a inexistência de estudos relacionados à obtenção de micropartículas compostas utilizando estes dois polímeros, torna-se evidente a importância da realização deste estudo.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

O objetivo geral do presente trabalho foi preparar e caracterizar microesferas de PHB e micropartículas compostas de PHB/quitosana com características adequadas para prolongar a liberação do piroxicam e do cetoprofeno.

2.2 Objetivos específicos:

- Preparar microesferas de PHB contendo piroxicam ou cetoprofeno através da técnica de emulsão e evaporação do solvente.
- Avaliar a influência de parâmetros do processo de microencapsulação sobre a eficiência de encapsulação dos fármacos e a morfologia das microesferas.
- Avaliar o perfil de liberação do piroxicam e do cetoprofeno presente nas microesferas através de ensaios de dissolução *in vitro*.
- Verificar a ocorrência de interações entre os fármacos e a matriz polimérica, bem como alterações das formas polimórficas do piroxicam após o processo de microencapsulação.
- Desenvolver uma metodologia para a obtenção de micropartículas compostas de PHB/quitosana, utilizando o método de emulsão-evaporação do solvente.
- Caracterizar as micropartículas compostas quanto à morfologia, tamanho e eficiência de encapsulação dos fármacos.
- Avaliar o perfil de liberação do piroxicam e do cetoprofeno das micropartículas compostas de PHB/quitosana através de ensaios de dissolução *in vitro*.
- Avaliar a influência da concentração de quitosana na fase interna da emulsão e da concentração de reticulante sobre o efeito *burst* e o prolongamento da liberação dos fármacos.

CAPÍTULO 3

REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Microencapsulação de fármacos

Microencapsulação é a técnica que permite encapsular substâncias sólidas ou líquidas no interior de matrizes poliméricas ou revesti-las com polímeros^{14,15}. Atualmente, a microencapsulação vem sendo utilizada em diversas áreas. Na área farmacêutica, pode ser empregada com as seguintes finalidades:

- controlar ou prolongar a liberação de fármacos;
- diminuir as flutuações plasmáticas de certos fármacos, diminuindo a ocorrência de efeitos colaterais, especialmente quando administrados por via oral;
- proteger substâncias que degradam facilmente pela ação de agentes externos, como umidade, luz e oxigênio, promovendo uma melhoria na sua estabilidade;
- proteger fármacos degradáveis no trato gastrointestinal, como proteínas e hormônios;
- mascarar o sabor e/ou odor desagradáveis de certas substâncias, entre outras aplicações¹⁴⁻¹⁹.

As micropartículas poliméricas podem ser denominadas de microesferas ou microcápsulas, diferindo com relação à estrutura final da partícula, conforme representado na Figura 1. As microcápsulas apresentam uma parede polimérica de espessura variável, contendo um núcleo totalmente isento de material polimérico, sendo que o fármaco pode estar presente na parte interna ou no revestimento. As microesferas, por outro lado, são constituídas por uma matriz polimérica com características morfológicas semelhantes em toda a extensão, na qual o fármaco encontra-se distribuído^{14,16,18}.

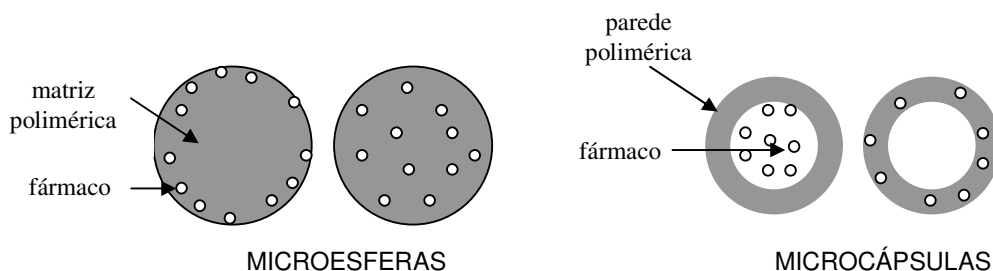


Figura 1. Representação esquemática de microesferas e microcápsulas poliméricas, indicando possíveis distribuições do fármaco.

As micropartículas apresentam diâmetro médio variando entre 1 μm e 1 mm ou mais, sendo a escolha da via de administração dependente do tamanho das partículas. Através da via oral podem ser administradas micropartículas com diferentes tamanhos. Para administração através da via intramuscular, por exemplo, o tamanho da micropartículas não deve exceder 150 μm . Por outro lado, quando a via endovenosa é almejada, partículas com tamanho menor do que 1 μm devem ser utilizadas, as quais são denominadas de nanopartículas^{14,18}.

3.2 Métodos para a obtenção de micropartículas

A seleção do método utilizado para obtenção de micropartículas depende das características do fármaco, do material polimérico que será utilizado como matriz e das características das micropartículas que se deseja obter. As técnicas mais comumente empregadas são a coacervação ou separação de fases, *spray drying* e a emulsão/evaporação do solvente^{14,17}.

A coacervação é uma das técnicas mais antigas empregadas no preparo de micropartículas e está relacionada ao fenômeno de separação de fases em sistemas coloidais. A fase coloidal, rica em polímero, constitui o coacervado. A deposição do coacervado em torno de partículas sólidas, líquidas, em solução, suspensão ou emulsão e posterior endurecimento, leva à formação das micropartículas^{14,17}.

A técnica de *spray drying* consiste na atomização de uma solução ou suspensão do fármaco e do polímero no interior de uma câmara aquecida. A

atomização produz pequenas partículas líquidas e o aquecimento leva à evaporação do solvente e, conseqüentemente, à formação das micropartículas²⁰.

O método de emulsão e evaporação do solvente consiste em dissolver o polímero e o fármaco em um solvente orgânico e posteriormente emulsificar em uma solução aquosa, contendo um estabilizante ou emulsificante, sob agitação. A evaporação do solvente orgânico, realizada em temperatura adequada, leva à formação das micropartículas. A emulsão obtida por esta técnica é denominada óleo em água (O/A) e aplica-se apenas nos casos em que o polímero e o fármaco são insolúveis em água. Baixas eficiências de encapsulação são obtidas quando se utilizam fármacos hidrossolúveis, uma vez que estes tendem a difundir e solubilizar-se na fase aquosa^{21,22}.

No entanto, esta técnica pode ser modificada e utilizada para encapsular substâncias solúveis em água. Neste caso, pode-se utilizar o processo de emulsificação óleo em óleo (O/O) ou o processo de emulsão múltipla água em óleo em água (A/O/A). No primeiro caso, o polímero e o fármaco contidos em um solvente polar são emulsificados em uma fase oleosa imiscível, na presença de um emulsificante^{14,23}. No caso da emulsão múltipla água em óleo em água (A/O/A), o fármaco é solubilizado em uma fase aquosa e emulsificado em um solvente orgânico não miscível contendo o polímero, formando uma emulsão água em óleo (A/O). Esta emulsão primária é vertida em uma solução aquosa contendo um emulsificante, originando desta forma uma emulsão múltipla A/O/A^{24,25}.

As características das micropartículas obtidas pela técnica de emulsão e evaporação do solvente, bem como a liberação de fármacos a partir da matriz polimérica, dependem da concentração, solubilidade, massa molar, entre outras propriedades físico-químicas do polímero, dos solventes empregados, do tipo e concentração do emulsificante, das características físico-químicas do fármaco, da velocidade de agitação, temperatura, bem como da velocidade de remoção do solvente^{14,26}.

A presença de um estabilizante ou emulsificante na fase externa da emulsão é um fator crítico para a obtenção de partículas esféricas individuais. A função do emulsificante é prevenir a agregação das microesferas durante a evaporação do solvente, bem como promover a estabilização das gotículas de solvente durante o processo de evaporação^{27,28}. O estabilizante mais utilizado é o poli(álcool vinílico)

(PVA). No entanto, outros emulsificantes também vêm sendo empregados, como a gelatina, alginato, hidroxipropilmetilcelulose, polissorbatos, entre outros.

O tipo e concentração do emulsificante utilizado afeta principalmente o tamanho das micropartículas. Maia e colaboradores (2004)²⁹ produziram microesferas de PHB empregando diversas concentrações de PVA na fase aquosa da emulsão e evidenciaram que, quando foi utilizada a concentração de 0,5 % de PVA, o tamanho das micropartículas obtidas foi cerca de 10 vezes maior do que quando se utilizou 2,0 % de PVA. Os autores demonstraram que não foi possível a obtenção de microesferas individuais na ausência do estabilizante. Resultados semelhantes foram obtidos por Lee e colaboradores (2000)³⁰, os quais utilizaram diversas concentrações de polissorbato 80 no preparo de microesferas de polimetacrilatos (Eudragit®).

A velocidade de evaporação do solvente orgânico, que está relacionado com a difusão para a fase externa e posterior evaporação na interface líquido-ar, é outro fator que afeta as características das micropartículas, bem como a liberação do fármaco. O processo de evaporação do solvente pode ser realizado sob pressão atmosférica ou reduzida, em diferentes temperaturas²⁶.

Chung e colaboradores (2001)³¹ estudaram o efeito da velocidade de evaporação do solvente sobre as características de microesferas de PLLA. A evaporação do diclorometano, utilizado como solvente da fase interna da emulsão, foi realizada sob pressão atmosférica (760 mmHg) e pressão reduzida (160 mmHg). Microesferas com superfície externa lisa foram obtidas quando foi utilizada pressão atmosférica para evaporação do solvente orgânico. Por outro lado, quando o processo de evaporação foi realizado sob pressão reduzida, as micropartículas apresentaram-se porosas e com superfície rugosa. Diferenças foram observadas, também, com relação à eficiência de encapsulação da lidocaína, sendo que a quantidade de fármaco encapsulado foi maior quando o processo foi realizado sob pressão atmosférica.

Uma variável desta técnica, que também pode ser utilizada, é o método de extração do solvente, que consiste em aumentar a solubilidade do solvente orgânico na fase externa, conduzindo a um aumento da velocidade de eliminação do mesmo a partir da fase interna. Meng e colaboradores (2004)³² adicionaram 6 % de isopropanol à fase externa aquosa para extrair o diclorometano, utilizado como solvente da fase interna da emulsão. Este processo foi comparado com o método

convencional de evaporação do solvente, sendo observadas diferenças com relação à eficiência de encapsulação de albumina bovina e ao tamanho das microesferas.

Outros trabalhos avaliam a influência de parâmetros do processo de encapsulação sobre as características das microesferas, como velocidade de agitação, temperatura de evaporação do solvente, quantidade e massa molar de polímeros, relação entre o volume das fases interna e externa, entre outras variáveis, as quais podem afetar as características das micropartículas, bem como a liberação de fármacos^{15,33,34}.

3.3 Micropartículas compostas

Entre as estratégias que podem ser utilizadas para controlar a liberação de fármacos a partir de sistemas microparticulados pode-se citar a preparação de micropartículas compostas a partir de dois ou mais polímeros, as quais podem ser do tipo *core-shell* ou um reservatório de micropartículas. Denomina-se *core-shell* quando uma única partícula é recoberta com uma ou mais camadas de espessura variável, normalmente constituídas por um outro polímero¹⁰. As micropartículas compostas formadas por diversas partículas dispersas em um segundo polímero, conforme representado na Figura 2, serão denominadas neste trabalho de micropartículas do tipo reservatório.

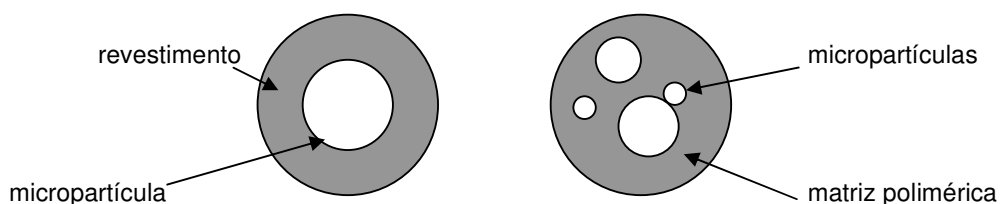


Figura 2 – Representação esquemática de uma micropartícula do tipo *core-shell* e de uma micropartícula do tipo reservatório.

A principal finalidade da utilização deste tipo de sistema é promover uma barreira adicional à difusão do fármaco, diminuindo o efeito *burst*, muito comum no caso de microesferas, e também prolongar a liberação do ativo. Com este objetivo,

alguns trabalhos foram desenvolvidos, como o preparo de micropartículas de PLGA recobertas com uma camada de alginato e outra de quitosana³⁵, microesferas de PHBV contendo ibuprofeno recobertas com diversas camadas de polissacarídeos³⁶, micropartículas de quitosana do tipo *core-shell* recobertas com acetato de celulose³⁷, incorporação de nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) em micropartículas de polimetacrilatos e etilcelulose⁸, entre outros. Além disso, micropartículas do tipo *core-shell* podem ser empregadas como sistemas bifásicos de liberação, nos quais dois fármacos são liberados de maneira controlada e em tempos distintos, estando um presente no núcleo e outro na camada externa³⁸.

A técnica de emulsão-evaporação do solvente também pode ser utilizada no preparo de micropartículas compostas. No entanto, é necessário que os polímeros empregados sejam imiscíveis, para que ocorra a separação de fases e a formação das micropartículas compostas. Diversas variáveis desta técnica vêm sendo utilizadas e alguns exemplos serão descritos a seguir.

Lee e colaboradores (2002)³⁹ utilizaram a técnica de emulsão O/O/A para a elaboração de micropartículas de PLGA recobertas com PLLA. Soluções dos polímeros em diclorometano foram preparadas separadamente, em diferentes concentrações, e depois misturadas sob agitação formando uma emulsão O/O. Em seguida, a emulsão foi gotejada em uma solução aquosa de PVA, originando uma emulsão múltipla do tipo O/O/A. A evaporação do solvente levou à formação das micropartículas compostas, em decorrência da imiscibilidade dos polímeros empregados. A emulsão múltipla A/O/A também vem sendo utilizada na elaboração de micropartículas do tipo reservatório^{8,37} e de microesferas do tipo *core-shell*³⁸. Morita e colaboradores (2001)⁹ prepararam microesferas do tipo reservatório utilizando o sistema S/O/O/A (sólido-óleo-óleo-água). Primeiramente, um polímero hidrofílico e a albumina bovina foram solubilizados em água e liofilizados. Através da elaboração de um diagrama de fases ternário PLA/PLGA/diclorometano observou-se que ocorre a separação de fases quando a concentração dos polímeros excede determinado nível. As micropartículas liofilizadas foram, então, dispersas em uma fase orgânica (diclorometano) na qual os polímeros (PLGA e PLA) encontravam-se solubilizados, levando à formação de uma fase interna rica em PLGA e uma fase externa rica em PLA. Esta fase orgânica foi, então, adicionada a uma solução aquosa contendo metilcelulose, sob agitação, formando uma emulsão S/O/O/A. A

evaporação do solvente levou à formação de micropartículas compostas de PLGA inseridas em uma matriz de PLA.

Além desta, outras técnicas vêm sendo empregadas no preparo de micropartículas compostas, como a deposição auto organizada camada por camada de polissacarídeos no recobrimento de microesferas pré-formadas³⁶ e também técnicas mais sofisticadas, utilizando aparatos específicos para a obtenção deste tipo de micropartícula¹⁰.

3.4 Poli(hidroxicanoatos)

Os PHAs são poliésteres sintetizados por diferentes bactérias a partir de substratos naturais, a exemplo do açúcar da cana. Estes polímeros acumulam-se na célula bacteriana na forma de grânulos, os quais são extraídos utilizando-se solventes orgânicos ou através da ruptura da membrana celular por ação mecânica, química ou enzimática^{40,41}.

Entre os principais representantes desta classe de polímeros destacam-se o poli(3-hidroxiбутирато), o poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiвалерато) e o poli(hidroxiбутирато-co-hidroxihexanoato), PHB, PHBV e PHBHHx, respectivamente^{40,41}, cujas estruturas químicas das unidades monoméricas estão representadas na Figura 3.

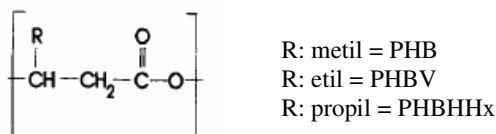


Figura 3. Fórmula estrutural da unidade monomérica dos poli(hidroxicanoatos).

O PHB, quando extraído a partir de diferentes fontes bacterianas, apresenta essencialmente propriedades similares: elevado grau de cristalinidade (cerca de 60-80 %), temperatura de transição vítrea em torno de 0 °C e temperatura de fusão em torno de 170-180 °C^{41,42}. A biodegradabilidade e a biocompatibilidade são as principais propriedades do PHB que possibilitam a sua utilização na área médica. A

degradação *in vivo* do PHB origina o ácido 3-hidroxibutírico, um componente presente no organismo. PHB de baixa massa molar complexado a outras macromoléculas possui a capacidade de penetrar nas células, podendo ser encontrado no citoplasma e em fluidos intracelulares. Além disso, a administração oral ou parenteral de derivados de 3-hidroxiácidos provoca um aumento das cetonas corporais, originando uma série de efeitos benéficos, como aumento da eficiência cardíaca e controle de peso, podendo ser utilizados no tratamento do diabetes e de outras desordens metabólicas. Sendo assim, o PHB, além de não ser tóxico às células, apresenta propriedades nutricionais e terapêuticas⁴³.

A maioria dos trabalhos utilizando PHB encontrados na literatura concentra-se na obtenção de filmes a partir do polímero puro, de seus copolímeros ou de blends com outros polímeros ou plastificantes, com o objetivo de avaliar a sua biodegradabilidade e propriedades mecânicas⁴⁴⁻⁴⁶ ou visando sua utilização na área médica, especialmente em estudos de reposição óssea^{47,48}. Alguns trabalhos têm sido publicados envolvendo a preparação de micropartículas de PHB para o controle da liberação de fármacos e encontram-se descritos a seguir.

Maia e colaboradores (2004)²⁹ prepararam microesferas de PHB e PHBV pelo método de emulsão e evaporação do solvente e estudaram o efeito de alguns parâmetros utilizados no processo sobre as características das micropartículas. Estudos de degradação *in vitro* evidenciaram que as microesferas de PHB apresentaram cerca de 2 % de perda de massa após 30 dias de incubação em tampão pH 7,4 a 37 °C, enquanto que a perda de massa das micropartículas de PHBV foi de 6 %, em virtude deste polímero possuir menor grau de cristalinidade.

Martin e colaboradores (2000)³ produziram micropartículas de PHB através da técnica de emulsão e evaporação do solvente O/A e A/O/A. Em ambos os casos as partículas obtidas apresentaram-se porosas e com superfície externa rugosa, fato atribuído pelos autores à rápida velocidade de cristalização do polímero. As micropartículas preparadas através da técnica A/O/A apresentaram estrutura interna multivesicular. No entanto, não foram realizados estudos de liberação de fármacos a partir destes sistemas.

Conway e colaboradores (1997)⁵ prepararam microesferas a partir de diversos polímeros, entre eles PLA, PHB e PHBV, para encapsulação de albumina bovina. A eficiência de encapsulação deste composto foi menor quando se utilizou o PHB, sendo que os autores atribuíram este fato à alta cristalinidade do polímero.

Estudos de liberação *in vitro* evidenciaram que os sistemas contendo PHB liberaram a albumina bovina mais rapidamente do que as matrizes contendo PHBV. Os autores atribuíram este fato a diferenças de porosidade das matrizes poliméricas, uma vez que a liberação da albumina a partir da microesfera ocorre por difusão através dos poros formados na matriz durante o processo de obtenção.

Resultados semelhantes foram obtidos por Gangrade e Price (1991)⁴⁹, que prepararam microesferas de PHB e PHBV contendo progesterona, através da técnica de emulsão e evaporação do solvente. As microesferas de PHB apresentaram estrutura mais porosa e liberação do fármaco mais rápida do que as preparadas com PHBV.

Kassab e colaboradores (1997)⁵⁰ prepararam microesferas de PHB contendo rifampicina através da técnica de emulsão e evaporação do solvente utilizando diferentes condições, como velocidades de agitação, concentrações de emulsificante e diferentes quantidades de fármaco. Apesar da obtenção de elevadas eficiências de encapsulação da rifampicina, a liberação do fármaco a partir das microesferas ocorreu rapidamente.

Trabalhos mais recentes propõem realizar modificações na estrutura do polímero, com o objetivo de modificar as suas propriedades, como a síntese de um copolímero em bloco (PHB-PEG-PHB) capaz de originar nanopartículas do tipo *core-shell* em meio aquoso, as quais podem ser utilizadas como sistemas de veiculação de fármacos⁵¹.

3.5 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo derivado do processo de desacetilação da quitina, que constitui a maior fração do exoesqueleto de insetos e crustáceos. A cadeia polimérica da quitosana é formada principalmente por unidades de β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose, conforme representado na Figura 4. No organismo, a quitosana é degradada por diferentes lisozimas originando o composto N-acetil glicosamina, o qual é excretado como dióxido de carbono⁵². Apresenta propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, mucoadesividade, baixa toxicidade e ação antimicrobiana, características que a tornam um material promissor para utilização na área médica^{53,54}.

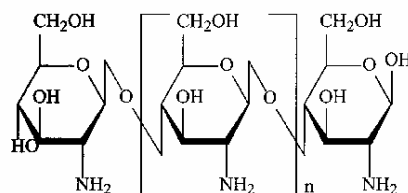


Figura 4 – Fórmula estrutural da unidade monomérica da quitosana.

Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos visando a elaboração de micro e nanopartículas de quitosana para liberação controlada de fármacos. Os principais parâmetros que influenciam as propriedades físico-químicas da quitosana e, conseqüentemente, a liberação de fármacos a partir de micropartículas preparadas com este polissacarídeo são a sua massa molar e o seu grau de reticulação⁵⁵.

Alguns trabalhos mostram que quando se utiliza quitosana de alta massa molar, tem-se um efeito *burst* menos pronunciado e um maior prolongamento da liberação de ativos quando comparada às de baixa e média massa molar^{52,55}.

Por ser um polímero hidrofílico, a quitosana não é capaz de prolongar a liberação de ativos durante longos períodos de tempo, havendo a necessidade de ser reticulada. A reticulação da quitosana pode ser realizada através de agentes químicos, como glutaraldeído, glicoxal, genipina, gliceraldeído ou agentes físicos, como o tripolifosfato. O glutaraldeído é o reticulante mais comumente empregado, cuja reação de reticulação com a quitosana encontra-se representada na Figura 5. O grupamento aldeído forma ligações covalentes do tipo imina com os grupamentos amino da quitosana. O polímero reticulado apresenta um menor grau de intumescimento e a matriz de quitosana torna-se mais compacta⁵⁶.

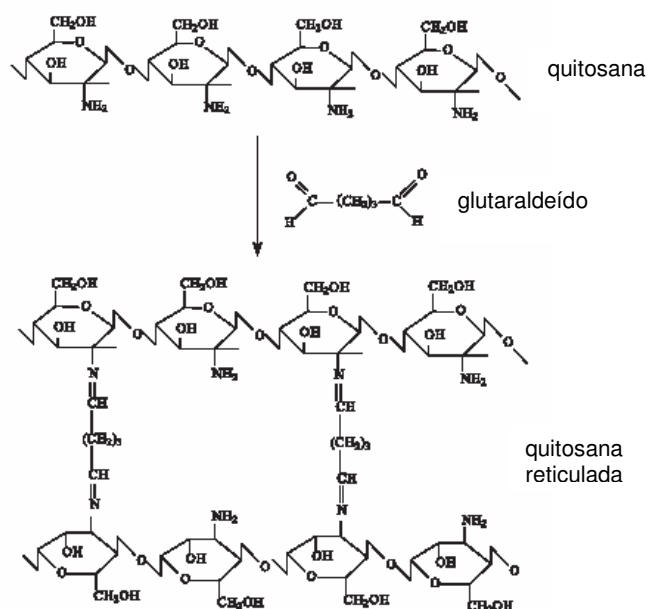


Figura 5 – Esquema da reação de reticulação da quitosana com glutaraldeído.

Gupta e Jabrail (2006)⁵⁷ prepararam microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído e glicoxal e observaram que a reticulação com glicoxal originou microesferas mais hidrofóbicas e compactas, capazes de sustentar a liberação do fármaco por um período de tempo maior. Resultados semelhantes foram obtidos por Anal e colaboradores (2006)⁵⁸, em que microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato foram capazes de prolongar a liberação da ampicilina. Da mesma maneira, Yuan e colaboradores (2007)⁵⁶ observaram que microesferas de quitosana não reticulada liberaram a albumina bovina muito mais rapidamente do que as microesferas reticuladas com genipina e que o grau de reticulação da quitosana depende da concentração do reticulante e do tempo de reticulação.

Micropartículas de quitosana também vêm sendo preparadas em associação com outros polímeros, como PLGA⁵⁹, alginato⁶⁰ e etilcelulose⁶¹. Shih e colaboradores (2007)⁵³ prepararam micropartículas de PHB/quitosana em diferentes composições (1:1, 3:1 e 5:1) através da técnica de emulsão/evaporação do solvente simples e múltipla. Através de ensaios de difração de raios-X, os autores evidenciaram a presença de um pico que não pertencia ao padrão de nenhum dos componentes isolados e atribuíram este evento a um produto formado pelas ligações cruzadas entre o PHB e a quitosana. Estudos de incorporação e liberação de fármacos não foram realizados.

Alguns estudos relacionados à caracterização de blendas de quitosana e PHB já foram realizados. Como exemplo pode-se citar o trabalho de Ikejima e Inoue (2000)⁶², que prepararam filmes contendo estes polímeros em diferentes proporções e observaram que ocorreu um decréscimo significativo do grau de cristalinidade do PHB na presença de quitosana devido à formação de ligações de hidrogênio entre os grupos carbonila do PHB e os grupos hidroxila e amina da quitosana. Além disso, estudos de biodegradabilidade dos filmes evidenciaram que o sistema PHB/quitosana degradou mais rapidamente do que aqueles contendo apenas quitosana.

3.6 Piroxicam e cetoprofeno

O piroxicam e o cetoprofeno (Figura 6) são fármacos antiinflamatórios não-esteroidais utilizados principalmente no tratamento da osteoartrite e artrite reumatóide, artrite idiopática juvenil, gota e outros processos inflamatórios e dolorosos. Dependendo do uso proposto, podem ser administrados por via oral, retal, ocular, intramuscular ou tópica^{63,64}.

O cetoprofeno ($pK_a = 4,6$) e o piroxicam ($pK_a = 6,3$) são ácidos fracos e possuem baixa solubilidade em água, a qual é dependente do pH do meio. Kallinteri e colaboradores (2001)⁶⁵ avaliaram a solubilidade do piroxicam em soluções aquosas com diferentes valores de pH (3,7; 5,0 e 7,0) e evidenciaram que a solubilidade do piroxicam aumenta gradativamente com o aumento do pH. O cetoprofeno apresenta um comportamento semelhante. A solubilidade de saturação desse fármaco em tampão pH 4,0, a 37 °C, é de 0,28 mg mL⁻¹, a qual aumenta para 3,68 mg mL⁻¹ em pH 6,0⁶⁶.

O piroxicam apresenta polimorfismo, podendo apresentar-se sob diferentes formas:

- duas formas polimórficas denominadas α e β (I), as quais possuem a mesma estrutura intramolecular, mas diferentes ligações de hidrogênio intra e intermolecular;
- a forma pseudopolimórfica de monoidrato (II), onde o hidrogênio enólico é transferido ao nitrogênio do grupo piridina, sendo obtida a partir da precipitação do fármaco em água^{67,68}.

A solubilidade das formas polimórficas do piroxicam também apresentam diferenças. De acordo com Vrečer (2003)⁶⁹, a forma de monoidrato apresenta menor solubilidade em meio aquoso (pH 1,2) do que as formas α e β . Por outro lado, estudos da cinética de dissolução realizados em suco gástrico artificial mantido à temperatura de $37\pm 0,5$ °C e velocidade de agitação de 100 rpm demonstraram que a forma de monoidrato apresenta uma velocidade de dissolução maior do que as formas polimórficas α e β .

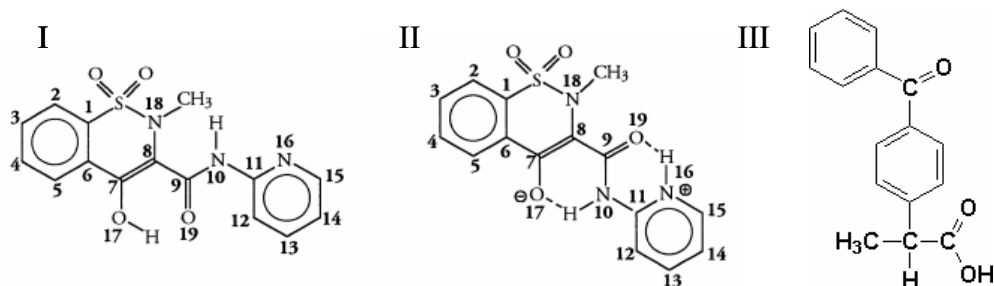


Figura 6 – Estrutura química das diferentes formas polimórficas do piroxicam (I, II) e do cetoprofeno (III).

Microesferas contendo piroxicam vêm sendo preparadas a partir de diferentes polímeros, como PLG⁷⁰, polianidrido¹⁹ e policarbonato⁶³, visando controlar a sua liberação através das vias oral, ocular e intramuscular.

O cetoprofeno apresenta um curto tempo de meia-vida plasmática e deve ser administrado 3 ou 4 vezes ao dia para a manutenção dos níveis plasmáticos. Com o objetivo de prolongar a liberação por via oral e, conseqüentemente, diminuir a frequência das administrações diárias e minimizar os efeitos adversos, este fármaco vem sendo incorporado em micropartículas utilizando polímeros como etilcelulose e carboximetilcelulose⁷¹, polimetacrilatos⁷² e poli(dimetil dialil cloreto de amônio)/poli (estirenosulfonato) [PDDA/PSS]⁷³.

CAPÍTULO 4

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE PHB CONTENDO PIROXICAM OU CETOPROFENO

Nesta primeira parte do trabalho foram preparadas microesferas de PHB contendo piroxicam ou cetoprofeno como fármacos modelo, através da técnica de emulsão-evaporação do solvente O/A. Ensaios preliminares evidenciaram uma grande dificuldade em encapsular o piroxicam através do método proposto. Sendo assim, a avaliação das condições do processo para a obtenção de altos valores de eficiência de encapsulação desse fármaco foi considerada uma interessante meta a ser alcançada, cujo planejamento fatorial direcionou os experimentos a serem realizados.

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Materiais

PHB ($M_n = 312.800 \text{ g mol}^{-1}$ e grau de polidispersão de 1,23, determinado através de cromatografia de permeação em gel) foi gentilmente cedido pela PHB Industrial (Serrana, SP). O piroxicam foi obtido da Deg Imp. de Produtos Químicos (São Paulo, SP), o cetoprofeno da All Chemistry (São Paulo, SP) e o poli(álcool vinílico) (massa molar de $92.000 \text{ g mol}^{-1}$, conforme especificação do fabricante) da Vetec (Rio de Janeiro, RJ). Isopropanol (Nuclear), diclorometano (Tedia Company) e clorofórmio (Nuclear) foram utilizados sem nenhuma purificação. Para as análises de espectrofotometria utilizou-se clorofórmio grau UV/HPLC (Vetec) e para o preparo do tampão fosfato pH 7,4 utilizou-se fosfato de sódio (Nuclear) e hidróxido de sódio (Merck).

4.1.2 Obtenção das microesferas de PHB/PXC

As microesferas de PHB/PXC foram preparadas através da técnica de emulsão e evaporação do solvente O/A, conforme representado na Figura 7.

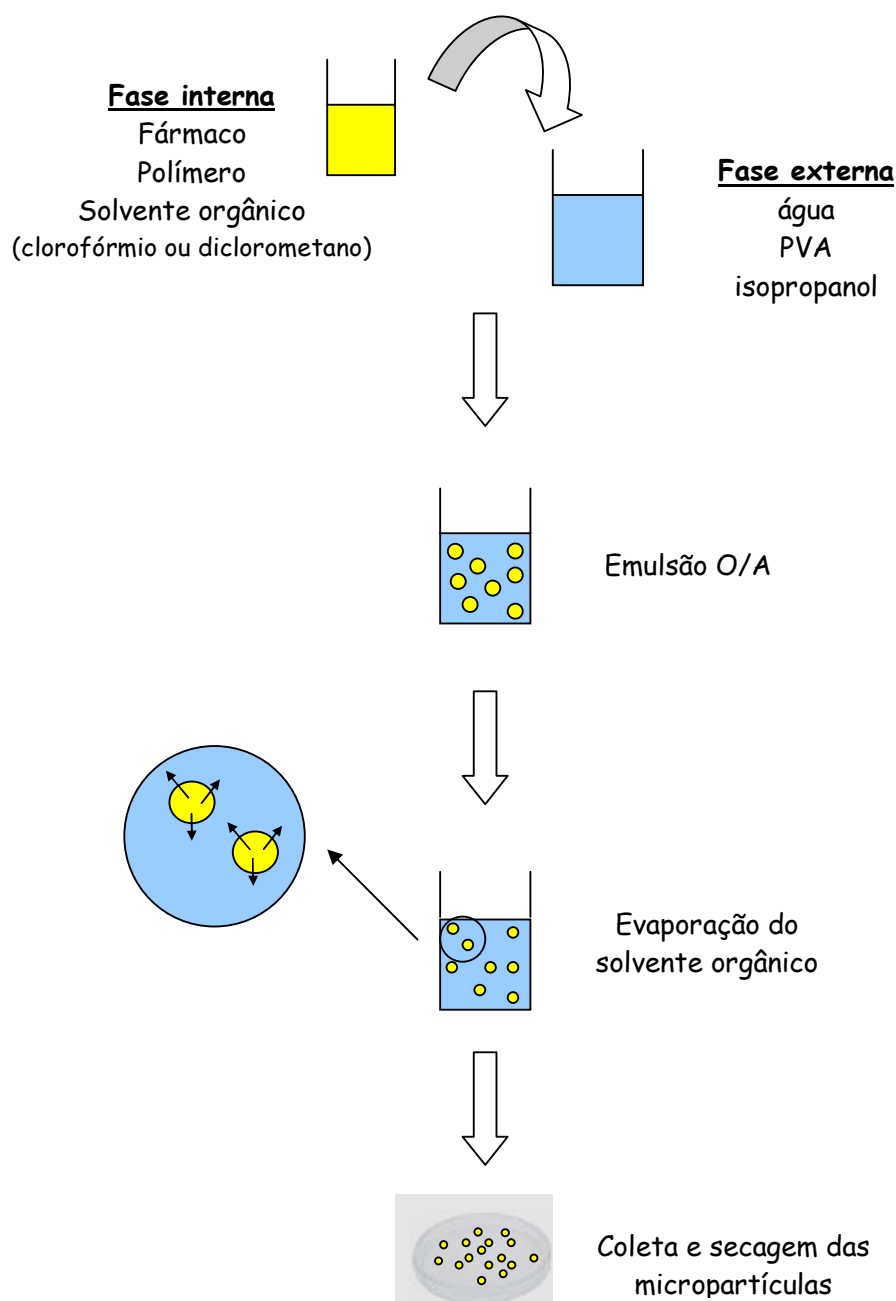


Figura 7. Esquema de obtenção das microesferas através do método de emulsão e evaporação do solvente O/A.

O polímero (500 mg) e o fármaco (200 mg) foram solubilizados no solvente orgânico (fase interna) e então emulsificados em 200 mL de uma solução aquosa contendo 0,15 % (p/v) de PVA como estabilizante e 6 % (v/v) de isopropanol (fase externa). A emulsão foi mantida sob agitação, em um agitador magnético com velocidade de 700 rpm, à temperatura ambiente, até a completa evaporação do solvente orgânico. As micropartículas foram lavadas com água destilada, decantadas, secas em estufa a vácuo à temperatura ambiente e armazenadas em dessecador.

Alíquotas da emulsão foram coletadas após a adição da fase interna à fase externa, em diferentes tempos do processo, colocadas sobre uma lâmina de vidro e em seguida observadas e fotografadas em microscópio óptico Zeiss Axiostar Plus MC 80 DX.

Com o objetivo de avaliar a influência de algumas condições do processo sobre a eficiência de encapsulação do PXC, foi elaborado um planejamento fatorial do tipo 2^3 . Na Tabela 1 encontram-se descritas as variáveis independentes e os níveis investigados. Os oito experimentos, elaborados de acordo com este planejamento fatorial, estão descritos na Tabela 2. Os resultados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, utilizando o software GraphPad Prism[®].

Tabela 1 – Variáveis independentes e seus níveis investigados no preparo das micropartículas de PHB contendo PXC.

Variáveis independentes	Menor nível (-)	Maior nível (+)
Tipo de solvente orgânico da fase interna (A)	clorofórmio	diclorometano
Volume do solvente orgânico da fase interna (B)	5 mL	20 mL
Adição de isopropanol à fase externa (C)	sim	não

Tabela 2 – Experimentos realizados de acordo com o planejamento fatorial 2³.

Formulação	Fase interna		Fase externa aquosa
	Solvente orgânico	Volume (mL)	Adição de isopropanol
1	clorofórmio	20	não
2	clorofórmio	5	não
3	clorofórmio	20	sim
4	clorofórmio	5	sim
5	diclorometano	20	não
6	diclorometano	5	não
7	diclorometano	20	sim
8	diclorometano	5	sim

4.1.3 Obtenção das microesferas de PHB/CET

Microesferas de PHB contendo cetoprofeno foram preparadas através da técnica de emulsão-evaporação do solvente O/A descrita no item anterior, utilizando as condições descritas para as formulações 5 e 7 (Tabela 2).

4.1.4 Determinação do teor de fármaco e da eficiência de encapsulação

Para a determinação do teor de PXC e CET nas micropartículas foi utilizado o método de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta. Foram pesadas micropartículas que correspondessem a uma massa conhecida de fármaco (da ordem de 10 mg), considerando-se uma eficiência de encapsulação de 100 %. Após a adição de 10 mL de clorofórmio, as amostras foram mantidas em frascos vedados, sob agitação, até a solubilização do polímero e do fármaco. Em seguida, a solução foi diluída até a concentração estimada de 10 mg L⁻¹ e a absorbância determinada em 327 nm para o PXC e 254 nm para o CET, utilizando clorofórmio como branco. O teor de fármaco nas microesferas foi calculado a partir de uma curva de calibração.

A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada através da Equação 1:

$$EE\% = \frac{\text{quantidade de fármaco encapsulada}}{\text{quantidade total de fármaco adicionada}} \times 100 \quad (1)$$

4.1.5 Avaliação da morfologia das micropartículas

A morfologia da superfície externa das micropartículas foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Amostras de cada formulação foram fixadas em um suporte metálico, recobertas com uma fina camada de ouro e observadas em microscópio eletrônico Philips XL30.

Para avaliação da morfologia interna das micropartículas, foram utilizados dois procedimentos: i) as micropartículas foram congeladas em nitrogênio líquido e um corte transversal foi obtido com o auxílio de uma lâmina; ii) as amostras foram inseridas em uma resina de glicerol poliglicidil éter (PELCO® Eponate 12™). Em seguida, foram obtidos cortes ultrafinos com faca de diamante, utilizando um crioultramicrotomo Leica, na temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras foram recobertas com uma camada de carbono e ouro, em metalizador Bal-Tec MD 020 (Balzers). A morfologia das partículas foi examinada em microscópio eletrônico de varredura com fonte de emissão de campo (Jeol JSM-6340F) operado com voltagem de aceleração de 3 kV.

4.1.6 Avaliação do diâmetro das micropartículas

O diâmetro médio das micropartículas foi determinado após a medição das partículas visualizadas nas micrografias ampliadas, através do diâmetro de Martin, que corresponde ao comprimento do segmento do perímetro projetado da partícula⁷⁴. No caso das partículas não esféricas, padronizou-se a medida do maior diâmetro.

4.1.7 Calorimetria exploratória diferencial

Amostras dos fármacos, do polímero puro e das micropartículas foram submetidas a ensaios de calorimetria exploratória diferencial (DSC), assim como uma amostra de piroxicam monodrato. Essa forma foi obtida experimentalmente, adicionando-se uma determinada quantidade do fármaco a um recipiente contendo água destilada e, após 24 h, o fármaco foi coletado e seco à temperatura ambiente.

Utilizou-se um equipamento DSC-50, da marca SHIMADZU, calibrado com índio ($T_m = 156,6\text{ }^{\circ}\text{C}$). Uma massa conhecida das amostras foi colocada em cadinho

de alumínio e aquecida a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL min^{-1} .

4.1.8 Difração de Raios-X de pó

O estado físico do piroxicam nas micropartículas foi avaliado utilizando um difratômetro de raios-X Philips X'Pert com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.54056\text{ \AA}$), na faixa de 5° a 35° , com passo de $0,05^{\circ}$ e tempo de 1 s.

4.1.9 Distribuição do tamanho de poros

As isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram coletadas em um equipamento Quantachrome Autosorb, após as amostras serem submetidas à temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob vácuo, durante 4 h. A distribuição do tamanho de poros foi calculada de acordo com o método proposto por Barret, Joyner e Hallenda (BJH), através das isotermas de adsorção.

4.1.10 Perfil de liberação do fármaco *in vitro*

Micropartículas contendo o equivalente a 45 mg de fármaco foram colocadas em frascos vedados, seguido da adição de 30 mL de tampão fosfato pH 7,4 (condição sink) e mantidas em banho-maria Yamato BT25, a $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob agitação. Em intervalos pré-determinados, foram retiradas alíquotas de 4 mL e igual volume de tampão foi repostado. A concentração de PXC e CET no meio foi determinada através de espectrofotometria de absorção na região do UV, em $\lambda_{\text{máx}} = 360\text{ nm}$ para o PXC e $\lambda_{\text{máx}} = 260\text{ nm}$ para o CET. Utilizando uma curva de calibração (faixa de concentração de $1,0$ a $20,0\text{ mg L}^{-1}$ de fármaco), calculou-se a percentagem de PXC e CET liberada para o meio em função do tempo. Após o término do ensaio, as micropartículas foram lavadas com água destilada, centrifugadas (centrífuga Sorvall RT 6000B), secas em estufa a vácuo e caracterizadas quanto à morfologia e distribuição do tamanho de poros, conforme descrito anteriormente.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Determinação do teor de fármaco e da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação de fármacos no interior de micropartículas poliméricas preparadas através da técnica de emulsão-evaporação do solvente depende das características físico-químicas do fármaco e do polímero, bem como das condições utilizadas no processo, como o tipo e volume dos solventes das fases interna e externa da emulsão, a proporção fármaco/polímero, o tipo e concentração do estabilizante, entre outros.

A eficiência de encapsulação e o teor de PXC nas micropartículas preparadas de acordo com o planejamento fatorial encontram-se descritos na Tabela 3. O aumento da viscosidade da solução devido à utilização de um menor volume de solvente orgânico (formulações 2, 4, 6 e 8 – Tabela 2) levou à obtenção de maiores valores de EE% em relação às demais formulações. Resultados semelhantes foram obtidos por Yang e colaboradores ao prepararem microesferas de PDLLA contendo albumina bovina. Maiores valores de EE% foram obtidos quando a concentração do polímero na fase interna da emulsão foi aumentada, sendo justificada pela formação de gotículas mais densas as quais dificultaram a difusão da albumina bovina para a fase externa, originando elevados valores de EE%.⁷⁵

Através da análise de variância (Tabela 4), pôde-se verificar que as variáveis estudadas influenciaram a eficiência de encapsulação do PXC ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$; $\alpha = 0,05$). A aplicação do teste de Tukey ($dms = 17,7$) para comparar os valores de EE% indicou que o aumento do volume do solvente orgânico de 5 para 20 mL originou um decréscimo significativo na eficiência de encapsulação do PXC (formulações 1, 3 e 5 – Tabela 2), exceto quando se utilizou diclorometano como solvente da fase interna e isopropanol foi adicionado à fase externa (formulação 7). Nesse caso, a adição de isopropanol como co-solvente aumentou a solubilidade do diclorometano na fase aquosa, facilitando a sua extração. A rápida eliminação do solvente orgânico contribuiu para acelerar a solidificação das micropartículas e, conseqüentemente, dificultar a migração do PXC para a fase externa, promovendo a sua encapsulação no interior das partículas. A adição de um co-solvente que tenha elevada afinidade pela fase externa promove a rápida eliminação do solvente da

fase interna, pois atua como um agente extrator, aumentando a solubilidade do solvente volátil na fase externa³².

Tabela 3. Eficiência de encapsulação e teor de piroxicam nas micropartículas de PHB.

Formulação	Eficiência de encapsulação (%)	Teor de fármaco (mg %)
1	10,6 ± 1,8	3,2 ± 0,5
2	89,8 ± 4,3	25,8 ± 1,2
3	10,0 ± 1,8	2,7 ± 0,5
4	53,4 ± 10,5	15,4 ± 3,1
5	5,5 ± 3,3	1,6 ± 0,9
6	61,4 ± 1,0	19,9 ± 0,2
7	57,7 ± 2,4	16,6 ± 0,7
8	71,0 ± 2,5	21,4 ± 0,5

Tabela 4. Resultados da análise de variância obtidos utilizando os valores de eficiência de encapsulação como variável dependente.

	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F
A	251,22	251,22	12,61*
B	9235,21	9235,21	463,44*
C	152,52	152,52	7,65*
Interação AB	742,56	742,56	37,26*
Interação AC	2470,09	2470,09	123,95*
Interação BC	1572,12	1572,12	78,89*
Interação ABC	10,24	10,24	0,514
Resíduo	159,42	19,93	
Total	14593,39		

A (tipo de solvente orgânico: diclorometano ou clorofórmio); B (volume do solvente orgânico: 5 mL ou 20 mL); C (adição de isopropanol à fase externa aquosa: sim ou não). F_{tab} (DF = 1;8) = 5,32 ($\alpha = 0,05$). *significativo para $\alpha = 0,05$.

A Figura 8-A mostra as gotículas do solvente orgânico contendo o PXC e o polímero solubilizados, correspondendo ao início do processo de preparação das microesferas. Após 1 h houve uma redução do tamanho das gotículas em virtude da evaporação do solvente, sendo possível observar alguns cristais de fármaco próximos à superfície das gotículas, conforme indicados pelas setas inseridas na Figura 8-B e com maior aumento na Figura 8-C. Na região próxima às microesferas solidificadas foram observados diversos cristais de PXC não encapsulados, conforme mostrado na parte aumentada que se encontra inserida na Figura 8-D. Esses cristais de fármaco não encapsulados originados durante a difusão do solvente orgânico para a fase aquosa foram removidos durante a etapa de lavagem das micropartículas, originando os baixos valores de EE%.

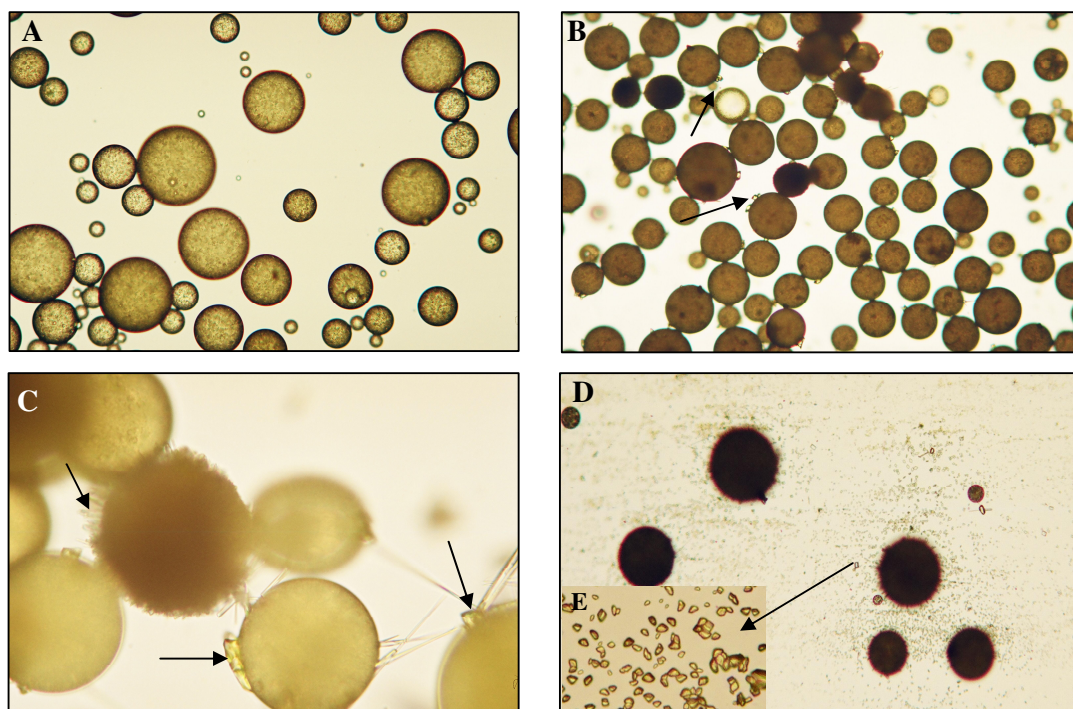


Figura 8 – Fotografias de microscopia óptica ilustrando diferentes tempos do processo de preparo das micropartículas de PHB/PXC (formulação 5): A (início do processo, aumento de 100X); B (após 1 h de agitação, aumento de 100X); C (após 1 h de agitação, aumento de 400X); D (final do processo, aumento de 100X); E (final do processo, aumento de 400X). As setas indicam os cristais de fármaco não encapsulado.

O planejamento fatorial empregado neste estudo teve como objetivo selecionar as condições do processo que possibilitassem uma maior eficiência de encapsulação do PXC no interior das micropartículas de PHB. Através dos

resultados apresentados na Tabela 3, as formulações 2 e 7 foram selecionadas para a continuação dos ensaios. Essas formulações serão identificadas, a partir de agora, como F2 e F7. Embora utilizando as formulações 4, 6 e 8 tenha sido possível obter altos teores de fármaco encapsulado, as mesmas foram excluídas em virtude de apresentarem-se na forma de grandes aglomerados.

Uma vez otimizadas as condições do processo para a obtenção das micropartículas de PHB contendo PXC, foram empregadas as condições descritas nas formulações 5 e 7 para preparar as microesferas contendo CET, pois estas condições levaram à obtenção de micropartículas com características morfológicas adequadas. Os resultados mostrados na Tabela 5 indicam que, de maneira análoga ao que ocorreu com o PXC, uma maior quantidade de CET foi encapsulado quando isopropanol foi adicionado à fase externa. No entanto, utilizando as condições descritas na formulação 5, maiores valores de eficiência de encapsulação foram obtidos quando o CET foi empregado como fármaco modelo, apesar desse fármaco apresentar uma maior solubilidade aquosa do que o PXC^{19,66}. Nas fotografias da emulsão em diferentes tempos do processo de preparo das microesferas (Figura 9) não foram observados cristais de CET na fase aquosa após a evaporação do diclorometano, indicando que a perda de fármaco para o meio externo ocorreu predominantemente pela solubilização do CET no meio, ao contrário do que ocorreu quando o PXC foi utilizado como fármaco modelo.

Por apresentarem maiores teores de fármaco encapsulado, as micropartículas obtidas a partir da formulação F7 foram selecionadas para a continuação dos ensaios e serão designadas por microesferas PHB/CET.

Tabela 5. Eficiência de encapsulação e teor de cetoprofeno nas microesferas de PHB.

Formulação	Eficiência de encapsulação (%)	Teor de fármaco (mg %)
5	38,7 ± 3,6	11,1 ± 0,5
7	56,6 ± 1,1	18,6 ± 0,2

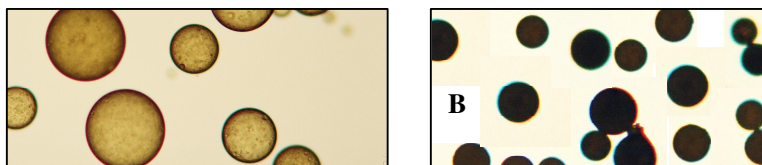


Figura 9 – Fotografias de microscopia óptica ilustrando diferentes tempos do preparo das micropartículas de PHB/CET (formulação 5): A (início do processo, aumento de 100X); B (final do processo, aumento de 100X).

4.2.2 Caracterização das micropartículas

4.2.2.1 Morfologia

Na Figura 10 encontram-se as micrografias das micropartículas obtidas a partir da formulação F2, as quais apresentaram formas irregulares, interior oco e tamanho médio de $487 \pm 89 \mu\text{m}$. Cristais de PXC aderidos à superfície dessas partículas foram observados nas micrografias com maior aumento (Figura 10-B).

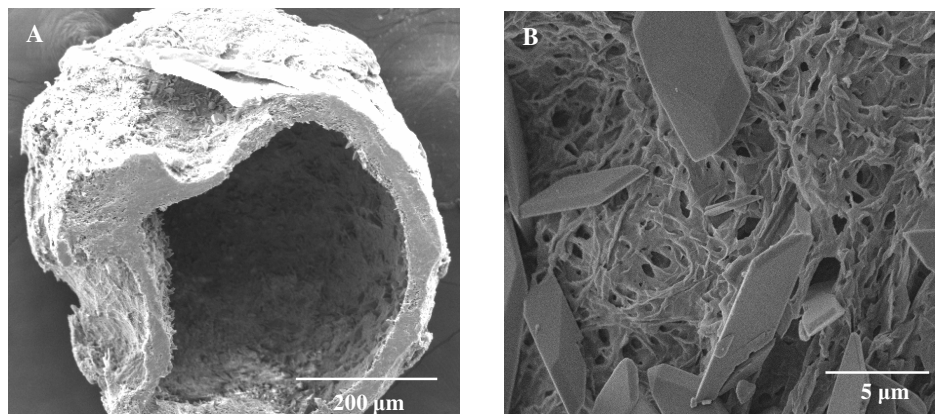


Figura 10 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de PHB/PXC obtidas a partir da formulação F2: A (corte transversal) e B (superfície).

Por outro lado, as microesferas provenientes da formulação F7 apresentaram forma esférica, diâmetro médio de $31,1 \pm 9,2 \mu\text{m}$ e superfície externa rugosa (Figura 11-A). No interior destas partículas observou-se a predominância de uma matriz polimérica densa e algumas pequenas cavidades (Figura 11-B). Não foram observados cristais de PXC aderidos à superfície dessas partículas utilizando um maior aumento (Figura 11-C). Segundo Martin e colaboradores, a rugosidade da matriz polimérica está relacionada ao elevado grau de cristalinidade do PHB e é normalmente observada em microesferas de PHB preparadas através da técnica de emulsão-evaporação do solvente³.

As diferenças no tamanho médio das partículas podem ser associadas à concentração de PHB na fase interna da emulsão. Quando se utilizou um menor volume de solvente orgânico na formulação F2, a solução contendo o fármaco e o polímero tornou-se mais viscosa e, conseqüentemente, mais resistente à fragmentação em pequenas gotículas durante a agitação, originando micropartículas com maior tamanho.

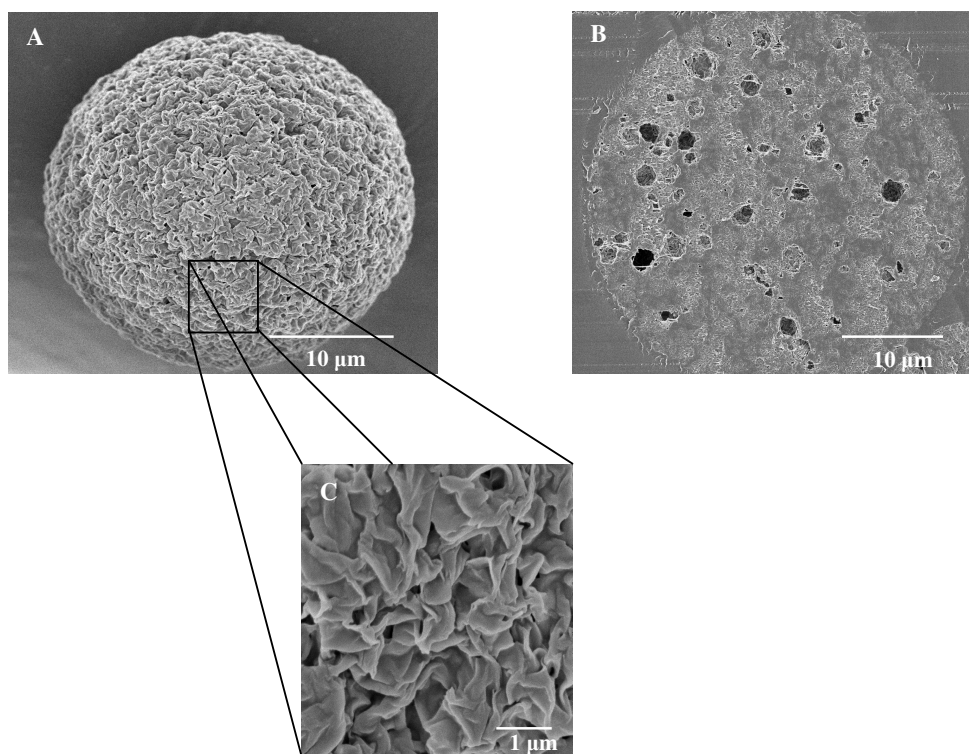


Figura 11 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de PHB/PXC obtidas a partir da formulação F7: A (microesfera), B (corte da micropartícula inserida em uma resina) e C (superfície com maior aumento).

As curvas de distribuição do tamanho de poros obtidas a partir do método BJH (Figura 12), mostraram a predominância de poros com dimensões da ordem de 25 Å nas micropartículas obtidas a partir da formulação F2 e da ordem de 20 Å nas microesferas F7. Poros com maiores dimensões, na faixa de 30 a 40 Å, também foram observados nessas micropartículas. A rápida evaporação do solvente é um parâmetro relacionado ao processo de encapsulação que favorece a formação de poros na matriz⁷⁶. Neste caso, a adição de isopropanol acelerou a extração do diclorometano, fato que pode ter contribuído para a formação dos poros.

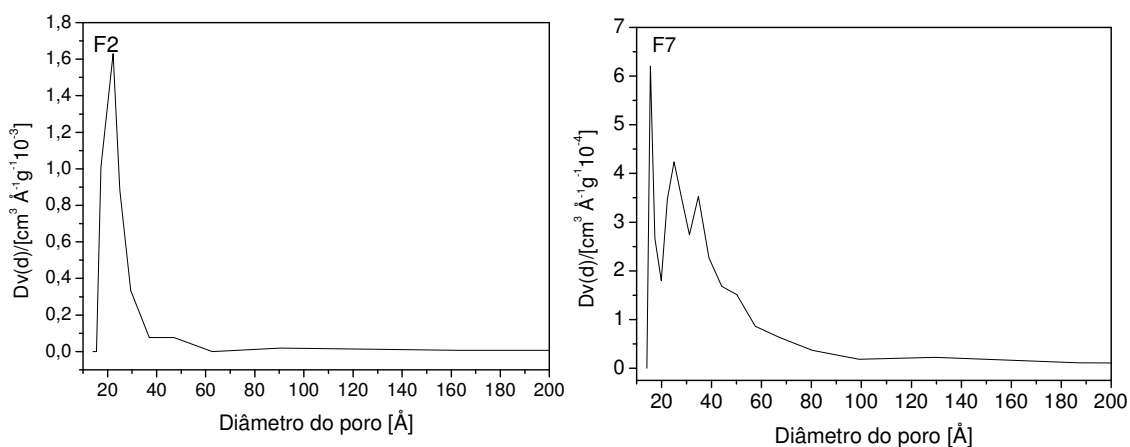


Figura 12 – Curvas de distribuição de tamanho de poros calculadas a partir do método BJH das micropartículas obtidas a partir das formulações F2 e F7. $Dv(d)$ corresponde à derivada da função que descreve o volume em função do diâmetro do poro.

As microesferas de PHB/CET apresentaram características morfológicas semelhantes às de PHB/PXC (F7), pois foram elaboradas utilizando as mesmas condições experimentais (formulação 7). Micropartículas esféricas, com ausência de cristais de fármaco aderidos à superfície externa e tamanho médio de $32,5 \pm 11,2$ μm podem ser visualizadas nas micrografias (Figura 13).

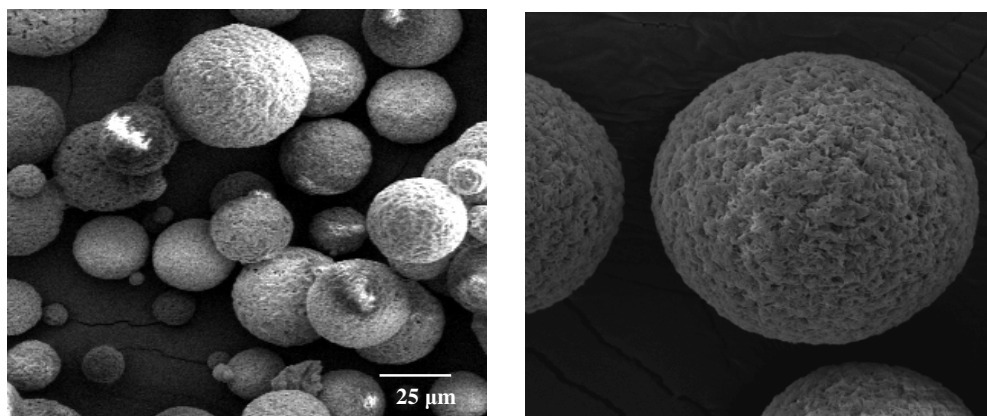


Figura 13 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de PHB/CET.

4.2.2.2 Calorimetria exploratória diferencial e difração de raios-X

Análises de calorimetria exploratória diferencial e difração de raios-X de pó foram realizadas com o objetivo de avaliar a ocorrência de alterações no grau de cristalinidade do PHB e dos fármacos, bem como alterações das formas polimórficas do PXC. O piroxicam pode apresentar-se de três diferentes formas: α (agulha), β (cúbica) ou monoidrato^{67,69}. A cinética de cristalização e a polaridade dos solventes utilizados determinam a cristalização do fármaco em cada uma destas formas⁶⁹.

As curvas DSC do PHB, dos fármacos e das micropartículas são mostradas na Figura 14. O PHB apresenta duas temperaturas de fusão, a 166 °C e 176 °C, o CET a 97 °C e o PXC a 204 °C. No entanto, quando esse fármaco foi mantido em meio aquoso durante 24 h, um pico em 122 °C foi observado, o qual corresponde à desidratação da forma de monoidrato⁶⁹.

Nas curvas DSC das micropartículas de PHB/PXC (F2 e F7) observa-se apenas um evento endotérmico correspondente ao processo de fusão, deslocado para uma temperatura mais baixa em relação à temperatura de fusão dos componentes puros. A ausência do pico de fusão do fármaco na temperatura de 204 °C poderia ser um indicativo de que o PXC estaria molecularmente disperso na matriz polimérica, na forma amorfa. No entanto, os difratogramas das

micropartículas F2 e F7 (Figura 15-C e D) mostram picos em 2θ igual a $12,0^\circ$ e $26,5^\circ$, evidenciando a presença de PXC na forma cristalina. Além disso, cristais do fármaco foram observados nas micrografias da superfície das micropartículas F2. Os valores de entalpia de fusão dos componentes puros e das microesferas, apresentados na Tabela 6, sugerem que o PXC está fundindo na mesma faixa de temperatura do polímero, uma vez que o ΔH_f do evento endotérmico presente na curva DSC das micropartículas é igual ao somatório do ΔH_f dos componentes isolados, considerando a proporção de PHB/PXC presente nas microesferas.

A presença do pico em 122°C na curva DSC e os picos característicos do PXC monoidrato no difratograma das micropartículas F2 e F7 (2θ igual a $12,0^\circ$ e $26,5^\circ$) evidenciam a presença de PXC nesta forma polimórfica, indicando que as condições utilizadas no processo de microencapsulação favoreceram a conversão do PXC para a forma de monoidrato.

Na curva DSC das micropartículas de PHB/CET é possível observar os picos de fusão característicos do CET (96°C) e do PHB (164°C). A partir dos valores de entalpia de fusão (Tabela 6), tem-se uma diminuição do ΔH_f do CET presente nas micropartículas, em comparação ao ΔH_f do fármaco puro. A partir desses valores foi possível determinar o grau de cristalinidade do fármaco através da Equação 2. Uma diminuição acentuada da cristalinidade do CET presente nas microesferas foi observada, sendo determinado 14 % na forma cristalina. Resultados semelhantes foram obtidos por Ricci e colaboradores, quando incorporaram o cetoprofeno em microesferas de PLA⁷⁷.

$$X_c\% = 100 \times \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^o} \quad (2)$$

Onde:

$X_c\%$ é o grau de cristalinidade

ΔH_f é a entalpia de fusão do fármaco na microesfera

ΔH_f^o é a entalpia de fusão do fármaco puro

O grau de cristalinidade do PHB, calculado a partir da Equação 2, foi de 60,3%, tomando o valor de ΔH_f do PHB 100 % cristalino igual a 146 J g^{-1} , segundo Ikejima⁷⁸. Conforme descrito anteriormente, o PHB é caracterizado por apresentar elevado grau de cristalinidade quando comparado a outros poliésteres. Alterações na cristalinidade do polímero não ocorreram em decorrência do processo de microencapsulação, sendo o grau de cristalinidade do PHB igual a 58,2 % nas micropartículas preparadas apenas com o polímero (Tabela 6).

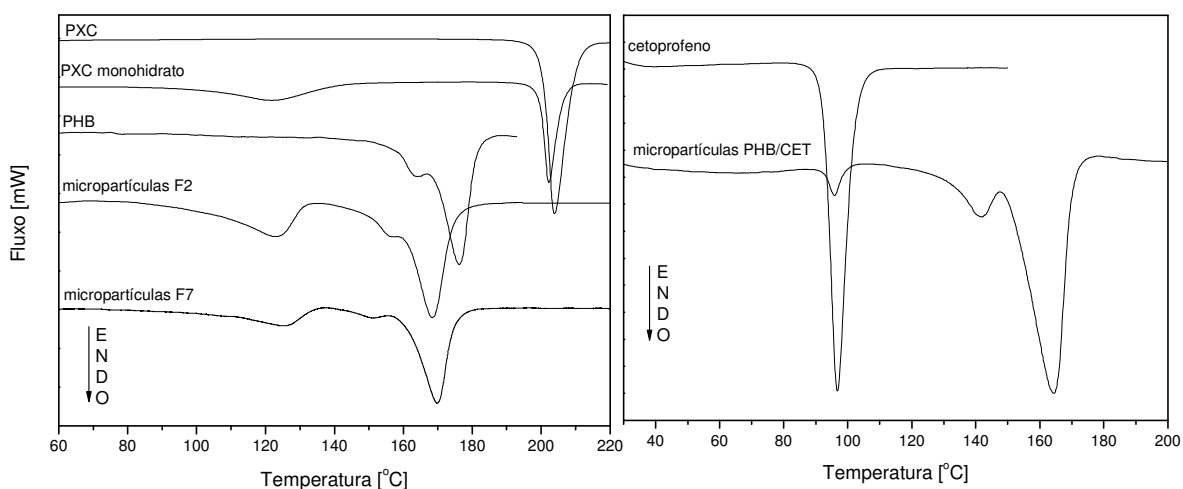


Figura 14 – Curvas de DSC do PHB, dos fármacos e das micropartículas.

Tabela 6 – Temperaturas e entalpias de fusão dos fármacos e do PHB.

	T_f (°C)	ΔH_f (Jg ⁻¹)
PXC	204	101,4
CET	97	108,0
PHB	177	88,0
Micropartículas PHB*	176	85,0
Micropartículas PHB/PXC (F2)	168	92,0
Micropartículas PHB/PXC (F7)	168	91,0
Micropartículas PHB/CET	96 ^a /164 ^b	15,1 ^a /88,4 ^b

* micropartículas de PHB, sem fármaco, preparadas utilizando as condições descritas na F7.
a = CET; b = PHB. O valor de ΔH_f foi calculado considerando a proporção de cada componente cristalino na mistura.

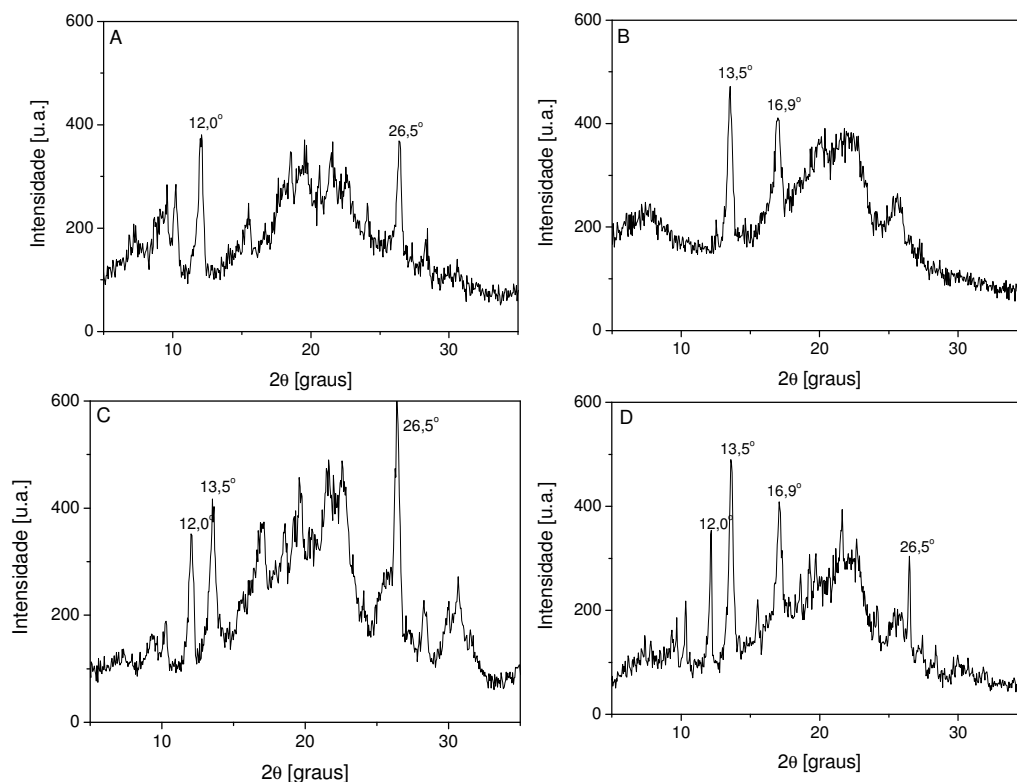


Figura 15 – Difractogramas do [A] PXC (forma monohidratada); [B] PHB e das micropartículas: [C] F2 e [D] F7.

4.2.2.3 Perfil de liberação do fármaco *in vitro*

A liberação de fármacos a partir de sistemas microparticulados depende das características da matriz polimérica (espessura, porosidade, capacidade de intumescimento), do tamanho das microesferas, da localização do ativo no interior das partículas, das propriedades físico-químicas do fármaco e do polímero, entre outros. Desta forma, a velocidade de liberação do fármaco a partir das micropartículas pode ser influenciada pela combinação de diversos fatores.

A Figura 16 apresenta o gráfico da porcentagem de fármaco liberado para o meio de dissolução em função do tempo. As micropartículas preparadas a partir das formulações F2 e F7 levaram aproximadamente 8 h e 50 h para liberar a totalidade do fármaco, indicando a maior eficiência das microesferas obtidas a partir da formulação F7 para prolongar a liberação do PXC.

Geralmente, quanto menor o diâmetro das partículas, menor é o caminho a ser percorrido pelo fármaco e, conseqüentemente, mais rápida é a sua liberação. No entanto, as micropartículas com menor tamanho (F7) foram capazes de prolongar a liberação do PXC durante um maior período de tempo, sugerindo que o fármaco está localizado preferencialmente no interior das partículas, conforme se observou nas micrografias, as quais não evidenciaram a presença de cristais de PXC na superfície. A rápida liberação do PXC a partir das micropartículas F2 está associado à presença de cristais de fármaco na sua superfície e também à estrutura oca destas partículas, o que facilitou a liberação do PXC.

A liberação do CET a partir das microesferas de PHB foi extremamente rápida, apresentando um efeito *burst* inicial, seguido da liberação de 85 % do fármaco após um período de 5 h. Nesse caso, além da facilidade de difusão do fármaco através dos poros da matriz deve-se considerar que a maior parte do CET encontrava-se disperso na matriz polimérica na forma amorfa. De maneira geral, as formas amorfas apresentam uma maior solubilidade do que as formas cristalinas, fato que pode ter contribuído para a liberação mais rápida do CET quando comparado ao PXC. Além disso, outros fatores devem ser considerados, como a possível localização do fármaco preferencialmente próximo à superfície das partículas e também a maior solubilidade do CET em tampão fosfato pH 7,4 (3,6 mg mL⁻¹) quando comparado ao PXC (0,2 mg mL⁻¹).

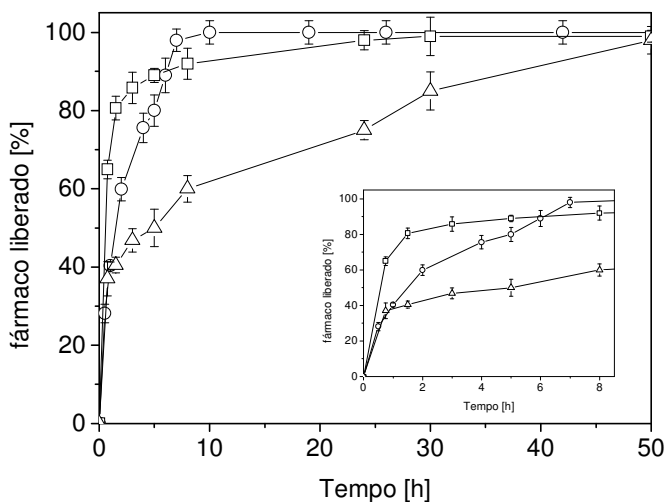


Figura 16 – Perfis de liberação dos fármacos a partir das micropartículas de PHB/PXC F2 (○) e F7 (△), e PHB/CET (□).

A liberação de fármacos a partir de micropartículas pode ocorrer por: i) difusão através dos poros da matriz polimérica, ii) difusão através de uma matriz hidrofílica intumescida, iii) erosão da matriz ou degradação do polímero.

As curvas de distribuição do tamanho de poros das micropartículas de PHB/PXC após o ensaio de liberação mostraram um pequeno aumento na intensidade e no tamanho dos poros comparado com as micropartículas antes do ensaio, conforme apresentado na Figura 17. Entretanto, esse aumento das dimensões dos poros é da ordem de ângstroms e as micropartículas apresentaram as mesmas características morfológicas antes e após o ensaio de liberação, sugerindo que o principal mecanismo envolvido na liberação dos fármacos é a difusão através dos poros da matriz polimérica. A micrografia do corte transversal da micropartícula preparada a partir da formulação F2 manteve a forma, dimensões e parede polimérica densa, conforme pode ser observado comparando-se as Figuras 18 e 10. Da mesma forma, as microesferas de PHB/PXC (F7) e de PHB/CET mantiveram as suas características morfológicas após a liberação dos fármacos.

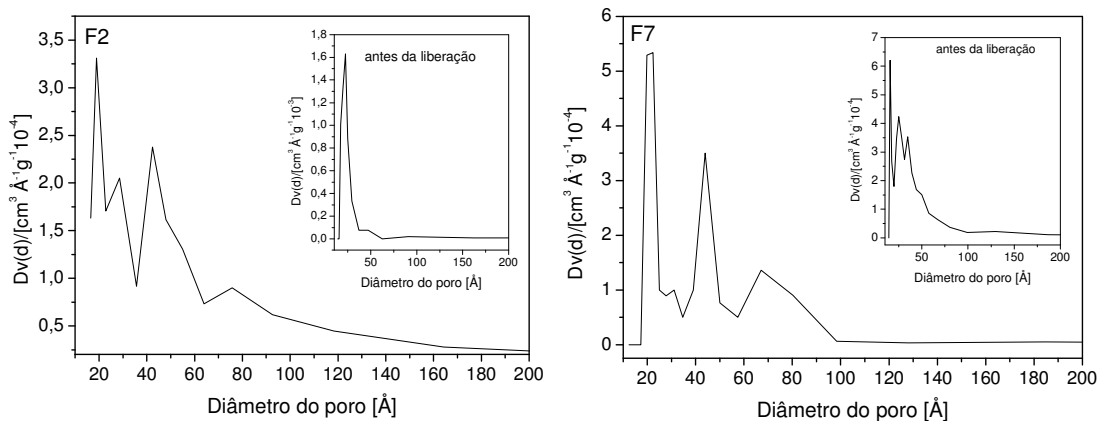


Figura 17 – Curvas de distribuição de tamanho de poros calculadas a partir do método BJH das micropartículas obtidas a partir das formulações F2 e F7 após o ensaio de liberação. Para comparação, são inseridos os gráficos obtidos antes do ensaio de liberação.

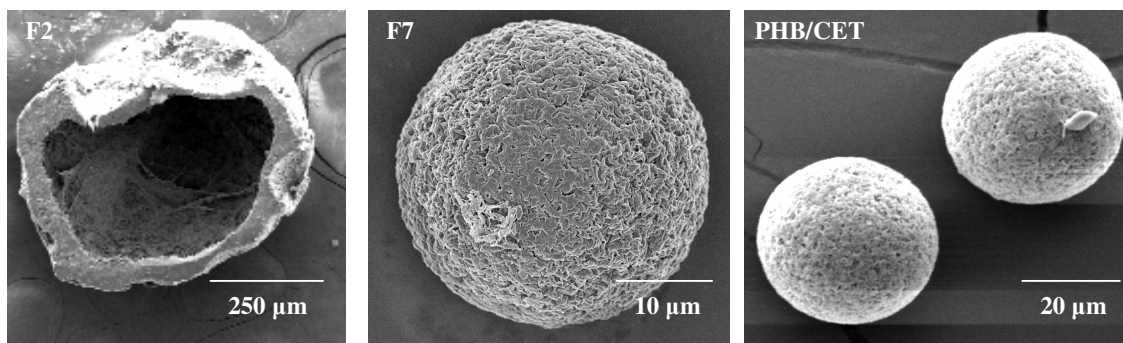


Figura 18 – Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das microesferas de PHB/PXC (F2 e F7) e de PHB/CET, após o ensaio de liberação.

Diversos modelos matemáticos foram desenvolvidos para auxiliar na elucidação do principal mecanismo envolvido na liberação do fármaco. A escolha dos modelos a serem aplicados depende principalmente das características do polímero e da matriz⁷⁹. Como o PHB é um polímero hidrofóbico e degrada lentamente *in vitro*, os fenômenos de difusão por intumescimento e erosão da matriz são desprezíveis.

O modelo matemático de Baker-Lonsdale descreve a liberação de um fármaco a partir de uma matriz esférica heterogênea por um processo de difusão e tem sido utilizado para linearizar resultados de ensaios de liberação de microesferas e microcápsulas. A descrição deste modelo a partir da Equação 3,

$$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = kt \quad (3)$$

onde k corresponde à constante de liberação, t ao tempo, M_t e M_∞ à quantidade de fármaco liberado no tempo “t” e no tempo infinito, respectivamente, será aplicável se houver correlação linear do primeiro termo da equação em função do tempo⁷⁹.

Na Figura 19 encontram-se as curvas obtidas após a linearização dos perfis de liberação através do modelo matemático descrito. Coeficientes de correlação linear próximos a 1 foram obtidos para as microesferas de PHB/PXC (F2 e F7) e PHB/CET, indicando que a difusão é o principal fenômeno envolvido na liberação do fármaco.

Os valores das constantes de velocidade de dissolução (k) inseridos na Figura 19 correspondem ao coeficiente angular das retas, conforme representado na Equação 3. A constante de velocidade de dissolução calculada para as microesferas PHB/PXC (F7) apresentou um valor cerca de dez vezes menor do que as demais ($k = 0,0067$), indicando que, nesse caso, a velocidade de liberação do fármaco ocorreu mais lentamente. Por outro lado, os valores obtidos para as microesferas de PHB/CET e PHB/PXC (F2), com valores de $k = 0,0753$ e $0,0512$, respectivamente, indicam que a velocidade de liberação do fármaco a partir dessas micropartículas foi maior do que para as microesferas F7. Estes dados concordam com os perfis de dissolução das microesferas de PHB/CET e PHB/PXC (F2) mostrados na Figura 16, as quais apresentaram um efeito *burst* mais pronunciado.

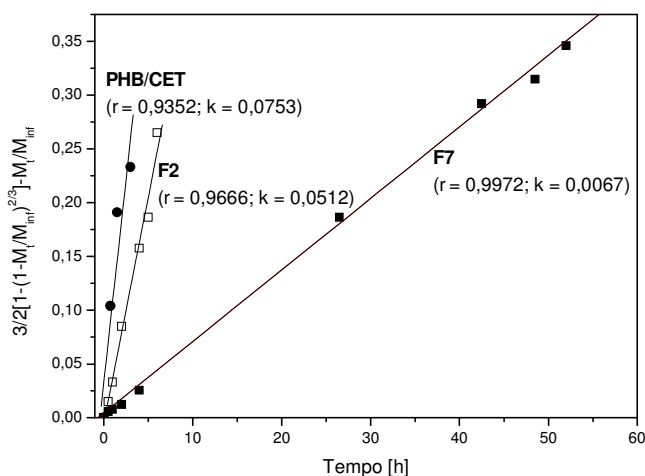


Figura 19 – Curvas obtidas após a linearização dos perfis de liberação de acordo com o modelo matemático de Baker-Lonsdale.

CONCLUSÕES PARCIAIS

Microesferas com diferentes características morfológicas e teores de fármaco encapsulado foram obtidas através da modificação de parâmetros do processo de microencapsulação. O emprego de 20 mL de diclorometano na fase interna da emulsão e a adição de isopropanol à fase aquosa levou à obtenção de micropartículas esféricas e maiores teores de PXC e CET encapsulado. Utilizando as mesmas condições experimentais, diferentes perfis de liberação foram obtidos em função do fármaco utilizado como modelo.

CAPÍTULO 5

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS COMPOSTAS DE PHB E QUITOSANA

O objetivo desta segunda parte do trabalho foi a preparação de micropartículas compostas contendo microesferas de PHB revestidas ou inseridas em uma matriz de quitosana, com o objetivo de obter um sistema de liberação que apresentasse um efeito *burst* menos pronunciado e que fosse capaz de prolongar a liberação dos fármacos por maiores períodos de tempo. Uma modificação do método de emulsão/evaporação do solvente foi proposta para a obtenção das micropartículas compostas. O efeito da concentração de quitosana e de reticulante sobre o efeito *burst* e o prolongamento da liberação do PXC e do CET foi avaliado.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Materiais

Quitosana de média massa molar ($1,14 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$, determinada através de viscosimetria e grau de desacetilação de 75%) foi obtida da Sigma Aldrich (USA) e o monooleato de sorbitano (Span 80) da Beraca (São Paulo, SP). Ácido acético glacial (Dinâmica, Diadema, SP), glutaraldeído (Nuclear, Diadema, SP), n-hexano (Ecibra, Santo Amaro, SP) e óleo mineral (Vetec, Rio de Janeiro, RJ) foram utilizados sem purificação prévia. Os demais reagentes utilizados são os mesmos descritos no Capítulo 4.

5.1.2 Preparo das micropartículas compostas

Micropartículas compostas foram preparadas através da técnica de emulsão sólido-água-óleo (S/A/O), conforme representado na Figura 20. Inicialmente preparou-se 25 mL de soluções de quitosana nas concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 % (p/v) em ácido acético 2 %. A estas soluções foram adicionadas microesferas de

PHB contendo piroxicam ou cetoprofeno, preparadas conforme descrito anteriormente (formulação 7), de forma que a proporção dos polímeros fosse mantida em 50/50 (m/m). Estas dispersões foram imediatamente adicionadas a 200 mL de óleo mineral contendo 2,0 % de Span 80 como estabilizante, em agitador magnético com agitação de 700 rpm. Amostras foram coletadas, colocadas sobre uma lâmina de vidro e observadas em microscópio óptico Zeiss Axiostar Plus MC 80 DX. Após a evaporação da fase aquosa, as micropartículas foram centrifugadas (centrífuga Sorvall RT 6000B), lavadas com n-hexano para a remoção da fase oleosa, secas em estufa a vácuo (Napco 5831) à temperatura ambiente e armazenadas em dessecador.

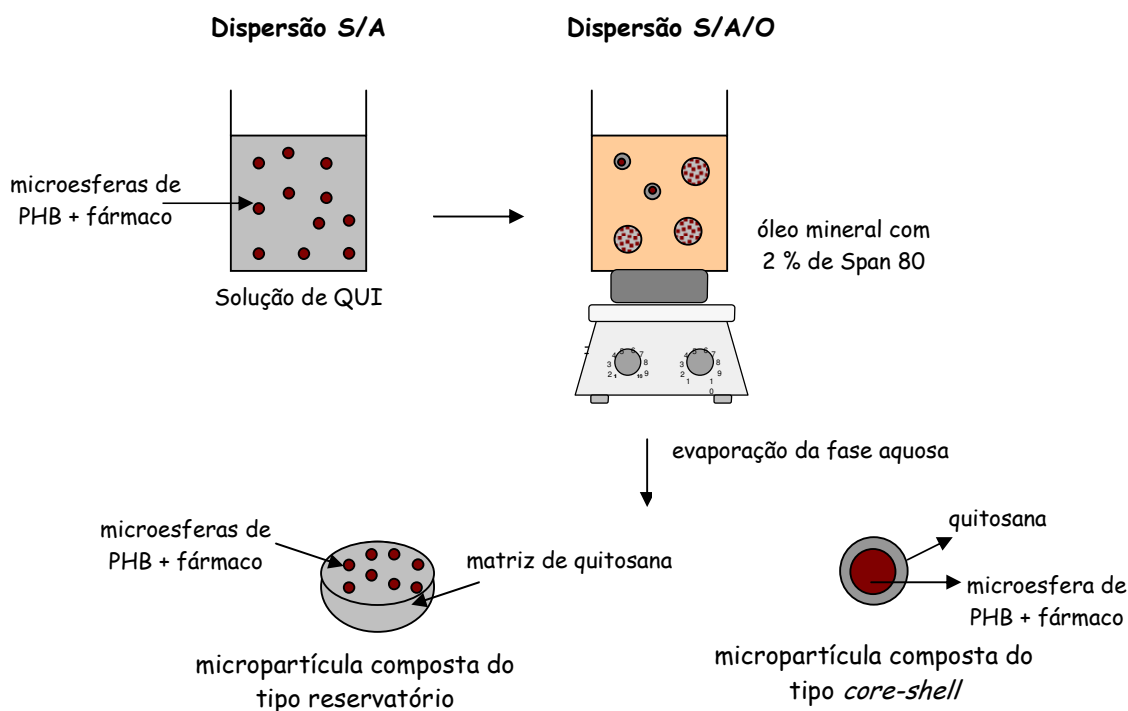


Figura 20 – Representação esquemática do processo de preparação sólido-água-óleo utilizado no preparo das micropartículas compostas.

5.1.3 Preparo das micropartículas reticuladas

A reticulação da quitosana com glutaraldeído foi realizada da seguinte maneira: uma quantidade de micropartículas compostas equivalente a 100 mg de quitosana foram mantidas em 25 mL de solução aquosa de glutaraldeído nas concentrações de 0,1 % e 1,0 % durante 1 h. As micropartículas foram lavadas com

água destilada para a remoção do glutaraldeído, secas em estufa a vácuo à temperatura ambiente e armazenadas em dessecador.

5.1.4 Determinação do teor de fármaco

Em uma balança analítica foram pesados 10 mg de micropartículas, as quais foram transferidas para um balão volumétrico. Adicionou-se 10 mL de ácido acético 2% e os balões foram vedados e mantidos em um banho de ultrassom por 1 h. As amostras foram centrifugadas e a quantidade de fármaco no sobrenadante foi quantificada através de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta, em espectrofotômetro Shimadzu 1601 PC ($\lambda_{\text{máx}} = 360$ nm para o PXC e $\lambda_{\text{máx}} = 260$ nm para o CET). Ao resíduo foram adicionados 10 mL de clorofórmio e os balões vedados foram mantidos sob agitação até a completa solubilização. A quantidade de fármaco presente na fase orgânica foi determinada através de espectrofotometria ($\lambda_{\text{máx}} = 327$ nm para o PXC e $\lambda_{\text{máx}} = 254$ nm para o CET). O teor de ativo nas micropartículas, expresso em mg de fármaco por 100 mg de micropartículas, foi determinado somando-se a quantidade de fármaco presente na fase ácida e na fase orgânica. Os valores de EE% foram calculados de acordo com a Equação 1.

O teor de fármaco nas micropartículas foi novamente determinado após o processo de reticulação. Uma alíquota da solução de glutaraldeído foi retirada após o término da reticulação e a quantidade de fármaco presente nessa solução foi determinada através de espectrofotometria de absorção na região do UV, no comprimento de onda de 360 nm para o PXC e 260 nm para o CET. A partir de uma curva de calibração, determinou-se a quantidade de fármaco perdida para o meio durante a reticulação. Através da diferença entre a quantidade de fármaco inicialmente presente nas partículas e a quantidade perdida para o meio, o teor de fármaco nas micropartículas reticuladas foi determinado. O resultado foi expresso em mg de fármaco por 100 mg de micropartículas.

5.1.5 Morfologia das micropartículas

Procedeu-se conforme descrito no item 4.1.5. Para a observação da superfície interna, as micropartículas foram cortadas transversalmente com uma lâmina.

5.1.6 Perfil de liberação do fármaco *in vitro*

Os perfis de liberação do PXC e do CET a partir das micropartículas foram determinados conforme metodologia descrita no item 4.1.10, utilizando tampão fosfato pH 7,4 como meio de dissolução.

Os dados obtidos no ensaio de liberação foram avaliados através de análise estatística, segundo planejamento fatorial do tipo 3^2 , conforme descrito na Tabela 7. A concentração de quitosana na fase interna da emulsão e a concentração de reticulante foram empregadas como variáveis independentes. Os valores percentuais de fármaco liberado em 45 min (Q_{45}) foram utilizados para comparar as formulações testadas com relação ao efeito *burst*. A eficiência de dissolução em 168 h (ED_{168}) foi estabelecida como resposta para avaliar a capacidade dos sistemas em prolongar a liberação dos fármacos e foi calculada a partir da área sob a curva dos perfis de dissolução, conforme a Equação 3:

$$ED = \frac{\int y dt}{y_{100} \times t} \times 100 \quad (3)$$

Onde $\int y dt$ é a área sob a curva de dissolução no tempo “t” e $y_{100} \times t$ é a área retangular correspondente a 100 % de fármaco dissolvido no tempo “t”.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada com o auxílio do software Design-Ease[®], seguida do teste de Tukey, empregando-se o software GraphPad Prism[®].

Tabela 7 – Variáveis independentes e seus níveis investigados no preparo das micropartículas compostas.

Variáveis independentes	menor nível (-)	nível central (0)	maior nível (+)
Concentração de quitosana (A)	1,0 %	2,0 %	3,0 %
Concentração de reticulante (B)	0 %	0,1 %	1,0 %

5.2 RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.2.1 Morfologia das micropartículas

A preparação das micropartículas compostas utilizando a técnica de emulsão S/A/O incluiu duas etapas principais: o recobrimento das micropartículas de PHB com a solução de quitosana após a adição da dispersão ao óleo mineral e a posterior evaporação do solvente aquoso, levando à formação de uma camada de quitosana ao redor da(s) microesferas(s) e à formação das micropartículas compostas. Após a avaliação de algumas condições do processo, optou-se por variar a concentração de quitosana na fase interna da emulsão, sendo que as micropartículas compostas preparadas a partir de soluções contendo 1, 2 e 3 % (m/v) de quitosana serão designadas por MC1, MC2 e MC3.

Nas micrografias das micropartículas MC1 podem ser observadas microesferas de PHB/PXC e PHB/CET, com forma esférica e superfície rugosa, conforme indicado na Figura 21-A e B, respectivamente. As micropartículas com superfície externa lisa e diâmetro médio de $14,4 \pm 3,03 \mu\text{m}$ observadas nas micrografias apresentaram tamanho menor do que as microesferas de PHB e características morfológicas semelhantes às microesferas preparadas apenas com quitosana (Figura 21-C). Algumas microesferas de PHB/PXC e PHB/CET foram parcialmente revestidas com uma fina camada de quitosana, conforme mostrado na Figura 21-D e E, respectivamente. No entanto, a ocorrência desse tipo de micropartícula foi muito pequena em relação às microesferas de PHB e de quitosana.

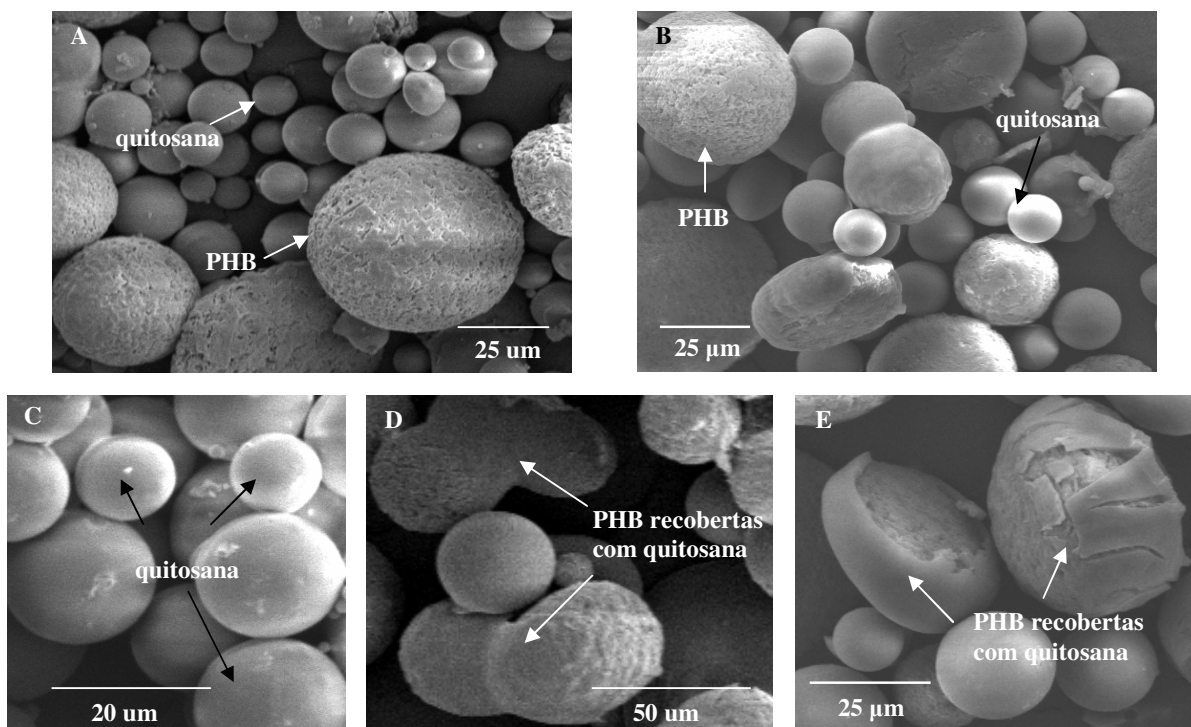


Figura 21 – Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas compostas MC1: (A) e (D) preparadas a partir das microesferas de PHB/PXC; (B) e (E) a partir das microesferas de PHB/CET; (C) microesferas preparadas apenas com quitosana, utilizando as mesmas condições descritas no preparo das micropartículas MC1.

As micrografias obtidas por microscopia óptica logo após a adição da dispersão à fase oleosa (Figura 22) mostraram que a solução de quitosana, pouco viscosa nesta concentração, não englobou as microesferas de PHB e formou pequenas gotículas dispersas na fase oleosa que, após a evaporação da fase aquosa, originaram as microesferas de quitosana indicadas na Figura 21-A e B.

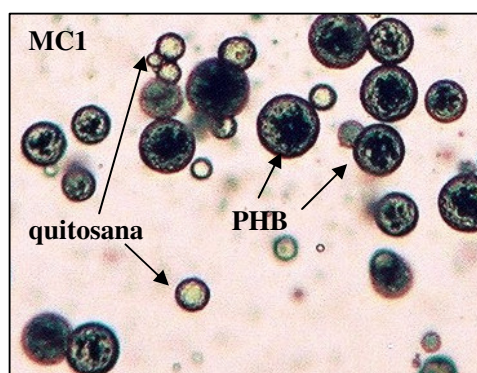


Figura 22 – Fotografia de microscopia óptica do início do preparo das micropartículas compostas, utilizando solução de quitosana 1%.

Nas micrografias das micropartículas preparadas com solução de quitosana 2 % foram observadas microesferas de PHB revestidas com o polímero, as quais são mostradas na Figura 23-A e B. Nessas condições o recobrimento das microesferas com a camada de quitosana mostrou-se mais eficiente. O corte transversal de uma micropartícula (Figura 23 C) mostra diversas microesferas de PHB inseridas na matriz de quitosana, indicando que houve a formação, também, de micropartículas do tipo reservatório, com tamanho médio de 88,7 μm .

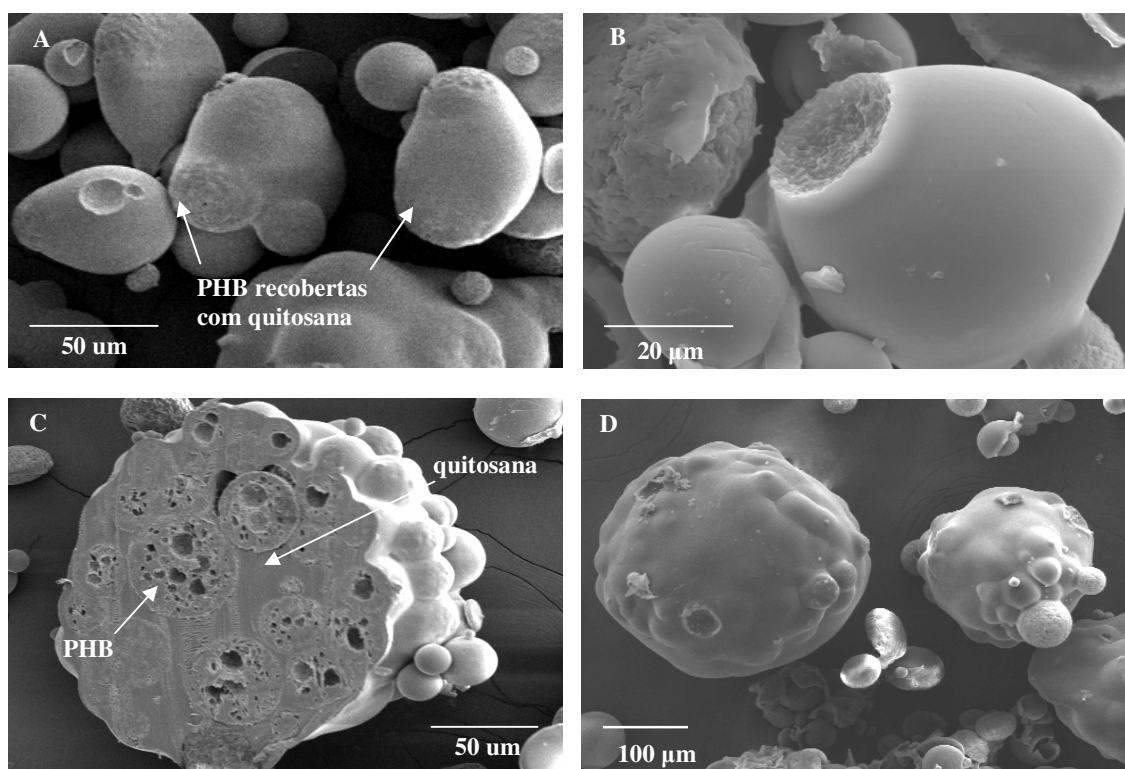


Figura 23 – Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas compostas MC2: (A) e (C) preparadas a partir das microesferas de PHB/PXC; (B) e (D) a partir das microesferas de PHB/CET.

Micropartículas com morfologia semelhante, do tipo reservatório, também foram observadas nas micrografias quando se utilizou solução de quitosana 3 % (Figura 24), as quais apresentaram diversas microesferas de PHB inseridas na matriz de quitosana. No entanto, o aumento da concentração do polímero na fase interna da emulsão originou micropartículas maiores, com tamanho médio de 410,8 μm .

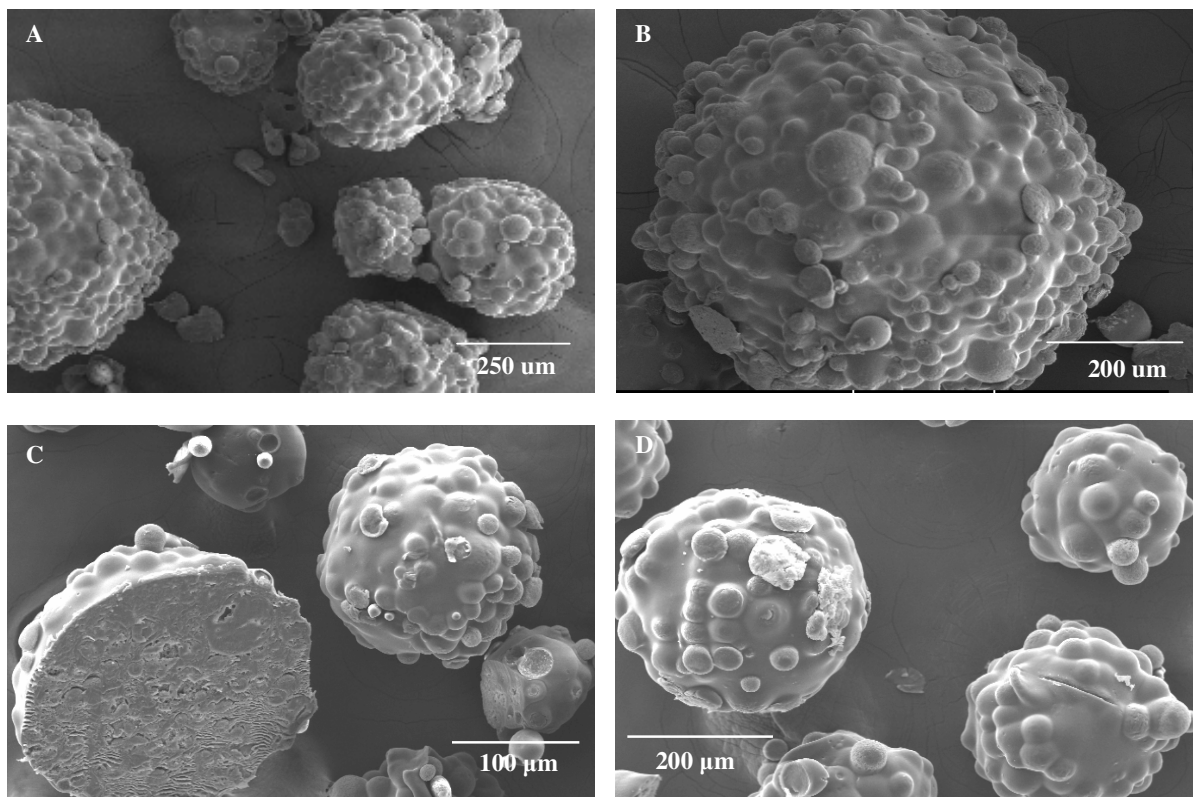


Figura 24 – Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas compostas MC3: (A) e (B) preparadas a partir das microesferas de PHB/PXC; (C) e (D) a partir das microesferas de PHB/CET.

Nas micrografias de microscopia óptica do início do preparo das micropartículas MC2 e MC3 logo após a adição da fase interna à fase externa foi possível observar microesferas de PHB no interior das gotículas da solução de quitosana (Figura 25). O aumento da viscosidade da solução, quando se utilizou uma maior concentração do polímero na fase interna da emulsão, facilitou a incorporação das microesferas de PHB no interior das gotículas de solução de quitosana, originando as micropartículas compostas do tipo reservatório após a evaporação da fase aquosa.

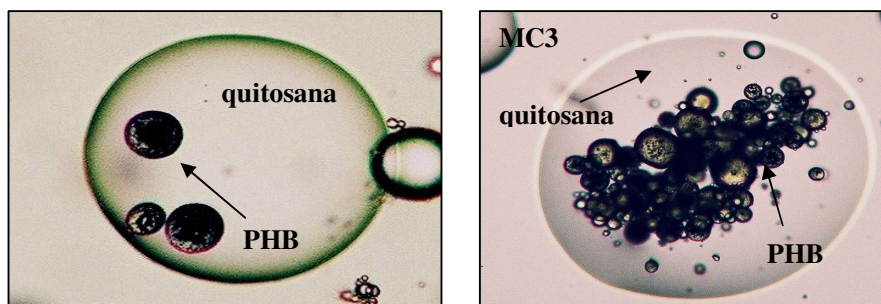


Figura 25 – Fotografias de microscopia óptica do início do preparo das micropartículas compostas, utilizando solução de quitosana 2 % e 3 %.

O tratamento das micropartículas com glutaraldeído modificou a sua coloração de bege para marrom após o processo de reticulação da quitosana. Nas micropartículas compostas MC3 observam-se microesferas de PHB/PXC próximas à superfície recobertas com uma camada de quitosana e inseridas na densa matriz do polímero reticulado (Figura 26-A). A fratura da micropartícula composta MC3 de PHB/CET sugere que não ocorre forte adesão interfacial das microesferas de polímero/fármaco com a matriz de quitosana, conforme pode ser observado pelas microesferas de PHB/CET não revestidas e pelos espaços que eram ocupados pelas partículas, indicados pelas setas na Figura 26-B.

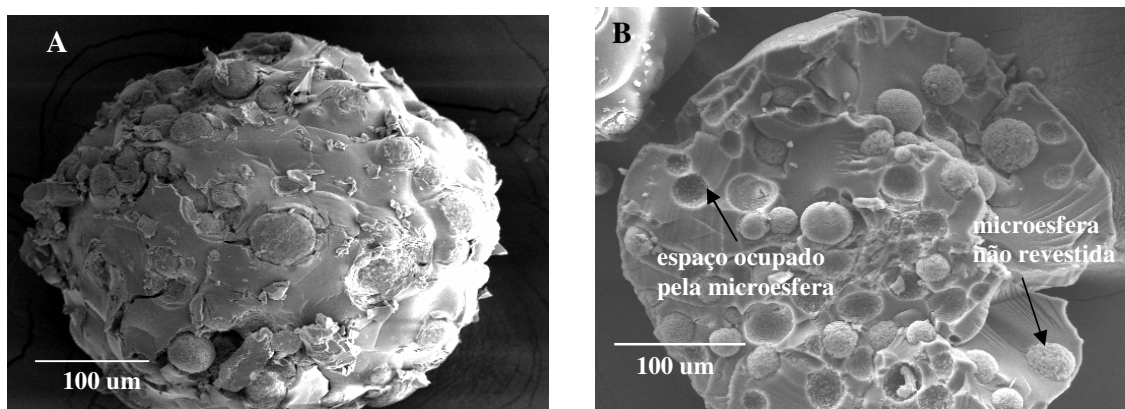


Figura 26 – Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas compostas MC3 reticuladas com 1,0 % de glutaraldeído: A (PXC) e B (CET).

5.2.2 Teor de fármaco nas micropartículas

Os resultados de eficiência de encapsulação e da quantidade de fármaco presente nas micropartículas compostas encontram-se descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Eficiência de encapsulação e teor de fármaco nas micropartículas compostas.

	Micropartículas compostas de PHB/ PXC			Micropartículas compostas de PHB/ CET		
	Teor (mg %)		EE (%)	Teor (mg %)		EE (%)
	não reticuladas	reticuladas		não reticuladas	reticuladas	
MC1	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2	23,3	3,2 ± 0,05	3,1 ± 0,03	34,6
MC2	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	26,5	5,2 ± 0,11	5,1 ± 0,03	68,2
MC3	1,7 ± 0,3	1,7 ± 0,1	33,5	7,0 ± 0,09	6,8 ± 0,05	74,9

O teor de PXC presente nas micropartículas compostas sofreu uma pequena variação em função da concentração de quitosana na fase interna da emulsão. No entanto, esse efeito foi mais pronunciado quando o CET foi empregado como fármaco modelo, pois houve um aumento significativo dos teores de fármaco encapsulado em função da concentração de quitosana. As gotículas mais densas da solução contendo uma maior concentração do polímero podem ter dificultado a difusão do fármaco para o meio externo, originando os teores mais altos de CET nas micropartículas compostas MC3.

Os valores de percentagem de eficiência de encapsulação indicaram que uma determinada quantidade de ambos os fármacos foi perdida para o meio durante o preparo das micropartículas compostas. A solubilização dos fármacos na solução de ácido acético e no óleo mineral poderia levar à conseqüente perda de ativo para a fase externa durante o processo de preparação. Dois diferentes procedimentos foram realizados para avaliar em quais etapas do processo estaria ocorrendo a perda de fármaco.

Inicialmente, uma alíquota da solução de quitosana com as microesferas de PHB/fármaco dispersas foi analisada por espectrofotometria de absorção na região do UV sendo determinada uma pequena quantidade de PXC ou CET, indicando que uma fração de ambos os fármacos solubilizou neste meio. Diferenças com relação

ao percentual de fármaco encapsulado poderiam ocorrer em função das diferentes solubilidades do PXC e do CET no meio ácido. A solubilidade de saturação do PXC nesse meio, determinada experimentalmente, foi de $107,4 \text{ mg L}^{-1}$ e a do CET $66,5 \text{ mg L}^{-1}$. Portanto, o fármaco próximo à superfície das microesferas de PHB/PXC poderia ter solubilizado mais facilmente no meio ácido e, posteriormente, difundido para a fase externa oleosa, originando os teores mais baixos de PXC mostrados na Tabela 8, em comparação aos teores de CET.

Para avaliar a possibilidade de ocorrer perda de PXC e CET para a fase externa (óleo mineral) foram preparadas microesferas contendo os fármacos dispersos em uma solução de quitosana a 2% em substituição às micropartículas de PHB/fármaco, mantendo-se os demais parâmetros do processo. As eficiências de encapsulação foram de $13,25 \pm 3,4 \%$ para o PXC e $21,1 \pm 3,9 \%$ para o CET, indicando haver difusão de ambos os fármacos para a fase oleosa durante o processo de encapsulação, sendo a perda de fármaco mais pronunciada no caso do PXC.

Sendo assim, os valores de EE% menores do que 100% são decorrentes da solubilização do fármaco próximo à superfície externa das partículas após a dispersão das microesferas de PHB à solução de ácido acético e também à perda de fármaco para o meio externo (óleo mineral) após a adição da fase interna à fase externa.

Comparando os teores de ativo antes e após a reticulação, não foram observadas variações significativas no teor de fármaco, conforme os valores listados na Tabela 8.

5.2.3 Avaliação do perfil de liberação dos fármacos *in vitro*

Os perfis de liberação do PXC a partir das micropartículas compostas são apresentados na Figura 27 e mostram que a incorporação das microesferas de PHB/PXC na matriz de quitosana levou a uma pequena diminuição da quantidade de fármaco inicialmente liberada e promoveu um maior controle da liberação do fármaco, especialmente com as micropartículas do tipo reservatório (MC3). Por outro lado, houve um pequeno aumento da quantidade de PXC inicialmente liberada no caso das micropartículas MC1, pelo fato das microesferas de PHB não terem sido

recobertas com a quitosana. Conforme discutido anteriormente, uma fração do PXC presente nas microesferas de PHB solubiliza na solução de ácido acético durante o preparo das micropartículas compostas, podendo ficar encapsulado nas microesferas de quitosana. Micropartículas preparadas a partir de uma dispersão do PXC em uma solução de quitosana a 1 %, utilizando as mesmas condições empregadas no preparo das micropartículas compostas, também liberaram o fármaco rapidamente em tampão fosfato pH 7,4 (65,6% após 45 min).

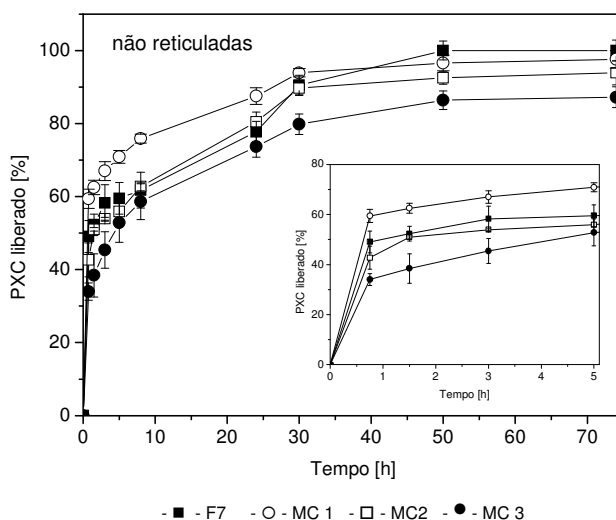


Figura 27 – Perfis de liberação do piroxicam a partir das micropartículas compostas, em tampão fosfato pH 7,4. O gráfico menor apresenta a faixa de tempo de 0 a 5 h.

Os perfis de liberação do cetoprofeno, visualizados na Figura 28, mostram que a liberação do fármaco das micropartículas MC1 apresentou-se muito semelhante ao das microesferas de PHB/CET, com um pronunciado efeito *burst*, pelo fato das microesferas não terem sido revestidas e incorporadas na matriz de quitosana, conforme observado nas micrografias (Figura 21). Por outro lado, uma diminuição da quantidade de CET liberado e um prolongamento da liberação do fármaco foram observados nas micropartículas MC2 e MC3.

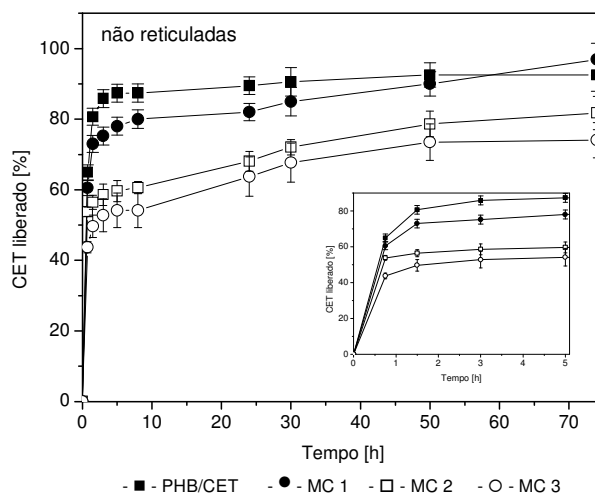


Figura 28 – Perfis de liberação do cetoprofeno a partir das micropartículas compostas, em tampão fosfato pH 7,4. O gráfico menor apresenta a faixa de tempo de 0 a 5 h.

Conforme mencionado anteriormente, os valores da quantidade de fármaco liberado nos primeiros 45 min (Figura 29) mostraram uma diminuição de aproximadamente 30 % da quantidade de CET e PXC inicialmente liberada das micropartículas MC3, quando comparadas às microesferas preparadas apenas com PHB. A diminuição do efeito *burst* foi observada especialmente quando as micropartículas compostas foram do tipo reservatório e apresentaram um tamanho maior e uma matriz mais espessa de quitosana (MC3). Resultados semelhantes foram obtidos por Gan e Wang (2007)⁵² que prepararam microesferas de quitosana contendo albumina bovina e observaram que, quando a concentração do polímero foi aumentada de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ para $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$, houve uma redução do efeito *burst* em virtude do aumento do tamanho das microesferas, o qual está relacionado à maior viscosidade da solução de quitosana.

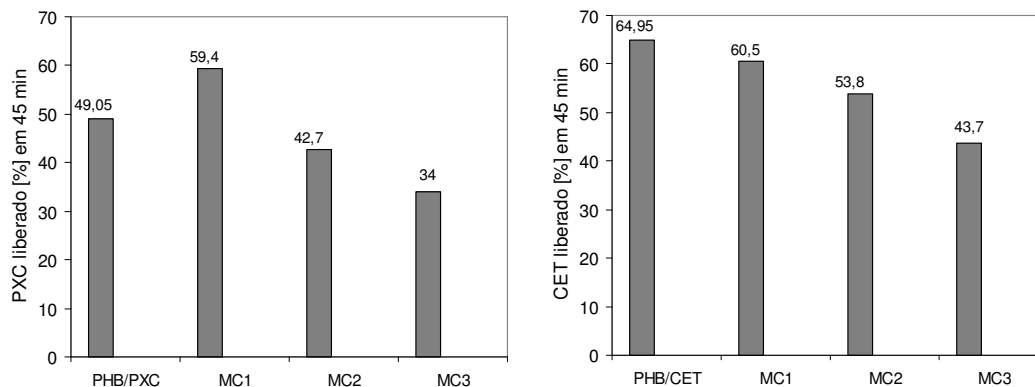


Figura 29 – Quantidade de fármaco liberado nos primeiros 45 min de ensaio a partir das microesferas de PHB/fármaco e micropartículas compostas.

A liberação de fármacos a partir de micropartículas preparadas com quitosana pode ser modificada através da reticulação do polímero, o que torna a matriz mais rígida, compacta e hidrofóbica⁵⁶. Nesse estudo optou-se por utilizar como agente reticulante o glutaraldeído, um dois mais comumente empregados, com o objetivo de avaliar a sua influência sobre o perfil de liberação do PXC e do CET.

Os perfis de liberação dos fármacos das micropartículas compostas reticuladas com glutaraldeído encontram-se nas Figuras 30 e 31, indicando haver diferenças na liberação de ambos os fármacos após a reticulação da quitosana, especialmente nas primeiras horas. Após um determinado período de tempo, uma menor quantidade de fármaco passa a ser liberada e os perfis de dissolução atingem um platô.

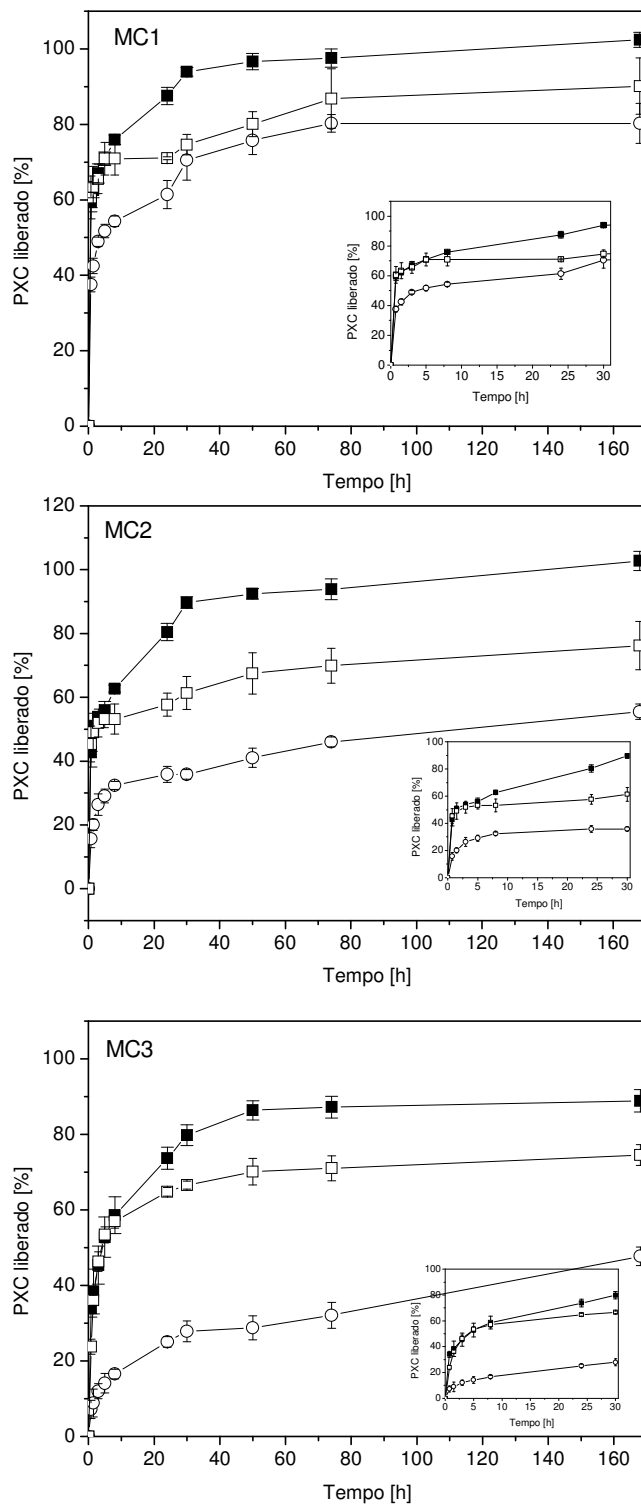


Figura 30 – Perfis de liberação do piroxicam a partir das micropartículas compostas não reticuladas (■) e reticuladas com 0,1% (□) e 1,0% (○) de glutaraldeído, em tampão fosfato pH 7,4. Os gráficos menores apresentam a faixa de tempo de 0 a 30 h.

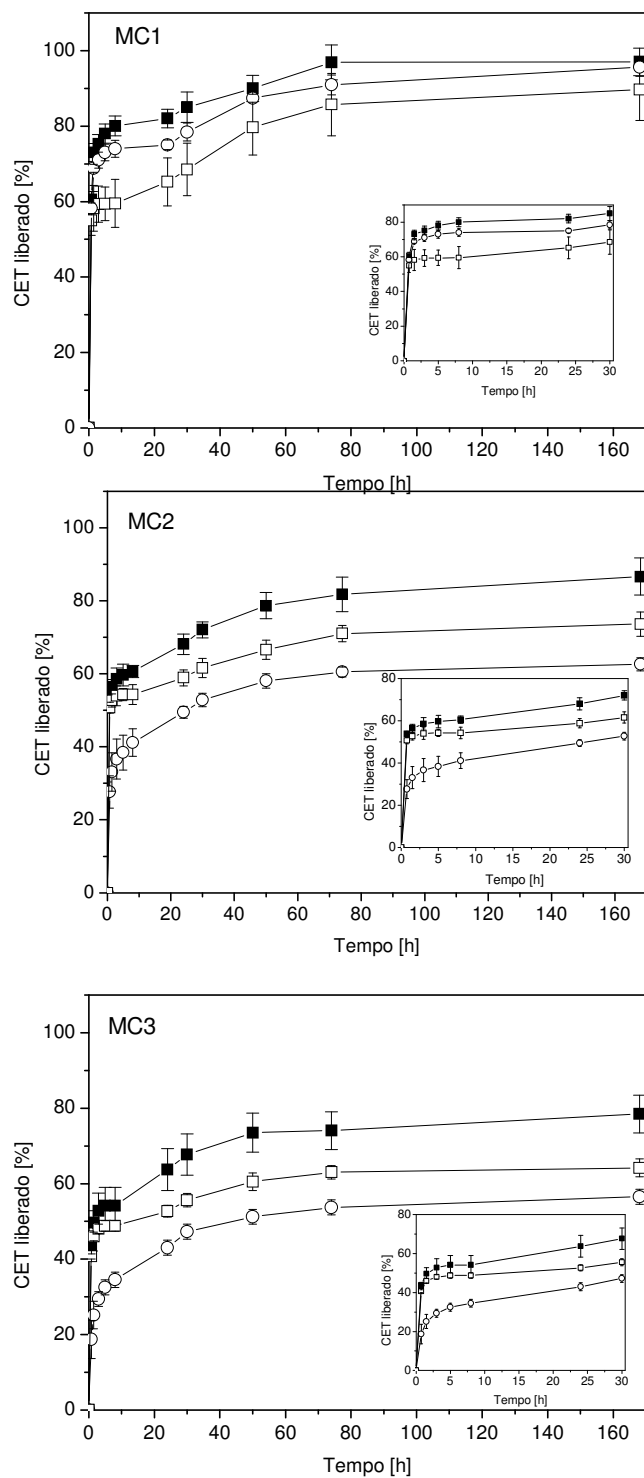


Figura 31 – Perfis de liberação do cetoprofeno a partir das micropartículas compostas não reticuladas (■) e reticuladas com 0,1% (□) e 1,0% (○) de glutaraldeído, em tampão fosfato pH 7,4. Os gráficos menores apresentam a faixa de tempo de 0 a 30 h.

Nos perfis de liberação do PXC não foram observadas diferenças com relação aos perfis das micropartículas não reticuladas e reticuladas com 0,1% de glutaraldeído até o tempo de 5 h. No entanto, diferenças foram observadas quando a concentração do reticulante foi aumentada. Resultados semelhantes foram observados nos perfis de liberação do CET.

Com o objetivo de avaliar a influência da concentração de quitosana e da concentração de reticulante sobre o efeito *burst*, os resultados da quantidade de fármaco liberado em 45 min (Q_{45}) (Figura 32) foram utilizados como resposta no planejamento fatorial. Através da análise de variância verificou-se que ambas as variáveis influenciaram a quantidade de fármaco liberada nos primeiros 45 min de ensaio (*burst release*) ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$; $\alpha = 0,05$).

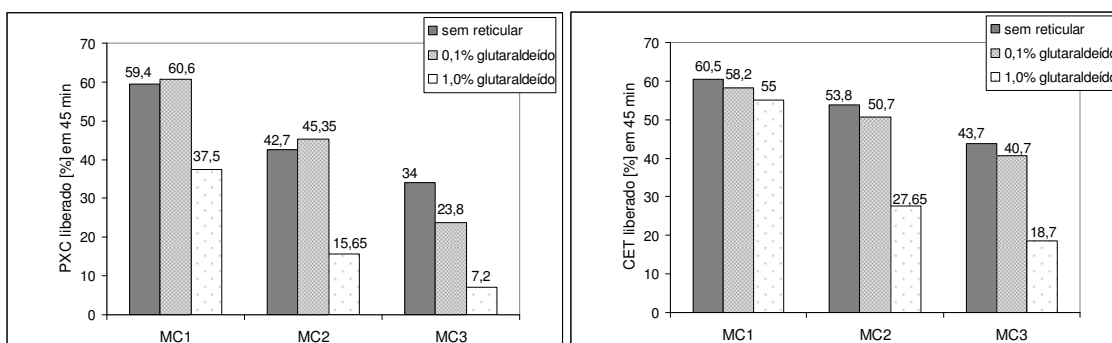


Figura 32 – Quantidade de PXC e CET liberados após 45 min, em tampão fosfato pH 7,4.

A aplicação do teste de Tukey demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de Q_{45} das micropartículas não reticuladas e reticuladas com 0,1% de glutaraldeído ($P > 0,05$), independente da concentração de quitosana utilizada, conforme se observou nos perfis de liberação de ambos os fármacos. No entanto, quando a concentração de reticulante foi aumentada para 1% ocorreu uma redução significativa de Q_{45} ($P < 0,05$), indicando que a redução do efeito *burst* foi efetiva quando se utilizou uma maior concentração do reticulante.

A liberação de ativos a partir de microesferas de quitosana pode ser modificada através da utilização de diferentes quantidades do polímero submetido ao processo de reticulação, diferentes tipos e concentrações de reticulante e tempos de reticulação^{56,80}. Nesse estudo, o tipo de reticulante, o tempo e a quantidade de

quitosana submetida ao processo de reticulação foram mantidos constantes. Portanto, a utilização de uma maior concentração de glutaraldeído (1,0 %) possibilitou um maior grau de reticulação da matriz de quitosana, tornando-a mais rígida e hidrofóbica, reduzindo a quantidade de fármaco liberado e o efeito *burst*.

Com o objetivo de avaliar o efeito da concentração de quitosana e de reticulante sobre a capacidade das micropartículas em prolongar a liberação dos fármacos, os valores de ED_{168} (Figura 33) foram analisados através de ANOVA, indicando que ambas as variáveis influenciaram a eficiência de dissolução em 168 h ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$; $\alpha = 0,05$).

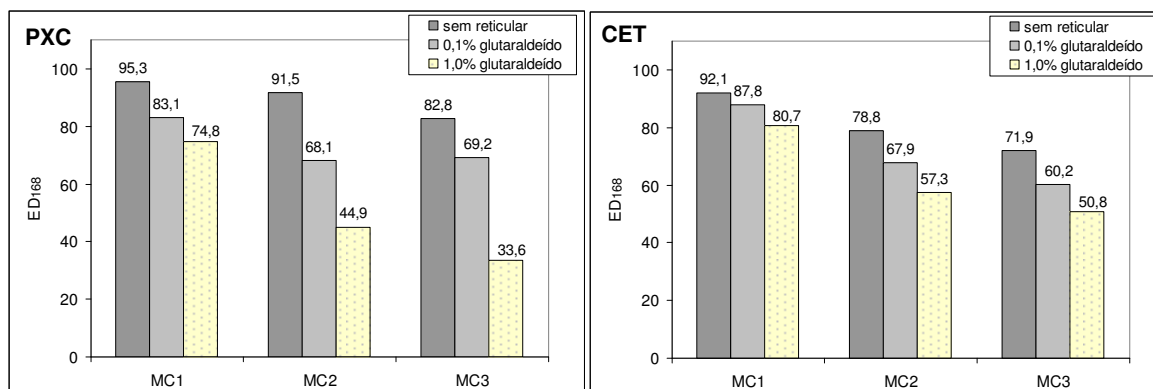


Figura 33 – Eficiências de dissolução em 168 h das micropartículas reticuladas.

Através da aplicação do teste de Tukey demonstrou-se que o aumento da concentração de quitosana de 1% para 2% ou 3% diminuiu significativamente ED_{168} independente da concentração de glutaraldeído utilizada. Conforme discutido anteriormente, a incorporação das microesferas de PHB na matriz de quitosana, especialmente quando as micropartículas apresentaram um maior tamanho (MC3), provocou uma barreira adicional à difusão do fármaco, prolongando a liberação dos ativos por um maior período de tempo. No entanto, não foram observadas diferenças nos valores de ED_{168} de ambos os fármacos quando a concentração de quitosana foi aumentada de 2% para 3% ($P > 0,05$).

A aplicação do teste de Tukey demonstrou, também, que a adição de reticulante diminuiu significativamente ED_{168} , independente da concentração de quitosana, levando a um prolongamento da liberação de ambos os fármacos, em consequência da maior rigidez e hidrofobicidade da matriz. O aumento da

concentração de glutaraldeído de 0,1 % para 1,0 % reduziu significativamente ED_{168} ($P < 0,05$) e, conseqüentemente, um prolongamento da liberação do PXC e do CET foi observado em função da concentração de reticulante utilizada.

CONCLUSÕES PARCIAIS

A técnica de emulsão sólido-água-óleo mostrou-se viável como uma nova técnica para o preparo de micropartículas compostas, sendo a concentração de quitosana na fase interna da emulsão um parâmetro importante para controlar as características e o tamanho das micropartículas compostas de PHB/quitosana.

Embora tenham sido obtidos valores de eficiência de encapsulação do PXC e do CET inferiores a 100 %, este sistema pode ser empregado para encapsular outros fármacos modelo, com diferentes características físico-químicas e que sejam administrados em baixas dosagens.

A utilização de maiores concentrações de quitosana e de reticulante provocou uma diminuição do efeito *burst* e também um prolongamento da liberação dos fármacos.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na primeira etapa deste trabalho demonstraram que as condições do processo de emulsão-evaporação do solvente utilizadas no preparo das microesferas de PHB/PXC influenciaram suas características morfológicas, eficiência de encapsulação e perfil de liberação do fármaco, indicando que é possível obter micropartículas com características específicas através da variação de parâmetros do processo de encapsulação. Utilizando um menor volume de solvente orgânico como fase interna da emulsão foi possível obter altos valores de PXC encapsulado. No entanto, a presença de cristais aderidos à superfície externa das partículas levou à rápida liberação do fármaco.

Por outro lado, a utilização de um maior volume de solvente orgânico conduziu à obtenção de micropartículas esféricas e com menor tamanho. A adição de isopropanol à fase externa aquosa foi fundamental para aumentar a eficiência de encapsulação dos fármacos e possibilitar um maior prolongamento da liberação do PXC. Ensaios de DSC e difração de raios-X indicaram a conversão do PXC para a forma de monohidrato durante o processo de microencapsulação. Os resultados obtidos sugerem que essas micropartículas são eficientes para prolongar a liberação do PXC administrado por via oral e constituem um sistema promissor para administração desse fármaco através das vias intramuscular e intra-articular.

Diferentes resultados foram obtidos quando o CET foi utilizado como fármaco modelo. As microesferas de PHB/CET apresentaram um pronunciado efeito *burst* seguido da rápida liberação do fármaco.

A técnica de emulsão sólido-água-óleo mostrou-se viável para a obtenção de micropartículas de PHB/quitosana, podendo ser considerada uma nova técnica para o preparo de micropartículas compostas. Foi possível alterar as características morfológicas e o tamanho das micropartículas através da utilização de diferentes concentrações de quitosana na fase interna da emulsão. A utilização de uma maior concentração do polímero (3 %) levou à obtenção de micropartículas compostas do tipo reservatório, contendo diversas microesferas de PHB inseridas em uma matriz de quitosana. Além disso, a utilização de uma maior concentração de quitosana

levou à uma diminuição do efeito *burst* e a um prolongamento da liberação do piroxicam e do cetoprofeno, em comparação às microesferas de PHB contendo esses fármacos. A reticulação da quitosana com glutaraldeído afetou a liberação dos fármacos a partir das micropartículas compostas. Uma diminuição efetiva do efeito *burst* e um maior prolongamento da liberação dos ativos foram obtidos quando se utilizou uma maior concentração de reticulante. Portanto, a liberação de fármacos a partir das micropartículas compostas pode ser controlada através da utilização de diferentes concentrações de quitosana e de reticulante.

Os resultados obtidos nesta segunda etapa do trabalho sugerem que através da elaboração de micropartículas compostas utilizando um segundo polímero biocompatível e biodegradável, a exemplo da quitosana, é possível prolongar a liberação de fármacos a partir de microesferas preparadas com o PHB, podendo ser considerado um sistema promissor para administração de fármacos. Além disso, também é possível modular a liberação de ativos a partir desses sistemas através da obtenção de diferentes graus de reticulação da quitosana. Sugere-se, em trabalhos futuros, a utilização de outros fármacos modelo e o estudo de outros agentes reticulantes, que possam favorecer e acelerar a degradação *in vivo* do PHB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. RANADE, V.V. **Drug delivery systems**. 2.ed. New York: CRC Press, 2004.
2. ZINN, M.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 53, p. 5-21, 2001.
3. MARTIN, M.A.; MIGUENS, F.C.; RIEUMONT, J.; SANCHEZ, R. Tailoring of the external and internal morphology of poly-3-hydroxy butyrate microparticles. **Colloids Surf., B**, v. 17, p. 111-116, 2000.
4. KAI, Z.; YING, D.; CHEN, G.Q. Effects of surface morphology on the biocompatibility of polyhydroxyalkanoates. **Biochem. Eng. J.**, v. 16, p. 115-123, 2003.
5. CONWAY, B. R.; EYLES, J. E.; ALPAR, H. O. A comparative study on the immune response to antigens in PLA and PHB microspheres. **J. Controlled Release**, v. 49, p. 1-9, 1997.
6. CARMIGNAN, F. **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**. 2006. 151 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
7. BIDONE, J. **Preparo e caracterização de microesferas de blendas de poli(3-hidroxi-butirato)/metoxi polietilenoglicol- poli (D,L ácido láctico) e de microesferas compostas de poli(3-hidroxi-butirato) e gelatina contendo ibuprofeno**. 2008. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
8. HASAN, A. S.; SOCHA, M.; LAMPRECHT, A.; GAZHOUANI, F.; SAPIN, A.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P.; UBRICH, N. Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release. **Int. J. Pharm.**, v. 344, p. 53-61, 2007.

9. MORITA, T.; HORIKIRI, Y.; SUZUKI, T.; YOSHINO, H. Applicability of various amphiphilic polymers to the modification of protein release kinetics from biodegradable reservoir-type microspheres. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 41, p. 45-53, 2001.
10. POLLAUFG, E. J.; KIM, K. K.; PACK, D. W. Small-Molecule Release from Poly(D,L-lactide)/Poly(D,L-lactide-co-glycolide) Composite Microparticles. **J. Pharm. Sci.**, v. 94, n. 9, p. 2013-2022, 2005.
11. SOPPIMATH, K.S.; KULKARNI, A.R.; AMINABHAVI, T.M. Encapsulation of antihypertensive drugs in cellulose-based matrix microspheres: characterization and release kinetics of microspheres and tableted microspheres. **J. Microencapsulation**, v. 18, n. 3, p. 397-409, 2001.
12. PAPADIMITRIOU, S.; BIKIARIS, D.; AVGOUSTAKIS, K.; KARAVAS, E.; GEORGARAKIS, M. Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole. **Carbohydr. Polym.**, v. 73, p. 44-54, 2008.
13. PARK, S. H.; CHUN, M. K.; CHOI, H. K. Preparation of an extended-release matrix tablet using chitosan/Carbopol interpolymer complex. **Int. J. Pharm.**, v. 347, p. 39-44, 2008.
14. WISE, D. L. **Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology**. New York: Marcel Dekker, 2000.
15. UDDIN, M. S.; HAWLADER, M. N. A.; ZHU, H. J. Microencapsulation of ascorbic acid: effect of process variables on product characteristics. **J. Microencapsulation**, v. 18, n. 2, p. 199-209, 2001.
16. BERGHAUSEN, S. W. et al. Comparison of microencapsulation techniques for the water-soluble drugs nitenpyram and clomipramine HCl. **J. Controlled Release**, v. 85, p. 35-43, 2003.
17. DOBETTI, L.; PANTALEO, V. Application of a hydrodynamic to microencapsulation by coacervation. **J. Microencapsulation**, v. 19, n. 2, p. 139-151, 2002.
18. SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S.S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

19. BERKLAND, C.; KIPPER, M.J.; NARASIMHAN, B.; KIM, K.; PACK, D.W. Microsphere size, precipitation kinetics and drug distribution control drug release from biodegradable polyanhydride microspheres. **J. Controlled Release**, v. 94, p. 129-141, 2004.
20. RATTES, A. L. R.; OLIVEIRA, W. P. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. **Powder Technol.**, v. 171, p. 7-14, 2007.
21. GIBAUD, S.; BONNEVILLE, A.; ASTIER, A. Preparation of 3,4-diaminopyridine microparticles by solvent-evaporation methods. **Int. J. Pharm.**, v. 242, p. 197-201, 2002.
22. WANG, F. J., WANG, C. H. Effects of fabrication conditions on the characteristics of etanidazole spray-dried microspheres. **J. Microencapsulation**, v. 19, n. 4, p. 495-510, 2002.
23. CHANG, C. M., BODMEIER, R. Organic solvent-free polymeric microspheres prepared from aqueous colloidal polymer dispersions by a w/o emulsion technique. **Int. J. Pharm.**, v. 130, p. 187-194, 1996.
24. SINHA, V. R.; TREHAN, A. Biodegradable microspheres for protein delivery. **J. Controlled Release**, v. 90, n. 3, p. 261-280, 2003.
25. KANG, A.; SINGH, H. Conformational stability of a model protein (bovine serum albumin) during primary emulsification process of PLGA microspheres synthesis. **Int. J. Pharm.**, v. 260, n. 1, p. 149-156, 2003.
26. O'DONNELL, P.B.; MCGINITY, J.W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. **Adv. Drug Delivery Rev.**, n. 28, p. 25-42, 1997.
27. DINARVAND, R.; MIRFATTAH, S.; ATYABI, F. Preparation, characterization and in vitro drug release of isosorbide dinitrate microspheres. **J. Microencapsulation**, v. 19, n. 1, p. 73-81, 2002.
28. COUVREUR, P.; BLANCO-PIETRO, M.J.; PUISIEUX, F.; ROQUES, B.; FATAL, E. Multiple emulsion technology for the design of microspheres containing peptides and oligopeptides. **Adv. Drug Delivery Rev.**, n. 28, p. 85-96, 1997.

29. MAIA, J. L.; SANTANA, M. H. A.; RÉ, M. I. The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. **Brazilian J. Chem. Eng.**, v. 21, n. 01, p. 1-12, 2004.
30. LEE, J. H.; PARK, T. G.; CHOI, H. K. Effect of formulation and processing variables on the characteristics of microspheres for water-soluble drugs prepared by w/o/o double emulsion solvent diffusion method. **Int. J. Pharm.**, v. 196, p. 75-83, 2000.
31. CHUNG, T.W.; HUANG, Y.Y.; LIU, Y.Z. Effects of the rate of solvent evaporation on the characteristics of drug loaded PLLA and PDLLA microspheres. **Int. J. Pharm.**, v. 212, p. 161-169, 2001.
32. MENG, F.T.; MA, G.H.; LIU, Y.D.; QIU, W.; SU, Z. G. Microencapsulation of bovine hemoglobin with high bio-activity and high entrapment efficiency using W/O/W double emulsion technique. **Colloids Surf., B**, v. 33, p. 177-183, 2004.
33. MATEOVIC, T.; KRIZNAR, B.; BOGATAJ, M.; MRHAR, A. The influence of stirring rate on biopharmaceutical properties of Eudragit RS microspheres. **J. Microencapsulation**, v. 19, n. 1, p. 29-36, 2002.
34. GUYOT, M.; FAWAZ, F. Nifedipine loaded-polymeric microspheres: preparation and physical characteristics. **Int. J. Pharm.**, v. 175, p. 61-74, 1998.
35. ZHENG, C. H.; GAO, J. Q.; ZHANG, Y. P.; LIANG, W. Q. A protein delivery system: biodegradable alginate-chitosan-poly(lactic-co-glycolic acid) composite microspheres. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 323, p. 1321-1327, 2004.
36. WANG, C.; YE, W.; ZHENG, Y.; LIU, Y.; TONG, Z. Fabrication of drug-loaded biodegradable microcapsules for controlled release by combination of solvent evaporation and layer-by-layer self-assembly. **Int. J. Pharm.**, v. 338, p. 165-173, 2007.
37. ZHOU, H. Y.; CHEN, X. G.; LIU, C. S.; MENG, X. H.; LIU, C. G.; YU, L. J. Release characteristics of three model drugs from chitosan/cellulose acetate multimicrospheres. **Biochem. Eng. J.**, v. 31, p. 228-233, 2006.
38. SHI, M.; YANG, Y. Y.; CHAW, C. S.; GOH, S. H.; MOOCHHALA, S. M.; NG, S.; HELLER, J. D. Double walled POE/PLGA microspheres: encapsulation of water-soluble

and water-insoluble proteins and their release properties. **J. Controlled Release**, v. 89, p. 167-177, 2003.

39. LEE, T. H.; WANG, J.; WANG, C. H. Double-walled microspheres for the sustained release of a highly water soluble drug: characterization and irradiation studies. **J. Controlled Release**, v. 83, p. 437-452, 2002.

40. 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, TF-FTIR and Py-GC/MS. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 89, p. 1530-1536, 2003.

41. POUTON, C.W.; AKHTAR, S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. **Adv. Drug Delivery Rev.**, n. 18, p. 133-162, 1996.

42. SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Prog. Polym. Sci.**, v. 25, p. 1503-1555, 2000.

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

44. ROSA, D. S.; FRANCO, B. L. M.; CALIL, M. R. Biodegradabilidade e propriedades mecânicas de novas misturas poliméricas. **Polímeros**, v. 11, n. 2, p. 82-88, 2001.

45. GODBOLE, S.; GOTE, S.; LATAKAR, M.; CHAKRABARTI, T. Preparation and characterization of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate – starch blend films. **Bioresour. Technol.**, v. 86, p. 33-37, 2003.

46. ERCEG, M.; KOVACIC, T.; KLARIC, I. Thermal degradation of poly (3-hydroxybutyrate) plasticized with acetyl tributyl citrate. **Polym. Degrad. Stab.**, v. 90, p. 313-318, 2005.

47. KAI, Z.; YING, D.; CHEN, G.Q. Effects of surface morphology on the biocompatibility of polyhydroxyalkanoates. **Biochem. Eng. J.**, v. 16, p. 115-123, 2003.

48. ZHAO, K.; DENG, Y.; CHEN, J.C.; CHEN, G.Q. Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility. **Biomaterials**, v. 24, p. 1041-1045, 2003.

49. GANGRADE, N.; PRICE, J. C. Poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) microspheres containing progesterone: preparation, morphology and release properties. **J. Microencapsulation**, v. 8, n. 2, p. 185-202, 1991.
50. 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.**, v. 8, n. 12, p. 947-961, 1997.
51. CHEN, C.; YU, C. H.; CHENG, Y. C.; YU, P. H. F.; CHEUNG, M. K. Biodegradable nanoparticles of amphiphilic triblock copolymers based on poly(3-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol) as drug carriers. **Biomaterials**, v. 27, p. 4804-4814, 2006.
52. GAN, Q.; WANG, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. **Colloids Surf., B**, v. 59, p. 24-34, 2007.
53. SHIH, W. J.; CHEN, Y. H.; SHIH, C. J.; HON, M. H.; WANG, M. C. Structural and morphological studies on poly(3-hydroxybutyrate acid) (PHB)/chitosan drug releasing microspheres prepared by both single and double emulsion processes. **J. Alloys Compd.**, v. 434-435, p. 826-829, 2007.
54. GE, Y.; CHEN, D.; XIE, L.; ZHANG, R. Optimized preparation of daidzein-loaded chitosan microspheres and in vivo evaluation after intramuscular injection in rats. **Int. J. Pharm.**, v. 338, p. 142-151, 2007.
55. GUPTA, K. C.; JABRAIL, F. H. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres for controlled release of centchroman. **Carbohydr. Res.**, v. 342, p. 2244-2252, 2007.
56. YUAN, Y.; CHESNUTT, B. M.; UTTURKAR, G.; HAGGARD, W. O.; YANG, Y.; ONG, J. L.; BUMGARDNER, J. D. The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. **Carbohydr. Polym.**, v. 68, p. 561-567, 2007.
57. GUPTA, K. C.; JABRAIL, F. H. Glutaraldehyde and glyoxal cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of centchroman. **Carbohydr. Res.**, v. 341, p. 744-756, 2006.

58. ANAL, A. K.; STEVENS, W. F.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C. Ionotropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. **Int. J. Pharm.**, v. 312, p. 166-173, 2006.
59. JIANG, T.; ABDEL-FATTAH, W. I.; LAURENCIN, C. T. In vitro evaluation of chitosan/poly(lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, p. 4894-4903, 2006.
60. MI, F. L.; SUNG, H. W.; SHYU, S. S. Drug release from chitosan-alginate complex-bead reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. **Carbohydr. Polym.**, v. 48, p. 61-72, 2002.
61. SHI, X. Y.; TAN, T. W. Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application in controlled release of Vitamin D2. **Biomaterials**, v. 23, p. 4469-4473, 2002.
62. IKEJIMA, T.; INOUE, Y. Crystallization behavior and environmental biodegradability of the blend films of poly(3-hydroxybutyric acid) with chitin and chitosan. **Carbohydr. Polym.**, v. 41, p. 351-356, 2000.
63. JOSEPH, N.J.; LAKSHMI, S.; JAYAKRISHNAN, A. A floating-type oral dosage form for Piroxicam based on hollow polycarbonate microspheres: in vitro and in vivo evaluation in rabbits. **J. Controlled Release**, v. 79, p. 71-79, 2002.
64. **MARTINDALE**: the complete drug reference. 33 ed. London: Pharmaceutical Press, 2002.
65. KALLINTERI, P.; ANTIMISIARIS, S.G. Solubility of drugs in the presence of gelatin: effect of drug lipophylicity and degree of ionization. **Int. J. of Pharm.**, v. 221, p. 219-226, 2001.
66. SHENG, J. J.; KASIM, N. A.; CHANDRASEKHARAN, R.; AMIDON, G. L. Solubilization and dissolution of insoluble weak acid, ketoprofen: Effects of pH combined with surfactant. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 29, p. 306-314, 2006.
67. BERTOLUZZA, A.; ROSSI, M.; TADDEI, P.; REDENTI, E.; ZANOL, M.; VENTURA, P. FT-Raman and FT-IR studies of 1:2,5 piroxicam:β cyclodextrin inclusion compound. **J. Mol. Struct.**, v. 480-481, p. 535-539, 1999.

68. SHAKHTSHNEIDER, T.P. Phase transformations and stabilization of metastable states of molecular crystals under mechanical activation. **Solid State Ionics**, v. 101-103, p. 851-856, 1997.
69. VRECER, F.; VRBINC, M.; MEDEN, A. Characterization of piroxicam crystal modifications. **Int. J. Pharm.**, v. 256, p. 3-15, 2003.
70. BERCHANE, N. S.; CARSON, K. H.; RICE-FICHT, A. C.; ANDREWS, M. J. Effect of mean diameter and polydispersity of PLG microspheres on drug release: Experiment and theory. **Int. J. Pharm.**, v. 337, p. 118-126, 2007.
71. YAMADA, T.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Sustained release ketoprofen microparticles with ethylcellulose and carboxymethylethylcellulose. **J. Controlled Release**, v. 75, p. 271-282, 2001.
72. KAMEL, A. H.; SOKAR, M. S.; AL GAMAL, S. S.; NAGGAR, V. F. Preparation and evaluation of ketoprofen floating oral delivery system. **Int. J. Pharm.**, v. 220, p. 13-21, 2001.
73. ARIDA, A. I.; AL-TABAKHA, M. M. Encapsulation of ketoprofen for controlled drug release. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 66, p. 48-54, 2007.
74. AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
75. YANG, Y. Y. CHUNG, T. S.; BAI, X. L.; CHAN, W. K. Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. **Chem. Eng. Sci.**, v. 55, p. 2223-2236, 2000.
76. FREIBERG, S.; ZHU, X.X. Polymer microspheres for controlled drug release. **Int. J. Pharm.**, v. 282, p.1-18, 2004.
77. RICCI, M.; BLASI, P.; GIOVAGNOLI, S.; ROSSI, C.; MACCHIARULO, G.; LUCA, G.; BASTA, G.; CALAFIORE, R. Ketoprofen controlled release from composite microcapsules for cell encapsulation: Effect on post-transplant acute inflammation. **J. Controlled Release**, v. 107, p. 395-407, 2005.

78. IKEJIMA, T.; YOSHIE, N.; INOUE, Y. Influence of tacticity and molecular weight of poly(vinyl alcohol) on crystallization and biodegradation of poly(3-hydroxybutyric acid)/ poly(vinyl alcohol) blend films. **Polym. Degrad. Stab.**, v. 66, p. 263-270, 1999.

79. COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 13, p. 123-133, 2001.

80. OLIVEIRA, B. F.; SANTANA, M. H. A.; RÉ, M. I. Spray-dried chitosan microspheres cross-linked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation and characterization. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 22, n. 3, p. 353-360, 2005.

Publicações relacionadas com o tema da tese

Artigo

BAZZO, G. C.; LEMOS-SENN, E.; GONÇALVES, M. C.; PIRES, A. T. N. Effect of preparation conditions on morphology, drug content and release profiles of poly (hydroxybutyrate) microparticles containing piroxicam. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 19, n. 5, p. 914-921, 2008.

Trabalho completo publicado em anais de congressos

BAZZO, G. C.; LEMOS-SENN, E.; GONÇALVES, M. C.; PIRES, A. T. N. Effect of some processing conditions on the characteristics of poly (hydroxybutyrate)/piroxicam microparticles prepared by emulsion/solvent evaporation. In: XI International Macromolecular Colloquium, Gramado, RS. *Proceedings of 6th ISNAPOL and XI IMC*, 2007.

Resumo expandido publicado em anais de congressos

BAZZO, G. C.; LEMOS-SENN, E.; PIRES, A. T. N. Poly (hydroxybutyrate)/piroxicam microparticles prepared by emulsion/solvent evaporation: characterization and in vitro drug release. In: SBPMat 2006 - V Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, Florianópolis. *Journal of Materials Science*, 2006.

Resumos publicados em anais de congressos

BAZZO, G. C.; LEMOS-SENN, E.; PIRES, A. T. N. Poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) and PHB/Eudragit® E microparticles containing piroxicam: preparation and in vitro drug release. In: 5th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2005, Ribeirão Preto. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. São Paulo : Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, 2005. v. 41. p. 472-472.

BAZZO, G. C.; LEMOS-SENN, E.; PIRES, A. T. N. Preparation of ketoprofen loaded poly(hydroxybutyrate)/chitosan composite microspheres for controlled drug release. In: 2nd French-Brazilian Meeting on Polymers (FBPOL 2008), Florianópolis. *Livro de resumos*, 2008.
