

**FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZES DE
POLIHIDROXIBUTIRATO PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
FÁRMACOS**

HELENA MARIA ERBETTA LEITE

"Tese apresentada ao Laboratório de Materiais Avançados do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciências dos Materiais."

Orientador: Prof. Dr. Rúben Sánchez Rodriguez

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

ABRIL – 2004

FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZES DE POLIHIDROXIBUTIRATO PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

HELENA MARIA ERBETTA LEITE

"Tese apresentada ao Laboratório de Materiais Avançados do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciências dos Materiais."

Aprovada em 12 de abril de 2004.

Comissão Examinadora:

Prof. Raúl Ernesto Lopes Palácio (Doutor, Materiais e Processamento)- UNICAMP

Dr^a Teresa Eligio Castillo (Doutora, Engenharia e Ciência dos Materiais) - UENF

Prof^a. Regina Coeli Martins Paes Aquino (Doutora, Engenharia e Ciência dos Materiais) - CEFET

Prof. Dr. Rubén Sánchez Rodriguez (Dout Ciências Químicas) - UENForientador

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha existência e por me dar a força para superar os obstáculos.

A Nossa Senhora e São José por seu amor e força nas horas mais desesperantes.

Ao professor Rubén Sánchez pela sua orientação na elaboração deste trabalho. E por sua confiança na minha capacidade.

A minha família por sua confiança, amor, estímulo e paciência dispensados no decorrer da elaboração deste trabalho.

A Felipe Leite por seu apoio e carinho incondicionais.

As Fernandas, Valentim e Estofel, pela ajuda e apoio moral.

Ao professor Flávio Miguens e a técnica Bia que auxiliaram na obtenção das micrografias apresentadas neste trabalho.

Aos meus colegas de pós-graduação: Rosemberg, Marcílio, Sidnei, e Rodolfo pelo apoio e estímulo.

A todos do LAMAV, em especial a Djalma, Michele, Teresa, Raul, Shirlene, Rosimara, Marcelo e Juliana.

Ao professor Frederico Straggiotti pela sua colaboração e interesse neste trabalho.

Aos professores Cristina e Sérgio do LCQUI pela disponibilização do Espectrofotômetro UV para obtenção dos perfis de liberação.

Ao Adail por sua paciência.

A Rosane pelas análises de Raio-X.

A CAPES pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

1- Introdução	1
2- Objetivo e justificativa de tese	3
2.1- Objetivo Geral	3
2.2- Objetivos específicos	3
2.3- Justificativa	3
3- Revisão Bibliográfica	5
3.1- Requerimentos para o emprego de um material polimérico como matriz	5
3.2- Liberação controlada de agentes ativos	5
3.2.1- Sistemas Reservatórios	7
3.2.2- Sistemas de matriz	10
3.2.3- Sistemas transportadores	14
3.2.4- Fatores que influenciam no transporte	15
3.3- Técnicas de microencapsulamento	16
3.3.1- Efeito das variáveis de processamento	19
3.4- Métodos de determinação da taxa de liberação <i>in vitro</i> :	20
3.5- Polímeros biodegradáveis e sistemas de liberação controlada	21
3.5.1- Características dos Polihidroxialcanoatos	22
3.5.2- Biodegradabilidade	23
3.5.3- Biocompatibilidade	23
3.6- Rotas de administração	25
3.7- Comportamento Térmico dos sistemas de liberação controlada	30
3.8- Aplicações das microcápsulas como sistemas de liberação controlada	31
3.9- Potencialidade dos PHAs como matrizes na liberação controlada de agentes ativos	34
3.10- A progesterona	43
4- Materiais e métodos	44
4.1- Especificação dos reagentes	44
4.2- Especificação dos equipamentos	44
4.3- Preparação das microcápsulas de poliestireno e PHB	45
4.4- Estudo da distribuição de tamanho de micropartículas de poliestireno	48
4.5- Determinação do Peso Molecular do PHB	48
4.6- Medida da cristalinidade das formulações PHB/Prog	49

4.7- Estudo da morfologia e distribuição da carga ativa na matriz	50
4.8- Estudo da incorporação da carga ativa	50
4.9- Estudo do perfil de liberação controlada	50
5- Resultados	52
5.1- Ajuste dos parâmetros do "Spray Drying"	52
5.2- Formulação das microcápsulas de PHB/Progesterona	55
5.2.1- Peso Molecular da matriz portadora (PHB)	55
5.2.2-Cristalinidade da matriz	56
5.2.3-Morfologia externa das microcápsulas de PHB/Prog	57
5.2.3-Morfologia interna das microcápsulas de PHB/Prog	62
5.2.4- Carga efetiva contida nas microcápsulas de PHB/Prog	64
5.2.5- Perfil de liberação associado ao sistema PHB/Prog	64
6- Conclusões	69
7- Referências Bibliográficas	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Comparação entre os modelos de cinética de liberação convencionais (primeira ordem) e formulações de liberação controlada (Smith e Herbig, 1992).	7
Figura 2: Esquema ilustrativo de um sistema reservatório.	8
Figura 3: Esquema ilustrativo de um sistema de matriz.	11
Figura 4: Diagrama do processo de microencapsulação.	19
Figura 5: Esquema da passagem do polisorbato-80 livre (A) e encapsulado (B) através de uma membrana biológica, Alyautdin et al (1995).	34
Figura 6: Taxa de liberação <i>in vitro</i> do sulfametizol por microcápsulas de PHB com diferentes diâmetros: ● 1180-2000 μ m, ■ 425-600 μ m e ▲ 53-150 μ m, obtidos por Brophy e Deasy (1986).	36
Figura 7: Perfis de liberação <i>in vitro</i> de prednisolona a partir de partículas de PHB, em diferentes proporções droga/polímero: (■) 1:1, (□) 1:2, (●) 1:4, (○) 1:6 e (▲) 1:8, (Koosha et al., 1989).	37
Figura 8: Fração de progesterona liberada em função do tempo para estudos <i>in vitro</i> : (○) PHB, (Δ) P(HB-9HV) e (□) P(HB-24HV), Gangrade e Pricet, (1991).	39
Figura 9: Perfil de liberação de progesterona a partir de microcápsulas de P(HB-24HV) contendo diferentes carregamentos da droga: (○) 2%, (Δ) 5%, (□) 7%, (∇) 10%, (◇) 15% e (■) droga pura.	39
Figura 10: Liberação de dicloro-fluoresceína a partir de microcápsulas de PHB com diferentes carregamentos, polímero/droga : (○)1:1, (●) 1,5:1, (□) 2:1, (■) 3:1, (Gürsel e Hasirci; 1995).	41
Figura 11: Liberação de dicloro-fluoresceína a partir de microcápsulas de P(HB-7HV) com diferentes carregamentos, polímero/droga: (○)1:1, (●) 1,5:1, (□) 2:1, (■) 3:1, (Gürsel e Hasirci; 1995).	41
Figura 12: Liberação de dicloro-fluoresceína a partir de microcápsulas de P(HB-14HV) com diferentes carregamentos, polímero/droga: (○)1:1, (●) 1,5:1, (□) 2:1, (■) 3:1, (Gürsel e Hasirci; 1995).	42
Figura 13: Esquema do princípio funcional de um "Spray Drying", modelo BÜCHI B-191.	47
Figura 14: Esquema do princípio funcional da produção do fluxo de um "Spray Drying", modelo BÜCHI B-191.	47
Figura 15: Esquema ilustrativo do sistema utilizado para a liberação controlada da	

carga ativa	51
Figura 16: (a) Histogramas da distribuição de diâmetro das partículas de PS e (b) micrografias obtidas por microscopia óptica, com aumento de 80x.	53
Figura 17: (a) Histograma da distribuição de diâmetro das partículas de PS e (b) micrografia obtida por microscopia óptica, com aumento de 80x.	54
Figura 18: Variação da viscosidade reduzida com a concentração da solução de (a) PHB(1) , (b) PHB(2) e (c) PHB(3).	55
Figura 19: Difratoograma de Raio-X das microcápsulas de PHB(1)/Prog.	57
Figura 20: Micrografia (MEV) das microcápsulas de PHB/Prog : (a) PHB(1), 3000 x; (b) PHB(2), 3000 x; (c) PHB(3), 5000x.	58
Figura 21: Fórmulas da (a) Progesterona e (b) da Tionicotinamida.	59
Figura 22: Micrografia (MEV) das microcápsulas de PHB(1)/Prog, (a)3500x e (b)10000x.	60
Figura 23: Micrografia (MEV) das microcápsulas de PHB(1)/Prog, (a)2000x e (b)10000x..	60
Figura 24: Micrografia (MEV) das microcápsulas de PHB(3)/Prog, (a)10000x e (b)30000x.	61
Figura 25: Histogramas da distribuição de diâmetro das microcápsulas de PHB/Progesterona.	61
Figura 26: Micrografia Eletrônica de Transmissão de um corte equatorial para uma das microcápsulas de PHB(1)/Prog, 7000x.	62
Figura 27: Micrografia Eletrônica de Transmissão de cortes transversais das microcápsulas de PHB(2)/Prog, (a) cortes polares e equatorial de microcápsulas com tamanhos diferentes 4400x e (b) corte polar e equatorial 12000x.	63
Figura 28: Micrografia Eletrônica de Transmissão de um corte equatorial das microcápsulas de PHB(3)/Prog, 7000x.	63
Figura 29: Perfil de liberação das microcápsulas de PHB/Prog obtidas por Spray Drying.	64
Figura 30: Correlação linear para liberação de ordem zero para as microcápsulas de PHB/Prog.	66
Figura 31: Correlação linear para liberação $t^{1/2}$ para as microcápsulas de PHB/Prog.	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades de alguns polímeros biodegradáveis (Thies, 1989).	15
Tabela 2: Exemplos de polímeros biodegradáveis e suas estruturas	22
Tabela 3: Sistemas de transporte de drogas via parenteral para aplicação em veterinária (Carter et al., 1988).	26
Tabela 4: Principais vantagens e desvantagens dos sistemas de transporte de drogas (Carter et al., 1988).	27
Tabela 5: Rotas mais prováveis de administração (Carter et al.; 1988) e (Bissery et al., 1984).	28
Tabela 6: Sistemas transportadores que estão sendo investigados na veterinária.	29
Tabela 7: Parâmetros utilizados na obtenção de micropartículas de PS	46
Tabela 8: Distribuição de tamanho das micropartículas de PS obtidas por "Spray Drying".	52
Tabela 9: Parâmetros selecionados para a formulação de microcápsulas de PHB/Progesterona.	54
Tabela 10: Peso Molecular.	56
Tabela 11: Cristalinidade das microcápsulas de PHB/Prog.	57
Tabela 12: Porcentagem da carga ativa total que foi encapsulada e carga.	64
Tabela 13: Coeficiente de regressão linear (R), desvio padrão (S) do ajuste para cinética de liberação de ordem zero efetuados para as microcápsulas de PHB/Prog e taxa de liberação específica da progesterona na matriz (k_{prog}).	67

SÍMBOLOS E ABREVIações

CCT - Centro de Ciência e Tecnologia

CCTA - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias

EPON - Resina epoxi

HV - Hidroxivalerato

IM - Intramuscular

IPT - Instituto de Pesquisas Tecnológicas

IV - Intravenoso

LCQUI - Laboratório de Ciências Químicas

LH - Hormônio luteinizante

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

P(HB-HV) - Polihidroxibutirato-co-valerato

PCL - Policaprolactona

PHAs - Polihidroxialcanoatos

PHB - Polihidroxibutirato

PLA - Ácido Polilático

PM - Peso Molecular

PMMA - Polimetilmetacrilato

Prog - Progesterona

PS - Poliestireno

SC - Subcutâneo

SEPOL - Setor de Polímeros

T_g - Temperatura de transição vítrea

T_m - Temperatura de fusão cristalina

USP - United States Pharmacopeia

UV - Ultravioleta

Δc : diferença de concentração da carga ativa entre os dois lados da membrana.

A: área superficial

C_{∞} : concentração da carga ativa inicialmente carregada na matriz

c_m : concentração da carga ativa na membrana na superfície do sistema.

C_{ms} : concentração de saturação da carga ativa no polímero

C_s : concentração de saturação da carga ativa no sistema

D - Coeficiente de difusividade da carga ativa na membrana

D: coeficiente de difusividade

dc_m/dx - Gradiente de concentração da carga ativa na membrana

dM_t/dt : taxa de liberação em um tempo t

J - Fluxo da carga ativa

K: razão entre a concentração da carga ativa na matriz e no meio de liberação

L: comprimento do cilindro

l: espessura da lamina

M_t : massa acumulativa da liberação da carga pelo tempo.

M_∞ : massa total da carga impregnada na matriz.

r_i : raio interno do cilindro ou esfera

r_o : raio externo do cilindro ou esfera

t: tempo

V: volume do reservatório

RESUMO

O microencapsulamento de agentes ativos em microcápsulas poliméricas apresenta uma série de vantagens tais como a possibilidade de aplicação única, o que reduz o estresse causado durante o tratamento.

Nas últimas décadas tem-se observado um crescente interesse neste tipo de sistema, inclusive na área veterinária estudada. Neste trabalho a carga ativa encapsulada foi a progesterona, um hormônio que atua na sincronização do estro de animais, pesquisa de interesse do laboratório de Melhoramento Genético Animal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da UENF que participa na avaliação *in vivo* das formulações. A matriz polimérica utilizada foi o Polihidroxibutirato (PHB), um poliéster biocompatível e biodegradável, que pode ser obtido através de culturas de diversas bactérias.

As microcápsulas de Polihidroxibutirato/Progesterona foram produzidas a partir de 3 PHBs com diferentes pesos moleculares, através da técnica de Spray Drying. Para definir os parâmetros de processamento foi feito um estudo prévio da influência destes no tamanho de partícula e na faixa de distribuição de diâmetros, utilizando como modelo o Poliestireno.

Realizou-se um estudo da morfologia interna e externa das microcápsulas de PHB/Prog, da sua cristalinidade e do seu perfil e cinética de liberação.

As microcápsulas apresentaram uma superfície pouco rugosa e diâmetro de até cerca de 5 μ m. Os testes *in vitro* indicaram um "burst" inicial seguido de uma liberação mais lenta.

ABSTRACT

Microencapsulation of active agents in polymeric microcapsules presents advantages such as possibility of single application, which reduces stress during treatment.

In the last decades an increasing interest has been observed in this type of system, including at Veterinary practice. In the present work progesterone, hormone that acts in estrus synchronization, has been encapsulated as active charge, in a research of concern of Animal Genetic Improvement Laboratory - CCTA/UENF, that takes part at *in vivo* evaluation of formulations. Polyhydroxybutirate (PHB), a biocompatible and biodegradable polyester that can be obtained through culture of various bacteria, was the polymeric matrix used.

Polyhydroxybutirate/Progesterone microcapsules were produced by Spray Drying technique using 3 PHBs with different molecular weights. In order to define the processing parameters a previous study of their influence in particle size and diameter distribution range was performed using Polystyrene as model.

It was performed a study of PHB/Prog microcapsules internal and external morphology, cristallinity and releasing outline and kinetics.

Microcapsules presented a little rough and diameter of until about 5 μ m. *In vitro* tests had indicated one burst initial followed of a slower release.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

09/2004

Leite, Helena Maria Erbeta

Formulação e caracterização de matrizes de polihidroxibutirato para liberação controlada de fármacos / Helena Maria Erbeta Leite. – Campos dos Goytacazes, 2004.

xiii, 79 f. : il.

Orientador: Rubén Sánchez Rodriguez

Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Materiais Avançados. Campos dos Goytacazes, 2004.

Área de concentração: Polímeros

Bibliografia: f. 70-79

1. Polihidroxibutirato 2. Liberação Controlada 3. Microcápsulas I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Materiais Avançados II. Título

CDD 620.192

1- Introdução

A utilização de matrizes poliméricas termoplásticas que agem como portadoras de cargas ativas apresenta uma série de vantagens, entre elas a modificação de aspectos físicos de certos produtos visando facilitar seu manuseio e uso, controlar o tempo de liberação de uma carga ativa, mascarar o sabor e odor de um produto (Rognoni, 1996)

Nas últimas décadas tem-se observado um considerável interesse no desenvolvimento de microcápsulas e nanocápsulas biodegradáveis a partir de matrizes poliméricas para utilização em sistemas de liberação controlada de agentes ativos. Nestes sistemas a droga pode ser utilizada mais efetivamente e com maior segurança devido a otimização da sua taxa de liberação, que permite um maior tempo efetivo de dosagem e níveis controlados, o que diminui a ocorrência de efeitos colaterais. Essas microcápsulas e nanocápsulas apresentam aplicações em diversos campos, tais como, agricultura, veterinária, na indústria farmacêutica, de cosméticos e na medicina (Soppimath et al., 2001)

No mercado, até o ano 2000, tem-se reportado cerca de 106 fármacos que utilizam a tecnologia de encapsulamento, a tendência é que este número cresça ainda mais (Eligio, 2000). Abre-se então um amplo campo de pesquisa para a formulação de novos sistemas de liberação controlada e no aprimoramento das propriedades dos sistemas já relatados na literatura.

Entre os polímeros utilizados como matrizes, tais como os poliésteres, os polihidroxicanoatos obtidos por bactérias devem ocupar um lugar de destaque no campo médico e veterinário devido a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade (que permite sua possível absorção pelo organismo), propriedades que abrem as portas para que sejam utilizados na indústria médico-farmacêutica.

O polihidroxitirato têm sido produzido através de biossíntese por bactérias, este polímero tem sido avaliado por vários anos e espera condições sócio-econômicas que viabilizem seu potencial para utilização na área de embalagens, mas sua aplicação na área biomédica certamente não será inibida pelo seu custo devido ao alto valor das formulações geradas (Pouton, 2001). No Brasil a PHB Industrial produz de 50 a 60 toneladas anuais de PHB e exporta este produto para o Japão, Estados Unidos e Europa. O custo da produção de PHB no Brasil (significativamente mais baixo que os demais países: US\$5 no Brasil e US\$14 na

Inglaterra) e o maior nível de exigência da legislação ambiental em alguns países desenvolvidos são fatores que animam a PHB Industrial a aumentar sua escala de produção (IPT, 2002).

2- Objetivo e justificativa da tese

2.1- Objetivo Geral

Formulação e caracterização do polihidroxibutirato (P3HB) como matriz portadora na liberação da progesterona como carga ativa e estudo da cinética de liberação.

2.2- Objetivos específicos

- Determinação das condições de trabalho que permitam obter microcápsulas com distribuição de tamanho inferior a 5 μ m.
- Formulação de microcápsulas de PHB/Progesterona pela técnica de "Spray Drying"
- Investigar a distribuição da carga ativa nas microcápsulas e sua correlação com o comportamento cinético
- Estudo do perfil da cinética de liberação *in vitro* da progesterona para sua utilização na regularização do cio de eqüinos.

2.3- Justificativa

Os polihidroxialcanoatos, em particular o PHB obtido através de culturas de diversas bactérias apresentam propriedades de termoplásticos, são biodegradáveis e biocompatíveis, ao contrário de alguns polímeros obtidos sinteticamente a partir de derivados do petróleo. Essas propriedades justificam o interesse na utilização como portador de agentes ativos utilizados na área veterinária e médico-farmacêutica estudadas.

Entre estes agentes ativos encontra-se a progesterona, um hormônio que atua na regularização do cio de animais, pesquisa de interesse do laboratório de Melhoramento Genético Animal do Centro de Ciência e Tecnologia Agropecuárias (CCTA) da UENF que participa na avaliação *in vivo* destas formulações. O desenvolvimento e caracterização, em particular da formulação PHB/Progesterona, tem interesse científico e tecnológico. Do ponto de vista científico pretende-se aprofundar na distribuição da carga ativa neste sistema e nos mecanismos que

regulam a sua liberação. Do ponto de vista tecnológico incorpora-se maior valor ao produto PHB, produzido utilizando-se a sacarose derivada da cana-de-açúcar, pela PHB Industrial em Serrana (SP) e paralelamente potencializa-se a indústria regional, estimulando seu desenvolvimento a partir da diversificação de suas produções tradicionais de açúcar e álcool.

O encapsulamento deste hormônio para uma dosagem controlada, acarreta uma série de vantagens, entre elas, a aplicação única, que leva a diminuição dos efeitos colaterais e do estresse no animal.

3- Revisão Bibliográfica

3.1- Requerimentos para o emprego de um material polimérico como matriz

Nos sistemas de liberação controlada de agentes ativos encapsulados em matrizes poliméricas biodegradáveis devem-se considerar os efeitos do agente ativo e do polímero no paciente. A toxicidade e biocompatibilidade do sistema polimérico são características críticas devido ao mesmo estar diretamente em contato com o meio no qual é injetado, implantado ou inserido. No casos de matriz ou membrana, as propriedades do polímero não devem ser afetadas pela exposição prolongada ao meio biológico. Além disso, os produtos de degradação devem ser atóxicos, não cancerígenos e serem excretados sem uma permanência excessiva que leve ao seu acúmulo nos tecidos (Brunstedt e Anderson, 1992).

Outros requisitos importantes são:

- Capacidade de conter uma dose efetiva do agente ativo
- Estabilidade durante o armazenamento
- Facilidade de administração e de maneira inofensiva
- Possibilidade de ser produzido em uma escala que satisfaça a demanda
- Custo acessível ao mercado (Thies, 1989).

Um outro requerimento é que os polímeros utilizados em microcápsulas não devem apresentar temperaturas de fusão baixas para evitar a aglomeração das microcápsulas durante sua estocagem (devido ao aumento de sua temperatura por atrito entre as mesmas).

3.2- Liberação controlada de agentes ativos

Entre os requisitos que devem apresentar os sistemas poliméricos para sua utilização como matrizes nas formulações para liberação controlada de agentes ativos estão as suas propriedades de transporte.

O transporte de drogas através de matrizes poliméricas não porosas em sistemas de liberação controlada ocorre por um processo de solução-difusão. A carga deve primeiro dissolver-se na matriz e então difundir-se da área de alta

concentração da carga para a área de menor concentração. Este fenômeno pode ser quantificado pela Primeira Lei de Fick - Equação 1 (Smith e Herbig;1992):

$$J = -D \frac{dC_m}{dx} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

- J: fluxo da carga ativa
- D: coeficiente de difusividade da carga ativa na membrana
- dc_m/dx : gradiente de concentração da carga ativa na membrana.

A liberação da carga ativa pelos sistemas de liberação controlada pode seguir uma grande variedade de comportamentos. Contudo, a cinética da liberação da maioria dos sistemas que dependem da difusão em uma matriz não porosa podem ser agrupados em três tipos de perfis de liberação:

- cinético de ordem zero
- cinético $t^{-1/2}$
- cinético de primeira ordem

Em sistemas que exibem cinética de ordem zero a taxa de liberação permanece constante até que quase toda carga tenha sido liberada (o termo ordem zero deriva da cinética de liberação ser independente da quantidade de droga remanescente). A taxa de liberação diminui proporcionalmente a raiz quadrada do tempo em sistemas de liberação controlada com cinética $t^{-1/2}$. A cinética de liberação de primeira ordem ocorre em sistemas onde a taxa de liberação é proporcional a quantidade de droga remanescente no sistema. A liberação de primeira ordem é comum em sistemas convencionais de liberação não controlada assim como em sistemas de liberação controlada e é caracterizada por uma diminuição exponencial da taxa de liberação com o tempo. Na Figura 1 é apresentado um perfil de liberação teórico para cada tipo de sistema.

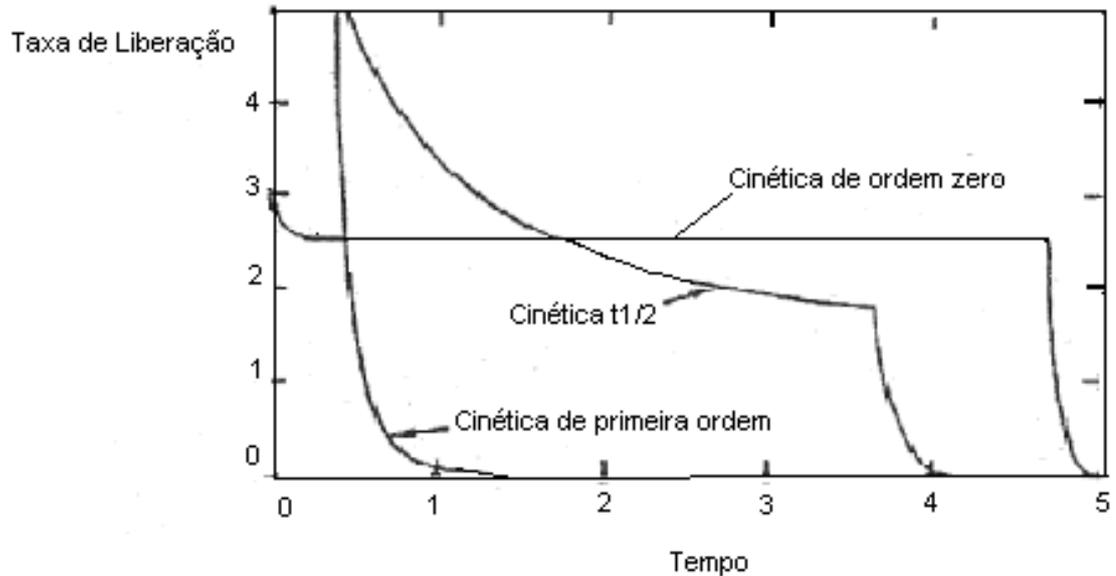


Figura 1: Comparação entre os modelos de cinética de liberação convencionais (primeira ordem) e formulações de liberação controlada (Smith e Herbig, 1992).

A maioria dos sistemas de liberação controlada pode ser incluída em um grupo:

- sistemas reservatórios: a carga ativa se apresenta em um núcleo cercado por uma membrana polimérica;
- sistemas de matriz: a carga ativa encontra-se dissolvida ou dispersada dentro de um polímero;
- sistemas transportadores: a carga ativa está ligada ao polímero (Brunstedt e Anderson; 1992).

3.2.1- Sistemas Reservatórios

A carga ativa no núcleo pode estar no estado líquido ou sólido e a membrana pode ser microporosa ou não porosa. Se a carga ativa é mantida em um estado saturado o seu transporte molecular através da membrana permanecerá constante, pois a força motriz não é alterada. Para que esta taxa de liberação constante (ordem zero) ocorra a carga ativa deve permanecer no estado sólido ou em suspensão. Se a droga apresentar elevada solubilidade em água, será difícil manter o estado saturado e até mesmo se todos os requerimentos para uma taxa de liberação de

ordem zero forem mantidos, a liberação geralmente não se manterá constante nas etapas iniciais e finais. Na Figura 2 é apresentado um esquema ilustrativo deste tipo de sistema.

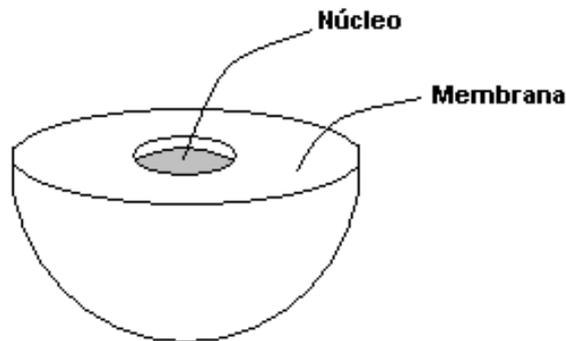


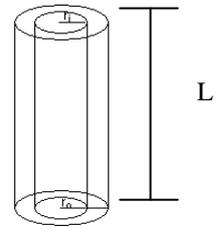
Figura 2: Esquema ilustrativo de um sistema reservatório.

Quando o sistema de liberação controlada é colocado em um meio de liberação, é necessário um certo tempo para que uma taxa de liberação constante seja alcançada, podendo ocorrer um tempo de retardo ("lag") ou uma liberação muito pronunciada inicialmente ("burst"). Se a membrana está carregada com uma pequena quantidade da carga ativa, será necessário um período de indução para que a sua liberação ocorra, por outro lado, se as moléculas de carga ativa se acumularam na membrana como resultado da fabricação ou estocagem, a taxa de liberação inicial será mais elevada do que a do período constante. (Leong e Langer; 1987).

As equações que descrevem a cinética de liberação dos denominados sistemas reservatórios podem ser derivadas da Primeira Lei de Fick, adicionando-se fatores que descrevam a geometria do sistema. As equações 2-4 descrevem a taxa de liberação para sistemas reservatórios de geometrias diferentes (Smith e Herbig; 1992):

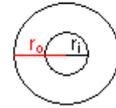
Cilindros:
$$\frac{dM_t}{dt} = 2\pi LDK \frac{\Delta c}{\ln\left(\frac{r_o}{r_i}\right)}$$

Equação (2)



Esferas:
$$\frac{dM_t}{dt} = 4\pi DK \Delta c \frac{r_o r_i}{r_o - r_i}$$

Equação (3)



Laminas:
$$\frac{dM_t}{dt} = ADK \frac{\Delta c}{l}$$

Equação (4)



Onde:

- M_t : massa da carga ativa liberada em um tempo t
- dM_t/dt : taxa de liberação em um tempo t
- L : comprimento do cilindro
- r_o : raio externo do cilindro ou esfera
- r_i : raio interno do cilindro ou esfera
- l : espessura da lamina
- A : área superficial
- K : razão entre a concentração da carga ativa na matriz e no meio de liberação
- Δc : diferença de concentração da carga ativa entre os dois lados da membrana.

O tempo "lag" e o efeito "burst" dependem da distribuição e difusividade da carga ativa na membrana e da espessura da membrana. As equações abaixo (5 e 6) descrevem a porção da curva de liberação referente a estes fenômenos, para um sistema de lamina.

$$\text{Tempo lag: } M_t = \frac{Dc_m}{l} \left(t - \frac{l^2}{6D} \right) \quad \text{Equação (5)}$$

$$\text{Efeito burst: } M_t = \frac{Dc_m}{l} \left(t + \frac{l^2}{3D} \right) \quad \text{Equação (6)}$$

Onde:

- M_t : quantidade de carga ativa liberada
- c_m : concentração da carga ativa na membrana na superfície do sistema.

No final do período de liberação a concentração da carga ativa no núcleo terá alcançado um valor inferior ao de saturação e a taxa de liberação diminuirá. A medida que a concentração da carga ativa no núcleo diminui, o gradiente de concentração através da membrana diminui e uma cinética de liberação de primeira ordem é observada, podendo ser expressada pela Equação 7, para laminas.

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{c_s ADK}{l} \exp\left(\frac{-ADKt}{Vl}\right) \quad \text{Equação (7)}$$

Onde:

- C_s : concentração de saturação da carga ativa no sistema
- t : tempo
- V : volume do reservatório (Baker e Lonsdale; 1974).

Na prática, a liberação da carga ativa pode ser mais complicada devido a uma possibilidade de quebra simultânea da matriz, dissolução parcial da matriz por substâncias do meio, porções das drogas em diferentes formas e a liberação da droga situada na superfície sendo mais rápida do que a liberação da droga dentro da matriz. Estas complicações não foram consideradas na análise teórica anterior (Higuchi, 1963) e devem ser objeto de discussão para cada sistema em particular.

3.2.2- Sistemas de matriz

É o mais simples e largamente utilizado. A liberação da droga é freqüentemente proporcional ao quadrado do tempo de liberação. A carga ativa pode permear através da matriz polimérica ou difundir-se através de canais criados pela sua dissolução. A liberação de macromoléculas que apresentam baixa permeabilidade ocorre geralmente por estes poros, e neste caso não se aplica a Equação 1 apresentada no item 3.2. Uma vez que a extensão e tamanho dos poros e canais criados na matriz são determinados pela carga ativa incorporada, o nível de carregamento e o tamanho da partícula da carga ativa têm uma grande influência na cinética de liberação. Na Figura 3 é apresentado um esquema ilustrativo deste tipo de sistema.

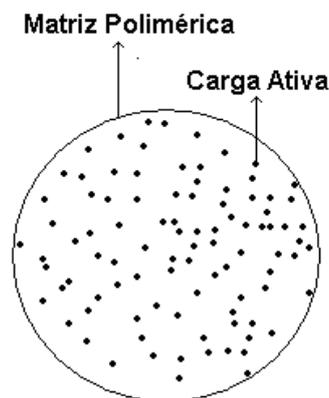


Figura 3: Esquema ilustrativo de um sistema de matriz.

Em adição ao nível de carregamento e tamanho das partículas da carga ativa, a solubilidade desta no polímero e sua difusividade na fase polimérica também são parâmetros importantes. Outro fator crítico é a forma do sistema, que determina a área superficial e a extensão do caminho de difusão (Leong e Langer; 1987).

A taxa de liberação dos denominados sistemas matrizes diminuem com o tempo. Isto ocorre devido ao caminho de difusão aumentar com o tempo, uma vez que a carga ativa próxima à superfície é liberada primeiro, a localizada no interior necessita difundir-se mais rapidamente para ser liberada a uma mesma taxa. A cinética de liberação destes sistemas não sofre alterações significativas devido a

defeitos na matriz polimérica, ao contrário dos sistemas reservatórios, onde defeitos na membrana podem alterar drasticamente a cinética de liberação.

Têm-se três tipos de matriz:

- Matrizes onde toda a carga ativa está dissolvida no polímero
- Matriz que apresentam pequenas quantidades da carga ativa dispersa no polímero e são liberadas por difusão através deste
- Matrizes nas quais grandes quantidades da carga ativa estão dispersas no polímero e são liberadas principalmente por difusão através dos poros que são formados à medida que a carga ativa é liberada.

As cargas ativas líquidas estão geralmente dissolvidas na matriz polimérica, enquanto cargas ativas sólidas estão dispersas na mesma (Smith e Herbig; 1992).

A cinética de liberação de matrizes contendo uma carga dissolvida caí dentro de dois regimes. A liberação dos primeiros 60% de carga segue a cinética $t^{-1/2}$, enquanto a liberação dos últimos 60% de carga segue a cinética de primeira ordem. (A porção sobreposta é descrita adequadamente por ambos regimes) As equações (8-13) que descrevem a cinética de liberação para sistemas de diferentes geometrias são (Smith e Herbig; 1992):

→ Cilindros:

$$\text{Para: } \frac{M_t}{M_\infty} < 0.6: \quad \frac{dM_t}{dt} = 3M_\infty \left(\frac{D}{r^2 \pi t} \right)^{\frac{1}{2}} - \frac{M_\infty D}{r^2} \quad \text{Equação (8)}$$

$$\text{Para: } \frac{M_t}{M_\infty} > 0.4: \quad \frac{dM_t}{dt} = \frac{4M_\infty D}{r^2} \exp\left(-\frac{(2.405)^2 Dt}{r^2}\right) \quad \text{Equação (9)}$$

→ Esferas:

$$\text{Para: } \frac{M_t}{M_\infty} < 0.6: \quad \frac{dM_t}{dt} = 3M_\infty \left(\frac{D}{r^2 \pi t} \right)^{\frac{1}{2}} - \frac{3M_\infty D}{r^2} \quad \text{Equação (10)}$$

$$\text{Para: } \frac{M_t}{M_\infty} > 0.4: \quad \frac{dM_t}{dt} = \frac{6M_\infty D}{r^2} \exp\left(-\frac{\pi^2 Dt}{r^2}\right) \quad \text{Equação (11)}$$

→ Laminas:

$$\text{Para: } \frac{M_t}{M_\infty} < 0.6: \quad \frac{dM_t}{dt} = 2M_\infty \left(\frac{D}{l^2 \pi t}\right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Equação (12)}$$

$$\text{Para: } \frac{M_t}{M_\infty} > 0.4: \quad \frac{dM_t}{dt} = \frac{8DM_\infty}{l^2} \exp\left(-\frac{\pi^2 Dt}{l^2}\right) \quad \text{Equação (13)}$$

Onde:

- M_t : massa acumulativa da liberação da carga pelo tempo.
- D : coeficiente de difusividade
- M_∞ : massa total da carga impregnada na matriz.
- dM_t/dt : taxa de liberação da carga de um sistema.
- t : tempo.

Matrizes contendo a carga ativa dispersa no polímero (menos que cerca de 20%v) exibem cinética de liberação $t^{1/2}$ para quase todo o processo de liberação, assumindo-se que a maioria da carga ativa está dispersa e não dissolvida.

As equações (14-16) que descrevem a cinética de liberação destes sistemas, contendo a carga ativa dispersada na matriz são apresentadas abaixo:

→ Cilindros:

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{4M_\infty DC_{ms}}{r^2 C_\infty \ln(1 - M_t / M_\infty)} \quad \text{Equação (14)}$$

→ Esferas:

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{3M_\infty DC_{ms}}{r^2 C_\infty} \left(\frac{(1 - M_t / M_\infty)^{1/3}}{1 - (1 - M_t / M_\infty)^{1/3}} \right) \quad \text{Equação (15)}$$

→ Laminas:

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{A}{2} \left(\frac{DC_{ms}(2C_\infty - C_{ms})}{t} \right)^{1/2} \quad \text{Equação (16)}$$

Onde:

- C_{ms} : concentração de saturação da carga ativa no polímero
- C_∞ : concentração da carga ativa inicialmente carregada na matriz (Smith e Herbig; 1992)

De um modo geral, a taxa inicial de liberação de sistemas de matriz com geometria cilíndrica e esférica é mais rápida do que em um sistema de geometria laminar.

3.2.3- Sistemas transportadores

Estes sistemas não apresentam cinética de liberação de ordem zero. Os sistemas carga ativa solúvel/polímero ligados quimicamente apresentam uma maior ação farmacêutica quando comparada com a carga ativa livre. Este fato se deve ao transporte restrito do sistema através de barreiras entre compartimentos do corpo, a degradação lenta da ligação entre polímero e carga ativa ou pela redução da excreção da carga ativa ligada ao polímero.

Existem vários modos de incorporar uma carga ativa num transportador polimérico. A carga ativa deve ser incorporada dentro da cadeia principal de um polímero por homopolimerização ou copolimerização em bloco, de forma alternada ou randômica. A carga ativa deve ser incorporada dentro de um polímero pela reação com grupos reativos localizados nas cadeias laterais ou grupos finais da cadeia polimérica. Uma vez que estes sistemas não são objetivo deste trabalho eles não são discutidos com maior detalhamento.

3.2.4- Fatores que influenciam no transporte:

As duas propriedades do sistema que influenciam no transporte de massa são difusividade e solubilidade da carga na matriz. A difusividade é uma propriedade cinética e descreve a facilidade com a qual as moléculas da carga ativa movem-se dentro da matriz. A solubilidade é uma propriedade do sistema em equilíbrio e descreve a interação ou compatibilidade entre a carga ativa e a matriz. Logo, o entendimento dos fatores que influenciam estas propriedades são importantes no desenvolvimento dos sistemas de liberação controlada.

Os fatores principais que influenciam na difusividade da carga ativa nos sistemas poliméricos são tamanho e forma das moléculas da carga ativa, a flexibilidade das cadeias poliméricas e a cristalinidade do polímero. A medida que o peso molecular do soluto aumenta ocorre geralmente uma diminuição da difusividade do agente ativo, embora outros fatores também influam na difusividade.

A flexibilidade das cadeias poliméricas é primariamente dependente da temperatura, plastificação e da quantidade de entrecruzamentos entre as cadeias poliméricas. Os polímeros podem se apresentar em dois estados: vítreo e borrachoso, e podem passar de um estado para outro por mudança de temperatura ou concentração de plastificante. No estado borrachoso os segmentos do "esqueleto" do polímero podem mover-se livremente, permitindo uma maior flexibilidade da cadeia polimérica, logo neste estado o polímero apresenta maior difusividade.

Na Tabela 1 são apresentadas as temperaturas de transição vítrea (T_g) e de fusão (T_m) de alguns polímeros biodegradáveis utilizados como matrizes portadoras de agentes ativos.

Tabela 1: Propriedades de alguns polímeros biodegradáveis (Thies, 1989).

Polímero	T_g (°C)	T_m(°)
Polilático	57	—
Poliglicólico	36	224-226
Poli(ϵ -caprolactona)	-60 -70	58-63
Polibis[(p-carboxifenoxi propano anidrido)]	92	230
Poli(β -hidroxibutirato)	2	176-180

O entrecruzamento reduz a flexibilidade das cadeias poliméricas, diminuindo proporcionalmente a difusividade. A medida em que se aumenta o grau de entrecruzamento diminui o comprimento das cadeias.

Polímeros cristalinos e semicristalinos possuem pequenos cristalitos, os quais diminuem a difusividade. Estes cristalitos consistem de regiões onde as cadeias poliméricas estão densamente empacotadas em uma configuração ordenada e orientada. A difusividade nos cristalitos é nula (efeito barreira) e essencialmente toda difusão em polímeros semicristalinos ocorre nas regiões amorfas. Portanto, a difusividade diminui com o aumento do grau de cristalinidade.

A morfologia das microcápsulas depende da técnica de preparação das mesmas e também influi na liberação da carga ativa.

A solubilidade depende da extensão da ligação de hidrogênio, polaridade e forças de dispersão apolares. Solutos são mais solúveis em polímeros que tenham funcionalidade química similar a estes. A solubilidade diminui proporcionalmente ao aumento de cristalinidade do polímero (Smith e Herbig; 1992).

3.3- Técnicas de microencapsulamento

Várias técnicas de microencapsulamento são descritas na literatura. A maioria delas, tais como separação de fase orgânica, secagem a jato "spray drying", evaporação de solvente, são baseadas no uso de solventes orgânicos para a preparação das microcápsulas (Breitenbach et al., 2000).

Em geral as técnicas de obtenção de microcápsulas podem ser divididas nas seguintes categorias (Finch, 1985):

- A partir de uma suspensão líquida
- Separação de soluções aquosas (incluindo coacervação)
- Formação a partir de dois polímeros incompatíveis
- Polimerização interfacial
- Polimerização *in situ*
- Secagem de um líquido
- Evaporação do solvente de uma emulsão
- Desolvatação

- A partir de uma suspensão de vapor
 - Spray Drying
 - Leito fluidizado
 - Revestimento a vácuo
 - Deposição eletrostática

- A partir de monômeros
 - Poliadição (em suspensão, emulsão e dispersão)
 - Policondensação (em suspensão, emulsão e dispersão)

- A partir de materiais poliméricos
 - Solidificação de um líquido por resfriamento
 - Secagem de um líquido
 - Coacervação com separação de fase
 - Precipitação do polímero
 - Solidificação do polímero fundido

O "Spray Drying" é a técnica mais utilizada nas indústrias química (plásticos, pesticidas, cerâmicos, fertilizantes e pigmentos), alimentação (leite em pó) e farmacêutica (extratos de plantas, materiais naturais e excipientes). O objetivo desta técnica é obter um produto seco, mais concentrado e de fácil conservação ou de manuseio do que os processos de extração de soluções. Pode-se assumir que a secagem quase instantânea do produto evitará ao máximo sua hidrólise, oxidação e sua decomposição (Moura et al., 1996).

A preparação de microcápsulas por "Spray Drying" oferece uma série de vantagens: menor dependência da solubilidade do agente ativo do que os métodos de evaporação do solvente, as condições de processamento são mais suaves e adequadas para a formulação de micropartículas carregadas com proteínas e peptídeos, é um processo contínuo de fácil alimentação e de maneira gradual (Clarke et al., 1998)

Na técnica de "Spray Drying" um líquido na forma de spray é secado e coletado, sendo o resíduo o produto final. A técnica de "Spray Drying" é utilizada em várias indústrias, tais como na indústria de alimentos e farmacêutica na produção de materiais plásticos e cerâmicos. Ela é adequada para materiais que sejam sensíveis

ao calor, devido ao processo de secagem ser rápido o material não precisa ser submetido a altas temperaturas para concluir a secagem dentro de um tempo razoável.

O processo de "Spray Drying" pode ser dividido em três etapas:

- Atomização do líquido por um redemoinho, pressão ou atomizador pneumático e entrada deste em uma câmara de secagem.
- Secagem das gotas do spray por um fluxo de gases aquecidos, produzindo um resíduo na forma de pó.
- Remoção do pó do meio de secagem, usualmente por meio de um separador ciclone (Crowe, 1980).

Na Figura 4 é apresentado um diagrama esquemático do processo de encapsulação da droga ativa na matriz polimérica. Uma emulsão (D) é produzida a partir de uma solução do material polimérico (A), um agente ativo (B) e um líquido não miscível (C). A emulsão é homogeneizada e forma-se um spray (E) em um aparelho. Com a evaporação do solvente ocorre a formação de uma superfície sólida em volta de um núcleo líquido (F). O aprisionamento do solvente restante neste núcleo gera uma pressão dentro do mesmo à medida que ocorre a evaporação do solvente ocasionando o rompimento da casca sólida (G), criando uma pequena abertura através da qual os vapores do solvente são liberados. Como resultado são obtidas pequenas cápsulas do material polimérico contendo o agente ativo disperso nas mesmas.

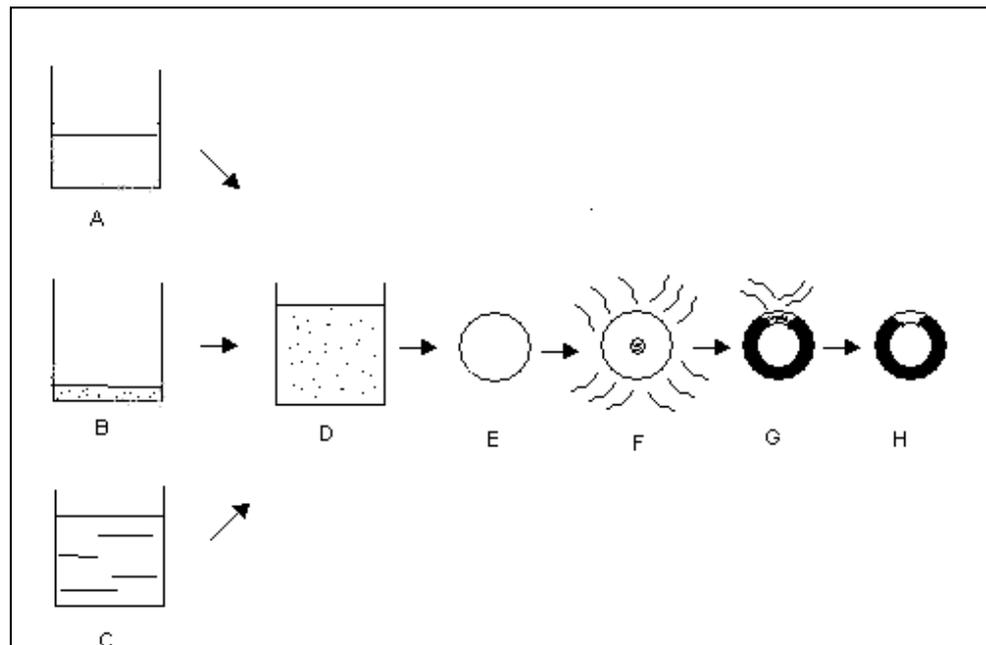


Figura 4: Diagrama do processo de microencapsulação.

3.3.1- Efeito das variáveis de processamento

O tamanho das partículas obtidas por "Spray Drying" depende de pelo menos quatro fatores:

- Método de atomização

O tamanho das gotículas formadas, constituintes do spray, dependerá do bico atomizador utilizado na formação do mesmo. Gotículas menores resultarão em partículas menores após a secagem.

- Propriedades do próprio material

O tamanho das partículas dependerá da densidade do material, se ele é amorfo ou cristalino, granular, etc.

- Sólidos contidos na solução

O tamanho da partícula seca pode ser maior ou menor do que a gotícula inicial gerado no atomizador, dependendo da densidade final da partícula, que dependerá dos sólidos contidos na solução (Duffie e Marshall, 1953).

- Condições de secagem

A secagem de gotículas contendo sólidos em solução ou suspensão é controlada pela taxa de aquecimento e transferência de massa. Este processo pode

ser um pouco mais complicado por variações de temperatura ao longo do sistema de secagem (Crosby e Marshall, 1958).

3.4- Métodos de determinação da taxa de liberação *in vitro*:

Dentre os métodos reportados na literatura utilizados no estudo da taxa de liberação de agentes ativos *in vitro* tem-se:

- difusão em saco de diálise
- difusão reversa em saco de diálise
- difusão em células com membranas biológicas
- ultracentrifugação
- ultrafiltração
- ultrafiltração centrifugal (Soppimath et al., 2001)

A maioria das técnicas apresentam dificuldades na separação das micro/nanocápsulas do meio de liberação, consumindo um tempo maior na separação destes. Para evitar este problema têm sido utilizadas as técnicas de diálise. Nesta técnica uma suspensão das micro/nanocápsulas é adicionada a sacos ou tubos de diálise seletivos, que não deixem que as micro e/ou nanopartículas passem. Estes sacos são incubados no meio de dissolução (LeRay et al.; 1994).

Uma outra técnica envolve a utilização de uma célula de difusão, que consiste de dois compartimentos, um doador e outro receptor. Esta técnica foi usada para separação através de membranas biológicas ou artificiais. Neste método o estudo da cinética não é efetuado com perfeitas condições de penetração, uma vez que as partículas não são diluídas no meio de dissolução, mas são separadas do meio de liberação através de membranas. Deste modo, a quantidade do agente ativo no meio de liberação não reflete a quantidade do agente ativo realmente liberado. (Cavallaro et al.; 1994).

Leavy e Benita (1990) utilizaram uma técnica de diálise reversa para uma emulsão óleo/água, evitando a delimitação das partículas em um saco de diálise. Esta técnica também foi utilizada por Calvo et al. (1996) na avaliação da liberação a partir de nanocápsulas, nanopartículas e nanoemulsões. Uma desvantagem deste método é que ele não é muito sensível no estudo de formulações de rápida

liberação, podendo apenas ser utilizado em sistemas com tempos de liberação da carga ativa de no mínimo 1h (Jalil e Nixon, 1990).

3.5- Polímeros biodegradáveis e sistemas de liberação controlada

Uma das principais características da tecnologia de liberação controlada é a função de suporte que os polímeros desempenham na liberação das drogas e a fabricação dos sistemas de liberação de droga. A necessidade de polímeros com propriedades físicas e biológicas específicas têm gerado um interesse contínuo na síntese de novos polímeros tanto no meio acadêmico como no meio comercial (Pouton, 2001).

Pressões econômicas e o progresso tecnológico têm sido os principais fatores no desenvolvimento de novos e melhorados sistemas de liberação controlada, tais como os polímeros biodegradáveis apresentados na Tabela 2 (Arnold, 1988).

Os polihidroxibutiratos (PHB) e polihidroxibutirato-valerato P(HB-HV) surgiram recentemente como possíveis agentes para liberação de drogas. O PHB tem uma taxa de degradação hidrolítica *in vivo* relativamente baixa se comparada com a dos polilactídeos e polímeros com maior grau de valerato degradam mais extensivamente (Conway, 1997).

As classes de drogas para as quais sistemas de liberação controlada tem larga aplicação na saúde animal incluem agentes anti-histamínicos, antimicrobianos, inseticidas, agentes anti-inflamatórios não esteroidais e hormônios. Os produtos de liberação controlada tem diminuído consideravelmente a inconveniência e o custo, assim como o desconforto causado no animal pela repetitiva administração de drogas. Além de minimizar a flutuação da concentração da droga no organismo, a dosagem requerida e efeitos colaterais, obtendo um efeito terapêutico mais efetivo (Baggot, 1988).

Outra vantagem destes sistemas é a estabilização da carga ativa alcançando um tempo maior de validade da mesma sobre condições normais de estocagem antes de seu uso. As drogas podem ser protegidas do calor, luz, oxidação, umidade, substâncias reativas, estresse mecânico, ou a combinação destes fatores (Arnold, 1988).

Na Tabela 2 são apresentados alguns exemplos de polímeros biodegradáveis e suas estruturas.

Tabela 2: Exemplos de polímeros biodegradáveis e suas estruturas

Polímero	Estrutura
Poliláctico	
Poliglicólico	
Poli(ε-caprolactona)	
Polibis[(p-carboxifenoxi propano anidrido)]	
Poli(β-hidroxibutirato)	
3,9-Bis(metil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5,5]undecano)/1.6-hexadiolpoli(ortoéster)	

3.5.1- Características dos Polihidroxicanoatos

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres biodegradáveis que são produzidos por muitas bactérias como materiais para estoque de energia. Este método de obtenção implica em várias vantagens para aplicações biomédicas, uma vez que a biossíntese evita o uso de catalisadores e iniciadores químicos que podem gerar problemas toxicológicos se permanecerem no produto farmacêutico. O emprego de enzimas microbianas geralmente resulta em um polímero estereoregular, provavelmente resultando em uma elevada reproducibilidade em suas propriedades físicas (Pouton, 1996)

O PHA mais estudado é o poli(3-hidroxibutirato) que pode ser obtido em grande escala pela fermentação de uma ampla variedade de tipos de bactérias. O PHB é termoplástico, semicristalino (60-80%), isotático. O homopolímero PHB tem ponto de fusão relativamente alto (160-180°C) e cristaliza rapidamente dificultando seu carregamento com a carga ativa. A taxa de degradação depende das propriedades do meio, tais como: pH, temperatura, da composição química e da presença de solventes e de biocatalisadores (Hasirci et al., 2001).

3.5.2- Biodegradabilidade

A ASTM (American Society for Testing and Materials) define biodegradabilidade como a capacidade de uma substância sofrer decomposição em dióxido de carbono, metano, água, compostos inorgânicos ou biomassa no qual o mecanismo predominante é a ação enzimática de microorganismos, que pode ser medida por testes padronizados, em um período específico de tempo.

Os dados disponíveis na literatura para a degradação *in vivo* do PHB e P(HB-HV) são contraditórios, mas isso pode se dever a diferenças nos meios fisiológicos onde estes são implantados. Willians et al., (1994) estudaram a influência do meio na taxa de degradação destes polímeros *in vivo*, incluindo a influência de enzimas, radicais livres, lipídeos e peróxidos. Eles concluíram que a formação de radicais hidroxila através da interação de radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio na presença de ferro, é provavelmente uma das causas principais da degradação polimérica em sistemas implantados. Portanto os exemplos relatados de maior degradação podem ser devido a altos níveis destes radicais no local de implante.

A forma física do polímero é o principal determinante na taxa de degradação (Pouton e Akhtar; 1996)

3.5.3- Biocompatibilidade

O termo biocompatibilidade refere-se a aceitabilidade mútua do polímero e do meio fisiológico que o cerca. A biocompatibilidade pode ser descrita como dois fenômenos complementares: os efeitos do meio fisiológico no polímero e os efeitos do polímero neste meio. O primeiro influenciará a degradação do polímero e o segundo a resposta do tecido ao implante polimérico (Willians; 1986)

Kennedy et al. (1987), realizaram um estudo da biocompatibilidade *in vivo* e *in vitro* do PHB e copolímeros de P(HB-HV). A biocompatibilidade *in vivo* foi estudada através do monitoramento de inflamações em ratos Wistar machos. Os autores administraram injeções intramusculares do polímero (20-40 μ m) nos músculos da coxa dos ratos, uma análise enzimática utilizando fosfatase alcalina e ácida, foi empregada para monitorar inflamações agudas e crônicas, respectivamente. Embora tenha ocorrido como resposta uma inflamação aguda, ela foi atribuída a um trauma mecânico inicial da injeção. Nenhuma inflamação crônica foi detectada pela análise enzimática.

A biocompatibilidade destes polímeros ainda foi estudada pela técnica de cultura de células. Os efeitos dos copolímeros no crescimento de CHO-K1 (ovários de ratos chineses) em culturas de células foi monitorado durante um período de 60h. Os polímeros, usados na forma de filmes, não inibiram o crescimento destas células durante este período, sugerindo uma boa biocompatibilidade (Pouton et al.; 1988).

Um estudo da biocompatibilidade *in vivo* do PHB através da injeção de microesferas (100 μ m) no músculo de ratos também foi efetuado por Juni e Nakano (1987), onde eles obtiveram resultados similares aos encontrados por Kennedy et al. (1987) na inflamação aguda transiente, a qual terminava após 7 dias após injeção.

Doyle e Bonfield (1988), investigaram a utilização de PHB como implantes ósseos na coxa, eles realizaram estudos preliminares em coelhos obtendo uma boa integração entre o PHB e o osso sem nenhuma evidência de inflamação crônica em resposta ao procedimento. Eles reportaram posteriormente que estudos *in vitro* com PHB e compósitos de PHB-Hidroxiapatita sugeriram que este polímero não é citotóxico.

Apesar da inflamação aguda inicial observada em vários estudos *in vivo* para os copolímeros e para o homopolímero, as quais ocorreram provavelmente em resposta a um trauma na implantação ou injeção, eles apresentaram boa biocompatibilidade tanto nos testes *in vitro* como *in vivo*. Espera-se que os produtos solúveis de degradação, geralmente os próprios monômeros, também sejam biocompatíveis, pelos resultados dos experimentos realizados (Pouton, 1988).

3.6- Rotas de administração

Existem diferentes rotas de administração para os sistemas de liberação controlada, cada rota apresenta vantagens e desvantagens. A escolha da rota de administração dependerá, entre outros fatores, da carga ativa, do sítio de ação desta carga e do tamanho do sistema de liberação. Abaixo são apresentados as rotas de administração e as cargas ativas que são aplicadas via estas rotas.

Parenteral: Sistemas de liberação de agentes ativos via parenteral podem ser utilizados para corticoesteróides, estradiol bovino (hormônio de crescimento), para os quais uma taxa constante de dosagem para o peso do corpo é requerida, ou para liberação de uma substância utilizada no controle do nascimento de cães. Sistemas implantáveis podem ser facilmente inseridos sem causar irritações nos tecidos com a persistência de níveis residuais da droga no sítio de administração. Na Tabela 3 são listados sistemas de transporte de drogas via parenteral para aplicação na veterinária e na Tabela 4 suas principais vantagens e desvantagens.

Administração Oral: A limitação mais séria nestes sistemas no uso de liberação controlada de produtos orais é o tempo de residência da dosagem no pequeno intestino. É estimada uma duração de 9 a 12h como tempo médio para absorção efetiva da droga após sua administração, a dosagem não muda no trato gastrointestinal. Isto significa que a droga deve ser administrada em intervalos de 12-24h, dependendo da meia-vida das espécies. Esta técnica é adequada para aplicação de anti-helmínticos em bovinos.

Aplicação Tópica: Sistemas de liberação transdermal contam com o controle da taxa de liberação da droga pelo sistema e/ou pela pele (penetração epidermal) como fatores limitantes da taxa de absorção. Utilizadas como via de aplicação de inseticidas e anti-helmínticos em bovinos ou caprinos têm sido desenvolvidos para prover uma proteção duradoura contra ectoparasitas. Utilizada também na medicina para o uso tópico de pomada de nitroglicerina no tratamento de angina.

Administração Local: implantes oculares biodegradáveis carregados com gentamicina para uso no tratamento de infecções bovinas, agentes antimicrobianos colocados no útero de éguas, no tratamento local de mastites bovina (Baggot, 1988).

Tabela 3: Sistemas de transporte de drogas via parenteral para aplicação em veterinária (Carter et al., 1988).

Tipo	Descrição	Tamanho
Fibras*	Agente ativo está dispersado dentro do material polimérico	μm-mm de espessura: comprimentos de poucos milímetros até várias polegadas
Laminados*	Agente ativo contido entre as camadas poliméricas ou diretamente misturado no polímero	
Tubos*	Agente ativo localizado dentro da cavidade do tubo	
Prodrogas	Precusores para derivados de agentes ativos	Molecular (Å)
Microcápsulas	Membrana polimérica sólida que reveste uma solução, emulsão ou partícula sólida de um agente ativo	De 1μm até 1-2 mm de diâmetro
Microesferas	Matriz polimérica sólida na qual o agente ativo é dispersado	De 1μm até 1-2 mm de diâmetro
Lipossomos	Partículas esféricas em bicamada com o agente ativo na camada aquosa ou na camada lipídica	2-5μm de diâmetro
Eritrócitos fantasmas	Um eritrócito natural o qual tenha sido preenchido com o agente ativo englobado dentro de um núcleo aquoso	Limitado pelo diâmetro das células vermelhas do sangue da espécie natural
Anticorpos monoclonais	Agente ativo ligado a um anticorpo sem interferir com o complexo antígeno-anticorpo	Molecular (Å)

*Implantes

Tabela 4: Principais vantagens e desvantagens dos sistemas de transporte de drogas (Carter et al., 1988).

Sistema de transporte	Vantagens	Desvantagens
Implantes	Manufatura simples, possibilidade de carregamento de uma grande quantidade da droga	Possível rejeição do implante
Prodrogas	Em geral seu desenvolvimento é de baixo custo, larga atividade farmacológica	Identificação de um fator de identificação útil, limitada funcionalidade química do agente ativo
Microcápsulas	Materiais de grande massa molar podem ser encapsuladas satisfatoriamente, polímeros biodegradáveis ou não biodegradáveis podem ser utilizados	Os custos de fabricação podem ser elevados, pode ocorrer dificuldade na liberação controlada de compostos de baixo massa molar que tenham elevada solubilidade em água
Microesferas	Podem ser obtidas a um baixo custo se um processo de encapsulamento correto for utilizado	A liberação controlada de materiais de elevada massa molar pode ser difícil, carregamento de drogas de no máximo 20-30%
Lipossomos	Diversidade de composição fosfolipídica e propriedades físicas	Limitada difusão transmembranar, baixos carregamentos de drogas
Eritrócitos fantasmas	Utilização de materiais naturais e biodegradáveis	Limitada difusão transmembranar, variações na liberação de acordo com as diferentes espécies utilizadas.
Anticorpos monoclonais	Ligação da droga a um sítio ativo específico (alvo).	Difícil identificação do antígeno

Na Tabela 5 são listadas as rotas mais prováveis de administração para cada tipo de sistema de liberação controlada.

Tabela 5: Rotas mais prováveis de administração (Carter et al.; 1988) e (Bissery et al., 1984).

Sistema Transportador	Parenteral*			Oral	Vaginal	Ocular
	IM	SC	IV			
Implantes	X	X			X	X
Prodrogas	X	X	X	X		
Microcápsulas	X	X		X	X	
Microesferas	X	X	X	X	X	
Lipossomos	X		X			X
Eritrócitos fantasmas			X			
Anticorpos Monoclonais			X		X	

*IM= intramuscular, IV= intravenoso, SC=subcutâneo.

Carter et al (1989) relatam que as microcápsulas podem ser administradas intramuscularmente ou subcutâneamente. No entanto se as microcápsulas apresentarem um tamanho inferior a $5\mu\text{m}$, elas podem ser aplicadas intravenosamente em éguas, evitando problemas inflamatórios. Na literatura encontra-se relatado o uso de vários polímeros biodegradáveis e/ou biocompatíveis como matrizes transportadoras de cargas ativas, tais como os polihidroxialcanoatos, polilactídeos, policarbonatos, polianidridos, entre outros (Koosha et al, 1989).

Na Tabela 6 são listados os sistemas transportadores que têm sido estudados e comercializados nas últimas décadas para utilização na veterinária, reportados na literatura.

Tabela 6: Sistemas transportadores que estão sendo investigados na veterinária.

Sistema	Polímero	Carga ativa	Objetivo	Animal
Tubos (Jaffe e Hayes; 1983)	Poli(ϵ -caprolactona)	Metopreno	Controle da artrópodes	Gado
Tubos (Scaletta et al.; 1986)	Silicone	Testosterona, estradiol	Aumento dos níveis de esteroides no sangue	Carneiro
Fibras, Syncro-Mate-B® (Mares; 1978)	Hydron® (hidrogel, HEMA)	Norgesterona	Sincronização do cio	Gado
Fibras (Kent et al., 1980)	Colesterol/PEG/Es tearato de Mg	LHRH análogos	Sincronização do cio	Gado
Fibras (Rankin; 1986)	Silicone	Agente antibacteriano	Prevenção de mastites	Gado
Fibras, Compudose® (Hsieh et al.; 1984)	Silicone	17 β -estradiol	Auxiliar no crescimento	Gado
Fibras, Synovex S®, H® e C® (Cardinal; 1985)	-----	Benzoato estradiol, progesterona, testosterona	Auxiliar no crescimento	Gado
Fibras, Ralgro® (Cardinal, 1985)	-----	Hormônio sintético (Zeranol®)	Auxiliar no crescimento	Gado
Fibras (Dunn et al.; 1985)	Policaprolactona, polietileno e polipropileno	Esteroides	Sincronização do cio	Gado
Comprimidos (Miller et al.; 1981)	Polipropileno	Ivermectinas	Controle de pestes	Animais domésticos
Comprimidos (Jaffe et al.; 1978)	Poli(d,l-ácido lactideo)	Metopreno (Altosid®)	Controle de larvas de insetos	Gado
Comprimidos (Jaffe et al.; 1980)	Vicryl® (lactideo-co-glicolídeo)	Metopreno (Altosid®) AI3-36206	Controle de artrópodes	Gado
Microesferas (Jaffe et al.; 1978)	Poli(d,l-ácido lactideo)	Metopreno	Controle de larvas de inseto	Gado
Microesferas (Gardner et al.; 1983)	Policaprolactona polioliol	MgO, Mg	Tratamento de hipomagnesia	Gado
Microcápsulas (Gardner et al.; 1983)	d,l-polilactideo	MgO, Mg	Tratamento de hipomagnesia	Gado
Microcápsulas (Nebel et al.; 1986)	Alginato de sódio	Espermatozoide bovino	Aumentar as taxas de concepção	Gado
Microcápsulas (Kessler et al.; 1986)	Poli(d,l-lactideo-co-glicolídeo)	GnRH	Controle da ovulação	Éguas/Gado
Eritrócitos fantasmas (DeLoach et al.; 1984)	Células vermelhas naturais do sangue	Metotrexato	Alvo para células Kupffer do fígado	Cães
Prodrogas (Cardinal; 1985)	-----	Ésteres de d-Norgesterol	Contracepção	Cães

® produtos disponíveis comercialmente.

3.7- Comportamento térmico dos sistemas de liberação controlada

O comportamento das matrizes empregadas na liberação controlada de cargas está intimamente relacionado com suas propriedades térmicas e de transporte. Assim o processo utilizado para obter as microcápsulas pode modificar a microestrutura e morfologia do polímero empregado na matriz, considerando o método de preparação e a interação com a carga. Estas modificações poderão refletir-se entre outras coisas também nas propriedades mecânicas, importantes na estocagem das microcápsulas.

Estas transformações terão conseqüências diretas na T_g e na cristalização do polímero. O problema torna-se ainda mais complexo quando uma carga ativa está encapsulada na matriz polimérica. Dependendo da técnica de encapsulamento a droga estará dissolvida ou fisicamente dispersa na matriz. Se a droga encontra-se inicialmente dispersa na matriz e permanece nesta forma, a situação é bastante simples: a carga ativa estará fisicamente suspensa na matriz polimérica. No entanto, se a carga ativa está inicialmente dissolvida poderão ocorrer três coisas:

- a) a carga ativa pode dissolver-se na matriz, levando a uma solução sólida
- b) a carga ativa pode permanecer com suas moléculas dispersas no polímero, com interações fracas entre as moléculas da carga ativa e as cadeias poliméricas, gerando um estado estável
- c) a carga ativa pode cristalizar durante a preparação das microcápsulas (ficando na forma uma dispersão cristalina fisicamente espalhada pela matriz polimérica)

Estes três estados possuem diferenças na estabilidade durante a estocagem e nas características de liberação da carga ativa (Dubernet, 1995).

Em uma solução sólida as moléculas da carga ativa e o polímero desenvolvem fortes interações entre si, levando a plastificação do polímero. Como conseqüência têm-se a diminuição da T_g e a ausência de um pico de fusão referente a carga ativa. No caso b a droga permanece no estado molecular, devido apenas a elevada viscosidade do meio a difusão da carga ativa é inibida, não ocorrendo sua cristalização. Em um caso ideal, as moléculas da carga ativa e as cadeias poliméricas não interagem entre si, conservando-se deste modo as características do polímero (T_g).

A análise térmica é portanto uma poderosa ferramenta na investigação das propriedades térmicas das matrizes poliméricas e da natureza da dispersão da carga

ativa nas microcápsulas. Entretanto, ela também pode ser utilizada na determinação da solubilidade da carga ativa na matriz polimérica. Para realizar este estudo microcápsulas com diferentes quantidades da carga ativa incorporada devem ser preparadas e o seu calor de fusão deve ser medido por DSC. Os valores obtidos são plotados contra a taxa de encapsulamento. A concentração da carga ativa correspondendo ao valor zero do calor de fusão (ausência de cristais) deve corresponder a solubilidade da droga. No entanto, deve ser enfatizado que esta solubilidade é determinada no ponto de fusão da carga ativa, logo este valor pode diferir um pouco na temperatura ambiente (Theeuwes et al., 1974).

O problema da determinação da solubilidade da carga ativa torna-se ainda mais complicado quando a carga ativa funde a uma temperatura superior a temperatura de fusão do polímero. Em tais casos, mede-se a solubilidade da carga ativa no polímero fundido na temperatura de fusão (bem diferente da solubilidade da droga no polímero sólido a temperatura ambiente). Este é o caso de microesferas de P(HB-HV) carregadas com progesterona. O copolímero funde a 124°C, apresentando um largo pico endotérmico. A progesterona funde a 130°C (forma α) ou 121°C (forma β), podendo sobrepor-se ao pico de fusão do polímero. Os polímeros carregados com 5 ou 10% de carga ativa apresentaram estas na forma de cristais, mas nenhum pico de fusão referente a ela foi detectado. Entretanto, para um carregamento de 30%, um pico correspondente a fusão da progesterona pode ser observado. Nesta concentração, a solubilidade da droga no polímero fundido pode ser ultrapassada. Não é possível portanto determinar com precisão a solubilidade da droga no polímero sólido, embora não seja zero no caso de progesterona e P(HB-HV) como estimada pela diminuição da temperatura de fusão do polímero (Gangrade e Price; 1991).

3.8- Aplicações das microcápsulas como sistemas de liberação controlada

Na odontologia

Como o uso de antibióticos pode causar diversos efeitos colaterais (sensibilidade, bactérias resistentes, super-infecções) a administração local de antibióticos têm recebido considerável atenção. Colocando-se a tetraciclina diretamente nas bolsas periodontais evita-se complicações observadas em estudos

prévios. A aplicação local de tetraciclina têm sido realizada utilizando sistemas transportadores, tais como, fitas acrílicas, fibras géis, entre outros. Sistemas de liberação de drogas, utilizando sólidos não degradáveis requerem a remoção clínica do transportador podendo ocorrer uma re-infecção ao final do tratamento. Portanto estudos mais recentes têm focado a administração local da droga utilizando transportadores (ou bases, suportes) biodegradáveis.

Sendil et al (1999) relatam em seu trabalho que é possível construir sistemas de liberação controlada de tetraciclina, utilizando polímeros biodegradáveis, tais como microcápsulas de polihidroxibutirato-co-valerato (PHBV), colocando-as diretamente nas bolsas periodontais, evitando problemas de transporte, metabolismo e distribuição e eliminando a necessidade de remoção.

Na veterinária

A liberação controlada de drogas tem uma ampla faixa de aplicações na terapêutica veterinária e no controle de parasitas nos animais. Devido a variações na fisiologia digestiva das espécies e na taxa de biotransformação de drogas lipídio-solúveis, cada produto deve ser designado especificamente para o tratamento de cada espécie. Em animais que serão consumidos pelo ser humano a frequência de administração da droga e a ausência de retenção desta em tecidos são características imprescindíveis (Baggot, 1988).

A maioria dos produtos nesta área disponível no mercado são para:

- prevenção e controle de doenças pela liberação de antibióticos e agentes anti-parasita
- promoção do crescimento pela administração de anti-helmínticos, bactericidas ou hormônios
- sincronização do cio através de hormônios (progesterona)
- suplementação alimentar utilizando elementos traços
- controle da fertilidade em animais domésticos (Carter et al, 1988).

Indústria de cosméticos

A tecnologia de microencapsulamento pode ser utilizada para preservar compostos voláteis em diversos produtos aumentando sua durabilidade. O produto

preserva por mais tempo seu cheiro e textura pois evita-se o contato dos compostos voláteis com os demais componentes da fórmula. As microcápsulas produzidas com esta finalidade podem ser obtidas pela técnica de Spray Drying (Rê, 2000).

Indústria de alimentos

As microcápsulas apresentam uma importante utilização em comidas congeladas. Neste produto, um corante latente na água é encapsulado e as cápsulas colocadas em uma fita. Esta fita indicadora é aderida em embalagens antes destas serem congeladas. Os envoltórios das microcápsulas quebram quando congeladas mas o corante congelado permanece no envoltório até ser derretido. No derretimento, o corante flui para fora dando uma coloração óbvia que indica o descongelamento do produto.

O encapsulamento de sabores apresentam uma série de vantagens: proteção contra oxidação e evaporação, permite que sabores líquidos sejam apresentados agradavelmente ou com sabor suave, liberando-os somente quando desejados. Esta liberação pode ser feita por mastigação, aquecimento ou dissolução. Alimentos congelados oferecem um largo potencial onde temperos ou sabores, os quais oxidam ou evaporam até mesmo quando congelados, podem ser protegidos até seu aquecimento (Sudekum).

Na medicina

Polímeros biodegradáveis, tais como o ácido polilático (PLA) e o polihidroxibutirato e mais recentemente os policarbonatos têm sido estudados como possíveis materiais para formulações de liberação controlada. Entre as aplicações reportadas para estes polímeros encontram-se o controle de fertilidade, quimioterapia e anestésicos locais. As formulações baseadas nestes polímeros encontram-se principalmente na forma de implantes, micropartículas injetáveis, microesferas e nanopartículas.

Borchardt et al. (1994), estudaram a passagem de polisorbato-80 através de uma membrana biológica (do cérebro) e observaram que sua passagem através desta é mais efetiva quando esta droga está encapsulada em nanopartículas de

polimetilmetacrilato (PMMA) em comparação com a administração da droga livre. Segundo Alyautdin et al (1995), isto pode ser explicado por dois mecanismos:

- ligação das nanopartículas ao revestimento endotelial interno dos capilares cerebrais, deste modo as partículas da droga se comunicam ao cérebro e através de um alto gradiente de concentração, aumenta-se a difusão passiva;
- reconhecimento do endotélio cerebral por fagocitose.

Na Figura 5 é apresentada uma representação esquemática deste fenômeno.

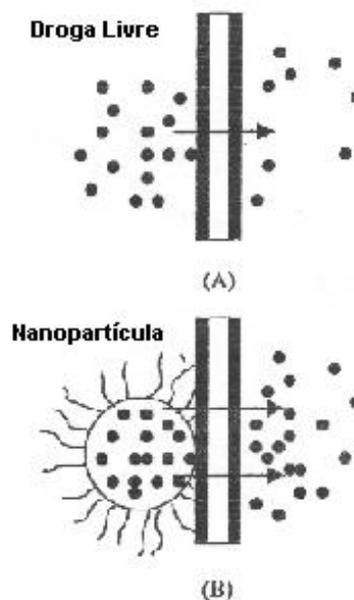


Figura 5: Esquema da passagem do polisorbato-80 livre (A) e encapsulado (B) através de uma membrana biológica, Alyautdin et al (1995).

3.9- Potencialidade dos PHAs como matrizes na liberação controlada de agentes ativos

A potencialidade dos PHAs como matrizes para liberação controlada de agentes ativos tem sido estudada por diversos autores.

Bissery et al. (1984) estudaram a liberação *in vitro* e *in vivo* de lomustine (CCNU), um agente utilizado no combate ao câncer, a partir de microcápsulas de PHB e de PLA. Eles injetaram intravenosamente microesferas marcadas com ^{14}C e observaram que estas se acumulam principalmente nos pulmões, baços e fígados 7 dias após a injeção. As microcápsulas de PHB obtidas por evaporação do solvente apresentaram-se como uma mistura de partículas individuais variando entre 1 e

12 μ m de diâmetro e agregados consistindo de partículas pequenas que não podem ser separadas.

As microcápsulas de PHB apresentam uma taxa de liberação de lomustine mais rápida, com uma completa liberação após 24h, enquanto o PLA liberou cerca de 70% após 90h. Em outro artigo os autores relatam que a liberação completa do agente ativo pelo PLA ocorre após 7 dias. Com base na distribuição nos tecidos os autores avaliaram o uso de PLA e PHB em carcinomas de Lewis em pulmões de ratos, encontrando um efeito pequeno utilizando-se microcápsulas de PHB carregadas com lomustine e que as microcápsulas de PLA carregadas com a droga pode aumentar a sobrevivência ao carcinoma nos pulmões de ratos.

Brophy e Deasy (1986) estudaram a taxa de liberação *in vitro* e *in vivo* de sulfametizol por microcápsulas de PHB obtidas por evaporação do solvente, com morfologia irregular e com diferentes faixas de tamanho de partícula. A taxa de liberação *in vivo* foi estudada a partir de micropartículas administradas por via oral em 6 cachorros machos pesando entre 20 e 30Kg e o estudo *in vitro* foi realizado utilizando-se um aparelho de dissolução USP (United States Pharmacopeia).

Os autores observaram que um aumento no peso molecular do polímero levou a um aumento na taxa de liberação do sulfametizol, que foi atribuída a uma distribuição desigual da droga, que pode ser mais pronunciada em polímeros de elevado peso molecular. A taxa de liberação pode ser diminuída aumentando-se o tamanho das microcápsulas, diminuindo o carregamento da droga ou usando um copolímero (PHB-HV) ao invés do homopolímero PHB.

Na Figura 6 é apresentado um gráfico mostrando o perfil de liberação *in vitro* do sulfametizol obtidos pelos autores para microcápsulas de diferentes tamanhos. Pode-se observar que após 30min as microcápsulas de menor tamanho (53-150 μ m) liberaram cerca de 90% de sulfametizol, enquanto as microcápsulas de maior tamanho (425-600 μ m e 1180-2000 μ m) liberaram aproximadamente 40 e 20% respectivamente, neste mesmo tempo.

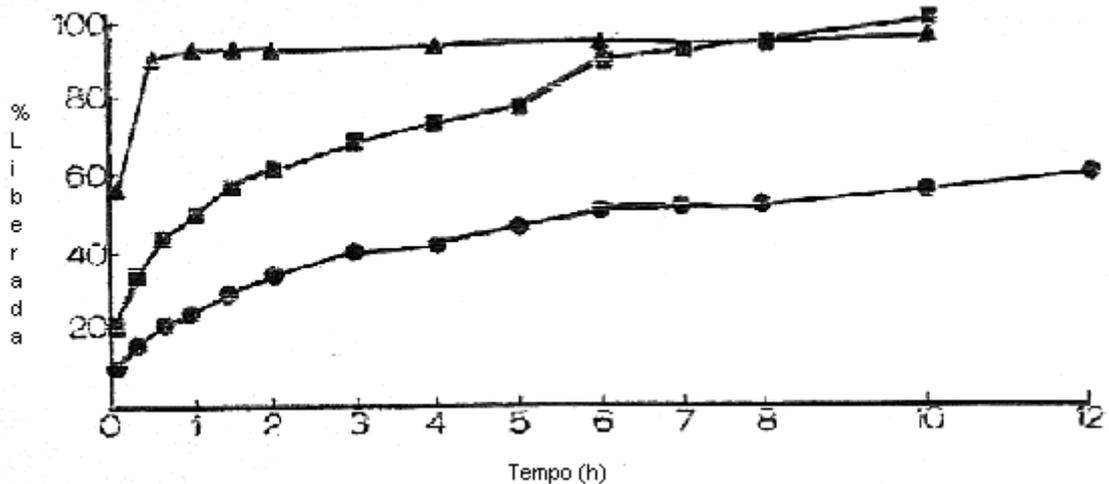


Figura 6: Taxa de liberação *in vitro* do sulfametizol por microcápsulas de PHB com diferentes diâmetros: ● 1180-2000µm, ■ 425-600µm e ▲ 53-150µm, obtidos por Brophy e Deasy (1986).

As matrizes de PHB podem ainda ser usadas na liberação de peptídeos. McLeod et al. (1988) estudaram a eficácia de implantes de PHB na liberação de níveis baixos de LHRH administrados subcutaneamente, para estimular a secreção de LH, promover o crescimento do folículo pré-ovulatório e induzir a ovulação em ovelhas. Os implantes de PHB revelaram-se mais eficazes (em comparação a injeções de depósitos a base de óleo) na liberação prolongada do hormônio por 2-4 dias, sendo adequado para causar a ovulação em ovelhas. Foi obtido 94% de sucesso utilizando dois implantes de PHB/LHRH por animal.

Koosha et al. (1987) prepararam nanopartículas (170-210nm) de PHB pela técnica de emulsão a alta pressão e Akhtar et al. (1991) obtiveram micropartículas de PHB (20-40µm) através da técnica de "Spray Drying". Estes autores observaram uma liberação relativamente rápida de prednisolona ou vermelho metil, uma droga modelo, a partir das micropartículas de PHB. A liberação completa ocorreu após cerca de 48h.

Na Figura 7 é apresentado o perfil de liberação *in vitro* da prednisolona a partir de partículas de PHB obtido por Koosha et al. (1989). Os autores obtiveram um efeito "burst" no início da liberação, devido a liberação da prednisolona contida na superfície da matriz portadora, em seguida a liberação torna-se mais lenta, pois a

liberação da carga ativa contida no volume da matriz portadora necessita de um tempo maior.

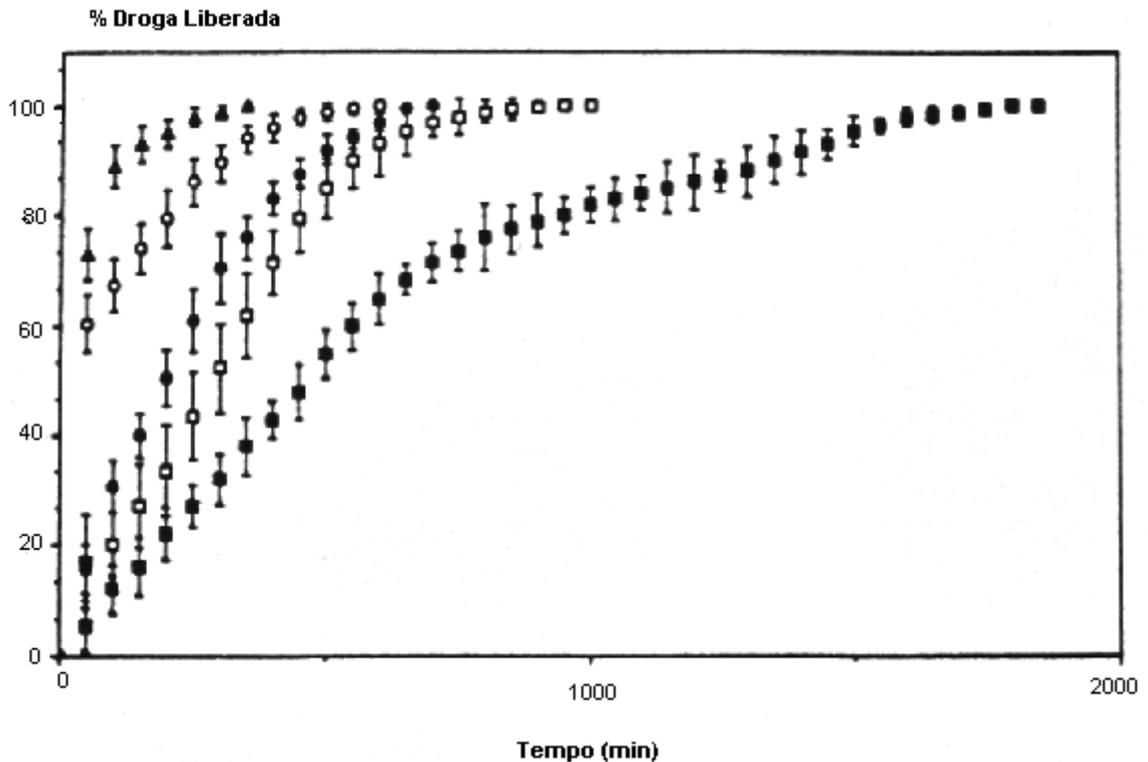


Figura 7: Perfis de liberação *in vitro* de prednisolona a partir de partículas de PHB, em diferentes proporções droga/polímero: : (■) 1:1, (□) 1:2, (●) 1:4, (○) 1:6 e (▲) 1:8, (Koosha et al., 1989).

Deasy et al. (1989) investigaram a utilização de compressas frias de PHB contendo tetraciclina e metronidazol dispersada fisicamente no tratamento de periodontite humana. O estudo foi realizado com 12 voluntários aplicando uma compressa compactada de 7.5 mm de diâmetro contendo 50% de tetraciclina aplicada no dente molar superior. Observou-se que foram encontrados níveis terapêuticos do antibiótico na saliva no decorrer do período em estudo (10 dias). Todos os pacientes mostraram melhora clínica, porém esta melhora não se manteve após a remoção da compressa. O estudo da liberação *in vitro* foi realizado utilizando-se uma solução imitando saliva e mostrou que a taxa de liberação independe da pressão de compactação na faixa de 106-318Kg/cm².

A diminuição no peso molecular do PHB ou a alteração para PLA levam a uma diminuição da taxa de liberação da tetraciclina e um aumento na quantidade de HV nos copolímeros P(HB-HV) tendem a aumentar a liberação inicial da droga. Este

fato pode ser atribuído a maior facilidade de difusão da droga através de copolímeros .

Gangrade e Pricet (1991) estudaram a preparação, morfologia e as propriedades de liberação da progesterona por microcápsulas de P(HB-HV). Eles obtiveram microcápsulas esféricas, muito porosas e com superfícies irregulares utilizando clorofórmio como solvente pelo método de evaporação de solvente a partir de uma emulsão, quando utilizaram o cloreto de metileno como solvente os autores obtiveram microcápsulas de superfície mais regular, em ambos os casos o tamanho das micropartículas foi de cerca de 15 μ m. Através de cromatografia gasosa foi observado que as microcápsulas aquecidas a 40°C durante 30 minutos não apresentaram resíduos do solvente.

A Figura 8 apresenta os perfis de liberação de progesterona apresentados para diferentes quantidades de HV, obtidos *in vitro* utilizando um aparelho de dissolução USP XXI. A liberação de progesterona ocorreu mais rapidamente nas microcápsulas de PHB e de P(HB-24HV) do que nas microcápsulas de P(HB-9HV). Os autores atribuíram este fato a diferença de porosidade das matrizes poliméricas formadas durante a evaporação do solvente, sendo a matriz P(HB-9HV) a que apresentou menor porosidade. Na Figura 9 é apresentado o perfil de liberação da progesterona por microcápsulas de P(HB-24HV) contendo diferentes quantidades de droga encapsulada até a droga livre. Pode-se observar que a droga não encapsulada dissolve-se completamente no meio de dissolução com a metade do tempo necessário para a droga encapsulada na matriz polimérica.

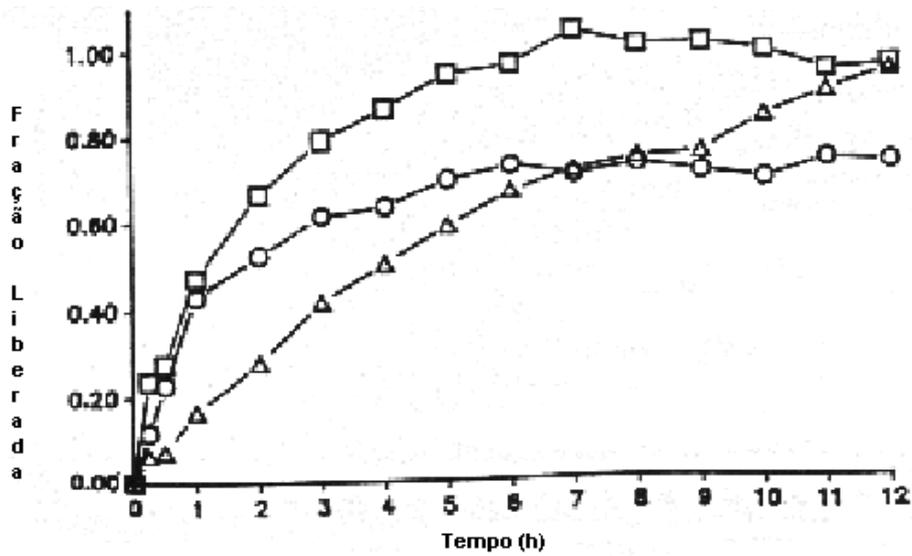


Figura 8: Fração de progesterona liberada em função do tempo para estudos *in vitro*: (O) PHB, (Δ) P(HB-9HV) e (□) P(HB-24HV), Gangrade e Pricet, (1991).

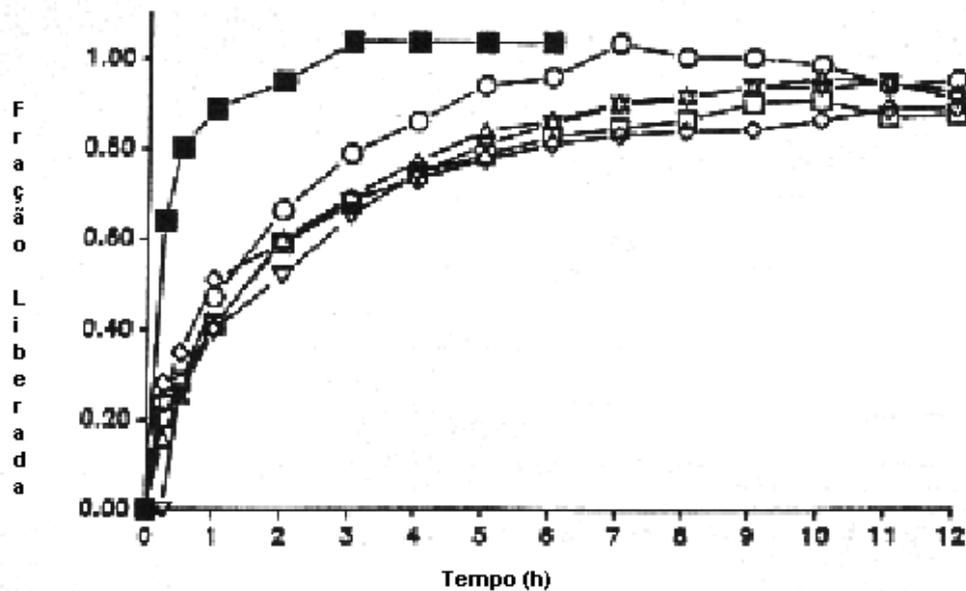


Figura 9: Perfil de liberação de progesterona a partir de microcápsulas de P(HB-24HV) contendo diferentes carregamentos da droga: (O) 2%, (Δ) 5%, (□) 7%, (▽) 10%, (◇) 15% e (■) droga pura.

A morfologia e as propriedades de liberação dependeram do emulsificante, do solvente, composição do polímero, temperatura de preparação e da concentração da

solução polimérica. Os autores concluíram que microcápsulas de P(HB-HV) podem ser potencialmente utilizadas na liberação controlada de progesterona via parenteral. As microcápsulas de tamanho adequado podem ser suspensas em um veículo adequado e injetadas sub-cutaneamente, intra-muscularmente ou localmente no sítio de ação.

Diferenças morfológicas em microesferas de PHB e copolímeros foram analisadas por Embleton et al. (1992, 1993). Os pesquisadores encontraram que polímeros de pesos moleculares mais elevados utilizando o método de dupla emulsão produzem microesferas mais uniformes. Eles observaram que partículas contendo policaprolactona (PCL) apresentam maior porosidade para percentagens até de 50% de PCL, a porosidade diminui para quantidades maiores. A 80% de PCL obtém-se partículas não porosas e muito suaves.

Juni et al. (1987-1992) têm estudado a taxa de liberação de agentes anti-cancerígenos, entre eles, a aclarubicin, doxorubicin, bleomycin e 5-fluorouracil a partir de microcápsulas de PHB. Eles observaram que a liberação dos agentes anti-cancerígenos pelo PHB ocorre vagarosamente, ao contrário do que encontrado por Brophy e Deasy (1986). A baixa taxa de liberação pode ser atribuída ao maior tamanho das partículas obtidas e a natureza da droga. A taxa de liberação da droga pode ser aumentada pela incorporação de ésteres etílicos ou butílicos de ácidos graxos com mais de 10 ou 12 carbonos, nas microcápsulas de PHB.

A cristalinidade das microcápsulas carregadas com a droga não foi afetada significativamente pela inclusão de aditivos, e em um estudo do mecanismo envolvido no aumento da liberação eles sugerem que ela ocorre através da difusão em canais formados pelos ácidos graxos na matriz de PHB. A influência da quantidade de HV na eficiência do carregamento da droga pela matriz e conseqüentemente na taxa de liberação da mesma é complexa e depende das condições de processamento adotadas. Gursel e Hasirci (1995) relataram que a liberação de dicloro-fluoresceína é menor para copolímeros, diminuindo com o aumento da quantidade de HV, como observado para o P(HB-14HV), (Figuras 10-12), porém Akhtar et al. (1991) declaram o oposto para a liberação de vermelho metil. Materiais obtidos por técnicas de vaporização do solvente apresentam um comportamento muito diferente dos materiais produzidos por extrusão de um fundido ou compressão de um fundido. A explicação normalmente encontrada para este fato está na taxa de cristalização do polímero e na morfologia obtida para cada técnica.

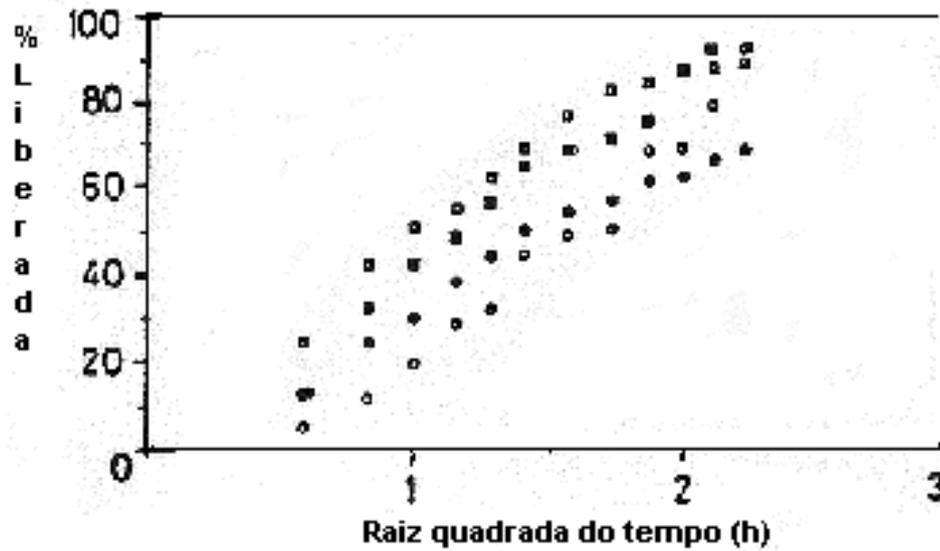


Figura 10: Liberação de dicloro-fluoresceína a partir de microcápsulas de PHB com diferentes carregamentos, polímero/droga : (O)1:1, (●) 1,5:1, (□) 2:1, (■) 3:1, (Gürsel e Hasirci; 1995).

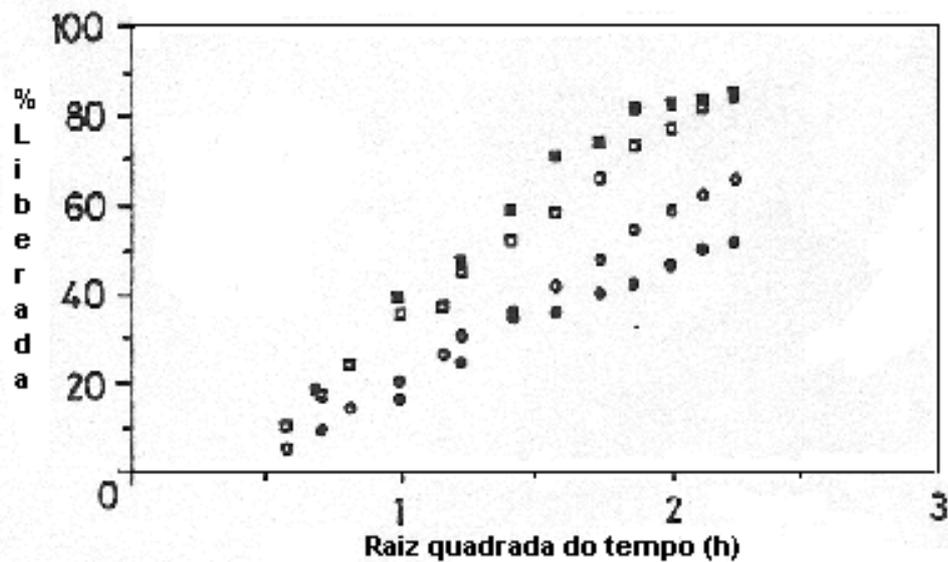


Figura 11: Liberação de dicloro-fluoresceína a partir de microcápsulas de P(HB-7HV) com diferentes carregamentos, polímero/droga: (O)1:1, (●) 1,5:1, (□) 2:1, (■) 3:1, (Gürsel e Hasirci; 1995).

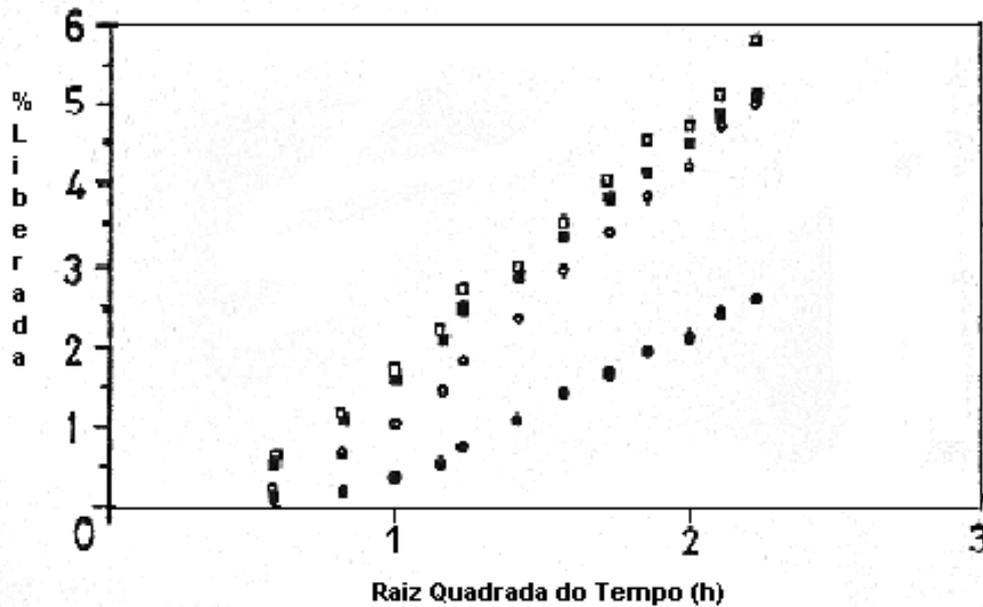


Figura 12: Liberação de dicloro-fluoresceína a partir de microcápsulas de P(HB-14HV) com diferentes carregamentos, polímero/droga: (O)1:1, (●) 1,5:1, (□) 2:1, (■) 3:1, (Gürsel e Hasirci; 1995).

Sá (2000), obteve microcápsulas de PHB carregadas com tionicotinamida (TNA) pelas técnicas de emulsão tamanho de 7-10 μ m e de "Spray Drying" com tamanho de 12-15 μ m. as microcápsulas obtidas por "Spray Drying" apresentaram uma membrana capsular densa que originou uma menor taxa de liberação em relação nas microcápsulas obtidas por emulsão, onde a membrana obtida foi porosa e com existência de microcanais.

Em geral observa-se que:

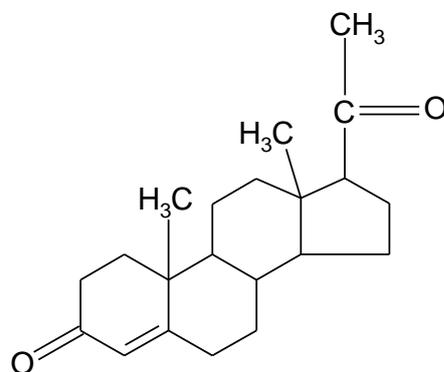
- a taxa de liberação de cargas ativas cresce com a diminuição do tamanho das microcápsulas,
- polímeros de maior massa molecular levam a maior uniformidade das microcápsulas,
- microcápsulas mais porosas liberam a carga ativa mais rapidamente.
- tipos diferentes de carga ativa incorporada em um mesmo tipo de matriz polimérica apresentam taxas de liberação diferentes.

3.10- A progesterona

A progesterona é uma droga lipofílica utilizada no controle do aborto natural e na supressão ou sincronização do período de copulação. A progesterona torna-se atrativa no controle da fertilidade devido a sua ocorrência em altas concentrações sobre condições naturais sem nenhum efeito colateral conhecido. O uso oral de progesterona não é adequado devido a esta não ser oralmente ativa exceto a elevadas dosagens e ter um curto tempo de meia vida biológica. No entanto, o emprego de sistemas de liberação controlada da droga possibilita o controle da fertilidade.

Nos últimos anos encontra-se na literatura vários estudos de sistemas poliméricos de liberação controlada para utilização no controle da fertilidade de humanos e de animais. Encontram-se disponíveis dois produtos que alcançaram utilização clínica, o Progestasert® e o Norplant®. O primeiro é um dispositivo em formato de T que provê uma liberação constante de progesterona através de uma membrana de etileno-vinil acetato e o segundo é um dispositivo com base de silicone para liberação de levonorgestrel. Estes dois polímeros não são biodegradáveis, o que torna necessário a remoção destes dispositivos após a liberação de toda a droga.

Diversos polímeros biodegradáveis têm tido seus potenciais na utilização em sistemas de liberação controlada de hormônios avaliados, tais como os ácidos polilácteos, ácidos poliglicólicos, poli- ϵ -caprolactona e os polihidroxialcanoatos(Latha et al.; 2000).



Progesterona

4- Materiais e métodos

4.1- Especificação dos reagentes

O poli(3-hidroxiobutirato) é um poliéster semicristalino, biodegradável e biocompatível, utilizado como matriz polimérica na obtenção de microcápsulas. Ele apresenta uma $T_g=2^{\circ}\text{C}$ e $T_m=176-180^{\circ}\text{C}$. Utilizou-se 3 PHBs de pesos moleculares diferentes: PHB(1) e PHB(2) cedidos pela PHB Industrial, e PHB(3) comprado da Aldrich,

A progesterona é um hormônio utilizado na regularização do ciclo de éguas, apresenta-se como um pó branco e de peso molecular de 314,5. Sua temperatura de fusão é de 130°C para a forma α e de 121°C para a forma β . Este hormônio será a carga ativa encapsulada na matriz de PHB.

O clorofórmio é um solvente orgânico incolor e peso molecular de 119,38; será utilizado para dissolver o polímero e a carga ativa, na preparação da emulsão de partida para obtenção das microcápsulas por "Spray Drying".

O álcool isopropílico é um solvente orgânico incolor de peso molecular 60,1, utilizado como solvente da progesterona no estudo do perfil de liberação.

4.2- Especificação dos equipamentos

- Mini Spray Dryer BÜCHI B-191: preparação das microcápsulas.
- Balança Analítica METTLER TOLEDO, modelo AB54 (4 dígitos)
- Ultra centrífuga Hitachi modelo Himac CR21, 4000-20000rpm.
- Microscópio ótico ZEISS Axioplan com câmera CCD Hamamatsu C3077 acoplada, utilizado na medida do tamanho das micropartículas de poliestireno.
- ZEISS 692: Microscópio eletrônico de varredura, utilizado para caracterizar a morfologia das microcápsulas.
- ZEISS 900: Microscópio Eletrônico de Transmissão, utilizado para caracterizar a morfologia interna das microcápsulas.
- Difrátômetro de raios-X URD65: medida da cristalinidade das microcápsulas.
- Espectrofotômetro UV-1601PC SHIMADZU: obtenção dos perfis de liberação da carga ativa em função do tempo

→ Bomba peristáltica Masterflex L/S™, Standard drive.

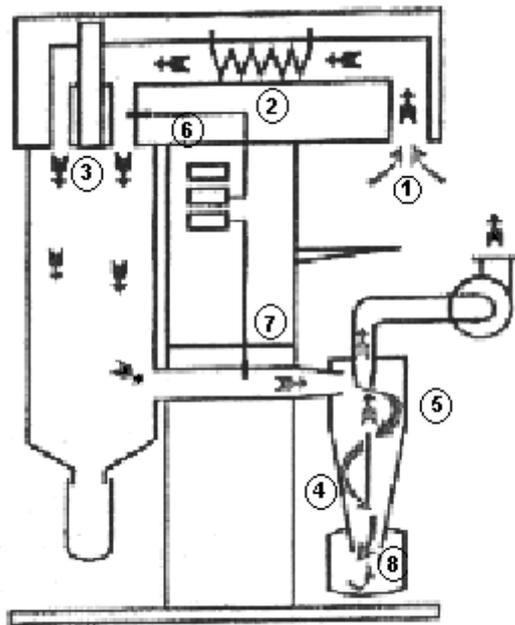
4.3- Preparação das microcápsulas de poliestireno e PHB

As micropartículas de poliestireno (PS) foram obtidas pela técnica de "Spray Drying", variando-se os parâmetros do processo com o objetivo de determinar quais parâmetros permitem obter cápsulas de diâmetro inferior a 5 μ m, com uma faixa de distribuição de tamanho estreita. Os parâmetros utilizados (Tabela 7) foram selecionados com base nos resultados de tamanho de partícula reportados por diversos autores. Os parâmetros adotados foram selecionados de acordo com as condições do equipamento utilizado neste trabalho e a disponibilidade de material e tempo. As microcápsulas de PHB/Progesterona a partir de com 3 PHBs diferentes, foram obtidas pela mesma técnica. A concentração das soluções foi de 1%p/v, devido a solubilidade do PHB em clorofórmio. A carga teórica de progesterona encapsulada foi de 20% p/p. A partir dos resultados obtidos para o poliestireno foram escolhidos os parâmetros a serem utilizados preliminarmente para o PHB, utilizando como fator de seleção a obtenção de micropartículas de tamanho médio até 5 μ m, fator limitante para a utilização das microcápsulas na aplicação intra-venosa, de interesse neste trabalho.

Tabela 7: Parâmetros utilizados na obtenção de micropartículas de PS

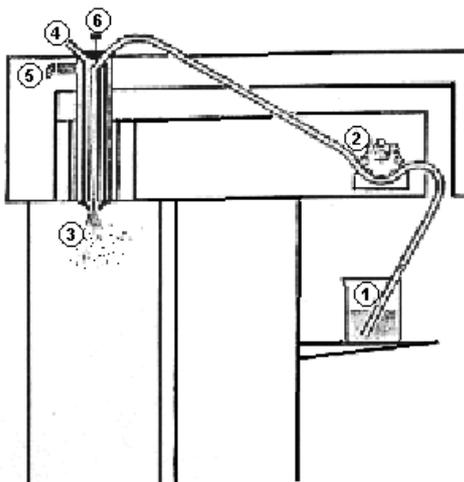
Amostra	Temperatura inicial (°C)	Temperatura de saída (°C)	Fluxo (NL/h)	Aspirador (%)	Bomba (mL/min)
A	56	47	600	85	5
B	56	47	600	95	5
C	56	44	600	75	10
D	56	43	600	85	10
E	56	46	600	95	10
F	56	44	600	75	15
G	56	44	600	85	15
H	56	45	600	95	15
I	56	46	650	75	5
J	56	45	650	85	5
K	56	46	650	95	5
L	56	45	650	75	10
M	56	44	650	85	10
N	56	43	650	95	10
O	56	44	650	75	15
P	56	44	650	85	15
Q	56	44	650	95	15
R	56	45	700	75	5
S	56	45	700	85	5
T	56	46	700	95	5
U	56	46	700	75	10
V	56	44	700	85	10
W	56	45	700	95	10
X	56	45	700	75	15
Y	56	45	700	85	15
Z	56	45	700	95	15

Nas Figuras 13 e 14 são apresentados o esquema do princípio funcional e do fluxo do produto no "Spray Drying", modelo BÜCHI B-191 com fluxo de ar concorrente, disponível no setor de Polímeros do Laboratório de materiais Avançados do Centro de Ciência e Tecnologia da UENF.



- 1) Abertura de sucção
- 2) Aquecimento
- 3) Estabilização do fluxo de entrada na câmara de secagem
- 4) Ciclone, separação do produto e da corrente de ar
- 5) Aspirador
- 6) Temperatura do ar na entrada
- 7) Temperatura do ar na saída
- 8) Vaso coletor do produto final

Figura 13: Esquema do princípio funcional de um "Spray Drying", modelo BÜCHI B-191.



- 1) Recipiente contendo a solução, emulsão ou dispersão
- 2) Bomba peristáltica
- 3) Canal de passagem do produto
- 4) Conexão para ar comprimido ou gás inerte
- 5) Conexão para água de resfriamento
- 6) Agulha de limpeza

Figura 14: Esquema do princípio funcional da produção do fluxo de um "Spray Drying", modelo BÜCHI B-191.

4.4- Estudo da distribuição de tamanho de micropartículas de poliestireno

Com a finalidade de desaglomerar as micropartículas de poliestireno obtidas em diferentes combinações de parâmetros, estas foram suspensas em 25mL de metanol e duas gotas de Tween 20. A centrifugação foi realizada com o objetivo de separar em duas faixas de distribuição de tamanho de partícula.

Cada amostra passou por duas etapas de centrifugação:

- Centrifugação a 4000rpm, coletando-se a fração sedimentada.
- Centrifugação a 18000rpm do sobrenadante da primeira centrifugação, e nova coleta da fração precipitada.

As micropartículas foram aderidas em lâminas de vidro, utilizando-se uma solução de álcool polivinílico a 1%p/v, e observadas em microscópio óptico ZEISS, acoplado a um microcomputador. O tamanho das partículas foi medido com o auxílio do software AnalySIS.

4.5- Determinação do Peso Molecular do PHB

O peso molecular dos 3 diferentes PHBs utilizados foi medido por viscosimetria utilizando um viscosímetro Ostwald. Partiu-se de 10 mL de solução na concentração de 0,05g/mL, utilizando clorofórmio como solvente. As medidas foram efetuadas a 20^oC, cada medida foi repetida 12 vezes. Esse procedimento foi repetido para 3 concentrações: 0,045; 0,042 e 0,038g/mL. As constantes de Mark-Houwink utilizadas no cálculo do Peso Molecular foram $\alpha=0,756$ e $k=1,51.10^{-2}$ mL/g (Akhtar, 1991). O Peso Molecular foi obtido utilizando as seguintes relações:

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0} \quad \text{Equação 17}$$

onde:

η_{sp} : Viscosidade específica

t: tempo de escoamento da solução polimérica

t_0 : tempo de escoamento do solvente

$$[\eta] = k.M^\alpha \quad \text{Equação 18}$$

onde:

η : viscosidade intrínseca

k e α : constantes para um determinado par polímero-solvente a uma dada temperatura.

M: Peso Molecular viscosimétrico.

4.6- Medida da cristalinidade das formulações PHB/Prog

A cristalinidade das microcápsulas de PHB/Progesterona foi analisada através de difração de raios-X com o objetivo de relacionar o valor desta com as propriedades de transporte de massa. O grau de cristalinidade (X_c) foi calculado mediante o ajuste do difratograma a funções gaussianas através do programa Microcal Origin 6.0 e utilizando a relação abaixo:

$$X_c = \frac{\text{áreatotal} - \text{áreaamorfa}}{\text{áreatotal}}$$

Onde a área da gaussiana refere-se a parte amorfa do sistema e o restante a fase cristalina.

4.7- Estudo da morfologia e distribuição da carga ativa na matriz

Através de Microscopia Eletrônica de Varredura foi feita a observação da topografia das microcápsulas obtidas, que influe na taxa de liberação destas.

As amostras foram fixadas em uma fita de carbono dupla face, aderida em um suporte metálico, e cobertas com um filme de ouro de cerca de 20nm de espessura, pela técnica de "Sputtering".

A Microscopia Eletrônica de Transmissão foi utilizada para observar a morfologia interna das microcápsulas, com a finalidade de se analisar a porosidade das mesma, um parâmetro que também têm influência na taxa de liberação da carga ativa.

As amostras foram impregnadas em resina Epon e cortes da ordem de 70nm foram obtidos com o auxílio de um Ultratrim. Estes cortes foram coletados em grades de cobre e observados em Microscópio Eletrônico de Transmissão a 50kV.

4.8- Estudo da incorporação da carga ativa

A carga efetiva de progesterona incorporada nas microcápsulas de PHB foi determinada por Espectroscopia no ultravioleta. Foram dissolvidas 5mg de microcápsulas em 40mL clorofórmio e a quantidade de progesterona presente foi medida utilizando um Espectrofômetro UV-1601PC SHIMADZU. O branco utilizado foi uma solução de PHB em clorofórmio na concentração de 0,1mg/mL. Esse procedimento foi realizado para as microcápsulas obtidas dos 3 polímeros de diferentes massas moleculares.

4.9- Estudo do perfil de liberação controlada

Para a obtenção do perfil de liberação 15 mg de microcápsulas foram submetidos a um fluxo constante com o auxílio de uma bomba peristáltica Masterflex L/STM. Para dar suporte as microcápsulas utilizou-se uma membrana Fluoropore PTFE de 1,04 μ m de porosidade. A solução utilizada foi uma mistura de água MilliQ e álcool isopropílico na proporção de 65:35. Em intervalos regulares foi retirado 1mL da solução e a quantidade de progesterona contida nestas alíquotas foi medida por Espectroscopia ultravioleta, utilizando uma cubeta de quartzo e comprimento de onda de 247nm. Após cada retirada de amostra o volume foi completado com 1mL da solução pura. O volume total utilizado foi de 19mL. Na Figura 15 é apresentado um esquema ilustrativo do sistema utilizado para a liberação controlada da carga ativa.

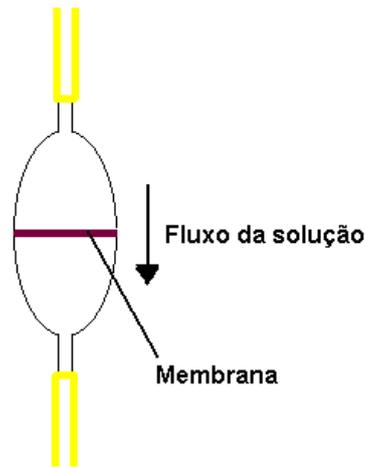


Figura 15: Esquema ilustrativo do sistema utilizado para a liberação controlada da carga ativa.

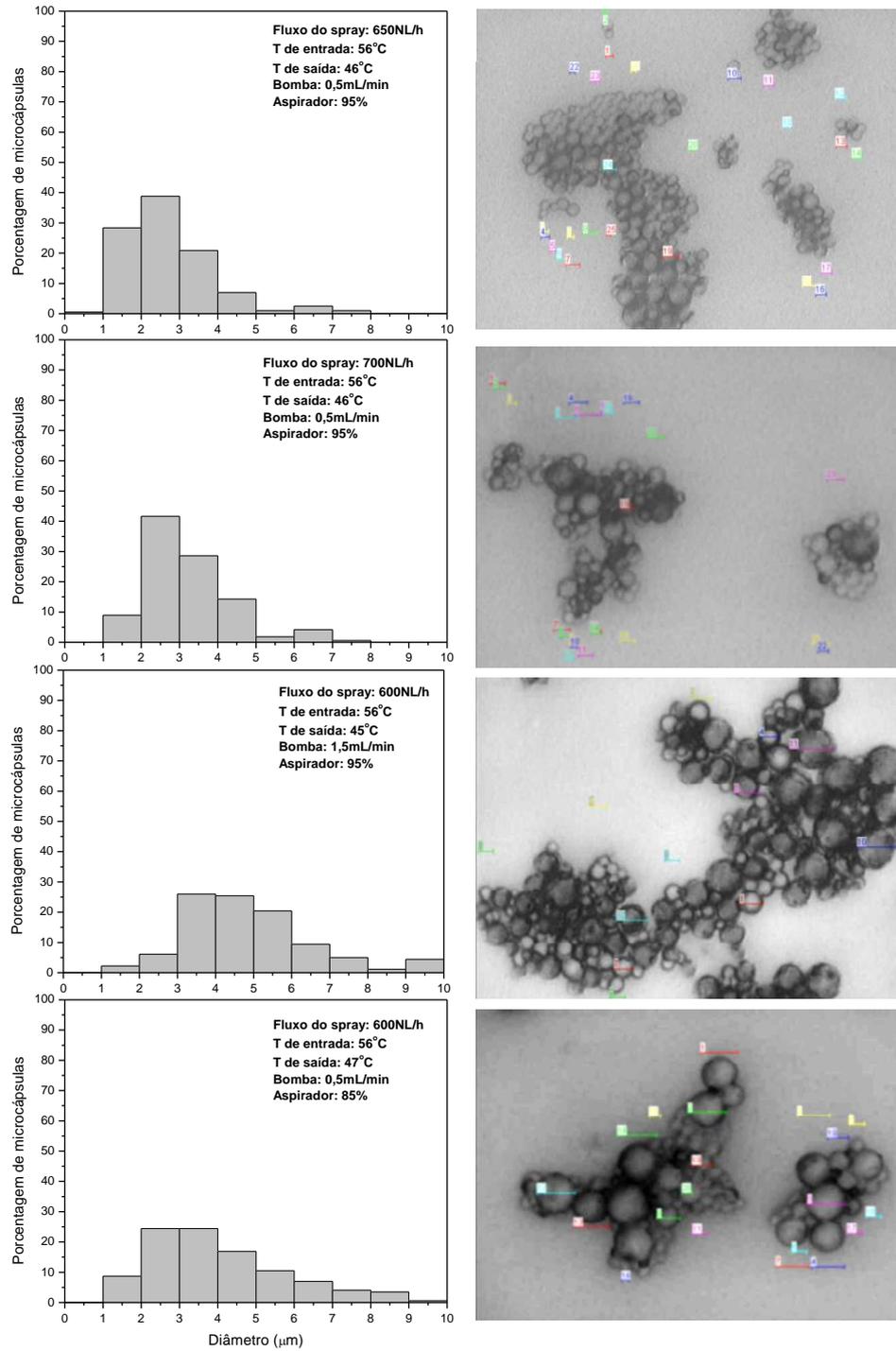
5- Resultados

5.1- Ajuste dos parâmetros do "Spray Dryer"

Na Tabela 8 é apresentada a distribuição de tamanho das micropartículas de PS obtidas utilizando-se diferentes parâmetros, pela técnica de "Spray Drying". Na Figura 16 são apresentados os histogramas e micrografias correspondentes a amostras que diferiram em apenas um dos parâmetros em relação a amostra que apresentou o tamanho de micropartícula na faixa adequada para a aplicação desejada (menor que 5 μ m).

Tabela 8: Distribuição de tamanho das micropartículas de PS obtidas por "Spray Drying".

Amostra	Diâmetro (μ m)									
	0 a 1	1 a 2	2 a 3	3 a 4	4 a 5	5 a 6	6 a 7	7 a 8	8 a 9	>9
A	0,00	8,72	24,42	24,42	16,86	10,47	6,98	4,07	3,49	0,58
B	0,00	29,57	47,31	16,67	4,84	0,54	0,00	1,08	0,00	0,00
C	0,00	8,27	30,08	31,20	19,17	9,02	1,88	0,38	0,00	0,00
D	0,00	0,00	4,62	20,00	36,15	20,77	7,69	4,62	3,85	2,31
E	0,00	0,85	5,93	33,90	27,12	16,95	9,32	1,69	3,33	0,85
F	0,00	1,41	15,49	31,92	20,19	14,08	5,63	3,29	2,82	5,16
G	0,00	2,61	24,84	28,10	18,61	9,15	9,15	3,92	0,65	1,96
H	0,00	2,21	6,08	25,97	25,41	20,44	9,39	4,97	1,10	4,42
I	0,59	4,14	28,99	35,50	17,16	8,28	2,37	2,37	2,17	4,35
J	0,00	7,69	42,08	31,22	10,41	7,24	0,90	0,45	0,00	0,00
K	0,50	28,36	38,81	20,90	6,97	1,00	2,49	1,00	0,00	0,00
L	1,91	21,02	36,31	28,03	10,19	2,55	0,00	0,00	0,00	0,00
M	0,68	29,25	36,05	17,01	6,80	8,16	1,36	0,68	0,00	0,00
N	0,00	0,00	5,06	30,90	26,97	25,28	6,74	1,69	0,56	2,81
O	0,00	18,94	37,88	26,52	8,33	3,79	3,03	1,52	0,00	0,00
P	0,00	10,10	34,85	30,30	10,10	7,58	2,02	2,53	0,51	2,02
Q	0,00	1,45	16,67	3,16	16,67	11,59	9,42	6,52	2,17	4,35
R	0,00	13,45	30,41	30,99	14,62	5,85	3,51	1,17	0,00	0,00
S	0,00	4,95	27,47	30,77	20,33	10,99	2,75	2,75	0,00	0,00
T	0,00	8,93	41,67	28,57	14,29	1,79	4,17	0,60	0,00	0,00
U	0,00	14,56	47,57	23,79	8,25	3,40	2,43	0,00	0,00	0,00
V	0,00	0,96	14,42	38,46	25,00	12,50	6,73	0,00	1,92	0,00
W	1,07	31,02	27,81	14,44	8,56	9,09	3,21	2,67	0,53	1,60
X	0,00	27,92	40,91	18,83	8,44	3,90	0,00	0,00	0,00	0,00
Y	0,57	9,77	36,21	36,78	10,92	4,02	1,15	0,57	0,00	0,00
Z	0,00	0,00	4,62	17,69	26,92	20,77	16,92	5,38	5,38	2,31



(a)

(b)

Figura 16: (a) Histogramas da distribuição de diâmetro das partículas de PS e (b) micrografias obtidas por microscopia óptica, com aumento de 80x.

Na Figura 17 apresenta-se o histograma e uma micrografia da amostra que apresentou melhor resultado, ou seja, o tamanho das partículas variou entre 1-5 μm , com a maior parte das micropartículas apresentando diâmetro entre 2 e 3 μm .

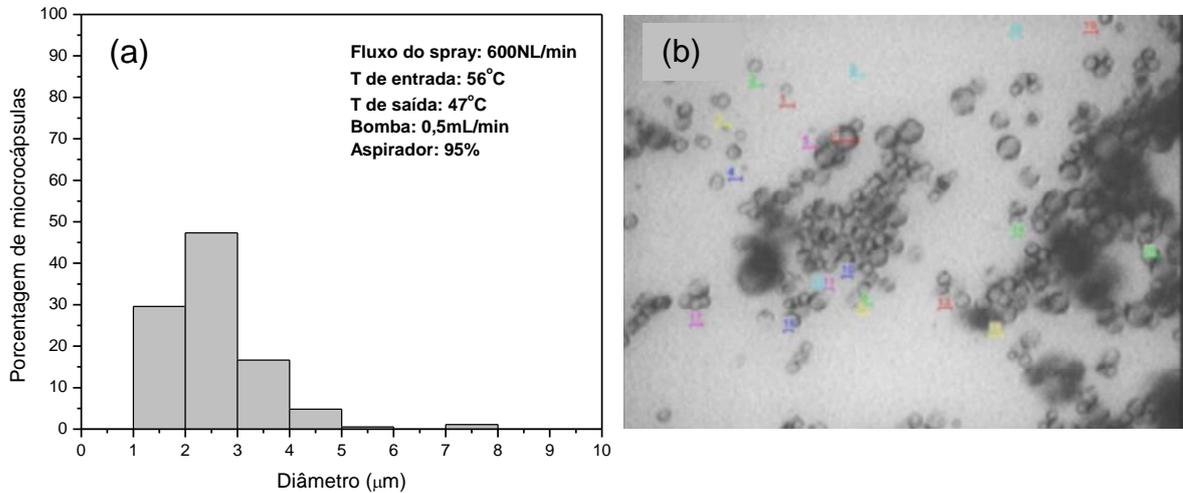


Figura 17: (a) Histograma da distribuição de diâmetro das partículas de PS e (b) micrografia obtida por microscopia óptica, com aumento de 80x.

Observou-se que o tamanho das micropartículas tende a diminuir com o aumento da aspiração, diminuição do fluxo de gás e da bomba.

A partir dos resultados obtidos para as micropartículas de PS, foram adotados preliminarmente os parâmetros utilizados na amostra B para a obtenção das microcápsulas de PHB/Progesterona, uma vez que estes parâmetros resultaram na maior porcentagem de partículas de tamanho inferior a 5 μm . Na tabela 9 são apresentados os parâmetros selecionados.

Tabela 9: Parâmetros selecionados para a formulação de microcápsulas de PHB/Progesterona.

Temperatura de entrada (°C)	56
Temperatura de saída (°C)	47
Fluxo (NL/h)	600
Aspirador (%)	95
Bomba (mL/min)	0,5

5.2- Formulação das microcápsulas de PHB/Progesterona

5.2.1- Peso Molecular da matriz portadora (PHB)

Na Figura 18 são apresentados os gráficos utilizados no cálculo do Peso Molecular dos 3 PHBs. A viscosidade intrínseca ($[\eta]$) é obtida pela extrapolação dos valores de viscosidade reduzida (η_{sp}/c). Na tabela 10 são apresentados os valores dos pesos moleculares dos diferentes PHBs, utilizando as equações 17 e 18 e os obtidos por GPC.

$$\eta_{sp} = (t - t_0)/t_0 \quad \text{Equação 17}$$

$$[\eta] = k.M^\alpha \quad \text{Equação 18}$$

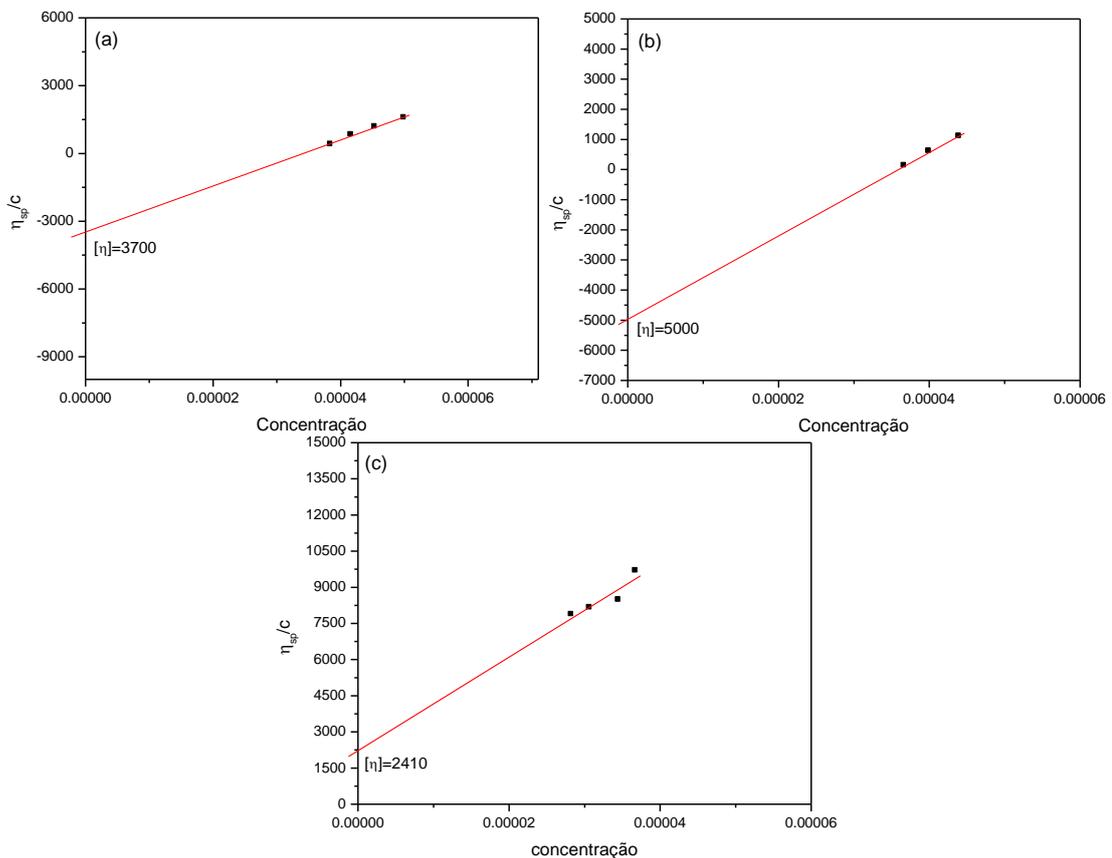


Figura 18: Variação da viscosidade reduzida com a concentração da solução de (a) PHB(1) , (b) PHB(2) e (c) PHB(3).

Tabela 10: Peso Molecular Viscosimétrico (M_v).

Polímero	M_v
PHB(1)	640.000
PHB(2)	887.000
PHB(3)	370.000

Segundo relatado por Brophy e Deasy (1986) a taxa de liberação da carga ativa deve ser maior para as microcápsulas obtidas com polímeros de peso molecular mais elevado, atribuída pelas autoras a uma distribuição mais desigual da droga nos polímeros de maior peso molecular. Portanto, com os valores de Peso Molecular obtido por viscosimetria, espera-se que as microcápsulas obtidas utilizando o PHB(1) e (2) como matriz, liberem a carga ativa mais rapidamente que as obtidas com o PHB(3).

5.2.2- Cristalinidade da matriz

Na Figura 19 é apresentado o difratograma de raio-X obtido para as microcápsulas de PHB(1)/Prog e na tabela 11 são apresentados o valor de cristalinidade obtidos para os polímeros testados

A cristalinidade é um fator muito importante para sistemas de liberação controlada, pois a difusão da carga ativa ocorre somente na porção amorfa do polímero. Deste modo uma maior cristalinidade resultará em uma maior dificuldade de difusão da carga ativa pelo efeito barreira gerado pelos cristalitos.

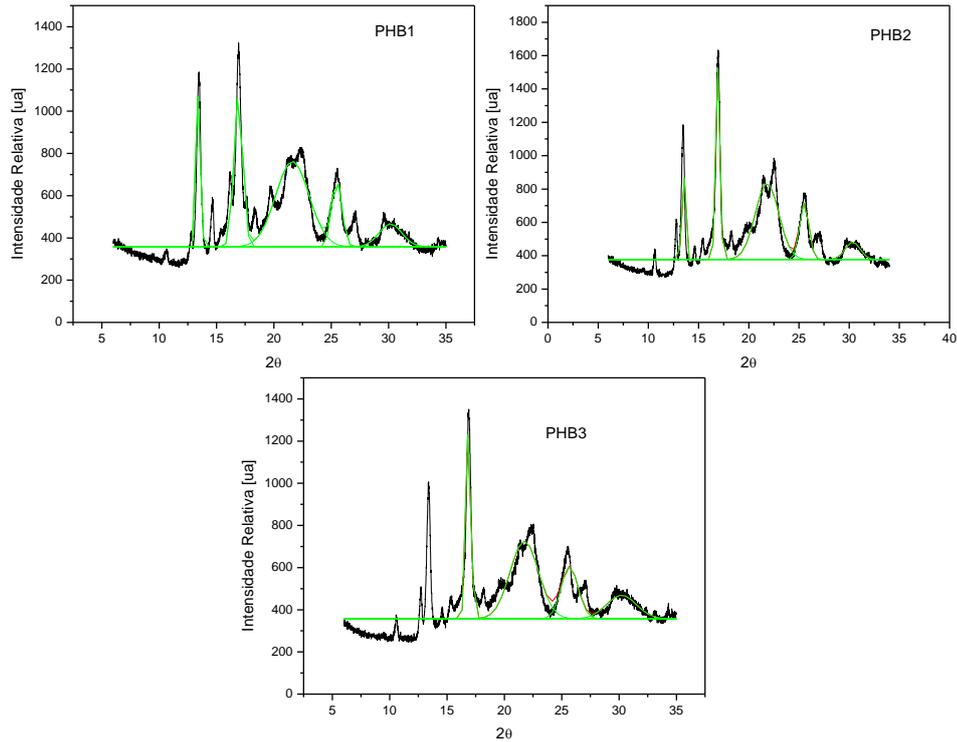


Figura 19: Difratoograma de Raio-X das microcápsulas de PHB(1)/Prog.

Tabela 11: Cristalinidade das microcápsulas de PHB/Prog.

Polímero	M_v	Cristalinidade (%)
PHB(1)	640.000	72
PHB(2)	887.000	72
PHB(3)	370.000	70

Os três PHBs estudados apresentaram valores de cristalinidade muito próximos. Portanto, a cristalinidade não deve causar diferenças significativas na taxa de liberação da carga ativa para os polímeros estudados.

5.2.3- Morfologia externa das microcápsulas de PHB/Prog

Na Figura 20 é apresentada uma micrografia para os diferentes PHBs utilizados. As microcápsulas de PHB/Prog obtidas pela técnica de "Spray Drying" apresentaram uma forte tendência a se aglomerarem devido a eletricidade estática e a coalescerem durante a sua formação. A coalescência pode ser explicada pela

presença de clorofórmio residual nas microcápsulas após passarem pelo ciclone. As microcápsulas se unem em alguns pontos e permanecem assim após a evaporação completa do solvente. Este resultado indica a necessidade de ajustar a relação temperatura de saída/fluxo de gás.

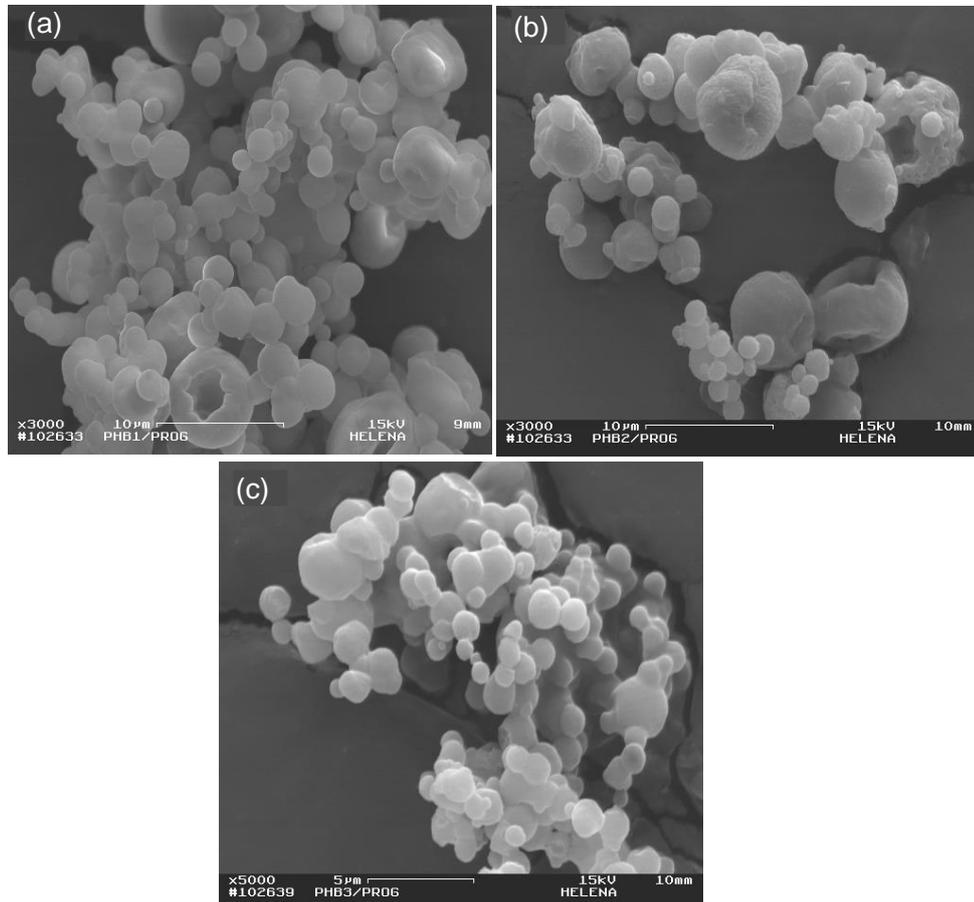


Figura 20: Micrografia (MEV) das microcápsulas de PHB/Prog : (a) PHB(1), 3000 x; (b) PHB(2), 3000 x; (c) PHB(3), 5000x.

As Figuras de 22-24 apresentam micrografias obtidas em MEV para os 3 tipos de PHB e na Figura 25 são apresentados os histogramas da distribuição de diâmetro das partículas. As microcápsulas apresentaram um tamanho de 1-5 μ m, com um número não representativo de microcápsulas com cerca de 15 μ m (Figuras 21a e 22a). O tamanho de partícula obtido foi inferior ao de Sá (2000) para micropartículas de PHB carregadas com tionicotinamida em sua tese de Mestrado empregando a técnica de dupla emulsão obteve micropartículas de 5-13 μ m, com uma distribuição mais larga de tamanho de partícula. As micropartículas obtidas pela

autora através da técnica de "Spray Drying" utilizando clorofórmio como solvente, apresentaram tamanho de 8,5-15 μ m e com 27% das partículas com um tamanho superior a 15 μ m, também com uma larga distribuição de partícula. Comparando os valores relatados por de Sá com os obtidos neste trabalho observa-se que os parâmetros escolhidos para obtenção das microcápsulas foram adequados.

Nas Figuras 22b, 23b e 24, com os maiores aumentos é possível observar que a superfície das microcápsulas apresentam rugosidade, porém menos pronunciada que as observadas em trabalhos apresentados por Gangrade e Pricet, (1991). Esse fato pode ser explicado pelo método de obtenção das microcápsulas e para os PHBs 1 e 2, isto pode se dever a presença de cadeias menores que atuam como plastificantes. Estes autores observaram ainda a presença de cristais de progesterona na superfície das microesferas de PHB quando a carga teórica foi superior a 5%, fato não observado para os sistemas estudados neste trabalho, com uma carga teórica de 20%.

De Sá (2000) obteve micropartículas por "Spray Drying" com uma superfície de topografia mais irregular a observada neste trabalho, este fato parece ser devido a característica lipofóbica da carga utilizada (tionicotinamida) pela autora enquanto que a progesterona é lipofílica.

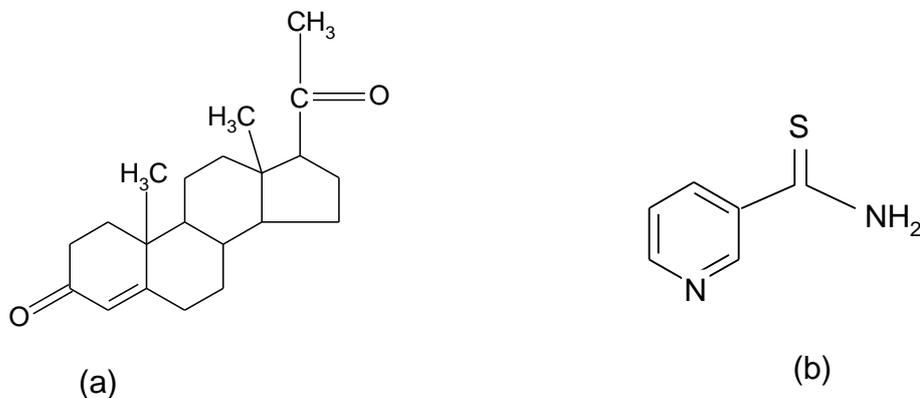


Figura 21: Fórmulas (a) da Progesterona e (b) da Tionicotinamida.

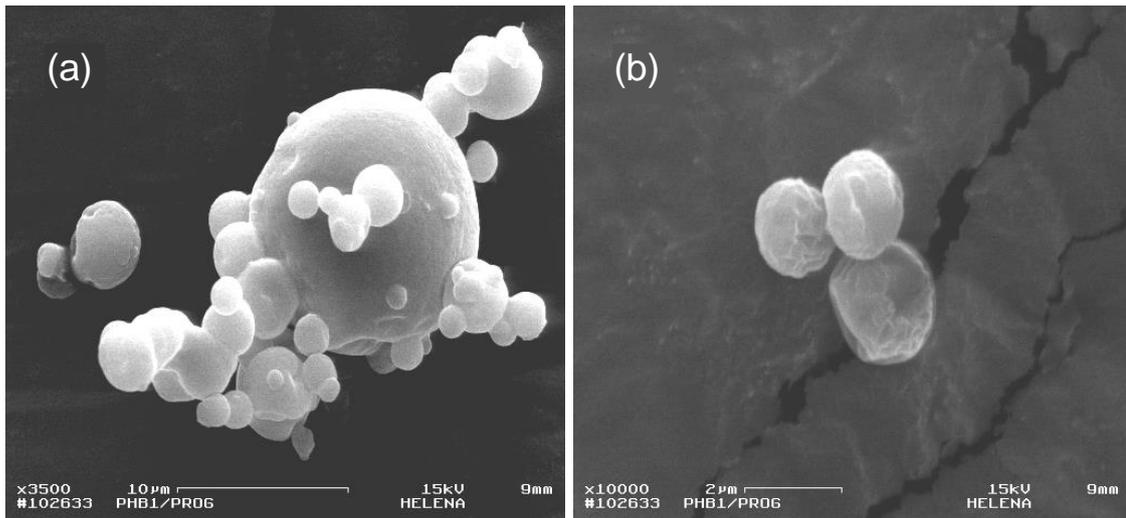


Figura 22: Micrografia (MEV) das microcápsulas de PHB(1)/Prog, (a)3500x e (b)10000x.

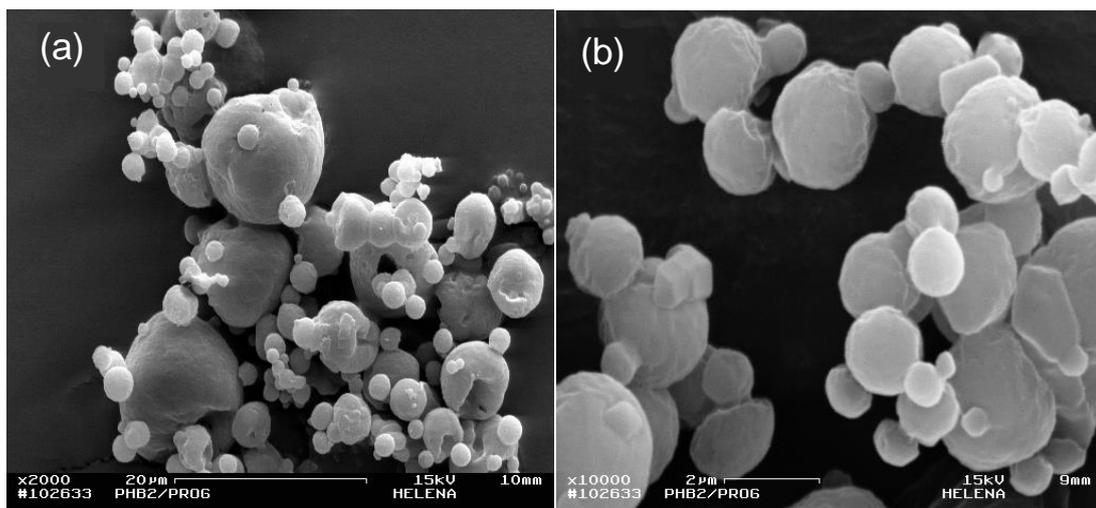


Figura 23: Micrografia (MEV) das microcápsulas de PHB(1)/Prog, (a)2000x e (b)10000x.

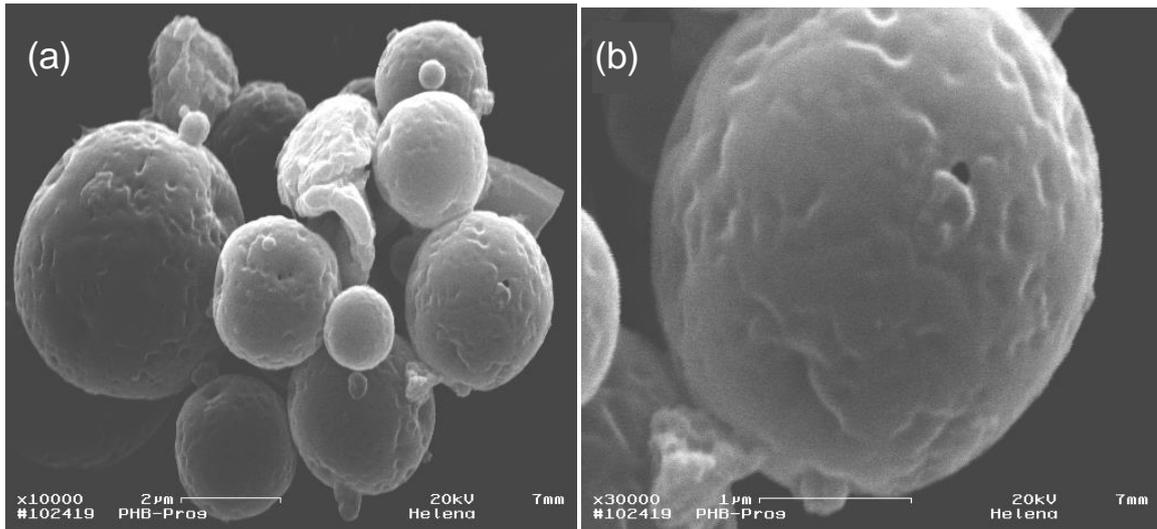


Figura 24: Micrografia (MEV) das microcápsulas de PHB(3)/Prog, (a)10000x e (b)30000x.

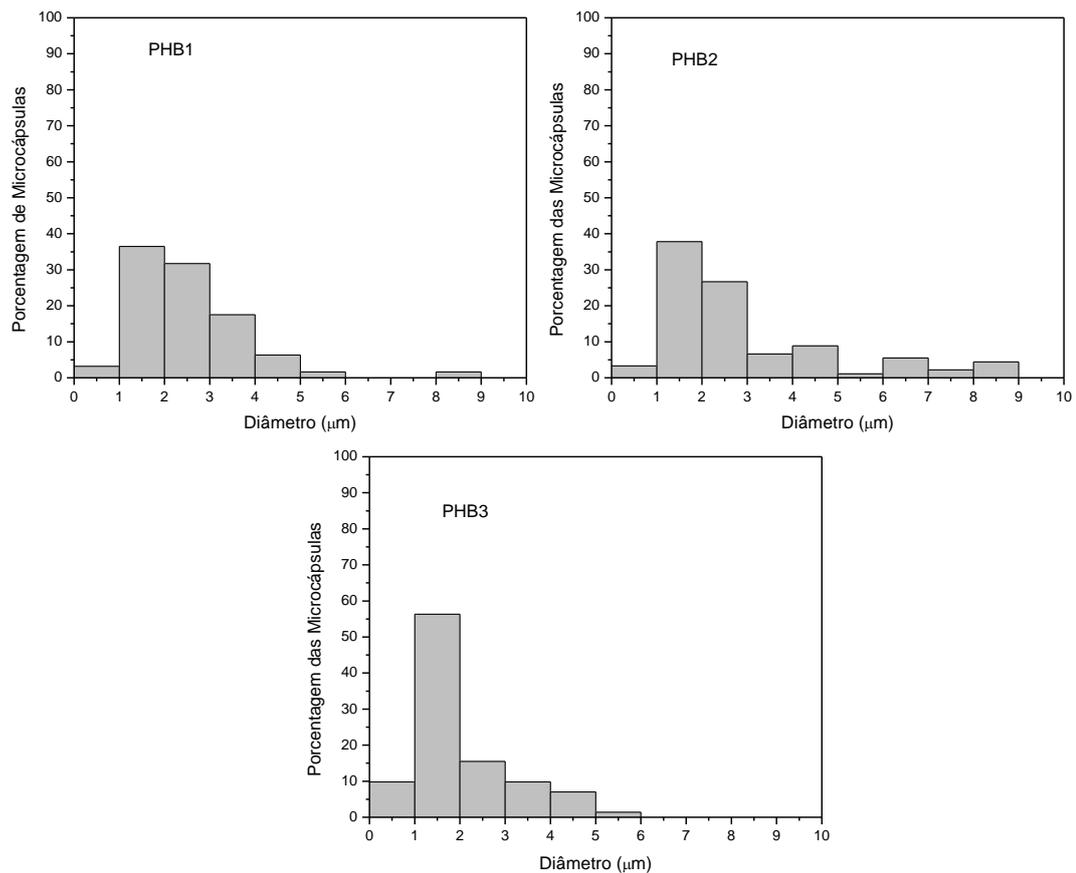


Figura 25: Histogramas da distribuição de diâmetro das microcápsulas de PHB/Progesterona.

5.2.3- Morfologia interna das microcápsulas de PHB/Prog

Nas figuras 26-28 são apresentadas as micrografias com cortes polares e equatoriais das microcápsulas de PHB/Prog de diferentes tamanhos, obtidas em Microscópio Eletrônico de Transmissão. Através destas micrografias pode-se observar que as microcápsulas possuem em geral um núcleo central de progesterona, envolvido por uma membrana de polihidroxibutirato. As microcápsulas de PHB(1) e (3) possuem uma membrana mais densa do que a do PHB(2). Entretanto, possivelmente parte da carga ativa esteja dispersa na membrana devido seu caráter lipofílico. Nas microcápsulas formuladas com PHB(1) e PHB(3) a membrana obtida é densa. As microcápsulas obtidas a partir do PHB(2) apresentaram parte da carga ativa dispersa formando pequenos agregados, provavelmente ligados com a superfície (Figura 27b).

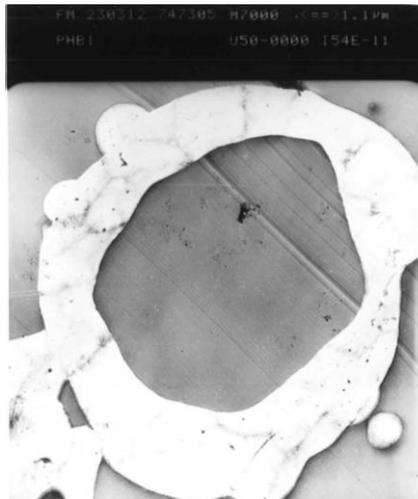


Figura 26: Micrografia Eletrônica de Transmissão de um corte equatorial para uma das microcápsulas de PHB(1)/Prog, 7000x.

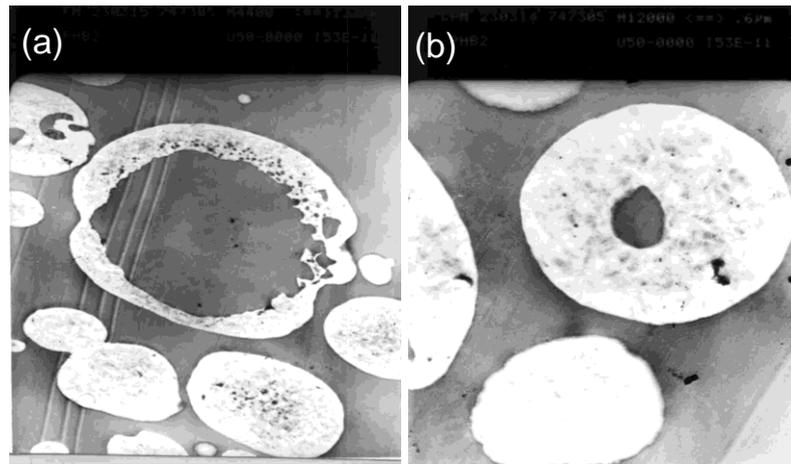


Figura 27: Micrografia Eletrônica de Transmissão de cortes transversais das microcápsulas de PHB(2)/Prog, (a) cortes polares e equatorial de microcápsulas com tamanhos diferentes 4400x e (b) corte polar e equatorial 12000x.

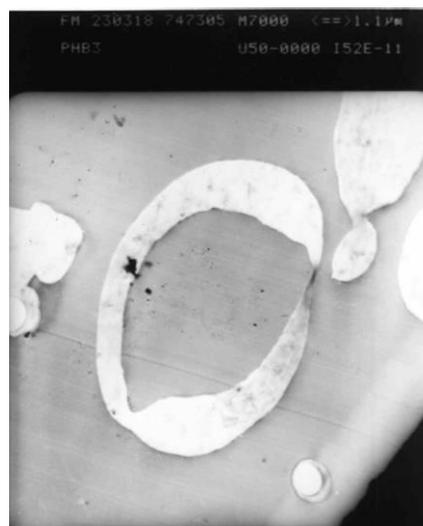


Figura 28: Micrografia Eletrônica de Transmissão de um corte equatorial das microcápsulas de PHB(3)/Prog, 7000x.

5.2.4- Carga efetiva contida nas microcápsulas de PHB/Prog.

Na Tabela 12 são apresentados os valores de carga efetiva incorporada encontrados por espectroscopia UV. Em todos os sistemas PHB/Prog a carga ativa foi encapsulada com uma elevada eficiência. Este fato deve-se ao caráter lipofílico da carga ativa, deste modo a progesterona não sofre rejeição pela matriz e é encapsulada em um núcleo central e uma parte encontra-se dispersa na matriz.

Tabela 12: Porcentagem da carga ativa total que foi encapsulada e carga.

Sistema	Porcentagem	Carga efetiva (mgProg/gPHB)
PHB(1)/Prog	99	198
PHB(2)/Prog	96	192
PHB(3)/Prog	98	196

5.2.5- Perfil de liberação associado ao sistema PHB/Prog.

Na Figura 29 são apresentados os perfis de liberação para as microcápsulas de PHB/Prog estudadas.

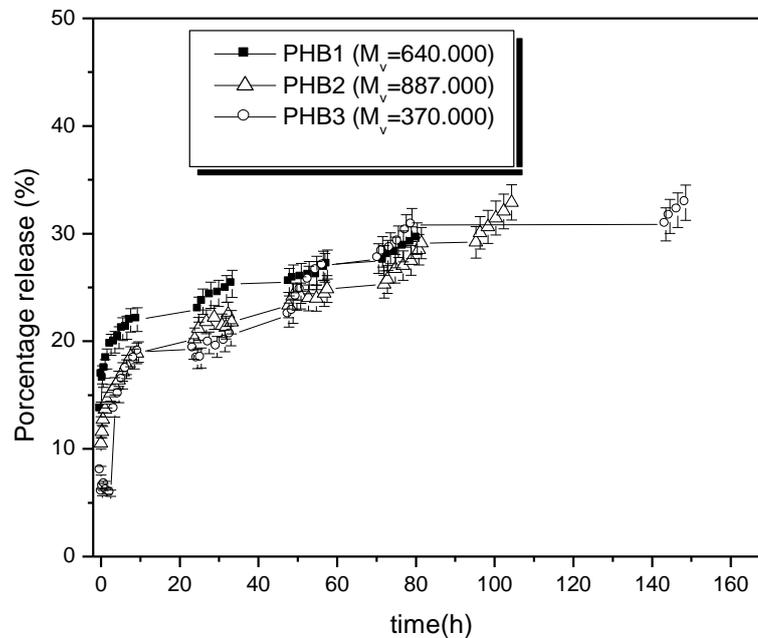


Figura 29: Perfil de liberação das microcápsulas de PHB/Prog obtidas por Spray Drying.

Nos perfis de liberação dos 3 diferentes PHBs (Figura 29) observa-se como característica geral a existência de um "burst" inicial, onde cerca de 18% da carga ativa teórica é liberada nas primeiras 7h para o PHB(2) e o PHB(3), enquanto uma porcentagem similar é liberada em apenas 2h pelo PHB(1). Isso indica que 18% da carga ativa estava próxima a superfície das microcápsulas, sendo liberada com maior rapidez do que a carga contida no núcleo, pois esta deve primeiro dissolver-se na matriz e então difundir até a superfície e ser liberada.

A presença da carga ativa próxima a superfície pode ser devida ao a um efeito de estocagem. Durante a estocagem a carga ativa dissolve-se na membrana que envolve o núcleo até que esta fique saturada.

O "burst" mais pronunciado para o PHB(1) deve-se ao maior tempo de estocagem destas microcápsulas, que foram preparadas dias antes das outras.

Esse "burst" inicial é encontrado em diversas formulações reportadas na literatura. Gangrade e Pricet (1991) observaram um "burst" com uma liberação de cerca de 30% de progesterona a partir de microcápsulas de PHB, após 1h de liberação. Este "burst" mais elevado observado pelos autores deve-se a presença de cristais de progesterona na superfície das microcápsulas e a maior rugosidade superficial destas, que leva a uma maior área superficial.

Para determinar a ordem da cinética de liberação da progesterona pelas microcápsulas de PHB foi feita uma correlação entre a morfologia interna por MET e modelo cinético que poderia ajustar-se a distribuição da carga ativa observada. É importante observar que para sistemas de liberação controlada com morfologia capsular e membrana não porosa a cinética de liberação mais encontrada é a de ordem zero e para sistemas monolíticos a cinética característica é a do tipo $t^{1/2}$ (Smith e Herbig;1992). Estes são casos extremos em que se tem uma morfologia única e bem definida, no entanto podem existir casos em que além de um núcleo central parte da droga esteja dispersa na membrana, dando lugar a uma cinética mais complexa.

Foram analisados os ajustes dos dados experimentais considerando os modelos cinéticos de perfis de liberação que descrevem: cinética de ordem zero e cinética $t^{-1/2}$ atendendo a morfologia observada (Figuras 30 e 31).

Para sistemas reservatórios: $dM/dt = kM^n$ Equação 19

Integrando a equação 19:

$$\text{para } n=0 \text{ (ordem zero)} \rightarrow M_t = kt + M_0 \quad \text{Equação 20}$$

Para sistemas de matriz: $n=1/2$

$$M_t = \left[\frac{2M_\infty S}{V} \left(\frac{D}{\pi} \right)^{1/2} \right] t^{1/2} \quad \text{Equação 21}$$

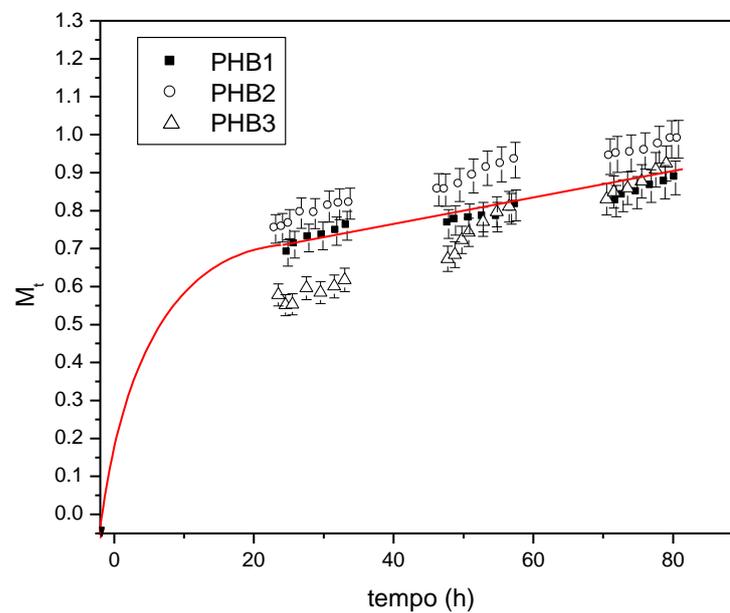


Figura 30: Correlação linear para liberação de ordem zero para as microcápsulas de PHB/Prog.

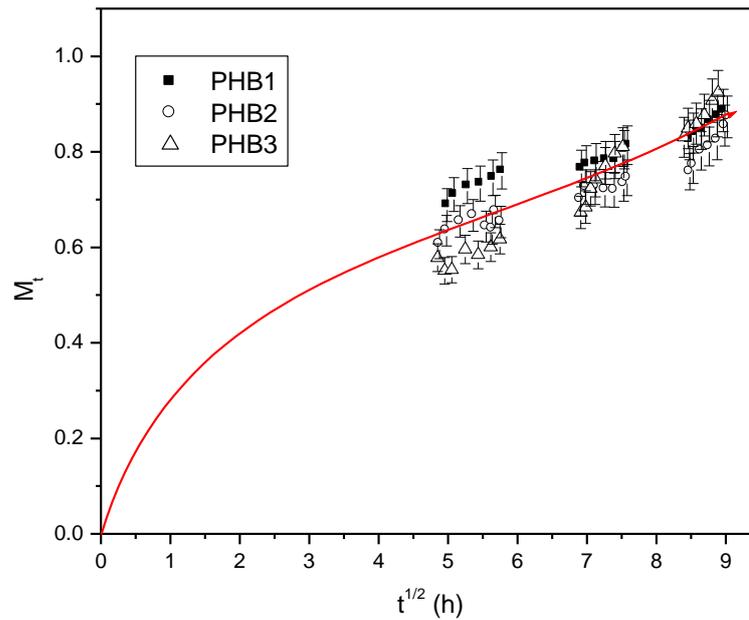


Figura 31: Correlação linear para liberação $t^{1/2}$ para as microcápsulas de PHB/Prog.

Na Tabela 13 são apresentados os valores do coeficiente de regressão linear, desvio padrão do ajuste para cinética de liberação de ordem zero efetuados para as microcápsulas de PHB/Prog e taxa de liberação da progesterona na matriz. Esses valores devem ser analisados para definir a cinética de liberação da carga ativa.

Tabela 13: Coeficiente de regressão linear (R), desvio padrão (S) do ajuste para cinética de liberação de ordem zero efetuados para as microcápsulas de PHB/Prog e taxa de liberação específica da progesterona na matriz (k_{prog}).

Matriz	R	S	$K_{\text{prog}} \times 10^3 \text{ (h}^{-1}\text{)}$
PHB(1)	0,945	0,34	3,37
PHB(2)	0,944	0,46	2,82
PHB(3)	0,969	0,64	6,38

Devido aos três ajustes efetuados apresentarem coeficientes de regressão linear muito próximos não é possível afirmar com que cinética as microcápsulas liberam a carga após o "burst" inicial. Através das micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão, onde se observa uma morfologia em geral capsular para os sistemas, podendo parte da carga ativa estar dispersa na membrana, pode-se considerar a cinética de liberação como sendo principalmente

de ordem zero. Desse modo a cinética de liberação pode ser descrita pela equação 20:

$$M_t = kt + M_0.$$

Onde k é constante de liberação específica da progesterona. O cálculo da taxa de liberação do sistema PHB/Prog para matrizes de massas moleculares diferentes foi realizado através do ajuste ao modelo cinético de ordem zero, sendo apresentados na Tabela 13. A constante de velocidade encontrada diminuiu com o aumento do peso molecular do polímero. Isto acontece devido a diminuição do volume livre com o aumento do peso molecular, conseqüentemente a mobilidade da carga ativa na membrana decresce, dificultando sua difusão.

O valor encontrado para a taxa de liberação é inferior ao valor encontrado por Gangrade e Price (1991) para a progesterona ($k = 0,048 \text{ h}^{-1}$). Esse menor valor para K_{prog} está relacionado com a morfologia interna e externa obtidas por simples emulsão.

De Sá (2000), preparou microcápsulas de PHB/TNA utilizando as técnicas de simples, dupla emulsão e de "Spray Drying" e estudou a relação entre a morfologia e a técnica de preparação empregada. As microcápsulas obtidas por "Spray Drying" apresentaram um núcleo central da carga ativa envolvido por uma membrana densa, nas técnicas de emulsão, além de um núcleo central, a autora observou a presença de microcanais para a simples emulsão e de canais na dupla emulsão. A autora observou que as microcápsulas obtidas pelas técnicas de emulsão apresentaram rugosidade superior. Como consequência destas diferenças nas morfologias, as microcápsulas obtidas pelas técnicas de emulsão apresentaram uma taxa de liberação superior, $K=0,34\text{h}^{-1}$ (simples emulsão) e $k=0,54\text{h}^{-1}$ (dupla emulsão) a encontrada para as microcápsulas formuladas empregando a técnica de "Spray Drying", $k=0,12\text{h}^{-1}$. Esses resultados comprovam a dependência da taxa de liberação com a morfologia das microcápsulas, que depende da técnica de obtenção empregada.

6- Conclusões

- Com base no estudo realizado com o poliestireno, o conjunto de parâmetros que levou a uma distribuição de tamanho de partícula com o máximo de distribuição foi:

-Temperatura de entrada (°C)	56
-Fluxo (NL/h)	600
-Aspirador (%)	95
-Bomba (mL/min)	0,5

- A progesterona apresenta um efeito plastificante na matriz o que modifica a morfologia das microcápsulas.
- A taxa de liberação não foi significativamente influenciada pelo Peso Molecular da matriz no intervalo de 300000 a 800000.
- As microcápsulas obtidas a partir do PHB(1), PHB(2) e PHB(3) apresentam uma cinética de liberação predominantemente de ordem zero, característica de sua morfologia capsular.
- O nível de liberação relativamente baixo atingido nas primeiras 70h indica a necessidade de modificar a matriz através da formulação de blendas com PHB que sejam menos hidrofóbicas, as quais possam facilitar o transporte da carga ativa até o meio de liberação.

7- Referências Bibliográficas

Akhtar S., Pouton C.W., Notarianni L.J., (1991). The Influence of Crystalline Morphology and Copolymer Composition on Drug Release from Solution Cast and Melt-processed P(HB-HV) Copolymer Matrices. *Journal of Controlled Release* 17, 225-234.

Alyautdin R., Gothier D., Petrov V., Kharkevich D., Kreuter J.(1995). Analgesic Activity of the Hexapeptide Dalargin Adsorbed on the Surface of Polysorbate 80-coated poly(butylcyanoacrylate) Nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 41, 44-48.

Arnold R.G., (1988). Controlled-Release New Animal Drugs. *Journal of Controlled Release* 8, 85-90.

Baggot J.D. (1988). Veterinary Drug Formulations for Animal Health Care: an Overview. *Journal of Controlled Release* 8, 5-13.

Baker R.W., Lonsdale H.K., (1974). Controlled Release: Mechanisms and Rates. In *Controlled Release of Biologically Active Agents*. Ed. Plenum Press, Nova Iorque. Ed. A.C. Tanquary e R.E. Lacey, p. 15-72.

Bissery M.C., Valeriotte F., Thies C., (1984). In Vitro and in Vivo Evaluation of CCNU-loaded Microspheres Prepared from Polylactide and Poliy(β -hydroxybutyrate). In: *Davis S.S., Illum J.G., McVie, Tomlinson (Eds), Microspheres and Drug Therapy, Pharmaceutical, Immunological and Medical Aspects*, Elsevier, Amsterdam, 217-227.

Bissery M.C., Valeriotte F., Thies C., (1984). In Vitro lomustine release from Small Poliy(β -hydroxybutyrate) and poly(DL-lactide) microspheres. *Proc. Int. Symposium. Controlled Release Bioactives Materials*. 12, 25-26.

Bissery M.C., Valeriotte F., Thies C., (1985). Fate and Effect of CCNU-loaded microspheres made of poly(DL-lactide) or Poliy(β -hydroxybutyrate) in mice. *Proc. Int. Symposium. Controlled Release Bioactives Materials*. 12, 69-70.

Borchardt G., Kenneth L.A., Fenlin S., Kreuter J., (1994). Uptake of Surfactant-coated Poly(methyl methacrylate)-nanoparticles by Bovine Brain Microvessel Endothelial Cell Monolayers. *International Journal of Pharmaceutics* 110, 29-35.

Breitenbach A., Mohr D., Kissel T., (2000). Biodegradable Semi-crystalline Comb Polyesters Influence the Microsphere Production by Means of a Supercritical Fluid Extraction Technique (ASES). *Journal of Controlled Release* 63, 53-68.

Brophy M.R., Deasy P.B., (1986). In Vitro and in Vivo Studies on biodegradable polyester microparticles containing sulphamethizole. *International Journal of Pharmaceutics* 29, 223-231.

Brunstedt M.R., Anderson J.M., (1992). Materials for Drug Delivery. In *Materials Science and Technology*. Nova Iorque. 4ª edição. Ed. VCA, p. 377-413.

Calvo P., Vila-Jato J.L., Alonso M.J., (1996). Comparative in Vitro Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules and Nanoemulsions as Ocular Drug Carriers. *Journal of Pharmaceutics Science* 85, 530-536.

Carter D.H., Luttinger M., Gardner D. L., (1988). Controlled Release Parenteral Systems for Veterinary Applications. *Journal of Controlled Release* 8, 15-22.

Cavallaro G., Fresta M., Giammona G., Puglisi G., Villare A.(1994). Entrapment of β -Lactams Antibiotics in Polyethylenecyanoacrylate Nanoparticles: Studies on the Possible in Vivo Application of this Colloidal Delivery System. *International Journal of Pharmaceutics* 111, 31-41

Cardinal J.R., (1985). Controlled Drug Delivery: Veterinary Applications. *Journal of Controlled Release* 2, 393-403.

Clarke N., O'Connor K., Ramtoola Z., (1998). Influence of Formulation Variables on the Morphology of Biodegradable Microparticles Prepared by Spray Drying. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 24 (2), 169-174.

Conway B.R., Eyles J.E., Alpar H.O., (1997). A Comparative Study on the Immune responses to Antigens in PLA and PHB microspheres. *Journal of Controlled Release* 49, 1-9.

Crosby E.J., Marshall W.R., (1958). Effects of Drying Conditions on the Properties of Spray-dried Particles. *Chemical Engineering Progress* 54, 56-63.

Crowe C.T. (1980), *Advances in Drying*, New York, Hemisphere Publishing Corporation, 63-64p.

Dawes E.A., Senior P.J., (1973). The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Microorganisms. *Advances in Microbial Physiology* 10, 135-266.

De Sá J.S.M., (2000). Formulação e Caracterização de Micropartículas de PHB/TNA com Potencial em Aplicações Médicas. Tese (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais). Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense-UENF, 81p.

Deasy P.B., Collins A.E.M., MacCarthy D.J., Russel R.J., (1989). Use of Strips Containing Tetracycline Hydrochloride for the Treatment of Advanced Periodontal Disease. *Journal of Pharmaceutical Pharmacology* 41, 694-699.

DeLoach J.R., Barton C., Tangner C.H., (1984). Hepatic Targeting of Carrier Erythrocytes in Dogs. *11th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*, Controlled Release Society, 38-39.

Doyle C., Bonfield W., (1988). Biodegradable Composites. In: S.A. Paipets and G.C. Papanicolaou (Eds), *Engineering Applications of New Composites*, Omega Scientific, Wallingford, 114-118.

Dubernet C., (1995). Thermoanalysis of Microspheres. *Thermochimica Acta* 248, 259-269.

Duffie J.A., Marshall Jr W.R., (1953). Factors Influencing the Properties of Spray-Dried Materials. *Chemical Engineering Progress* 49 (8), 417-423.

Dunn R.L., Cowsar D.R., Gibson J.W., Perkins B.H., (1985). Mechanisms and Applications of Fibrous Delivery Systems for Agricultural/Veterinary Products, *13th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*, Controlled Release Society, 337-338.

Eligio T.C., (2000). Polímeros Bacterianos. Matrizes Poliméricas e Liberação Controlada de Agentes Ativos. Exame de Qualificação (Doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais), Campos dos Goytacazes-RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense-UENF, 55p.

Embleton J.K., Tighe B.J., (1992). Polymers for Biodegradable Medicals Devices. 9. Microencapsulation Studies- Effects of polymer composition and Process Parameters on Poly-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate microcapsules morphology via Polycaprolactone Blending. *Journal of Microencapsulation* 9, 73-87.

Embleton J.K., Tighe B.J., (1993). Polymers for Biodegradable Medicals Devices. 10. Microencapsulation Studies-control of Poly-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate microcapsules porosity via Polycaprolactone Blending. *Journal of Microencapsulation* 10, 341-352.

Finch C.A., (1985). Polymers for Microencapsulation Walls. *Chemistry Industry*, 782-786.

Gangrade N., Price J.C., (1991). Poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) Microspheres Containing Progesterone: Preparation, Morphology and Release Properties. *Journal of Microencapsulation* 8, 185-202.

Gardner D., Hoffsis G., Kersting K., Benton B., Metz B., Stuhlfauth G., (1983). Development of a Magnesium Dosage Form for Treatment of Hypomagnesemia. *10th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*, Controlled Release Society, 57-66.

Gursel I., Hasirci V., (1995). Properties and Drug-release Behaviour of poly(3-hydroxybutyric Acid) and Various Poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) Copolymer Microcapsulas. *Journal of Microencapsulation* 12, 185-193.

Hasirci V., Lewandrowski K., Gresser J.D., Wise D.L., Trantolo D.J., (2001). Versatility of Biodegradable Biopolymers: Degradability and na in vivo Application. *Journal of Biotechnology* 86, 135-150.

Higuchi T. , (1963).Mechanism of Sustained-Action Medication. Theoretical Analysis of Rate of Release of Solid Drugs Dispersed in Solid Matrices. *Journal of Pharmaceutic Science* 52, 1145-1149.

Hsieh D.S.T., Smith N., Chien Y.W., (1984). Subcutaneous Controlled Administration of Estradiol from Compudose® Implants: *In Vitro* and *In Vivo* Evaluations. *11th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*, Controlled Release Society, 134-135.

IPT, (2002). Brasil aperfeiçoa plástico que não agride meio ambiente; <http://www.ipt.br/impresna/midia/?ID=853> em 02/07/03 página mantida pelo IPT.

Jaffe H., Giang P.A., Miller J.A., (1978). Implants of Methroprene in Poly(lactic acid) Against Cattle Grubs, *5th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*, Controlled Release Society, 5.5-5.11.

Jaffe H., Miller J.A., Giang P.A., Hayes D.K., (1980). Implantable Systems for Delivery of Insect Growth Regulators in Liverstock-II. *7th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*, Controlled Release Society, 97-100.

Jaffe H., Hayes D.H.,(1983). Controlled Release Reservoir Systems for the Delivery of Insect Steroid Analogues Adaisnt Ticks. *10th International Symposion on Controlled Release of Bioactives Materials*, Controlled Release Society 67-70.

Jalil R., Nixon J.R., (1990). Biodegradable Poly(lactic acid) and Poly(lactide-co-glycolide) Microcapsules: Problems Associated with Preparative Techniques and Release Properties. *Journal of Microencapsulation* 7, 297-325.

Juni K., Nakano M., (1987). Poly(hydroxy Acids) in Drug Delivery. *CRC Criticals Reviews Therapy Drug Carrier Systems* 3, 209-232.

Juni K., Nakano M., Kubota M., (1986). Controlled Release of Aclarubirin, an Anticancer Antibiotic from Poly(β -hydroxybutyrate) microspheres. *Journal of Controlled Release* 4, 25-32.

Kawaguchi T., Tsugane A., Higashide K., Endoh H, Hasegawa T., Kanno H., Seki T., Juni K., Fukushima S., Nakano M., (1992). 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 Science* 81, 508-512.

Kennedy J.E., Notarianni L.J., Pouton C.W., (1987). Biocompatibility of a Biodegradable Polyester in Rats. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology* 39, 58.

Kennedy J.E., Notarianni L.J., Pouton C.W., (1988). Assessment of the Cellular Toxicity of a Biodegradable Polyester. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology* 40, 33.

Kent J.S., Vickery B.H., Mc Era G.I.,(1980). The use of a Cholesterol Matrix Pellet Implant for Early Studies on the Prolonged Release in Animals of Agonist Analogues of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone, *7th International Symposium on Controlled Release of Bioactives Materials*, Controlled Release Society, 67-76.

Kessler D.J., Cruz L.C., McKenzie J.A., Henderson E.A., (1986). The Effect of the GnRH Burst Release on the Efficacy of GnRH Microcapsules. *13th International Symposium on Controlled Release of Bioactives Materials*, Controlled Release Society, 54-55

Konnig W., Seidel H.R., Sandow J.K., (1984). *European Patent N^o 133988*.

Koosha F., Muller R.H, Washington C.W., (1987). Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) nanoparticles for Drug Targeting. *Journal of Pharmaceutical Pharmacology* 39, 136.

Koosha F., Muller R.H., Davis S.S. (1988). A Continuous Flow System for in Vitro Evaluation of Drug-loaded Biodegradable Colloid Carriers. *Journal of Pharmaceutical Pharmacology* 40, 131.

Koosha F., Muller R.H., Davis S.S. (1989). Polyhydroxybutyrate as Drug Carriers. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carriers Systems* 6 (2), 117-129.

Kubota m., Nakano M., Juni K., (1988). Mechanism of Enhancement of the Release Rate of aclarubirin from poly(3-hydroxybutyrate) microspheres by Fatty Acid Esters. *Chemical Pharmaceutical Bull.* 36, 333-337.

Latha M.S., Lal A.V., Kumary T.V., Sreekumar R., Jayakrishnan A., (2000). Progesterone Release from Glutaraldehyde Cross-linked Casein Microspheres: *In Vitro Studies and In Vivo Response in Rabbits*. *Contraception* 61(5), 329-334.

Leavy M.Y., Benita S., (1990). Drug Release from Sunmicrom O/W Emulsion: A new in Vitro Kinetic Evaluation Model. *International Journal of Pharmaceutics* 66, 29-37.

Leong K.W., Langer R., (1987). Polymeric Controlled Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1, 199-233.

LeRay A.M., Vert M., Gautier J.C., Benoit J.P., (1994). End-chain Radiolabeling and in Vitro Stability Studies of Radiolabeled Poly(hydroxy) Nanoparticles. *Journal of Pharmaceutics Science* 83, 845-851.

Mares S.E.,(1978). Synchronization of Estrus in the Bovine with Syncro-Mate-B® , A-Hydron® Ear Implant, *5th International Symposium on Controlled Release of Bioactives Materials*, Controlled Release Society, 830-855.

McLeod B.J., Haresign W., Peters A.R., Humke R., Lamming G.E., (1988). The Development of Subcutaneous Delivery Preparations of GnRH for the Induction of Ovulation in Acyclic Sheep and Cattle. *Animal Reproduction Science* 17, 33-50.

Miller J.A., Drummond R.O., Oehler D.D.,(1981). A Sustained Release Implant for Delivery of Ivermectin for Control of Livestock Pests. *8th International Symposium on Controlled Release of Bioactives Materials*, Controlled Release Society, 276-280.

Moura T.F., Gaudy D., Jacob M., Terol A., Pauvert B., Chauvet A., (1996). Vitamin C Spray Drying: Study of the Thermal Constraint. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 22(5), 393-400.

Nebel R.L., Fultz S.W., Saacke R.G.,(1986). A Series of Studies on the Microencapsulation of Bovine Spermatozoa. *13th International Symposium on Controlled Release of Bioactives Materials*, Controlled Release Society, 214-215.

Pouton C.W., Akhtar S., (1996). Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their Potential in Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 18, 133-162.

Pouton C.W., (2001). Polymeric Materials for Advanced Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 53, 1-3.

Pouton C.W., Kennedy J.E., Notarianni L.J., Gould P.L. (1988). Biocompatibility of Polyhydroxybutyrate and Related Copolymers. *Proc. International Symposium Controlled Release Bioactives Materials* 15, 179-180.

Rankin F.S., (1986). Physical Property Requirements of Silicones Incorporated into Controlled Release Devices, *13th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*, Controlled Release Society, 218-291.

Rê M.I., (2000), *Revista Ciência Hoje*, vol.27, nº 162.24-29, Brasil.

Reddy C.S.K., Ghai R., Rashmi, Kalia V.C., (2003). Polyhydroxyalkanoates: an Overview. *Bioresource Technology* 87, 137-146.

Rognoni G., (1996). Prospective Uses of Microencapsulation in Veterinary and Zootechnical Practice. *Institute Zootechnic University of Milan*, Italy, 139-141.

Sá, J.S.M. (2000). Formulação e Caracterização de micropartículas de PHB/TNA com potencial em Aplicações Médicas. Tese (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, 98p.

Scaletta C., Christensen D.C., Kesler D.J., (1986). Testosterone and Estradiol Therapy Via Polydimethylsiloxane Inplants: The Effect of Estratification, *13th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*, Controlled Release Society 224-225.

Sendil D., Gürsel I., Wise D.L., Hasirci V., (1999). Antibiotic Release from Biodegradable PHBV Microparticles. *Journal of Controlled Release* 59, 207-217.

Smith K.L., Hergi S.M., (1992), Controlled Release. *In: Membrane Handbook*, Nova Iorque, 915.

Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Kulkarni A.R., Rudzinski W.E., (2001). Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Devices. *Journal of Controlled Release* 70, 1-20.

Sudekum R.H. Microcapsules for Topical and other Applications. *3M United Kingdom Ltd*, London, England.

Theeuwes F., Hussain A., Higuchi T., (1974). Quantitative Analytical Methode for Determination of Drugs Dispersed in Polymers Using Differential Scanning Calorimetry. *Journal of Pharmaceutics Science* 63, 427-429.

Thies C., (1989). Dispersed Systems for Parental Administration. In *Controlled Release of Drugs. Polymer and Agregate Systems*. Washington. Ed. Morton Rosoff, p. 97-123.

Williams D.F., (1986). Techniques of Biocompatibility Testing. *CRC Press*, Boca Raton, Fl, Vol.2.