



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

**DESENVOLVIMENTO DE MICROESFERAS A PARTIR DO POLI-(3-
HIDROXIBUTIRATO) E DIFERENTES ADJUVANTES DE FORMULAÇÃO
VISANDO O PROLONGAMENTO DA LIBERAÇÃO DO IBUPROFENO PARA O
TRATAMENTO LOCALIZADO DA ARTRITE**

JULIANA BIDONE

Florianópolis

2008



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

**DESENVOLVIMENTO DE MICROESFERAS A PARTIR DO POLI-(3-
HIDROXIBUTIRATO) E DIFERENTES ADJUVANTES DE FORMULAÇÃO
VISANDO O PROLONGAMENTO DA LIBERAÇÃO DO IBUPROFENO PARA O
TRATAMENTO LOCALIZADO DA ARTRITE**

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

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

JULIANA BIDONE

Florianópolis

2008

DESENVOLVIMENTO DE MICROESFERAS A PARTIR DO POLI-(3-HIDROXIBUTIRATO) E DIFERENTES ADJUVANTES DE FORMULAÇÃO VISANDO O PROLONGAMENTO DA LIBERAÇÃO DO IBUPROFENO PARA O TRATAMENTO LOCALIZADO DA ARTRITE

POR

JULIANA BIDONE

“Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de **Mestre em Farmácia** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina.”

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

Profa. Dra. Elenara M. T. Lemos-Senna
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski
Guterres – UFRGS

Prof. Dr. Alfredo Tíburcio Nunes
Pires -UFSC

Profa. Dra. Ângela Machado de
Campos - UFSC

À Martha e Daniela.

Agradecimentos

À Prof^a. Dr^a. Elenara Lemos-Senna pela oportunidade concedida, pela orientação e por possibilitar a concretização deste sonho.

A todas as Prof^{as}. do Laboratório de Farmacotécnica por terem desejado o sucesso deste trabalho, de forma explícita ou por um simples olhar de incentivo.

Ao Prof. Dr. Valdir Soldi e à Marli Soldi pela sempre presente disposição em ajudar e compartilhar seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Rogério Tonussi pelo acolhimento e carinho, e por viabilizar a realização de importantes segmentos deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alfredo Tibúrcio N. Pires e a todos os integrantes do Laboratório de Polímeros, por permitirem a utilização de seu laboratório, e principalmente, à querida Giovana, pela paciência, pelas conversas e por ter-me 'socorrido' inúmeras vezes.

Aos amigos do Laboratório de Neurobiologia da Nocicepção, seres humanos simplesmente incríveis e admiráveis.

Em especial, à Taty morena, não apenas por sua ajuda nos experimentos, mas por sua luz e a, sempre contagiante, alegria de viver. Por ser um exemplo de pesquisadora e de mulher.

Ao Prof. Dr. Marcos A. Segatto pelos primeiros ensinamentos na trajetória da pesquisa e por ter disponibilizado seu laboratório sempre que se fez necessário.

À Sandra e ao Nilson, exemplos de luta, trabalho e honestidade.

Aos amigos da Farmacotécnica, pela paciência extrema, pelo carinho, e por esta amizade reconfortante. Dani, Tati loira, Andréia e Cá, obrigada também pelas conversas (terapêuticas).

Aos amigos do Controle de Qualidade, da Farmacognosia, da Virologia Aplicada e de todos os cantos da UFSC, dos quais não cito nomes com receio de ser injusta, mas a quem deixo meus profundos agradecimentos por tudo, pelo carinho, atenção, paciência e, é claro, por todos os momentos de diversão e alegria.

A todos os demais amigos (de fora do mestrado), em especial à Simone e Raquel, pelo companheirismo, amizade, compreensão e por todas as longas conversas, regadas a vinho e sorrisos.

À Tica, companheira inseparável na redação desta dissertação.

E, em especial, à minha mãe Martha e à minha irmã Daniela por existirem e por sempre estarem ao meu lado, apesar de todas as dificuldades e diferenças.

*“Podemos escolher o que
semear, mas somos
obrigados a colher aquilo que
plantamos”.*
(Provérbio chinês)

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	XII
Lista de Figuras	XIV
Lista de Siglas e Abreviaturas	XVII
Resumo	XIX
Abstract	XX
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	21
1.1 Introdução	22
1.2 Objetivos	25
1.2.1 Objetivo Geral	25
1.2.2 Objetivos Específicos	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 Microencapsulação de fármacos	27
2.2 Polihidroxialcanoatos	31
2.2.1 Histórico dos PHAs	32
2.2.2 Biossíntese dos PHAs	34
2.2.3 Características químicas e físico-químicas dos PHAs	36
2.2.4 Degradação	38
2.2.5 Toxicidade e biocompatibilidade dos polihidroxialcanoatos	40
2.2.6 Aplicações do PHA em sistemas de liberação	42

2.3 Artrite Reumatóide	52
2.4 Ibuprofeno	57
3. MATERIAIS E MÉTODOS	61
3.1 Materiais	62
3.1.1 Matérias-primas	62
3.1.2 Reagentes e solventes	62
3.1.3. Equipamentos	62
3.2 Métodos : PARTE I - Avaliação do efeito da adição de trimiristato de glicerila sobre a liberação do ibuprofeno a partir de microesferas de poli (3-hidroxi-butirato).....	64
3.2.1 Preparação e caracterização das microesferas brancas e contendo ibuprofeno a partir de blendas de poli (3-hidroxi-butirato) e trimiristato de glicerila	64
3.2.1.1 Preparação das microesferas	64
3.2.1.2 Avaliação da viscosidade cinemática da fase interna	65
3.2.1.3 Caracterização das microesferas	66
3.2.1.3.1 Determinação da eficiência de encapsulação e teor de ibuprofeno nas microesferas	66
3.2.1.3.1.1 Curva de calibração do IBF em metanol	66
3.2.1.3.1.2 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de ibuprofeno...	67
3.2.1.3.2 Avaliação da morfologia das microesferas	68
3.2.1.3.3 Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC)	68
3.2.1.4 Avaliação do perfil de liberação do IBF a partir das microesferas	69
3.2.1.4.1 Curva de calibração do IBF em tampão fosfato 0,02 M pH 7,4	69

3.2.1.4.2 Determinação da solubilidade do IBF no meio de liberação	69
3.2.1.4.3 Avaliação do perfil de liberação do IBF em tampão fosfato 0,02 M pH 7,4	69
3.2.2 Preparação e avaliação da morfologia de filmes obtidos a partir de blendas de poli (3-hidroxi-butilato) e trimetacrilato de glicerila	70
3.2.2.1 Preparação dos filmes	70
3.2.2.2 Avaliação da morfologia dos filmes	70
 PARTE II - Efeito da adição de poli (D-L-ácido láctico)-co-poli(etileno glicol) (PLA-PEG) e gelatina (GEL) sobre as propriedades físico-químicas das partículas e sobre o perfil de liberação do ibuprofeno a partir de microesferas de poli(3-hidroxi-butilato)	 71
3.2.3 Preparação e caracterização das microesferas	71
3.2.3.1 Preparação das microesferas brancas e contendo ibuprofeno a partir de blendas de P(3HB) e PLA-PEG	71
3.2.3.2 Preparação das microesferas brancas e contendo ibuprofeno a partir do P(3HB) e gelatina	72
3.2.3.3 Caracterização físico-química das microesferas	73
3.2.3.3.1 Determinação da eficiência de encapsulação e teor de ibuprofeno nas microesferas	73
3.2.3.3.2 Avaliação da morfologia das microesferas	73
3.2.3.3.3 Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica das microesferas	74
3.2.3.3.4 Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC)	74
3.2.3.3.5 Difração de Raios-X	74
3.2.3.4 Avaliação do perfil de liberação do IBF a partir das microesferas	74

3.2.3.5. Preparação e avaliação da morfologia de filmes obtidos a partir de blendas de poli (3-hidroxi-butirato) e poli(D,L-ácido lático)- <i>b</i> -polietilenoglicol	75
3.2.3.5.1 Preparação dos filmes	75
3.2.3.5.2 Avaliação da morfologia dos filmes	76
PARTE III- Avaliação preliminar da eficácia terapêutica <i>in vivo</i> do ibuprofeno liberado a partir das microesferas em modelo de artrite crônica induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA)	77
3.2.4 Animais	77
3.2.5 Protocolos Experimentais	77
3.2.5.1 Indução da artrite crônica pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA)	77
3.2.5.2 Avaliação da incapacitação articular	78
3.2.5.3 Avaliação do edema articular	79
3.2.5.4 Leucograma do fluido sinovial	79
3.2.6 Avaliação da resposta terapêutica do ibuprofeno após administração i.a. das microesferas	80
3.2.7 Análise estatística dos resultados	81
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
PARTE I - Efeito da adição de trimiristato de glicerila sobre a liberação do ibuprofeno a partir de microesferas de poli (3-hidroxi-butirato)	83
4.1 Preparação e caracterização das microesferas	83

4.1.1 Determinação da eficiência de encapsulação e teor de ibuprofeno nas microesferas	84
4.1.2 Caracterização físico-química	88
4.1.2.1 Avaliação da morfologia das microesferas	88
4.1.2.2 Avaliação da morfologia dos filmes	95
4.1.2.3 Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC)	97
4.1.3 Avaliação do perfil de liberação do IBF a partir das microesferas	100

PARTE II - Efeito da adição de poli(D,L-ácido láctico)-<i>b</i>-poli(etilenoglicol) (PLA-PEG) e gelatina (GEL) sobre as propriedades físico-químicas e sobre o perfil de liberação do ibuprofeno a partir de microesferas de poli (3-hidroxibutirato)	105
--	------------

4.2 Preparação e caracterização das microesferas a partir de blendas de P(3HB) e PLA-PEG	105
4.2.1 Determinação da eficiência de encapsulação e teor de ibuprofeno nas microesferas	106
4.2.2 Caracterização físico-química	108
4.2.2.1 Avaliação da morfologia das partículas.....	108
4.2.2.2 Avaliação da morfologia de filmes de P(3HB) e de blendas	111
4.2.2.3 Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC)	111
4.2.2.4 Difração de Raio-X	115
4.2.3 Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica das microesferas	120
4.2.4 Avaliação do perfil de liberação do IBF a partir das microesferas	121

PARTE III - Avaliação preliminar da eficácia terapêutica <i>in vivo</i> do ibuprofeno liberado a partir das microesferas em modelo de artrite crônica induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA)	129
4.3 Avaliação da eficácia terapêutica do ibuprofeno liberado a partir das microesferas	129
5. CONCLUSÕES	133
6. BIBLIOGRAFIA	136

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Fatores que demonstraram afetar a velocidade de liberação de fármacos a partir de micropartículas de PHAs, preparadas pela técnica de emulsão evaporação do solvente	43
TABELA 2 Solubilidade aproximada do ibuprofeno em temperatura ambiente	58
TABELA 3 Composição das microesferas preparadas a partir de blendas de P(3HB) e TMG	66
TABELA 4 Composição das microesferas preparadas a partir de blendas de P(3HB) e PLA-PEG	71
TABELA 5 Composição das formulações de microesferas preparadas a partir do P(3HB) e gelatina 10:1	73
TABELA 6 Delineamento dos grupos de animais utilizados para avaliar a resposta terapêutica com ibuprofeno liberado a partir das microesferas	80
TABELA 7 Análise dos dados da regressão obtidos a partir da curva de calibração do ibuprofeno por espectrofotometria de absorção no ultravioleta	85
TABELA 8 Valores de eficiência de encapsulação e de teor de ibuprofeno nas microesferas	86
TABELA 9 Análise da variância obtida a partir dos valores de teor de fármaco	87
TABELA 10 Valores da diferença entre as médias dos teores de IBF (mg/ 100mg microesferas) para as formulações	87
TABELA 11 Viscosidade cinemática de soluções de P(3HB) e trimiristato de glicerila em clorofórmio das microesferas e das matérias primas utilizadas	90
TABELA 12 Resultados da análise por calorimetria exploratória diferencial	100
TABELA 13 Análise dos dados da regressão obtidos a partir da curva de calibração do ibuprofeno por espectrofotometria de absorção no ultravioleta	101
TABELA 14 Valores eficiência de encapsulação e de teor de ibuprofeno nas microesferas	107
TABELA 15 Análise da variância obtida a partir dos valores de teor de fármaco .	107
TABELA 16 Valores da diferença entre as médias dos teores de IBF (mg/ 100 mg microesferas) obtidas para as formulações	108

TABELA 17 Resultados obtidos por análise de calorimetria exploratória diferencial das microesferas e das matérias primas utilizadas	113
TABELA 18 Resultados obtidos por análise de calorimetria exploratória diferencial das microesferas e das matérias primas utilizadas	114
TABELA 19 Intensidade dos picos de difração de raios-X obtidos a partir dos difratogramas do fármaco, P(3HB), PLA-PEG e microesferas brancas e contendo IBF.....	119
TABELA 20 Resultados obtidos por difração a laser para diâmetro médio e distribuição granulométrica das microesferas	121
TABELA 21 Análise da variância referente aos valores de percentagem obtidos na primeira hora de ensaio de liberação	123
TABELA 22 Valores de diferença entre as médias do percentual de IBF liberado após uma hora	124
TABELA 23 Análise da variância obtida a partir dos valores de AUC dos perfis de liberação, obtidas após 96 horas de ensaio	125
TABELA 24 Valores da diferença entre as médias das áreas sob as curvas dos perfis obtidos após 96 horas	125
TABELA 25 Dados de regressão obtidos após aplicação do modelo de Baker-Lonsdale nos perfis de liberação do ibuprofeno a partir das microesferas	127

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Rota metabólica para síntese de PHAs	35
FIGURA 2 Estrutura geral dos polihidroxicanoatos	37
FIGURA 3 Esquema do tratamento da artrite reumatóide	56
FIGURA 4 Estrutura química do ibuprofeno	57
FIGURA 5 Esquema ilustrativo da preparação das microesferas pelo método de emulsão/evaporação do solvente	65
FIGURA 6 Esquema ilustrativo da preparação de microesferas de P(3HB) e gelatina	72
FIGURA 7 (A) Ratas com as sapatilhas metálicas e (B) cilindro de aço inox utilizado na determinação da incapacitação articular através da medida do tempo de elevação da pata (TEP,s)	78
FIGURA 8 Medida do diâmetro articular com auxílio de um paquímetro não-digital	79
FIGURA 9 Estrutura química do trimiristato de glicerila	84
FIGURA 10 Curva de calibração do ibuprofeno em metanol obtida por espectrofotometria de absorção no ultravioleta	85
FIGURA 11 Micrografias obtidas por MEV das microesferas contendo fármaco IBF preparadas com solvente clorofórmio a partir de (a) P(3HB), (b) P(3HB):TMG 9:1, (c) P(3HB):TMG 4:1, (d) P(3HB):TMG 3:1 e (e) P(3HB):TMG 1:1, em aumento de 1000 vezes	89
FIGURA 12 Micrografias obtidas por MEV das microesferas brancas preparadas com solvente diclorometano a partir de (a) P(3HB), (b) P(3HB):TMG 9:1, (c) P(3HB):TMG 4:1, (d) P(3HB):TMG 3:1 e (e) P(3HB):TMG 1:1, em aumento de 1000 vezes.....	92
FIGURA 13 Micrografias obtidas por MEV das microesferas contendo fármaco IBF preparadas com solvente diclorometano a partir de (a) P(3HB), (b) P(3HB):TMG 9:1, (c) P(3HB):TMG 4:1, (d) P(3HB):TMG 3:1 e (e) P(3HB):TMG 1:1, em aumento de 1000 vezes.....	93
FIGURA 14 Micrografias obtidas por MEV das microesferas de P(3HB):TMG 3:1 brancas preparadas utilizando diclorometano como solvente e (a) com e (b) sem adição de álcool isopropílico na fase externa da emulsão, em aumento de 1000 vezes.....	94

FIGURA 15 Micrografias obtidas por MEV da superfície e da fratura de filmes obtidos a partir do (a) P(3HB), (b) P(3HB):TMG 9:1, (c) P(3HB):TMG 4:1, (d) P(3HB):TMG 3:1 e (e) P(3HB):TMG 1:1, usando clorofórmio como solvente..... **96**

FIGURA 16 Micrografias obtidas por MEV da superfície e da fratura de filmes preparados a partir do (a) P(3HB) e (b) P(3HB):TMG 3:1, usando diclorometano como solvente **97**

FIGURA 17 Termogramas obtidos por DSC após análise do (a) IBF, (b) P(3HB), (c) TMG, (d) Microesferas P(3HB) brancas, (e) Microesferas P(3HB) com IBF, (f) Mistura física de P(3HB), TMG e IBF, (g) Microesferas P(3HB):TMG 3:1 brancas e (h) Microesferas P(3HB): TMG 3:1 com IBF..... **98**

FIGURA 18 Curva de calibração do ibuprofeno em tampão fosfato 0,02M pH 7,4, obtida por espectrometria de absorção no ultravioleta..... **101**

FIGURA 19 Perfis de liberação obtidos a partir das microesferas preparadas usando (a) clorofórmio e (b) diclorometano como solvente da fase interna **103**

FIGURA 20 Micrografias obtidas por MEV das microesferas obtidas a partir de (a) P(3HB) e (b) P(3HB):TMG 3:1 em clorofórmio e (c) P(3HB):TMG 3:1 em diclorometano, após sete dias do início do ensaio de liberação **104**

FIGURA 21 Estrutura química do PLA-PEG. n = unidades de etileno glicol, m = unidades de ácido láctico..... **106**

FIGURA 22 Micrografias obtidas por MEV das microesferas brancas preparadas a partir do (a) P(3HB), (b) P(3HB):PLA-PEG 3:1, (c) P(3HB):PLA-PEG 1:1, (d) P(3HB):gelatina, (e) P(3HB):gelatina (etanol) **109**

FIGURA 23 Micrografias obtidas por MEV das microesferas contendo IBF preparadas a partir do (a) P(3HB), (b) P(3HB):PLA-PEG 3:1, (c) P(3HB):PLA-PEG 1:1, (d) P(3HB):gelatina e (e) P(3HB):gelatina (etanol). **110**

FIGURA 24 Micrografias obtidas por MEV da superfície e da fratura de filmes de P(3HB):PLA-PEG 3:1 **111**

FIGURA 25 Termogramas obtidos por DSC para (a) IBF, (b) P(3HB), (c) PLA-PEG, (d) Mistura física de P(3HB), PLA-PEG e IBF, (e) Microesferas P(3HB) brancas, (f) Microesferas P(3HB):PLA-PEG 3:1 brancas, (g) Microesferas P(3HB) com IBF, (h) Microesferas P(3HB): PLA-PEG 3:1 com IBF..... **112**

FIGURA 26 Termogramas obtidos por DSC para (a) IBF, (b) P(3HB), (c) Gelatina; (d) Mistura física de P(3HB), gelatina e IBF, (e) Microesferas P(3HB):gelatina 10:1 brancas e (f) Microesferas P(3HB): gelatina 10:1 com IBF..... **115**

FIGURA 27 Difractogramas obtidos após análise do (a) ibuprofeno, (b) P(3HB), (c) microesferas de P(3HB) brancas e (d) microesferas de P(3HB) contendo IBF **116**

FIGURA 28 Difractogramas obtidos após análise do (a) ibuprofeno, (b) P(3HB), (c) PLA-PEG, (d) microesferas P(3HB):PLA-PEG 3:1 brancas, (e) microesferas P(3HB):PLA-PEG 1:1 brancas, (f) microesferas de P(3HB):PLA-PEG 3:1 com IBF e (g) microesferas P(3HB):PLA-PEG 1:1 com IBF..... **117**

FIGURA 29 Difractogramas obtidos após análise do (a) ibuprofeno, (b) P(3HB), (c) microesferas P(3HB): gelatina 10:1 brancas e (d) microesferas de P(3HB):gelatina 10:1 com IBF..... **118**

FIGURA 30 Histograma da distribuição granulométrica das microesferas obtidas a partir de P(3HB), P(3HB):gelatina 10:1, P(3HB):gelatina 10:1 (etanol), P(3HB):PLA-PEG 3:1 e P(3HB):PLA-PEG 1:1 **121**

FIGURA 31 Perfis de liberação obtidos a partir de microesferas P(3HB) puro , P(3HB):gelatina 10:1, P(3HB):gelatina 10:1 (etanol), P(3HB):PLA-PEG 3:1, P(3HB):PLA-PEG 1:1 e ibuprofeno livre, após (a) 168 horas e (b) 24 horas de ensaio..... **123**

FIGURA 32 Gráfico obtido após aplicação do modelo Baker-Lonsdale nos perfis de liberação do IBF a partir das microesferas de P(3HB), P(3HB):GEL 10:1, P(3HB):GEL 10:1(etanol), P(3HB):PLA-PEG 3:1 e P(3HB):PLA-PEG 1:1..... **127**

FIGURA 33 Micrografias obtidas por MEV das microesferas de (a) P(3HB):PLA-PEG 3:1, (b) P(3HB):PLA-PEG 1:1, (c) P(3HB):GEL e (d) PHB:GEL(etanol), após sete dias do início do ensaio de liberação **128**

FIGURA 34 Avaliação da resposta antinociceptiva de microesferas contendo ibuprofeno através da medida de incapacitação articular. Os resultados estão expressos como média e erro padrão da média ($M \pm E.P.M$) de 6 ratos por grupo. Análise estatística (ANOVA de uma via seguida de *post-hoc* de Tukey) **130**

FIGURA 35 Avaliação do aumento do diâmetro articular de microesferas contendo ibuprofeno. Os resultados estão expressos como média e erro padrão da média ($M \pm E.P.M$) de 6 ratos por grupo. Análise estatística (ANOVA de uma via seguida de *post-hoc* de Tukey). *** e ## indicam diferença estatística entre os grupos tratados com micropartículas de ibuprofeno e salina ($p < 0.001$) e os grupos tratados com micropartículas de ibuprofeno e ibuprofeno livre ($p < 0.01$) **131**

FIGURA 36 Avaliação da migração celular de microesferas contendo ibuprofeno. Os resultados estão expressos como média e erro padrão da média ($M \pm E.P.M$) de 6 ratos por grupo. Análise estatística (ANOVA de uma via seguida de *post-hoc* de Tukey) **132**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ΔHexp	variação da entalpia de fusão experimental
3HB	3- hidroxibutirato
3HHx	3-hidroxihexanoato
3HV	3-hidroxivalerato
4HB	4- hidroxibutirato
Å	angstron
a/o	água em óleo
a/o/a	água em óleo em água
AINES	antinflamatórios não-esteroidais
ANOVA	análise de variância
AR	artrite reumatóide
AUC	área sob a curva
COX	ciclooxigenase
Cst	centistokes
d.m.s	diferença mínima significativa
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EBV	vírus Epstein-Barr
F	valor de F calculado
F crítico	valor de F tabelado ao nível de significância de 5%
gl	grau de liberdade
HA	hidroxiácido
IBF	ibuprofeno
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MQ	média dos quadrados
o/a	óleo em água

o/o	óleo em óleo
P(3HB)	poli-(3-hidroxi-butirato)
P(3HB)a	poli [(R,S)-3-hidroxi-butirato] atático
P(3-HB-co-HV)	poli-(3-hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato)
P(3HV)	poli-(3-hidroxi-valerato)
p/p	peso por peso
p/v	peso por volume
PCL	policaprolactona
PEG	poli(etilenoglicol)
PGs	prostaglandinas
PHAs	polihidroxi-álcanoatos
PHBHHx	poli(hidroxi-butirato-co-hidroxi-hexanoato)
PLA	poli-(ácido láctico)
PLAGA	poli(ácido láctico- co-glicólico)
PLA-PEG	poli-(D-L-ácido láctico)- <i>b</i> -poli(etilenoglicol)
PVA	álcool polivinílico
r²	coeficiente de regressão
RPM	rotações por minuto
s	desvio padrão
s/o/a	sólido em óleo em água
SQ	soma dos quadrados
Tg	temperatura de transição vítrea
Tm	temperatura de fusão
TMG	trimiristato de glicerila
Xc	grau de cristalinidade relativo
TEP	tempo de elevação da pata
DA	diâmetro articular

RESUMO

Poli(hidro)álcanoatos (PHAs) são poliésteres biodegradáveis e biocompatíveis, produzidos por uma ampla variedade de microorganismos e estocados como fonte de carbono e energia. Poli-(3-hidroxi)butirato (P(3HB)) é o membro mais comum desta família e tem sido usado na obtenção de carreadores de fármacos. Na maior parte dos casos, a liberação de fármacos a partir de microesferas de P(3HB) ocorre em taxas excessivas e tem sido assumido que o fenômeno de liberação é mais dependente da velocidade de dissolução do fármaco do que da degradação da matriz. A estratégia de misturar diferentes materiais em uma formulação pode ser empregada para modificar as propriedades físico-químicas de microesferas e controlar a liberação. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da formação de blendas de P(3HB) com trimiristato de glicerila (TMG) ou poli (D,L-ácido láctico)-*b*-poli (etilenoglicol) (PLA-PEG) e da obtenção de partículas compostas de P(3HB) e gelatina (GEL) sobre as características físico-químicas das microesferas e o perfil de liberação do ibuprofeno. O método de emulsão/evaporação do solvente foi empregado no preparo das microesferas de P(3HB):TMG (9:1, 4:1, 3:1 e 1:1) e P(3HB):PLA-PEG (3:1 e 1:1), usando clorofórmio ou diclorometano/ álcool isopropílico como solventes. As microesferas de P(3HB):GEL 10:1 foram preparadas usando o procedimento de dupla emulsão/evaporação do solvente. Elevados valores de eficiência de encapsulação foram verificados em todas as formulações testadas. Partículas esféricas e de superfície rugosa, apresentando diâmetro médio entre 21,93 e 41,55 µm, foram obtidas. A utilização de diclorometano e o aumento da proporção de TMG na blenda conduziram à redução da porosidade das partículas. Entretanto, os estudos de liberação em tampão fosfato 0,02 M pH 7,4 mostraram que a associação de P(3HB) e TMG não conduz ao controle de liberação do IBF, a qual foi bastante pronunciada na primeira hora de ensaio. Elevados valores de liberação inicial (*efeito burst*) também foram observados nas microesferas preparadas a partir das blendas de P(3HB) e PLA-PEG 3:1 e P(3HB):GEL 10:1. Neste último caso, a adição de etanol acelerou a liberação do IBF, indicando que a adição do solvente afeta a localização do fármaco na matriz. As análises por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios-x indicaram a redução da cristalinidade do P(3HB) somente quando a blenda P(3HB):PLA-PEG 1:1 foi testada. Entretanto, independente das condições de preparo das microesferas, o IBF pareceu estar parcialmente disperso na sua forma amorfa ou molecular na matriz. Apesar da utilização da blenda de P(3HB) e PLA-PEG 1:1 ter conduzido à redução da cristalinidade, a velocidade de liberação foi mais prolongada quando as microesferas de P(3HB):PLA-PEG 3:1 foram testadas, sugerindo que o grau de hidratação da matriz pode ter interferido na cinética de liberação. A avaliação *in vivo* do ibuprofeno encapsulado nas microesferas de P(3HB):PLA-PEG 3:1 foi conduzida em ratos artríticos (modelo CFA). Os resultados obtidos indicaram redução do edema articular e da migração celular após administração das microesferas contendo IBF, quando comparado aos grupos tratados com IBF livre e microesferas brancas, respectivamente.

Palavras-chave: microesferas, poli-(3-hidroxi)butirato), ibuprofeno, liberação controlada, blendas poliméricas, compósitos.

ABSTRACT

Title: Development of microspheres from poly-(3-hydroxybutyrate) and different formulation adjuvants aiming to prolong the release of the ibuprofen for local treatment of arthritis

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biodegradable and biocompatible polyesters produced by a wide variety of microorganisms, which are accumulated by the bacteria as an energy and carbon storage material. Poly-(3-hydroxybutyrate) (P(3HB)) is the most common member of this family, and it has been used to obtain polymer-based drug carriers. In most of the cases, the release of drugs from P(3HB) microspheres occurs at excessive rates and it has been assumed that the release phenomenon is more dependent on drug dissolution rather than on matrix degradation. The strategy of blending multiple polymers in a formulation may be employed to modify physicochemical properties of microspheres and control drug release. The aim of this study was to evaluate the effect of blending P(3HB) and glyceryl trimyristate (TMG) or poly(D,L-lactide)-*b*-polyethylene glycol (PLA-PEG), and of preparing P(3HB) and gelatin (GEL) composites on IBF release rate from microspheres. P(3HB), P(3HB):TMG (9:1, 4:1, 3:1 and 1:1) and P(3HB):PLA-PEG (3:1 or 1:1) microspheres were prepared by a single emulsion/evaporation method, using chloroform or methylene chloride/isopropilic alcohol as solvent. P(3HB):GEL (10:1) composite microspheres were prepared using a double emulsion/evaporation process. The encapsulation efficiency was high in all tested formulations. Spherical particles displaying rough surface and mean diameter ranging from 21.93 μm to 41.55 μm were obtained. The increasing of TMG ratio in the blend lead to the reduction of the particle porosity in a concentration-dependent manner, since the microspheres prepared from a PHB:TMG ratio of 1:1 were less porous than those obtained from PHB:TMG ratio of 9:1. However, even though the addition of glyceryl trimyristate in the internal phase of the emulsion to have resulted in a noticeable reduction of the particle porosity, the association of P(3HB) and TMG did not allow the control of IBF release, which was very quick in the first hour of assay. *Burst effect* was also observed in the IBF release profiles obtained from P(3HB):PLA-PEG 3:1 and P(3HB):GEL 10:1 microspheres. Upon ethanol addition, a faster IBF release was verified from P(3HB)/GEL composite microspheres, indicating that the solvent addition affects the location of the drug in the matrix. DSC and XRD analyses indicated the reduction of the crystallinity degree of the P(3HB) only when the 1:1 P(3HB):PLA-PEG blend was used to prepare the microspheres. However, independent of the conditions under which microspheres were prepared, the IBF appeared to be partially dispersed in its amorphous or molecular form in the matrix. Although the reduction of the crystallinity degree of P(3HB) has been verified in 1:1 P(3HB):PLA-PEG microspheres, the IBF release rate was more prolonged from 3:1 P(3HB):PLA-PEG microspheres, indicating that the matrix hydration degree had played an important role in the release kinetic. The *in vivo* evaluation of ibuprofen-loaded 3:1 P(3HB):PLA-PEG microspheres was carried out in arthritic rats (CFA model). The articular edema and the cell migration were significantly reduced after IBF-loaded microspheres administration, when compared with the groups treated with IBF alone and unloaded microspheres, respectively.

Keywords: microspheres, poly-(3-hydroxybutyrate), ibuprofen, controlled release, polymer blends, composites.

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

A preocupação com o sucesso de tratamentos realizados com fármacos de características singulares, como toxicidade elevada, estreita faixa terapêutica, rápida metabolização, ou que precisam ser empregados em esquemas terapêuticos de longa duração, levou os pesquisadores do setor farmacêutico a buscarem novas alternativas de administração, além daquelas consideradas convencionais. Este interesse torna-se ainda mais pertinente quando se trata de fármacos de uso contínuo, destinados à terapia de doenças crônico-degenerativas. Neste contexto, as micropartículas têm sido bastante estudadas, pois oferecem um importante meio de controlar a liberação dos fármacos, por meio do emprego de uma ampla variedade de materiais poliméricos e de metodologias para a sua obtenção (WATTS *et al.*, 1990; FREIBERG, ZHU, 2004; FREITAS, MERKLE, GANDER, 2005).

A flexibilidade de se projetar e selecionar polímeros com características únicas, capazes de se adequarem a diferentes situações, garante uma ampla aplicabilidade destes materiais na medicina. Dentre os materiais poliméricos, destacam-se os polímeros biodegradáveis, que podem ser usados, por exemplo, na substituição temporária de tecidos ou como sistemas de liberação de fármacos (ORÉFICE, 2008). De acordo com a forma de obtenção, os polímeros biodegradáveis podem ser classificados em duas categorias, sintéticos e naturais. Dentre os polímeros sintéticos mais utilizados estão o poli (ácido glicólico) (PGA), o poli (ácido láctico) (PLA), os copolímeros do ácido láctico e glicólico (PLAGA) e a policaprolactona (PCL). Tais polímeros, pertencentes à classe dos poliésteres alifáticos, sofrem hidrólise química ou enzimática de suas ligações ésteres no meio fisiológico, formando produtos de degradação que são metabolizados e eliminados do organismo. Em alternativa ao uso destes polímeros consideram-se os polihidroxicanoatos (PHAs). Tais polímeros são poliésteres de hidróxiácidos estereoregulares e opticamente ativos, não sendo produzidos por síntese química, mas biossinteticamente por bactérias a partir de matérias primas naturais. Os membros mais comuns da família dos PHAs são o poli-(3-hidroxi butirato) (P(3HB)) e o copolímero poli-(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (P(3HB-co-3HV)) (VERHOOGT, RAMSAY, FAVIS, 1994; ZINN *et al.*, 2001).

No Brasil, a produção de PHAs teve início na década de 90, por meio de um projeto cooperativo entre o Instituto de Pesquisa e Tecnologia (IPT), Copersucar e Universidade de São Paulo, usando carboidratos como material de partida, em especial o açúcar de cana (IPT, 2008). Desde então, a produção nacional destes polímeros tem aumentado consideravelmente, tornando o Brasil o único país produtor de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) da América Latina. Estes polímeros têm sido produzidos a partir de matérias-primas de baixo custo, fato que, em conjunto com suas características de biodegradabilidade e biocompatibilidade, torna-os materiais promissores no que se refere ao desenvolvimento de medicamentos inovadores.

A degradação hidrolítica do P(3HB) leva à formação do monômero ácido D(-)-3-hidroxi-butírico, um constituinte normal do sangue. No entanto, apesar das suas vantagens, a utilização do P(3HB) torna-se limitada por sua lenta velocidade de biodegradação e alta estabilidade hidrolítica nos tecidos. A degradação hidrolítica do P(3HB) em condições fisiológicas pode levar meses e está relacionada com a sua elevada cristalinidade e natureza hidrofóbica das cadeias alquílicas (RENARD *et al.*, 2003). A elevada cristalinidade é responsável também pela grande porosidade observada nas matrizes obtidas a partir do P(3HB), o que torna difícil o controle da liberação. Um recente estudo realizado por Carmingan (2006) demonstrou uma rápida liberação do ibuprofeno a partir de microesferas de P(3HB), ou seja, cerca de 70%, na primeira hora de ensaio, contrastando com a liberação de unicamente 25% do fármaco encapsulado a partir das microesferas de PLGA. Neste caso, a velocidade de liberação do ibuprofeno foi claramente dependente da cristalinidade da matriz polimérica empregada, sugerindo também que a localização do fármaco na partícula depende deste parâmetro. A melhor dispersão do fármaco, encontrada nos sistemas matriciais amorfos, e o aumento da interação fármaco-polímero podem ser considerados fatores determinantes no controle da velocidade de liberação (FREIBERG & ZHU, 2004).

A associação de polímeros em sistemas matriciais tem se mostrado uma estratégia promissora para a obtenção de novos materiais com melhor desempenho. Essas misturas, denominadas blendas, permitem a obtenção de materiais com propriedades diferentes às dos componentes puros, sendo efetivas para alterar as propriedades físicas e mecânicas de cada polímero individualmente. Desta maneira, as características físico-químicas das microesferas de P(3HB) podem ser

modificadas por meio da obtenção de blendas com outros materiais, na busca da modulação do perfil de liberação de fármacos (BHATT, SHAH, TRIVEDI, 2008). Outra estratégia que tem sido adotada para a alteração da cinética de liberação de substâncias ativas encapsuladas em sistemas matriciais consiste na obtenção de partículas compostas, ou seja, compósitos. Materiais compósitos podem ser definidos como materiais formados de dois ou mais constituintes com distintas composições, estruturas e propriedades e que estão separados por uma interface. O objetivo principal em se produzir compósitos é de combinar diferentes materiais para produzir um único dispositivo com propriedades superiores às dos componentes unitários (YU, DEAN, LI, 2006).

Neste contexto, ambas estratégias de formação de blendas e de obtenção de partículas compostas foram estudadas neste trabalho, visando a modulação do perfil de liberação do ibuprofeno a partir das microesferas de P(3HB). O ibuprofeno é um antiinflamatório não esteroidal (AINE) utilizado para o tratamento da osteoartrite e artrite reumatóide aguda e crônica. Devido a sua meia vida biológica relativamente curta (1 a 3 horas) e aos seus efeitos colaterais indesejáveis, o ibuprofeno é um potencial candidato para a utilização em sistemas de liberação prolongada. Além disso, especial interesse tem sido dado à administração intra-articular de AINES, como alternativa ao uso de corticosteróides. Entretanto, seu curto tempo de meia-vida no líquido sinovial faz com que eles tenham que ser administrados várias vezes, para a manutenção dos níveis terapêuticos. Assim, o triglicerídeo trimiristato de glicerila, o polímero em bloco poli-(ácido lático-*b*-polietilenoglicol) e a gelatina, materias adequados à administração parenteral, foram testados para a obtenção de blendas e/ou partículas compostas. Com estas estratégias buscou-se mudar as características das partículas convencionais de P(3HB) e, conseqüentemente, a velocidade de liberação do ibuprofeno a partir das mesmas. As características físico-químicas das microesferas obtidas e os perfis de liberação do ibuprofeno foram avaliados e comparados.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver microesferas a partir de blendas e/ou compósitos de P(3HB) com outros materiais, visando a liberação prolongada do IBF nas articulações, para o tratamento da artrite.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- * Preparar microesferas de ibuprofeno a partir de blendas de P(3HB) e trimiristato de glicerila ou poli(D-L-ácido láctico)-*b*-poli(etilenoglicol) pela técnica de emulsão/evaporação do solvente;
- * Preparar microesferas compostas de ibuprofeno, utilizando a técnica de dupla emulsão/evaporação do solvente, a partir de P(3HB) e gelatina;
- * Caracterizar as microesferas de ibuprofeno quanto a tamanho, morfologia, propriedades térmicas, eficiência de encapsulação e teor do fármaco;
- * Avaliar e comparar a cristalinidade do polímero e fármaco nas diferentes formulações de microesferas;
- * Avaliar os perfis de liberação do ibuprofeno *in vitro* a partir das microesferas;
- * Comparar os resultados obtidos com as diferentes formulações no que se refere a velocidade de liberação do fármaco;
- * Aplicar um modelo matemático aos perfis de liberação do ibuprofeno a partir das microesferas;
- * Selecionar a formulação com as melhores características e avaliar sua eficácia terapêutica, por via intra-articular, em modelo de artrite crônica induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA) em ratos *Wistar*, comparando com a administração do fármaco livre pela via intra-articular.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microencapsulação de fármacos

A resposta biológica de um fármaco é resultante de sua interação com os receptores celulares ou sistemas enzimáticos importantes e, por conseqüência, da alteração de processos biológicos presentes anteriormente à administração do medicamento. A magnitude da resposta está relacionada à concentração do fármaco que alcança o sítio de ação que, por sua vez, depende da dose administrada e da velocidade e extensão de sua absorção e eliminação (ANSEL, POPOVICH, ALLEN, 2007).

De modo geral, a administração de fármacos em formas farmacêuticas convencionais leva ao rápido aumento da concentração plasmática dos mesmos (FREIBERG & ZHU, 2004). Após um período relativamente curto em níveis terapêuticos, a concentração plasmática do fármaco cai, havendo necessidade de uma nova administração do medicamento. A administração de uma nova dose produz um segundo pico plasmático e assim sucessivamente, gerando flutuações na concentração do fármaco e o aparecimento de efeitos tóxicos (SWARBRICK & BOYLAN, 1990). Assim, especialmente nos casos em que esquemas terapêuticos de longa duração são empregados, sobretudo com fármacos que são rapidamente metabolizados, a utilização de especialidades farmacêuticas que permitam a liberação contínua dos mesmos torna-se desejável. A administração de formas farmacêuticas de liberação prolongada permite a redução do número de doses diárias, a manutenção das concentrações plasmáticas em níveis terapêuticos e a redução dos efeitos colaterais, além de favorecer a adesão do paciente ao tratamento (WATTS *et al.*, 1990).

Neste contexto, a microencapsulação de fármacos, empregando polímeros naturais ou sintéticos, tem sido considerada uma boa estratégia para a obtenção de formas farmacêuticas de liberação prolongada. O processo de microencapsulação consiste em encapsular sólidos ou líquidos dentro de matrizes compactas ou reservatórios poliméricos, sendo tais partículas denominadas de microesferas e microcápsulas, respectivamente (WATTS *et al.*, 1990). As micropartículas apresentam diâmetro médio variando entre um a algumas centenas

de micrômetros, sendo o fármaco liberado por mecanismos de difusão e/ou de degradação do material polimérico. Apesar do objetivo principal da microencapsulação ser o prolongamento da liberação, a curta meia-vida biológica e a baixa biodisponibilidade dos fármacos também podem ser contornadas quando as micropartículas são administradas diretamente no tecido alvo, com redução da absorção sistêmica (THOMPSON *et al.*, 2007).

Várias técnicas são descritas na literatura para a preparação de micropartículas, permitindo uma ampla adequabilidade no que se refere às diferentes classes de medicamentos. Para a obtenção de microesferas, o método de emulsificação seguida da evaporação do solvente tem sido freqüentemente empregado face à simplicidade dos procedimentos envolvidos e à possibilidade de modulação das características físicas e físico-químicas das partículas por meio da escolha dos componentes da formulação e das condições de preparação (BHARDWAJ *et al.*, 1995; KHIDR *et al.*, 1998). Neste método, o fármaco é dissolvido ou disperso em uma solução do polímero em um solvente orgânico volátil. A fase orgânica é então emulsificada em uma fase aquosa, contendo um estabilizante da dispersão. O solvente é removido da fase interna pela aplicação de calor, vácuo (DEASY, 1984; WATTS *et al.*, 1990), ou ainda, pela sua evaporação em temperatura ambiente, que pode ser acelerada pela adição de um solvente extrator (VILA JATO, 1997). As microesferas formadas são separadas por filtração ou centrifugação, lavadas com solvente adequado e secas sob condições apropriadas ou liofilizadas (JAIN, 2000). Apesar da simplicidade dos procedimentos envolvidos, a formação das microesferas pode ser influenciada por diversos fatores, destacando-se, entre eles, agitação e natureza do estabilizante e dos solventes empregados na preparação. A capacidade de dissolução do polímero e, preferencialmente, de dissolução do fármaco são características desejáveis do solvente da fase interna. Além dessas características, o solvente deve ser imiscível na fase contínua e apresentar baixo ponto de ebulição. A fim de garantir a formação das partículas e proporcionar uma elevada taxa de encapsulação, o fármaco e o polímero também devem ser insolúveis na fase externa (WATTS *et al.*, 1990).

A eficiência de encapsulação do fármaco é estimada como sendo a diferença percentual entre a concentração inicialmente adicionada na formulação e a concentração associada às partículas. Desta maneira, quando a técnica de emulsão/

evaporação do solvente é utilizada, a eficiência de encapsulação é fortemente influenciada pelo coeficiente de partição do fármaco entre a fase interna e externa da emulsão. Fármacos caracterizados por apresentar baixa hidrossolubilidade podem ser encapsulados com sucesso pela formação de uma emulsão óleo em água (o/a). Entretanto, quando fármacos que apresentam elevada hidrossolubilidade são utilizados, baixas taxas de encapsulação têm sido observadas. Neste caso, a encapsulação pode ser realizada por meio da formação de uma emulsão água em óleo (a/o), onde um solvente polar contendo o fármaco e o polímero é emulsificado em uma fase oleosa, como o óleo mineral (SHUKLA *et al.*, 1989), ou pela formação de uma emulsão múltipla (a/o/a), em que uma fase aquosa contendo o fármaco é dispersa em uma solução do polímero no solvente volátil, e a emulsão (a/o) resultante é, por sua vez, dispersa em uma segunda fase aquosa (OGAWA *et al.*, 1988; WATTS *et al.*, 1990). A técnica de spray drying tem sido também amplamente aplicada no preparo de sistemas microparticulados, pois possibilita a encapsulação tanto de fármacos solúveis como de fármacos insolúveis em água (MU, FENG, 2001).

Vários polímeros têm sido empregados na preparação de sistemas de liberação prolongada. Entre eles pode-se citar os poliésteres alifáticos, os copolímeros do ácido metacrílico e dos ésteres acrilatos, além de diferentes polissacarídeos, tais como a celulose e seus derivados, os alginatos e as quitosanas (LINHARDT, 1988). Para a administração parenteral, polímeros biodegradáveis são claramente os materiais de escolha. Além disso, os requisitos de segurança, biocompatibilidade e baixa toxicidade do polímero e de seus produtos de degradação devem ser considerados no desenvolvimento das formulações (WHATELEY, 1993). Enquanto a biodegradação é um processo natural pelo qual compostos orgânicos são convertidos a moléculas mais simples no ambiente biológico (catabolismo), o termo biocompatibilidade refere-se à aceitabilidade mútua entre o polímero e seu ambiente fisiológico (POUTON & AKHTAR, 1996; CHANDRA & RUSTGI, 1998), e pode ser obtida com a utilização de polímeros naturais ou sintetizados a partir de monômeros encontrados na natureza (ZHU & FREIBERG, 2004).

Os principais mecanismos que governam a liberação de um fármaco a partir de um sistema de liberação controlada são a difusão e a erosão. Na prática, o

perfil de liberação é o resultado da combinação destes mecanismos, podendo ser usado não somente como meio de assegurar a qualidade da preparação, mas principalmente para descrever a estrutura do sistema e a conduta da formulação. A velocidade de liberação pode ser influenciada por diversos fatores que envolvem tanto o tipo de estrutura da matriz polimérica, como as propriedades físico-químicas do fármaco e do polímero (ZHU & FREIBERG, 2004).

Recentemente, a associação de diferentes materiais para a obtenção de micropartículas tem se mostrado uma estratégia importante na busca da modulação do perfil de liberação de fármacos. Em especial, as blendas poliméricas são misturas físicas de diferentes polímeros, com a finalidade de modular as propriedades físicas e mecânicas de um material (SUDESH & DOI, 2000; BHATT, SHAH, TRIVEDI, 2008). A formação de blenda não tem o intuito de mudar drasticamente as características dos componentes puros, mas sim melhorar ao máximo o desempenho do sistema terapêutico (YU, DEAN, LI, 2006). A natureza dos polímeros envolvidos na blenda e sua miscibilidade conferem importantes características morfológicas às partículas, influenciando no processo de liberação. A miscibilidade, por exemplo, existente entre o poli-(ácido lático-co-glicólico) (PLAGA) e o Pluronic[®] F68 ou L121 pareceu influenciar na redução do efeito *burst* e no controle da liberação de diversas proteínas a partir das micropartículas preparadas com esta blenda (YEH, DAVIS, COOMBES, 1996; TOBÍO *et al.*, 1999; SÁNCHEZ *et al.*, 2003). Quando a blenda é imiscível, a adição de um componente hidrofílico na sua composição pode provocar o efeito contrário, ou seja, a elevação da velocidade de liberação de fármacos, por facilitar a difusão do meio para o interior das partículas. Este foi o motivo descrito por Sanli e colaboradores (2007) ao observarem o aumento da liberação do diclofenaco de sódio a partir de esferas obtidas com blendas de álcool polivinílico (PVA) e alginato de sódio (NaAlg).

Além da miscibilidade da matriz polimérica, cristalinidade e porosidade das partículas são outros fatores controláveis pela utilização e escolha da composição da blenda e que influenciam no processo de liberação do fármaco encapsulado. O aumento na porosidade demonstrou ser um fator determinante no acréscimo de até 45% na liberação do diclofenaco de sódio a partir de microesferas de acetobutirato de celulose com a adição de Pluronic F68 para a formação da blenda (MEDEIROS, 2003). A maior porosidade de microesferas obtidas de blendas

de PLAGA e PCL, em relação às aquelas obtidas com PLAGA puro, também resultou no aumento da liberação do antibiótico doxicilina, em condições fisiológicas (MUNDARGI *et al.*, 2007). O efeito da redução da cristalinidade foi verificado em microesferas preparadas com blendas de polímeros de diferentes pesos moleculares. A liberação do paclitaxel foi mais lenta quando PLA de baixo molecular foi adicionado a matrizes de PLA de peso molecular elevado. A liberação completa do fármaco ocorreu em setenta dias, em quatro fases distintas (LIGGINS & BURT, 2004). O maior empacotamento da matriz polimérica foi verificado com a utilização de PLAGA de alto e baixo peso molecular, resultando igualmente na redução da velocidade de liberação do ganciclovir a partir de microesferas (DUVVURI, JANORIA, MITRA, 2006). Estudos também revelaram que o teor de nifedipina nas microesferas constituídas de blendas de etilcelulose e metacrilato de amônio (Eudragit RL 100[®]) afeta o mecanismo de liberação. Em baixos níveis de teor do fármaco, a interação polímero-nifedipina gerou um efeito plastificante sobre a matriz, levando ao aumento da liberação com o aumento da taxa de encapsulação. Entretanto, em valores mais elevados de teor de nifedipina, a alteração da cinética de liberação foi verificada pela formação de reservatórios deste fármaco (HUANG *et al.*, 2006).

2.2 Polihidroxialcanoatos

Poliésteres alifáticos biodegradáveis, tais como o poli-(ácido láctico) (PLA) e seu copolímero poli-(ácido láctico-co-glicólico) (PLAGA), são freqüentemente usados na preparação de micropartículas (POUTON & AKHTAR, 1996, ANDERSON & SHIVE, 1997). Estes polímeros são biodegradados a ácido láctico e glicólico, que são metabolizados através do ciclo do ácido carboxílico (ciclo de Krebs) e, subseqüentemente, eliminados do corpo como dióxido de carbono e água (JAIN, 2000). Entretanto, a necessidade de importação destes materiais ainda representa um custo elevado para o desenvolvimento de medicamentos de liberação prolongada em nível nacional.

Outra classe de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, genericamente conhecida como polihidroxialcanoatos (PHAs), tem representado imenso potencial para aplicação farmacêutica, uma vez que oferece uma alternativa

como matéria-prima para a obtenção de formas farmacêuticas de liberação controlada para a via parenteral (POUTON & AKHTAR, 1996). PHAs são poliésteres lineares de 3-hidroxiácidos, naturalmente produzidos por bactérias, como reserva de energia e fonte de carbono, sendo acumulados na forma de inclusões celulares com diâmetro médio de 0,2 a 0,5 μm (SURIYAMONGKOL *et al.*, 2006). O mais comum dos PHAs é o homopolímero poli-(3-hidroxi butirato) (P(3HB)), seguido do seu copolímero com hidroxivalerato (P(3HB-co-3HV)). Os PHAs possuem propriedades similares a vários termoplásticos sintéticos, como o polipropileno, podendo ser moldados na forma de fios ou filmes (KHANNA & SRIVASTAVA, 2004). Desta forma, os PHAs são importantes materiais para aplicação médica e farmacêutica, principalmente para a utilização em suturas, próteses, suportes de culturas de tecidos em implantes, e obtenção de formas farmacêuticas de liberação prolongada.

2.2.1 Histórico dos PHAs

A primeira observação da existência de grânulos refratários em células bacterianas data de 1888, com Beijerinck. No entanto, embora a presença destes grânulos tenha sido observada por muitos microbiologistas no decorrer dos anos, foi apenas em 1927 que sua composição foi determinada por Lemoigne. Este pesquisador verificou que a degradação anaeróbica de um material desconhecido pelo *Bacillus megaterium* conduzia a formação de ácido 3-hidroxi butírico. Lemoigne identificou este material como um homopolíéster do 3-hidroxi butirato, ou poli-(3-hidroxi butirato) (P(3HB)). Nos trinta anos seguintes, o interesse por este material foi pequeno, limitando-se a estudos de avaliação de condições de cultura e de métodos de detecção e determinação do teor de grânulos nas células. Em 1958, a primeira hipótese sobre a função do P(3HB) foi descrita por Macrae e Wilkinson. Após observarem que o *Bacillus megaterium* estocava rapidamente o homopolímero em presença de um excesso de glicose e restrição de nitrogênio no meio, e o degradava na ausência de fonte de energia ou de carbono exógeno, os pesquisadores concluíram que o P(3HB) servia como material de reserva, e que sua síntese envolvia os complexos acetato e coenzima A (BRAUNEGG, LEFEBVRE, GENSER, 1998).

Até 1973, apesar dos inúmeros estudos, o interesse nos biopolímeros permaneceu diretamente ligado a sua significância fisiológica como substância de origem microbiológica. No entanto, com a crise do petróleo o interesse da utilização do P(3HB) como material plástico alternativo foi retomado, não somente porque poderia ser obtido a partir de fontes renováveis, mas também por apresentar algumas propriedades semelhantes as do propileno (BRAUNEGG, LEFEBVRE, GENSER, 1998).

Em 1974, Wallen e Rohwedder identificaram um poliéster contendo unidades de ácido 3-hidroxicapróico (3HV) e 3-hidroxi-butírico (3HB) como principais componentes, além de unidades de ácido 3-hidroxi-hexanoico e 3-hidroxi-pentanoico, em menor quantidade. O interesse nestes polímeros, em particular nos copolímeros do 3HB e 3HV, deve-se ao fato de apresentarem ponto de fusão mais baixo e serem menos cristalinos que o P(3HB), o que os torna materiais promissores para a aplicação em diversas áreas. Atualmente, uma variedade de copolímeros com diferentes teores de 3HB e 3HV é obtida a partir da bactéria *Ralstonia eutropha*, sob a marca registrada BIOPOL[®] (Monsanto) (SUDESH, ABE, DOI, 2000).

No Brasil, o desenvolvimento da tecnologia para a produção de PHAs como plásticos biodegradáveis e biocompatíveis teve início em meados da década de 90, por meio de um projeto cooperativo entre o Instituto de Pesquisa e Tecnologia (IPT), Copersucar e Universidade de São Paulo, usando carboidratos como material de partida, em especial derivados da cana-de-açúcar. A produção de P(3HB) é realizada em tanques agitados e aerados em condições controladas de pH, temperatura, oxigênio dissolvido e aporte de matérias-primas. O copolímero P(3HB-co-3HV) é produzido pela adição concomitante de ácido propiônico e açúcar. Dando prosseguimento ao projeto, um melhoramento genético foi realizado na *Burkholderia sacchari* IPT 101, obtendo-se um mutante IPT 189 que tem maior capacidade de acúmulo do polímero (P3HB-co-3HV), quando alimentado com sacarose e ácido propiônico (IPT, 2008)

2.2.2 Biossíntese dos PHAs

Numerosas bactérias gram-positivas e gram-negativas, assim como cianobactérias sintetizam PHAs. Dependendo do número de átomos de carbonos na cadeia, os PHAs podem ser divididos em três classes: de cadeia curta, consistindo de monômeros com 3 a 5 carbonos, de cadeia média, com monômeros de 6 a 14 carbonos, e de cadeia longa, formados por monômeros com mais de 14 carbonos (ZINN, WITHOLT, EGLI, 2001). Esta diferença é atribuída, principalmente, a especificidade das PHAs sintases frente ao substrato (KHANNA & SRIVASTAVA, 2004). Já foram identificados e caracterizados diversos tipos de polimerases e algumas cepas bacterianas podem apresentar mais de uma polimerase ativa (ZINN, WITHOLT, EGLI, 2001).

As bactérias responsáveis pela produção de PHAs podem ser divididas em dois grupos, conforme as características do meio de cultura. O primeiro grupo de bactérias requer um meio com limitação de nutriente essencial, tal como nitrogênio, fósforo, magnésio ou enxofre, e com excesso de fontes de carbono. Os exemplares deste grupo são *Ralstonia eutropha*, *Protomonas extorquens*, e *Protomonas oleovorans*. A *Ralstonia eutropha* consegue acumular até 80% do seu peso seco em polímero, quando nitrogênio ou fósforo está ausente no meio. O segundo grupo, cujas representantes são as cepas *Alcaligenes latus*, uma mutante da *Azotobacter vinelandii*, e a recombinante *E. coli*, não necessita de limitação de nutrientes e pode sintetizar PHAs mesmo durante o crescimento celular (KHANNA & SRIVASTAVA, 2004).

A síntese do P(3HB), o mais conhecido PHA, pela *Ralstonia eutropha* ocorre a partir de vários substratos. A metabolização dos açúcares conduz à formação de acetil-CoA, que pela ação da β -cetotiolase, é conjugada a outra acetil-CoA formando a acetoacetil-CoA. A acetoacetil-CoA transforma-se em (R)-3-hidroxiacetil-CoA pela ação de uma acetoacetil-CoA redutase NADPH-dependente. Finalmente, os monômeros (R)-3-hidroxiacetil-CoA são polimerizados a P(3HB) pela enzima PHA sintase (Figura 1). A *Ralstonia eutropha* pode utilizar para o seu crescimento e/ou produção de PHAs substratos como ácido láctico, óleos de vegetais e dióxido de carbono. Além disso, ela é capaz de acumular PHAs a partir de fontes de carbono especiais, tais como ácido 4-hidroxiacetil-CoA, γ -butirolactona e 1,4-

butanediol, que permitem a incorporação de monômeros 4HB, juntamente com 3HB (SUDESH, ABE, DOI, 2000).

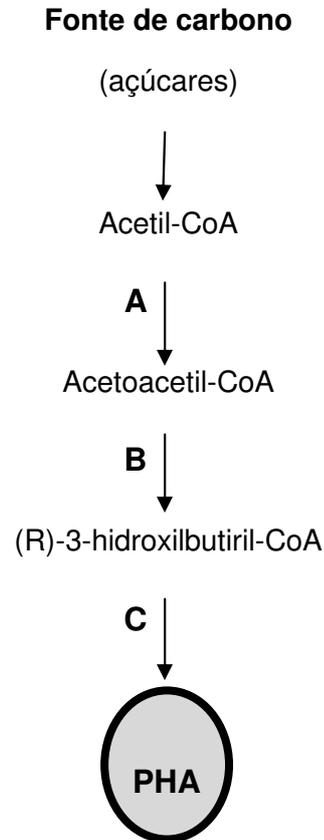


FIGURA 1: Rota metabólica para síntese de PHAs. A: β -cetotiolase, B: acetoacetil-CoA redutase, C: PHA sintase (Adaptado de SUDESH *et al.*, 2000).

A produção dos PHAs por bactérias garante sua completa estereoespecificidade - todos os carbonos quirais da cadeia principal estão na configuração R - o que é essencial para a existência de biodegradabilidade e biocompatibilidade destes polímeros. O fato de ser obtido naturalmente também exclui o risco de toxicidade pelo uso de reagentes químicos. Como a biossíntese do polímero é regulada a nível genético, é passível de ser reproduzida e manipulada. Por esta razão, a obtenção de PHAs constitui um importante alvo da engenharia genética. Os genes da *Ralstonia eutropha*, para síntese do P(3HB), foram clonados e expressados em *Escherichia coli*, que tem seu metabolismo amplamente conhecido e mapeado, e também em células de plantas, possibilitando o aumento

da produção e a redução dos custos, e se tornando uma alternativa aos plásticos não-biodegradáveis. Nota-se, neste contexto, o surgimento de novas rotas metabólicas para síntese dos PHAs (POUTON & AKHTAR, 1996; ZINN, WITHOLT, EGLI, 2001).

2.2.3 Características químicas e físico-químicas dos PHAs

PHAs são poliésteres alifáticos de carbono, oxigênio e hidrogênio e sua estrutura geral encontra-se demonstrada na Figura 2. A composição da cadeia lateral (R), juntamente com o valor “x”, identifica uma unidade monomérica. O P(3HB), o mais comum dos PHAs, é constituído de monômeros contendo um grupo metila na cadeia lateral e valores de “x”=1, enquanto as unidades do P(3HV) contêm um grupo etila no carbono 3 (BRAUNEGG, LEFEBVRE, GENSER, 1998). A natureza da cadeia lateral influencia consideravelmente nas propriedades do biopolímero, como ponto de fusão, temperatura de transição vítrea e cristalinidade (ZINN, WITHOLT, EGLI, 2001). A massa molar destes polímeros varia entre 2×10^5 a 3×10^6 Daltons (Da), dependendo do microorganismo que os produz e das condições de crescimento. Entretanto, alguns PHAs, como o homopolímero poli-(3-hidroxivalerato) (P(3HV)), podem apresentar massas molares de 60.000 Da ou menos (LEE, 1996).

As propriedades mecânicas dos PHAs são amplamente variáveis e dependem da composição monomérica (KHANNA & SRIVASTAVA, 2005). No interior dos grânulos citoplasmáticos os PHAs apresentam-se na forma amorfa, provavelmente devido à ação estabilizante da água presente nestes grânulos. No entanto, a extração do polímero a partir dos microorganismos conduz à sua rápida cristalização (SUDESH, ABE, DOI, 2000). Os PHAs podem ser extraídos dos grânulos pela utilização de solventes orgânicos, como o clorofórmio, ou pela ruptura mecânica, química ou enzimática da membrana (POUTON & AKHTAR, 1996). O P(3HB) isolado das bactérias possui grau de cristalinidade de cerca de 55-80% e as densidades do polímero cristalino e amorfo são $1,26$ e $1,18 \text{ g/cm}^3$, respectivamente (SUDESH, ABE, DOI, 2000).

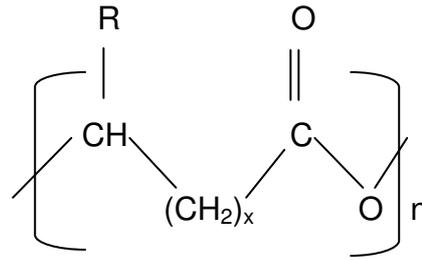


FIGURA 2: Estrutura geral dos polihidroxiálcanoatos.

No estado sólido, o P(3HB) apresenta-se na forma de uma hélice com duas unidades monoméricas completando uma volta. As forças envolvidas nesta conformação são principalmente interações do tipo Van der Waals entre os oxigênios dos grupamentos carbonilas e os grupamentos metilas. A estereoregularidade do polímero é responsável por sua elevada cristalinidade. O P(3HB) possui várias propriedades úteis, tais como resistência a umidade, piezoelectricidade e pureza óptica. Porém, apresenta duas grandes limitações. Primeiro, o P(3HB) tem baixa estabilidade térmica, pois se degrada a 200 °C, próximo à temperatura de fusão. Segundo, o P(3HB), sob condições ambientais, torna-se quebradiço após alguns dias de armazenamento (LEE,1996).

A estrutura cristalina do copolímero P(3HB-co-3HV) é semelhante a do P(3HB), contudo tem sua cristalinidade reduzida com o aumento da proporção de monômeros 3HV, apresentando propriedades mecânicas mais promissoras, como menor dureza, o que o torna um termoplástico mais promissor que o P(3HB) (BRAUNEGG, LEFEBVRE, GENSER, 1998). A introdução de outros co-monômeros, tal como 4-hidroxiбутirato, 3-hidroxi-hexanoato e 3-hidroxi-propionato, na cadeia do P(3HB) também conduz à obtenção de polímeros com melhores propriedades físicas e mecânicas (KHANNA & SRIVASTAVA, 2005). A solubilidade dos PHAs é dependente da temperatura e do peso molecular do polímero. O P(3HB) e P(3HB-co-3HV) são solúveis em solventes orgânicos, como clorofórmio, diclorometano e anidrido acético (POUTON & AKHTAR, 1996).

Dependendo dos monômeros que constituem o polímero, a temperatura de fusão dos PHAs pode variar de 50 a 180 °C (LEE, 1996). O P(3HB) funde entre 160-180 °C, conforme o peso molecular e a história térmica da amostra. O

copolímero P(3HB-co-3HV) apresenta temperatura de fusão mais baixa que o homopolímero, mas esta é influenciada pelo teor de HV na molécula. As temperaturas de transição vítrea do P(3HB) e P(3HB-co-3HV) ocorrem na faixa de -5 a 20 °C e parecem ser independentes da composição do copolímero (POUTON & AKHTAR, 1996).

2.2.4 Degradação

A característica mais atraente dos PHAs é sua biodegradabilidade. No processo de degradação ocorre a deterioração do polímero por meio da clivagem das cadeias poliméricas, formando oligômeros e, posteriormente, monômeros. Existem diferentes tipos de degradação polimérica, dependendo do processo de iniciação, tais como fotoquímica, térmica, mecânica, e por meio de ataque químico, sendo este último o mais importante (GOPFERICH, 1996). A velocidade da degradação é influenciada por diversos fatores, como presença de microorganismos no ambiente, temperatura, teor de umidade, pH, composição do polímero, cristalinidade e área de superfície (KHANNA & SRIVASTAVA, 2005).

Estudos de degradação química dos PHAs têm sido realizados utilizando filmes obtidos a partir destes materiais. A degradação hidrolítica *in vitro* do P(3HB) tem se mostrado relativamente lenta. Estudos estimam que a perda de massa de filmes de 85 µm de espessura, a 37°C e pH 7,4, ocorre com uma meia vida de, aproximadamente, 152 semanas. A perda de massa de filmes de P(3HB-co-3HV) mostrou ser mais rápida que a do homopolímero, no entanto não foi verificada uma correlação com o teor de HV na cadeia polimérica. A penetração da água nos polímeros foi muito baixa e impossível de ser determinada precisamente. Desta forma, os autores concluíram que a degradação *in vitro* do P(3HB-co-3HV) ocorre por um mecanismo de erosão superficial (POUTON & AKHTAR, 1996).

Desde que os PHAs são materiais sólidos e incapazes de atravessar as membranas celulares, muitos microorganismos secretam as PHA-depolimerases extracelulares, capazes de hidrolisar o PHA em oligômeros e monômeros solúveis em água, que são utilizados como fonte de nutrientes (KHANNA & SRIVASTAVA, 2005). As enzimas PHA-depolimerases possuem um domínio hidrofóbico que serve

como sítio de ligação para aderir à superfície dos PHAs e um domínio catalítico com seqüência de aminoácidos de lipase (LEE, 1996). Visto que o polímero P(3HB) é insolúvel em água e as P(3HB)-depolimerases são solúveis, acredita-se que a degradação enzimática seja uma reação heterogênea, ocorrendo em duas etapas: adsorção da enzima na superfície do P(3HB) e, posteriormente, hidrólise das cadeias poliméricas pelo sítio ativo da enzima (KHANNA & SRIVASTAVA, 2005). Os produtos finais da degradação aeróbica dos PHAs são dióxido de carbono e água; metano também é produzido em condições anaeróbicas (LEE, 1996).

A velocidade de degradação enzimática do P(3HB) no estado amorfo é vinte vezes maior que no estado cristalino, demonstrando que a biodegradabilidade do P(3HB) pode ser regulada variando seu grau de cristalinidade (SUDESH, ABE, DOI, 2000). Neste contexto, inúmeros estudos têm sido realizados com intuito de modificar a velocidade de degradação dos PHAs através da alteração de sua cristalinidade, utilizando alternativas como a obtenção de blendas e de copolímeros.

Dependendo das propriedades termodinâmicas e da escolha dos polímeros, diferentes graus de separação de fases podem ser observados nas blendas, levando à variação no seu comportamento de degradação (MI et al., 2006). Blendas miscíveis têm sido obtidas com P(3HB) e polioxietileno, poli(epicloridrina) e poli(acetato de vinila), e parcialmente miscíveis com poli(metilmetacrilato). Blendas imiscíveis compatíveis têm sido formadas com policaprolactona, etileno-propileno, polibutilacrilato e polissacarídeos (AVELLA, MARTUSCELLI, RAIMO, 2000). A imiscibilidade entre PCL e o P(3HB), assim como a redução da cristalinidade do biopolímero, foi observada em estudos de análise térmica de filmes preparados a partir de blendas destes dois polímeros (ANTUNES & FELISPERTI, 2005).

Rosa e colaboradores (2001) avaliaram a influência da adição de amido no processo de degradação enzimática de três diferentes polímeros: P(3HB), P(3HB-co-3HV) e PCL. A mudança da morfologia e das propriedades mecânicas foi observada com a adição de amido nos polímeros puros. Quando expostos a microorganismos em presença de lodo ativado, o material que apresentou maior degradação foi o P(3HB) puro. No entanto, a adição de amido acelerou a degradação dos filmes obtidos a partir da PCL e do P(3HB-co-3HV).

A degradação enzimática em solo de filmes constituídos de blendas de poli [(R,S)-3-hidroxi-butirato] atático (P(3HB) sintético e amorfo preparado a partir da polimerização aniônica da β -butirolactona, P(3HB)a) e P(3HB) natural ou PLA foi avaliada por Rychter e colaboradores (2006). Durante o estudo, os filmes constituídos de P(3HB) puro não demonstraram perda de massa significativa, no entanto, quando preparados com 50% de P(3HB)a, os filmes tiveram 40% de sua massa reduzida após 183 dias. Por outro lado, os filmes constituídos de PLA e P(3HB)a (50:50) sofreram alteração na sua composição durante a degradação, visto que o PLA degrada numa maior velocidade que o P(3HB)a. Portanto, a aceleração da degradação enzimática do PLA e P(3HB) pode ser obtida com o uso de blendas com o P(3HB)a.

A adição de polietilenoglicol (PEG) também afeta a degradação enzimática do P(3HB) nas blendas. Chen e colaboradores (2003) demonstraram que a adição de PEG nos filmes de P(3HB) aumenta a velocidade de degradação, quando estes são incubados em tampão fosfato pH 7,2 - 7,4 a 37 °C, na presença de lisozima. O PEG por ser hidrossolúvel é rapidamente dissolvido na solução tampão, tornando os filmes mais porosos e aumentando a área superficial para que o ataque pela enzima ocorra. Parra e colaboradores (2006) prepararam filmes com diferentes proporções de P(3HB) e PEG. Estudos de análise térmica evidenciaram a redução da cristalinidade do P(3HB) nas blendas contendo 10 e 20% de PEG. A degradação foi avaliada após exposição das amostras à enzima α -amilase, em tampão acetato pH 6,0. A incorporação do PEG aumentou a velocidade de degradação do filme e este aumento foi dependente da concentração do aditivo. Santana e colaboradores (2004) prepararam filmes com diferentes proporções de P(3HB) e PLA. Os polímeros mostraram-se imiscíveis em todas as composições estudadas e a degradação em condições fisiológicas (tampão fosfato pH 7,4 e temperatura de 37°C) ocorreu de forma desigual: apenas o PLA mostrou sinais de degradação.

2.2.5 Toxicidade e biocompatibilidade dos polihidroxicanoatos

O potencial de utilização dos PHAs em sistemas de liberação de fármacos ou em outras aplicações biomédicas não depende somente das propriedades de

biodegradação dos polímeros, mas também de sua biocompatibilidade (POUTON, AKHTAR, 1996). A degradação do P(3HB) conduz a formação do monômero ácido D-(-)-3-hidroxi-butírico. Este ácido é um constituinte normal do sangue e, juntamente, com o acetoacetato e a acetona, é uma das três cetonas que são produzidas endogenamente pelo processo de cetogênese (POUTON, AKHTAR, 1996; ZINN, WITHOLT, EGLI, 2001). Adicionalmente, PHAs de baixo peso molecular são encontrados nas células biológicas, complexados a outras macromoléculas (SUDESH, ABE, DOI, 2000). A complexação modifica as propriedades físicas e químicas dos PHAs, permitindo que este atravesse tanto regiões aquosas quanto lipídicas da célula, fazendo com que possam ser encontrados no citoplasma e fluidos intracelulares, assim como nas membranas e lipoproteínas (CHEN, WU, 2005). Estas observações indicam que o P(3HB), seus oligômeros e monômeros não são tóxicos às células (LEE, 1996).

Propriedades nutricionais ou terapêuticas têm sido obtidas com o aumento das cetonas corporais, na forma de oligômeros lineares ou cíclicos e/ou derivados de hidroxiácidos, constituídos principalmente de 3-hidroxi-butirato, 3-hidroxi-valerato, 3-hidroxi-hexanoato e 3-hidroxi-heptanoato. Tais substâncias podem ser administradas oralmente, na forma de suplementos alimentares, ou por via parenteral e são úteis no controle de ataques epiléticos, doenças metabólicas, redução do catabolismo de proteínas, na supressão do apetite e no aumento da eficiência cardíaca, entre outras aplicações. Da mesma forma, os oligômeros poli-4-hidroxi-butirato e o monômero 4-hidroxi-butírico também têm sido utilizados no tratamento de pacientes com narcolepsia, esquizofrenia crônica, psoríase atípica, neurose, alcoolismo, e muitas outras enfermidades. Baseado no exposto, acredita-se que além dos PHAs, seus oligômeros e monômeros não serem tóxicos às células, podem ainda fornecer alguns benefícios nutricionais e terapêuticos (CHEN, WU, 2005).

Estudos de biocompatibilidade de microesferas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) apresentando diâmetro entre 20 e 40 μm foram realizadas em ratos *Wistar* machos, por meio do monitoramento da resposta inflamatória aguda e crônica. Embora uma resposta inflamatória aguda tenha sido observada após a administração intramuscular das microesferas, a inflamação crônica não foi detectada pelo método enzimático. Quando microesferas de maior diâmetro (100

μm) foram administradas pela mesma via, resultados semelhantes foram obtidos. A inflamação aguda observada nos estudos *in vivo* tem sido atribuída ao trauma ocorrido na implantação ou injeção, indicando que estes materiais são biocompatíveis (POUTON & AKHTAR, 1996).

2.2.6 Aplicações do PHA em sistemas de liberação

A maior parte dos estudos realizados com os PHAs na área de liberação de fármacos refere-se à obtenção de micropartículas de liberação prolongada. Devido às suas características de solubilidade, as micropartículas são preparadas por meio de técnicas que envolvem a emulsificação de uma solução orgânica do polímero, seguida da evaporação do solvente. O controle da liberação é uma característica desejável e esperada, mas são muitos os fatores que a afetam, envolvendo a estrutura da matriz onde o fármaco está inserido e as propriedades físicas e químicas de ambos polímero e fármaco (DONNELL & MCGINITY, 1997). Assim, diversos estudos têm sido realizados na tentativa de compreender quais dos fatores são passíveis de serem alterados na busca da modulação da velocidade de liberação de fármacos a partir de matrizes de PHAs (Tabela 1).

Um dos primeiros estudos relatados sobre a utilização dos PHAs para a obtenção de microesferas foi realizado por Juni e colaboradores (1986). Microesferas de P(3HB) contendo aclarubicina, um antitumoral antracíclico, foram preparadas pelo método da emulsão/evaporação do solvente. A velocidade de liberação do fármaco demonstrou ser muito lenta, ou seja, unicamente 10% do fármaco foram liberados em 120 horas, mas esta pôde ser modulada pela adição de ácidos graxos e seus ésteres formando blendas para compor a matriz. Particularmente, os ésteres etila e butila de ácidos graxos, com mais de 12 e 10 carbonos na cadeia acila, respectivamente, aumentaram a velocidade de liberação da aclarubicina.

A progesterona também foi encapsulada em microesferas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) usando a técnica de emulsão/evaporação do solvente (GRANGADE & PRICE, 1991). Segundo os autores, a menor velocidade de liberação do fármaco foi obtida com a utilização do copolímero apresentando 9% de HV, e este resultado

TABELA 1: Fatores que demonstraram afetar a velocidade de liberação de fármacos a partir de micropartículas de PHAs, preparadas pela técnica de emulsão evaporação do solvente.

Fator	Fármaco	Polímero	Referência
<i>Emprego de blendas</i>	Aclarubicina	P(3HB) e ácidos graxos e seus ésteres	Juni <i>et al.</i> (1986)
	Ftalocianinas	P(3HB-co-3HV) (9,8 mol% de 3HV) e PCL	Vaccari <i>et al.</i> (2005)
	Indometacina e Diclofenaco de Sodio	P(3HB-co-3HV) e PCL	Polleto <i>et al.</i> (2007)
	Ibuprofeno	P(3HB) e ésteres de glicerila	Bidone; Lemos-Senna (2007)
<i>Porosidade</i>	Progesterona	P(3HB) ; P(3HB-co-3HV)	Grangade; Price (1991)
	Progesterona	P(3HB-co-3HV)	Penna <i>et al.</i> (2005)
	Albumina sérica bovina	P(3HB-co-3HV) (330kD; 10,8 mol% HV)	Atkins; Peacock (1997)
<i>Grau de lipofilia do fármaco</i>	Pró-fármacos do 2'-3'-diacil-5-fluoro-2'-deoxiuridina	P(3HB) (65, 135 e 450 kD)	Kawagushi <i>et al.</i> (1992)
<i>Peso molecular do polímero</i>	Pró-fármacos do 2'-3'-diacil-5-fluoro-2'-deoxiuridina	P(3HB) (65, 135 e 450 kD)	Kawagushi <i>et al.</i> (1992)
<i>Método de preparação</i>	5-Fluorouracila	P(3HB-co-3HV) (15 mol% HV)	Khang <i>et al.</i> (2001)
	Diazepam	P(3HB-co-3HV) (21 mol% HV, 630 kD)	Chen; Davis (2002)
	Levonorgestrol	P(3HB) (230kD)	Lu <i>et al.</i> (2001)
<i>Velocidade de remoção do volume da fase interna</i>	Piroxicam	P(3HB)	Bazzo <i>et al.</i> (2005)
<i>Teor de HV no copolímero</i>	Tetraciclina	P(3HB-co-3HV) (7, 14 e 22% HV) 400 a 750 kD	Sendil <i>et al.</i> (1999)
<i>Emprego de Compósitos</i>	Gentamicina	P(3HB-co-3HV) (3mol% HV; 300 kD) e volastonita	Li; Chang (2005)
	Gentamicina	P(3HB-co-3HV) (3mol% HV; 300 kD) e hidroxiapatita	Wang <i>et al.</i> (2007)
<i>Cristalinidade</i>	Ibuprofeno	P(3HB) (300 kD) P(3HB-co-3HV) (680 kD, 5 mol% de 3HV)	Carmingnan (2006)

Fonte: CARMINGNAN, BIDONE, LEMOS-SENNA, 2008.

foi relacionado com a obtenção de partículas menos porosas. A elevada porosidade das microesferas de P(3HB-co-3HV) também foi responsável pela rápida liberação da progesterona, na qual alcançou 90% nas duas primeiras horas de ensaio (PENNA, PEREIRA, RÉ, 2005).

A porosidade de matrizes esféricas compostas de P(3HB-co-3HV) (330 kD; 10,8 mol% de 3HV) e 20% de PCL também foi o fator predominante que afetou o tempo de liberação *in vitro* da albumina sérica bovina (BSA) (ATKINS & PEACOCK, 1997). No entanto, estudos demonstraram que a porosidade das micropartículas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV), preparadas pela técnica de dupla emulsão, pode ser controlada pela alteração das condições de preparação tal como massa molar do polímero, teor de HV, temperatura de evaporação do solvente e adição de policaprolactona para a formação de blendas, bem como pela quantidade de fármaco encapsulada (EMBLETON & TIGHE, 1992; EMBLETON & TIGHE, 1993; EMBLETON & TIGHE, 2002).

A velocidade de liberação também tem demonstrado ser afetada pelo grau de lipofilia do fármaco e pela massa molar do polímero, conforme estudos de encapsulação dos pró-fármacos 2'-3'-diacil-5-fluoro-2'-deoxiuridina em microesferas de P(3HB) de diferentes massas molares (65, 135 e 450 kD). Pró-fármacos apresentando diferentes propriedades físico-químicas foram obtidos por meio da esterificação da 5-fluoro-2'-deoxiuridina com os ácidos propiônico, n-butírico e n-pentanóico. A velocidade de liberação do pró-fármaco decresceu com o aumento da cadeia alifática do éster, independentemente do polímero empregado, mas foi mais rápida com o emprego do polímero de baixa massa molar, para o mesmo fármaco (KAWAGUSHI *et al.*, 1992).

O efeito do método de preparação de microesferas de P(3HB-co-3HV) (15 mol% 3HV) sobre a eficiência de encapsulação e velocidade de liberação da 5-fluorouracila foi avaliado por Khang e colaboradores (2001). A preparação das microesferas foi realizada pelas técnicas de emulsão/evaporação do solvente óleo em água (o/a) e óleo em óleo (o/o), e a técnica de dupla emulsão (a/o/a). A eficiência de encapsulação da fluorouracila foi maior que 80% quando a técnica o/o foi empregada, sendo significativamente superior aos 7% obtidos para as microesferas preparadas pela técnica o/a e ao 1% obtido para as microesferas

preparadas pela técnica de dupla emulsão. Por outro lado, o perfil de liberação mais desejável foi alcançado quando a técnica o/a foi usada.

Diferentes variantes da técnica de emulsão/evaporação do solvente também foram testadas para a encapsulação do diazepam em microesferas de P(3HB-co-3HV) (21 mol% de HV). Quando uma emulsão simples o/a foi utilizada, o diazepam foi liberado das partículas seguindo um perfil trifásico, sendo que a quantidade liberada acumulada aumentou com o aumento do teor de fármaco. A gelatina foi usada como estratégia para modular o perfil de liberação do diazepam. Para isto, uma dispersão do fármaco em gelatina foi usada na preparação de microesferas de P(3HB-co-3HV) pela técnica de dupla emulsão (a/o/a). Este procedimento levou à redução do efeito *burst* de 40% para 25%, mas o perfil de liberação do fármaco foi igualmente trifásico. Um outro método empregando uma emulsão o/a/o foi igualmente testado para a obtenção de microcápsulas, mas, neste caso, as partículas foram recobertas com uma camada de gelatina reticulada com glutaraldeído. A camada de gelatina permitiu o controle do efeito *burst*, levando à obtenção de uma cinética de liberação de ordem zero por um período de 30 dias (CHEN & DAVIS, 2002).

O processo de encapsulação modifica algumas das propriedades do P(3HB), e este efeito foi mais pronunciado quando a técnica de emulsão a/o/a foi empregada. A morfologia interna das partículas foi mais irregular quando a dupla emulsão foi usada na preparação das microesferas, em comparação ao emprego da emulsão simples o/a. Entretanto, a aparência externa rugosa das micropartículas foi originada pela elevada cristalinidade do polímero e, em menor extensão, pelos parâmetros de processamento (MARTIN *et al.*, 2000), embora a concentração de tensoativo tenha demonstrado afetar o tamanho das partículas (MAIA, SANTANA, RÉ, 2004). Por outro lado, a encapsulação do hormônio folículo estimulante nas microesferas de P(3HB) foi obtida com sucesso, quando a técnica de emulsão a/o/a foi usada, mesmo na ausência de um tensoativo comercial, visto que o peptídeo age também reduzindo a tensão interfacial da emulsão primária (MARTIN *et al.*, 2000).

Uma técnica denominada secagem em líquido (*in-liquid drying method*) foi empregada para encapsular o contraceptivo levonorgestrol em microesferas de P(3HB). A técnica consistiu na obtenção de uma emulsão o/a, seguida da sua

diluição em um grande volume de água com a finalidade de acelerar a remoção do solvente orgânico volátil da fase interna. O procedimento foi empregado com o intuito de evitar a formação de cristais de fármaco na superfície das partículas, os quais têm sido considerados responsáveis pelo pronunciado efeito *burst*, durante a liberação. A liberação do levonorgestrol foi então prolongada em 1,8 vezes em relação ao fármaco livre, aumentando o tempo de contracepção em camundongos em até 60 dias (LU, WANG, YANG, 2001).

A administração de antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) pela via intra-articular tem sido estudada como forma alternativa à utilização de corticosteróides no tratamento localizado da artrite, os quais são responsáveis por inúmeros efeitos adversos indesejáveis. O prolongamento da liberação e a manutenção das concentrações terapêuticas no local de ação poderiam ser obtidos mediante a incorporação do fármaco em matrizes poliméricas biodegradáveis, conduzindo à redução dos efeitos colaterais sistêmicos e à adesão ao tratamento e melhoria da qualidade de vida do paciente. Com este propósito, o piroxicam foi encapsulado em microesferas de P(3HB) pela técnica de emulsão o/a seguida da evaporação do solvente, usando diferentes variáveis de formulação. Enquanto a redução do volume da fase interna levou à formação de partículas de formato irregular e liberação total do fármaco em 7 horas, a adição de álcool isopropílico à emulsão formada permitiu a rápida remoção do solvente da fase interna e obtenção de partículas esféricas cuja liberação total do fármaco ocorreu em 54 horas (BAZZO, LEMOS-SENNA, PIRES, 2005).

O tramadol é um analgésico que atua no sistema nervoso central que apresenta curta duração de ação, necessitando da administração de doses repetidas ou infusão contínua para obtenção de um efeito prolongado. Assim, Salman e colaboradores (2003) propuseram a encapsulação do tramadol em microesferas de P(3HB) como forma de controlar a sua liberação, após administração pela via epidural. A liberação *in vitro* do tramadol, em tampão fosfato pH 7,4 a 37 °C, foi observada por mais de 6 dias, entretanto, cerca de 12,8% e 58% do tramadol encapsulado foi liberado na primeira hora e após 24 horas, respectivamente. A atividade analgésica *in vivo* das microesferas foi avaliada usando ensaio de reatividade ao estímulo térmico, pela medida da retirada rápida da cauda (*tail-flick*) da água a 52,5° C, antes e até 30 horas após a injeção. Embora o estudo *in vitro*

tenha demonstrado a liberação do fármaco por mais de uma semana, a atividade *in vivo* não ocorreu em um período similar devido à redução da velocidade de liberação com o tempo, não permitindo a manutenção da concentração plasmática em níveis terapêuticos. Entretanto, o efeito analgésico das microesferas de P(3HB) contendo tramadol foi observado por 21 horas, enquanto uma dose equivalente de tramadol livre foi efetiva por menos de 5 horas. Os autores consideraram que a administração das microesferas pode ser uma forma alternativa para a administração do tramadol, particularmente no tratamento da dor pós-operatória. Por outro lado, a eliminação do polímero do espaço epidural e o aparecimento de possíveis efeitos, tal como a formação de adesão tecidual, permaneceram desconhecidos pelos autores.

Alguns dos estudos realizados com os PHAs enfocam a liberação de antibióticos no local da infecção, uma vez que ainda ela é considerada um dos problemas mais graves na cirurgia de implantes. A utilização de sistemas carreadores de antibióticos em procedimentos cirúrgicos ofereceria, além dos benefícios terapêuticos, a redução da utilização da antibioticoterapia sistêmica. Neste contexto, a preparação de microcápsulas de tetraciclina a partir do P(3HB-co-3HV) contendo diferentes teores de 3HV (7, 14 e 22%, PM 400– 750 kD) foi realizada, visando o implante em bolsas periodontais, para o tratamento localizado da gengivite e periodontite. As microcápsulas foram preparadas por meio da técnica da dupla emulsão a/o/a e caracterizadas quanto à eficiência de encapsulação, perfil de liberação e morfologia. Fatores, como tipo de emulsificante e forma química do fármaco, afetaram a eficiência de encapsulação. Após 100 horas, a liberação de tetraciclina foi cerca de 90%, 42% e 50% para as microcápsulas preparadas a partir do P(3HB-co-3HV) contendo 22%, 14% e 7% de HV, respectivamente. Os dados de liberação foram melhores expressos pela equação de Higuchi, indicando que o fármaco é liberado por um mecanismo de difusão. A liberação foi total antes que sinais de degradação do polímero tivessem sido observados (SENDIL *et al.*, 1999).

Microesferas de P(3HB) contendo rifampicina foram preparadas pela técnica de emulsão/evaporação do solvente, com o objetivo de obter agentes para a quimioembolização. A rápida liberação do fármaco foi observada, atingindo cerca de 90% nas primeiras 24 horas. Entretanto, tamanho de partícula e teor de fármaco demonstraram ser fatores passíveis de otimização, permitindo o controle da velocidade de liberação. Angiogramas renais e análises histopatológicas, obtidas

após administração das microesferas em cães, demonstraram a viabilidade de utilização destes sistemas como agentes de quimioembolização (KASSAB *et al.*, 1997; KASSAB *et al.*, 1999).

Formulações de microesferas constituídas de compósitos de P(3HB-co-3HV) (3 mol% 3HV, PM 300,000) e volastonita foram propostas para a liberação da gentamicina durante o processo de reparo ósseo, não somente para promover o crescimento tecidual, mas também para minimizar o risco de infecções. As microesferas foram preparadas por meio da formação de uma dispersão sólido em óleo em água (s/o/a) seguida da evaporação do solvente, e a gentamicina foi incorporada por imersão das partículas numa solução do fármaco em tampão fosfato pH 7,4. A análise morfológica das partículas e os estudos de liberação em tampão fosfato e meio fisiológico simulado revelaram a formação de uma camada microporosa de apatita na superfície das microesferas, a qual permitiu o controle da liberação da gentamicina durante 22 dias, um período cerca de três vezes maior quando as microesferas foram preparadas unicamente a partir do poliéster biodegradável (LI & CHANG, 2005). Com a mesma finalidade terapêutica, a técnica de dispersão sólido em óleo em água (s/o/a) foi igualmente empregada para encapsular a gentamicina em microesferas constituídas de compósitos de P(3HB-co-3HV) e hidroxiapatita (HA), esta última na forma de nanopartículas contendo o fármaco. Neste caso, a liberação do fármaco ocorreu num período de 10 semanas por um mecanismo de difusão, expressa pelo modelo matemático de Higuchi (WANG *et al.*, 2007).

Recentemente, blendas de P(3HB-co-3HV) (9,8% 3HV) e policaprolactona (PCL) foram testadas na preparação de microesferas, com o intuito de encapsular um fármaco da classe das ftalocianinas, para uso na terapia fotodinâmica, no tratamento do câncer. Tais fármacos, quando ativados por uma luz visível de comprimento de onda apropriado, produzem espécies reativas de oxigênio que levam à destruição irreversível dos tecidos tratados. Neste caso, o controle da liberação a partir de um sistema de liberação é indispensável para maximizar a ação do fármaco. Assim, para determinar a composição polimérica e peso molecular do PCL ideais, diferentes blendas foram empregadas na preparação das microesferas e a cinética de liberação do fármaco foi então avaliada em plasma humano. O menor efeito *burst* foi obtido com a utilização de PCL de menor peso molecular. Entretanto,

com a utilização de PCL de mesmo peso molecular, o aumento da proporção deste polímero na blenda conduziu a obtenção de perfis de liberação mais aceitáveis, alcançando o máximo em 24 horas (VACCARI *et al.*, 2005). O emprego de blendas de P(3HB-co-3HV) (9,8% 3HV) e PCL também conduziu à alteração da morfologia das micropartículas. Neste estudo, a velocidade de liberação da indometacina e do diclofenaco de sódio foi aumentada com o aumento da proporção de PCL na blenda e os resultados foram relacionados com a tortuosidade do sistema (POLETTI *et al.*, 2007).

Por outro lado, apesar das partículas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) serem mais rugosas e porosas do que partículas de PLAGA, preparadas nas mesmas condições, outros fatores têm sido relacionados à rápida liberação do fármaco encapsulado. A maneira pela qual o fármaco encontra-se distribuído nas microesferas também tem demonstrado afetar o perfil de liberação. A localização preferencial do fármaco na superfície ou nas camadas mais externas das partículas tem conduzido à obtenção de velocidades de liberação muito rápidas, podendo ser associado à elevada cristalinidade das microesferas obtidas a partir destes polímeros. De modo geral, partículas amorfas liberam o fármaco mais lentamente que partículas cristalinas, devido à melhor dispersão do fármaco no sistema e a maior interação fármaco-polímero (CARMINGNAN, 2006; FREIBERG & ZHU, 2004).

Poucos estudos relatam a utilização dos polihidroxicanoatos na preparação de nanopartículas. Enzimas, precisamente a L-asparaginase, a catalase e a glicose oxidase, e a albumina sérica bovina foram incorporadas em nanocápsulas de P(3HB-co-3HV) (8 mol% de HV) pela técnica de dupla emulsão a/o/a, com ou sem o tratamento prévio do polímero com borohidreto de sódio, para a redução do seu peso molecular. Embora a quantidade de proteína encapsulada não tenha aumentado, o tamanho da partícula diminuiu e a atividade enzimática aumentou com o uso de um P(3HB-co-3HV) de baixo peso molecular, indicando que estas nanocápsulas apresentam uma maior permeabilidade, em decorrência da diminuição da barreira polimérica difusional (BARAN, OZER, HASIRCH, 2002). Com o intuito de preparar conjugados de nanopartículas e fármacos e obter sistemas de liberação sítio-específicos, copolímeros do poli(3-hidroxiocanoato) contendo grupamentos carboxílicos nas cadeias carbonadas laterais foram preparados por modificação química. Igualmente, copolímeros de PHAs de cadeia média, ligados

covalentemente com unidades de PEG e PLA, foram sintetizados. Em ambos casos, as nanopartículas foram obtidas pela técnica de deslocamento do solvente, com e sem a adição de estabilizantes. A presença dos grupamentos carboxílicos, assim como de unidades de PEG na superfície das partículas proporcionou melhorias na estabilidade das mesmas frente à agregação (KURTH *et al.*, 2002; RENARD *et al.*, 2003).

Outros tipos de sistemas carreadores de fármacos têm sido preparados empregando os PHAs. Visando o tratamento da osteomielite, implantes de Sulperazone® (sulfabactama e cefoperazona, 1:1, Pfizer) foram preparados a partir do P(3HB-co-3HV) apresentando diferentes proporções de 3HV (7, 14 e 22 mol%). A liberação do fármaco a partir das microesferas foi significativamente maior quando o copolímero contendo 22 mol% de 3HV foi empregado. Este resultado foi relacionado com a redução da cristalinidade do polímero contendo maior teor de 3HV que permitiu a mais rápida penetração de água na partícula, aumentando a velocidade de dissolução dos cristais de fármaco e, conseqüentemente, a velocidade de liberação do mesmo a partir da matriz polimérica. Por outro lado, a matriz polimérica permaneceu intacta no período testado, indicando que a liberação ocorre essencialmente por um mecanismo de difusão (GURSEL *et al.*, 2002). O carreador constituído de P(3HB-co-3HV) (22 mol% HV) contendo os fármacos foi implantado no sitio da infecção, previamente induzida pela inoculação de *Staphylococcus aureus* na tíbia de coelhos. A efetividade do sistema foi verificada por métodos macroscópicos, radiográficos, bacteriológicos e histológicos. A infecção subsidiu e a remissão foi completa com o tratamento empregado, indicando que o sistema biodegradável desenvolvido pode ser usado com sucesso no tratamento de infecções ósseas severas (YAGMURLU *et al.*, 1999; GURSEL *et al.*, 2001).

Como meio de prevenir a adesão de bactérias, discos ortopédicos revestidos com um complexo de gentamicina e P(3HB-co-3HV) (8 ou 12mol% de 3HV) foram implantados em pacientes com articulações comprometidas. O aumento do teor de 3HV levou ao aumento da velocidade de liberação da gentamicina. A redução significativa do número de *S. aureus* aderido aos discos, após 48 horas de exposição em cultura de células, demonstrou a eficácia deste sistema. Além disso, a alteração da hemodinâmica de amostras de sangue não foi observada, confirmando a biocompatibilidade dos implantes (ROSSI, AZGHANI, OMRI, 2004).

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

Finalmente, um sistema de liberação controlada foi obtido pela técnica de compressão, usando P(3HB) como material de revestimento (KORSATTO-WABNEGG, 1990). O revestimento dos núcleos contendo o fármaco com uma matriz de P(3HB) e um agente de formação de canais, tal como o cloreto de sódio, nitrato de potássio ou lactose, conduziu à obtenção de cinéticas de liberação de ordem zero. Tais sistemas poderiam ser aplicáveis tanto para a administração oral como parenteral. Além disso, complexos formados entre P(3HB) e PEG demonstraram modificar o perfil de dissolução da teofilina a partir de comprimidos, retardando a liberação do fármaco com o aumento do teor de PEG 4000 no complexo (RODRIGUES *et al.*, 2007).

Como pode ser observado com o exposto, nenhum trabalho foi encontrado utilizando os polihidroxi alcenoatos no preparo de uma forma farmacêutica visando à administração intraarticular. Mesmo quando são aplicados outros polímeros, tais como o PLAGA (TUNÇAY *et al.*, 2000; BOZDAG *et al.*, 2001; HORISAWA *et al.*, 2002; FERNÁNDEZ-CARBALLIDO *et al.*, 2004) e polifosfazeno modificado (ZHANG *et al.*, 2006), os estudos com esta via de administração são escassos.

2.3 Artrite Reumatóide

A deficiência de produção das células imunes ou uma função defeituosa dessas células pode gerar um amplo espectro de doenças de imunodeficiência. A atividade excessiva de vários componentes do sistema imune conduz ao surgimento de doenças alérgicas ou auto-imunes (FAUCI & HAYNES, 1998). Neste contexto, a artrite reumatóide (AR) é uma doença sistêmica, crônica, inflamatória e auto-imune, de causa desconhecida, e caracterizada por uma típica sinovite persistente que compromete as articulações periféricas, embora haja uma variedade de manifestações sistêmicas (LIPSKY, 1998). No Brasil, estudo multicêntrico verificou prevalência de AR do adulto variando de 0,2 a 1% da população, o que significa cerca de 1,8 milhões de brasileiros acometidos pela doença (MARQUES, 2005; LOUZADA-JUNIOR, 2007).

Apesar do seu potencial destrutivo, a evolução da AR pode ser muito variável. A doença começa lenta e insidiosamente em mais da metade dos pacientes. A princípio, existem mal-estar, fadiga e dor musculoesquelética generalizada, e somente após algumas semanas a meses as articulações são afetadas, às vezes com acometimento monoarticular, outras vezes oligoarticular e, em algumas circunstâncias, poliarticular (em geral, simetricamente). As articulações afetadas ficam tumefeitas, quentes, dolorosas e particularmente rígidas ao despertar ou após inatividade. Aproximadamente 20% dos pacientes conseguem períodos de remissão parcial ou completa, mas os sintomas retornam inevitavelmente e acometem articulações que ainda não haviam sido afetadas. O padrão do acometimento articular varia, mas em geral as pequenas articulações são afetadas antes das maiores. Os sintomas manifestam-se nas pequenas articulações das mãos (articulações metacarpofalangianas e interfalangianas proximais) e nos pés, seguidas pelos pulsos, tornozelos, cotovelos e joelhos. Em média, a expectativa de vida é reduzida de três a sete anos. As fatalidades são devidas habitualmente às complicações da AR assim como aos efeitos iatrogênicos da terapia, como, por exemplo, sangramento gastrintestinal relacionado com o uso a longo prazo de ácido acetil salicílico e infecções associadas com o uso a longo prazo de esteróides (COTRAN, KUMAR, ROBBINS, 1996; LIPSKY, 1998).

A incidência máxima de início da artrite reumatóide situa-se entre a quarta e a sexta décadas de vida; entretanto, a AR pode surgir em qualquer época, desde a infância até a velhice. As mulheres têm duas a três vezes mais probabilidades de serem acometidas do que os homens (ARNETT, 2001). Apesar de ainda existirem muitas incertezas, admite-se que a AR seja desencadeada pela exposição de um hospedeiro imunogeneticamente susceptível a um antígeno microbiano artritogênico. Dessa forma é iniciada uma artrite aguda, mas que constitui uma reação auto-imune persistente em que as células T desempenham um papel central com a liberação local de mediadores inflamatórios e citocinas líticas que acabam destruindo a articulação. Portanto os fatores causais envolvidos são: (1) susceptibilidade genética, (2) exposição a um antígeno artritogênio exógeno primário, (3) uma reação auto-imune dentro das membranas sinoviais e (4) presença de mediadores do dano articular (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996). Uma hipótese constante sugere uma origem infecciosa para a AR. Foram propostos diversos candidatos bacterianos e virais. Verificou-se que certas infecções virais, como a rubéola, vírus de Ross River e parvovírus B19, produzem poliartrite aguda, porém não existem evidências que possam desencadear a AR crônica. O vírus Epstein-Barr (EBV) permanece sendo um candidato viável, mas não-comprovado, ao qual se atribui um papel patogênico, visto que são encontradas várias respostas imunes incomuns contra esse vírus em pacientes com AR. Foi, também, constatado que uma proteína do EBV compartilha os mesmos cinco aminoácidos das moléculas HLA-DR4 (Dw 14) e HLA-DR1, implicadas na suscetibilidade à AR, levantando, assim, a possibilidade de “mimetismo molecular” como mecanismo. Observou-se, igualmente, uma homologia semelhante com a proteína do choque térmico da *Escherichia coli* (ARNETT, 2001).

As alterações histopatológicas da AR evoluem ao longo da duração desta doença crônica. O primeiro evento parece ser uma resposta inflamatória inespecífica iniciada por um estímulo desconhecido. Subseqüentemente, uma resposta inicial, e talvez específica, das células T CD4+ é induzida, a qual amplifica e perpetua a inflamação. A presença de células T ativadas pode induzir estimulação policlonal das células B e a produção local de fator reumatóide. À medida que a lesão tecidual ocorre, auto-antígenos adicionais são revelados e a natureza da resposta das células T amplia-se quando clones adicionais de células T CD4+ são recrutados para o local inflamatório. Finalmente, em conseqüência da exposição persistente ao

meio inflamatório, a função dos fibroblastos sinoviais é alterada e eles podem adquirir um potencial destrutivo que não exige mais estimulação pelas células T ou macrófagos (LIPSKY, 1998).

O diagnóstico da AR é primeiramente clínico. A típica apresentação é poliarticular, com dor, rigidez e inchaço de múltiplas articulações com padrão simétrico (MAJITHIA & GERACI, 2007). A AR não tem cura e os objetivos do tratamento incluem: alívio da dor e rigidez, redução dos efeitos colaterais indesejáveis dos fármacos, manutenção da força muscular e função articular e, conseqüentemente, da qualidade de vida do paciente. O programa inicial básico que leva à concretização desses objetivos, na grande maioria dos pacientes, consiste em repouso absoluto, terapia antiinflamatória apropriada, medidas físicas para manter a função articular e a alteração da evolução da doença por meio de terapia farmacológica agressiva e precoce. A terapia antiinflamatória é de suma importância para o programa básico, entretanto, todos os pacientes devem ser monitorizados devido à possível ocorrência de níveis tóxicos. Frequentemente, os antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) administrados por via oral causam sangramento gastrointestinal, devendo assim, serem evitados ou prescritos com extrema cautela em pacientes com comprometimento da função renal. Para o paciente, a interferência funcional nas atividades diárias é que determina o impacto do distúrbio. Estudos mostraram que os pacientes com AR possuem uma probabilidade dez vezes maior de incapacidade no trabalho em comparação com a população geral (ARNETT, 2001). O tratamento da AR é um processo contínuo e o paciente precisa ser periodicamente reavaliado (MAJITHIA & GERACI, 2007).

O tratamento farmacológico da AR geralmente ocorre em três frentes: administração por via oral de baixas doses de AINES, injeções intra-articulares de glicocorticóides e utilização de fármacos modificadores da doença (Figura 3) e, ainda, deve-se considerar modificadores da resposta biológica. Os AINEs reduzem a dor e o inchaço das articulações, no entanto não alteram o curso da doença (MAJITHIA & GERACI, 2007). O uso prolongado de AINEs conduz a graves complicações gástricas e, além disso, a administração local de esteróides gera sérios efeitos adversos, tais como degeneração da cartilagem, síndrome de Cushing e risco de reação anafilática (FERNÁNDEZ-CARBALLIDO *et al.*, 2004). Dentre os AINEs utilizados no tratamento da artrite encontra-se o ibuprofeno.

Uma alternativa de tratamento, com finalidade de reduzir os efeitos adversos e aumentar a adesão do paciente, seria a utilização de injeções localizadas, ou seja, intraarticulares, de microesferas poliméricas contendo antiinflamatórios não esteroidais. Com este tipo de administração é possível obter uma liberação controlada do fármaco, evitar o efeito do metabolismo de primeira passagem, reduzir os efeitos colaterais indesejáveis, tornando a administração mais cômoda e sendo uma alternativa à administração oral de medicamento (MORCILLO, 1993).

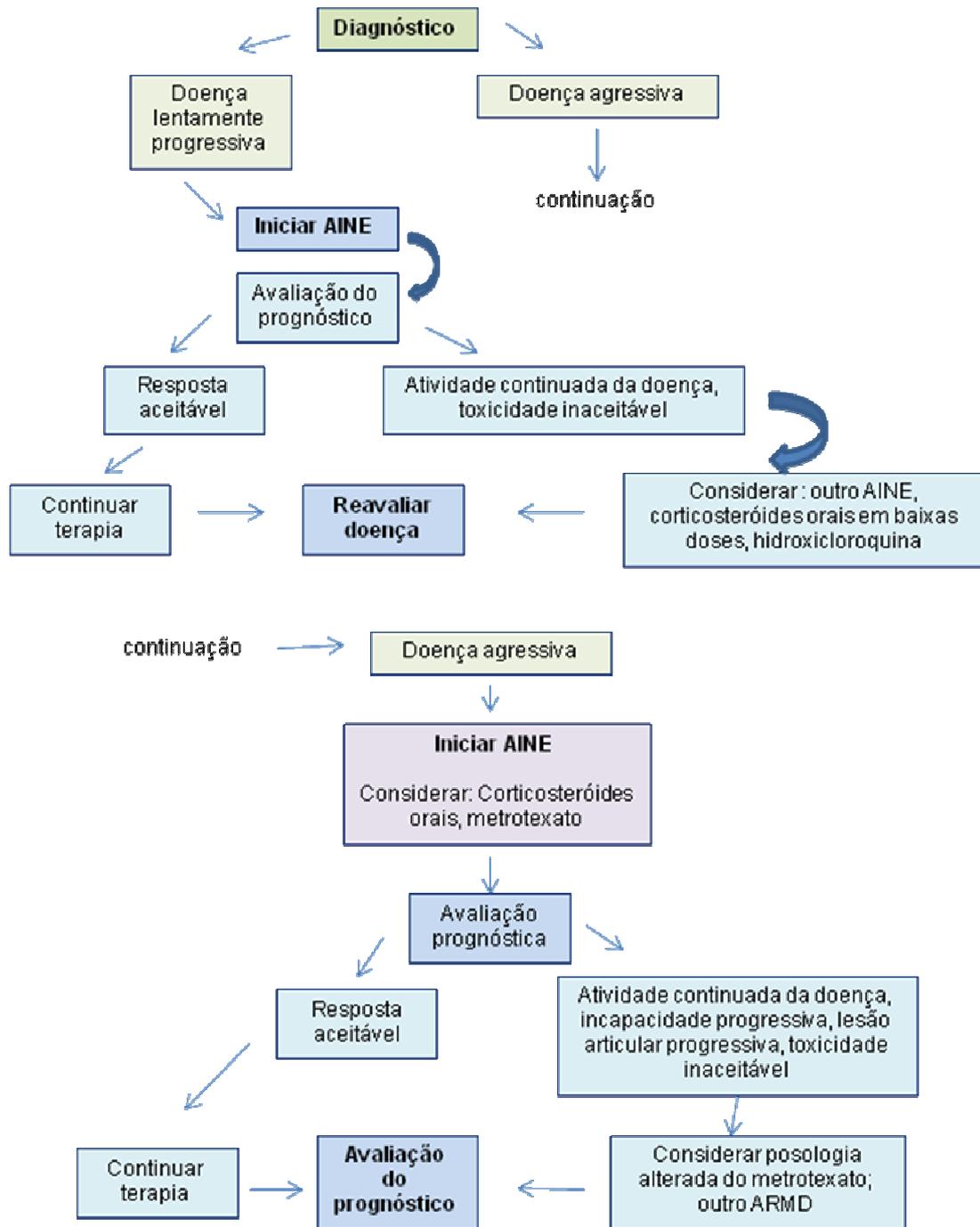


FIGURA 3: Esquema do tratamento da artrite reumatóide (Adaptado de LIPSKY, 1998).

2.4 Ibuprofeno

O ibuprofeno (ácido 2-(4-isobutilfenil) propiônico) é um AINE pertencente ao subgrupo dos derivados do ácido propiônico, que apresenta atividade antiinflamatória, antipirética e analgésica. É provavelmente a molécula mais estudada clinicamente entre todos os AINEs (BEJARANO, 2006). O ibuprofeno se apresenta na forma de um sólido cristalino, branco, com um leve odor e sabor característico. Possui apenas um carbono assimétrico, existindo como isômero (*S*)-(+)*dextro* ou (*R*)-(-)*levo* (Figura 4). O ibuprofeno comercial é composto por uma mistura racêmica, apesar de unicamente o enantiômero *S* (-) ser ativo (HIGTON, 1999). Entretanto, o enantiômero *R*(-) sofre uma inversão metabólica de configuração para formar a forma ativa (CARVALHO *et al.*, 2006). Em outras palavras, quando o fármaco é administrado na forma de racemato, o distômero é convertido “*in vivo*” em eutômero, enquanto o último não é afetado.

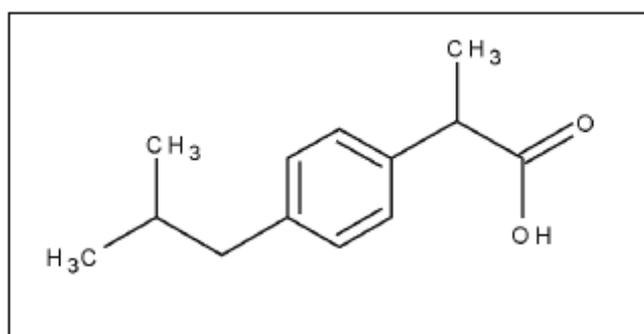


FIGURA 4: Estrutura química do ibuprofeno.

O ibuprofeno é um AINE pertencente à classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BSC) (KOCBEK, BAUMGARTNER, KRISTL, 2006), a qual inclui fármacos com baixa solubilidade aquosa e alta permeabilidade (PARK & CHOI, 2006). É praticamente insolúvel em água destilada, pouco solúvel em hexano e bastante solúvel em etanol, octanol, dimetil sulfóxido e clorofórmio (Tabela 2). A solubilidade do ibuprofeno aumenta com pH, sendo o fármaco bastante insolúvel a baixos pH. A determinação potenciométrica da constante de dissociação do

ibuprofeno fornece um valor de pKa de 4,54. Estudos têm demonstrado, também, que o ibuprofeno não possui polimorfismo e não é higroscópico (HIGTON, 1999).

TABELA 2: Solubilidade aproximada do ibuprofeno em temperatura ambiente (HIGTON, 1999).

SOLVENTE	SOLUBILIDADE (% p/v)
Acetona	>10
Etanol	>10
Octanol	33,0
Hexano	3,3
Água destilada	<0,1

O sistema enzimático das ciclooxigenases (COX) catalisa a conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas (PGs) biologicamente ativas, dentro de múltiplos processos homeostáticos, em quase todos os órgãos do corpo (proteção gastrintestinal, homeostase renal, funções uterinas, regulação da temperatura e do ritmo circadiano, entre outras). As prostaglandinas e outras citocinas regulam os processos reparativos correspondentes à resposta inflamatória periférica e à conseqüente sensibilização neuronal e dor. Os AINES são empregados na terapêutica por inibir a COX e regular a produção de PGs, diminuindo a inflamação e a hiperalgesia inflamatória e regulando as respostas neuronais basais, assim como os processos de transmissão neuronal nociceptiva no sistema nervoso central. A variabilidade entre os efeitos alcançados com o uso de determinado AINE depende, em primeiro lugar, do órgão onde encontra-se a enzima e, em segundo, de sua capacidade estrutural de adaptação a várias funções (polimorfismo). As COXs são um família de isoenzimas, sendo conhecidas até o momento a COX1, COX2 e COX3. O ibuprofeno inibe as três isoenzimas de modo eficaz (BEJARANO, 2006).

A analgesia do ibuprofeno tem sido avaliada extensamente e apresenta uma relação dose resposta de comportamento linear que facilita seu uso clínico. No

entanto, seus efeitos adversos se comportam na mesma forma de dose-resposta. As complicações graves (hemorragia, perfuração, morte) representam a maior ameaça, especialmente para as populações de risco (maiores de 75 anos, histórico de úlceras, hemorragia gastrointestinal prévia). A administração oral do ibuprofeno, assim como a dos demais AINEs, pode levar a erosões gástricas, úlceras, sangramentos e morte por hemorragia gastrointestinal (BEJARANO, 2006). A metabolização do ibuprofeno ocorre principalmente pelo fígado, onde é convertido a 2-hidroxiibuprofeno e 2-carboxi ibuprofeno. Efeitos adversos pela utilização de AINES são freqüentes devido ao grande uso deste fármaco (AL-NASSER, 1999).

O ibuprofeno é rapidamente absorvido por via oral. Estudos demonstram que após a administração oral de 400 mg, concentrações plasmáticas de 20-40 µg/mL são observadas. O pico de concentração ocorre entre 1-2 horas e diminui a 5 µg/mL após seis horas. A administração de doses múltiplas de 400 mg de 8 em 8 horas (1200 mg/dia) durante dois dias, em 15 pacientes com artrite, conduziram à obtenção de concentrações plasmáticas médias de 20 µg/mL e sinoviais de 7,5 µg/L. A administração tópica, quando em doses repetidas, pode proporcionar concentrações de fármaco 4-7 vezes maiores nos meniscos e cartilagens, comparada à administração oral. Por esta razão, a administração tópica resulta em concentrações no soro e no líquido sinovial inferiores àquelas alcançadas por administração oral, o que explica a ausência de efeitos adversos por esta via (BEJARANO, 2006).

As propriedades farmacológicas do ibuprofeno tornam-o um modelo de fármaco ideal para aplicações em inúmeros sistemas de liberação sustentada. O t_{max} é na ordem de 1,5 h e a meia-vida no organismo é de 2 h. Algumas tecnologias têm sido reportadas na literatura no intuito de prolongar a duração da ação do fármaco, ao retardar a sua liberação. Estas envolvem, geralmente, o recobrimento direto do fármaco, de grânulos, pellets, ou da forma farmacêutica final, ou ainda, a incorporação deste em uma matriz que, *in vivo*, libera lentamente o fármaco por meio de processos envolvendo a erosão e/ou difusão do mesmo (HIGTON, 1999). Microesferas de PLA ou PLAGA contendo ibuprofeno têm sido preparadas e avaliadas quanto à capacidade de prolongar a velocidade de liberação do fármaco. Leo e colaboradores (2000) observaram que parte do ibuprofeno apresenta-se no estado amorfo na superfície de microesferas de PLA, quando estas são preparadas

pela técnica de emulsão/evaporação do solvente. Esta camada superficial de fármaco leva à obtenção de um efeito *burst* pronunciado, sendo mais marcante a partir de microesferas com diâmetro reduzido, devido à maior área superficial total. A remoção desta camada mais externa e amorfa de ibuprofeno, pela lavagem com solução de carbonato de sódio, reduziu, quase que completamente, o efeito de liberação inicial. Quando a mesma técnica foi usada para a preparação de microesferas, a prévia solubilização do ibuprofeno no etanol provocou o deslocamento do fármaco em direção à superfície das partículas, acelerando ainda mais a velocidade de liberação, apesar do aumento da proporção do polímero na formulação ter causado um efeito contrário (PERUMAL, 2001).

Em outro estudo, a adição de Labrafil, um derivado do PEG, em microesferas de PLAGA, visando à administração intra-articular, modificou os perfis de liberação do ibuprofeno, controlando a velocidade de liberação e reduzindo o efeito *burst*. A formulação contendo 10% de Labrafil proporcionou concentrações *in vitro* próximas as calculadas como terapêuticas (8 µm/mL), durante 8 dias. A liberação do ibuprofeno a partir das microesferas sem aditivo alcançou 63-82% em apenas 24h, não satisfazendo a concentração “terapêutica” após este período (FERNÁNDEZ-CARBALLIDO *et al.*, 2004). Uma rápida liberação do ibuprofeno utilizando microesferas de PLAGA também foi obtida por Klose e colaboradores (2008), e foi atribuída a característica ácida do fármaco, que impossibilita sua interação com o polímero ou com os produtos de degradação deste, igualmente, ácidos. A utilização de novos polímeros para encapsulação de ibuprofeno, sintetizados a partir de ω-pentadecalactona, adipato de divinila e propano-1,3-diol (SH-L509) ou glicerol (SH-L510), tem, da mesma forma, demonstrado resultados interessantes. A velocidade de liberação encontrada com microesferas foi maior quando o polímero SH-L510 foi empregado, devido, provavelmente, a sua maior hidrofiliabilidade, facilitando a entrada do meio nas partículas (THOMPSON *et al.*, 2007).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Matérias-primas

- * Álcool polivinílico P.S. (Vetec, Brasil);
- * Gelatina farmacêutica-262 (YOD, Brasil);
- * Ibuprofeno (lote 63602203, origem Índia, Fraccionata Distribuidora de Matérias-primas LTDA, Brasil);
- * Poli (D-L-ácido láctico)-co-polietilenoglicol (PLA-PEG 66 kDa, 20% PEG 5000 kDa) (Alkermes Inc., EUA);
- * Poli-(3-hidroxibutirato) (Biocycle[®] 1000 FE 117, $M_n = 312,800 \text{ g mol}^{-1}$, PHB Industrial S.A., Brasil);
- * Trimiristato de glicerila (Dynasan[®]114, Sasol, Alemanha).

3.1.2 Reagentes e solventes

Todos os solventes utilizados possuíam grau de pureza para análise (p.a).

- * Ácido fosfórico 85% (Vetec);
- * Álcool etílico (Vetec);
- * Álcool isopropílico (F. Maia Indústria e Comércio);
- * Clorofórmio (99,5%) (Synth);
- * Diclorometano (Cromato Produtos Químicos LTDA);
- * Fosfato monobásico de potássio (Vetec);
- * Hidróxido de sódio (Vetec);
- * Metanol (F. Maia Indústria e Comércio);

3.1.3. Equipamentos

- * Agitadores ARE (Velp Científica);
- * Balança analítica (Ohaus Corporation AS200);

- * Banho Dubnoff CT 232 (Cientec);
- * Calorímetro diferencial de varredura, detector tipo DSC-50 (Shimadzu);
- * Centrífuga 4K15 (Sigma);
- * Difrátômetro de Raios-X marca SIEMENS modelo D5000;
- * Dissolutor Modelo 299 (Nova Ética);
- * Espectrofotômetro UV/Vis (Perkin Elmer Lambda 10);
- * Evaporador rotativo Q-344B (Quimis[®]);
- * Granulômetro a laser Cilas, modelo 1064;
- * Liofilizador Micromodulyo E-C (Shimadzu);
- * Manta aquecedora (Fisatom);
- * Microscópio eletrônico de varredura Philips XL 30;
- * Mufla MQBEP2000MP (Microquímica);
- * pHmêtro Acor Series (Oakton);
- * Ultra som, Ultrasonic clear USC 700 (Unique);
- * Viscosímetro Cannon Fenske AS 350 (Schott);
- * Vortex Mixer KMC-1300V (Vision Scientific CO. LTD).

3.2 MÉTODOS

PARTE I Avaliação do efeito da adição de trimiristato de glicerila sobre a liberação do ibuprofeno a partir de microesferas de poli-(3-hidroxi-butilato)

3.2.1 Preparação e caracterização das microesferas brancas e contendo ibuprofeno a partir de blendas de poli-(3-hidroxi-butilato) e trimiristato de glicerila

3.2.1.1 Preparação das microesferas

A preparação das microesferas foi realizada pelo método de emulsão/evaporação do solvente, conforme descrito por Watts e colaboradores (1990), e sob os parâmetros e concentrações utilizados por Carmingnan (2006). Brevemente, uma solução contendo o P(3HB) puro ou uma mistura de P(3HB) e trimiristato de glicerila (TMG) em clorofórmio ou diclorometano foram adicionados, lentamente, numa solução aquosa de álcool polivinílico 1% (p/v) ajustada a pH 5,0, sob agitação magnética de 800 rpm. A emulsão formada foi mantida sob agitação em temperatura ambiente até completa evaporação do solvente orgânico. Após repouso das formulações por 24 h, o sobrenadante foi descartado e as microesferas foram lavadas com água destilada, centrifugadas a 1000 rpm durante 3 minutos, e liofilizadas por 48 horas sob pressão de 5 Pascal e temperatura de -50 °C. Estes procedimentos conduziram a um rendimento médio em partículas de (86,68 ± 7,46)%.

A solubilização do P(3HB) no solvente orgânico foi realizada após a modificação de sua cristalinidade por um tratamento térmico, que consistiu no aquecimento do polímero até fusão (180°C), seguido de resfriamento abrupto em banho de gelo. Diferentes proporções de P(3HB) e TMG foram testadas: 9:1, 4:1, 3:1 e 1:1 e 1:0. Quando diclorometano foi utilizado como solvente, álcool isopropílico foi adicionado à fase externa, após a formação da emulsão o/a. Para a preparação das microesferas contendo ibuprofeno (IBF), o fármaco foi adicionado na fase orgânica das formulações, numa proporção fármaco:P(3HB) ou fármaco:blenda de 1:4. Todas as formulações foram preparadas em triplicata. Um esquema ilustrativo da

preparação das microesferas é apresentado na Figura 5. A composição das formulações testadas encontra-se demonstrada na Tabela 3.

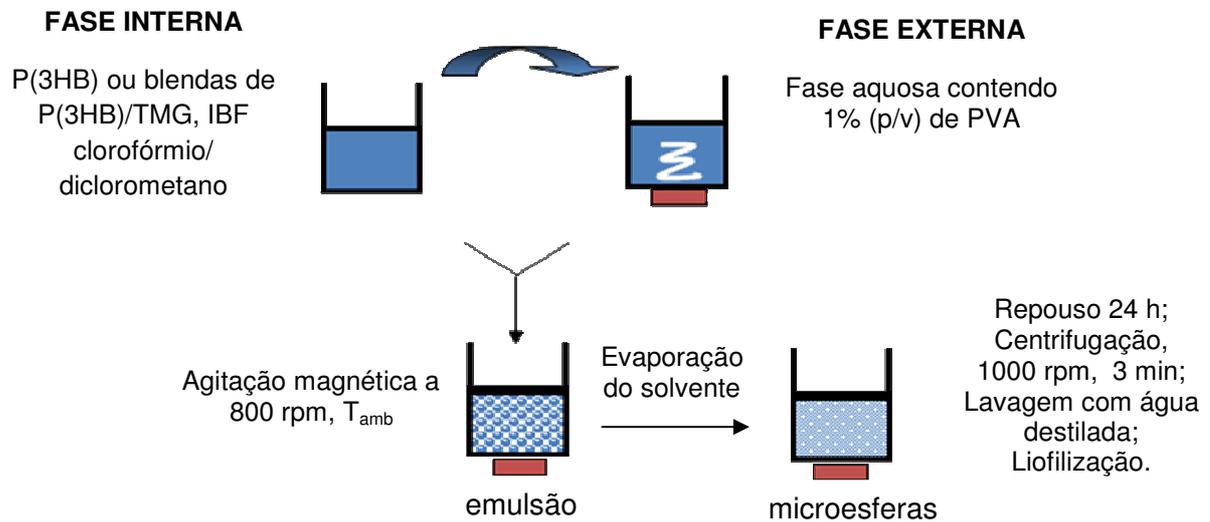


FIGURA 5: Esquema ilustrativo da preparação das microesferas pelo método de emulsão/evaporação do solvente.

3.2.1.2 Avaliação da viscosidade cinemática da fase interna

A avaliação da viscosidade cinemática da solução de P(3HB) ou de P(3HB) e TMG em clorofórmio, utilizadas como fase interna, foi realizada em um viscosímetro Cannon-Fenske automático, equipado com um capilar de 0,44 mm de diâmetro, termostaticado a 25 °C. As análises foram conduzidas em triplicata e as viscosidades foram determinadas a partir do tempo requerido pela solução para percorrer determinada região do capilar (fluxo), por meio da seguinte equação:

$$V = k \cdot (t - \psi)$$

V = viscosidade cinemática em cSt

k = constante do capilar utilizado (cSt/s)

t = tempo de corrida (s)

ψ = fator de correção da energia cinética (s)

TABELA 3: Composição das microesferas preparadas a partir de blendas de P(3HB) e TMG.

	Formulação									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fase orgânica										
P(3HB) ¹ (mg)	200	180	160	150	100	600	540	480	450	300
TMG (mg)	-	20	40	50	100	-	60	120	150	300
IBF ² (mg)	50	50	50	50	50	150	150	150	150	150
Clorofórmio qsp (mL)	20	20	20	20	20	-	-	-	-	-
Diclorometano qsp (mL)	-	-	-	-	-	60	60	60	60	60
Fase aquosa										
Solução de PVA 1% (p/V) pH 5,0 (mL)	100	100	100	100	100	300	300	300	300	300
Álcool isopropílico (mL)	-	-	-	-	-	10	10	10	10	10
Proporção P(3HB):TMG	1:0	9:1	4:1	3:1	1:1	1:0	9:1	4:1	3:1	1:1

¹ Foi utilizada uma solução do polímero 1% (p/v) em clorofórmio ou diclorometano.

² Para a preparação das microesferas contendo fármaco.

3.2.1.3 Caracterização das microesferas

3.2.1.3.1 Determinação da eficiência de encapsulação e teor de ibuprofeno nas microesferas

3.2.1.3.1.1 Curva de calibração do IBF em metanol

Para a construção da curva de calibração 500 mg de IBF, exatamente pesados, foram dissolvidos em metanol e o volume completado até 50,0 mL, em balão volumétrico. Esta solução foi então diluída de modo a obter soluções metanólicas de IBF em concentrações variando entre 200,0 e 650,0 µg/mL. As soluções foram preparadas em triplicata e analisadas por espectrofotometria de absorção no ultravioleta no comprimento de onda de 265 nm, contra o mesmo

solvente. A curva de calibração foi construída a partir das médias das absorvâncias de cada concentração, e a equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados pela análise de regressão linear.

3.2.1.3.1.2 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de ibuprofeno

Cerca de 60 mg de microesferas foram pesadas em um balão volumétrico de 25,0 mL e o volume completado com metanol. A mistura foi submetida à agitação magnética por 4 horas a temperatura ambiente. Este tempo foi estipulado através da avaliação de dois períodos diferentes de extração, 2 e 4 horas. Após as 4 horas, alíquotas do sobrenadante foram coletadas e analisadas em espectrofotômetro a 265 nm. A concentração de IBF foi determinada por meio da comparação da absorção da amostra com aquela obtida por uma solução padrão de IBF 400 µg/mL em metanol, analisada nas mesmas condições. A eficiência de encapsulação (E.E.%) e o teor de fármaco (mg IBF/100 mg de microesferas) foram calculados conforme as equações demonstradas abaixo:

$$E.E = \frac{C_{ibf} \times 25 \times 100}{Q_i} \qquad Teor = \frac{C_{ibf} \times 25 \times 100}{Q_p}$$

onde: C_{ibf} = concentração de ibuprofeno na solução analisada (mg/mL);

Q_i = massa de fármaco adicionado nas formulações (mg);

Q_p = massa de microesferas pesadas (mg).

Os resultados foram expressos pela média de três determinações e os valores de teor de ibuprofeno nas microesferas foram analisados e comparados por meio da ANOVA. Quando diferença significativa entre as médias foi detectada, a determinação de onde esta diferença ocorreu foi realizada pela aplicação do teste t, onde a diferença mínima significativa é calculada empregando-se a seguinte equação:

$$d.m.s. = t \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) \times QMR}$$

onde:

QMR é o quadrado médio do resíduo da análise de variância,
 n é o número de repetições de cada um dos tratamentos,
 t é o valor dado na tabela ao nível de significância escolhido ($p < 0,05$).

Assim, duas médias são estatisticamente diferentes toda vez que o valor absoluto da diferença entre elas for igual ou maior que a d.m.s.

3.2.1.3.2 Avaliação da morfologia das microesferas

A morfologia das microesferas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio Philips XL 30. As amostras foram fixadas com fita dupla-face em suportes de alumínio e recobertas com uma fina camada de ouro de 350 Å de espessura, em aparelho a vácuo Polaren E 500. As fotomicrografias foram obtidas nos aumentos de 250 e 1000 vezes.

3.2.1.3.3 Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Microesferas brancas e contendo IBF, obtidas a partir do P(3HB) e P(3HB):TMG 3:1, assim como os compostos puros e suas misturas físicas, foram analisados por calorimetria exploratória diferencial (DSC) em um equipamento DSC-50 (Shimadzu). Cerca de 3-14 mg de microesferas foram pesadas em cápsulas de alumínio, as quais foram lacradas, resfriadas a -50°C , e em seguida aquecidas até 250°C , numa velocidade de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera de nitrogênio. As temperaturas de transição vítrea (T_g) e de fusão (T_f) foram então obtidas a partir dos termogramas.

3.2.1.4 Avaliação do perfil de liberação do IBF a partir das microesferas

3.2.1.4.1 Curva de calibração do IBF em tampão fosfato 0,02 M pH 7,4

Para a construção da curva de calibração, uma solução metanólica de IBF foi preparada na concentração de 10,0 mg/mL. Esta solução foi diluída em tampão fosfato 0,02 M pH 7,4 a fim de obter soluções nas concentrações: 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 800 e 1000 µg/mL. As soluções foram preparadas em triplicata e analisadas em espectrofotômetro a 265 nm. A curva de calibração foi construída a partir das médias das absorvâncias de cada concentração, e a equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados pela análise de regressão linear.

3.2.1.4.2 Determinação da solubilidade do IBF no meio de liberação

Cerca de 1 g de IBF foi colocado em 20 mL de tampão fosfato 0,02M pH 7,4 e a mistura foi mantida sob agitação magnética a 800 rpm por 48 horas, em temperatura ambiente. Uma alíquota da mistura foi coletada, centrifugada a 5000 rpm durante 5 minutos e diluída cinco vezes com a solução tampão. A solução resultante foi analisada em espectrofotômetro a 265 nm. As amostras foram preparadas em triplicata e a concentração de IBF foi determinada pela comparação da absorvância das amostras com aquela obtida com uma solução padrão de IBF, analisada nas mesmas condições.

3.2.1.4.3 Avaliação do perfil de liberação do IBF em tampão fosfato 0,02 M pH 7,4

Para o ensaio de liberação, 100 mg de microesferas foram pesadas em frascos âmbar e colocadas em 20 mL de tampão fosfato 0,02 M pH 7,4. Os frascos foram fechados e colocados em banho a 37 °C, sob agitação mecânica constante. Alíquotas de 2,0 mL foram coletadas após 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 e 168 horas, e analisadas em espectrofotômetro a 265 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e, após cada coleta, o volume do meio foi repostado. A concentração de IBF no meio de liberação foi determinada pela comparação das absorvâncias das amostras com aquela obtida a partir de uma solução padrão de IBF 400 µg/mL, analisada nas mesmas condições.

A partir dos resultados, curvas de liberação de IBF, expressas em porcentagens (%) de fármaco liberado *versus* tempo (h), foram construídas.

3.2.2 Preparação e avaliação da morfologia de filmes obtidos a partir de blendas de poli (3-hidroxi butirato) e trimiristato de glicerila

3.2.2.1 Preparação dos filmes

Filmes de P(3HB) e P(3HB):TMG nas proporções 9:1, 4:1, 3:1 e 1:1, foram preparados, utilizando clorofórmio ou diclorometano como solvente. Para tal, 30 mL das soluções orgânicas contendo o polímero ou uma mistura de polímero e TMG foram vertidas em placas de Petri, posteriormente acondicionadas em dessecador para evaporação do solvente, em temperatura ambiente. Após a completa evaporação do solvente, os filmes foram removidos cuidadosamente das placas.

3.2.2.2 Avaliação da morfologia dos filmes

As superfícies superiores dos filmes e as suas respectivas superfícies de fratura foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura, conforme procedimentos descritos em 3.2.1.3.2. As fotomicrografias foram obtidas nos aumentos de 500 e 1000 vezes.

PARTE II Efeito da adição de poli (D-L-ácido lático)-*b*-poli(etilenoglicol) (PLA-PEG) e gelatina (GEL) sobre as propriedades físico-químicas das partículas e sobre o perfil de liberação do ibuprofeno a partir de microesferas de poli-(3-hidroxibutirato)

3.2.3 Preparação e caracterização das microesferas

3.2.3.1 Preparação das microesferas brancas e contendo ibuprofeno a partir de blendas de P(3HB) e PLA-PEG

As microesferas foram preparadas conforme descrito em 3.2.1.1, empregando o diclorometano como solvente orgânico da fase interna. Diferentes proporções de P(3HB) e PLA-PEG foram testadas: 1:0, 3:1 e 1:1. Álcool isopropílico foi adicionado à fase externa após a formação da emulsão o/a, em uma proporção de 1 mL para cada 30 mL de solução de álcool polivinílico 1%. Estas microesferas foram denominadas de brancas e aquelas contendo IBF foram obtidas pela adição de IBF na proporção fármaco:P(3HB) ou fármaco:blenda de 1:4, na fase interna das formulações. A composição das formulações pode ser visualizada na Tabela 4.

TABELA 4: Composição das microesferas preparadas a partir de blendas de P(3HB) e PLA-PEG.

	Proporção P(3HB):PLA-PEG		
	1:0	3:1	1:1
Fase orgânica			
P(3HB) ¹ (mg)	600	450	300
PLA-PEG (mg)	-	150	300
IBF ² (mg)	150	150	150
Diclorometano qsp (mL)	60	60	60
Fase aquosa			
Solução de PVA 1% (p/V) pH 5,0 (mL)	300	300	300
Álcool isopropílico (mL)	10	10	10

¹ Foi utilizada uma solução do polímero 1% (p/v).

² Para a preparação das microesferas contendo fármaco.

3.2.3.2 Preparação das microesferas brancas e contendo ibuprofeno a partir do P(3HB) e gelatina

Microesferas de P(3HB) e gelatina (GEL) foram preparadas pelo método de dupla emulsão/ evaporação do solvente, descrita por Watts (1990). Neste caso, uma solução aquosa de gelatina 1% pH 6,5, contendo ou não etanol, foi adicionada em uma solução de P(3HB) em diclorometano, sob agitação magnética a 1200 rpm. Em seguida, a emulsão a/o formada foi adicionada em 300 mL de uma solução de PVA 1% pH 5,0, também sob agitação magnética a 1200 rpm. A dupla emulsão formada foi mantida sob agitação em temperatura ambiente até completa evaporação do solvente orgânico. Após repouso das formulações por 24 h, o sobrenadante foi descartado e as microesferas foram lavadas com água destilada, centrifugadas a 1000 rpm durante 3 minutos, e liofilizadas. As formulações contendo etanol foram previamente submetidas à evaporação sob pressão reduzida para remoção do solvente. Estas microesferas foram denominadas de brancas e aquelas contendo IBF foram obtidas pela dispersão prévia do fármaco na solução aquosa de gelatina 1%, na proporção fármaco:P(3HB) de 1:4. A composição das formulações pode ser visualizada na Tabela 5. Um esquema ilustrativo da preparação das microesferas encontra-se demonstrado na Figura 6.

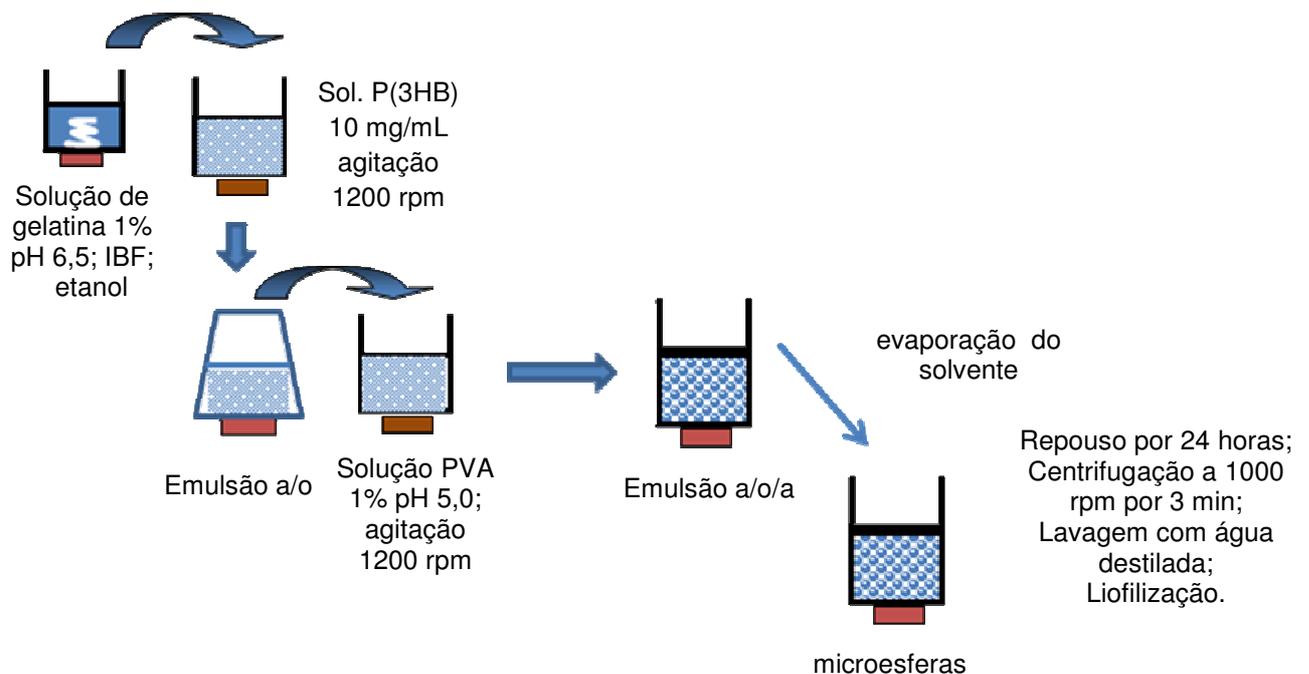


FIGURA 6: Esquema ilustrativo da preparação de microesferas de P(3HB) e gelatina.

TABELA 5: Composição das formulações de microesferas preparadas a partir do P(3HB) e gelatina 10:1.

	Formulação	
	1	2
Fase aquosa 1		
Gelatina ¹ (mg)	60	60
Etanol (mL)	-	1
IBF ² (mg)	150	150
Água (mL)	6	6
Fase orgânica		
P(3HB) ³ (mg)	600	600
Diclorometano qsp (mL)	60	60
Fase aquosa 2		
Solução de PVA 1% (p/V) pH 5,0 (mL)	300	300

¹ Foi utilizada uma solução de gelatina 1% (p/v).

² Para a preparação das microesferas contendo fármaco (p/v).

³ Foi utilizada uma solução do polímero 1%.

3.2.3.3 Caracterização físico-química das microesferas

3.2.3.3.1 Determinação da eficiência de encapsulação e teor de ibuprofeno nas microesferas

A determinação da eficiência de encapsulação e do teor de fármaco foi realizada conforme metodologia descrita em 3.2.1.3.1.

3.2.3.3.2 Avaliação da morfologia das microesferas

A superfície e morfologia das microesferas, antes e após o ensaio de liberação, foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura, conforme descrito em 3.2.1.3.2. As fotomicrografias foram obtidas nos aumentos de 250 e 1000 vezes.

3.2.3.3.3 Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica das microesferas

O diâmetro médio e a distribuição granulométrica das microesferas foram determinados por granulometria a laser em equipamento Cilas modelo 1064 (0,04 - 500 μm), após dispersão das partículas em água, com auxílio de ultrassom.

3.2.3.3.4 Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As propriedades térmicas das microesferas brancas e contendo IBF, obtidas a partir do P(3HB), P(3HB):PLA-PEG 3:1 e P(3HB):GEL 10:1, assim como os compostos puros e suas misturas físicas, foram avaliadas por calorimetria exploratória diferencial (DSC), conforme descrito em 3.2.1.3.3.

3.2.3.3.5 Difração de Raios-X

Os modelos de difração de raios-X das microesferas brancas e contendo IBF, obtidas a partir do P(3HB), P(3HB):PLA-PEG 3:1, P(3HB):PLA-PEG 1:1 e P(3HB):GEL 10:1, assim como os compostos puros e suas misturas físicas, foram obtidos utilizando um difratômetro marca SIEMENS modelo BRUKER-AXES D5000 equipado com goniômetro $\theta - \theta$. Na emissão de raios-X foi utilizado ânodo de cobre radiação $\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$, voltagem de 40kV e intensidade de corrente de 25 mA. As fendas foram de 1° e 1° (divergente e de antiespalhamento) e de 2 mm no monocromador de grafite. As análises foram realizadas em uma faixa de 2° a 75° em temperatura ambiente de 25°C .

3.2.3.4 Avaliação do perfil de liberação do IBF a partir das microesferas

O perfil de liberação das microesferas contendo IBF foi avaliado pelo método da diálise, usando um aparelho de dissolução (Dissolutor modelo 299, Nova Ética, Brasil). Neste método, cerca de 300 mg de microesferas foram pesadas e transferidas para o interior de um saco de diálise (Spectra/Por[®] CE MIUCO 10000) e ressuspensas com 1,0 mL de tampão fosfato 0,02 M pH 7,4. Após o fechamento, o

saco de diálise foi colocado em 300 mL de tampão fosfato 0,02 M pH 7,4 a 37 °C, mantido sob agitação de 70 rpm. Alíquotas de 2 mL do meio foram coletadas após 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 33, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de ensaio, e analisadas em espectrofotômetro a 265 nm. O ensaio foi conduzido em triplicata e, após cada coleta, o volume removido foi repostado para o meio de liberação. A concentração de IBF no meio foi obtida por meio da comparação das absorvâncias das amostras analisadas com aquela obtida para uma solução padrão de IBF 400 µg/mL, analisada nas mesmas condições. A partir dos resultados, curvas de liberação de IBF, expressas em porcentagens (%) de fármaco liberado *versus* tempo (h), foram construídas. Os perfis de liberação obtidos com as diferentes formulações foram analisados e comparados estatisticamente pela ANOVA, empregando-se como variáveis o percentual de fármaco liberado após 1 hora e as áreas sob as curvas de liberação (ASC), calculadas pelo método trapezoidal, nos demais períodos do ensaio. A comparação entre as médias foi realizada mediante aplicação do teste t. O valor de diferença mínima significativa entre duas médias foi calculado empregando-se a seguinte equação:

$$d.m.s. = t \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) \times QMR}$$

onde:

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

n é o número de repetições de cada um dos tratamentos,

q é o valor dado na tabela ao nível de significância escolhido ($p < 0,05$).

3.2.3.5. Preparação e avaliação da morfologia de filmes obtidos a partir de blendas de poli-(3-hidroxi-butanato) e poli-(D,L-ácido láctico)-*b*-poli(etilenoglicol)

3.2.3.5.1 Preparação dos filmes

Filme de P(3HB) e P(3HB):PLA-PEG na proporção de 3:1 foi preparado, utilizando diclorometano como solvente, conforme descrito em 3.2.2.1.

3.2.3.5.2 Avaliação da morfologia dos filmes

As superfícies superiores dos filmes e as suas respectivas superfícies de fratura foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura, conforme procedimentos descritos em 3.2.1.3.2. As fotomicrografias foram obtidas nos aumentos de 500 e 1000 vezes.

PARTE III Avaliação preliminar da eficácia terapêutica *in vivo* do ibuprofeno liberado a partir das microesferas em modelo de artrite crônica induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA)

3.2.4 Animais

Os experimentos foram realizados com ratos fêmeas *Wistar* com idade aproximada de três meses, pesando entre 200 e 300 g. Os animais foram criados até o desmame pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia até o início dos experimentos, onde foram deslocados ao Biotério do Laboratório de Neurobiologia da Nocicepção. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e luz (ciclo de claro/escuro de 12 horas) e com acesso à água e comida *ad libitum*. No dia do experimento, os animais foram removidos do biotério cerca de 1 hora antes para ambientação. Os ensaios *in vivo* foram conduzidos após prévia aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (Protocolo PP00075).

3.2.5 Protocolos Experimentais

3.2.5.1 Indução da artrite crônica pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA)

A estimulação da artrite crônica pelo CFA (suspensão de *Mycobacterium butyricum* morto em óleo mineral, 1mg/mL, Difco) e a incapacitação articular foram conduzidas em duas etapas, conforme descrito por Gomes (2007). Na primeira etapa, 50 μL de CFA foram injetados na base da cauda dos animais. Esta injeção intra-dérmica (i.d.) foi realizada com auxílio de uma seringa de 1 mL e agulha 13 x 4,5 mm e constituiu-se no primeiro estímulo artritogênico recebido pelos animais. Após 21 dias, a incapacitação articular foi obtida pela injeção intraarticular (i.a.), no joelho posterior direito, do mesmo volume de CFA (reestimulação). A injeção intraarticular foi realizada na articulação tíbio-femural através do ligamento suprapatelar, para o interior da cavidade sinovial e os sítios de injeção foram previamente depilados e

submetidos à anti-sepsia com solução de álcool iodado. Todos os tratamentos foram conduzidos após 24 horas da reestimulação com CFA.

3.2.5.2 Avaliação da incapacitação articular

Para avaliar o grau de incapacitação motora do membro que recebeu o estímulo nociceptivo, foi utilizado o modelo de incapacitação articular em ratos, descrito por Tonussi e Ferreira (1992). Este modelo consiste na determinação do tempo de elevação da pata (TEP) de animais submetidos a caminhada forçada por 60 segundos. A caminhada é realizada em um cilindro de aço inox (30 cm de largura e 30 cm de diâmetro), coberto com tela de arame de trama fina de aço inoxidável, com rotação contínua de 3 rpm. A superfície do cilindro é dividida em três trilhos iguais, o que permite a avaliação de três animais simultaneamente. Em ambas as patas posteriores do animal são ajustadas sapatilhas metálicas e a sapatilha colocada na pata direita é conectada à porta de dados do computador (Figura 7). O tempo total que a pata posterior direita dos animais fica sem tocar a superfície do cilindro durante este período é registrado pelo programa Ratlimb (Tonussi e Ferreira, 1992). Neste modelo, o TEP dos animais sem estimulação articular varia em torno de 10 segundos enquanto a injeção intraarticular de substâncias alogênicas causa elevação deste valor, indicando o desenvolvimento de incapacitação articular. Os animais foram treinados na roda antes da realização dos experimentos.



FIGURA 7: (A) Ratas com as sapatilhas metálicas e (B) cilindro de aço inox utilizado na determinação da incapacitação articular através da medida do tempo de elevação da pata (TEP,s).

3.2.5.3 Avaliação do edema articular

A avaliação do edema articular induzido por CFA foi realizada por meio da medida do diâmetro articular, imediatamente após cada medida da incapacitação articular. Para isso, os animais foram gentilmente imobilizados dentro de um cone de polietileno e a medida do diâmetro da articulação tíbio-femural do joelho posterior direito foi obtida com auxílio de um paquímetro não digital (Figura 8). Os dados foram expressos como sendo a diferença média entre o valor obtido antes da reestimulação com CFA e os valores obtidos após o tratamento (variação do diâmetro articular, DA, cm).



FIGURA 8: Medida do diâmetro articular com auxílio de um paquímetro não-digital.

3.2.5.4 Leucograma do fluido sinovial

Ao término do período de sete dias de cada tratamento, os animais foram sacrificados por injeção de hidrato de cloral (15%, 3 mL/animal) seguida de desclocamento cervical. Após eutanásia e exposição da cápsula articular, a retirada do líquido sinovial da articulação do joelho posterior direito e a lavagem da cavidade articular com 100 μ L salina heparinizada foram realizadas. Este lavado foi utilizado para a contagem total de leucócitos com auxílio de uma câmara de Neubauer e microscópio óptico, com aumento de 40x.

3.2.6 Avaliação da resposta terapêutica do ibuprofeno após administração i.a. das microesferas

Para avaliar a resposta terapêutica alcançada com o ibuprofeno liberado a partir das microesferas, a formulação que demonstrou o melhor desempenho *in vitro* foi selecionada e o delineamento do experimento foi conduzido conforme exposto na Tabela 6. A dose de ibuprofeno selecionada para administração intraarticular foi de 50 µg, com base em concentrações terapêuticas teóricas descritas na literatura (FERNANDÉZ-CARBALLIDO, 2004). As microesferas foram pesadas considerando o teor de fármaco encapsulado, sendo as microesferas brancas pesadas na mesma proporção. O fármaco livre e as microesferas contendo ibuprofeno foram ressuspensos em 50 µL de salina com 5% de tween 80 e o sítio de injeção foi previamente depilado e submetido à anti-sepsia com solução de álcool iodado. A avaliação da incapacitação e do edema articular ocorreu 24 horas antes da reestimulação, 1, 24, 48, 72, 96, 120 e 168 h após o tratamento. Cada grupo constituiu-se de seis animais.

TABELA 6: Delineamento dos grupos de animais utilizados para avaliar a resposta terapêutica com ibuprofeno liberado a partir das microesferas.

Grupos	Via de administração	Tratamento	Dose IBF (µg)
Controle positivo	i.a.	CFA/salina + 5% tween 80	-
Grupo A	i.a.	CFA/IBF livre/ salina + 5% tween 80	50
Grupo B	i.a.	CFA/Microesferas brancas/ salina + 5% tween 80	-
Grupo C	i.a.	CFA/Microesferas com IBF/ salina + 5% tween 80	50

3.2.7 Análise estatística dos resultados

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais. A análise estatística dos dados foi realizada no programa “Graph Pad Prism 3.0[®]”, através da análise de variância (ANOVA) de uma via ou para medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE I Efeito da adição de trimiristato de glicerila sobre a liberação do ibuprofeno a partir de microesferas de poli-(3-hidroxi-butirato)

4.1 Preparação e caracterização das microesferas

Em decorrência da elevada cristalinidade e elevada massa molar ($312,800 \text{ g mol}^{-1}$), os polihidroxiálcanoatos são polímeros que perdem massa muito lentamente quando comparados a outros poliésteres alifáticos como o poli-(D,L-ácido láctico). A liberação de moléculas ativas de reduzida massa molar a partir de matrizes de PHAs ocorre por meio da penetração de água e formação de poros, numa velocidade substancialmente maior que a degradação do polímero. Conseqüentemente, microesferas preparadas a partir destes materiais tendem a se acumular no organismo após implantação. Portanto, aplicações dos PHAs em sistemas de liberação dependem, na maioria das vezes, da formação de blendas adequadas com outros materiais biocompatíveis, uma vez que estas permitem controlar a cristalinidade, porosidade e velocidade de erosão das partículas e, por conseguinte, a capacidade de incorporação e de liberação dos fármacos (CHEN, WU, 2005).

O efeito da formação de blendas de P(3HB) e trimiristato de glicerila (TMG) (Figura 9) sobre as características físico-químicas e sobre a velocidade de liberação do IBF a partir das microesferas foi avaliado na primeira parte deste trabalho. Os ésteres de triglicerídeos são matérias-primas amplamente empregadas na preparação de formulações lipídicas de uso parenteral, tendo sido utilizados por outros autores na preparação de microesferas. Blendas de diferentes proporções de P(3HB) e TMG foram testadas. Como o ibuprofeno é um fármaco pouco solúvel em água, mas solúvel em clorofórmio e diclorometano, era esperado que este antiinflamatório fosse facilmente incorporado nas microesferas pelo emprego da técnica de emulsão o/a, seguida pela evaporação do solvente. A velocidade de eliminação do solvente pode influenciar as propriedades finais das partículas (RADWAN *et al.*, 1995) e, portanto, foi uma das condições consideradas no delineamento dos experimentos. Assim, o uso de clorofórmio e diclorometano como solventes da fase interna e a adição de álcool isopropílico na fase externa foram igualmente testados. As demais condições empregadas no preparo das

microesferas, descritas em 3.2.1.1., foram aquelas estipuladas por Carmingnan (2006).

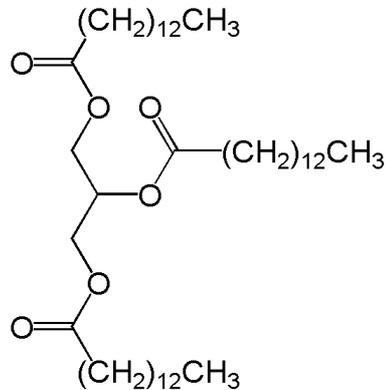


FIGURA 9: Estrutura química do trimiristato de glicerila.

4.1.1 Determinação da eficiência de encapsulação e teor de ibuprofeno nas microesferas

Conforme exposto em 3.2.1.3.1.2, a espectrofotometria de absorção no ultravioleta foi empregada para determinação da eficiência de encapsulação e do teor do IBF. Para isto, uma curva de calibração do IBF foi construída após análise de soluções metanólicas do fármaco com concentrações variando entre 200 e 650 $\mu\text{g/mL}$. Na Figura 10 encontra-se demonstrada a curva de concentração de ibuprofeno *versus* absorbância, assim como a equação da reta e o coeficiente de correlação, obtidos após análise da regressão linear. Na faixa de concentração testada, o método usado demonstrou um comportamento linear significativo. A ausência de erro sistemático constante também foi verificada, uma vez que os valores do intervalo de confiança do intercepto incluíram o valor zero (Tabela 7).

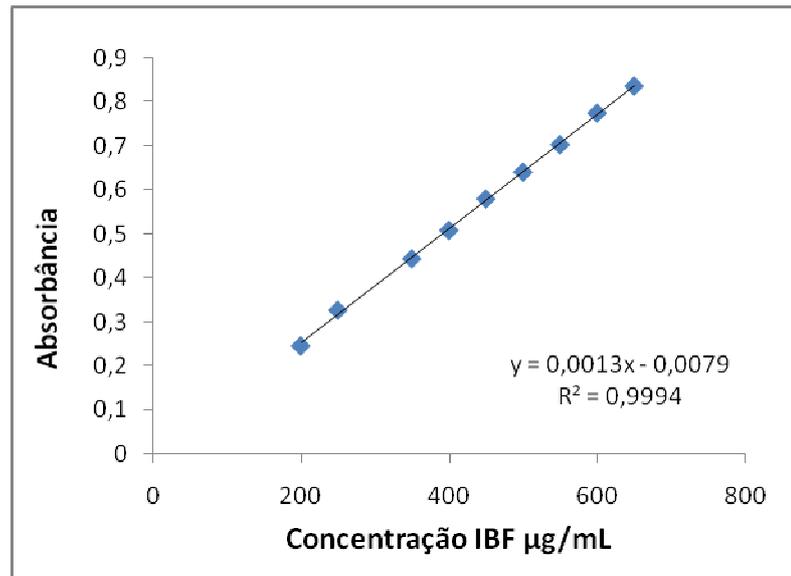


FIGURA 10: Curva de calibração do ibuprofeno em metanol obtida por espectrofotometria de absorção no ultravioleta.

TABELA 7: Análise dos dados da regressão obtidos a partir da curva de calibração do ibuprofeno por espectrofotometria de absorção no ultravioleta.

Parâmetros de regressão	Valores
Intercepto (intervalo de confiança)	-0,0079 (-0,49066 a 0,47486)
Inclinação (intervalo de confiança)	0,0013 (-0,00769 a 0,01029)
R^2	0,9994

Os valores de eficiência de encapsulação e teor de ibuprofeno obtidos após extração e determinação do fármaco por espectrofotometria de absorção no ultravioleta estão demonstrados na Tabela 8.

TABELA 8: Valores de eficiência de encapsulação e de teor de ibuprofeno nas microesferas (n=3).

Formulações	E.E. \pm d.p. (%)		Teor de fármaco \pm d. p. (mg IBF/100mg microesferas)	
	Clorofórmio	Diclorometano ¹	Clorofórmio	Diclorometano ¹
P(3HB)	81,98 \pm 4,97	81,22 \pm 0,33	16,26 \pm 0,95	16,26 \pm 0,04
P(3HB):TMG 9:1	73,89 \pm 4,59	77,33 \pm 0,13	14,69 \pm 0,92	15,46 \pm 0,03
P(3HB):TMG 4:1	81,05 \pm 4,65	79,13 \pm 1,34	16,38 \pm 0,76	15,83 \pm 0,27
P(3HB):TMG 3:1	62,55 \pm 13,67	81,39 \pm 1,01	12,48 \pm 2,75	16,28 \pm 0,21
P(3HB):TMG 1:1	66,58 \pm 2,13	68,49 \pm 1,55	13,31 \pm 0,43	13,70 \pm 0,31

¹Com adição de álcool isopropílico na fase externa, após formação da emulsão.

Como pode ser visualizado, elevados valores de eficiência de encapsulação foram obtidos, mas pareceram reduzir com o aumento da proporção de TMG nas microesferas. Os valores de teor de fármaco, estimados a partir dos resultados de eficiência de encapsulação, foram submetidos à análise da variância (ANOVA). A análise estatística indicou que o teor de IBF nas microesferas foi afetado pelas condições de preparação ($F_{cal} > F_{crit}$, $\alpha = 0,05$) (Tabela 9). Para verificar onde ocorreu esta diferença, as médias dos valores de teor de fármaco foram comparadas por meio da aplicação do teste t. Pode-se observar que nenhum dos valores referentes à diferença entre as médias foi igual ou maior que a d.m.s., 4,14. Desta forma, verifica-se que, neste caso, o teste t não foi capaz de identificar a diferença entre as médias indicada pela ANOVA, provavelmente porque o F, embora significativo, esteja próximo da não significância (Tabela 10). Com isso, pode-se inferir que a alteração do solvente orgânico da fase interna e a adição de álcool isopropílico na fase externa não afetaram a associação do fármaco. Além disso, o aumento da proporção de TMG na blenda não reduziu significativamente o teor de ibuprofeno nas partículas.

Outra observação importante a ser realizada a respeito dos valores obtidos para eficiência de encapsulação e teor de fármaco é o aumento da homogeneidade das partículas, em relação a estes parâmetros, quando o solvente orgânico empregado na fase interna é o diclorometano.

TABELA 9: Análise da variância obtida a partir dos valores de teor de fármaco.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F	F _{crítico}
Tratamento	97,30	9	10,81	6,52	2,16
Resíduo	58,00	35	1,66		
Total	155,30	44			

$\alpha = 0,05$

TABELA 10: Valores da diferença entre as médias dos teores de IBF (mg/ 100mg microesferas) para as formulações.

Formulações		Diferença entre as médias dos teores de IBF									
		Clorofórmio					Diclorometano				
		9:1	4:1	3:1	1:1	1:0	9:1	4:1	3:1	1:1	
	P(3HB): TMG	Teor	14,69	16,38	12,48	13,31	16,26	15,46	15,83	16,28	13,70
Clorofórmio	1:0	16,26	1,57	-0,12	3,78	2,95	0	0,80	0,43	-0,02	2,56
	9:1	14,69		-1,69	2,21	1,38	-1,57	-0,77	-1,14	-1,59	0,99
	4:1	16,38			3,90	3,07	0,12	0,92	0,55	0,10	2,68
	3:1	12,48				-0,83	-3,78	-2,98	-3,35	-3,80	-1,22
	1:1	13,31					-2,95	-2,15	-2,52	-2,97	-0,39
Diclorometano	1:0	16,26						0,80	0,43	-0,02	2,56
	9:1	15,46							-0,37	-0,82	1,76
	4:1	15,83								-0,45	2,13
	3:1	16,28									2,58

* diferença significativa, $\alpha = 0,05$, dms teste t=4,14

4.1.2 Caracterização físico-química

4.1.2.1 Avaliação da morfologia das microesferas

Quando a técnica de emulsão/evaporação do solvente é empregada, as características de superfície e a porosidade das partículas resultantes têm sido correlacionadas com a cristalinidade e velocidade de precipitação do polímero. Tendo em vista que a evaporação ocorre na interface ar-água, qualquer parâmetro de formulação que altere a solubilidade do solvente na fase externa afeta a sua velocidade de remoção da fase interna. Em geral, quanto mais rápida é a eliminação do solvente, mais rápida é a precipitação do polímero e mais porosa é a superfície das partículas (MARTIN *et al.*, 2000).

As micrografias obtidas das microesferas preparadas a partir das blendas de P(3HB) e TMG, nas diferentes proporções, e utilizando clorofórmio como solvente orgânico da fase interna, podem ser visualizadas na Figura 11. Partículas esféricas, apresentando diâmetro em torno de 50 μm , foram obtidas para todas as formulações testadas. Entretanto, as micrografias claramente demonstram a redução da porosidade e rugosidade das partículas com o aumento da proporção de TMG na blenda. Visto que outros fatores que poderiam afetar a velocidade de remoção do solvente foram mantidos constantes, as diferenças observadas na aparência da superfície das partículas podem ser relacionadas unicamente à adição de TMG para a formação da matriz.

Zanetti-Ramos e colaboradores (2006) descreveram que o aumento da viscosidade da fase interna da emulsão, causado pelo uso de polímero de maior massa molar, reduziu a velocidade de difusão do solvente para a fase externa, levando à formação de partículas de acetobutirato de celulose menos porosas. Portanto, com o intuito de verificar se a adição de TMG influencia a viscosidade da fase interna a ponto de alterar as características de superfície das partículas, medidas de viscosidade cinemática das soluções de P(3HB):TMG em clorofórmio foram realizadas e os resultados podem ser visualizados na Tabela 11. Como pode ser observado, o aumento da proporção de TMG na blenda conduziu à redução da viscosidade da solução de clorofórmio. Tendo em vista que um efeito contrário seria esperado, a menor porosidade das partículas não pode ser explicada pelo efeito da viscosidade sobre a velocidade de eliminação do solvente.

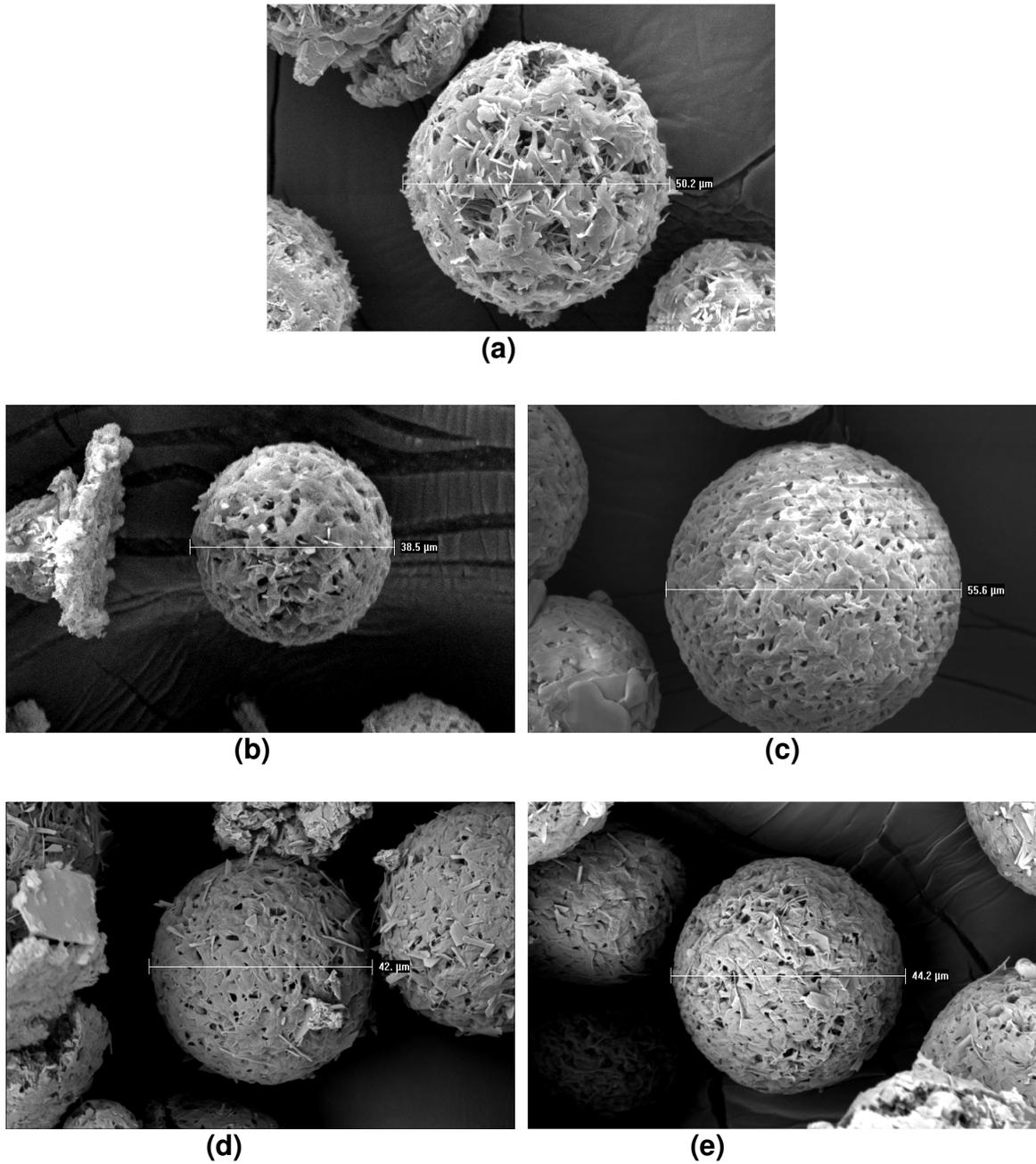


FIGURA 11: Micrografias obtidas por MEV das microesferas contendo fármaco IBF preparadas com solvente clorofórmio a partir de (a) P(3HB), (b) P(3HB):TMG 9:1, (c) P(3HB):TMG 4:1, (d) P(3HB):TMG 3:1 e (e) P(3HB):TMG 1:1, em aumento de 1000 vezes.

TABELA 11: Viscosidade cinemática de soluções de P(3HB) e trimiristato de glicerila em clorofórmio.

Formulação	Viscosidade cinemática (cSt)
P(3HB)	1,027 ± 0,002
P(3HB):TMG 9:1	0,953 ± 0,001
P(3HB):TMG 4:1	0,879 ± 0,002
P(3HB):TMG 3:1	0,860 ± 0,004
P(3HB):TMG 1:1	0,662 ± 0,002

Uma estratégia que tem sido considerada por pesquisadores para alteração da velocidade de remoção do solvente consiste no uso de misturas binárias de solventes orgânicos na fase interna, um imiscível e outro miscível em água como, por exemplo, clorofórmio e acetona (MURAKAMI *et al.*, 1999; MAIA, SANTANA, RÉ, 2004), ou ainda a adição de solventes hidromiscíveis na fase externa, após a formação da emulsão (MENG *et al.*, 2004). Considerando que a magnitude e a velocidade de transferência do solvente da fase interna para a fase aquosa dependem da solubilidade, o clorofórmio foi substituído pelo diclorometano e álcool isopropílico foi adicionado à fase externa da emulsão. A presença do álcool provocaria a remoção mais rápida do diclorometano de dentro das gotículas de emulsão, formando uma ponte de afinidade entre a solução aquosa e o solvente orgânico.

Quando as micrografias das microesferas contendo IBF preparadas unicamente com P(3HB) são comparadas (Figura 11a e 13a), é possível observar que a substituição do clorofórmio pelo diclorometano provoca alterações significativas na morfologia das partículas. A utilização do diclorometano pareceu não somente conduzir à redução do diâmetro de partícula, mas também levou a uma redução considerável na rugosidade das mesmas. Este efeito sobre a morfologia de partículas, causado pela substituição do clorofórmio para o diclorometano, também foi observado por outros autores (GRANGADE & PRICE, 1991; MARTIN *et al.*, 2000). Aparentemente, a alteração do solvente da fase interna da emulsão altera o modo de cristalização do polímero. Esta pode também ser uma possível explicação

à elevada homogeneidade dos valores de eficiência de encapsulação e teor de ibuprofeno descritos anteriormente, obtidos a partir de partículas preparadas utilizando-se o diclorometano como solvente orgânico.

Por outro lado, quando o diclorometano é empregado, o aumento da proporção de TMG na blenda conduziu à obtenção de partículas altamente porosas (Figura 12), sugerindo a formação de canais pelo éster de triglicerídeo, conforme descrito por outros autores (KUBOTA *et al.*, 1987; URATA, ARIMORI, NAKANO, 1999; SCHAEFER, SINGH, 2000). No entanto, a presença do ibuprofeno nestas partículas parece preencher estes canais, tornando a partícula visivelmente mais compacta (Figura 13). Apesar do álcool isopropílico ter sido adicionado à fase externa com a intenção de acelerar o processo de remoção do solvente orgânico, a comparação das micrografias obtidas a partir das microesferas não demonstra alterações visíveis na superfície das partículas preparadas com e sem a adição deste álcool, indicando que a morfologia das partículas é afetada principalmente pelo tipo de solvente orgânico empregado na fase interna da emulsão (Figura 14).

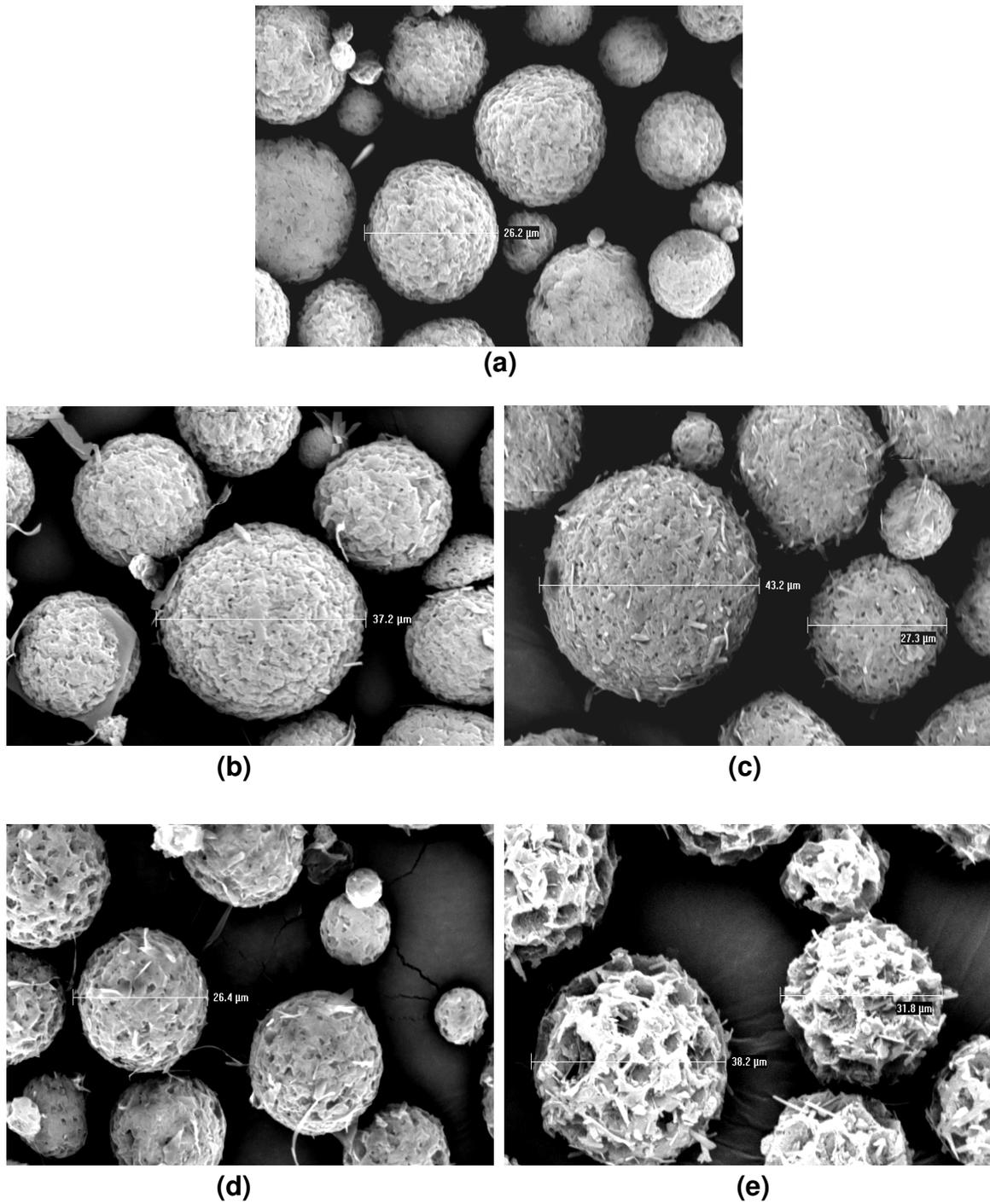


FIGURA 12: Micrografias obtidas por MEV das microesferas brancas preparadas com solvente diclorometano a partir de (a) P(3HB), (b) P(3HB):TMG 9:1, (c) P(3HB):TMG 4:1, (d) P(3HB):TMG 3:1 e (e) P(3HB):TMG 1:1, em aumento de 1000 vezes.

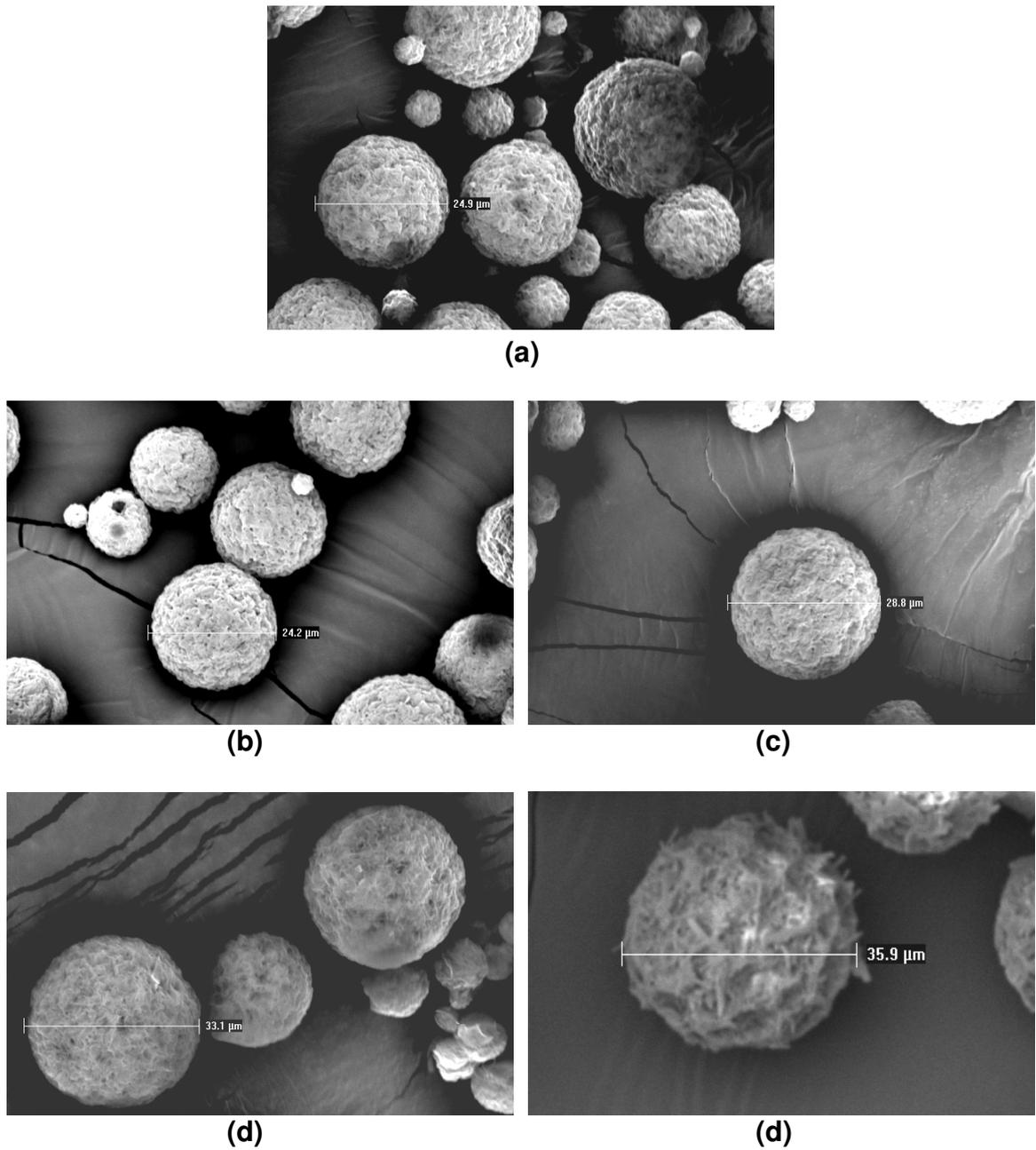
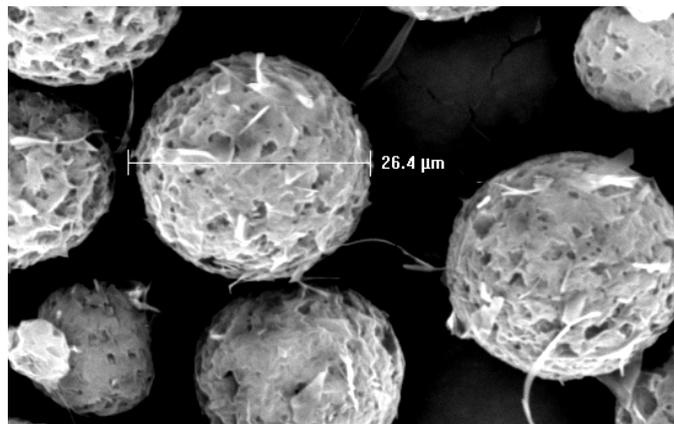
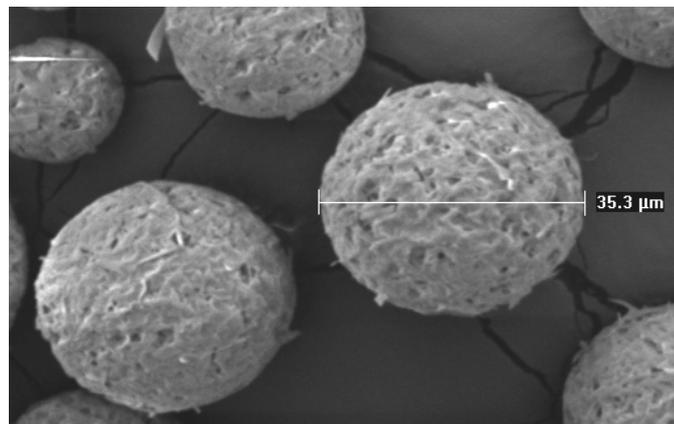


FIGURA 13: Micrografias obtidas por MEV das microesferas contendo fármaco IBF preparadas com solvente diclorometano a partir de (a) P(3HB), (b) P(3HB):TMG 9:1, (c) P(3HB):TMG 4:1, (d) P(3HB):TMG 3:1 e (e) P(3HB):TMG 1:1, em aumento de 1000 vezes.



(a)



(b)

FIGURA 14: Micrografias obtidas por MEV das microesferas de P(3HB):TMG 3:1 brancas preparadas utilizando diclorometano como solvente e (a) com e (b) sem adição de álcool isopropílico na fase externa da emulsão, em aumento de 1000 vezes.

4.1.2.2 Avaliação da morfologia dos filmes

A miscibilidade é uma importante característica das blendas que depende da natureza dos polímeros empregados e influencia o modo de cristalização, as propriedades físico-químicas, a velocidade de degradação da matriz e, por conseguinte, a forma de associação e a velocidade de liberação de fármacos a partir de sistemas matriciais (YU, DEAN, LI, 2006). Quando uma mistura de dois polímeros aparece como uma única fase, a blenda é considerada miscível (homogênea), mas caso a existência de duas fases seja perceptível, a blenda é considerada imiscível (heterogênea). Geralmente, a existência de ligações de hidrogênio é um fator importante na promoção da miscibilidade dos materiais que constituem a blenda, afetando a morfologia e melhorando as propriedades mecânicas desta, em relação aos polímeros puros (CHEN, DONG, YU, 2006). Além disso, mesmo quando o aditivo é miscível com o polímero semicristalino, a sua incorporação na fase cristalina do polímero dificilmente ocorre e a presença deste na fase amorfa conduz ao aumento da mobilidade das moléculas, atuando como plastificante (YOSHIE *et al.*, 2000).

Assim, com o intuito de verificar a miscibilidade entre P(3HB) e TMG, filmes foram obtidos a partir do polímero puro e das blendas, em clorofórmio e diclorometano, e analisados por microscopia eletrônica de varredura. As fotomicrografias obtidas evidenciaram a imiscibilidade entre os dois materiais (Figuras 15 e 16). O filme obtido unicamente a partir do P(3HB) em clorofórmio apresentou uma estrutura compacta e rugosa (Figura 15a), enquanto que com o aumento da proporção de TMG na blenda, regiões distintas de polímero e lipídeo foram observadas. Este efeito também foi verificado com a alteração do solvente orgânico, entretanto, filmes preparados a partir do P(3HB) puro e diclorometano apresentaram uma superfície menos rugosa, conforme verificado nas microesferas, confirmando que o tipo de solvente empregado afeta o modo de cristalização do polímero.

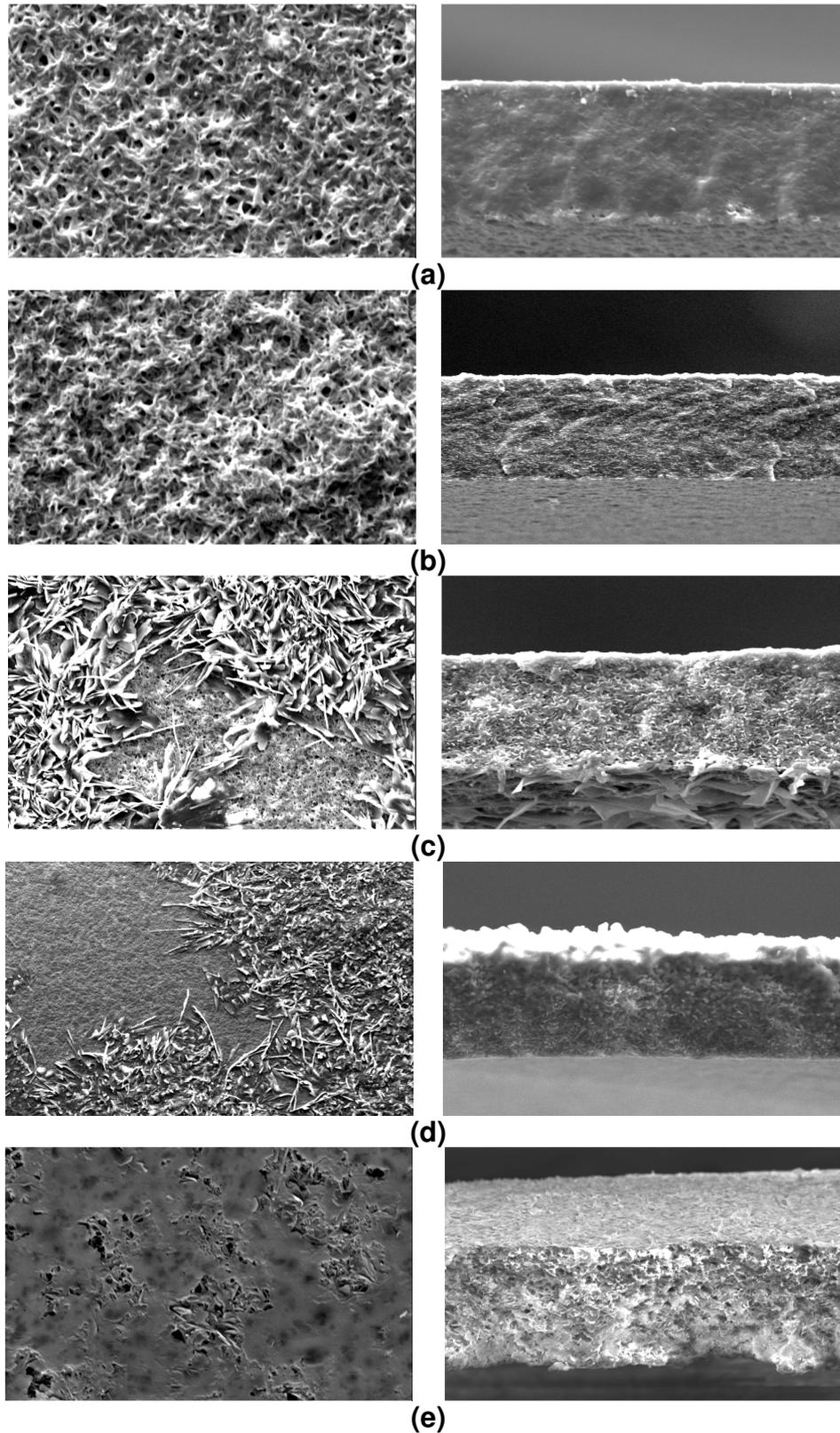


FIGURA 15: Micrografias obtidas por MEV da superfície e da fratura de filmes obtidos a partir do (a) P(3HB), (b) P(3HB):TMG 9:1, (c) P(3HB):TMG 4:1, (d) P(3HB):TMG 3:1 e (e) P(3HB):TMG 1:1, usando clorofórmio como solvente.

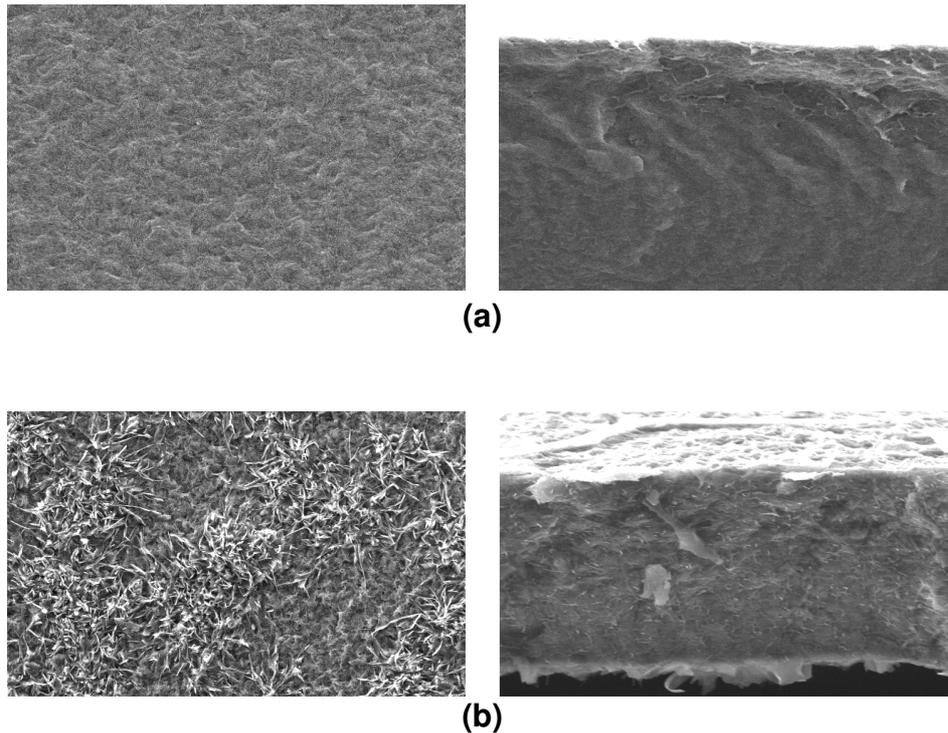


FIGURA 16: Micrografias obtidas por MEV da superfície e da fratura de filmes preparados a partir do (a) P(3HB) e (b) P(3HB):TMG 3:1, usando diclorometano como solvente.

4.1.2.3 Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O grau de cristalinidade é um dos mais importantes parâmetros utilizados para caracterizar polímeros semicristalinos. Esta característica afeta praticamente todas as propriedades do material polimérico, incluindo as propriedades mecânicas, físicas, termodinâmicas e ópticas. Do ponto de vista farmacêutico, as características finais das microesferas podem ser fortemente influenciadas pela cristalinidade do polímero utilizado no seu preparo, incluindo a taxa e o mecanismo de degradação, afinidade e localização do fármaco na partícula, e velocidade e mecanismo de liberação (POUTON & AKHTAR, 1996; HUANG *et al.*, 2006). Assim, com intuito de avaliar o efeito da formação de blendas sobre o grau de cristalinidade do polímero e verificar a presença de interações do fármaco com a matriz polimérica, as microesferas preparadas com P(3HB) e TMG 3:1, usando diclorometano como solvente, foram analisadas por calorimetria exploratória diferencial. As curvas de DSC obtidas para o ibuprofeno, P(3HB) e trimiristato de glicerila, assim como para a mistura física dos componentes e para as microesferas brancas e com fármaco, encontram-se demonstradas na Figura 17.

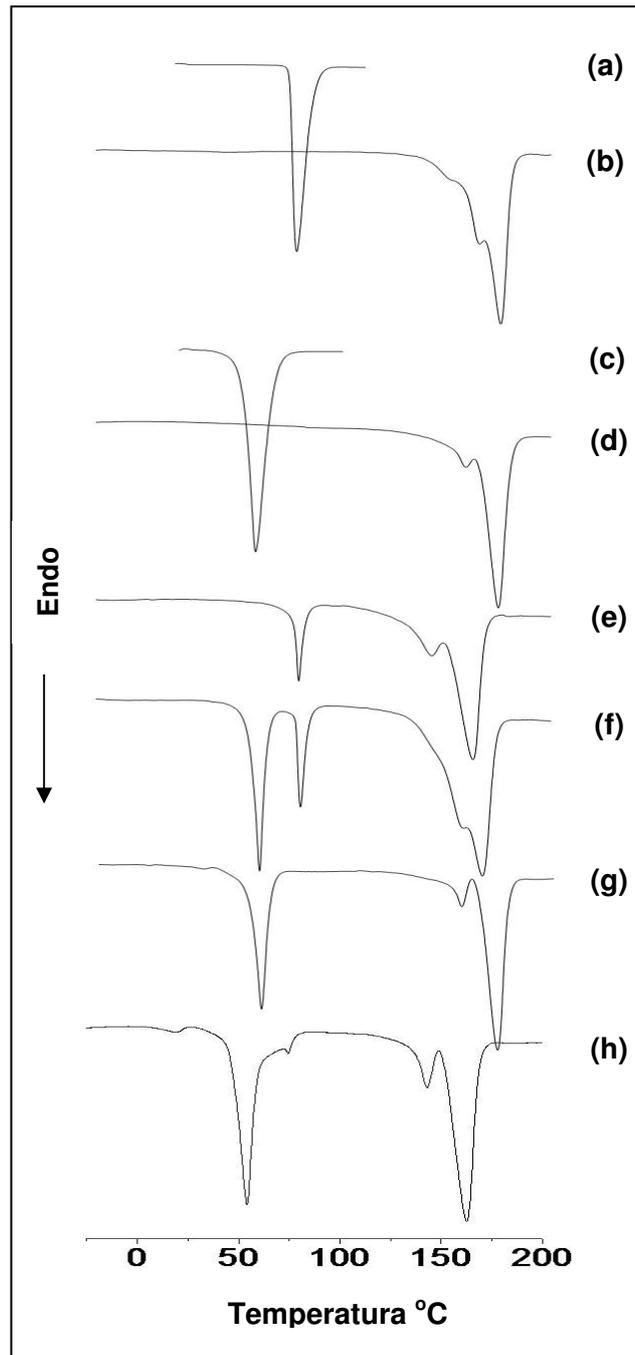


FIGURA 17: Termogramas obtidos por DSC após análise do (a) IBF, (b) P(3HB), (c) TMG, (d) Microesferas P(3HB) brancas, (e) Microesferas P(3HB) com IBF, (f) Mistura física de P(3HB), TMG e IBF, (g) Microesferas P(3HB):TMG 3:1 brancas e (h) Microesferas P(3HB): TMG 3:1 com IBF.

P(3HB), IBF e TMG apresentaram eventos endotérmicos correspondentes à fusão em 175 °C, 77 °C e 58 °C, respectivamente, estando de acordo com aqueles descritos na literatura (POUTON & AKHTAR, 1996; WILLIANS *et al.*, 2005). Para o P(3HB), um segundo pico de fusão a 165 °C foi observado, decorrente, provavelmente, de um processo de fusão/recristalização ocorrido durante a análise de DSC (YOSHIE *et al.*, 2000). Nas microesferas brancas obtidas a partir do P(3HB) puro e da blenda P(3HB):TMG, temperaturas de fusão semelhantes as dos componentes puros foram obtidas para ambos polímero e lipídeo (Figura 17d e 17g). Entretanto, uma pequena redução na temperatura de fusão do P(3HB) foi observada com a presença do fármaco, tanto na mistura física como nas microesferas (Figura 17e, 17f e 17h). A existência de interações entre IBF e a matriz polimérica não pode ser inteiramente descartada. No entanto, neste caso, como o deslocamento da temperatura de fusão do P(3HB) também é observado na mistura física, deve-se considerar a possibilidade de uma interferência momentânea do IBF fundido no processo de fusão do P(3HB). Por outro lado, o evento endotérmico correspondente à fusão do lipídeo não parece ter sido alterado nestas mesmas amostras.

A técnica de DSC pode ser usada para avaliar o grau de cristalinidade relativo ($X_c\%$) dos materiais, uma vez que uma mudança da mesma é caracterizada pela redução da entalpia de fusão (ΔH_{exp}), em relação ao composto puro (ΔH_{puro}). Assim, o grau de cristalinidade pôde ser estimado por meio da equação demonstrada abaixo, adaptada de El-Taweel e colaboradores, onde f corresponde a fração do fármaco ou polímero que constitui a microesfera (2004):

$$X_c(\%) = \frac{\Delta H_{exp}}{\Delta H_{teor} \times f}$$

A entalpia de fusão (ΔH) referente ao P(3HB) 100% cristalino é de 146 J/g (EL-TAWEEL *et al.*, 2004). Para o IBF, admitiu-se que o fármaco puro encontrava-se em uma forma completamente cristalina, exibindo (ΔH) igual a 131,93 J/g. Os valores de temperatura e entalpia de fusão (ΔH_{exp}) e o grau de cristalinidade ($X_c\%$) encontrados para o P(3HB) e o IBF, nas diferentes amostras analisadas, podem ser visualizados na Tabela 12. Com base nos resultados obtidos, verifica-se que a

técnica de emulsão evaporação do solvente não afeta o grau de cristalinidade do P(3HB), o qual pode ser considerado elevado nas microesferas brancas preparadas unicamente com o polímero. Entretanto, a presença de TMG nas partículas pareceu diminuir a cristalinidade do P(3HB). Esta redução da cristalinidade não pôde ser observada quando as microesferas contendo IBF foram analisadas. Adicionalmente, os resultados obtidos mostram a significativa redução da cristalinidade do ibuprofeno nas microesferas de P(3HB) e, sobretudo, nas de P(3HB):TMG 3:1, indicando que grande parte do fármaco encontra-se no estado amorfo ou associado às partículas na sua forma molecular.

TABELA 12: Resultados da análise por calorimetria exploratória diferencial.

Formulações	Polímero				IBF			
	Tg(°C)	Tm(C°)	ΔH_{exp} (J/g)	Xc(%)	Tm(C°)	ΔH_{exp} (J/g)	Xc(%)	
Matéria-prima	IBF	-	-	-	-	77	131,93	100
	P(3HB)	-5	175	107,12	73,37	-	-	-
Mistura física	P(3HB) + TMG + IBF	1	166	134,97	-	76	50,65	-
Microesferas brancas	P(3HB)	3	174	102,8	70,41	-	-	-
	P(3HB):TMG 3:1	-2	172	73,8	50,55	-	-	-
Microesferas com IBF	P(3HB)	2	162	93,7	64,18	75	77,79	58,96
	P(3HB):TMG 3:1	11	162	128,7	88,15	75	3,99	3,02

4.1.3 Avaliação do perfil de liberação do IBF a partir das microesferas

O perfil de liberação do IBF a partir das microesferas foi avaliado após determinação da concentração do fármaco no meio de liberação por espectrofotometria de absorção no ultravioleta. Para isto se fez necessário a

construção de uma curva de calibração de ibuprofeno em tampão fosfato 0,02 M pH 7,4, na faixa de concentração entre 10 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. O gráfico de concentração de IBF *versus* absorbância, assim como a equação da reta e o coeficiente de correlação, obtidos após análise da regressão linear, encontram-se demonstrados na Figura 18. Na faixa de concentração testada, o método usado demonstrou um comportamento linear significativo. A ausência de erro sistemático constante também foi verificada, uma vez que os valores do intervalo de confiança do intercepto incluíram o valor zero (Tabela 13).

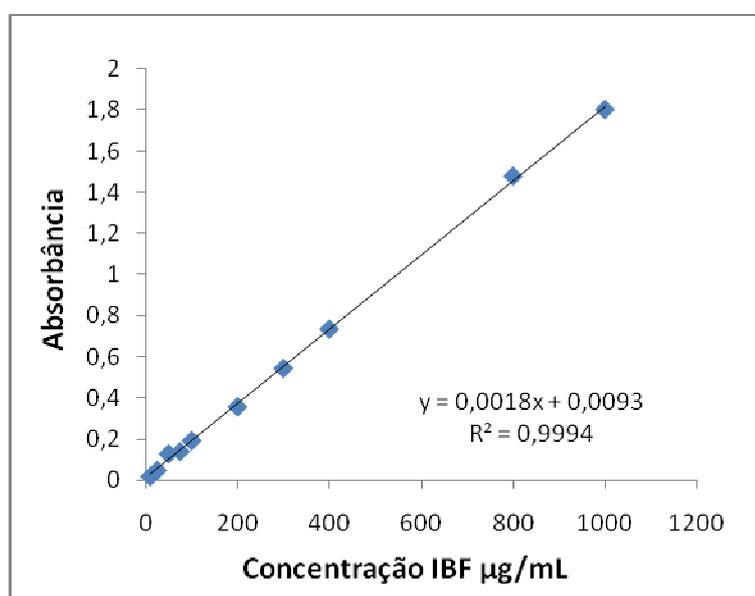


FIGURA 18: Curva de calibração do ibuprofeno em tampão fosfato 0,02M pH 7,4, obtida por espectrometria de absorção no ultravioleta.

TABELA 13: Análise dos dados da regressão obtidos a partir da curva de calibração do ibuprofeno por espectrofotometria de absorção no ultravioleta.

Parâmetros de regressão	Valores
Intercepto (intervalo de confiança)	0,0093 (-0,00244 a 0,02104)
Inclinação (intervalo de confiança)	0,0018 (0,00176 a 0,00184)
R^2	0,9994

O processo de transferência de fármacos pode tanto ocorrer a partir das microesferas em direção à fase contínua, como no sentido contrário, se a concentração no meio de liberação for suficientemente alta. Nestas condições, o equilíbrio natural do fenômeno de difusão será atingido e, para evitá-lo, o emprego de condições *sink* torna-se desejável. Tem-se preconizado que a concentração máxima do fármaco não deva exceder 20% da sua concentração na saturação para a obtenção destas condições. Assim, para garantir que o ensaio de liberação fosse realizado em condições *sink*, a solubilidade do ibuprofeno em tampão fosfato 0,02M a pH 7,4 foi determinada, conforme descrito em 3.2.1.4.2, e foi igual a $3,667 \pm 0,226$ mg/mL. A partir deste resultado, a quantidade de 100 mg de microesferas para 20 mL de meio de liberação foi estipulada.

As coletas do meio de liberação foram realizadas durante sete dias, em tempos pré-determinados, conforme citado em 3.2.1.4.3. Contudo, devido à ausência de alterações no percentual de fármaco liberado, os perfis de liberação foram demonstrados somente até 24 horas de ensaio (Figura 19). Como pode ser observado, o efeito de liberação inicial do IBF, conhecido como efeito *burst*, foi elevado em todas as formulações testadas. Cerca de 80% do fármaco encapsulado foi liberado a partir das microesferas de P(3HB) em apenas uma hora de ensaio, independente do solvente empregado na fase interna da emulsão. Os valores obtidos na primeira hora de ensaio, a partir das microesferas preparadas com blendas de P(3HB) e TMG, não foram muito diferentes, variando entre 74 e 86%.

As elevadas taxas de liberação de fármacos a partir de microesferas preparadas com polímeros cristalinos são bastante descritas na literatura. Assim como ocorre com o poli-(L-ácido láctico), a cristalização do polímero pode conduzir à formação de espaços vazios nas partículas, que passam a funcionar como canais para penetração da água, facilitando a liberação (URATA, ARIMORI, NAKANO, 1999; GUSE, 2006). Ao contrário do que se esperava, a redução na porosidade e da cristalinidade das partículas pela adição de trimiristato de glicerila, conforme observado nas micrografias obtidas por MEV e nos resultados de DSC, não afetou a cinética de liberação. Este fato pode estar relacionado com a localização preferencial do fármaco na superfície ou nas proximidades da superfície das microesferas, sendo liberado principalmente por um processo de desorção. Além disso, taxas elevadas de liberação têm sido descritas quando ésteres de ácidos

graxos são empregados no preparo de microesferas, em blends com PLA, PLAGA ou P(3HB) (JUNI *et al.*, 1985; KUBOTA *et al.*, 1987; URATA, ARIMORI, NAKANO, 1999; SCHAEFER, SINGH, 2000). Após 7 dias de ensaio, as microesferas mantiveram sua estrutura esférica e nenhum sinal de erosão da matriz foi visualizado (Figura 20). Portanto, a adição de TMG para a obtenção das microesferas não permitiu o controle da liberação do IBF.

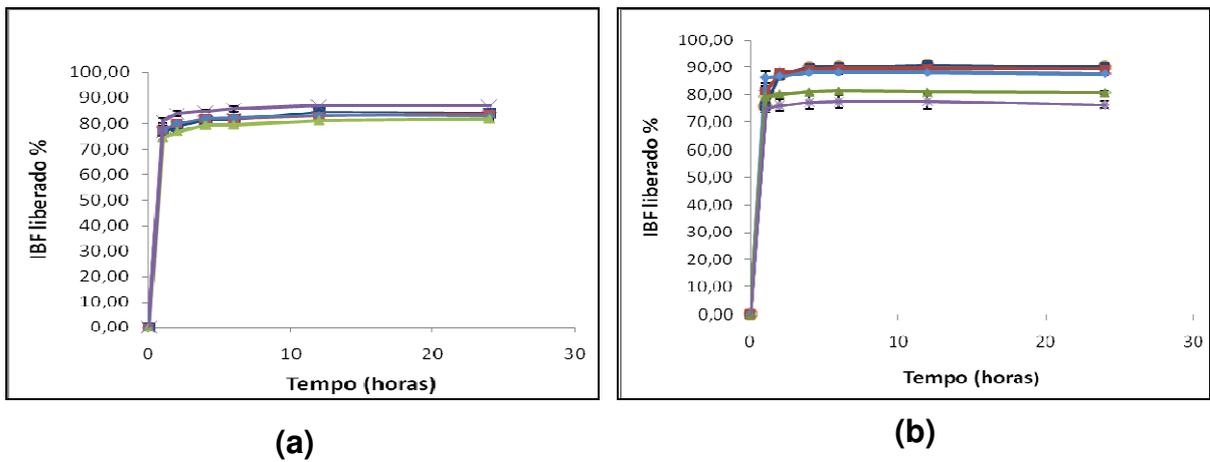


FIGURA 19: Perfis de liberação obtidos a partir das microesferas preparadas usando (a) clorofórmio e (b) diclorometano como solvente da fase interna. (■) P(3HB) puro, (■) P(3HB):TMG 9:1, (◆) P(3HB):TMG 4:1, (▲) P(3HB):TMG 3:1 e (X) P(3HB):TMG 1:1

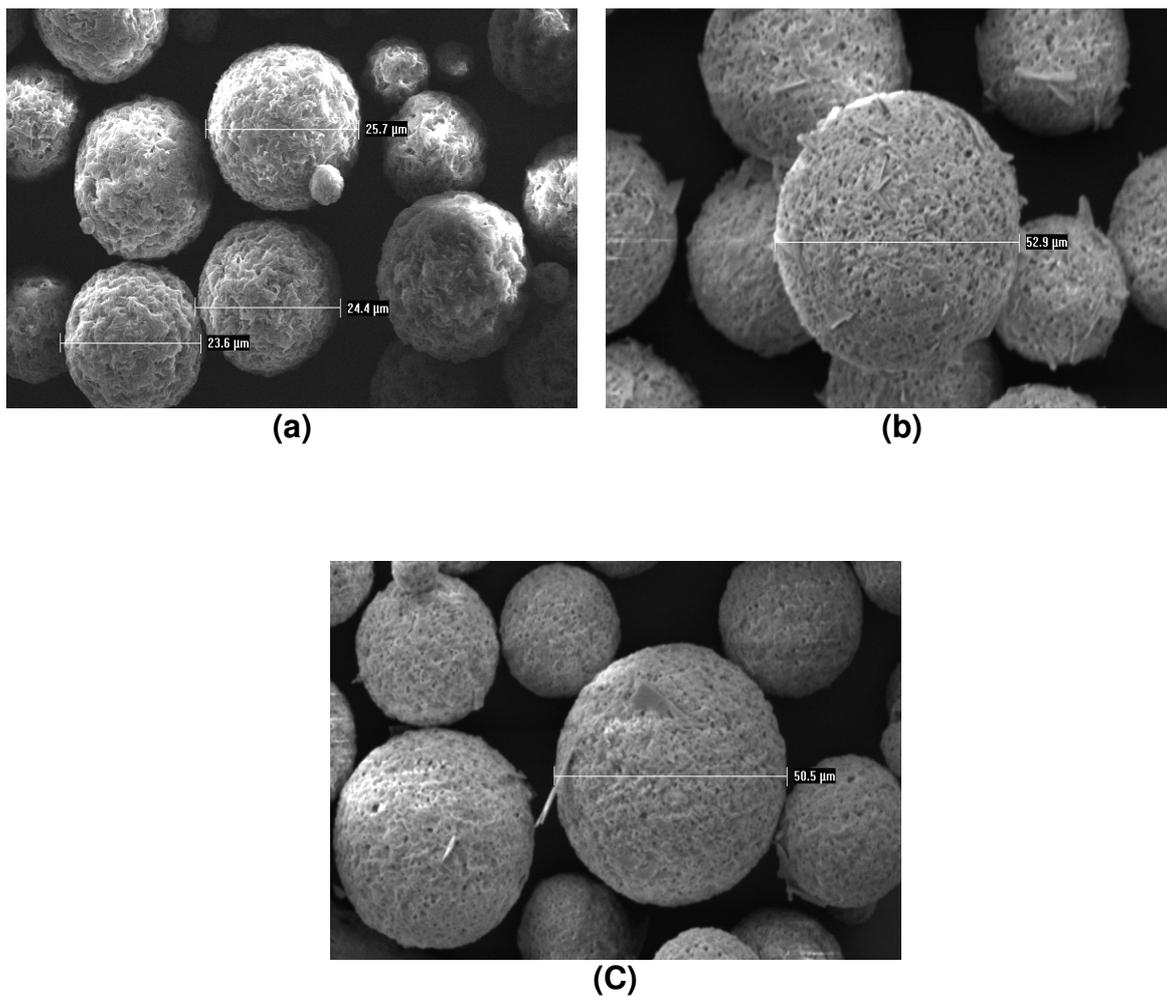


FIGURA 20: Micrografias obtidas por MEV das microesferas obtidas a partir de (a) P(3HB) e (b) P(3HB):TMG 3:1 em clorofórmio e (c) P(3HB):TMG 3:1 em diclorometano, após sete dias do início do ensaio de liberação.

PARTE II Efeito da adição de poli-(D,L-ácido láctico)-*b*-poli(etilenoglicol) (PLA-PEG) e gelatina (GEL) sobre as propriedades físico-químicas e sobre o perfil de liberação do ibuprofeno a partir de microesferas de poli-(3-hidroxi-butirato)

4.2 Preparação e caracterização das microesferas a partir de blendas de P(3HB) e PLA-PEG

Com o intuito de obter formulações de microesferas que permitissem o controle da liberação do IBF, duas estratégias foram testadas. A primeira consistiu em formar blendas de P(3HB) e PLA-PEG e a segunda em formar uma partícula composta P(3HB) e gelatina (GEL), onde o fármaco pudesse se difundir de forma controlada. O poli-(D,L-ácido láctico)-*b*-poli (etilenoglicol) (PLA-PEG) (Figura 21) é um polímero obtido pela modificação química do PLA com poli(etilenoglicol). Esta modificação resulta na obtenção de um copolímero anfifílico, o qual é mais susceptível à degradação por hidrólise, sofre menor adsorção por proteínas, células, e/ou tecidos sendo, portanto, menos propício a desencadear reações adversas. Além disso, este copolímero também apresenta propriedade auto-associativa em meio aquoso, ou seja, formação de suspensões coloidais termodinamicamente metaestáveis (DRUMOND, WANG, MOTHE, 2004). Poucos trabalhos relatam a obtenção de blendas de P(3HB) e PLA-PEG e em nenhum deles descreve a liberação de fármacos a partir de matrizes constituídas por estes materiais. Por outro lado, a gelatina é um polímero natural derivado do colágeno, também bastante utilizado em aplicações médicas/farmacêuticas por ser biodegradável e biocompatível em meio fisiológico. Oferece importante segurança tanto como expansor plasmático, quanto como componente de formulações farmacêuticas ou próteses vasculares (YOUNG *et al.*, 2005).

As microesferas de P(3HB), assim como aquelas constituídas de blendas de P(3HB) e PLA-PEG foram preparadas pela técnica de emulsão simples, seguida da evaporação do solvente, tendo em vista que ambos polímeros são solúveis em diclorometano. No entanto, as microesferas contendo gelatina, as quais podem ser denominadas de partículas compostas, foram obtidas pelo procedimento de dupla emulsão, onde uma dispersão aquosa de gelatina contendo IBF constituiu a fase interna da emulsão primária a/o. Este método de preparo tem demonstrado ser adequado para encapsular fármacos hidrossolúveis, tais como peptídeos e proteínas

(JAIN, 2000). Como o IBF é praticamente insolúvel em água, o pH da dispersão aquosa de gelatina foi ajustado a 6,5 com o intuito de aumentar a solubilidade do fármaco (GOSH *et al.*, 1998). Além disso, em uma das formulações foi adicionado álcool etílico na fase aquosa da emulsão primária visando também aumentar a solubilidade do ibuprofeno, e conseqüentemente, a eficiência de encapsulação.

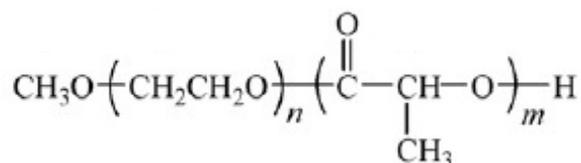


FIGURA 21: Estrutura química do PLA-PEG. n = unidades de etileno glicol, m = unidades de ácido láctico (LU, LI, WANG, 2008).

4.2.1 Determinação da eficiência de encapsulação e teor de ibuprofeno nas microesferas

Os resultados obtidos para eficiência de encapsulação e teor de fármaco nas microesferas estão demonstrados na Tabela 14. A análise da variância indicou que o teor de IBF variou significativamente nas formulações testadas ($F_{\text{cal}} > F_{\text{crit}}$, $\alpha = 0,05$) (Tabela 15). Para verificar onde ocorreu esta diferença, as médias dos valores de teor de fármaco foram comparadas por meio da aplicação do teste t. Neste caso, a diferença entre os valores médios de teor de fármaco é considerada significativa quando este valor for maior que 0,972 (Tabela 16). Assim, como pode ser observado, o teor de ibuprofeno foi significativamente reduzido nas microesferas compostas P(3HB):GEL, em relação àquelas preparadas com P(3HB) puro. Neste caso, a menor quantidade de ibuprofeno encapsulada pode ter sido decorrente do método de preparação escolhido. Como o fármaco é pouco solúvel em meio aquoso, este permanece disperso na solução de gelatina, e tende a se deslocar para fora das gotículas em direção à fase orgânica, durante a formação da primeira emulsão. Por outro lado, a formação de uma blenda de P(3HB):PLA-PEG 3:1 não afetou o teor de fármaco, mas uma redução significativa foi observada quando a blenda P(3HB):PLA-PEG 1:1 foi testada.

TABELA 14: Valores eficiência de encapsulação e de teor de ibuprofeno nas microesferas.

Formulação	E.E. \pm d.p. (%)	Teor de fármaco \pm d. p. (mg IBF/100mg micros)
P(3HB)	81,22 \pm 0,33	16,26 \pm 0,04
P(3HB): PLA-PEG 3:1	77,46 \pm 0,72	15,49 \pm 0,14
P(3HB):PLA-PEG 1:1	74,75 \pm 0,41	14,95 \pm 0,17
P(3HB): gelatina 10:1	66,73 \pm 2,37	12,35 \pm 0,44
P(3HB):gelatina 10:1 etanol	71,55 \pm 2,50	13,24 \pm 0,46

TABELA 15: Análise da variância obtida a partir dos valores de teor de fármaco.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F	F _{crítico}
Tratamento	40,16	4	10,04	78,52	3,18
Resíduo	1,66	13	0,13		
Total	41,83				

*GL= 4,13; α = 0,05

TABELA 16: Valores da diferença entre as médias dos teores de IBF (mg/ 100 mg microesferas) obtidas para as formulações.

Formulações		Diferença entre as médias dos teores			
		P(3HB):GEL 10:1	P(3HB):GEL 10:1 (etanol)	PLA:PEG 3:1	PLA:PEG 1:1
		12,35	13,24	15,49	14,95
P(3HB)	16,26	3,91*	3,02*	0,77	1,31*
P(3HB):GEL 10:1	12,35		-0,89	-3,14*	-2,60*
P(3HB):GEL10:1 et.	13,24			-2,25*	-1,71*
PLA:PEG 3:1	15,49				0,54

* diferença significativa, $\alpha = 0,05$, dms teste t=0,972

4.2.2 Caracterização físico-química

4.2.2.1 Avaliação da morfologia das partículas

Nas Figuras 22 e 23 encontram-se demonstradas, respectivamente, as microesferas brancas e contendo IBF, obtidas a partir do P(3HB), P(3HB):PLA-PEG e P(3HB):GEL. Conforme pode ser observado, partículas esféricas apresentando alguns poros pequenos foram obtidas para todas as formulações testadas. Entretanto, partículas mais rugosas foram obtidas quando blendas de P(3HB) e PLA-PEG foram empregadas. O elevado grau de hidratação das cadeias de PEG no copolímero tem sido usado para explicar esta característica. Aparentemente, a grande interação entre o PLA-PEG e o meio aquoso durante a emulsificação, favorece a má formação das partículas (HUANG, CHUNG, 2001). Por outro lado, a presença do IBF nas microesferas parece reduzir este efeito, formando partículas com superfície mais lisa, mas igualmente porosa.

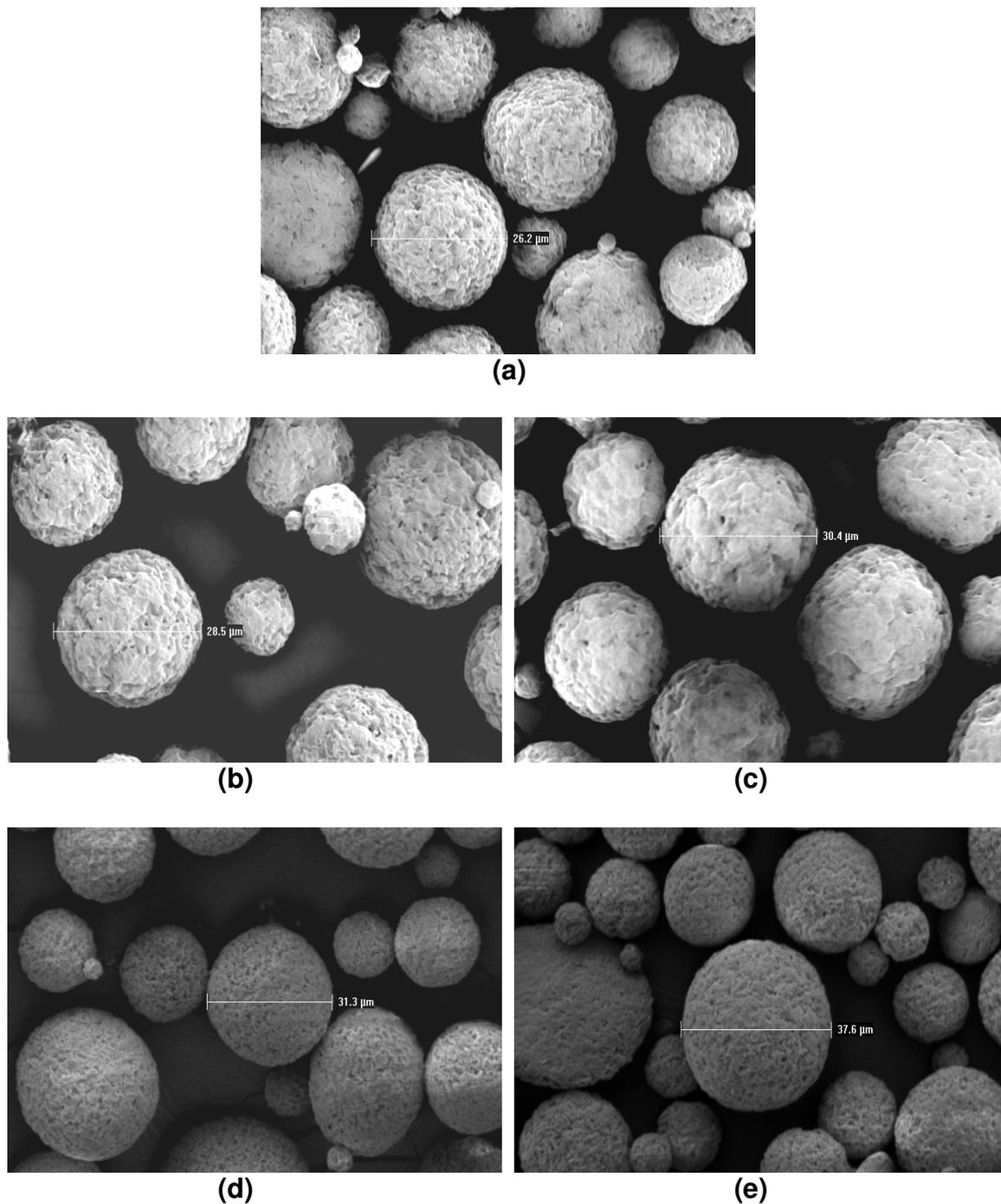


FIGURA 22: Micrografias obtidas por MEV das microesferas brancas preparadas a partir do (a) P(3HB), (b) P(3HB):PLA-PEG 3:1, (c) P(3HB):PLA-PEG 1:1, (d) P(3HB):gelatina, (e) P(3HB):gelatina (etanol).

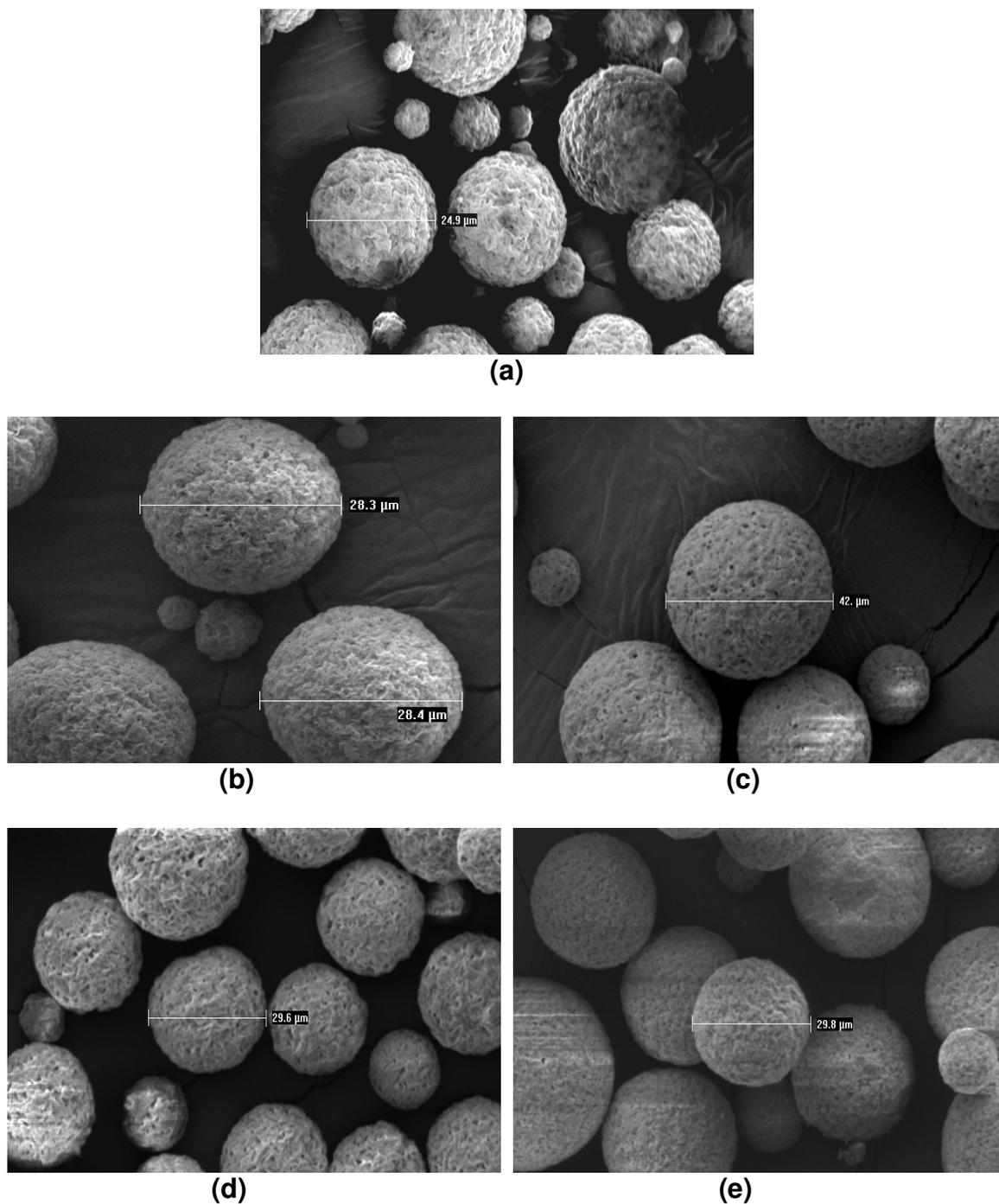


FIGURA 23: Micrografias obtidas por MEV das microesferas contendo IBF preparadas a partir do (a) P(3HB), (b) P(3HB):PLA-PEG 3:1, (c) P(3HB):PLA-PEG 1:1, (d) P(3HB):gelatina e (e) P(3HB):gelatina (etanol).

4.2.2.2 Avaliação da morfologia de filmes de P(3HB) e de blendas

Para a verificação da miscibilidade entre o P(3HB) e o PLA-PEG, filmes do polímero puro e da blenda foram preparados conforme descrito em 3.2.2.1 e visualizados por MEV. A visualização das fotomicrografias obtidas da superfície e fratura dos filmes (Figura 24) indicou a formação de uma estrutura compacta e homogênea. A utilização do PLA-PEG como compatibilizador em blendas de PLA e P(3HB) tem sido descrita. Estudos de análise térmica têm demonstrado apenas uma T_g para estas blendas, maior que a T_g encontrada para o P(3HB) puro, e a redução desta T_g com o aumento da proporção de PEG no copolímero, sugerindo que as cadeias de PEG penetram na região amorfa do P(3HB) (YOON *et al.*, 2000).

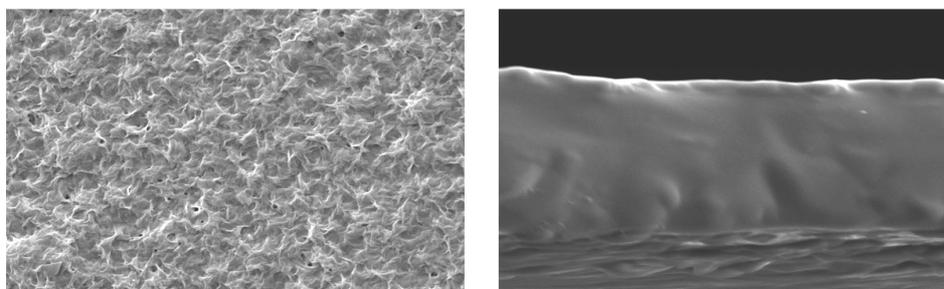


FIGURA 24: Micrografias obtidas por MEV da superfície e da fratura de filmes de P(3HB):PLA-PEG 3:1.

4.2.2.3 Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Os termogramas obtidos a partir das matérias-primas puras, misturas físicas e microesferas brancas e contendo IBF estão apresentados nas Figuras 25 e 26. Os valores de temperatura e entalpia de fusão (ΔH_{exp}) e o grau de cristalinidade ($X_c\%$) encontrados para o P(3HB) e o IBF, nas diferentes amostras analisadas, são demonstrados nas Tabelas 17 e 18.

Conforme pode ser visualizado, P(3HB) e IBF apresentaram eventos endotérmicos correspondentes à fusão destes materiais em 175 °C e 77 °C, respectivamente, sendo que o P(3HB) apresentou um segundo pico de fusão em 165°C, conforme descrito anteriormente. O PLA-PEG, um polímero em bloco de

característica amorfa, mostrou uma transição vítrea na temperatura de 20 °C e um evento endotérmico a 40 °C, referente à fusão do bloco PEG (Figura 25c).

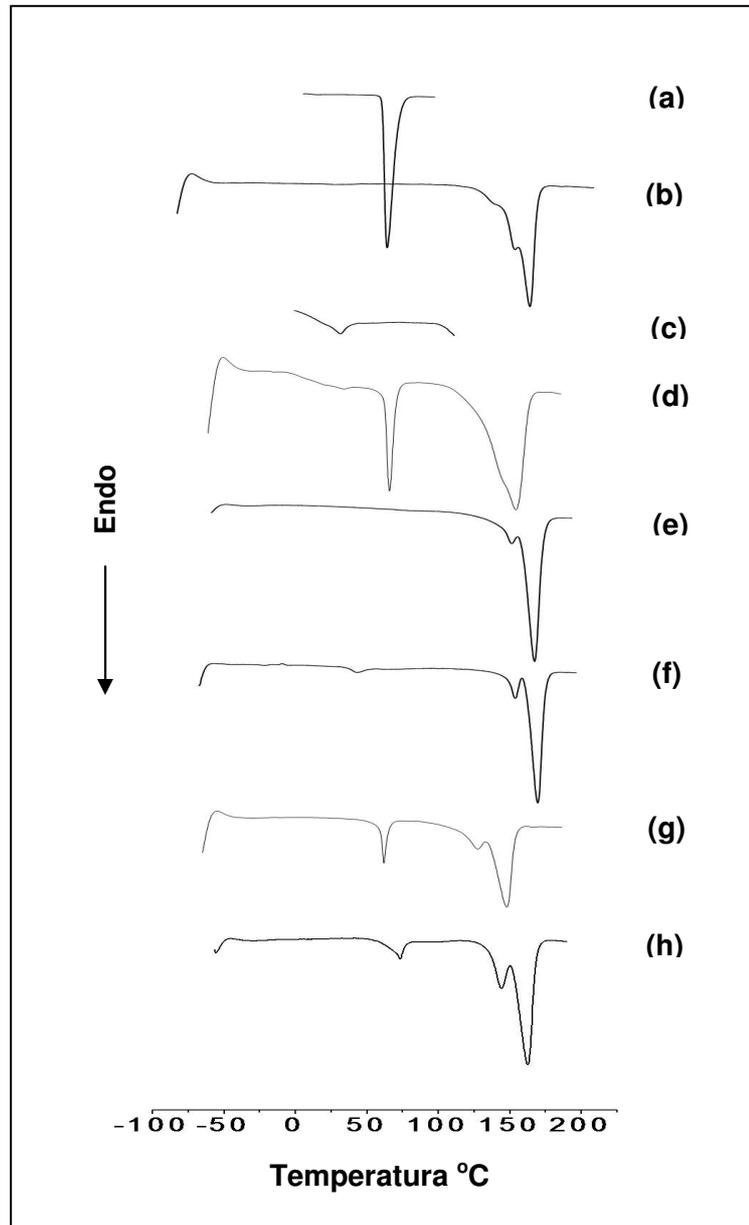


FIGURA 25: Termogramas obtidos por DSC para (a) IBF, (b) P(3HB), (c) PLA-PEG, (d) Mistura física de P(3HB), PLA-PEG e IBF, (e) Microesferas P(3HB) brancas, (f) Microesferas P(3HB):PLA-PEG 3:1 brancas, (g) Microesferas P(3HB) com IBF, (h) Microesferas P(3HB): PLA-PEG 3:1 com IBF.

Quando as microesferas brancas obtidas a partir do P(3HB) e da blenda P(3HB):PLA-PEG 3:1 foram analisadas (Figura 25e e 25f), o evento térmico referente à fusão do P(3HB) ocorreu em valores próximos a do polímero puro. Entretanto, uma pequena redução na temperatura de fusão do P(3HB) foi observada com a presença do fármaco, tanto na mistura física como nas microesferas, evidenciando uma possível interferência do IBF fundido no processo de fusão do P(3HB), de modo semelhante ao ocorrido quando o TMG foi usado para a obtenção da blenda (Figura 25d, 25g e 25h).

TABELA 17: Resultados obtidos por análise de calorimetria exploratória diferencial das microesferas e das matérias primas utilizadas.

Formulações		P(3HB)				IBF		
		Tg(°C)	Tm(C°)	ΔH_{exp} (J/g)	Xc(%)	Tm(C°)	ΔH_{exp} (J/g)	Xc(%)
Matéria-prima	IBF	-	-	-	-	77	131,93	100
	P(3HB)	-5	175	107,1	73,37	-	-	-
Mistura física	P(3HB)+PLA-PEG+IBF	-7	164	121,8	-	76	79,50	-
Microesferas brancas	P(3HB)	3	174	102,8	70,41	-	-	-
	P(3HB):PLA-PEG 3:1	-6	173	101,2	69,32	-	-	-
Microesferas com IBF	P(3HB)	2	162	93,70	64,18	75	77,79	58,96
	P(3HB):PLA-PEG 3:1	-1	163	107,5	73,63	73	42,64	32,32

Como pode ser verificado na Tabela 17, tanto a adição de PLA-PEG, para a formação da blenda, como a presença de ibuprofeno não provocou redução significativa da cristalinidade do P(3HB). Entretanto, o grau de cristalinidade do fármaco foi reduzido durante o processo de microencapsulação, indicando que o IBF encontra-se apenas parcialmente disperso na sua forma cristalina.

Devido ao possível efeito plastificante causado pela umidade excessiva da gelatina, duas varreduras foram necessárias nas análises de DSC para as microesferas compostas de P(3HB) e GEL (PORTO, 2007). Na segunda varredura da GEL pura, o evento correspondente a transição vítrea foi verificado em 209° C (FIGURA 26c), no entanto, a análise da mistura física e das microesferas não revelou esta T_g .

TABELA 18: Resultados obtidos por análise de calorimetria exploratória diferencial das microesferas e das matérias primas utilizadas.

Formulações		Polímero				IBF		
		Tg(°C)	Tm(C°)	ΔH_{exp} (J/g)	Xc(%)	Tm(C°)	ΔH_{exp} (J/g)	Xc(%)
Matéria-prima	IBF	-	-	-	-	77	131,93	100
	P(3HB)	-5	175	107,1	73,37	-	-	-
Mistura física	PHB +gelatina +IBF	-8	170	133,2	-	76	46,49	-
Microesferas brancas	P(3HB)	3	174	102,8	70,41	-	-	-
	P(3HB):gelatina 10:1	-	175	106,0	72,60	-	-	-
Microesferas com IBF	P(3HB)	2	162	93,7	64,18	75	77,79	58,96
	P(3HB):gelatina 10:1	-	162	97,9	67,05	76	76,36	57,88

Martin e colaboradores (2000) verificaram maiores valores de temperatura de fusão do P(3HB) nas microesferas obtidas pelo método de emulsão o/a seguido da evaporação do solvente, quando comparado com aquelas obtidas pelo método de dupla emulsão. No entanto, este resultado não foi observado nestes experimentos, visto que as partículas brancas demonstraram valores semelhantes aqueles obtidos para as matérias-primas (Figura 26b e 26e). De modo semelhante ao ocorrido nas microesferas preparadas a partir da blenda de P(3HB):PLA-PEG, o

ibuprofeno encontra-se apenas parcialmente disperso em sua forma cristalina nas microesferas compostas de P(3HB) e GEL (Tabela 18).

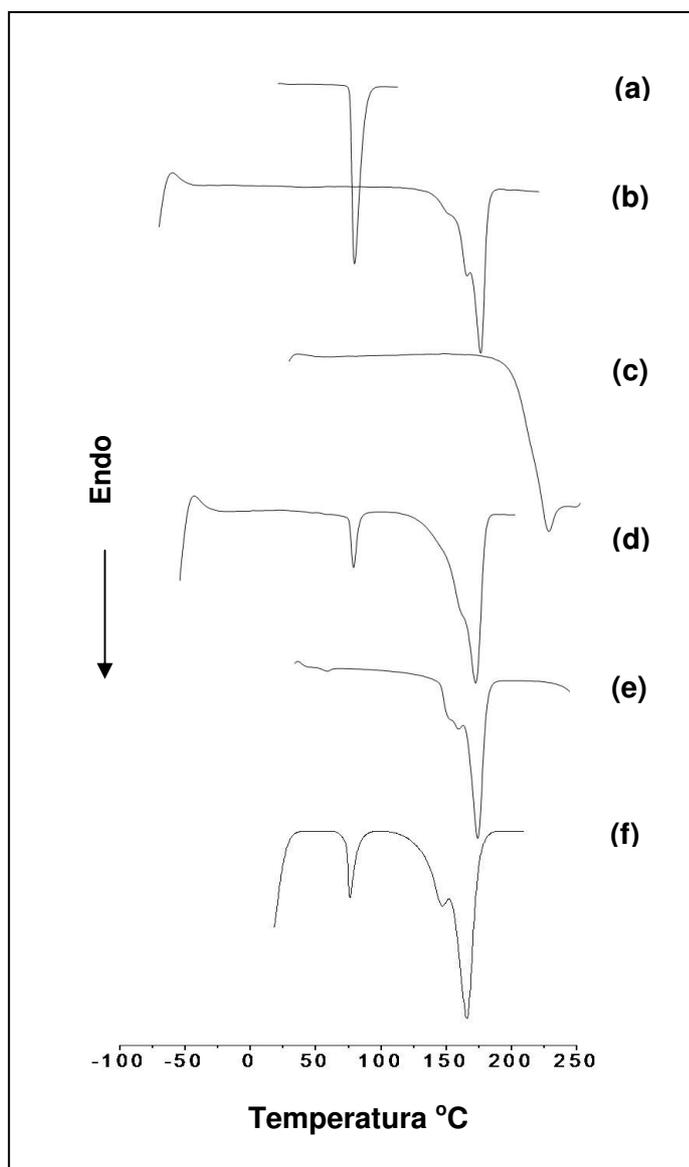


FIGURA 26: Termogramas obtidos por DSC para (a) IBF, (b) P(3HB), (c) Gelatina; (d) Mistura física de P(3HB), gelatina e IBF, (e) Microesferas P(3HB):gelatina 10:1 brancas e (f) Microesferas P(3HB):gelatina 10:1 com IBF.

4.2.2.4 Difração de Raios-X

A difração de raios-x é uma técnica complementar à calorimetria exploratória diferencial e permite avaliar as características de cristalinidade dos materiais que podem afetar a velocidade de liberação do fármaco e de degradação das microesferas. Os difratogramas obtidos para os componentes puros, e

microesferas brancas e contendo IBF encontram-se demonstrados nas figuras 27, 28 e 29. Os valores das intensidades dos picos (%) referentes ao IBF e P(3HB), nas diferentes formulações, encontram-se dispostos na Tabela 19.

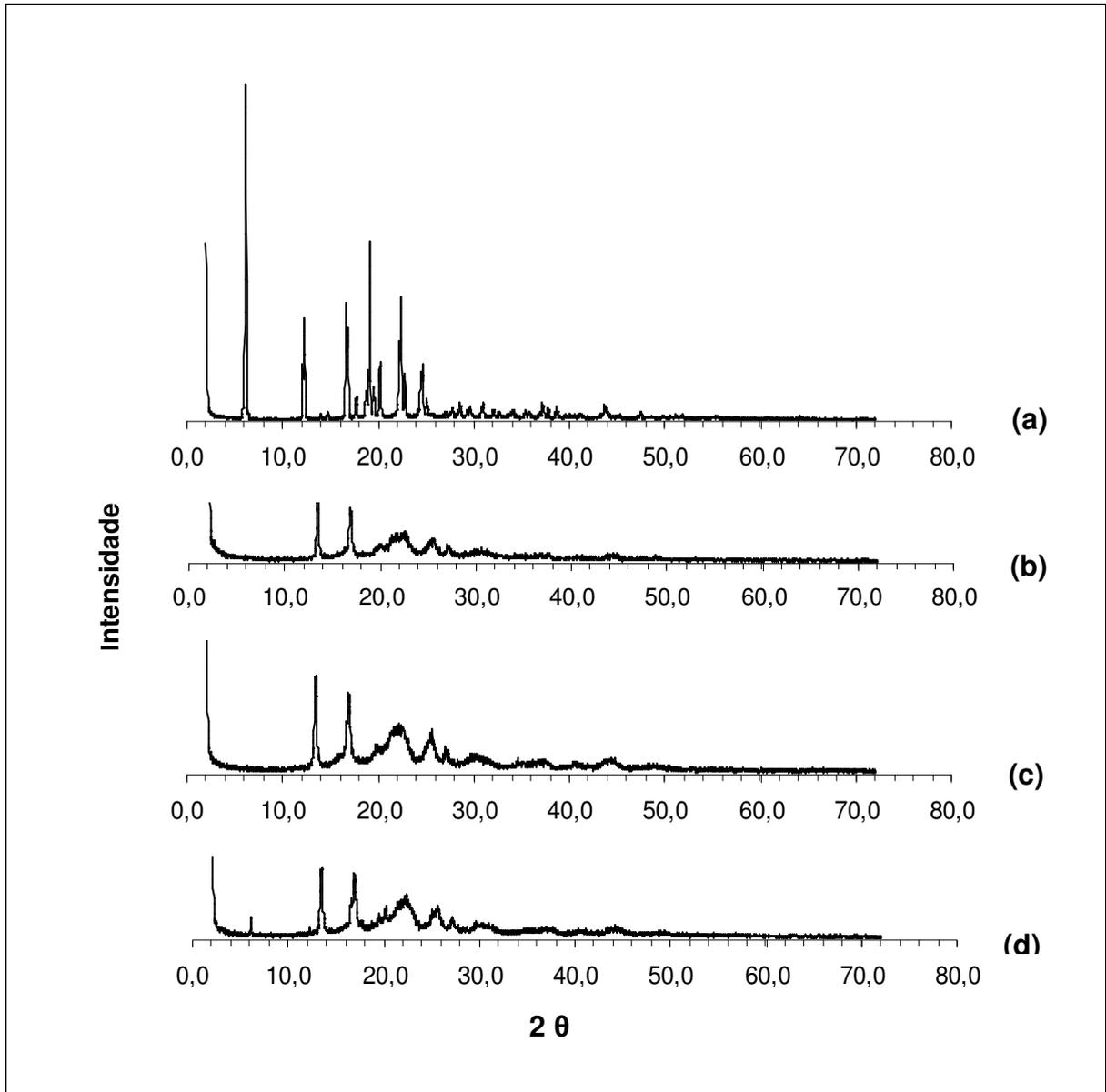


FIGURA 27: Difrátogramas obtidos após análise do (a) ibuprofeno, (b) P(3HB), (c) microesferas de P(3HB) brancas e (d) microesferas de P(3HB) contendo IBF.

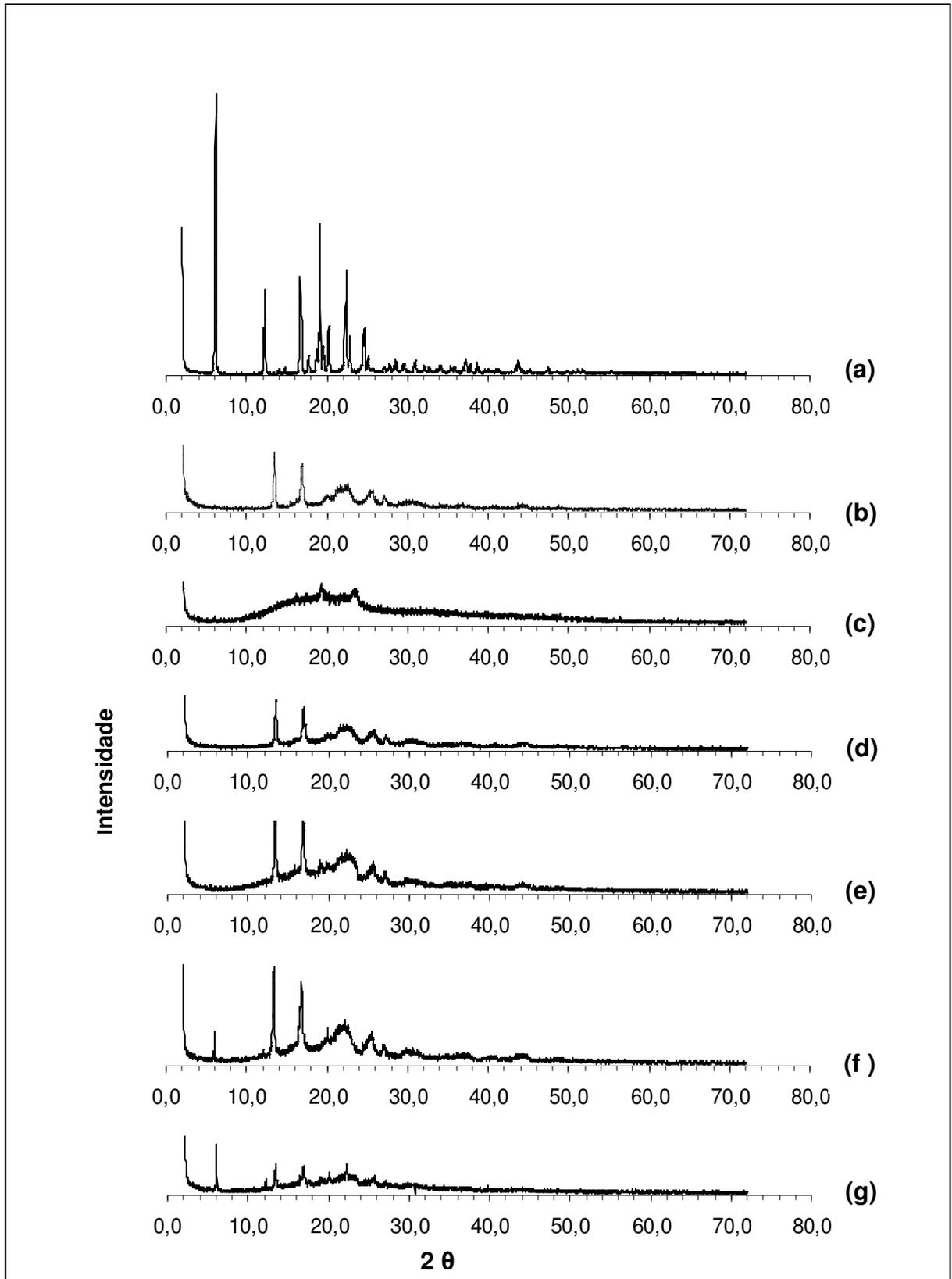


FIGURA 28: Espectros obtidos após análise do (a) ibuprofeno, (b) P(3HB), (c) PLA-PEG, (d) microesferas P(3HB):PLA-PEG 3:1 brancas, (e) microesferas P(3HB):PLA-PEG 1:1 brancas, (f) microesferas de P(3HB):PLA-PEG 3:1 com IBF e (g) microesferas P(3HB):PLA-PEG 1:1 com IBF.

O difratograma obtido após análise do IBF é típico de uma estrutura cristalina (FERNANDEZ-CARBALLIDO, 2004). Este difratograma apresenta picos de difração característicos do ibuprofeno em 2θ igual a $6,18^\circ$, $12,26^\circ$, $16,68^\circ$, $20,14^\circ$ e $22,40^\circ$ (NOVOA *et al.*, 2005) (Figuras 27a, 28a e 29a). Picos de elevada difração podem ser observados nos difratogramas obtidos a partir do P(3HB) puro em 2θ de $13,48^\circ$, $16,88^\circ$, $21,72^\circ$, $21,84^\circ$, $22,64^\circ$ e $25,64^\circ$, caracterizando a estrutura semi-cristalina do polímero, segundo descrito por Galego e colaboradores (2000) (Figuras 27b, 28b e 29b). A natureza amorfa do PLA-PEG pode ser visualizada no difratograma obtido a partir deste polímero (Figura 28 c).

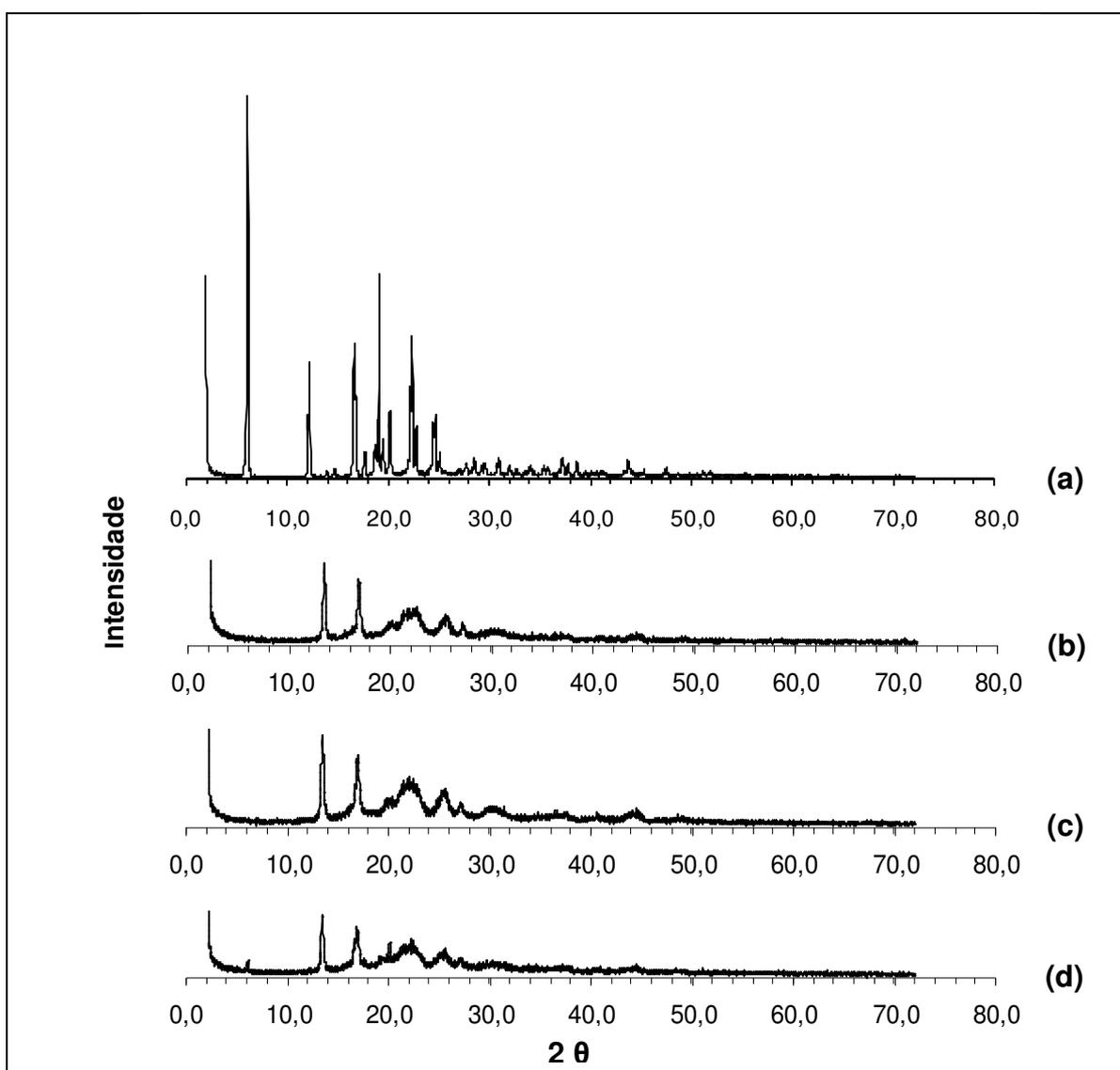


FIGURA 29: Difratogramas obtidos após análise do (a) ibuprofeno, (b) P(3HB), (c) microesferas P(3HB):gelatina 10:1 brancas e (d) microesferas de P(3HB):gelatina 10:1 com IBF.

O modelo de difração de raios-x do P(3HB) foi observado nos difratogramas obtidos a partir das microesferas preparadas a partir do P(3HB) puro, da blenda de P(3HB) e PLA-PEG e das microesferas compostas P(3HB) e GEL. Entretanto, a intensidade dos picos de difração do P(3HB) pareceu bastante reduzida no difratograma obtidos a partir das microesferas de P(3HB):PLA-PEG 1:1, indicando uma possível redução da cristalinidade da matriz. A redução dos picos de difração do IBF também foi visualizada em todos os difratogramas obtidos a partir das microesferas contendo fármaco (Figura 27d, 28f, 28g, 29d). Este resultado está de acordo com aqueles verificados na análise calorimétrica, confirmando que apenas uma fração do IBF encontra-se cristalizada nas partículas.

TABELA 19: Intensidade dos picos de difração de raios-X obtidos a partir dos difratogramas do fármaco, P(3HB), PLA-PEG e microesferas brancas e contendo IBF.

2 θ	INTENSIDADE (%)									
	IBF	P(3HB)	P(3HB) _m	P(3HB) _{mf}	P(3HB):	P(3HB):	P(3HB):	P(3HB):	P(3HB):	P(3HB):
					PLA-PEG 3:1 _m	PLA-PEG 3:1 _{mf}	PLA-PEG 1:1 _m	PLA-PEG 1:1 _{mf}	Gel _m	Gel _{mf}
6,18	100,00	-	-	30,75	-	35,54	-	100,00	-	29,58
12,26	30,52	-	-	17,85	-	17,02	-	33,76	-	15,84
13,48	-	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	57,96	100,00	100,00
16,68	35,32	-	-	59,14	-	84,63	-	36,94	-	56,34
16,88	-	82,38	78,79	92,90	87,98	82,81	91,77	57,32	78,12	81,34
20,14	14,46	-	-	47,10	-	30,58	-	43,63	-	57,39
21,72	-	46,34	45,33	48,39	47,31	40,99	51,00	41,40	49,28	53,52
21,84	-	44,72	47,66	55,05	51,15	42,15	46,79	39,49	52,40	50,00
22,40	37,18	-	-	62,80	-	39,01	-	60,51	-	58,45
25,38	-	37,40	38,72	40,86	42,20	35,54	40,96	34,71	42,54	67,93

(-) não detectado

4.2.3 Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica das microesferas

Quando a técnica de emulsão/evaporação do solvente é empregada, a granulometria das partículas é resultante de uma complexa contribuição de diferentes fatores, como tipo e proporção do solvente orgânico da fase interna, concentração de polímero, tipo e concentração do estabilizante da emulsão, temperatura, velocidade de agitação, entre outros. Trata-se de um parâmetro importante na caracterização destes sistemas, pois afeta grandemente a velocidade de liberação dos fármacos encapsulados. Supondo uma distribuição homogênea do fármaco no interior das partículas, espera-se que quanto maior o diâmetro, mais lenta seja a velocidade de liberação (FREIBERG & ZHU, 2004). Além disso, o diâmetro da partícula é condicionado ao modo de administração. Quando a via parenteral é almejada, a obtenção de partículas com até 100 μm é requerida, para evitar inconvenientes como o entupimento da agulha para injeção (VILA-JATO, 1997).

O diâmetro médio e a distribuição granulométrica das diferentes formulações podem ser visualizados na Tabela 20 e Figura 30. Aparentemente, a técnica de dupla emulsão, utilizada para a obtenção de partículas compostas de P(3HB):GEL, levou à obtenção de partículas de maior diâmetro. A pequena redução do tamanho demonstrada por P(3HB): gelatina 10:1 (etanol) pode ser atribuída à presença do álcool etílico durante o processo de preparo, considerando que demais condições foram mantidas constantes. Além disso, as microesferas preparadas a partir do P(3HB) e GEL 10:1 exibiram maior polidispersidade. As microesferas de P(3HB):PLA-PEG 3:1 exibiram diâmetro médio e distribuição granulométrica semelhante às obtidas unicamente a partir do P(3HB). Entretanto, o aumento da proporção de PLA-PEG nas microesferas conduziu ao aumento do diâmetro médio das partículas. Este efeito pode estar relacionado com a interação do PLA-PEG com a fase aquosa durante o processo de evaporação do solvente.

TABELA 20: Resultados obtidos por difração a laser para diâmetro médio e distribuição granulométrica das microesferas.

Formulação	Diâmetro 10% (μm)	Diâmetro 50% (μm)	Diâmetro 90% (μm)	Diâmetro médio (μm)
P(3HB)	11,70	22,43	31,71	21,93
P(3HB): GEL 10:1	20,18	51,91	98,84	56,17
P(3HB):GEL 10:1 (etanol)	18,67	37,53	71,55	41,55
P(3HB): PLA-PEG 3:1	12,26	23,81	32,62	23,12
P(3HB):PLA-PEG 1:1	18,12	37,17	68,51	40,39

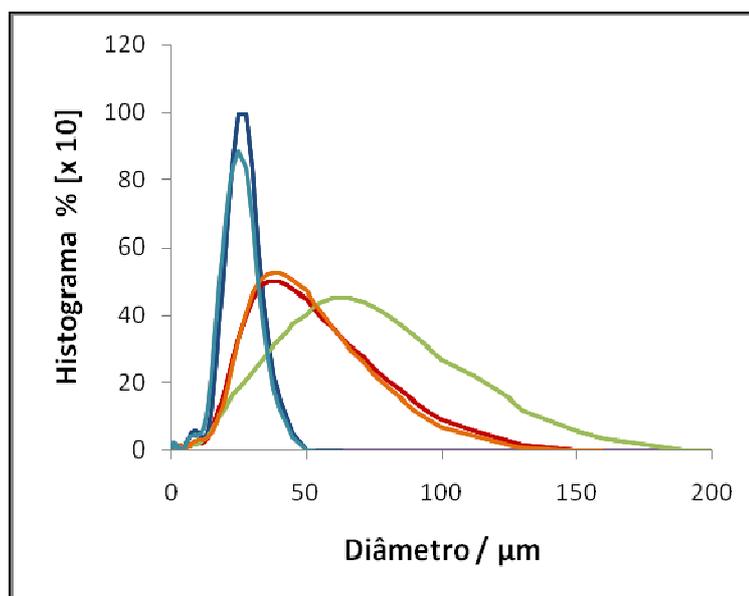


FIGURA 30: Histograma da distribuição granulométrica das microesferas obtidas a partir de (—) P(3HB), (—) P(3HB):gelatina 10:1, (—) P(3HB):gelatina 10:1 (etanol), (—) P(3HB):PLA-PEG 3:1 e (—) P(3HB):PLA-PEG 1:1.

4.2.4 Avaliação do perfil de liberação do IBF a partir das microesferas

Os perfis de liberação do ibuprofeno a partir das microesferas, obtidos pelo método da diálise, podem ser visualizados na Figura 29. Ao contrário do que ocorre com as formulações de liberação controlada destinadas à administração oral, não existem técnicas de liberação *in vitro* regulamentadas para sistemas microparticulados que visam à administração parenteral. Entretanto, o método da

diálise é atrativo quando a forma farmacêutica em questão constituirá um depósito de fármaco restrito ao local de administração, como ocorre nas administrações intramuscular, subcutânea e intra-articular (D´SOUZA, DELUCA, 2006) sendo, portanto, utilizado na segunda parte deste trabalho. Contudo, diferenças foram encontradas nos perfis de liberação do IBF a partir das microesferas de P(3HB) puro, quando os métodos do banho e da diálise foram empregados, decorrentes provavelmente de parâmetros como volume do meio e tipo e velocidade de agitação. O pequeno volume utilizado no banho é difícil de ser mantido exato, devido às diversas coletas e reposições que são realizadas, mas apresenta como vantagem a agitação mecânica horizontal que permite a ressuspensão das microesferas. Na diálise, além do maior volume envolvido, as partículas ficam separadas do meio por uma membrana, facilitando as coletas. No entanto, possui como desvantagem o lento equilíbrio da concentração de fármaco entre membrana e meio, devido à pequena área de superfície da mesma. Isto pode limitar a análise precisa dos percentuais iniciais de liberação a partir de formulações que possuam alto efeito *burst* (D´SOUZA, DELUCA, 2006). Neste contexto, algumas conclusões foram obtidas ao comparar os perfis de liberação das diferentes formulações testadas. Para verificar o efeito da membrana de diálise sobre a velocidade de liberação do IBF, o fármaco puro foi testado nas mesmas condições.

Conforme pode ser observado (Figura 31), o percentual de ibuprofeno liberado a partir das microesferas preparadas unicamente com o P(3HB), após 1 hora de ensaio, foi cerca de 21,63%. Para as partículas compostas de P(3HB):gelatina 10:1, sem e com a adição de etanol na fase interna, 17,66% e 25,89% de ibuprofeno foram liberados na primeira hora de ensaio e para as microesferas preparadas a partir das blendas de P(3HB):PLA-PEG 3:1 e 1:1, a liberação foi de 28,89% e 9,64%, respectivamente. No mesmo período, 29% do IBF puro atravessaram a membrana. A liberação total do fármaco ocorreu após 33, 96, 24, 168 e 120 horas de ensaio a partir das microesferas de P(3HB), P(3HB):GEL 10:1, P(3HB):GEL 10:1 (etanol), P(3HB):PLA-PEG 3:1 e P(3HB):PLA-PEG 1:1, respectivamente. A completa difusão do IBF através da membrana para o meio de liberação transcorreu em 8 horas de ensaio.

A comparação estatística dos perfis de liberação foi realizada pela ANOVA, empregando-se como variável o percentual de fármaco liberado após 1

hora (efeito *burst*) e a área sob a curva (ASC) obtida após 96 horas de ensaio. A comparação entre os percentuais médios de liberação após 1 hora, assim como para as ASC médias, foi realizada mediante aplicação do teste t.

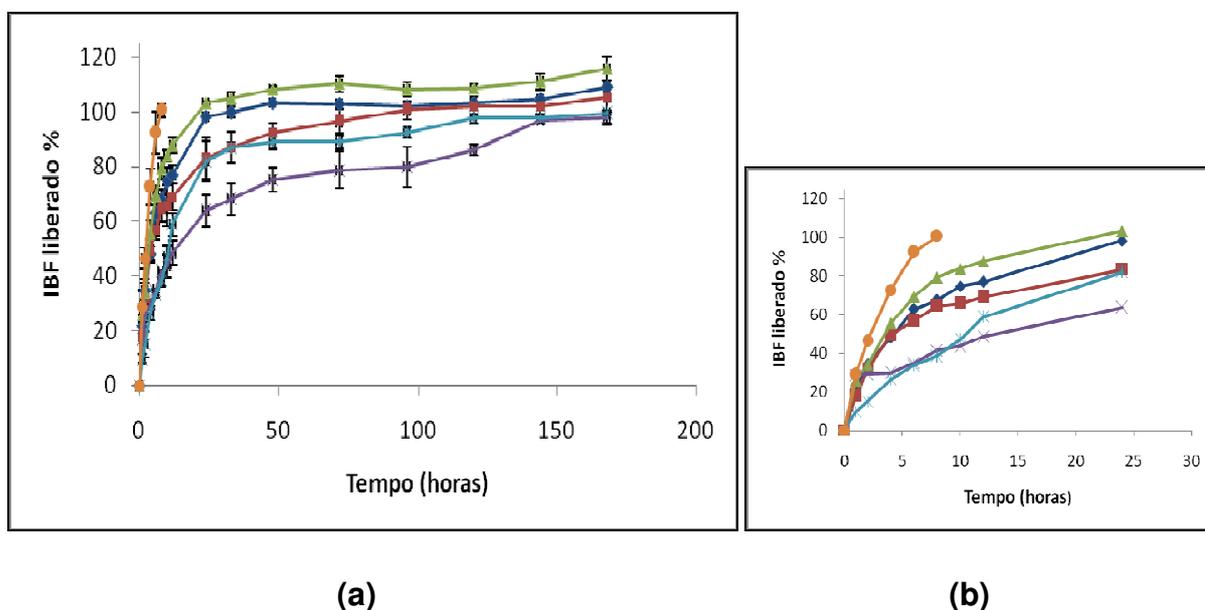


FIGURA 31: Perfis de liberação obtidos a partir de microesferas (◆) P(3HB) puro, (■) P(3HB):gelatina 10:1, (▲) P(3HB):gelatina 10:1 (etanol), (×) P(3HB):PLA-PEG 3:1, (×) P(3HB):PLA-PEG 1:1 e (●) ibuprofeno livre, após (a) 168 horas e (b) 24 horas de ensaio.

TABELA 21: Análise da variância referente aos valores de percentagem obtidos na primeira hora de ensaio de liberação.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F	F _{crítico} *
Tratamento	671,65	5	134,33	16,92	3,33
Resíduo	79,41	10	7,94		
Total	751,06				

*GL=5,10; $\alpha = 0,05$

A análise da variância realizada a partir dos percentuais de liberação do IBF na primeira hora de ensaio demonstrou que o efeito *burst* variou significativamente em função da formulação testada ($F_{cal} > F_{tab}$, $\alpha = 0,05$) (Tabela

21). Entretanto, unicamente a utilização da blenda de P(3HB):PLA-PEG 1:1 conduziu à redução significativa do efeito *burst*, quando comparado com a liberação obtida partir das microesferas de P(3HB) puro (Tabela 22) .

TABELA 22: Valores de diferença entre as médias do percentual de IBF liberado após uma hora.

Formulações		Diferença entre as médias				
		P(3HB):GEL 10:1	P(3HB)GEL 10:1 (etanol)	PLA:PEG 3:1	PLA:PEG 1:1	IBF
		17,66	25,89	28,89	9,64	29,01
P(3HB)	21,63	3,97	-4,26	-7,26	11,99*	-7,38
P(3HB):GEL 10:1	17,66		-8,23	-11,23*	8,02	-11,35*
P(3HB):GEL10:1 (etanol)	25,89			-3,00	16,25*	-3,12
P(3HB):PLA:PEG 3:1	28,89				19,25*	-0,12
P(3HB):PLA:PEG 1:1	9,64					-19,37*

* diferença significativa, $\alpha = 0,05$, dms teste $t=9,60$

A análise da variância realizada a partir dos valores de área sob a curva indicou que a velocidade de liberação do IBF a partir das microesferas varia significativamente em função da formulação testada ($F_{cal} > F_{tab}$, $\alpha = 0,05$) (Tabela 23). Quando as áreas sob as curvas médias foram comparadas, verificou-se que a velocidade de liberação do IBF a partir das microesferas compostas de P(3HB):GEL não diferiu significativamente daquela obtida a partir das microesferas de P(3HB) puro (Tabela 24), apesar da adição de etanol ter causado um aumento na velocidade de liberação do fármaco. A maior velocidade de liberação demonstrada pela formulação P(3HB):GEL 10:1, preparada com adição de etanol, pode ser decorrente da localização mais externa do fármaco, causada pelo seu arraste para a interface da emulsão.

Por outro lado, a formação de blends de P(3HB) e PLA-PEG conduziu à redução significativa da velocidade de liberação do IBF, quando comparada com a

liberação do IBF a partir das microesferas de P(3HB) puro. Esta redução foi dependente da proporção de PLA-PEG na blenda. A compatibilidade existente entre os polímeros, levando à formação de uma matriz polimérica homogênea e com estrutura mais amorfa, pode justificar o maior controle da liberação com o uso do PLA-PEG. Todavia, a elevada interação existente entre o copolímero e a fase aquosa da emulsão tem levado à formação de canais durante o processo de emulsão/evaporação do solvente (HUANG, CHUNG, TZENG, 1999; HUANG, CHUNG, 2001). Este dado pode ser usado para explicar o aumento da velocidade de liberação do IBF com o aumento da proporção de PLA-PEG na blenda.

TABELA 23: Análise da variância obtida a partir dos valores de AUC dos perfis de liberação, obtidas após 96 horas de ensaio.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F	F _{crítico}
Tratamento	15925904	4	3981476	53,04	3,84
Resíduo	600506,6	8	75063,33		
Total	16526411	12			

$\alpha = 0,05$

TABELA 24: Valores da diferença entre as médias das áreas sob as curvas dos perfis obtidos após 96 horas.

Formulações		Diferença entre as AUCs médias			
		P(3HB):GEL 10:1	P(3HB):GEL 10:1 (etanol)	PLA:PEG 3:1	PLA:PEG 1:1
		8263,24	9661,56	6424,05	7591,26
P(3HB)	9060,77	797,53	-600,79	2636,72*	1469,51*
P(3HB):GEL 10:1	8263,24		-1398,32*	1839,19*	671,98
P(3HB):GEL10:1 et.	9661,56			3237,51*	2070,3*
PLA:PEG 3:1	6424,05				-1167,21*

* diferença significativa, $\alpha = 0,05$, dms teste t=893,49

No desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, a aplicação de modelos matemáticos representa uma importante ferramenta para o entendimento dos mecanismos envolvidos, além de fornecer dados que podem ser usados para simular o efeito dos parâmetros estudados sobre a cinética de liberação. Os mecanismos mais descritos incluem a difusão fickniana, intumescimento e erosão/degradação da matriz polimérica (NARASIMHAN, 2001). A escolha do modelo é baseada nas características do fármaco e da matriz. Considerando que a maior parte do fármaco foi liberada após 72 h de ensaio, a erosão/degradação da matriz no período avaliado é, provavelmente, negligenciável. Desta maneira, o modelo matemático de Baker-Lonsdale, desenvolvido a partir do modelo de Higuchi, foi aplicado para descrever os perfis de liberação. Este modelo descreve o controle da liberação de matrizes esféricas e não homogêneas, e uma correlação linear pode ser estabelecida após a construção de um gráfico de fração liberada *versus* tempo, usando a seguinte equação:

$$f = 3/2 [1 - (1 - M_t / M_\infty)^{2/3}] - M_t / M_\infty = k t$$

Onde M_t é a taxa de fármaco liberado no tempo t , M_∞ é a taxa de fármaco liberado no infinito, e k corresponde à inclinação da reta obtida após linearização (COSTA, LOBO, 2001).

Na Figura 32 encontram-se demonstrados os perfis de liberação do ibuprofeno a partir das diferentes formulações, após aplicação do modelo de Baker-Lonsdale. Os dados de regressão estão demonstrados na Tabela 25.

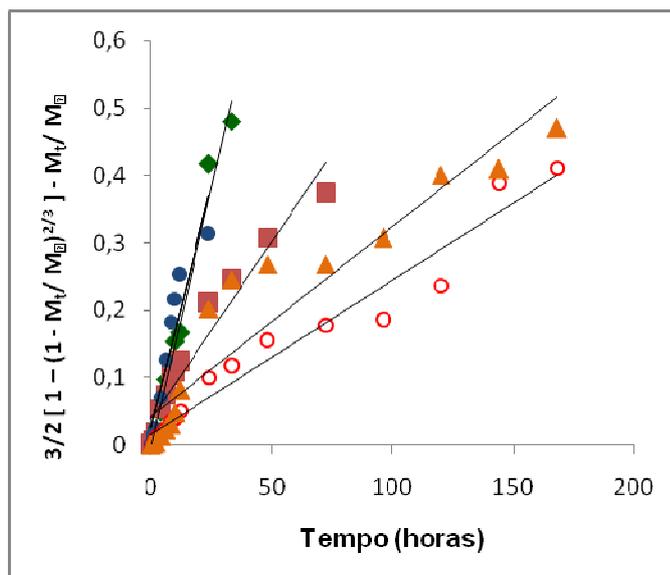


FIGURA 32: Gráfico obtido após aplicação do modelo Baker-Lonsdale nos perfis de liberação do IBF a partir das microesferas de (◆) P(3HB), (■) P(3HB):GEL 10:1, (●) P(3HB):GEL 10:1(etanol), (○) P(3HB):PLA-PEG 3:1 e (▲) P(3HB):PLA-PEG 1:1.

TABELA 25: Dados de regressão obtidos após aplicação do modelo de Baker-Lonsdale nos perfis de liberação do ibuprofeno a partir das microesferas.

Formulação (n=3)	Coefficiente de correlação (R ²)	Inclinação da reta	Intercepto
P(3HB)	0,985	0,015	-0,004
P(3HB):GEL 10:1	0,936	0,005	0,038
P(3HB):GEL 10:1 (etanol)	0,876	0,014	0,025
P(3HB):PLA-PEG 3:1	0,959	0,002	0,015
P(3HB):PLA-PEG 1:1	0,895	0,002	0,041

Os altos coeficientes de correlação obtidos após linearização dos perfis de liberação indicam que o fármaco é liberado principalmente por um processo de difusão. Este resultado foi confirmado pela análise das fotomicrografias obtidas a

partir das microesferas, após sete dias de ensaio de liberação (Figura 33). Como pode ser observado, a forma esférica das microesferas foi mantida, porém ocorreu um aumento da porosidade, resultante provavelmente da saída do fármaco e da formação de canais nas partículas. Quando PLA-PEG foi empregado para a obtenção da blenda, um maior aumento da porosidade foi observado, decorrente, provavelmente, da maior hidrofília das cadeias de polietilenoglicol. Esta hidrofília promove a penetração da água na partícula, facilitando a liberação. Os grandes espaços vazios observados nas microesferas compostas P(3HB):GEL são decorrentes, possivelmente, da solubilização e remoção da gelatina após entrada do meio de liberação no interior das partículas.

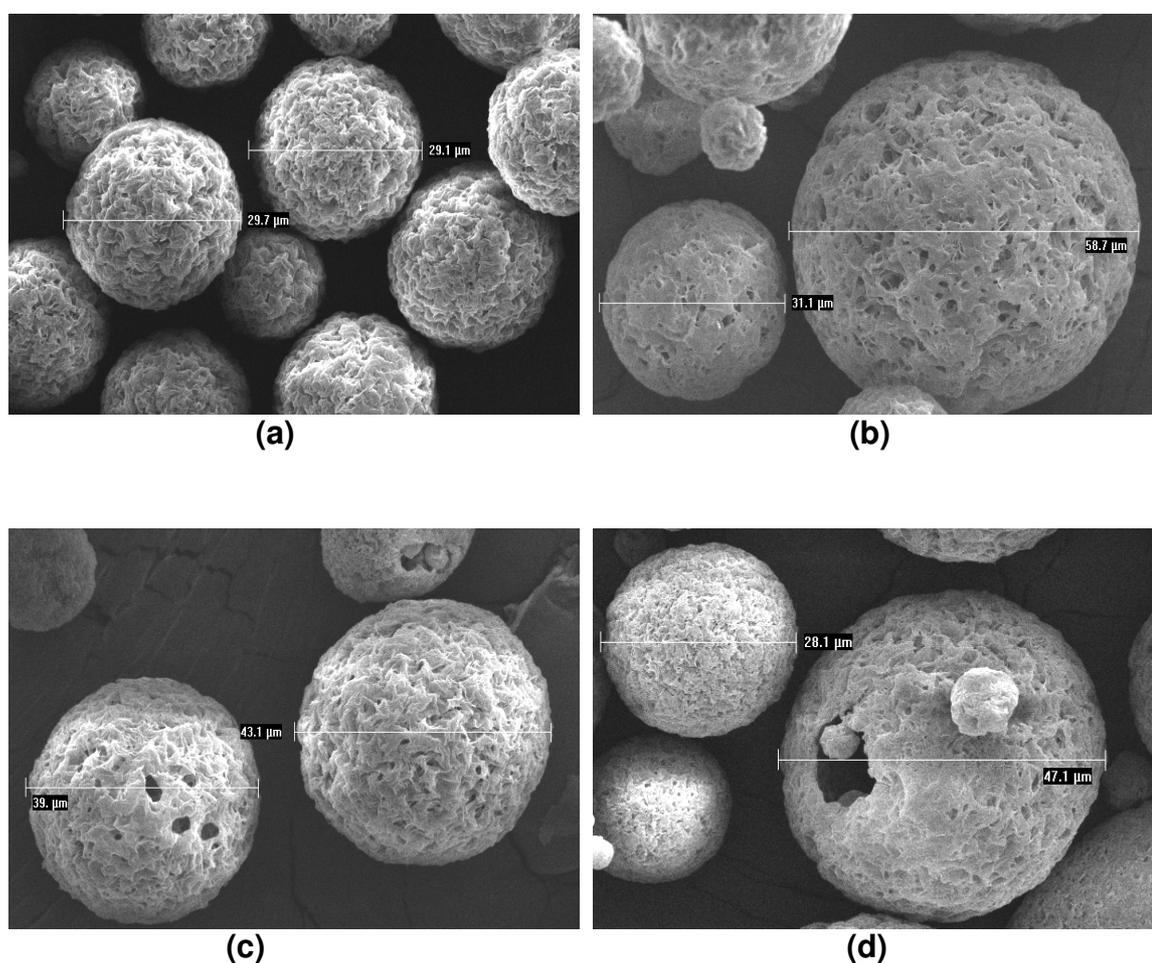


FIGURA 33: Micrografias obtidas por MEV das microesferas de (a) P(3HB):PLA-PEG 3:1, (b) P(3HB):PLA-PEG 1:1, (c) P(3HB):GEL e (d) PHB:GEL(etanol), após sete dias do início do ensaio de liberação.

PARTE III Avaliação preliminar da eficácia terapêutica *in vivo* do ibuprofeno liberado a partir das microesferas em modelo de artrite crônica induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA)

O uso do adjuvante completo de Freund (CFA) como indutor de doenças auto-imunes está descrito em diversos protocolos de modelos experimentais. No entanto, o modo de ação do CFA ainda não é completamente conhecido. O CFA é composto por óleo mineral, mono-oleato de manitol, como surfactante, e uma micobactéria morta. É sugerido que a doença seja desencadeada pela resposta imune a um epítipo da proteína hsp65 (*heat shock protein* de 65 kDa) do *mycobacterium*. Anticorpos e células T específicas, produzidos contra este epítipo, levariam a uma reação-cruzada com os epítipos da proteína HSP do hospedeiro (BILLIAU, MATTHYS, 2001). Outros investigadores acreditam que o gatilho artritogênico seja determinado tanto pela natureza do óleo utilizado no preparo do adjuvante, quanto pelas peptidoglicanas presentes nas paredes celulares das bactérias (WHITEHOUSE, 2007).

4.3 Avaliação da eficácia terapêutica do ibuprofeno liberado a partir das microesferas

Devido às características das microesferas demonstradas nos ensaios *in vitro*, como alto teor de ibuprofeno encapsulado e maior controle da liberação, a formulação de microesferas utilizadas no ensaio *in vivo* foi preparada a partir de P(3HB):PLA-PEG 3:1. Os resultados obtidos para incapacitação articular, edema articular e contagem de células, após administração de IBF livre e microesferas, estão apresentados como gráficos nas Figuras 34, 35 e 36, respectivamente.

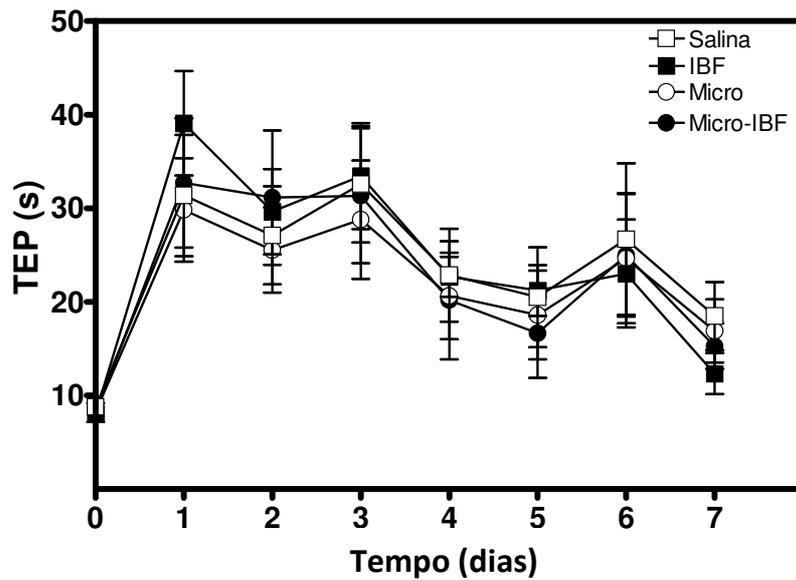


FIGURA 34: Avaliação da resposta antinociceptiva de microesferas contendo ibuprofeno através da medida de incapacitação articular. Os resultados estão expressos como média e erro padrão da média ($M \pm E.P.M$) de 6 ratos por grupo. Análise estatística (ANOVA de uma via seguida de *post-hoc* de Tukey).

Através dos resultados demonstrados na Figura 34, pode-se observar que os grupos tratados com IBF livre, microesferas brancas e microesferas com o fármaco, não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao grupo salina. Entretanto, ao se avaliar o edema articular (Figura 35), os animais que receberam as microesferas contendo ibuprofeno demonstraram menor aumento do diâmetro articular ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo que recebeu IBF livre ou aos grupos controles (salina e microesferas brancas). Além disso, no grupo tratado com microesferas contendo o fármaco, a migração de leucócitos (Figura 36) foi reduzida de forma significativa ($p < 0,05$).

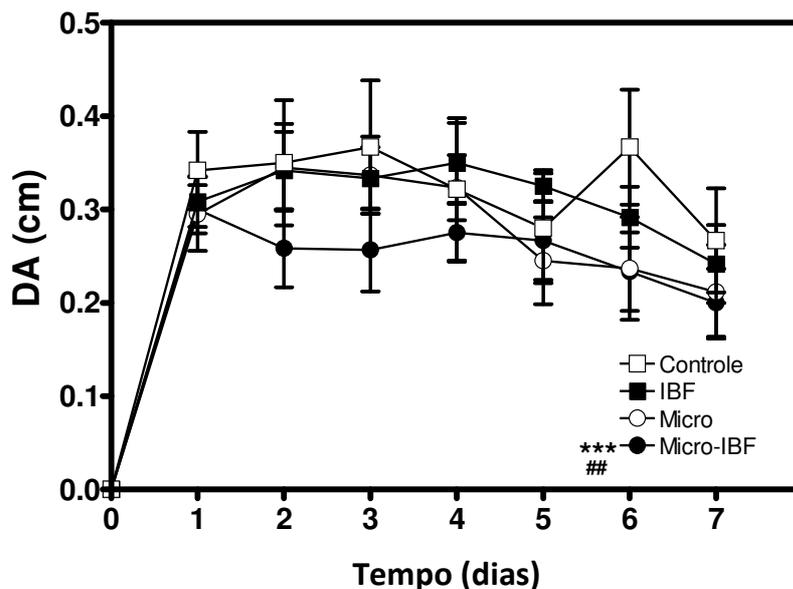


FIGURA 35: Avaliação do aumento do diâmetro articular de microesferas contendo ibuprofeno. Os resultados estão expressos como média e erro padrão da média ($M \pm E.P.M$) de 6 ratos por grupo. Análise estatística (ANOVA de uma via seguida de *post-hoc* de Tukey). *** e ## indicam diferença estatística entre os grupos tratados com micropartículas de ibuprofeno e salina ($p < 0.001$) e os grupos tratados com micropartículas de ibuprofeno e ibuprofeno livre ($p < 0.01$).

A reduzida estimulação celular causada pela matriz polimérica que compõe as microesferas de P(3HB):PLA-PEG 3:1 pode ser decorrente das características de hidrofiliabilidade e de não-imunogenicidade do PEG. A modificação química do PLA com poli(etilenoglicol), PEG, conduz à formação de um copolímero anfifílico, o qual é menos susceptível à adsorção de proteínas, células, e/ou tecidos, e, conseqüentemente, menos propício a ativar o sistema complemento e desencadear reações adversas (LUCKE *et al.*, 2000; DRUMOND & WANG, 2004). Este efeito tem sido atribuído à barreira estérica que se forma ao redor das partículas preparadas a partir de PLA-PEG, decorrente da hidratação das cadeias de PEG (MOSQUEIRA *et al.*, 2001).

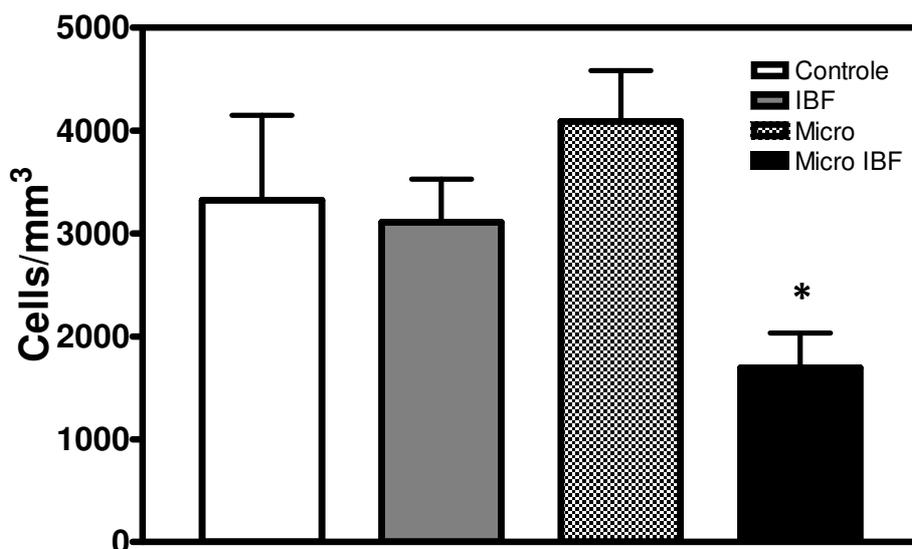


FIGURA 36: Avaliação da migração celular de microesferas contendo ibuprofeno. Os resultados estão expressos como média e erro padrão da média ($M \pm E.P.M$) de 6 ratos por grupo. Análise estatística (ANOVA de uma via seguida de *post-hoc* de Tukey).

A relativa melhora no quadro artrítico alcançada com o ibuprofeno encapsulado nas microesferas, verificada através da redução do edema articular e da migração de leucócitos, torna necessário o estudo de doses mais elevadas de ibuprofeno. É importante avaliar se estas doses aumentam a resposta terapêutica ao fármaco, tendo em vista que o ibuprofeno livre não reduziu os parâmetros inflamatórios avaliados no estudo. Experimentos com este ajuste de dose de ibuprofeno, encapsulado ou não, já estão sendo realizados, juntamente com a avaliação histopatológica e radiográfica dos animais. Estes resultados serão publicados em breve por nosso grupo. É necessário verificar também se a utilização de tween 80 para facilitar a solubilização do ibuprofeno não provocou o aceleração da liberação do fármaco a partir das partículas de P(3HB): PLA-PEG 3:1.

Ressalta-se ainda que a maioria dos estudos encontrados na literatura tem avaliado a resposta anti-artritogênica de fármacos antiinflamatórios, veiculados em micro e nanopartículas, após a administração sistêmica. Neste estudo, temos avaliado a resposta terapêutica do ibuprofeno local, o que poderia diminuir possíveis efeitos adversos já conhecidos no tratamento com antiinflamatórios não-esteroidais.

5. CONCLUSÕES

- Todas as formulações avaliadas apresentaram altos valores de eficiência de encapsulação e teor de ibuprofeno. Entretanto, os valores de teor de fármaco foram significativamente reduzidos pela adição de PLA-PEG para formar uma blenda e quando microesferas compostas de P(3HB) e GEL foram preparadas.
- As microesferas preparadas a partir de blends de P(3HB) e trimiristato de glicerila apresentaram forma esférica e superfície rugosa. O aumento da proporção de TMG reduziu a porosidade das partículas, quando clorofórmio foi utilizado como solvente orgânico.
- A substituição do clorofórmio por diclorometano/álcool isopropílico no preparo das microesferas de P(3HB) e TMG reduziu o diâmetro e atenuou a rugosidade das microesferas. Neste caso, o aumento da proporção de TMG na blenda conduziu à obtenção de partículas altamente porosas. Esta rugosidade pareceu ser reduzida com a adição do fármaco. A rugosidade da superfície das partículas também foi afetada pela adição de PLA-PEG, em decorrência da maior hidratação das microesferas proporcionada pela presença das cadeias de poli(etilenoglicol) na superfície das mesmas.
- A avaliação da morfologia de filmes preparados com P(3HB) e TMG mostrou uma nítida separação de fases, caracterizando imiscibilidade entre os componentes. Quando a morfologia dos filmes de P(3HB) e PLA-PEG foi avaliada uma estrutura compacta e homogênea foi visualizada.
- Os estudos de calorimetria exploratória diferencial (DSC) indicaram que a adição de TMG nas microesferas não altera o grau de cristalinidade do P(3HB). Por outro lado, as análises de DSC, em conjunto com a difração de raios-x, demonstraram a redução da cristalinidade do P(3HB), unicamente quando PLA-PEG é adicionado na proporção de 50% da matriz.
- Para todas as formulações estudadas, as análises de DSC e difração de raios-x demonstraram que o fármaco encontra-se parcialmente disperso na sua forma amorfa ou molecular na matriz.

- Partículas de diâmetro médio variando entre 21,3 e 56,17 μm foram obtidas, sendo os maiores valores observados para as microesferas compostas de P(3HB):GEL. A formulação P(3HB):GEL 10:1 também apresentou a maior heterogeneidade de tamanhos.
- A velocidade de liberação do IBF foi significativamente afetada pela composição ou procedimento empregado para preparação das microesferas.
- As microesferas preparadas a partir de blendas de P(3HB) e TMG não permitiram o controle da liberação do ibuprofeno, a qual foi bastante pronunciada na primeira hora. Este fato decorreu, provavelmente, da localização superficial do fármaco nas partículas e da formação de canais durante a formação das microesferas.
- Elevados valores de *efeito burst* foram observados nas microesferas preparadas a partir de P(3HB) e PLA-PEG 3:1 ou P(3HB):GEL 10:1, com e sem adição de etanol. A adição de etanol pareceu provocar ainda o deslocamento do fármaco para a superfície das microesferas, e, conseqüentemente, o aceleração da liberação do IBF.
- Apesar da redução da cristalinidade do P(3HB) verificada nas microesferas de P(3HB):PLA-PEG 1:1, o maior controle da liberação foi obtido quando as microesferas de P(3HB):PLA-PEG 3:1 foram testadas. Este resultado pode estar associado ao maior grau de hidratação da matriz, ocasionada pela maior proporção de PLA-PEG.
- Os resultados obtidos no ensaio *in vivo* demonstraram a maior eficácia das microesferas de P(3HB):PLA-PEG 3:1 contendo ibuprofeno, em relação ao fármaco livre, no que diz respeito à redução do edema articular e à migração de leucócitos. A ausência de alteração no quadro de incapacitação articular denota a importância de novos estudos com doses maiores de microesferas, sem, no entanto, subestimar os resultados promissores obtidos com esta formulação.

6. BIBLIOGRAFIA

AL-NASSER, I. A. Ibuprofen-induced liver mitochondrial permeability transition. *Toxicology Letters*, v. 111, p. 213-218, 2000.

ANDERSON, J. M.; SHIVE, M. S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 28, p. 5-24, 1997.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. Desenvolvimento e Processo de Aprovação de Novos Medicamentos. In: *Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos*. 8.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2007, p. 40-81.

ANTUNES, M. C. M.; FELISBERTI, M. I. Blends of poly(hydroxybutyrate) and poly (ε-caprolactone) obtained from melting mixture. *Polímeros*, v. 15, n. 2, p. 2005.

ARNETT, F.C. Artrite Reumatóide. In: GOLDMAN, L.; BENNET, J. *Cecil: Tratado de Medicina Interna*. 21. ed. v.2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Parte XXI-286, p. 1663-1664,1668-1669.

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

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

BARAN, E. T. OZER, N. HASIRCI, V. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanocapsules as enzyme carriers for cancer therapy: an in vitro study. *Journal of Microencapsulation*, v. 19, n. 3, p. 363-376, 2002.

BAZZO, G.C.; LEMOS-SENNA, E.; PIRES, A.T.N. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) and PHB/Eudragit E microparticles containing piroxicam. *Proceed. e-Book of First French-Brazilian Meeting on Polymers*, p. 004, 2005.

BEJARANO, P.F. Ibuprofeno y analgesia. *EMB*, v. 5, p.39-42, 2006.

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

BHATT, R.; SHAH, D.; PATEL, K. C.; TRIVEDI, U. PHA-rubber blends: Synthesis, characterization and biodegradation. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 4615-4620, 2008.

BIDONE, J. LEMOS-SENNA, E. Ibuprofen-loaded microspheres obtained from poly-3-hydroxybutyrate and triglyceride ester of fatty acid blends: evaluation of drug content, morphology and drug release. *Proceed. e-Book of XI International Macromolecular Colloquium and 6th International Symposium on Natural Polymers and Composites*. P. 27, 2007.

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 70, p. 849-860, 2001.

BOZDAG, S.; ÇALIS, S.; KAS, H.S.; ERCAN, M.T.; PEKSOY, Í.; HINCAL, A.A. *In vitro* evaluation and intra-articular administration of biodegradable microspheres containing naproxen sodium. *Journal of Microencapsulation*, v. 18, n. 4, p. 443-456, 2001.

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

CARMINGNAN, 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. *Dissertação de Mestrado em Farmácia*. Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 148p., 2006.

CARMINGNAN, F.; BIDONE, J.; LEMOS-SENNA, E. Emprego dos polihidroxialcanoatos em sistemas de liberação controlada de fármacos. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 27, p. 131-143, 2008.

CARVALHO, P. O.; CASS, Q. B.; CALAFATTI, S. A.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R. Review- Alternatives for the separation of drug enantiomers: ibuprofen as a model compound. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 23, n. 3, p. 291-300, 2006.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. *Prog. Polym. Sci.* v. 23, p. 1273-1335, 1998.

CHEN, C.; DONG, L.; YU, P.H.F. Characterization and properties of biodegradable poly(hydroxyalkanoates) and 4,4-dihydroxydiphenylpropane blends. Intermolecular hydrogen bonds, miscibility and crystallization. *European Polymer Journal*. v.42, p. 2838-2848, 2006.

CHEN,G.Q.; CAI, Z.; WANG, L. Biocompatibility and biodegradation of poly(hydroxybutyrate)/ poly(ethylene glycol) blend. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, v.14, p. 1073-1078, 2003.

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

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

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

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Robbins: Patologia estrutural e funcional. 5 .ed., Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1996, p.1129-1134.

D'SOUZA, S.S.; DELUCA P.P. Methods to assess *in vitro* drug release from injectable polymeric particulate systems. *Pharmaceutical Research*, v. 23, n. 3, p. 460-474, 2006.

DEASY, P.B. Drug and the pharmaceutical sciences: Microencapsulation and related drug process. New York: Marcel Dekker, 361p., 1994.

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

DRUMOND, W. S.; WANG, S.H.; MOTHÉ, C.G. Síntese e Caracterização do Copolímero Poli (lático-*b*-glicol etilênico). *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 14, n. 2, p. 74-79, 2004.

DUVVURI, S.; JANORIA, K. G.; MITRA, A.K. Effect of Polymer Blending on the Release of Ganciclovir from PLGA Microspheres. *Pharmaceutical Research*, v. 23, n. 1, p. 215-223, 2006.

EL-TAWEEL, S.H.; HÖHNE G.W.H.; MANSOUR, A. A.; STOLL, B.; SELIGER, H. Glass transition and the rigid amorphous phase in semicrystalline blends of bacterial polyhydroxybutyrate PHB with low molecular mass atactic R, S-PHB-diol. *Polymer*, v. 45, p. 983-992, 2004.

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

EMBLETON, J. K.; TIGHE, B.J.; Polymers for biodegradable medical devices. IX: Microencapsulation studies: effects of polymer composition and process parameters on poly-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate microcapsule morphology. *Journal of Microencapsulation*, v. 9, n. 1, p. 73-87, 1992.

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

FAUCI, A. S.; HAYNES, B.F. Introdução ao sistema imune. In: FAUCI, A.S.; BRAUNWALD, E.B.; ISSELBACHER, K.J.; WILSON, J.D.; MARTIN, J.B.; KAUSPER, D.L.; HAUSER, S.L.; LONGO, D.L. *Harrison: Medicina Interna*. 14.ed., v. 2, Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1998. Parte Doze. Seção 1. p. 1863.

FERNÁNDEZ-CARBALLIDO, A.; HERRERO-VANRELL, R. MOLINA-MARTINEZ, I. T.; PASTORIZA, P. Biodegradable ibuprofen-loaded PLGA microspheres for intraarticular administration: Effect of Labrafil addition on release in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 279, p. 33-41, 2004.

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

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

GALEGO, N.; ROZCA, C.; SÁNCHEZ, R.; FUNG, J.; VÁSQUEZ, A.; TOMÁS, A. Characterization and application of poly(b-hydroxyalkanoates) family as composite materials. *Polymer Testing*, v. 19, p. 485-492, 2000.

GOMES, R.P. Atividade física no tratamento de artrite induzida por Adjuvante de Freund: Efeitos na nocicepção, edema e migração celular. *Dissertação de Mestrado em Ciências do Movimento Humano*. Universidade do Estado de Santa Catarina, Brasil, 104 p., 2007.

GOPFERICH, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*, v. 17, p. 103-114, 1996.

GOSH, L. K.; GOSH, N.C.; CHATTERJEE, M.; GUPTA, B.K. Product development studies on the tablet formulation of ibuprofen to improve bioavailability. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 24, p. 473-477, 1998.

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

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

GURSEL, YAGMURLU, F., KORKUSUZ, F.; HASIRCI, V. In vitro antibiotic release from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Journal of Microencapsulation*, v. 19, n. 2, p. 153-164, 2002.

GUSE, C.; KOENNINGS, S.; KREYE, F.; SIEPMANN, F.; GOEPFERICH, A.; SIEPMANN, J. Drug release from lipid-based implants. Elucidation of the underlying mass transport mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 314, p. 137-144, 2006.

HIGTON, F. The pharmaceuticals of ibuprofen. In: *Ibuprofen: A Critical Bibliographic Review*, Estados Unidos: CRC Press, 1999, Cap. 3, p. 55-64.

HORISAWA, E.; HIROTA, T.; KAWAZOE, S.; YAMADA, J.; YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Prolonged anti-inflammatory action of DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres containing bethamethasone sodium phosphate for an intra-articular delivery system in antigen-induced arthritic rabbit. *Pharmaceutical Research*, v. 19, n. 4, p. 403-410, 2002.

HUANG, J.; WIGENT, R. J.; BENTZLEY, C. M.; SCHWARTZ, J. B. Nifedipine solid dispersion in microparticles of ammonio methacrylate copolymer and ethylcellulose binary blend for controlled drug delivery: Effect of drug loading on release kinetics. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 319, p. 44-54, 2006.

HUANG, Y-Y.; CHUNG, T-W. Microencapsulation of gentamicin in biodegradable PLA and/or PLA/PEG copolymer. *Journal of Microencapsulation*, v. 18, n. 4, p. 457-465, 2001.

HUANG, Y-Y.; CHUNG, T-W.; TZENG, T-W. A method using biodegradable polylactides/polyethylene glycol for drug release with reduced initial burst. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 182, p. 93-100, 1999.

IPT. Instituto de Pesquisa e Tecnologia. Biodiversidade. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/biodiversidade/bio15.htm>. Acesso em: 03jan.2008.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, v. 21, p. 2475-2490, 2000.

JUNI, K.; JUNKO, O.; MATSUI, N.; KUBOTA, M.; NAKANO, M. Control of release rate of bleomycin from polylactic acid microspheres by additives. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 33, n. 4, p. 1609-1614, 1985.

JUNI, K.; NAKANO, M.; KUBOTA, M. Controlled release of aclarubicin, an anticancer antibiotic, from poly- β -hydroxybutyric acid microspheres. *Journal of Controlled Release*, v. 4, n. 1, p. 25-32, 1986.

KASSAB, A.C.; PEIAKEIN, E.; BEILGEIASC, S.; DENKBAA, E.B.; XU, K. Embolization with polyhydroxybutyrate (PHB) microspheres: in vivo studies. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 14, p. 291-303, 1999.

KASSAB, A.C.; XU, K.; DENKBAS, E.B.; DOU, Y.; ZHAO, S.; PISKIN, E. Rifampicin carrying polyhydroxybutyrate microspheres as a potencial chemoembolization agent. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, v. 8, n. 12, p. 947-961, 1997.

KAWAGUSHI, T.; TSUGANE, A.; HIGASHIDE, K.; ENDOH, H.; HASEGAWA, T.; KANNO, H.; SEKI, T.; JUNI, K.; FUKUSHIMA, S.; NAKANO, M. Control of drug release with a combination of prodrug and polymer matrix: antitumor activity and release profiles of 2'3'-diacyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine from poly(3-hydroxybutyrate) microspheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 81, p. 508-512, 1992.

KHANG, G.; KIM, S.W.; CHO, J.C.; RHEE, J.M.; YOON, S.C.; LEE, H.B. Preparation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) microspheres for the sustained release of 5-fluorouracil. *Biomedical Materials Engineering*, v. 11, n. 2, p. 89-103, 2001.

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

KHIDR, S.H.; NIAZY, E.M.; EL-SAYED, Y.M. Development and in-vitro evaluation of sustained-release meclofenamic acid microspheres. *Journal of Microencapsulation*, v. 15, n. 2, p. 153-162, 1998.

KLOSE, D.; SIEPMANN, F.; ELKHARRAZ, K.; SIEPMANN, J. PLGA-based drug delivery systems: Importance of the type of drug and device geometry. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 354, p. 95-103, 2008.

KOCBEK, P.; BAUMGARTNER, S.; KRISTL, J. *Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs*. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 312, p. 179-186, 2006.

KORSATTO-WABNEGG, B. Development of press-coated tablets with controlled-release effect with a base of poly-d-(-)-3-hydroxybutyric acid. *Pharmazie*, v. 45, p. 842-844, 1990.

KUBOTA, M.; NAKANO, M.; JUNI, K. Mechanism of Enhancement of the release rate of aclarubicin from poly- β -hydroxybutyric acid microspheres by fatty acid esters. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 36, n. 1, p. 333-337, 1988.

LEE, S. Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates- Review. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, p. 1-14, 1996.

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

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

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

LIPSKY, P. E. Artrite reumatóide. In: FAUCI, A.S.; BRAUNWALD, E. B.; ISSELBACHER, K.J.; WILSON, J.D.; MARTIN, J.B.; KASPER, D.L.; HAUSER, S.L.; LONGO, D.L. *Harrison: Medicina Interna*. 14.ed., v.2, Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1998. Parte Doze. Seção 2. p. 1996,1999, 2003.

LOUZADA-JUNIOR, P.; SOUZA, B.D.B.; TOLEDO, R.A.; CICONELLI, R.M. Análise descritiva das características demográficas e clínicas de pacientes com artrite reumatóide no estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 47, n. 2, p. 84-90, 2007.

LU, B.; WANG, Z. R.; YANG, H. Long-acting delivery microspheres of levonorgestrel-poly(3-hydroxybutyrate): their preparation, characterization and contraceptive tests on mice. *Journal of Microencapsulation*, v. 18, n. 1, p. 55-64, 2001.

LU, Y.; LI, J.; WANG, G. In vitro and in vivo valuation of mPEG-PLA modified liposomes loaded glycyrrhetic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 356, p. 274-281, 2008.

LUCKE, A.; TEBMAR, J.; SCHNELL, E.; SCHMEER, G.; GÖPFERICH, A. Biodegradable poly(D,L- lactic acid)-poly(ethylene glycol)-monomethyl ether diblock copolymers: structures and surface properties relevant to their use as biomaterials. *Biomaterials*, v. 2, p. 2361-2370, 2000.

MAIA, J.L.; SANTANA, H.A.; RÉ, M.I. The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 21, n. 01, p. 1-12, 2004.

MAJITHIA, V.; GERACI, S. A. Rheumatoid Arthritis: Diagnosis and Management. *The American Journal of Medicine*, v. 120, p. 936-939, 2007.

MARQUES, F. Freio na corrosão. Disponível em: <http://www.revistapesquisa.fapesp.br/index.php?art=2808&bd=1&pg=2&lg=>. Acesso em 10dez2007.

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

MEDEIROS, D. C. Desenvolvimento de microesferas de diclofenaco de sódio de liberação prolongada – avaliação do potencial de utilização de blendas de acetobutirato de celulose e poloxamers na modulação do perfil de liberação do fármaco. *Dissertação de Mestrado em Farmácia*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 116p., 2003.

MENG, F.T.; MA, G.H.; LIU, Y.D.; QIU, W.; SU, Z.G. Microencapsulation of bovine hemoglobin with high bioactivity and high entrapment efficiency using w/o/w double emulsion technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 33, p. 177-183, 2004.

MORCILLO, J.S. Sistemas terapêuticos de administração transdérmica. In: TRILLO, C. F. (ed) *Tratado de Farmácia Galênica*. Madrid: S.A. de Ediciones, 1993. Cap. 48, p. 649-652.

MOSQUEIRA, V.C.F.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BOURDON, O.; GREF, R.; LABARRE, D.; BARRATT, G. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials*, v. 22, p. 2967-2979, 2001.

MU, L.; FENG, S.S. Fabrication, characterization and in vitro release of paclitaxel (Taxol[®]) loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by spray drying technique with lipid/ cholesterol emulsifiers. *Journal of Controlled Release*, n. 76, p. 239-254, 2001.

MUNDARGI, R. C.; SRIRANGARAJAN, S.; AGNIHOTRI, S. A.; PATIL, S. A.; RAVINDRA, S.; SETTY, S. B.; AMINABHAVI, T. M. Development and evaluation of novel biodegradable microspheres based on poly(D,L-lactide-co-glycolide) and poly(ϵ -caprolactone) for controlled delivery of doxycycline in the treatment of human periodontal pocket: In vitro and in vivo studies. *Journal of Controlled Release*, v. 119, p. 59-68, 2007.

MURAKAMI, H.; KOBAYASHI, M.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 187, p. 143-152, 1999.

NARASIMHAN, B. Mathematical models describing polymer dissolution: consequences for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, p. 195-210, 2001.

NOVOA, G. A.G.; HEINAMAKI, J.; MARZA, S.; ANTIKAINEN, O.; COLARTE, A.I.; PAZ, A.S.; YLIRUUSI, J. Physical solid-state properties and dissolution of sustained-release matrices of polyvinylacetate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 59, p. 343-350, 2005.

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

ORÉFICE, R. LepCom-UFMG. Biopolímeros e Polímeros Biodegradáveis. Disponível em: <http://www.demet.ufmg.br/docentes/rodrigo/biopolimeros.htm>. Acesso em 03mar.2008.

PARK, S-H; CHOI, H-K. The effects of surfactants on the dissolution profiles of poorly water-soluble acidic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 321, p. 35-41, 2006.

PARRA, D. F.; FUSARO, J.; GABOARDI, F.; ROSA, D.S. Influence of poly(ethylene glycol) on the thermal, mechanical, morphological, physicochemical and biodegradation properties of poly(3-hydroxybutyrate). *Polymer Degradation and Stability*, v. 91, p. 1954-1959, 2006.

PENNA, L.M.R.; PEREIRA, N.N.; RE, M.I. Progesterone-loaded biodegradable microspheres: preparation, morphology and release properties. In: V INTERNATIONAL CONGRESS OF PHARMACEUTICAL SCIENCES-CIFARP, 2005, Ribeirão Preto. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.41, p. 438, 2005.

PERUMAL, D. Microencapsulation of ibuprofen and Eudragit[®] RS 100 by the emulsion solvent diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 218, p. 1-11, 2001.

POLETTI, F. S.; JÄGER, E.; RÉ, M. I.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Rate-modulating PHBHV/PCL microparticles containing weak acid model drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 345, p. 70-80, 2007.

PORTO, L.C. Filmes formados por gelatin e poli(acrilamida-co-ácido acrílico): Efeito da composição, do plastificante e agente reticulante nas propriedades térmicas, mecânicas e absorção de água. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 106p., 2007.

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

RADWAN, M. A.; PRICE, J. C.; TACKETT, R. L. In vitro release of disopyramide from cellulose acetate butyrate microspheres. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, n. 21, v. 12, p. 145-1462, 1995.

RENARD, E.; TANGUY, P. Y.; SAMAIN, E.; GUERIN, P. Synthesis of novel graft polyhydroxyalkanoates. *Macromolecular Symposia*, v. 197, p. 11-18, 2003.

RENARD, E.; TANGUY, P.Y.; SAMAIN, E.; GUERIN, P. Synthesis of novel graft polyhydroxyalkanoates. *Macromolecular Symposia*, v. 197, p. 11-18, 2003.

RODRIGUES, K.M.S.; PARRA, D.F.; SOUZA, J.S.; SILVA, M.J.; FERRAZ, H.G.; ISSA, M.G.; LUGAO, A.B. ISNAPOL Use of polyhydroxybutyrate (PHB) matrices and its blends with polietilenoglicol (PEG) in control release of theophylline. *Proceed. E-Book of XI International Macromolecular Colloquium and 6th International Symposium on Natural Polymers and Composites*. p012, 2007.

ROSA, D. S.; FRANCO, B. L. M.; CALIL, M. R. Biodegradabilidade Propriedades Mecânicas de Novas Misturas Poliméricas. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 11, n. 2, p. 82-88, 2001.

ROSSI, S.; AZGHANI, A.O.; OMRI, A. Antimicrobial efficacy of a new antibiotic-loaded poly(3-hydroxybutyric-co-hydroxyvaleric acid) controlled release system. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 54, p. 1013-1018, 2004.

RYCHTER, P.; BICZAK, R.; HERMAN, B.; SMYLLA, A.; KURCOK, P.; ADAMUS, G.; KOWALCZUK, M. Environmental degradation of polyester blends containing atactic poly(3-hydroxybutyrate). Biodegradation in Soil and Ecotoxicological Impact. *Biomacromolecules*, v. 7, p. 3125-3131, 2006.

SALMAN, M.A.; SAHIN, A.; ONUR, M.A.; ÖGE, K.; KASSAB, A.; AYPAR, Ü. Tramadol encapsulated into polyhydroxybutyrate microspheres: in vitro release and epidural analgesic effect in rats. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, v. 47, p. 1006-1012, 2003.

SÁNCHEZ, A.; TOBÍO, M.; GONZÁLEZ, L.; FABRA, A.; ALONSO, M. J. Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon-alpha. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 18, p. 221-229, 2003.

SANLI, O.; AY, N.; ISIKLAN, N. Release characteristics of diclofenac sodium from poly(vinyl alcohol)/sodium alginate and poly(vinyl alcohol)-grafted-poly(acrylamide)/sodium alginate blend beads. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 65, p. 204-214, 2007.

SANTANA, C.C.; VANIN, M.; TORRIANI, I. I.; PRIVELIC, T.; DUEK, E. A. R. Estudo de degradação "In vitro" de blendas de poli(β -hidroxibutirato) (PHB)/ poli (L-ácido láctico) (PLLA) na forma de filmes. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 14, n. 3, p. 187-193, 2004.

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

SHAEFER, M.J.; SINGH, J. Effect of isopropyl myristic acid ester on the physical characteristics and in vitro release of etoposide from PLGA microspheres. *AAPS PharmSciTec*, v. 1, n. 4, 2000.

SHUKLA, A.J.; PRICE, J.C. Effect of drug (core) particle size on the dissolution of theophylline from microspheres made from low molecular weight cellulose acetate propionate. *Pharmaceutical Research*, v. 6., n. 5, p. 418-421, 1989.

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

SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S.; MOLONEY, M.; SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants- A review. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 148-175, 2007.

SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. (Ed). Controlled- and modulated-release drug-delivery systems. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. v.3. New York: Marcel Dekker Inc., 1990, p. 281-313.

THOMPSON, C. J.; HANSFORD, D.; HIGGINS, S.; ROSTRON, C.; HUTCHEON, G.A.; MUNDAY Evaluation of ibuprofen-loaded microspheres prepared from novel copolyesters. *International Journal of Pharmaceutics*, n. 329, p. 53-61, 2007.

TOBÍO, M.; NOLLEY, J.; YUYI, G.; MCLER, J.; ALONSO, M. J. A novel system based on a poloxamers PLGA blend as a Tetanus Toxoid delivery vehicle. *Pharmaceutical Research*, v. 16, n. 5, 1999.

TONUSSI, C.R. FERREIRA, S.H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. *Pain*, v. 48, n. 3, p. 421-427, 1992.

TUNÇAY, M.; ÇALIS, S.; KAS, H.S.; ERCAN, M.T.; PEKSOY, I.; HINCAL, A.A. Diclofenac sodium incorporated PLGA (50:50) microspheres: formulation considerations and in vitro/ in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 195, p. 179-188, 2000.

URATA, T.; ARIMORI, K.; NAKANO, M. Modification of release rates of cyclosporin A from poly(L-lactic acid) microspheres by fatty acid esters and in-vivo evaluation of the microspheres. *Journal of Controlled Release*, v. 58, p. 133-141, 1999.

VACCARI, C.; SIMIONI, A. R.; RÉ, M. I.; TEDESCO, A. C. PHBHV/PCL microspheres as biodegradable drug delivery systems (DDS) for Photodynamic Therapy (PDT). *Proceed. e-Book of First French-Brazilian Meeting on Polymers*, 2005.

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

VILA JATO, J.L. (Ed). Microencapsulación de medicamentos. In: *Tecnología Farmacêutica. Aspectos Fundamentals de los sistemas farmacêuticos y operaciones básicas*. Madrid: editorial Síntesis S.A., 1997, p. 577-608.

WANG, Y.; WANG, X.; WEI, K.; ZHAO, N.; ZHANG, S.; CHEN, J. Fabrication, characterization and long-term in vitro release of hydrophilic drug using PHBV/HA composite microspheres. *Materials Letters*, v. 61, p. 1071-1076, 2007.

WANG, Z.; ITOH, Y.; HOSAKA, Y.; KOBAYASHI, I.; NAKANO, Y.; MAEDA, I.; YAMAKAWA, J.; NISHIMINE, M.; SUENOBU, T.; FUKUZUMI, S.; KAWASE, M.; YAGI, K. Novel transdermal drug delivery system with polyhydroxyalkanoate and starburst polyamidoamine dendrimer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 95, p. 541-543, 2003.

WANG, Z.; ITOH, Y.; HOSAKA, Y.; KOBAYASHI, I.; NAKANO, Y.; MAEDA, I.; YAMAKAWA, J.; NISHIMINE, M.; SUENOBU, T.; FUKUZUMI, S.; KAWASE, M.; YAGI, K. Mechanism of enhancement effect of dendrimer on transdermal drug permeation through polyhydroxyalkanoate matrix. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 96, p. 537-540, 2003.

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

WHATELEY, T.L. Biodegradable microspheres for controlled drug delivery. In: KARSA, D.R., STEPHENSON, R.A. Encapsulation and Controlled Release. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1993, p. 52-65.

WHITEHOUSE, M.W. Adjuvant arthritis 50 years on: the impact of the 1956 article by C. M. Pearson, 'Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants'. *Inflammation Research*, v. 56, p. 133-138, 2007.

WILLIAMS, A.C.; TIMMINS, P.; LU, M.; FORDES, R.T. Disorder and dissolution enhancement: deposition of ibuprofen on to insoluble polymers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 26, p. 288-294, 2005.

YANG, Y.Y.; BAI, X.L.; CHAN, W.K. Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricate by double-emulsion method. *Chemical Engineering Science*, v. 55, n.12, p. 2223-2236, 2000.

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

YOON, J-S.; LEE, W-S.; KIM, K-S.; CHIN, I-J.; KIM, M-N.; KIM, C. Effect of poly(ethylene glycol)-*block*-poly(L-lactide) on the poly[(R)-3-hydroxybutyrate]/poly(L-lactide) blends. *European Polymer Journal*, v. 36, p. 435-442, 2000.

YOSHIE, N.; NAKASATO, K.; FUJIWARA, M.; KASUYA, K.; ABE, H.; DOI, Y.; INOUE, Y. Effect of low molecular weight additives on enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate). *Polymer*, v. 41, p. 3227-3234, 2000.

YOUNG, S.; WONG, M.; TABATA, Y.; MIKOS, A.G. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of controlled release*, v. 109, p. 256-274, 2005.

YU, L.; DEAN, K.; LI, L. Polymer blends and composites from renewable resources. *Progress in Polymer Science*, v. 31, p. 576-602, 2006.

ZANETTI-RAMOS, B.; SOLDI, M.; SOLDI, V.; LEMOS-SENNA, E. The effect of polyethylene glycol on particle morphology and carbamazepine release profiles of sustained-release microspheres prepared from cellulose acetate butyrate. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 25, n. 2, p. 177-183, 2006.

ZHANG, J.X.; LI, X.J.; QIU, L.Y.; LI, X.H.; YAN, M.Q.; JIN, Y.; ZHU, K.J. Indomethacin-loaded polymeric nanocarriers based on amphiphilic polyphosphazenes with poly (*N*-isopropylacrylamide) and ethyl tryptophan as side groups: Preparation, in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*, v. 116, p. 322-329, 2006.

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