

FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA E VETORIZADA A PARTIR DE P3HB e P3(HB-co-HH_x)

MAYARA DE FREITAS E CASTRO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JULHO – 2018

**FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS DE
LIBERAÇÃO CONTROLADA E VETORIZADA A PARTIR DE P3HB e
P3(HB-co-HH_x)**

MAYARA DE FREITAS E CASTRO

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obter o título de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais”.

Orientador: Prof. Rubén J. Sánchez Rodríguez

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

C355 Castro, Mayara de Freitas e.

Formulação e caracterização de sistemas de liberação controlada e vetorizada a partir de P3HB e P3(HB-co-HHX) / Mayara de Freitas e Castro. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

102 f. : il.

Bibliografia: 88 - 102.

Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciência e Tecnologia, 2018.
Orientador: Rubén Jesus Sánchez Rodriguez.

1. Liberação controlada e vetorizada. 2. poli 3-(hidroxitirato-co-hidroxi-hexanoato). 3. nanomagnetita. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 620.11

**FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS DE
LIBERAÇÃO CONTROLADA E VETORIZADA A PARTIR DE P3HB e
P3(HB-co-HH_x)**

MAYARA DE FREITAS E CASTRO

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obter o título de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais”.

Área de concentração: Polímeros e Compósitos

Aprovada em 13 de julho de 2018

Banca Examinadora:

Prof^a. Márcia Giardinieri de Azevedo (D. Sc., Engenharia Química) – UENF/CCT

Prof. José Frederico Straggiotti Silva (D.Sc., Medicina Veterinária) – UENF/CCTA

Prof. Marlon de Freitas Abreu (D.Sc., Química) – UniRedentor

Prof. Rubén J. Sánchez Rodríguez (D.Sc., Ciências Químicas) – UENF/CCT (Orientador)

“Dedico esse trabalho a memória dos meus amados avós e marido Jhonatan Teixeira.”

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus autor da vida por estar sempre ao meu lado segurando em minha mão nos momentos mais difíceis.

Aos meus amados pais, Jonatas e Célia, por serem meu porto seguro e por todo amor a mim depositado. Ao meu marido, Jhonatan Maciel (*in memoriam*) por ter me amado e estado ao meu lado sempre me encorajando a seguir em minha caminhada e mesmo hoje não estando mais aqui, pelas lembranças maravilhosas que guardo em meu coração.

Agradeço também a todos os meus familiares e amigos pelo carinho e por estarem sempre presentes em minha vida, nos bons momentos e nos mais difíceis, quando precisei de colo e de abraço.

Ao meu orientador Doutor Rúbens Sánchez por me passar um pouco dos seus conhecimentos, me orientando neste trabalho com carinho e dedicação. E aos demais professores do programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais pelos ensinamentos que contribuíram para a construção da minha vida acadêmica.

Aos meus colegas de laboratório por sempre estarem disponíveis, me ajudando a completar mais esta etapa da minha vida acadêmica: Darlan, Ellen, Magno, Gabriel, Mariana, Marcos, Katia, Frirlei, Larissa e demais. Vocês tornaram os meus dias mais leves e agradáveis.

Gostaria de agradecer ao professor Djalma Souza pelas micrografias obtidas no microscópio Eletrônico de Varredura. À Barbara pelas imagens obtidas no microscópio confocal. Ao laboratório de fisiologia vegetal bioquímica e metabolismo de plantas (LMGV/CCTA/UENF) por disponibilizar o Espectrofotômetro. À Yandira Barros e ao Laboratório de Caracterização de Materiais, localizado no Instituto Federal do Espírito Santo – IFES – Campus Vitória, pelo suporte na realização da análise de DRX. Ao professor José Augusto pela ajuda no estudo do campo magnético. À Universidade de São Paulo (USP) pelo fornecimento do copolímero hidroxibutirato com 5,85% em mol de hidrixihexanoato P3(HB-co-HHx).

À CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro e a UENF pela estrutura física e oportunidade oferecida para a realização deste trabalho.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para este estudo, deixo o meu muito obrigado!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivo geral	3
1.1.2 Objetivos específicos	3
1.2 Justificativas	4
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Sistemas de liberação controlada e vetorizada de fármacos	5
2.2 Polihidroxiálcanoatos	11
2.2.1 Poli 3-hidroxi-butirato (P3HB)	13
2.2.2 Poli 3-(hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato) - P3(HB-co-HV)	14
2.2.3 Poli 3-(hidroxi-butirato-co-hidroxi-hexanoato - P3(HB-co-HHx)	15
2.3 Técnicas de microencapsulação	17
2.4 Nanopartículas magnéticas	24
2.4.1 Magnetita	27
2.4.2 Síntese de nanopartículas magnéticas pela técnica de coprecipitação	28
2.4.3 Uso de nanopartículas magnéticas na liberação controlada e vetorizada	30
2.5 Progesterona	33
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Materiais	36
3.2 Nanopartículas magnéticas (magnetita)	37

3.3 Formulação e Caracterização das micropartículas contendo nanomagnetita e progesterona (PHAs/nM/Pg)	38
3.3.1 Formulação das micropartículas magnéticas de polihidroxialcanoatos contendo progesterona (PHAs/nM/Pg)	38
3.3.2 Caracterização na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) dos poli 3-hidroxialcanoatos utilizados como matriz	39
3.3.3 Análise termogravimétrica (TGA)	39
3.3.4 Determinação da Eficiência de Encapsulação (%) de progesterona nas formulações utilizando P3HB e P3(HB-co-HHx)	40
3.3.5 Distribuição de tamanho	41
3.3.6 Morfologia externa das formulações	42
3.3.7 Cristalinidade da matriz polimérica	42
3.3.8 Estudo da liberação da progesterona nas formulações de P3HB e P3(HB-co-HHx)	43
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
4.1 Caracterização dos polihidroxialcanoatos <i>in natura</i>	46
4.1.1 Caracterização na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) dos polihidroxialcanoatos utilizados como matriz	46
4.2 Caracterização das formulações contendo progesterona e nanomagnetita (PHAs/nM/Pg)	47
4.2.1 Análise termogravimétrica (TGA)	47
4.2.2 Determinação da Eficiência de Encapsulação (%) de progesterona nas micropartículas de P3(HB-co-HHx)	50
4.2.3 Distribuição de tamanho	51
4.2.4 Morfologia externa das micropartículas	55
4.2.5 Cristalinidade das matrizes poliméricas	58
4.2.6 Estudo da liberação da progesterona das micropartículas de P3HB e P3(HB-co-HHx)	61
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES	69

SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO PRESENTE ESTUDO	70
CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Perfil de concentração plasmático de um fármaco no tempo para um sistema de liberação controlada e para um sistema de liberação convencional.....	5
Figura 2 – Modelo da estrutura dos diferentes tipos de micropartículas.....	7
Figura 3 – Estrutura química geral dos PHAs (Braunegg <i>et al.</i> , 1998). Onde “n” representa o numero de monômeros presentes na estrutura do polímero e “R” representa a posição onde um radical é introduzido na estrutura.	111
Figura 4 – Estrutura geral dos polihidroxialcanoatos (Hazer <i>et al.</i> , 2012).....	12
Figura 5 – Estrutura geral dos P3(HB-co-HHx) (Ke <i>et al.</i> , 2012).....	15
Figura 6 – Ciclo de histerese típico de materiais: a) superparamagnéticos, b) e c) ferromagnéticos (Mody <i>et al.</i> , 2014 - adaptado).....	26
Figura 7 – Nanopartícula sendo envolvida por moléculas de surfactante (Atta <i>et al.</i> , 2014 - adaptado).....	27
Figura 8 – Estrutura cristalina da magnetita (Oliveira <i>et al.</i> , 2012).....	28
Figura 9 – Representação esquemática de sistema magnético de liberação de fármacos sendo direcionado as células cancerígenas sobre a influência de um campo magnético externo (Mody <i>et al.</i> , 2014 - adaptado).....	30
Figura 10 – Esquema de um sistema de liberação controlado pela resposta térmica mediante aplicação de um campo magnético (Liu <i>et al.</i> , 2009 - adaptado).	31
Figura 11 – Estrutura Química da progesterona (Brasil, 2010).....	33
Figura 12 – Difratoograma de raio-X da magnetita sintetizada (Bôa Morte, 2017).....	37
Figura 13 – Micrografia eletrônica de Transmissão das nanomagnetitas (Bôa Morte, 2017).....	37
Figura 14 – Reator (IKA-250) localizado no setor de polímeros no LAMAV-UENF com o Ultraturrax (IKA, T-25) acoplado.....	38

Figura 15 – Curva de calibração de progesterona em etanol/água 60%.....	41
Figura 16 – Esquema ilustrativo do sistema utilizado para o estudo da liberação sem presença de campo magnético.....	43
Figura 17 – Visão superior (a) e lateral (b) do equipamento utilizado para aplicar o campo magnético pulsante nas amostras.	44
Figura 18 – Osciloscópio usado para medir a frequência de giro do motor e observar o comportamento da onda magnética.....	44
Figura 19 – Espectro no Infravermelho do a) P3(HB-co-HHx) <i>in natura</i> e b) P3HB <i>in natura</i>	46
Figura 20 – Espectro do Infravermelho do a) P3(HB-co-HHx) + progesterona e b) P3HB + progesterona <i>in natura</i>	47
Figura 21 – Termograma das micropartículas de P3HB, P3HB/nM/Pg, P3(HB-co-HHx), P3(HB-co-HHx)/nM/Pg.....	48
Figura 22 – Termograma DTGA das micropartículas de P3HB, P3HB/nM/Pg, P3(HB-co-HHx), P3(HB-co-HHx)/nM/Pg.....	49
Figura 23 – Distribuição de tamanho referente às micropartículas de P3HB e ao lado uma das imagens utilizadas para analisar o tamanho dessas partículas.....	52
Figura 24 – Distribuição de tamanho referente às micropartículas de P3HB/nM e ao lado uma das imagens utilizadas para analisar o tamanho dessas partículas.....	52
Figura 25 – Distribuição de tamanho referente às micropartículas de P3HB/nM/Pg e ao lado uma das imagens utilizadas para analisar o tamanho dessas partículas.....	52
Figura 26 – Distribuição de tamanho referente às micropartículas de P3(HB-co-HHx) e ao lado uma das imagens utilizadas para analisar o tamanho dessas partículas.....	53

Figura 27 – Distribuição de tamanho referente às micropartículas de P3(HB-co-HHx)/nM e ao lado uma das imagens utilizadas para analisar o tamanho dessas partículas.....	53
Figura 28 – Distribuição de tamanho referente às micropartículas de P3(HB-co-HHx)/nM/Pg e ao lado uma das imagens utilizadas para analisar o tamanho dessas partículas.....	54
Figura 29 – Imagens obtidas por MEV das micropartículas preparadas por simples emulsão de P3HB.....	56
Figura 30 – Imagens obtidas por MEV das micropartículas preparadas por simples emulsão de P3HB/nM/Pg.....	56
Figura 31 – Imagens obtidas por MEV das micropartículas preparadas por simples emulsão de P3(HB-co-HHx).....	57
Figura 32 – Imagens obtidas por MEV das micropartículas preparadas por simples emulsão P3(HB-co-HHx)/nM/Pg.....	57
Figura 33 – Difratomogramas de Raios-X das micropartículas de P3HB e P3HB/nM/Pg.....	58
Figura 34 – Difratomogramas de Raios-X das micropartículas de P3(HB-co-HHx) e P3(HB-co-HHx)/nM/Pg.....	59
Figura 35 – Deconvolução dos Difratomogramas de Raio-X dos transportadores de A) P3HB; B) P3HB/nM/Pg; C) P3(HB-co-HHx); D) P3(HB-co-HHx)/nM/Pg.....	60
Figura 36 – Medidas do Osciloscópio do campo magnético gerado pelos ímãs que giram a frequência de 53 Hz.....	62
Figura 37 – Perfis de liberação da progesterona na presença e na ausência de campo magnético externo pulsante, para as micropartículas de P3HB/nM/Pg e P3(HB-co-HHx)/nM/Pg.....	63
Figura 38 – Correlação linear para a Liberação de ordem zero, primeira ordem e $t^{1/2}$ para as micropartículas de P3HB.....	66

Figura 39 – Correlação linear para a Liberação de ordem zero, primeira ordem e $t^{1/2}$ para as micropartículas de P3(HB-co-HHx).....67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de propriedades térmicas e mecânicas de alguns PHAs (Nigmatullin <i>et al.</i> , 2015).....	12
Tabela 2 – Efeito da concentração de surfactante, razão polímero/solvente e taxa de homogeneização no tamanho das nanopartículas de P3(HB-co-HHx)) (Kiliçay <i>et al.</i> , 2011).....	23
Tabela 3 – Comportamento Térmico das micropartículas.....	49
Tabela 4 – Eficiência de encapsulação da progesterona dos transportadores de P3HB e P3(HB-co-HHx) contendo nanomagnetita.....	50
Tabela 5 – Tamanho médio e rendimento obtido de cada tipo de transportadores.....	55
Tabela 6 – Cristalinidade das micropartículas.....	60
Tabela 7 – Dados referentes à quantidade de progesterona liberada (%) das formulações em 96 horas na presença e na ausência de campo magnético pulsante.....	62
Tabela 8 – Coeficiente de regressão linear dos ajustes feitos para cinética de diferentes ordens.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$(C_2H_4O)_n$ – Álcool Polivinílico

$C_{18}H_{34}O_2$ – Ácido Oleico

$C_{21}H_{30}O_2$ – Progesterona

CCT – Centro de Ciências e Tecnologia

CCTA – Centro de Ciências e Tecnologia Agrária

CH_3CH_2OH – álcool etílico

$CHCl_3$ – Clorofórmio

DRX – Difração de Raios-X

$Fe(OH)_3$ – Hidróxido de ferro III

Fe_3O_4 – Magnetita

FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

HHx – co-monômero hidroxihexanoato

KBr – Brometo de potássio

LAMAV – Laboratório de materiais avançados

LMG – Setor de fisiologia vegetal bioquímica e metabolismo de plantas

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

Nd-Fe-B – liga de neodímio, ferro e boro

P3HB – Poli 3-hidroxibutirato

P3HB *in natura* – Poli 3-hidroxibutirato em pó conforme recebido do fabricante

P3(HB-co-HHx) – Poli 3-(hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato)

P3(HB-co-HHx) *in natura* – Poli 3-(hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato) em pó conforme recebido

P3(HB-co-HHx)/nM/Pg – Micropartículas de Poli 3-(hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato) contendo nanomagnetita e progesterona

P3(HB-co-HV) – Poli 3-(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

P3HB/nM/Pg – Micropartículas de Poli 3-hidroxibutirato contendo nanomagnetita e progesterona

PCL – Poli- ϵ -caprolactona

PHAs – Polihidroxialcanoatos

PHAs/nM/Pg – Micropartículas de Polihidroxialcanoatos contendo nanomagnetita e progesterona

PLGA – Poli(lactide-co-glicólico)

PTX – Paclitaxel

PVA – Poli(acetate de vinila)

SCLV- Sistemas de liberação controlado e vetorizados

SEPOL – Setor de Polímeros

$t^{1/2}$ – Cinética do tipo Higuchi

TGA – Análise termogravimétrica

TNA – Tionicotinamida

UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

USP – Universidade de São Paulo

RESUMO

Os polihidroxialcanoatos, por serem biocompatíveis e biodegradáveis, são materiais a serem considerados na formulação de sistemas de liberação controlado e vetorizados (SCLV). Na área da veterinária, estes SCLV podem ser muito úteis para controlar a sincronização do estro de equinos, por intermédio da liberação controlada da progesterona. Uma das maneiras promissoras de controlar a liberação e direcioná-la ao local desejado é através da interação entre partículas superparamagnética, contidas na matriz portadora, com um campo magnético externo. Assim, no presente trabalho são formuladas e caracterizadas matrizes de Poli 3-(hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato) (P3(HB-co-HHx)) e poli 3-hidroxibutirato (P3HB) contendo nanopartículas magnéticas e progesterona, com a finalidade de serem usadas em liberação controlada e vetorizada na veterinária para sincronização do estro de equinos. Para esse fim, as formulações utilizando os dois poli 3-hidroxialcanoatos foram produzidas pelo método de simples emulsão (O/W), onde a fase orgânica, composta de polímero, clorofórmio, magnetita e progesterona, é emulsificada em uma fase aquosa e posteriormente o solvente é evaporado para que ocorra a formação das micropartículas. As imagens de MEV mostraram que os transportadores apresentaram uma geometria esférica com superfície irregular e distribuição de tamanho larga com partículas de tamanho entre 2-100 μm para o P3HB e entre 2-72 μm para o P3(HB-co-HHx). A análise de DRX mostrou que a cristalinidade do P3HB diminuiu nas formulações contendo progesterona e magnetita. Por esse motivo, a cristalinidade dos dois sistemas poliméricos estudados ficou próxima, o que resultou em um perfil de liberação da progesterona similar. O estudo do perfil de liberação dos transportadores apresentou um “*burst*” inicial de aproximadamente 2% antes da primeira hora e ocorreu um incremento entorno de 12% da taxa de liberação na presença de um campo magnético externo.

Palavras Chaves: Liberação controlada e vetorizada, poli 3-(hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato), Progesterona, nanomagnetita.

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates, due to being biocompatible and biodegradable, may be used as the matrix in systems for vectorized and controlled release. In veterinary medicine, these systems may be useful to control estrus synchronization in mares, by means of the controlled release of progesterone. One of the promising approaches to control the release and to direct it toward the desired region is by the interaction of supermagnetic particles with an external magnetic field. Thus, this work formulates and characterizes P3(HB-co-HHX) and poly 3-hydroxybutyrate (P3HB) loaded with progesterone and nanomagnetic properties, in order to be used in veterinary medicine as vectorized and controlled release for estrus synchronization in mares. For this purpose, formulations using the two poly 3-hydroxyalkanoates were produced by the simple emulsion method. The organic phase, which consisted of polymer, chloroform, magnetite and progesterone, was emulsified in an aqueous phase and subsequently the solvent was evaporated so that the formation of the microparticles occurred. SEM images showed that the carriers had a spherical geometry with irregular surface and wide-size distribution, with particles of size between 2-100 μm for P3HB and 2-72 μm for P3 (HB-co-HHx). XRD analysis showed that P3HB crystallinity decreased in formulations containing progesterone and magnetite. Therefore, the crystallinity of the two polymer systems was close, resulting in a similar progesterone release profile. The study of the release profile of the carriers showed an initial burst of approximately 2%, before the first hour. Also, a swell of around 12% of release rate occurred in the presence of an external magnetic field.

Keywords: Vectorized and controlled release, poly 3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate), progesterone, nanomagnetite.

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

O surgimento da ideia de usar polímeros na liberação controlada de agentes ativos remota dos anos 60, porém naquela época se usava polímeros não degradáveis o que implicava na necessidade de remoção cirúrgica, o que limitava sua aplicabilidade (Freiberg e Zhu, 2004). Esse inconveniente começou a ser superado nos anos 70, quando os polímeros biodegradáveis começaram a ser usados para a administração controlada de fármacos. A partir de então, os estudos sobre a liberação controlada de agentes ativos cresceram e esse tema se tornou interessante para diversas áreas como na agricultura, na indústria de produtos cosméticos, na medicina, na veterinária, entre outras (Gangrade e Price, 1991; Freiberg e Zhu, 2004; Campos *et al.*, 2013).

A liberação controlada e vetorizada de agentes ativos apresenta várias vantagens em relação à liberação convencional. A liberação convencional apresenta uma série de limitações como à falta de especificação para o local patológico e mudanças cíclicas na concentração do fármaco na corrente sanguínea. Já na liberação controlada e vetorizada, o fármaco é direcionado ao local desejado evitando efeitos colaterais e a liberação ocorre de forma controlada e constante, podendo ajustar e otimizar a taxa de liberação do fármaco (Dash e Cudworth, 1998).

Entre os polímeros utilizados como matriz, os polihidroxicanoatos (PHAs) vêm se mostrando atraente para a medicina e veterinária, pois reúne características como biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade (Zinn *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2003). Dentre os PHAs, o poli 3-(hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato) (P3(HB-co-HHx)) pode ser usado como matriz em liberação controlada de agentes ativos, pois além de possuir as características já mencionadas, sua cristalinidade pode ser modificada conforme o teor do co-monômero hidroxihexanoato (HHx) na molécula, o que permite modificar a taxa de agente ativo que é liberado da matriz (Wang *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2012).

Para aprimorar a liberação controlada e vetorizada de fármacos, as nanopartículas magnéticas podem ser inseridas nos sistemas que utilizam biopolímeros. Nesse caso, o uso de um campo magnético externo pode conduzir as partículas ao local em que se deseja a ação do fármaco e controlar a velocidade da liberação (Parveen *et al.*, 2012).

O estudo da manipulação do ciclo estral de equinos têm se tornado importante devido à necessidade de uma maior eficiência reprodutiva. A progesterona é um hormônio frequentemente utilizado para controlar as funções reprodutivas, porém se faz necessário o estudo e o aperfeiçoamento de um método mais eficiente de entrega que não cause estresse no animal (Faria e Gradela, 2010).

Embora o poli 3-(hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato) (P3(HB-co-HHx)) já esteja sendo estudado para o uso em sistemas de liberação controlada (Kiliçay *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2012) a incorporação de nanopartículas magnéticas nesse tipo de microcápsula polimérica ainda não foi reportado na literatura. Portanto, o grande desafio desse trabalho será o de desenvolver uma metodologia apropriada para a produção de micropartículas magnéticas de P3(HB-co-HHx) com propriedades adequadas para o uso na veterinária que seja de fácil replicação; compará-las com as formulações utilizando o Poli 3-hidroxibutirato (P3HB), mais utilizado na literatura como matriz em sistemas de liberação controlada, e aprofundar nas variáveis que afetam a taxa de liberação.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi o de formular e caracterizar matrizes de poli 3-hidroxi butirato (P3HB) e poli 3-(hidroxi butirato-co-hidroxi hexanoato) (P3(HB-co-HHx)) contendo nanopartículas magnéticas e progesterona, com a finalidade de serem usadas em liberação controlada e vetorizada na veterinária para sincronização do estro de equinos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver uma metodologia para produzir micropartículas de P3(HB-co-HHx) contendo nanomagnetita e progesterona;
- Caracterizar essas micropartículas magnéticas produzidas, dando ênfase em seu formato, tamanho, superfície e cristalinidade.
- Produzir micropartículas de P3HB contendo nanomagnetita e progesterona e realizar um estudo comparativo de suas propriedades com as apresentadas quando o P3(HB-co-HHx) foi utilizado.
- Fazer o estudo da liberação do hormônio progesterona, a partir das duas matrizes poliméricas, na presença e na ausência do campo magnético externo, avaliando a influência desse campo na liberação e estabelecendo uma correlação com a morfologia da matriz.

1.2 Justificativas

As nanopartículas magnéticas revestidas com polímeros vêm sendo amplamente estudadas em diversas áreas. Sendo uma delas a liberação controlada e vetorizada de fármacos para o uso em humanos e na área da veterinária. Portanto, o presente trabalho possui justificativas relevantes, como contribuir para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de um sistema de liberação de fármacos, utilizando matrizes poliméricas que podem ser biossintetizadas a partir de fontes renováveis, como os poli 3-hidroxialcanoatos, e com tecnologia nacional (PHB Industrial), para serem utilizadas de forma inovadora em tratamentos de patologias.

É extremamente importante desenvolver um sistema eficiente de liberação controlada de fármacos para uso na veterinária, pois dessa forma será possível reduzir a repetição da administração do fármaco, diminuindo o estresse do animal e reduzindo o tempo de exposição do humano a compostos, que em alguns casos, não são seguros de serem manuseados. Além disso, esse tipo de sistema garante uma concentração adequada do fármaco na corrente sanguínea do animal, diminuindo efeitos não desejáveis. Esses motivos apresentados indicam que o sistema de liberação controlada pode ser mais seguro e adequado para o uso na medicina veterinária se comparados com sistemas tradicionais de entrega de drogas (Rothen-Weinhold *et al.*, 2010).

A realização desse trabalho também é estimulada por possuir na literatura poucos trabalhos que fazem uso do P3(HB-co-HHx) para liberação controlada, a pesar de seu elevado potencial nesta área, bem como a ausência de estudos incorporando nanopartículas magnéticas em matrizes de polihidroxialcanoatos para produzir sistemas de liberação controlada e vetorizada.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro possui grupos de pesquisas que colaboram uns com os outros de forma multidisciplinar para o aperfeiçoamento de novas tecnologias. O grupo de pesquisa no qual esse trabalho faz parte, possui parceria com o Laboratório de Melhoramento Genético Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) para traçar uma estratégia para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada para a sincronização do estro de equinos.

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistemas de liberação controlada e vetorizada de fármacos

Em qualquer que seja a forma de tratamento usado para tratar uma patologia, sempre se busca adequar a administração do fármaco (agente ativo) a uma quantidade apropriada para curar ou controlar a doença em questão. Portanto, a maneira pelo qual o fármaco será liberado terá efeito na sua eficiência terapêutica.

Os sistemas tradicionais de entrega de droga, ou seja, uso de via intravenosa ou extravasculares (oral, sublingual, nasal, renal, etc), não conseguem manter as concentrações dos fármacos em níveis apropriados durante muito tempo. Nesses casos a concentração do fármaco aumenta rapidamente, podendo alcançar níveis tóxicos na corrente sanguínea e depois diminui a níveis ineficientes, tornando-se necessária uma nova dosagem (Figura 1). Já na liberação controlada a concentração do agente ativo permanecerá constante no plasma sanguíneo, pois, a liberação do fármaco ocorrerá a uma velocidade praticamente constante (Freiberg e Zhu, 2004; Huynh e Lee, 2014).

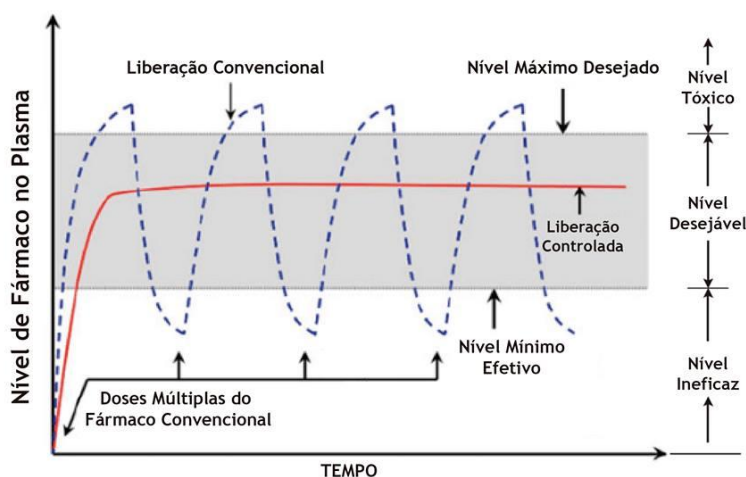


Figura 1 – Perfil de concentração plasmática de um fármaco no tempo para um sistema de liberação controlada e para um sistema de liberação convencional (Huynh e Lee, 2014 - adaptado).

Portanto, o principal objetivo de usar sistemas de liberação controlada de drogas é o de manter o fármaco dentro de uma janela terapêutica apropriada podendo reduzir o número de doses e ao mesmo tempo poder diminuir a quantidade do fármaco administrado, o que evitará efeitos indesejáveis devido às altas dosagens (Freiberg e Zhu, 2004; Hazer *et al.*, 2012; Parveen *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014; Huynh e Lee, 2014).

A maioria dos fármacos apresenta uma série de limitações que podem vir a causar efeitos indesejáveis durante o tratamento. Dentre esses limitantes podemos citar a falta de especificação para o local patológico, o que resulta em distribuição do fármaco por todo o corpo; necessidade de alta dosagem para produzir o efeito desejado; alta toxicidade; sofrer degradação em meios fisiológicos; possuir *meia-vida* curta e possuir pouca solubilidade, que facilita a aglomeração. Devido às limitações citadas, novos sistemas de transporte de fármacos estão sendo desenvolvidos a fim de melhorar a eficácia, a farmacocinética (absorção, distribuição e destino das drogas) e a proteção do agente ativo da degradação *in vivo* (Parveen *et al.*, 2012).

Dentre esses novos sistemas de entrega, as micropartículas poliméricas apresentam grande potencial, pois sua estrutura pode ser modificada a fim de controlar a cinética de liberação, além de poder encapsular tanto drogas hidrofílicas quanto hidrofóbicas (Parveen *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). No entanto, o uso de micropartículas poliméricas pode possuir desvantagens, incluindo possível toxicidade ou não biocompatibilidade, uma difícil correlação entre a liberação *in vitro* (utilizada em estudos) e *in vivo*, possuir produtos indesejáveis de degradação, dificuldade no ajuste da dosagem do fármaco, custo mais elevado e em alguns casos a necessidade de cirurgia para o implante e/ou remoção do sistema de liberação. Por isso, o requisito básico que um sistema de liberação de fármacos deve ter para que possa ser usado em humanos e animais é a disponibilidade de um material apropriado, que deve ser totalmente inofensivo ao organismo vivo, ser biodegradável em meios biológicos e possuir propriedades físico-mecânicas e biomédicas necessárias (Althuri *et al.*, 2013; Huynh e Lee, 2014).

Um sistema de liberação vetorizado visa à liberação de forma seletiva do agente ativo em sítio fisiológico específico, ou seja, em um órgão, tecido ou célula, que necessite da ação farmacológica. Portanto, o grande desafio em sistemas de liberação controlado e vetorizado é o de produzir um sistema aprimorado capaz de

liberar e direcionar os fármacos no momento, local, dose e período de tempo adequado. Sendo assim possível tratar a doença sem provocar efeitos indesejáveis no restante do organismo (Hazer *et al.*, 2012). Existem várias formas de direcionar e modular a liberação de um agente ativo com estímulos biológicos (pH e temperatura) ou estímulos externos (como o uso de ultrassom ou campo magnético).

O perfil de liberação do fármaco encapsulado dependerá das propriedades do fármaco (como a difusibilidade) e de como esse se encontra distribuído dentro da micropartícula. De acordo com a distribuição do composto ativo no interior da micropartícula (partículas poliméricas que apresentam um diâmetro médio entre 1 μm a 1 mm), ela pode ser classificada como: “microesferas” ou “microcápsulas” (Figura 2). As microesferas são sistemas matriciais (sistema monolítico) e podem ser divididas em soluções monolíticas (onde o fármaco apresenta-se completamente solubilizado na matriz) e dispersões monolíticas (onde fármaco se encontra parcialmente solubilizado na matriz). Nesse tipo de sistema com a degradação da matriz polimérica, a droga começa a se difundir para o meio, logo a taxa de liberação dependerá da degradação da matriz. Já as microcápsulas apresentam casca (polímero) e núcleo (agente ativo), podendo ter um ou mais de um núcleo. Nesse tipo de sistema o fármaco se difunde através da casca que envolve o fármaco, portanto a taxa de liberação não é afetada pela degradação da matriz (Silva *et al.*, 2003; Siepmann e Siepmann, 2012; Campos *et al.*, 2013; Huynh e Lee, 2014).

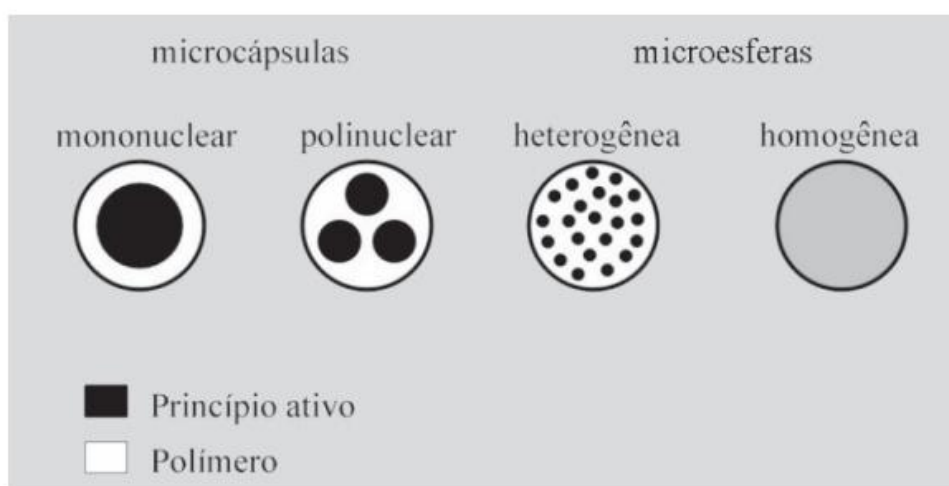


Figura 2 – Modelo da estrutura dos diferentes tipos de micropartículas (Silva *et al.*, 2003).

O uso de modelos matemáticos para estudar a liberação de fármacos pode ser muito útil para acelerar os estudos no desenvolvimento de fármacos com um perfil de liberação apropriado, bem como compreender melhor os mecanismos que atuam e controlam a liberação do agente ativo a partir de sistemas de administração avançados. Para selecionar a equação matemática apropriada devemos observar primeiramente se estamos lidando com um “sistema casca-núcleo” ou um “sistema monolítico”. Outro fator a ser observado é se a concentração inicial do fármaco está abaixo ou acima da solubilidade do fármaco quando o sistema se encontra no meio de liberação. Além desses fatores deve-se conhecer qual a geometria do sistema de administração do fármaco (esférico, cilíndrico, lamina, entre outras geometrias mais complexas). Os principais modelos matemáticos usados para modelar a liberação controlada de fármacos são: cinética de ordem zero, cinética de primeira ordem e cinética de Higuchi (Siepmann e Siepmann, 2012; Jain e Jain, 2016; Costa e Lobo, 2001).

- Cinética de ordem zero

Ocorre quando a taxa de liberação se mantém constante até que todo o agente ativo seja liberado, ou seja, a cinética de liberação é independente da quantidade de droga. Esse tipo de cinética ocorre em “sistemas casca-núcleo” quando o agente ativo é mantido no estado saturado, portanto o seu transporte molecular através da membrana permanecerá constante.

Porém, quando o sistema de liberação é colocado no meio de liberação dois tipos de desvios do comportamento ideal podem ser observados. O primeiro é conhecido como “lag” e ocorre quando a membrana polimérica está carregada com uma pequena quantidade de agente ativo, sendo necessário um determinado tempo para que a taxa de liberação fique constante, ocorrendo então um tempo de retardo. O outro fenômeno é conhecido como “burst” e ocorre quando o agente ativo se acumula na membrana, ocorrendo uma taxa de liberação mais pronunciada no início da liberação até que o período estacionário seja alcançado (Siepmann e Siepmann, 2012; Jain e Jain, 2016; Costa e Lobo, 2001).

A cinética de ordem zero pode ser expressa pela seguinte equação:

$$D_t = D_0 + K_0 t \quad \text{Eq 1}$$

Onde:

D_t = quantidade de fármaco liberado no tempo t ;

D_0 = quantidade inicial de fármaco;

K_0 = constante de liberação de ordem zero (taxa de liberação);

t = tempo.

- Cinética de primeira ordem

Esse perfil de liberação pode ser observado quando a taxa de liberação é proporcional à quantidade de fármaco na microcápsula, ou seja, ocorre um decréscimo exponencial na taxa de liberação em função do tempo. Os “sistemas casca-núcleo” não saturados apresentam esse tipo de cinética, pois o transporte molecular do agente ativo não é constante através da membrana polimérica (Jain e Jain, 2016).

A liberação do fármaco que segue a cinética de primeira ordem é expressa pela seguinte equação matemática:

$$C = C_0 e^{-Kt} \quad \text{Eq 2}$$

Que pode ser linearizada aplicando o logaritmo em ambos os lados da equação:

$$\text{Log } C = \text{Log } C_0 - \frac{Kt}{2,303} \quad \text{Eq 3}$$

Onde:

C = concentração de fármacos liberado;

C_0 = concentração inicial do fármaco;

K = constante de velocidade da primeira ordem (taxa de liberação);

t = tempo.

- Cinética de Higuchi ($t^{1/2}$)

Higuchi nos anos de 1961 e 1963 desenvolveu uma série de modelos matemáticos para estudar o comportamento observado durante a liberação de fármacos. O modelo Higuchi foi então representado pela seguinte equação matemática:

$$Q_t = \sqrt{D(2C - C_s)C_t} \quad \text{Eq 4}$$

Onde:

Q_t = quantidade de fármaco liberado por unidade de área no tempo t ;

D = constante de difusão;

C = concentração inicial de droga;

C_s = a solubilidade da droga;

C_t = concentração da droga em um determinado tempo t .

O modelo proposto por Higuchi foi simplificado usando uma constante. Assim, esse modelo descreve a liberação de fármaco como um processo de difusão que depende da raiz quadrada do tempo.

$$Q_t = K_H \sqrt{t} \quad \text{Eq 5}$$

Onde:

Q_t = quantidade de fármaco liberado por unidade de área no tempo t ;

K_H = constante de dissociação Higuchi (taxa de liberação);

t = tempo.

Mais comum nos sistemas monolíticos, a cinética de Higuchi ocorre quando a taxa de liberação diminui de forma proporcional a raiz quadrada do tempo. Nesse caso a queda da taxa de liberação acontece de forma menos acentuada do que na cinética de primeira ordem. Na realidade em matrizes contendo o agente ativo totalmente dissolvido apresenta dois tipos de regime cinético, primeiramente obedecendo à cinética de Higuchi ($t^{1/2}$) e depois de um tempo a cinética de primeira ordem. Já as matrizes que possuem o agente ativo disperso no polímero exibirá uma

cinética do tipo Higuchi para quase todo o processo de liberação, assumindo que a maioria do agente ativo se encontra disperso e não dissolvido (Siepmann e Siepmann, 2012; Jain e Jain, 2016; Costa e Lobo, 2001).

2.2 Polihidroxicanoatos

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são homo ou heteropoliésteres que podem ser produzidos a partir de fontes renováveis, sendo em sua maioria poliésteres alifáticos constituídos por carbono, oxigênio e hidrogênio; que possuem a seguinte estrutura química, Figura 3 (Braunegg *et al.*, 1998).

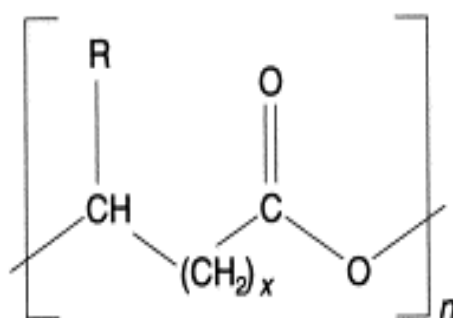


Figura 3 - Estrutura química geral dos PHAs (Braunegg *et al.*, 1998). Onde “n” representa o número de monômeros presentes na estrutura do polímero e “R” representa a cadeia lateral, onde um substituinte ou hidrogênio estará presente.

Estes polímeros são acumulados intracelularmente como material de armazenamento de carbono e/ou energia em vários microrganismos, podendo chegar a 90% do peso seco da célula. São conhecidos mais de 300 microrganismos capazes de produzir PHAs, como as bactérias: *Alcaligenes eutrophus*, *Sphaerotilus natans*, *P. denitrificans*, *P. putida* BM01, *Klebsiella aerogenes*, entre outras (Lee *et al.*, 1999; Reddy *et al.*, 2003; Chen e Wu, 2005; Pereira, *et al.*, 2008; Cespedes *et al.*, 2018). A produção desses polímeros pelos microrganismos ocorre quando um dos nutrientes essenciais de crescimento como o nitrogênio, enxofre, oxigênio, fósforo ou magnésio, se encontra em concentrações limitadas enquanto o carbono se encontra em excesso. Existem vários compostos orgânicos que podem ser usados como fonte de carbono para a produção de PHAs, como também podem ser usadas fontes mais baratas como melaço, soro de leite, farelo de arroz ou até

mesmo materiais que seriam descartados (óleo usado, água residual ou lama ativa) (Nigmatullin *et al.*, 2015).

Dependendo do metabolismo do microrganismo e dos substratos, diferentes monômeros são acoplados na cadeia principal, logo, diferentes copolímeros (Figura 4) com propriedades distintas (Tabela 1) podem ser obtidos (Bordes *et al.*, 2009; Nigmatullin *et al.*, 2015). Cerca de 150 monômeros de PHA diferentes já foram identificados e esse número não para de crescer devido aos avanços nas pesquisas (Tan *et al.*, 2014). Entre os PHAs podemos citar os: poli 3-hidroxi butirato (P3HB), poli 4-hidroxi butirato (P4HB), poli 3-hidroxi valerato (P3HV), poli 3-hidroxi hexanoato (P3HHx), poli 3-hidroxi octanoato (P3HO) entre outros (Chen e Wu, 2005; Hazer *et al.*, 2012).

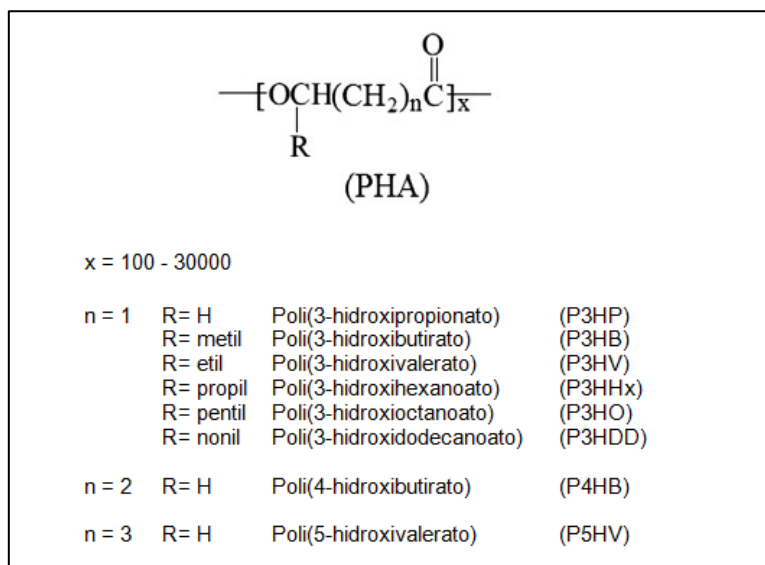


Figura 4 – Estrutura geral dos polihidroxi alcanoatos (Hazer *et al.*, 2012).

Tabela 1- Exemplos de propriedades térmicas e mecânicas de alguns PHAs (Nigmatullin *et al.*, 2015).

Polímeros-PHAs	Ponto de Fusão (C°)	Resistência a Tração (MPa)	Módulo de Young (GPa)	Deformação até ruptura (%)
P(3HB)	175	40	3,5	5-6
P(3HV)	106,2	6,6	0,39	3,5
P(4HB)	60	50	0,07	1000
P(3HB-co-3HV)	137-170	20-25	0,7-2,9	50
P(3HB-co-4HB)	152	26	-	444
P(3HHx-co-3HO)	61	9	0,008	380
P(3HB-co-3HHx)	97	4,5	0,135	107,7

Os PHAs podem substituir os plásticos convencionais derivados do petróleo em uma variedade de aplicações como em embalagens, agricultura e medicina. Eles são em geral biodegradáveis, insolúveis em água, não tóxicos e com boa biocompatibilidade, possuem elevado grau de polimerização, são altamente cristalinos e opticamente ativos (Reddy *et al.*, 2003).

Na medicina e na veterinária os polihidroxialcanoatos tem se mostrado bons candidatos para o uso em sistemas de liberação controlada de drogas, pois possuem propriedades adequadas para estes sistemas (Zinn *et al.*, 2001). Devido a sua biocompatibilidade esses polímeros são inertes em relação a tecidos animais e ainda possuem como vantagem uma taxa de degradação biológica baixa, tendo como produtos principais desta degradação CO_2 e H_2O . Sendo que a taxa de degradação e a porosidade desses polímeros podem ser controladas através da variação da estrutura química ou misturando-os com outros materiais diferentes, tornando possível controlar a taxa de liberação da droga (Althuri *et al.*, 2013).

Existem vários fatores que influenciam a taxa de degradação do PHA como a atividade microbiana do ambiente, umidade, temperatura, pH, porosidade, área de superfície do material e estrutura molecular que por sua vez modifica a cristalinidade e a hidrofiliidade. Um exemplo da influência do tamanho da partícula de PHA sobre a degradação foi observada por Leimann e seus colaboradores (2012), que estudaram a redução do peso molecular de nanopartículas de poli 3-(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (P(3HB-co-3HV)) e a redução de peso de micropartículas do mesmo polímero em diferentes temperaturas e pHs. Eles observaram que, nas mesmas condições de análise, as nanopartículas de P(3HB-co-3HV) obtiveram uma redução no peso molecular de 80% em 50 dias, enquanto ocorreu apenas uma discreta diminuição no peso molecular nas micropartículas de P(3HB-co-3HV). Essa diferença encontrada na taxa de degradação foi explicada pelo tamanho das partículas, onde as partículas menores degradaram mais rapidamente devido a sua maior área de superfície (Reddy *et al.*, 2003; Leimann *et al.*, 2013; Nigmatullin *et al.*, 2015).

2.2.1 Poli 3-hidroxibutirato (P3HB)

O Poli 3-hidroxibutirato é o polímero mais estudado da família dos polihidroxialcanoatos e foi descoberto em 1926. Esse polímero é um poliéster

alifático altamente cristalino (acima de 50%) e opticamente ativo que é produzido por diferentes tipos de microrganismos como produto de armazenamento de energia. O P3HB possui características físicas próximas das apresentadas pelo polipropileno, porém, devido a sua alta cristalinidade ele é mais rígido e quebradiço (Braunnegg *et al.*, 1998; Maiti *et al.*, 2007). O P3HB apresenta um elevado ponto de fusão ($T_f = 173-180^\circ\text{C}$), se comparado a outros poliésteres biodegradáveis, e sua transição vítrea (t_g) é em torno de 5°C (Lee *et al.*, 1999; Bordes *et al.*, 2009).

Por ser biodegradável e biocompatível esse polímero possui muitas aplicações na medicina, na veterinária e na agricultura (Du *et al.*, 2001; Wang e Yu, 2007). Na medicina e na veterinária os copolímeros de P3HB podem ser usados como bons sistemas de administração de fármacos, pois além das características já mencionadas eles possuem cristalinidade suficiente para serem misturados com qualquer tipo de fármacos. Sendo preferíveis as interações físicas entre a droga e o polímero, para que não ocorram danos na estrutura molecular do fármaco, pois pequenas modificações na estrutura química pode causar perda do efeito farmacológico (Althuri *et al.*, 2013).

Entre as bactérias utilizadas para produzir o P3HB podemos citar: *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, várias cepas de *Methylotrrops* e recombinantes de *Escherichia coli*. Em condições normais de crescimento o teor deste biopolímero nas células bacterianas que o produz é em torno de 2-10% em relação ao peso da massa celular seca. Para que o conteúdo de P3HB produzido seja maior, atingindo até 80%, o crescimento deve ser limitado pela perda de um dos elementos nutritivos fundamentais (nitrogênio, fósforo, enxofre ou magnésio) (Lee *et al.*, 1999; Du *et al.*, 2001).

2.2.2 Poli 3-(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) - P3(HB-co-HV)

O Poli 3-(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) é um copolímero que também faz parte da família dos polihidroxicanoatos. Esse copolímero é formado pela presença tanto de unidades de metil quanto de etil na posição "R" da cadeia (Figura 4), ou seja, é constituído de unidades de 3-hidroxibutirato (3HB) e 3-hidroxivalerato (3HV) incorporadas de forma aleatória ao longo da cadeia polimérica. A produção do P3(HB-co-HV) é possível fornecendo ácido valérico ou ácido propriônico aos

microrganismos produtores de P3HB, sendo assim possível formar o co-monômero 3-hidroxicaproato (Braunnegg *et al.*, 1998; Dennis *et al.*, 1998; Koller *et al.*, 2014).

A presença de 3HV na cadeia polimérica de PHB abaixa o ponto de fusão (Tabela 1) e a cristalinidade, o que torna esse copolímero mais moldável, tornando sua gama de aplicação maior. Além disso, as propriedades termomecânicas do P3(HB-co-HV) podem ser modificadas, em função de um uso específico, variando o conteúdo de 3HV, pois o monômero 3HV proporciona um efeito de plastificação interna devido a um maior espaçamento entre as cadeias, aumentando a sua mobilidade. Conforme o teor desse monômero aumenta na cadeia, ocorre um aumento da resistência ao impacto e na condutividade térmica do copolímero, enquanto ocorre uma diminuição na temperatura de transição vítrea, temperatura de fusão, cristalinidade e resistência à tração (Braunnegg *et al.*, 1998; Bordes *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014a). Já a difusividade térmica apresenta um aumento brusco inicial, à medida que ocorre o incremento da concentração de 3HV, até atingir um platô de saturação conforme foi observado por Sanchez e seus colaboradores (1999). Devido ao fato de possuir temperatura de fusão e cristalinidade inferiores do que as do P3HB e um maior coeficiente de difusão térmica, o P3(HB-co-HV) apresenta características mais apropriadas para aplicação em liberação controlada de drogas (Li *et al.*, 2014b).

2.2.3 Poli 3-(hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato - P3(HB-co-HHx))

O poli 3-(hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato) é outro membro da família dos PHAs. Sendo um copolímero, sua estrutura química é formada por unidades distribuídas aleatoriamente de 3-hidroxibutirato (3HB) e 3-hidroxihexanoato (HHx) (Figura 5) (Ke *et al.*, 2012).

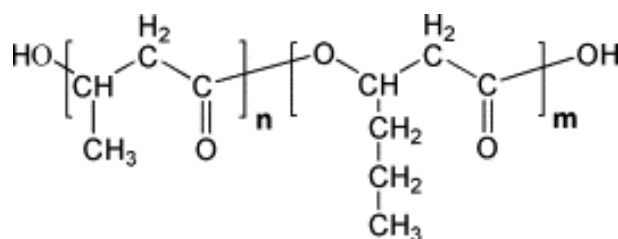


Figura 5 – Estrutura geral dos P3(HB-co-HHx) (Ke *et al.*, 2012).

Por possuir um grupo lateral maior, os agrupamentos de 3-hidroxi-hexanoato promovem uma maior separação entre as cadeias poliméricas, o que resulta em uma menor cristalinidade, tornando o poli 3-(hidroxibutirato-co-hidroxi-hexanoato) um polímero macio e com menor resistência a tração do que o convencional Polihidroxibutirato (PHB) (Zhao *et al.*, 2012; Mendonça *et al.*, 2017)

O P3(HB-co-HHx) pode ser usado como transportador de fármacos para liberação controlada por reunir características como biocompatibilidade, biodegradabilidade e por possuir produtos de degradação não tóxicos. Além disso, sua cristalinidade pode ser modificada conforme o teor de HHx é modificado na estrutura polimérica, onde quanto maior for a participação do co-monômero 3-hidroxi-hexanoato (HHx) menor será a cristalinidade do copolímero formado (Wang *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2012; Mendonça *et al.*, 2017).

O P3(HB-co-HHx) é um poliéster que apresenta uma cadeia lateral hidrocarbonada com dois grupos metilenos a mais que seu homólogo P3HB, o que provoca uma diminuição da cristalinidade e introduz um efeito plastificante na estrutura em relação a sequência de hidroxibutirato, facilitando a difusão de um eventual permeante através da fase amorfa. Como matriz portadora desses efeitos, o co-polímero P3(HB-co-HHx) é promissor na formulação de sistemas de liberação controlada particularmente para cargas ativas de caráter hidrofóbicos, como é o caso da progesterona que é uma droga lipofílica (Brasil, 2010; Kiliçay *et al.*, 2011).

Wang e seus colaboradores (2004) analisaram o impacto do co-monômero 3HHx sobre a biodegradabilidade do poli 3-(hidroxibutirato-co-hidroxi-hexanoato) em relação ao Poli 3-hidroxibutirato. Estes autores registraram que a degradação do P3(HB-co-12%-HHx) em presença de lodo ativado, após 18 dias, foi de 40%, enquanto do P3HB foi de apenas 20%. Ao estudar o efeito do teor de 3HHx no copolímero sobre a biodegradabilidade destes materiais, eles observaram que o P3(HB-co-12%-HHx) apresentou uma maior taxa de degradação enzimática do que o P3(HB-co-5%-HHx). No entanto este comportamento se inverteu para o copolímero P(HB-co-20%-HHx), que mesmo tendo menor cristalinidade, apresentou uma taxa de degradação menor do que o P3(HB-co-12%-HHx).

Doi e seus colaboradores (1995) já haviam observado que a taxa de degradação enzimática não é regulada apenas pela cristalinidade do polímero, mas por um conjunto de fatores associados à estrutura química das unidades monoméricas presentes no copolímero. Em um primeiro momento, o efeito da

diminuição da cristalinidade causado pela introdução do co-monômero 3HHx na cadeia polimérica, assim como o efeito plastificante que introduz estas unidades monoméricas, propicia uma melhor difusão da enzima pela estrutura do copolímero, contribuindo assim para uma maior taxa de degradação. Entretanto, a introdução do co-monômero 3HHx também causa um aumento no caráter hidrofóbico do copolímero o que dificulta a difusão da enzima em meio aquoso pela cadeia para originar a quebra desta. Nesse contexto, é necessário considerar que apesar do efeito do 3HHx reduzir a cristalinidade, o incremento do caráter hidrofóbico pode chegar a reduzir a taxa de degradação.

Wang e seus colaboradores (2004) também apontaram que a morfologia da superfície é modificada em função do conteúdo de 3HHx, o que também afeta a taxa de degradação. Quando compararam a biodegradabilidade de amostras de P(HB-co-12%-HHx), que apresentam superfície porosa, com o P(HB-co-20%-HHx), com uma superfície lisa, observaram uma diminuição da taxa de degradação desta última contendo 20% do co-monômero 3HHx em relação ao copolímero com 12%. Isso ocorre, pois uma superfície muito lisa pode ser um obstáculo ao contato da enzima com as cadeias poliméricas.

2.3 Técnicas de microencapsulação

As micropartículas que apresentam tamanho de 1 μm à 1 mm podem ser produzidas utilizando uma variedade de matérias primas, tanto naturais como sintéticas, e podem ser preparadas por muitas técnicas diferentes, como coacervação, pulverização, emulsificações e suas variáveis. A combinação dessas técnicas com a variedade de matérias primas permite obter uma enorme variedade de micropartículas, podendo apresentar variação no seu tamanho, distribuição de tamanho, distribuição do encapsulado no interior das micropartículas, composição, química superficial, topografia e morfologia. Essa vasta variedade permite utilizar as micropartículas em diferentes áreas como: na agricultura, alimentar, de produtos domésticos, médica e cosmética (Campos *et al.*, 2013).

Na indústria farmacêutica as micropartículas podem ser utilizadas para diversas aplicações como: liberação controlada de agente ativo encapsulado, proteção do fármaco contra reações de degradação, mascarar odores e sabores não

agradáveis, facilitar manuseio, tornar segura a manipulação de material encapsulado tóxico, entre outras aplicações (Silva *et al.*, 2003, Andreani, 2008; Campos *et al.*, 2013).

Contudo, devemos tomar cuidado com a escolha da técnica que será utilizada para a preparação de micropartículas para a liberação controlada e vetorizada. Pois, embora o revestimento polimérico possa trazer inúmeros benefícios já mencionados, ele também pode proporcionar um sistema de entrega com tamanho inapropriado. O tamanho inapropriado de partículas pode diminuir a capacidade de penetração em espaços intersticiais e dificultar sua distribuição nos tecidos (Wei *et al.*, 2012).

Sabe-se que dependendo da via de administração o tamanho adequado das partículas será diferente. No caso de humanos para administração intravenosa, o tamanho deve estar em torno de 200 nm e para administração oral, são preferíveis tamanhos entre 7,2 e 2,1 μm . Já utilizando a via subcutânea e intramuscular, os tamanhos podem variar de 10 à 250 μm (Tran *et al.*, 2011; Kulkarni e Feng, 2012). No caso específico de aplicação via intravenosa em equinos é aceitável o tamanho de até 5 μm (Silva *et al.*, 2006).

Portanto o uso de uma técnica apropriada para que sejam produzidas micropartículas que apresentam propriedades adequadas são de extrema importância. Existem várias técnicas de microencapsulação, porém muitas delas são na verdade uma variação das três técnicas básicas: separação de fases (coacervação), secagem por pulverização e extração/evaporação de solvente (Freitas *et al.*, 2005).

- Técnica de separação de fase (coacervação)

Coacervação é uma técnica que utiliza um procedimento que modifica as características do meio (como mudança de temperatura, pH, adição de um não solvente) que levará a uma deposição do polímero ao redor do agente ativo. Apesar de ser uma técnica muito utilizada, apresenta como ponto negativo a presença em muitos casos de solventes residuais e agentes coacervantes na micropartícula formada (Freitas *et al.*, 2005; Andreani, 2008).

Yu e Lee (1997) em seu estudo utilizaram a técnica de coacervação para a encapsulação de pirrolnitrina em microcápsulas de Glúten. Os autores formaram microcápsulas de 5 e 80 μm com formato irregular, ou seja, não foram formadas partículas esféricas regulares.

- Técnica de secagem por pulverização

O princípio utilizado na técnica de pulverização (*spray drying*) se baseia na atomização de uma solução contendo fármaco e molécula transportadora, que é bombeada por ar comprimido para dentro de uma câmara de dessecação e é utilizada uma corrente de ar quente para que ocorra a secagem. Essa técnica de encapsulação costuma ser rápida, contínua e barata (Lins *et al.*, 2014) porém, apresenta como desvantagens o fato de não ser apropriada para compostos muito sensíveis a temperatura, além de possuir um difícil controle do tamanho final das partículas formadas e possuir baixo rendimento (Freitas, *et al.*, 2005).

Sá (2000) em sua tese de mestrado formulou microcápsulas de PHB contendo TNA usando as técnicas de *spray drying*, simples emulsão e dupla emulsão. As microcápsulas obtidas por *spray drying* apresentaram um núcleo central de carga ativa envolvida em uma membrana polimérica, já nas técnicas de emulsão, além do núcleo central, observou-se a presença de canais que facilitariam a liberação do fármaco e uma superfície mais rugosa. Devido à diferença de morfologia as taxas de liberação apresentadas pelas microcápsulas produzidas por cada técnica foi diferente. A autora observou que as microcápsulas produzidas pela técnica de emulsão simples apresentaram uma taxa de liberação superior (0,34 mg/h), seguida pelas formuladas pela técnica de dupla emulsão (0,54 mg/h). Já as microcápsulas produzidas por *spray drying* foram as que obtiveram a menor taxa de liberação (0,12 mg/h). Os resultados observados comprovam que a taxa de liberação irá depender da morfologia apresentada pelas partículas obtidas que por sua vez depende da técnica que foi utilizada para obtê-las.

Ventura e seus colaboradores (2008) utilizaram a técnica de *spray drying* para obter microesferas de quitosana para liberação controlada intrapulmonar de moxifloxacina. Nesse trabalho eles obtiveram microesferas com tamanho entre 2,5 e 6 µm, com formato esférico e superfície lisa.

- Técnica de extração/evaporação de solvente

A técnica de extração/evaporação de solvente é um dos métodos mais utilizados para preparar micropartículas a partir de polímeros hidrofóbicos. Esse tipo de técnica não necessita de temperaturas elevadas e nem de agentes indutores para separar fases. A versão mais simples desse tipo de método é o que envolve a

formação de uma emulsão óleo-água, sendo muito utilizado quando se deseja encapsular fármacos insolúveis ou pouco solúveis em água.

De forma resumida, para obter micropartículas utilizando a técnica de extração/evaporação são usados quatro passos: 1) primeiramente o agente ativo é dissolvido ou disperso em geral em solvente orgânico que já contém o material formador da matriz; 2) posteriormente é feita uma emulsificação dessa fase orgânica em uma fase contínua que seja imiscível com a primeira (geralmente uma fase aquosa); 3) depois é feita uma extração da fase que foi dispersa na fase contínua que será seguida ou não pela evaporação do solvente; 4) por último as partículas formadas são separadas e secas (Freitas *et al.*, 2005; Campo *et al.*, 2013).

Sempre será necessária a escolha cuidadosa dos parâmetros de processo e materiais utilizados para que seja possível obter uma encapsulação elevada e partículas com propriedades adequadas para cada tipo de uso final (Freitas *et al.*, 2005).

Como já foi dito anteriormente quando se deseja encapsular um agente ativo hidrofóbico é utilizada a técnica de simples emulsão. Porém, quando se deseja encapsular um agente ativo hidrofílico (como proteínas e peptídeos) se for utilizada a técnica anterior resultará em baixa eficiência de encapsulação. Isso ocorre, porque a difusão do fármaco hidrofílico para a fase aquosa é grande antes do polímero se solidificar e prender o fármaco. Para eliminar esta característica não desejada é comumente utilizada a técnica de emulsão dupla (água/óleo/água). Nesse caso, o fármaco é primeiramente dissolvido em água e posteriormente essa fase aquosa formada é dispersa em um solvente orgânico contendo o polímero, formando assim a primeira emulsão (óleo/água). A primeira emulsão formada é então dispersa em um meio aquoso estabilizado, formando a segunda emulsão (água/óleo). As partículas são formadas à medida que o solvente orgânico é evaporado e o polímero endurece aprisionando o agente ativo. A duração da sonicação para o segundo passo é o mais crítico para determinar o tamanho final das partículas formadas, sendo que quanto maior for esse tempo de sonicação menor será o tamanho e a polidispersividade das partículas, porém deve-se ter cuidado para que não ocorram danos ao fármaco (Nihant *et al.*, 1994; Freiberg e Zhu, 2004; Campos *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

Rodríguez-Contreras e seus colaboradores (2013) fizeram um estudo utilizando diferentes técnicas de encapsulação de doxiciclina em PHB. As

micro/nanopartículas foram preparadas por precipitação de polímero via diálise, emulsão simples ou emulsão dupla e nos dois últimos casos foram utilizados três rotas diferentes para obter as emulsões: ultrassom, gotejamento (velocidade de 900 rpm) e/ou agitação à alta velocidade (12000 rpm). Além disso, diferentes condições de processamento foram variadas para avaliar sua influência na morfologia, tamanho e capacidade de encapsulação. Alguns resultados obtidos foram: Na produção de partículas de PHB por precipitação via diálise foram obtidas esferas com diâmetro de 1-2 μm e a amostra que obteve a maior eficiência de encapsulação tinha 2,94% (p/p) de carga. A eficiência de encapsulação obtidos utilizando simples emulsão e gotejamento foram muito baixos. No entanto esse valor foi aumentado ao se usar a técnica de dupla emulsão. Ao ser usado alta velocidade na emulsão simples a eficiência de encapsulação foi mais alto que das amostras anteriores, porém ao precipitar não foram formadas partículas esféricas. Esse inconveniente não foi encontrado quando se usou alta velocidade na técnica de dupla emulsão, apresentando assim os melhores resultados encontrados no trabalho.

Althuri e seus colaboradores (2013) produziram partículas de PHB-PVA (copolímero de polihidroxibutirato e álcool polivinílico) carregados com trióxido de arsênio funcionalizado com folato para direcionar o fármaco até células cancerígenas. As nanopartículas de PHB foram preparadas usando a técnica de dupla emulsão com evaporação do solvente e parâmetros como efeito do tempo de sonicação e concentração de emulsificante foram investigados. Eles puderam observar que à medida que se aumenta o tempo de sonicação o tamanho das partículas diminui drasticamente indo de 1,132 μm , usando o tempo de 5 min, para 43,73 nm, usando o tempo de 30 min. Isso ocorreu possivelmente, devido o aumento do tempo de sonicação que eleva a energia externa aplicada por unidade de volume total da emulsão o que resulta em um aumento das tensões cisalhante, resultando em uma rápida degradação dos glóbulos na emulsão água/óleo. Observou-se também que o tamanho das nanopartículas de PHB diminuiu com o aumento da concentração de PVA, sendo essa diferença de até 115 nm. As partículas formadas no experimento onde a concentração de PVA era de 0,05% (p/v) obtiveram o tamanho aproximado de 207,85 nm, mas quando a concentração de PVA foi aumentada para 0,15% (p/v) o tamanho obtido foi de 142,45 nm. Já no estudo da liberação do fármaco eles observaram uma explosão inicial de 13% do fármaco em 30 minutos. No intervalo de 60-120 minutos ocorreu à liberação de 20%

do fármaco e em 8 horas 30% do fármaco já tinham sido liberados. Após as 8 horas a liberação seguiu mais constante e lenta, tendo aproximadamente 40% do fármaco liberado em 48 horas. Althuri relacionou essa liberação à processos de difusão do fármaco e erosão do copolímero (dois processos lentos de liberação).

Campos *et al.* (2013) utilizaram o PHBV para encapsular a Catalase (enzima antioxidante). Nesse estudo, eles usaram o método de dupla emulsão para encapsular a enzima nas partículas de PHBV usando dois tipos de agitação: agitação mecânica (8000 rpm) e homogeneizador (11000 à 24000 rpm). Observou-se que o aumento da agitação resultou em uma diminuição do tamanho das micropartículas, onde as micropartículas formadas com o agitador mecânico tiveram o tamanho médio de 26 μm enquanto as formadas com o auxílio do homogeneizador obtiveram tamanho médio de 17 μm . Eles também analisaram a eficiência de encapsulação e os maiores valores obtidos foram encontrados para as micropartículas preparadas utilizando o homogeneizador (homogeneizador até 58%, agitação mecânica até 11%).

Kiliçay *et al* (2011) utilizaram o poli(3-hidroxi butirato-co-12%hidroxi hexanoato) (P3(HB-co-HHx)) como matriz para liberação controlada de Etoposido (agente terapêutico), usando o ácido fólico que foi ligado as partículas formadas para direcionamento para células cancerosas. Eles utilizaram a técnica de emulsão com evaporação de solvente (simples emulsão) para o preparo das nanopartículas de P3(HB-co-HHx) obtendo o tamanho médio das nanopartículas na gama de 180 nm e 1,5 μm pela variação das condições experimentais (Tabela 2). Kiliçay e colaboradores observaram que o aumento da taxa de homogeneização e da concentração de surfactante, diminui o tamanho das nanopartículas, enquanto que o tamanho aumenta com o aumento da proporção polímero/solvente. Em seus estudos eles também analisaram o perfil de liberação do agente terapêutico, e em todas as amostras ocorreu inicialmente uma liberação de explosão, seguida de uma liberação mais lenta e sustentada. Eles justificaram esse resultado relacionando a explosão inicial, ao fármaco que fica mais próximo da superfície enquanto o fármaco contido no núcleo é o responsável pela liberação prolongada do fármaco a partir das partículas de P3(HB-co-HHx).

Tabela 2- Efeito da concentração de surfactante, razão polímero/solvente e taxa de homogeneização no tamanho das nanopartículas de P3(HB-co-HHx)) (Kiliçay *et al.*, 2011).

Número da amostra	Concentração de PHBHHX (mg/mL de diclorometano)	Concentração de Tween-80 (mL/mL de meio de suspensão)	Taxa de homogeneização (% de amplitude)	Tamanho (nm)
Efeito da concentração de polímero				
1	10	0,06	90	290±10
2	5	0,06	90	226±8
3	2	0,06	90	199±5
Efeito da concentração de surfactante				
3	2	0,06	90	119±5
4	2	0,04	90	392±10
5	2	0,02	90	550±20
Efeito da taxa de homogeneização				
3	2	0,06	90	199±5
6	2	0,06	70	626±15
7	2	0,06	60	1685±30

Peng e seus colaboradores (2012) estudaram a aplicação de poli 3-(hidroxibutirato-co-11%hidroxihexanoato) (P3(HB-co-HHx)) para a liberação controlada de insulina (hidrofílica). Para poder encapsular uma droga hidrofílica utilizando a técnica de emulsão com evaporação de solvente (simples emulsão) e obter uma boa eficiência de encapsulação, eles formaram um complexo de insulina-fosfolipídica para aumentar a lipofilicidade da insulina. As partículas obtidas apresentaram um formato esférico com um tamanho médio de 186,2 nm e eficiência de encapsulação de 89,73%, sendo importante salientar que a eficiência de captura foi significativamente aumentada à medida que aumentou a quantidade de fosfolipídio no complexo insulina-fosfolipídica, ou seja, à medida que aumentou o caráter lipofílico da insulina. Peng e sua equipe ainda fizeram um estudo da liberação desse fármaco que mostrou que apenas 20% da insulina foi liberada em 31 dias com uma liberação de 5,42% nas primeiras 8 horas. O perfil de liberação apresentou uma liberação inicial de explosão nas primeiras 8 horas onde a insulina foi liberada a uma taxa maior, seguido por uma liberação sustentada a uma taxa mais baixa.

A liberação controlada de medicamentos a partir de micro/nanopartículas poliméricas é viável manipulando as propriedades físicas e químicas do polímero e

das partículas formadas. Questões como peso molecular do polímero, concentração do polímero na hora do preparo, cristalinidade do polímero e do fármaco, velocidade usada entre outros fatores afetam o tamanho e propriedades das partículas formadas, que por consequência influenciará no perfil de liberação da droga (Freiberg e Zhu, 2004).

2.4 Nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas são definidas como materiais que possuem propriedades magnéticas diferenciadas, superparamagnetismo, devido ao seu tamanho reduzido (abaixo de 100 nm), podendo então ser manipuladas por um campo magnético externo (Willard *et al.*, 2004). A nanotecnologia possui um caráter multidisciplinar trazendo uma revolução em diversas áreas como: física, engenharias (mecânica, química, elétrica, biológica), design de máquinas, robótica e nas áreas médicas e biológicas (Hofmann-Antenbrink *et al.*, 2009; Lodhia *et al.*, 2010). Na biomedicina as nanopartículas magnéticas, em contraste com as demais nanopartículas, por terem uma magnetização induzível, podem ser direcionadas para um local patológico ou aquecidas pela presença de um campo magnético externo. Estas características permitem usa-las em inúmeras aplicações como na: ressonância magnética para aumento de contraste, (Graf *et al.*, 2015), hipertermia (onde é utilizado fonte de calor para terapia tumoral) (Laurent *et al.*, 2011) e liberação vetorizada de fármacos (Arruebo *et al.*, 2007).

As nanopartículas magnéticas apresentam várias características que as tornam atraentes para o uso biomédico como: alta relação entre a área superficial e o volume, facilidade de ser ligada com biomoléculas (exemplo: encapsulados por polímeros), são manipuladas por campo magnético externo, apresentam menores taxas de sedimentação e devido ao seu tamanho possuem melhor difusão nos tecidos (Menegucci *et al.*, 2015).

O comportamento das nanopartículas é definido pela sua superfície química e seu tamanho. Dependendo da superfície química que as nanopartículas apresentarem, elas podem interagir com o meio biológico e sofrer ação do sistema imunológico tornando o tempo de permanência na corrente sanguínea (*meia-vida*) curto. Em geral, a curta *meia-vida* das nanopartículas na corrente sanguínea ocorre quando elas aglomeram ou adsorvem proteínas plasmáticas. Nessas condições,

elas são rapidamente capturadas pelo sistema fagocitário e são eliminadas antes mesmo de atingirem o local alvo (Hofmann-Amtenbrink *et al.*, 2009). Para evitar que isso ocorra e a meia-vida possa ser aumentada pode ser feito um revestimento polimérico, pois os polímeros são muito mais estáveis aos meios biológicos (Arruebo *et al.*, 2007). O tamanho também é outro fator que pode determinar o tempo de permanência das nanopartículas na corrente sanguínea. Para uso biomédico as nanopartículas devem ter um tamanho menor que 100 nm para que consigam atravessar as barreiras biológicas do organismo (Gupta e Gupta, 2005; Shubayev *et al.*, 2009).

O tamanho das nanopartículas também causa um efeito nas propriedades magnéticas, pois devido ao seu tamanho reduzido apresentam um domínio único. As partículas magnéticas maiores apresentam uma estrutura de multidomínio, porém à medida que as dimensões são reduzidas ao se chegar abaixo de um tamanho crítico (para magnetita em torno de 30 à 50 nm) as partículas passam a possuir um único domínio apresentando então um comportamento superparamagnético (Figura 6a) (Deatsch e Evans, 2014; Petcharoen e Sirivat., 2012).

O superparamagnetismo é caracterizado pela ausência de histerese na curva de magnetização (Figura 6a), ou seja, a magnetização desaparece quando o campo magnético é removido (não apresentam magnetização residual), portanto sua coercividade é nula. Além disso, elas apresentam uma susceptibilidade magnética elevada, com isso sua capacidade de se magnetizar sob a ação de um estímulo magnético é rápida e sem a necessidade do uso de um campo magnético muito alto (Chomoucka *et al.*, 2010; Issa *et al.*, 2013). Como resultado, as nanopartículas superparamagnéticas tornam-se magnéticas na presença de um ímã, mas voltam para seu estado não magnetizado quando esse estímulo magnético é retirado. Isso evita que essas partículas possuam um comportamento “ativo” quando não estão expostas a um campo magnético. Essas características tornam as nanopartículas magnéticas boas candidatas para o uso em liberação controlada de fármacos, uma vez que elas podem ser direcionadas pelo sistema vascular até um local específico com o auxílio de um campo magnético externo e quando esse campo for removido voltam ao seu estado não magnético para permitir sua excreção pelo organismo (Yigit *et al.*, 2012; Mody *et al.*, 2014).

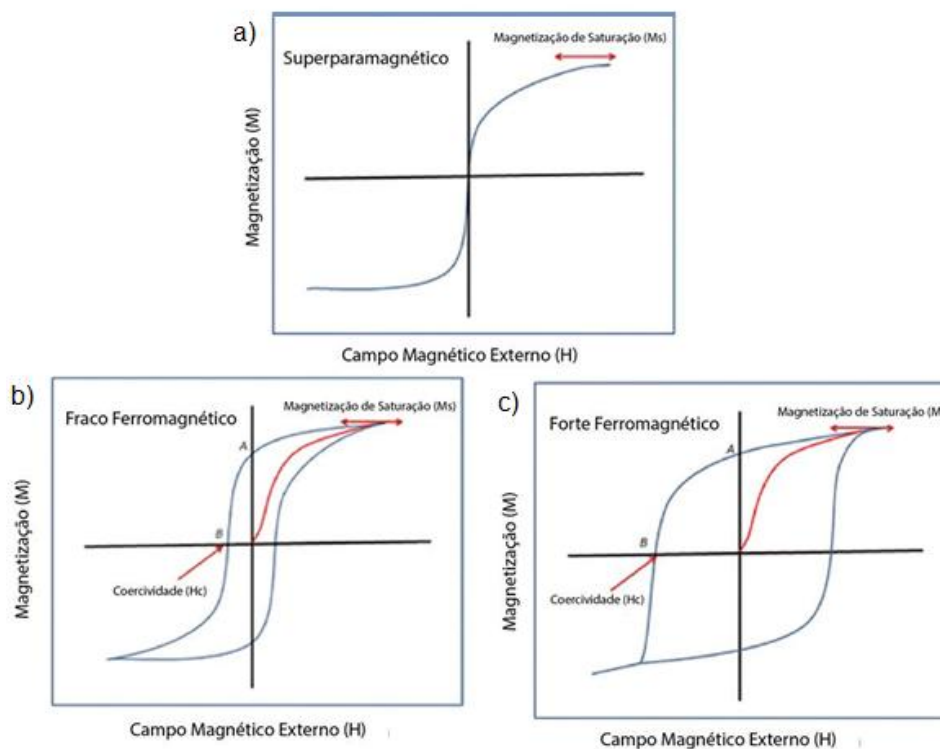


Figura 6 – Ciclo de histerese típico de materiais: a) superparamagnéticos, b) e c) ferromagnéticos (Mody *et al.*, 2014 - adaptado).

O tamanho reduzido das nanopartículas faz com que elas apresentem grande área superficial em relação ao seu volume e conseqüentemente uma alta energia superficial. Devido a esses fatores, elas possuem a tendência de se aglomerar formando fortes atrações dipolo-dipolo entre elas. Porém, aplicações biomédicas requerem que essas nanopartículas magnéticas não se aglomerem, caso contrário elas se comportariam como uma partícula maior o que mudaria suas propriedades (como a perda do superparamagnetismo). Além disso, um perigo ainda maior seria se ocorresse aglomeração durante o tratamento *in vivo* na corrente sanguínea podendo até ocorrer um entupimento de uma veia ou atrapalhar a distribuição e chegada dessas partículas ao alvo desejado (Willard *et al.*, 2004; Issa *et al.*, 2013; Mody *et al.*, 2014).

A aglomeração das nanopartículas magnéticas pode ocorrer em várias etapas: síntese, secagem e manipulação. A estabilização das nanopartículas magnéticas pode ser feita modificando quimicamente sua superfície utilizando, em geral, um surfactante, que diminui as interações entre as partículas através do

aumento das forças de repulsão, ou recobrando com um polímero biodegradável, que reduz as forças dipolo-dipolo existentes entre as nanopartículas magnéticas (Willard *et al.*, 2004; Issa *et al.*, 2013).

Os surfactantes são usados para diminuir as tensões superficiais entre duas ou mais partículas, aumentando assim a miscibilidade, a estabilidade coloidal e a dispersão (Heinz *et al.*, 2017). Os surfactantes como o ácido oleico ($C_{18}H_{34}O_2$) possuem uma cauda apolar e uma cabeça polar que é atraída pela magnetita envolvendo-a. Devido a sua cauda apolar, os surfactantes não permitem que as partículas de magnetita se aproximem evitando sua aglomeração (Figura 7) (Atta *et al.*, 2014). O ácido oleico além de evitar aglomeração, também modifica a hidrofiliicidade da magnetita facilitando sua encapsulação em polímeros hidrofóbicos (Okassa *et al.*, 2005).

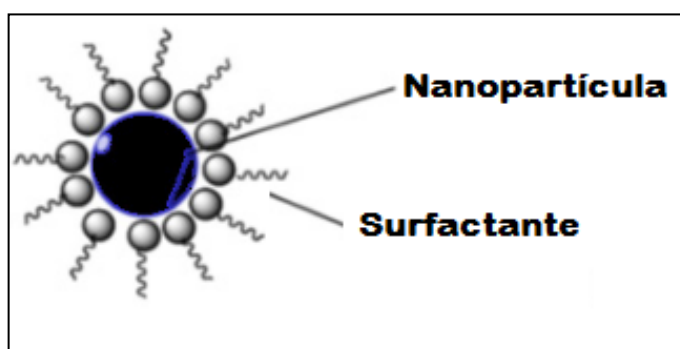


Figura 7 – Nanopartícula sendo envolvida por moléculas de surfactante
(Atta *et al.*, 2014 - adaptado).

2.4.1 Magnetita

Dentre as nanopartículas magnéticas os óxidos de ferro, em especial a magnetita (Fe_3O_4), são considerados os mais importantes em aplicações biomédicas, pois apresentam características como biocompatibilidade, baixa toxicidade no corpo humano, maior estabilidade na resposta magnética, menor sensibilidade à oxidação, possibilidade de tratamento superficial, possibilidade de apresentar superparamagnetismo e facilidade de síntese (Mahmoudi *et al.*, 2011; Ghazanfari *et al.*, 2016).

A magnetita (Fe_3O_4) é um óxido de ferro ferromagnético, porém abaixo de um tamanho crítico (por volta de 20 nm à 50 nm) apresenta superparamagnetismo

(Petcharoen e Sirivat, 2012). A magnetita apresenta uma estrutura cristalina de espinélio invertida (Figura 8), apresentando o ferro em dois estados de oxidação (Fe^{2+} e Fe^{3+}) e ambos podem ser coordenados com os íons de O^{2-} . Os íons Fe^{3+} podem ser encontrados distribuídos igualmente entre os sítios tetraédricos e octaédricos da estrutura, por isso não existem momentos magnéticos resultantes da presença desse íon. Já os íons Fe^{2+} só são encontrados nos sítios octaédricos, sendo estes os responsáveis pelas características magnéticas da magnetita (Silva *et al.*, 2015).

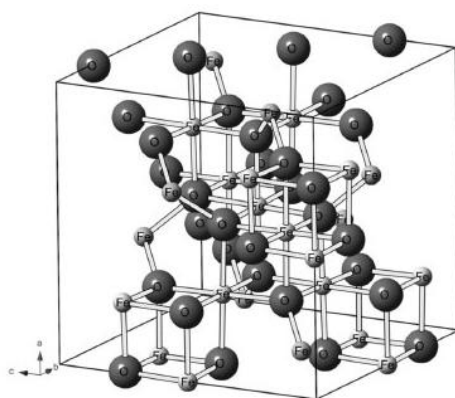


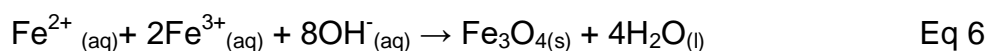
Figura 8 – Estrutura cristalina da magnetita (Oliveira *et al.*, 2012).

2.4.2 Síntese de nanopartículas magnéticas pela técnica de coprecipitação.

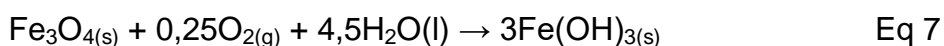
O método de síntese adotado é de extrema importância, pois ele controla o tamanho e a forma das partículas formadas. Uma variedade de técnicas pode ser utilizada para obtenção de nanopartículas magnéticas como a coprecipitação, hidrólise, decomposição térmica e técnica sol-gel (Petcharoen e Sirivat, 2012).

O método de coprecipitação é o método mais comum e simples para a síntese de nanomagnetita, pois não necessita de temperaturas muito elevadas durante a reação. A coprecipitação dos sais de ferro Fe^{2+} e Fe^{3+} em solução aquosa na proporção 1:2 ocorre pela adição de uma base. O controle do tamanho, forma e composição das nanopartículas formadas dependerá de vários fatores como: o tipo de sal usado, a proporção molar entre os íons de ferro, do pH do meio de reação, do tipo de agente precipitante e da base usada (Gupta e Gupta, 2005; Lin *et al.*, 2008).

Em geral, a magnetita é preparada adicionando uma base a uma mistura aquosa de $1\text{Fe}^{2+}/2\text{Fe}^{3+}$ formando um precipitado preto. A reação geral de formação de magnetita pode ser descrita pela equação (Lodhia *et al.*, 2010):



Segundo a termodinâmica se as proporções de sais $1\text{Fe}^{2+}/2\text{Fe}^{3+}$ forem mantidas e o pH estiver entre 9 e 14 em atmosfera não controlada a magnetita pode ser oxidada formando hidróxido de ferro III conforme a seguinte equação:



Essa oxidação não é desejada, pois afetariam drasticamente as propriedades físicas e químicas da nanopartícula magnética formada. Para impedir que essa reação aconteça, a síntese deve ser feita sempre em um ambiente inerte, livre de oxigênio (em geral usa-se uma atmosfera de Nitrogênio). O gás inerte ao ser borbulhado na solução durante a síntese não só protege a magnetita da oxidação como também ajuda a reduzir o tamanho das partículas obtidas quando comparado com os métodos sem a remoção do oxigênio (Gupta e Gupta, 2005).

A proporção molar de 1:2 entre os sais de ferro $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ também é muito importante para que a magnetita seja formada. É conhecido que para razões baixas ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} < 0,3$) a goetita é formada em vez da magnetita. Já se a razão molar for entre 0,3 e 0,5, duas fases são formadas contendo nanopartículas menores e maiores de magnetita. Já no caso da proporção estequiométrica (1:2) a magnetita formada possui um tamanho nanométrico menor e mais homogêneo (Lodhia *et al.*, 2010).

O pH da solução também é um fator importante durante a síntese, porque ele controla a estabilidade dos hidróxidos metálicos formados (Gupta e Gupta, 2005). Kin e seus colaboradores (2003) em seu trabalho observaram que a magnetita deve ser obtida no pH entre 9 e 14, já no pH entre 1 e 4 a goetita pode ser formada.

A temperatura usada durante o processo de síntese também foi estudada e constatou-se que ela influencia no tamanho das partículas obtidas. Sun e seus colaboradores (2006) estudaram a influência da temperatura na síntese de magnetita e comprovaram que o tamanho das partículas reduz com o aumento da

temperatura até que a temperatura de 50°C seja atingida. A partir dessa temperatura o efeito é contrário, à medida que aumentava a temperatura, as partículas aumentavam o seu tamanho.

2.4.3 Uso de nanopartículas magnéticas na liberação controlada e vetorizada

Como mencionado anteriormente, o superparamagnetismo é fundamental para que as nanopartículas magnéticas possam ser utilizadas nos sistemas de liberação controlada e vetorizada de fármacos no organismo. O processo de direcionamento do sistema de entrega contendo nanopartículas magnéticas é possível quando as forças geradas pelo campo magnético externo superam as forças exercidas sobre as partículas pelo fluxo sanguíneo. Em geral, esse campo magnético é gerado utilizando um forte ímã, como por exemplo, o ímã de Nd-Fe-B (ímã produzido a partir de uma liga de neodímio, ferro e boro) que é fixado fora do corpo sobre o local alvo.

As partículas poliméricas contendo o fármaco são então injetadas na corrente sanguínea e quando as forças magnéticas superam as taxas de fluxo sanguíneo na artéria ou capilar, as partículas ficarão retidas no alvo (Mahmoudi *et al.*, 2011) (Figura 9). Já no alvo, a droga pode ser liberada por atividade enzimática ou mudança nas condições fisiológicas como a temperatura e pH.

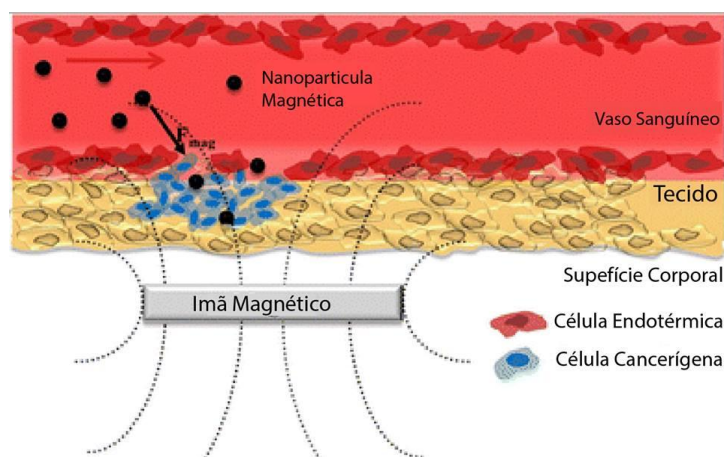


Figura 9 – Representação esquemática de sistema magnético de liberação de fármacos sendo direcionado as células cancerígenas sobre a influência de um campo magnético externo (Mody *et al.*, 2014 - adaptado).

O campo magnético também pode ser usado para impulsionar a liberação do agente ativo (Figura 10). Nesse caso, ao expor as micropartículas magnéticas a um campo magnético oscilante ou pulsante, esse campo provocará vibração das partículas magnéticas no interior das micropartículas promovendo um aumento da temperatura o que resultará no aumento da taxa de difusão do agente ativo para o meio em que se encontra. A grande vantagem desse tipo de sistema é que o uso do campo magnético pode direcionar e controlar a cinética de liberação conforme o estímulo externo aplicado (Dash e Cudworth, 1998; Ferreira, 2009; Liu *et al.*, 2009).

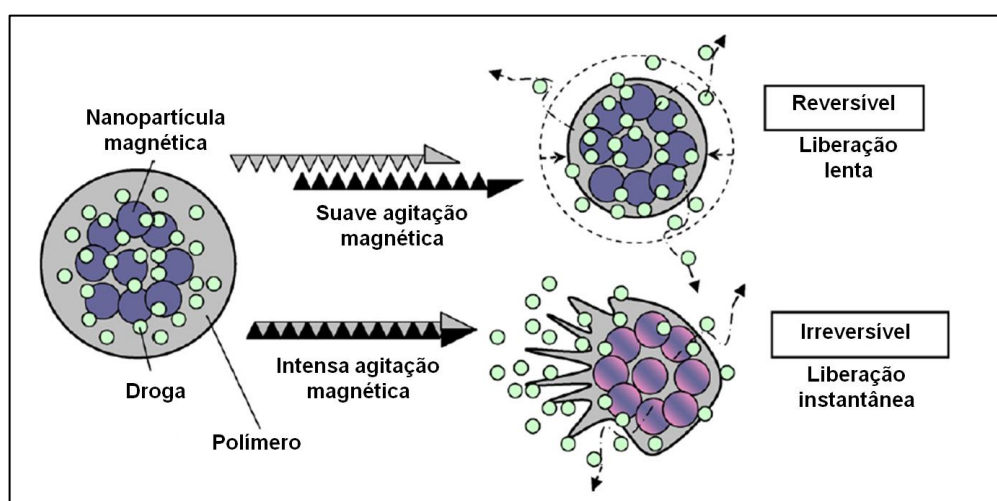


Figura 10 – Esquema de um sistema de liberação controlado pela resposta térmica mediante aplicação de um campo magnético (Liu *et al.*, 2009 - adaptado).

Embora o poli 3-(hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato) (P3(HB-co-HHx)) já esteja sendo estudado para o uso em sistemas de liberação controlada, conforme já foi citado anteriormente neste trabalho, a incorporação de nanopartículas magnéticas nesse tipo de microcápsula polimérica ainda não foi reportado na literatura. Porém, estudos que utilizam nanopartículas magnéticas em microcápsulas de outros polímeros para liberação de fármaco mostram que estas partículas são promissoras para direcionamento de sistema de entrega de drogas.

Okassa e seus colaboradores (2005) fizeram um estudo preliminar para avaliar a possibilidade de encapsulação da magnetita em partículas de poli(lactide-co-glicólido) (PLGA) para o direcionamento de drogas intravenosas. As partículas magnetita/PLGA foram preparadas utilizando a técnica de dupla emulsão e as partículas de magnetita - ácido oleico/PLGA foram feitas pela técnica de emulsão

simples. A natureza hidrofóbica de PLGA não era favorável para o aprisionamento de compostos hidrofílicos. Para tentar minimizar esse problema e aumentar a afinidade entre a magnetita e o polímero, as nanomagnetitas foram tratadas com ácido oleico para obter partículas mais lipofílicas. Esse tratamento permitiu introduzir as nanomagnetitas diretamente na fase orgânica juntamente com o polímero, sendo possível assim o uso da técnica de emulsão simples. Os resultados que eles obtiveram mostraram que a eficiência de encapsulação usando a nanomagnetita tratada foi de até 60% a mais do que comparado com a nanomagnetita não revestida.

Yang e seus colaboradores (2006) fizeram um estudo comparando a capacidade de encapsulação em microcápsulas magnéticas de poli- ϵ -caprolactona (PCL) de dois tipos de fármacos anticancerígenos: o Gemcitabina (hidrofílica) e Cisplatina (hidrofóbica). As nanopartículas de PCL magnéticas foram preparadas pelo método de simples emulsão e para que fosse possível acrescentar a magnetita na fase orgânica foi feito um tratamento em sua superfície com ácido oleico. Eles puderam constatar que a liberação do fármaco mais hidrofóbico foi mais prolongada devido a sua maior afinidade com a matriz polimérica. Em ambos os fármacos, o perfil de liberação mostrou um efeito de explosão inicial que se deve a pequenas quantidades de fármacos ligados na superfície das nanopartículas. Nesse estudo eles também investigaram o comportamento das nanopartículas sobre um campo magnético externo. Para que isso fosse possível eles usaram um micro-canal de borossilicato (sistema que simula um sistema vascular) e as nanopartículas de PCL magnéticas foram marcadas (tingidas) para poderem ser visualizadas em microscópio de fluorescência. Quando o campo magnético foi criado usando um ímã de Nd-Fe-B na parede do canal, as partículas em apenas um minuto se reuniram na parede, demonstrando que as nanopartículas magnéticas de PCL eram sensíveis a um campo magnético externo.

Chorny *et al* (2010) prepararam microcápsulas magnéticas de polilático para liberação de agente antirestenótico, o Paclitaxel (PTX). Nesse estudo as nanomagnetitas também foram tratadas com ácido oleico e dispersas juntamente com o polímero na fase orgânica para a produção de partículas usando a técnica de emulsão simples. Eles conseguiram direcionar as microcápsulas magnéticas pelas artérias carótidas de um rato com o uso de um campo magnético aplicado, obtendo uma quantidade substancialmente mais elevada de fármaco na região onde o campo

foi aplicado. A liberação de PTX ocorreu em dois estágios, onde primeiramente teve uma liberação rápida de 60% de fármaco nas primeiras 8 horas, seguida de uma liberação sustentada.

2.5 Progesterona

A progesterona ($C_{21}H_{30}O_2$) é um hormônio natural (esteróide) secretado por glândulas adrenais, placenta e pelas células luteínas. A progesterona (Figura 11) possui um caráter predominantemente hidrofóbico, sendo praticamente não solúvel em água e solúvel em alguns solventes orgânicos como: etanol, acetona e clorofórmio. Funde-se no intervalo de 126°C a 131°C e comercialmente apresenta a característica de um pó branco ou ligeiramente amarelado (Faria e Gradela, 2010; Brasil, 2010).

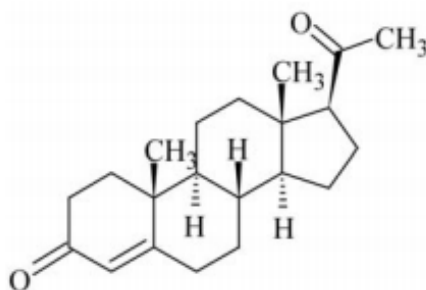


Figura 11– Estrutura Química da progesterona (Brasil, 2010).

A progesterona vem sendo usada para obter um controle do ciclo reprodutivo dos equinos e bovinos. Vários métodos de administração desse hormônio foram desenvolvidos como: injeção, administração oral, implantes de orelha e administração intravaginal (Faria e Gradela, 2010; Whisnant e Burns, 2002). Em geral a abordagem farmacológica para controlar fertilidade ainda é feita usando administração oral que apresenta desvantagens como a exigência de ingestão diária e só ser ativa se ingerida em doses elevadas (Jameela *et al.*, 1998; Cerchiara *et al.*, 2003). Por isso, o desenvolvimento de sistemas de liberação usando polímeros biodegradáveis se mostra atraente para possibilitar um maior controle e uma liberação mais apropriada da progesterona.

Whismant e Burns (2002) fizeram um estudo com o objetivo de determinar o padrão de liberação *in vivo* de progesterona a partir de microesferas de poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo) para induzir puberdade em novilhas de corte. O padrão observado no estudo mostrou um rápido aumento e um acentuado declínio nas concentrações de progesterona na corrente sanguínea, o que permitiu uma boa sincronia do estro. Embora o número de vacas usadas no experimento seja pequeno, três entre quatro vacas foram observadas em estro durante um período de dois dias.

Silva e colaboradores (2006) produziram microcápsulas de polihidroxibutirato com diâmetro médio de 1 à 5 μm , contendo progesterona para uso subcutâneo em éguas, para avaliar a dinâmica útero-ovárica. As microcápsulas foram então dispersas em solução fisiológica e posteriormente introduzidas subcutaneamente por uma seringa no pescoço do animal. Para que fosse possível avaliar os resultados obtidos, éguas de controle receberam, também de forma subcutânea, apenas a solução fisiológica. Eles verificaram que o nível de hormônio nas éguas tratadas com as microcápsulas foi capaz de suprir o estro conforme o desejado, porém ocorreu uma grande variação dos níveis de progesterona entre as éguas tratadas. Essa variação ocorreu provavelmente devido à reação inflamatória que foi mais branda em alguns animais e mais intensa em outros, tornando o perfil de liberação diferente nesses animais. Como esse processo inflamatório também ocorreu nas éguas de controle, essa inflamação não deve ter sido causada por falta de biocompatibilidade do polímero, mas sim devido a uma sensibilidade dos equinos a essa via de aplicação, ou a sensibilidade da região onde foi aplicado, ou ainda ao volume administrado ter sido grande para essa via.

Leite (2004) em sua tese de mestrado formulou e caracterizou micropartículas de polihidroxibutirato para liberação controlada de progesterona. No perfil de liberação pode-se observar uma liberação de explosão (“burst”) inicial onde cerca de 18% da progesterona foi liberada nas primeiras 7 horas, devido ao hormônio que se encontrava próxima a superfície das microcápsulas. Já a progesterona que se encontrava mais no núcleo precisou primeiro se dissolver na matriz para depois difundir até a superfície e ser liberada, portanto sua liberação foi mais lenta. Porém o nível de liberação baixo durante as primeiras 70 horas indica a necessidade do uso de uma matriz mais apropriada que facilite o transporte da carga ativa até o meio de liberação. Alguns fatores podem ter levado a esse baixo nível de liberação da

progesterona, como a alta cristalinidade do P3HB e a afinidade química entre a matriz e a carga ativa. Visto que a difusão da carga ativa ocorre na porção amorfa do polímero, o uso de uma matriz com menor cristalinidade levaria a uma liberação mais acentuada. Além disso, sendo a matriz hidrofóbica e a progesterona uma droga lipofílica ocorre fortes interações químicas entre elas resultando em uma liberação mais lenta.

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

- Copolímero de hidroxibutirato com 5,85% em mol de hidroxihexanoato P3(HB-co-HHx) sintetizado e fornecido pelo grupo de microbiologia da Universidade de São Paulo (USP). Caracterizado por Mendonça *et al* (2017). Massa Molar (Mw) = 303685 Da e Temperatura de transição vítrea (Tg) = 2,9°C.
- Poli 3-hidroxibutirato (P3HB) fornecido por PHB Industrial. Massa Molar (Mw) = 394723 Da.
- Álcool Etílico (CH₃CH₂OH) fornecido pela Cromoline; Grau de Pureza: P.A.
- Progesterona (Preg-4-eno-3,20-diona) fornecida pela Sigma-Aldrich; Grau de Pureza: 99%.
- Clorofórmio (CHCl₃), fornecido pela Vetec; Grau de pureza: 99%.
- Ácido oleico (C₁₈H₃₄O₂), fornecido pela Proquimios; Grau de pureza: P.A.
- Álcool polivinílico (C₂H₄O)_n, fornecido pela Vetec; Teor de cinzas: 0,4%.

3.2 Nanopartículas magnéticas (magnetita)

A nanomagnetita utilizada foi formulada como parte das pesquisas realizadas em partículas com propriedades magnéticas pelo grupo de pesquisa “Polímeros a partir de recursos renováveis”, no qual a autora desse trabalho faz parte (Bôa Morte, 2017). A fase magnética foi caracterizada por difração de Raios-X (Figura 12) e pela microscopia eletrônica de transmissão (Figura 13).

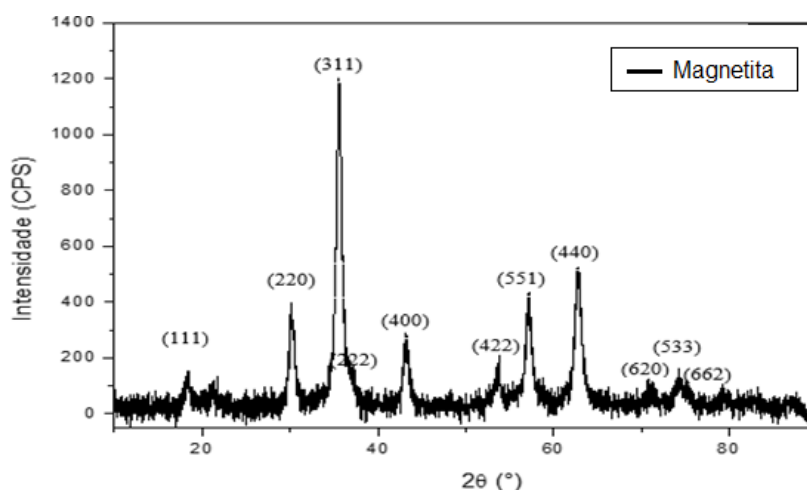


Figura 12 – Difratograma de Raios-X da magnetita sintetizada (Bôa Morte, 2017).

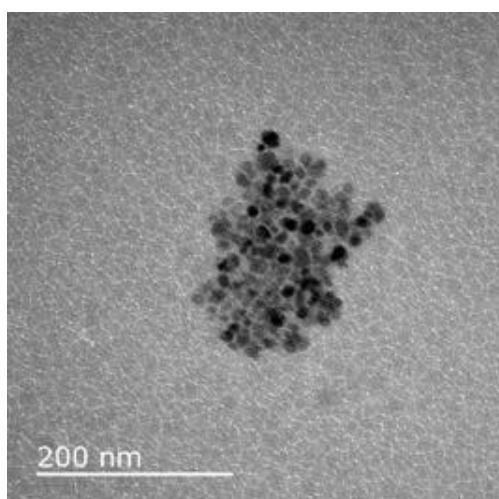


Figura 13 – Micrografia eletrônica de transmissão das nanomagnetitas (Bôa Morte, 2017).

3.3 Formulação e Caracterização das micropartículas contendo nanomagnetita e progesterona (PHAs/nM/Pg)

3.3.1 Formulação das micropartículas magnéticas de polihidroxialcanoatos contendo progesterona (PHAs/nM/Pg)

Para a formulação das micropartículas foi utilizado o método de simples emulsão baseado no procedimento proposto por Okassa *et al.* (2005); Yang *et al.* (2006) e Rodrigues-Contreras *et al.* (2013). Esse método foi escolhido devido ao fato da progesterona ser solúvel no mesmo solvente (clorofórmio) que pode solubilizar o polímero escolhido para a produção das micropartículas.

Para o preparo das micropartículas de P3HB/nM/Pg e P3(HB-co-HHx)/nM/Pg foi feita uma solução contendo 1 g de polímero (P3HB ou P3(HB-co-HHx)) em 10 mL de clorofórmio. A essa solução acrescentou-se 80 mg de magnetita modificada com ácido oleico e 0,3 g de progesterona, formando assim a fase orgânica. A fase orgânica formada foi gotejada sobre a fase aquosa, composta de 200 mL de uma solução de álcool polivinílico à 1% m/v, contida em um reator (IKA-250) (A). Durante o gotejamento da fase orgânica, a temperatura foi mantida em 10°C (B) e a agitação mecânica (C) em 200 rpm mais agitação de 9500 rpm proporcionada por um ultraturrax (IKA, T-25) (D) acoplado ao reator (Figura 14).

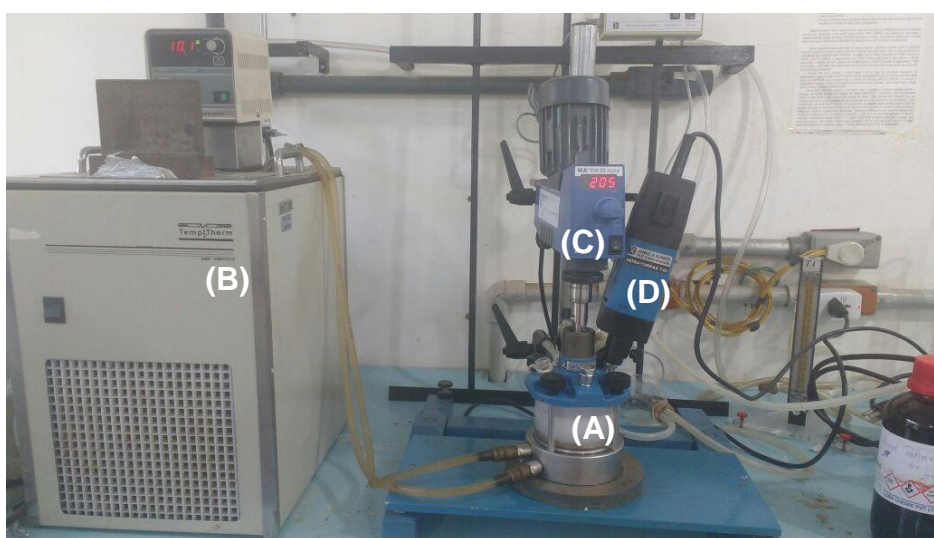


Figura 14 – Reator (IKA-250) utilizado para a formulação das micropartículas, SEPOL-LAMAV (UENF) com o Ultraturrax (IKA, T-25) acoplado: A) copo do reator; B) banho hidrotérmico; C) agitador mecânico; D) Ultraturrax.

Após 15 minutos do término do gotejamento o ultraturrax (D) foi desligado, permanecendo ligado apenas a agitação mecânica e o reator foi submetido a vácuo, para que ocorresse a evaporação do solvente, por 2 horas. Passadas às 2 horas aumentou-se a temperatura para 30°C a fim de completar a evaporação do clorofórmio (Figura 14).

As micropartículas formadas foram separadas por centrifugação a 1000 rpm por 2 minutos, lavadas com água destilada três vezes para eliminar o álcool polivinílico residual e em seguida lavadas com etanol 99% para facilitar a secagem. Por último, as micropartículas foram colocadas em um dessecador a vácuo para completar a secagem.

3.3.2 Caracterização na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) dos poli 3-hidroxiálcanoatos utilizados como matriz

A análise de espectroscopia na região do infravermelho foi feita com os polihidroxiálcanoatos conforme recebidos em pó (P3HB e P3(HB-co-HHx)), nos quais nessa dissertação serão chamados de *in natura*, e com os polihidroxiálcanoatos *in natura* misturados com progesterona, na mesma proporção utilizada para formulação das micropartículas, com o intuito de caracterizar os polímeros utilizados e verificar a interação entre os componentes do sistema.

Primeiramente, foram feitas pastilhas de KBr em uma prensa manual e reservadas. Depois de feitas as pastilhas, as amostras foram dissolvidas em uma quantidade mínima de clorofórmio e depositadas sobre as pastilhas de forma que se formasse um filme fino. Após a completa evaporação do solvente utilizado para dissolver as amostras as medidas foram feitas através de um Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) Shimadzu, modelo IRPrestige-2, disponível na unidade de Caracterização Térmica do SEPOL/LAMAV – UENF.

3.3.3 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada nas micropartículas de P3HB, P3(HB-co-HHx), P3HB/nM/Pg e P3(HB-co-HHx)/nM/Pg no intuito de analisar a estabilidade térmica dos sistemas e de determinar a massa de nanomagnetita

presente nas formulações. A análise foi feita em um equipamento de análise termogravimétrica modelo TGA Q-5000 – TA Instruments, disponível na Unidade de Caracterização Térmica (SEPOL) na UENF.

A faixa de temperatura utilizada na análise foi da temperatura ambiente até 500°C, utilizando uma taxa de aquecimento de 10°C/min e o fluxo de nitrogênio foi mantido a 50 mL/min durante toda a análise.

3.3.4 Determinação da Eficiência de Encapsulação (%) de progesterona nas formulações utilizando P3HB e P3(HB-co-HHx)

A quantificação da progesterona remanescente nas formulações após o período de liberação consistiu em dissolver 0,04 g de micropartículas usadas no estudo de liberação, ou seja, as micropartículas já tinham liberado uma quantidade significativa de progesterona, em 10 mL de clorofórmio. Após dissolução a solução obtida foi gotejada em 100 mL de solução etanol/água 60% gelada, para que ocorresse a precipitação do polímero e posteriormente essa solução foi colocada na estufa a vácuo, a temperatura ambiente, para que o clorofórmio, componente mais volátil, evaporasse. Após evaporação completa do clorofórmio a mistura foi levada a uma centrífuga (30000 rpm durante 10 minutos) e uma alíquota foi retirada do sobrenadante. A partir dessa alíquota foi determinada a progesterona remanescente nas partículas utilizando um espectrômetro modelo UV-50 Bio – Cary, com comprimento de onda de 247 nm (o branco foi feito utilizando o mesmo procedimento, porém partindo de micropartículas sem progesterona). O espectrômetro utilizado pertence ao Setor de fisiologia vegetal bioquímica e metabolismo de plantas - LMGV/CCTA na UENF.

Utilizando amostras com concentrações de progesterona conhecidas, uma curva de calibração foi construída ($y = 0,0417x + 0,0744$) (Figura 15) para determinar, a partir das leituras de absorvância, a concentração de progesterona em cada alíquota analisada.

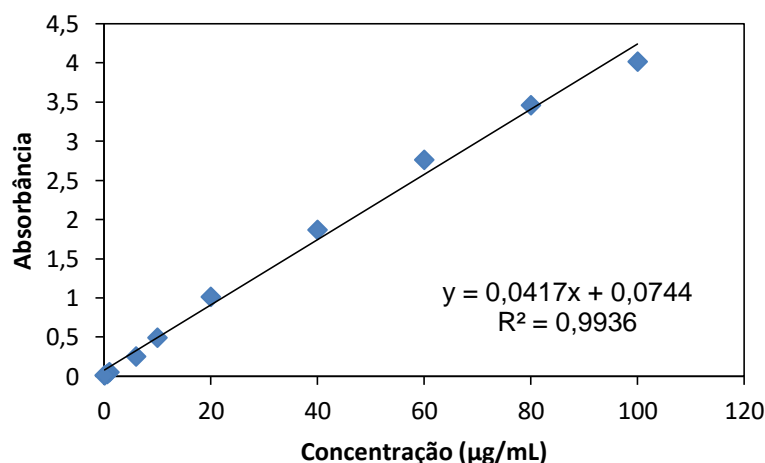


Figura 15 – Curva de calibração de progesterona em etanol/água 60%.

A eficiência de encapsulação poderá então ser calculada utilizando a Equação 8 (Bazzo, *et al.*, 2008 – adaptada):

$$\text{Eficiência de encapsulação} = \frac{(m_2 + m_3)}{m_1} \times 100 \quad \text{Eq 8}$$

Sendo:

m_1 = Massa de droga utilizada na formulação

m_2 = Massa de droga obtida no final do período de liberação

m_3 = Massa de droga remanescente nas partículas ao término do período de liberação.

3.3.5 Distribuição de tamanho

A distribuição de tamanho das micropartículas de PHB, PHB/nM/Pg, P3(HB-co-HHx) e P3(HB-co-HHx)/nM/Pg foi realizada utilizando para cada amostra, 5 imagens diferentes com mais de 150 partículas. As imagens foram obtidas em um microscópio confocal, Lext 3D a laser OLS4000 da marca Olympus disponível no Laboratório de Materiais Avançados (LAMAV) na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

Todas as amostras, contendo as micropartículas usadas, se encontravam secas e foram dispostas em uma lâmina de vidro para a observação.

3.3.6 Morfologia externa das formulações

A análise de MEV foi realizada nas micropartículas de P3HB, P3(HB-co-HHx), P3HB/nM/Pg e P3(HB-co-HHx)/nM/Pg para verificar o tamanho e a morfologia externa das micropartículas. Para esse fim foi usado um microscópio Eletrônico de Varredura Shimadzu, modelo SSX - 550, operando em uma voltagem de 18 kV, disponível no Laboratório de Materiais Avançados (LAMAV) na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

Para que fosse possível a obtenção das imagens, as amostras foram depositadas em um porta amostra com fita dupla-face de carbono e recoberta com ouro (metalizadas) para evitar que a amostra sofra descargas durante a análise.

3.3.7 Cristalinidade da matriz polimérica

A cristalinidade da fase polimérica presente nas formulações de P3HB, P3HB/nM/Pg, P3(HB-co-HHx) e P3(HB-co-HHx)/nM/Pg foi determinada com auxílio dos difratogramas de Raios-X. Para esse fim, utilizou-se um método de deconvolução dos picos, no programa computacional Fityk 0.9.8, para determinar as áreas referentes à contribuição cristalina e amorfa.

A percentagem de cristalinidade foi obtida através da seguinte equação (Xu, *et al.*, 2013):

$$C (\%) = \frac{\sum A_{CR}}{\sum A_{CR} + A_{AM}} \times 100 \quad Eq. 9$$

Onde:

- $\sum A_{CR}$ é o somatório correspondente da região cristalina;
- $\sum A_{CR} + A_{AM}$ é o somatório correspondente da região amorfa e cristalina (área total);
- $C (\%)$ percentual de cristalinidade.

Os difratogramas foram obtidos a partir de um difratômetro Bruker modelo D8 Advance, instalado no Laboratório de Caracterização de Materiais – Propemmm– Ifes Vitória, equipado com radiação de Cu com 1,5418 Å. As varreduras foram feitas na faixa do ângulo de difração $2\theta = 10^\circ$ - 60° , sendo utilizada a tensão de 40 kV e uma corrente no filamento de 40 mA.

3.3.8 Estudo da liberação da progesterona nas formulações de P3HB e P3(HB-co-HHx)

Para o estudo da liberação da progesterona nas diferentes formulações foram preparados 3 tubos de ensaio contendo 40 mg de micropartículas, de P3HB/nM/Pg em um dos ensaios e em outro de P3(HB-co-HHx)/nM/Pg, em 10 mL de etanol/água (em uma proporção de 60% v/v), onde 5 mL estavam em contato com as partículas e os outros 5 mL estavam separados por um filtro de Nitrato de Celulose de 0,45 μ m (Figura 16). Os tubos foram mantidos em repouso e à temperatura ambiente.

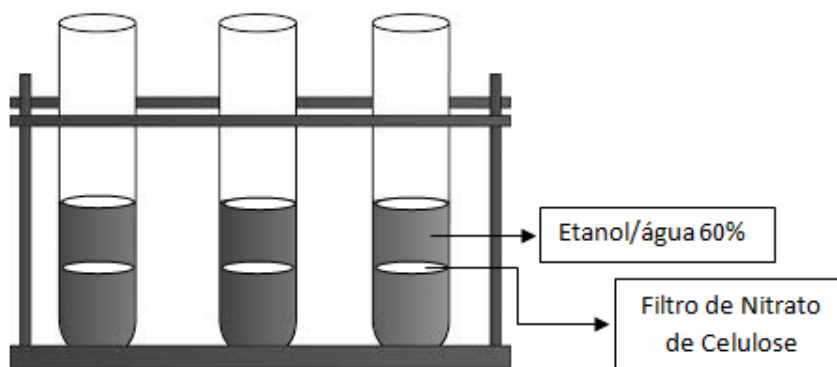


Figura 16 – Esquema ilustrativo do sistema utilizado para o estudo da liberação sem presença de campo magnético.

Em intervalos regulares foi retirado 2 mL da solução e a quantidade de progesterona contida nesta alíquota foi medida com o auxílio de um espectrômetro de Ultravioleta. Após a retirada de cada alíquota o volume retirado era repostado pela solução de etanol/água 60% v/v (Taghizadeh *et al.*, 2004; Mashak e Taghizadeh, 2006).

Já para o estudo da liberação na presença de um campo magnético, o procedimento realizado foi semelhante ao anterior com a diferença que as amostras ficaram expostas a um campo magnético externo pulsante. Para que isso fosse possível, foi utilizado um protótipo montado pelo grupo de pesquisa do Setor de Polímeros da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (SEPOL/UENF) (Figura 17).

Esse dispositivo é formado por 2 ímãs permanentes de Neodímio-Ferro-Boro (0,3T) colocados radialmente em um motor que gira a uma frequência de 53 Hz, a frequência de giro do motor e o comportamento do campo magnético gerado foi verificado com o auxílio de um Osciloscópio MO-1225 20 MHz (Figura 18).

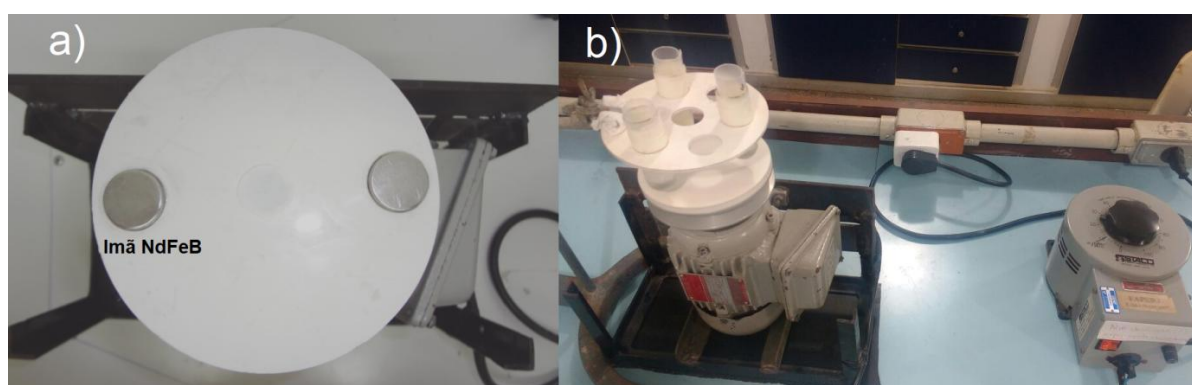


Figura 17– Visão superior (a) e lateral (b) do equipamento utilizado para aplicar o campo magnético pulsante nas amostras.



Figura 18 – Osciloscópio usado para medir a frequência de giro do motor e observar o comportamento da onda magnética resultante dos ímãs fixados nesse motor.

As amostras ficaram a uma distância onde o campo magnético, ao qual as micropartículas foram expostas, foi de 0,2 T, valor determinado com auxílio de um Gaussímetro GM08 da Hirst-Magnétic Intrument Ltda (Leite, 2014).

Para quantificar a concentração de progesterona liberada, foi utilizada a mesma curva de calibração feita para o estudo da eficiência de encapsulação (Figura 15) onde a equação obtida a partir da reta foi $y = 0,0417x + 0,0744$ e o coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,936. Todas as leituras foram feitas utilizando um Espectrômetro Vis/UV Cary 50 Bio comprimento de onda de 247 nm, pertencente ao setor de fisiologia vegetal bioquímica e metabolismo de plantas LMGV/CCTA.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização dos polihidroxicanoatos *in natura*

4.1.1 Caracterização na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) dos polihidroxicanoatos utilizados como matriz

Os espectros no infravermelho (FTIR) dos polihidroxicanoatos *in natura* (Figura 19) utilizados nas formulações possuem uma banda de absorção bem definida em torno de 1750 cm^{-1} referente à vibração de alongamento do C=O, característico da estrutura poliéster presente nesses polímeros, assim como no intervalo entre 1320 a 1160 cm^{-1} onde aparecem bandas referentes a vibrações dos grupos C-O-C. Uma região que deve receber destaque se encontra em torno de 2930 cm^{-1} e 2980 cm^{-1} , estes sinais são atribuídos as vibrações de alongamento do CH_2 e CH_3 , respectivamente. Essa região é importante, pois a diferença entre as estruturas do P3HB e P3(HB-co-HHx) é o comprimento da cadeia lateral do comonômero 3HHx. Por isso, a intensidade da banda em 2930 cm^{-1} , caracteriza esta diferença entre as estruturas e pode-se observar que este sinal é pronunciado ainda que com apenas 5,85% em mol da unidade 3HHx no copolímero (Lageveen *et al.*, 1988; Padermshoke *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007).

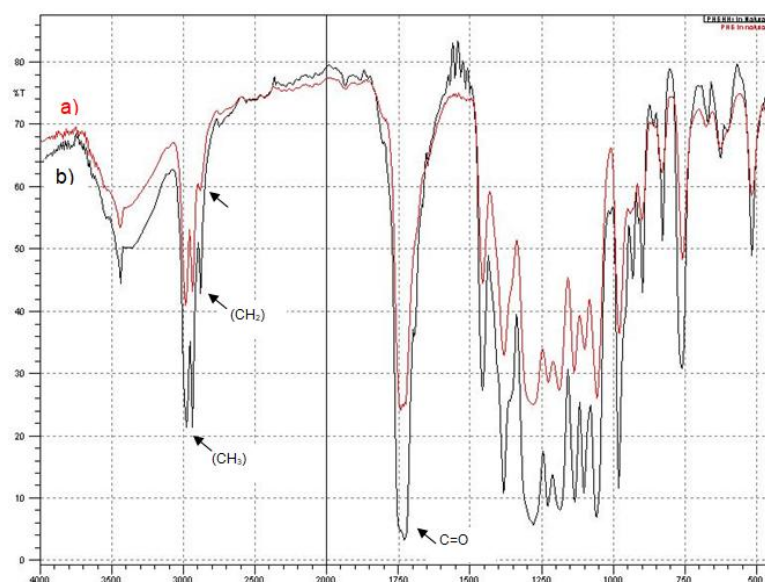


Figura 19 – Espectro no Infravermelho do a) P3(HB-co-HHx) *in natura* e b) P3HB *in natura*.

Nos espectros referentes aos polihidroxicanoatos *in natura* contendo progesterona (Figura 20) é observado uma diferença na intensidade do sinal presente na região em torno de 1650 cm^{-1} , se comparado aos espectros dos polihidroxicanoatos *in natura* puros, região esta que se encontra indicada pelas setas colocadas na figura a seguir (Figura 20). Essa região do espectro aparece os picos característicos referentes à progesterona, em 1661 cm^{-1} e 1698 cm^{-1} , relativo ao estiramento da carbonila C_3 e C_{20} (Cerchiara *et al.*, 2003). No entanto, não é possível definir qual o tipo de interação existente entre os polihidroxicanoatos e a progesterona.

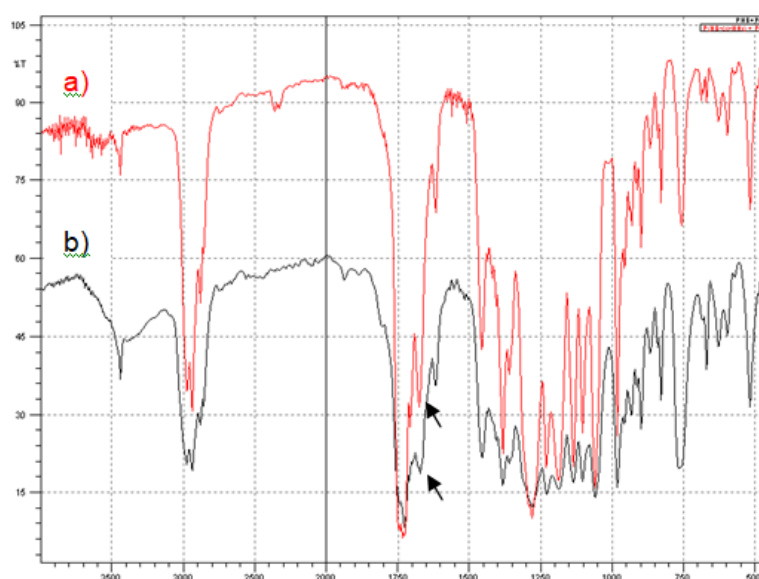


Figura 20 – Espectro do Infravermelho do a) P3(HB-co-HHx) + progesterona e b) P3HB + progesterona *in natura*.

4.2 Caracterização das formulações contendo progesterona e nanomagnetita (PHAs/nM/Pg)

4.2.1 Análise termogravimétrica (TGA)

As curvas termogravimétricas, integral e diferencial, relativas às micropartículas de P3HB, P3(HB-co-HHx), P3HB/nM/Pg e P3(HB-co-HHx)/nM/Pg (Figuras 21 e 22) mostram que a termodegradação das matrizes ocorrem em intervalos de temperaturas diferentes. A degradação das micropartículas de P3HB

(267°C) ocorre a uma temperatura inferior a degradação das micropartículas de P3(HB-co-HHx) (277°C). A maior estabilidade térmica do copolímero P3(HB-co-HHx) em relação ao P3HB também foi observada pelo Xie e Chen (2008). Esses resultados mostram que o co-mônômero HHx contribuem para a estabilidade térmica, provavelmente devido a mecanismos que dificultam a via de degradação térmica por cisão aleatória de cadeias dos seus grupos ésteres (Aoyagi *et al*, 2002; Rajaratnam *et al.*, 2017).

O comportamento térmico observado para as formulações de polihidroxicanoatos contendo magnetita e progesterona evidencia uma diminuição da temperatura de degradação registrada no termograma para as micropartículas de P3HB/nM/Pg e P3(HB-co-HHx)/nM/Pg em relação as de P3HB e P3(HB-co-HHx). O que é um indicativo da influência da nanomagnetita, seja pelo aumento da condutividade térmica nas formulações, que elimina possíveis diferenças entre a temperatura registrada e a temperatura das amostras e/ou por consequência de interações entre a superfície das nanomagnetitas com a matriz polimérica que diminui sua estabilidade térmica. O comportamento térmico das amostras pode ser observado na Tabela 3. Leite (2014) em sua dissertação de mestrado também observou a diminuição da estabilidade térmica causada pela magnetita em microcápsulas de quitosana e relacionou esse resultado ao aumento da condutividade térmica.

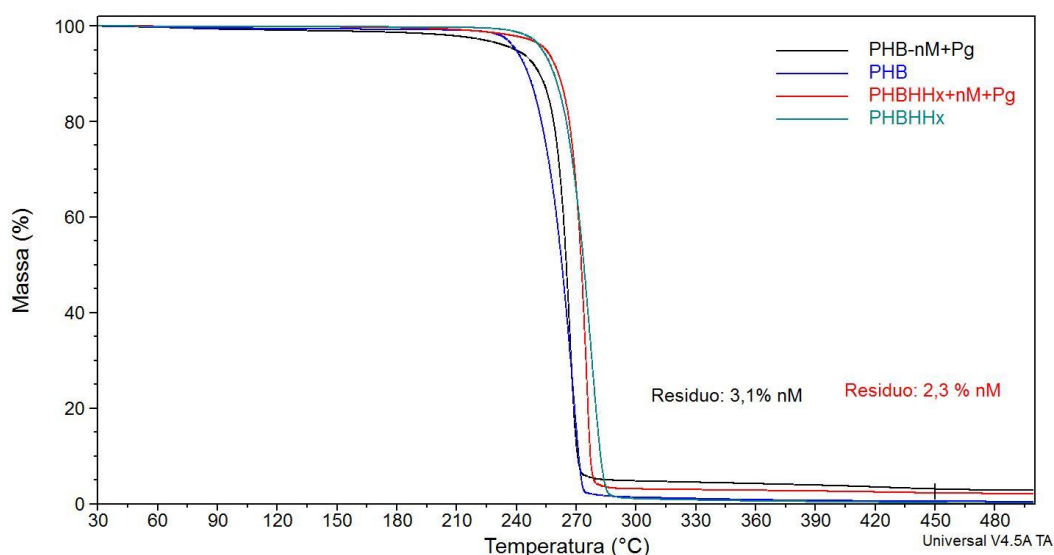


Figura 21 – Termograma das micropartículas de P3HB, P3HB/nM/Pg, P3(HB-co-HHx), P3(HB-co-HHx) /nM/Pg.

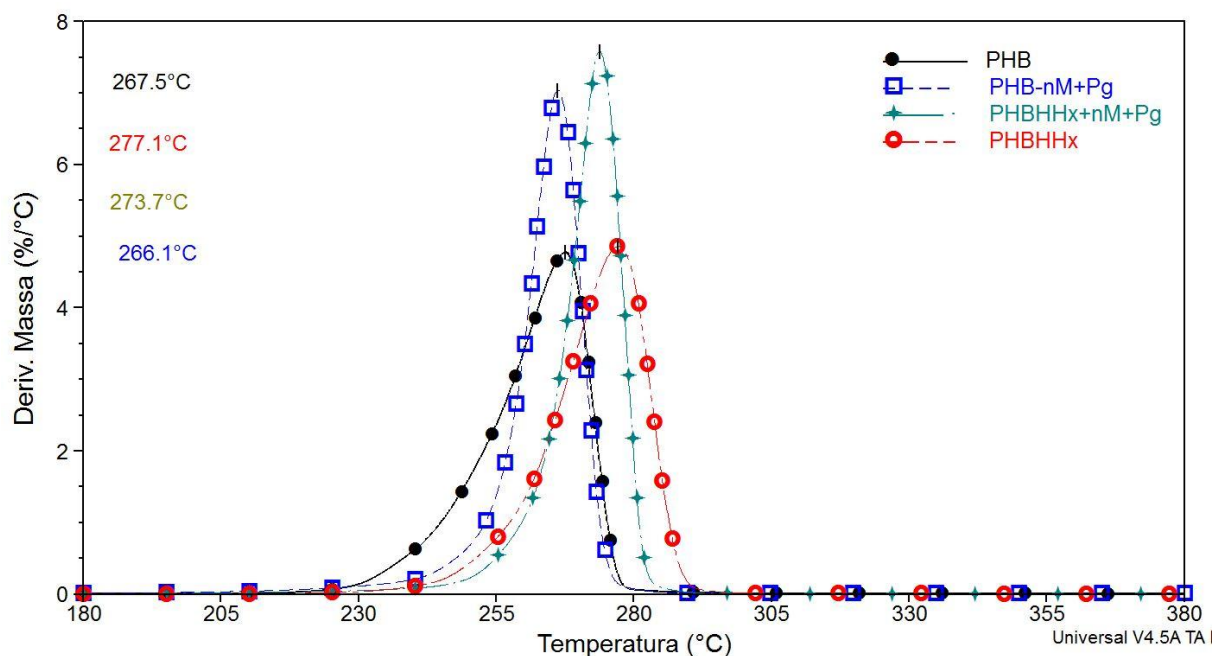


Figura 22 – Termograma DTGA das micropartículas de P3HB, P3HB/nM/Pg, P3(HB-co-HHx), P3(HB-co-HHx) /nM/Pg.

A partir da curva integral do termograma (Figura 21) foi determinada a massa percentual da magnetita presente nas formulações, pois esta permanece como um resíduo (Tabela 3), nas condições experimentais utilizadas. A quantidade de magnetita presente nas micropartículas de P3HB foi de 3,1% enquanto nas micropartículas de P3(HB-co-HHx) foi de 2,3%.

A liberação da progesterona na presença do campo magnético externo é dependente da vibração causada na carga magnética presente nas formulações, que induz um aumento do coeficiente de difusão (Dash e Cudworth, 1998). Assim, a diferença registrada no conteúdo de nanomagnetita nas formulações deve originar um efeito mais discreto no sistema com P3(HB-co-HHx).

Tabela 3- Comportamento Térmico das micropartículas.

Amostras	Temperatura de degradação (°C)	Resíduo (%)
P3HB	267,5	-
P3HB/nM/Pg	266,1	3,1
P3(HB-co-HHx)	277,1	-
P3(HB-co-HHx)/nM/Pg	273,7	2,3

4.2.2 Determinação da Eficiência de Encapsulação (%) de progesterona nas micropartículas de P3(HB-co-HHx)

Para determinar a quantidade de progesterona remanescente nas micropartículas foi utilizado a equação $y = 0,0417x + 0,0744$ obtida da curva de calibração (Figura 15). Assim, o cálculo da eficiência de encapsulação foi feito utilizando a equação 8 e os valores obtidos encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4- Eficiência de encapsulação da progesterona das micropartículas de P3HB e P3(HB-co-HHx) contendo nanomagnetita.

Amostras	Progesterona de partida (g)	Progesterona liberada (g)*	Progesterona remanescente (g)	Eficiência de encapsulação
P3HB ^(a)	0,3	0,1617	0,0456	69,10%
P3HB ^(b)	0,3	0,1894	0,0311	73,50%
Média	-	-	-	71,3 ± 2
P3(HB-co-HHx) ^(a)	0,3	0,1862	0,0507	78,99%
P3(HB-co-HHx) ^(b)	0,3	0,2187	0,0497	89,46%
Média	-	-	-	84,2 ± 3

a) cápsulas usadas na liberação sem a presença de campo magnético

b) cápsulas usadas na liberação com a presença de campo magnético

*massa de progesterona obtida no final do período de liberação

Os valores de eficiência de encapsulação indicam que o procedimento adotado de simples emulsão é adequado para formular micropartículas de P3HB e P3(HB-co-HHx), que possuem características hidrofóbicas, e encapsular a progesterona, hormônio lipofílico. Considerando que todos os parâmetros de processamento e as massas molares dos polímeros são da mesma ordem de grandeza, o fator principal que deve ter influenciado na eficiência de encapsulação da progesterona nessas formulações são as interações de natureza hidrofóbica, que resultam entre a progesterona e a matriz. Como consequência dessa maior interação, a eficiência de encapsulação da progesterona será maior na matriz de P3(HB-co-HHx), do que na matriz de P3HB, devido a sua cadeia lateral maior que

acentua este caráter hidrofóbico e aumenta o espaçamento entre as cadeias facilitando as interações (Dhakar *et al.*, 2010).

Lins e colaboradores (2014) utilizaram-se do método de simples emulsão para obter partículas de P3HB contendo cetoprofeno (anti-inflamatório) obtiveram uma eficiência de encapsulação de 60%. Alguns fatores podem ter contribuído para que a eficiência de encapsulação reportada por esses pesquisadores tenha sido menor do que a encontrada no presente trabalho, como o uso de temperatura ambiente durante a formulação e o fato do Cetoprofeno ter um caráter menos hidrofóbico do que a progesterona. Estes fatores podem ter levado a uma maior difusão do fármaco para o meio aquoso durante a técnica de simples emulsão, diminuindo assim a quantidade de droga encapsulada.

Uma alta eficiência de encapsulação (89%) também foi encontrada por Peng *et al* (2012) para microcápsulas de P3(HB-co-HHx) contendo insulina complexada, sua alta eficiência de encapsulação foi justificada pela grande interação entre a insulina complexada com fosfolipídeos e a matriz de P3(HB-co-HHx).

4.2.3 Distribuição de tamanho

A distribuição de tamanho das micropartículas de P3HB, P3HB/nM/Pg, P3(HB-co-HHx) e P3(HB-co-HHx)/nM/Pg foram determinadas com o auxílio de imagens obtidas no microscópio confocal (Figuras 23 - 28). As imagens mostraram algumas regiões onde as partículas ficaram sobrepostas, formando aglomerados. Essas regiões aglomeradas ocorreram devido à dificuldade de dispersar partículas com granulometria em escala de poucos microns onde as forças atrativas entre as partículas são grandes devido à elevada energia superficial (Issa *et al.*, 2013).

As micropartículas de P3HB (Figura 23) apresentaram a distribuição de tamanho entre 2-44 μm com maior distribuição entre 2-16 μm . Já as micropartículas de P3HB/nM (Figura 24) apresentaram a distribuição de tamanho mais larga com partículas com tamanho entre 2-100 μm enquanto as de P3HB/nM/Pg (Figura 25) entre 2-86 μm , com uma maior distribuição entre 2-16 μm (50% das partículas). Em média a adição de magnetita e progesterona nas micropartículas de P3HB/nM/Pg resultaram na obtenção de micropartículas maiores. Porém a maior contribuição continua na mesma faixa de tamanho, ou seja, entre 2-16 μm .

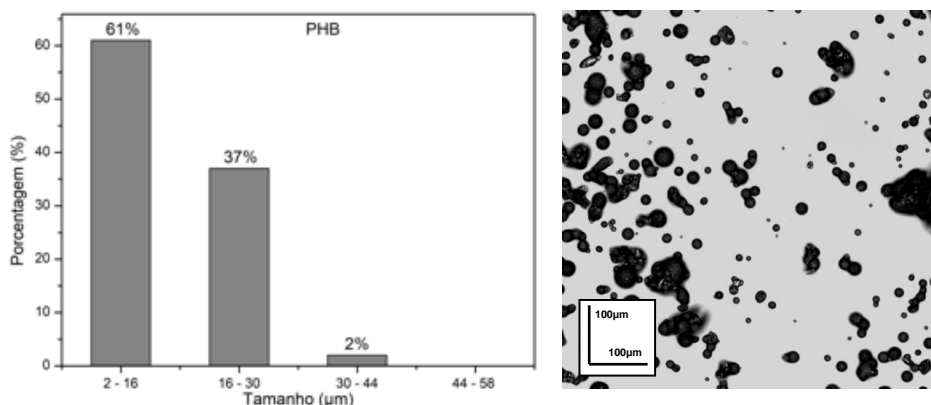


Figura 23 – Distribuição de tamanho referente às micropartículas de P3HB e ao lado uma das imagens utilizadas para analisar o tamanho dessas partículas.

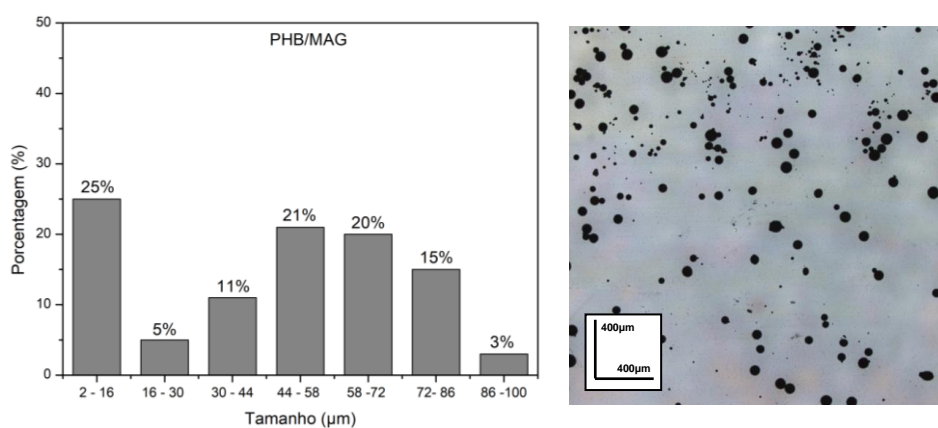


Figura 24 – Distribuição de tamanho referente às micropartículas de P3HB/nM e ao lado uma das imagens utilizadas para analisar o tamanho dessas partículas.

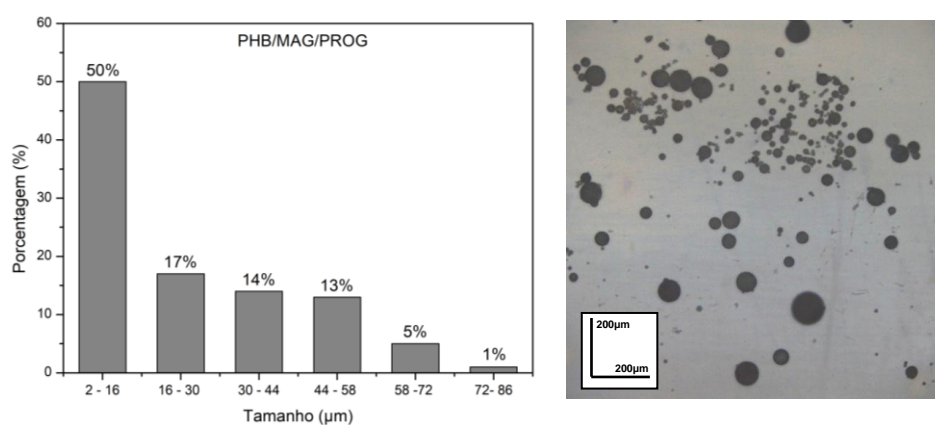


Figura 25 – Distribuição de tamanho referente às micropartículas de P3HB/nM/Pg e ao lado uma das imagens utilizadas para analisar o tamanho dessas partículas.

A distribuição de tamanho das partículas de P3(HB-co-HHx) (Figura 26) ficou entre 2-58 μ m, com maior distribuição na faixa de 16-30 μ m. Já as micropartículas de P3(HB-co-HHx)/nM (Figura 27) obtiveram distribuição de tamanho entre 2-58 μ m, com 81% das partículas entre 2-30 μ m. A distribuição de tamanho das partículas de P3(HB-co-HHx)/nM/Pg (Figura 28) ficou entre 2-72 μ m com maior distribuição na faixa de 2-44 μ m (91%). A adição de magnetita e progesterona nessas micropartículas pouco influenciou no tamanho final das micropartículas de P3(HB-co-HHx).

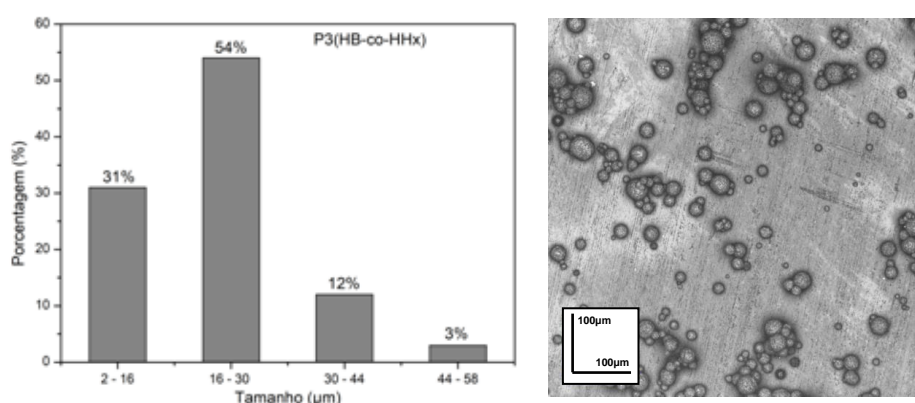


Figura 26 – Distribuição de tamanho referente às micropartículas de P3(HB-co-HHx) e ao lado uma das imagens utilizadas para analisar o tamanho dessas partículas.

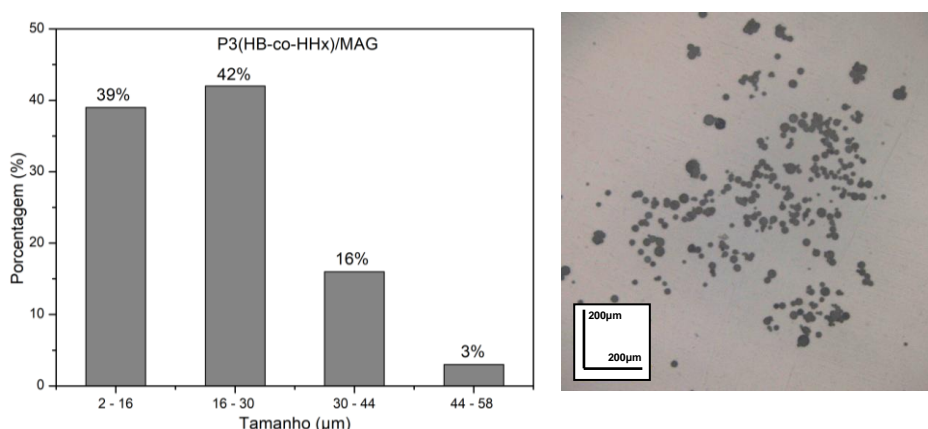


Figura 27 – Distribuição de tamanho referente às micropartículas de P3(HB-co-HHx)/nM e ao lado uma das imagens utilizadas para analisar o tamanho dessas partículas.

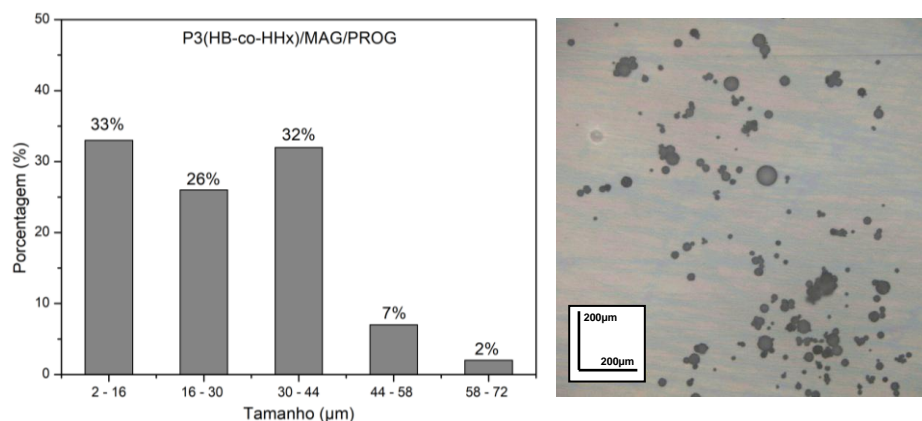


Figura 28 – Distribuição de tamanho referente às micropartículas de P3(HB-co-HHx)/nM/Pg e ao lado uma das imagens utilizadas para analisar o tamanho dessas partículas.

Pode-se inferir que em todas as amostras observadas apresentam uma larga distribuição de tamanho, essa característica é interessante para o sistema de liberação controlada, pois o tamanho da partícula influencia na taxa de degradação da matriz e no tempo de difusão do fármaco para que ocorra a liberação (Leimann *et al.*, 2013). Portanto, uma distribuição mais larga fará com que a liberação mantenha o nível desejado por um período mais longo.

A faixa de tamanho obtida para todas as amostras se encontra adequada para a aplicação desejada utilizando a via intramuscular ou subcutânea, as quais exigem que o tamanho das partículas estejam entre 10 à 250 µm (Tran *et al.*, 2011; Kulkarni e Feng, 2012). No caso específico do uso em equinos é aceitável um tamanho maior das partículas devido ao porte do animal (Silva *et al.*, 2006).

Pelas imagens apresentadas também é possível observar a geometria esférica, sendo este um dos parâmetros que se deve conhecer para a aplicação adequada de um modelo matemático no estudo da cinética da liberação de fármacos (Siepmann e Siepmann, 2012).

O tamanho médio das partículas obtidas pode ser observado na Tabela 5, onde podemos verificar uma tendência das micropartículas de P3HB (15 µm) a apresentar um diâmetro médio menor do que as micropartículas de P3HB/nM/Pg (24 µm). Essa redução de tamanho das micropartículas também pode ser observada analisando as imagens obtidas por MEV (Figuras 29 e 30). Essa mesma tendência foi mais discreta para as micropartículas de P3(HB-co-HHx) (21 µm) que obtiveram tamanho médio semelhante ao da formulação P3(HB-co-HHx)/nM/Pg (25 µm).

Conforme mostrado na Tabela 5 os rendimentos do processo de Formulação das microcápsulas foram superiores a 50%, mostrando que o método de simples emulsão e os parâmetros usados na formulação se mostraram adequados para obtenção de partículas com tamanho apropriado e um bom rendimento em relação a quantidade de polímero utilizado na formulação de micropartículas.

Tabela 5- Tamanho médio e rendimento obtido de cada tipo de formulações.

Amostras	Tamanho médio (μm)	Rendimento*
P3HB	14,7	60,04%
P3HB/Magnetita	45,4	57,80%
P3HB/Magnetita/Progesterona	24,3	68,22%
P3(HB-co-HHx)	21,2	72,80%
P3(HB-co-HHx)/Magnetita	20,9	54,40%
P3(HB-co-HHx)/Magnetita/Progesterona	25,3	68,85%

*Rendimento: relação entre a massa das micropartículas obtidas e a massa de polímero empregada na formulação.

Rodríguez-Contreras e colaboradores (2013) utilizaram várias técnicas para obter micropartículas de PHB contendo doxiciclina (antibacteriano) e mostraram que o tamanho das partículas é sensível a velocidade de agitação no momento da formulação. Utilizando a técnica de simples emulsão eles obtiveram partículas com tamanho de até 64 μm utilizando uma velocidade de 900 rpm e esse tamanho diminuiu para até 0,43 μm quando a velocidade aumentou para 12000 rpm.

Comparando os resultados relatados no parágrafo anterior com os obtidos neste trabalho podemos verificar que os parâmetros escolhidos para a obtenção das micropartículas ainda podem ser ajustados para que sejam obtidas partículas em escalas ainda menores. Tal diminuição no tamanho das micropartículas tornaria possível a sua utilização usando a via intravenosa, já que esta é a via mais utilizada na administração de hormônio para o controle do ciclo reprodutivo de equinos, onde o tamanho aceitável das micropartículas é de até 5 μm (Silva *et al.*, 2006).

4.2.4 Morfologia externa das micropartículas

As imagens de MEV das micropartículas de P3HB e P3(HB-co-HHx) (Figuras 29 e 31) obtidas por simples emulsão mostram uma geometria esférica regular, com tamanho médio de 13 μm e 22 μm respectivamente. Esses valores estão próximos

aos encontrados anteriormente, confirmando os tamanhos médios determinados com auxílio da Microscopia Óptica Confocal (Figura 23 - 28).

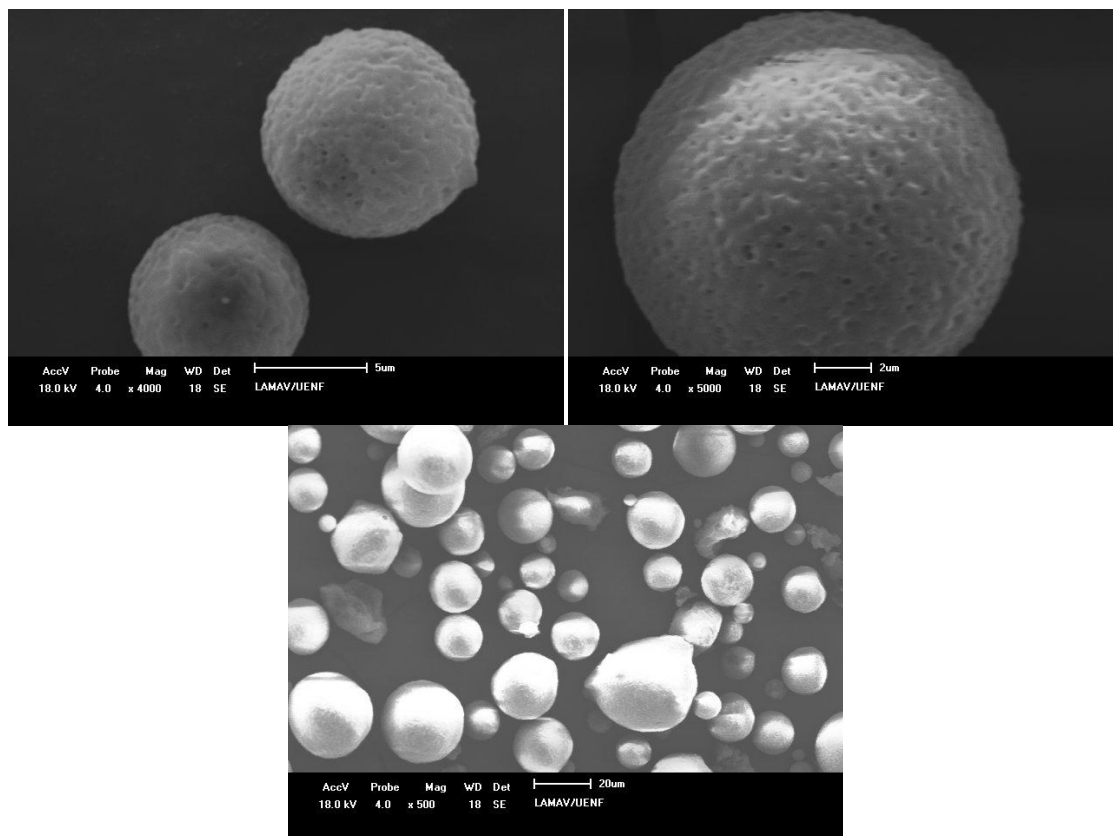


Figura 29 – Imagens obtidas por MEV das micropartículas preparadas por simples emulsão de P3HB.

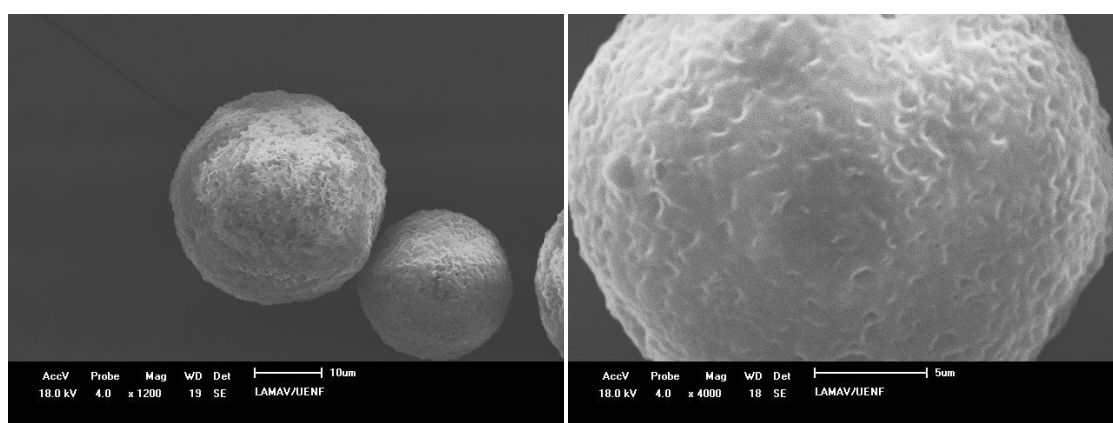


Figura 30 – Imagens obtidas por MEV das micropartículas preparadas por simples emulsão de P3HB/nM/Pg.

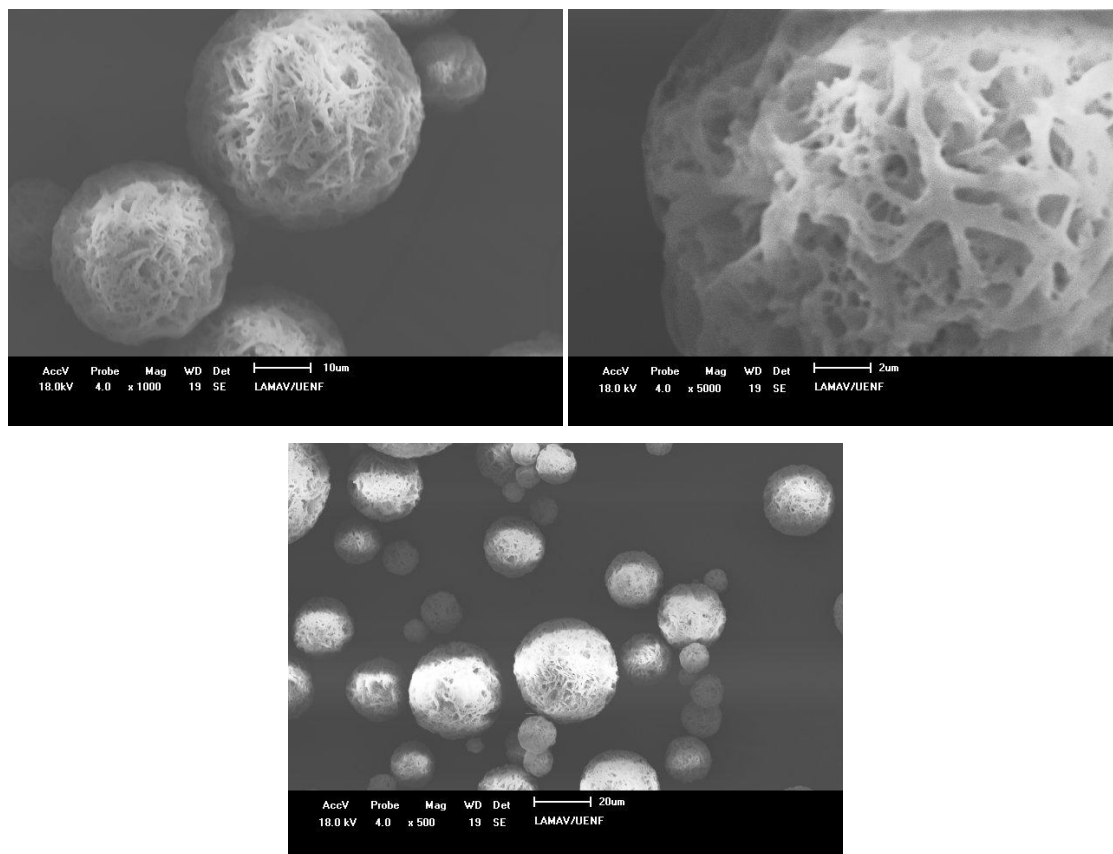


Figura 31 – Imagens obtidas por MEV das micropartículas preparadas por simples emulsão de P3(HB-co-HHx).

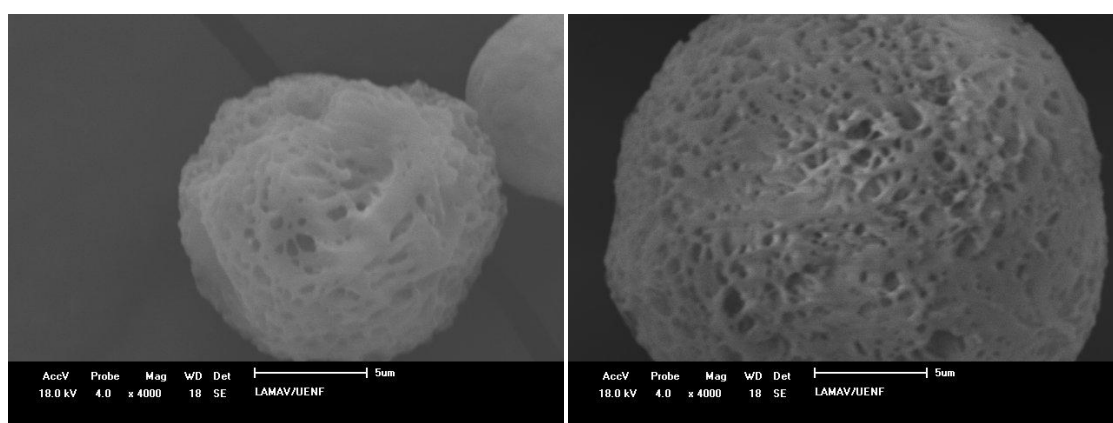


Figura 32 – Imagens obtidas por MEV das micropartículas preparadas por simples emulsão de P3(HB-co-HHx)/nM/Pg.

A superfície das micropartículas são morfologicamente diferentes (Figuras 29 - 32), com a presença de pequenas cavidades e/ou poros para o P3HB e de uma malha ou cavidades bem maiores para o copolímero P3(HB-co-HHx).

A rugosidade das micropartículas de P3HB obtidas pelo método de emulsão pode estar ligada à alta cristalinidade do P3HB e principalmente à rápida taxa de cristalização desse poliéster (Doi, 1990; Abe *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 2000). Sabe-se que a presença do co-mônômero 3HHx além de reduzir a cristalinidade torna a taxa de cristalização do P3(HB-co-HHx) muito menor do que a do P3HB (Xu *et al.*, 2002), este deve ter sido o fator que tornou a superfície das micropartículas dessas duas formulações estudadas tão distintas.

Sá (2000) e Rodriguez-Contreras *et al.* (2013) também encontraram para micropartículas de P3HB, feitas pela técnica de simples emulsão, uma superfície irregular semelhante a observada neste trabalho. Já em relação ao P3(HB-co-HHx) não foram encontrados na literatura estudos prévios sobre a superfície das micropartículas utilizando essa matriz.

4.2.5 Cristalinidade das matrizes poliméricas

Na Figura 33 é apresentado os difratogramas de Raios-X obtidos para as micropartículas de P3HB e P3HB/nM/Pg. Neles é possível a identificação da fase cristalina característica do poli 3-hidroxi-butirato que é um polímero semicristalino de estrutura cristalina ortorrômbica e planos de reflexão em (020), (110), (021), (101), (111), (121), (040), (002) e (200) (Skrbic e Divjakovic, 1996; Galego *et al.*, 2000).

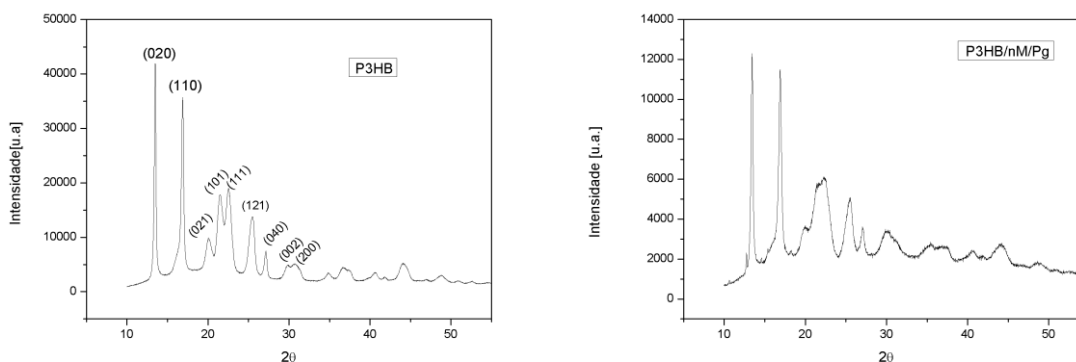


Figura 33 – Difratogramas de Raios-X das micropartículas de P3HB e P3HB/nM/Pg.

Na Figura 34 são apresentados os difratogramas de Raios-X obtidos para as microcápsulas do copolímero P3(HB-co-HHx) e P3(HB-co-HHx)/nM/Pg. Também

apresenta uma forma cristalina ortorrômbica como o P3HB. A forma cristalina se mantém devido ao baixo conteúdo do co-monômero 3-hidroxi-hexanoato (HHx) (5%). O co-monômero 3HHx dificulta a formação da estrutura cristalina, aumentando a fração amorfa do copolímero, porém pouco influencia nos planos cristalinos da estrutura ortorrômbica que é mantida (Padermshoke *et al.*, 2004).

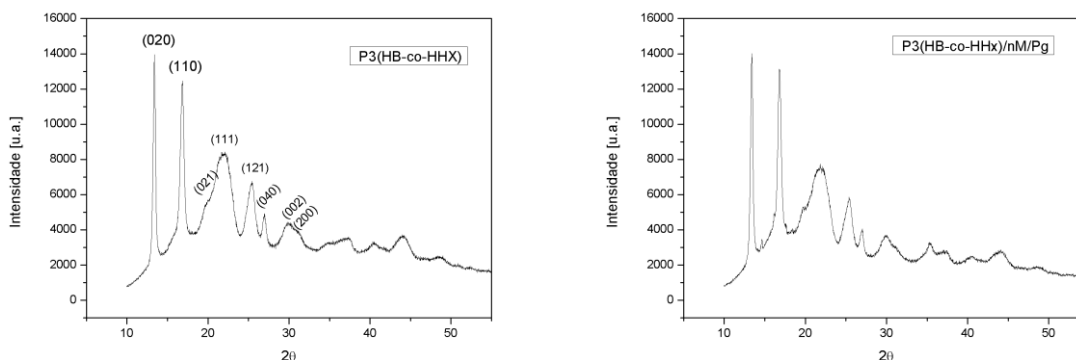


Figura 34 – Difractogramas de Raios-X das micropartículas de P3(HB-co-HHx) e P3(HB-co-HHx)/nM/Pg.

Doi e colaboradores (1995) estudando a cristalinidade e os parâmetros cristalográficos do P3(HB-co-HV) e P3(HB-co-HHx) constataram que a cristalinidade desses copolímeros são consideravelmente menores do que a cristalinidade do PHB e que essa cristalinidade era dependente da quantidade de co-monômero 3-hidroxi-valerato e 3-hidroxi-hexanoato. Porém, eles observaram que os parâmetros cristalográficos pouco foram influenciados e a estrutura ortorrômbica foi mantida em um copolímero de composição de até 25% de HHx. Sato e colaboradores (2004) utilizaram a difração de Raios-X e estudos na região do infravermelho para caracterizar a estrutura cristalina e cristalinidade do P3(HB-co-HHx) com 12% de HHx e em seus estudos confirmaram a estrutura cristalina ortorrômbica.

A cristalinidade das micropartículas, determinadas mediante deconvolução das curvas experimentais (Figura 35) dos difractogramas de Raios-X, foi calculada utilizando a Equação 9. Os valores de cristalinidade são apresentados na Tabela 6.

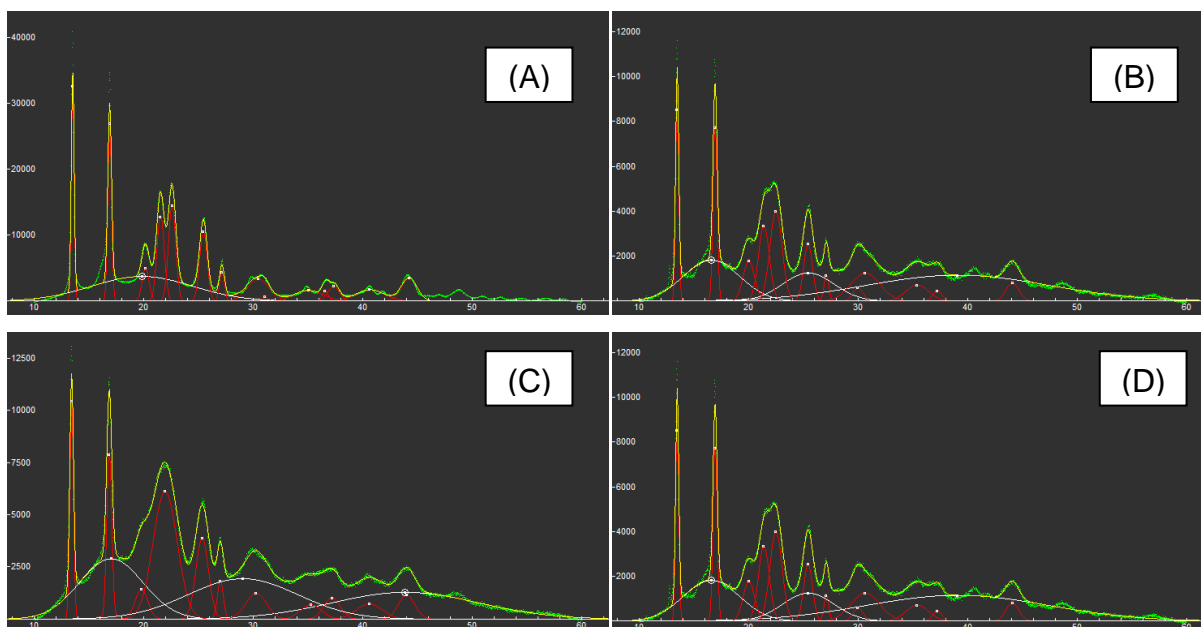


Figura 35 – Deconvolução dos Difractogramas de Raios-X das formulações de A) P3HB; B) P3HB/nM/Pg; C) P3(HB-co-HHx) e D) P3(HB-co-HHx)/ nM/Pg.

Tabela 6 – Cristalinidade das micropartículas.

Polímero	Cristalinidade (%)
P3HB	59,5%
P3HB/nM/Pg	41,5%
P3(HB-co-HHx)	40,5%
P3(HB-co-HHx)/nM/Pg	41,8%

A cristalinidade encontrada para o P3HB foi menor do que a cristalinidade reportada na literatura para este polímero. Galego e colaboradores (2000) encontraram 69% de cristalinidade para o P3HB, já Leite (2004) em sua dissertação encontrou cristalinidade para o P3HB em torno de 72%. O menor valor de cristalinidade encontrado no presente trabalho pode ser explicado, pois a análise de difração de Raios-X de todas as amostras foram feitas nas micropartículas e não no polímero *in natura*. Sá (2000) relacionou a redução da cristalinidade das micropartículas em relação ao polímero *in natura* com o efeito plastificante dos resíduos de solvente e do tenso ativo utilizados no processo de formulação da partícula.

Outro fator que influencia no valor da cristalinidade que pode explicar a diferença de cristalinidade encontrada no presente trabalho e nos trabalhos reportados é a diferença da massa molar média dos polímeros utilizados. A massa molar ponderada do P3HB utilizado no presente trabalho é de 303.685 Da, enquanto

do P3HB utilizado por Galego *et al* (2000) é de 177.000 Da. As cadeias de baixo peso molecular favorecem uma maior cristalinidade.

Já a cristalinidade encontrada para as partículas de P3(HB-co-HHx) de 40% se encontrou bem próxima à cristalinidade encontrada por Doi e colaboradores (1995) de 42% para o P3(HB-co-HHx) com 5% em mol do co-monômero hidroxihexanoato (HHx). Cheng e colaboradores (2011) em seus estudos encontrou uma cristalinidade de 43% para o P3(HB-co-HHx) contendo 3,9% em mol de hidroxihexanoato (HHx).

A partir dos resultados apresentados na Tabela 6 também é possível observar que a cristalinidade das partículas de P3HB/nM/Pg decaiu 18% em relação às micropartículas de P3HB. O motivo para essa redução de cristalinidade se deve ao provável efeito plastificante causado pela progesterona, que por se tratar de uma molécula pequena se posicionou entre as moléculas do copolímero aumentando a separação entre as cadeias e por consequência, diminuído a cristalinidade. Juni e colaboradores (1986) estudaram o efeito de plastificantes na taxa de liberação de um fármaco anticancerígeno em uma matriz de poli 3-hidroxibutirato. Eles obtiveram um aumento efetivo da taxa de liberação à medida que a quantidade de aditivo (ésteres etílicos e butílicos de ácidos graxos) foi aumentada.

Devido a esse efeito, a cristalinidade das micropartículas de P3HB/nM/Pg e P3(HB-co-HHx)/nM/Pg ficaram bem próximas. Apesar de existirem outros fatores que influenciam na liberação de um fármaco, como a morfologia externa das micropartículas, a cristalinidade é um fator muito importante para sistemas de liberação controlada, visto que a difusão do agente ativo ocorre somente pela porção amorfa do polímero (Narasimhan, 2001). Portanto, não deve ocorrer uma diferença muito significativa entre a taxa de liberação da progesterona nas formulações estudadas, se for considerado apenas a presença da fase cristalina.

4.2.6 Estudo da liberação da progesterona das micropartículas de P3HB e P3(HB-co-HHx)

Como parte do estudo da liberação da progesterona na presença de um campo magnético externo se fez necessário verificar o comportamento do campo magnético gerado pelo protótipo montado pelo grupo de pesquisa do Setor de Polímeros da UENF já retratado na Figura 17. O campo magnético, gerado pelos

ímãs fixados de forma que seus polos Norte e Sul estavam invertidos, se comporta de forma pulsante (Figura 36). A partir desse estudo também foi possível determinar a velocidade de giro que corresponde a 53 Hz de frequência. E essa velocidade foi utilizada durante o teste de liberação (Finotelli *et al.*, 2010).



Figura 36 – Medidas do Osciloscópio do campo magnético gerado pelos ímãs que giram a frequência de 53Hz.

O perfil de liberação de progesterona das micropartículas de P3HB/nM/Pg e P3(HB-co-HHx)/nM/Pg na presença e na ausência de campo magnético externo pulsante estão representados na Tabela 7 e Figura 37.

Tabela 7 - Dados referentes à quantidade de progesterona liberada (%) das formulações em 96 horas na presença e na ausência de campo magnético pulsante.

Tempo (h)	% de Liberação de progesterona na ausência de campo magnético		% de Liberação de progesterona na presença de campo magnético	
	P3HB	P3(HB-co-HHx)	P3HB	P3(HB-co-HHx)
0,25	1,94	0,33	1,39	0,44
0,5	2,29	0,41	1,70	0,76
1	1,61	1,05	3,00	1,76
2	3,67	1,69	4,85	3,83
3	5,15	2,89	7,31	5,47
4	6,41	4,67	10,19	8,43
6	11,28	7,35	16,09	14,03
8	13,29	10,75	19,76	18,52
10	14,83	13,78	25,16	23,21
12	20,99	17,78	32,45	28,65
24	35,53	38,39	40,71	44,53
48	47,48	60,13	51,80	69,05
72	65,05	70,60	71,93	81,71
96	68,84	71,90	80,67	84,44

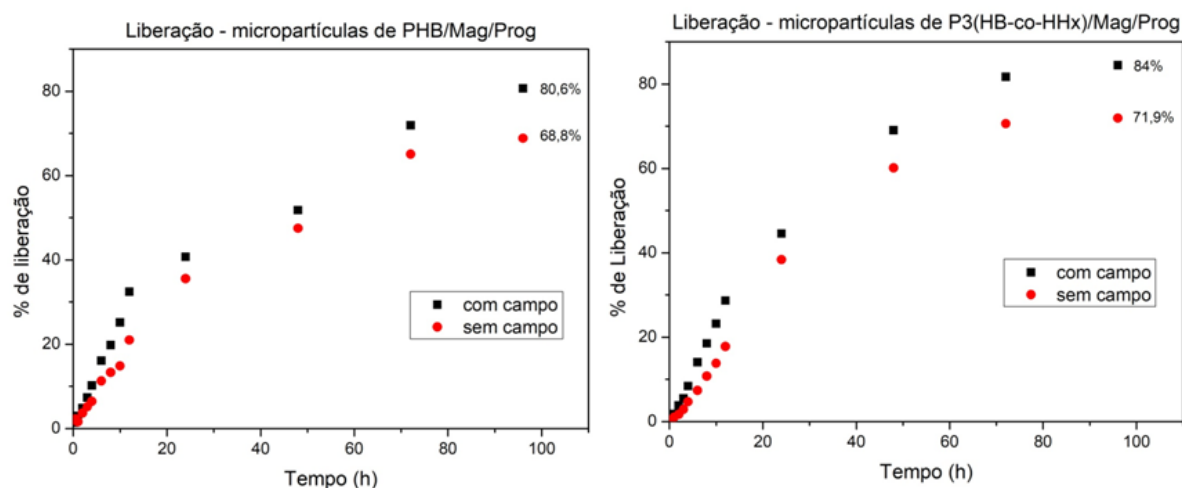


Figura 37 – Perfis de liberação da progesterona na presença e na ausência de campo magnético externo pulsante, para as formulações de P3HB/nM/Pg e P3(HB-co-HHx)/nM/Pg.

Os perfis de liberação dos dois copolímeros estudados, na presença e na ausência de campo magnético pulsante, apresentaram um perfil de liberação semelhante com um “*burst*” (liberação pronunciada) inicial característico de muitos sistemas de liberação controlada (Huang e Brazel, 2001), seguido por uma taxa de liberação mais lenta.

As partículas de P3HB/nM/Pg e P3(HB-co-HHx)/nM/Pg possuem um “*burst*” inicial de aproximadamente 2% durante a primeira hora na presença e na ausência de campo magnético externo, já que este não depende do campo. A liberação de progesterona foi em torno de 20% nas primeiras 12 horas de estudo sem a presença do campo e 30% na presença de um campo magnético pulsante. E ao término do estudo (96 h) cerca de 70% de progesterona tinha sido liberada das partículas que foram mantidas na ausência de campo magnético e cerca de 80% de progesterona liberada das micropartículas de P3HB e P3(HB-co-HHx) na presença de campo magnético pulsante.

A liberação da progesterona através da matriz polimérica ocorre primeiramente através da dessorção da progesterona que se encontra adsorvido na superfície das micropartículas, resultando no característico “*burst*” inicial. Por isso, espera-se que o “*burst*” não dependa da presença do campo magnético, sendo assim neste período ambas as curvas (na presença e na ausência do campo) são praticamente iguais. Após esse período inicial, a progesterona que se encontra no

interior das partículas é liberada através de um processo de transporte por difusão através da região amorfa, já que o P3HB e o P3(HB-co-HHx) não se degradam nas condições utilizadas nesse estudo no período de 96 horas (Peng *et al.*, 2012; Lins *et al.*, 2014).

Lins e colaboradores (2014) estudaram a liberação da droga Cetoprofeno (analgésico, anti-inflamatório e antirreumático), que possui natureza hidrofóbica, em matriz de poli 3-hidroxibutirato e observaram uma liberação pronunciada de 75% do fármaco na primeira hora. Essa alta liberação inicial (“burst”) se deve ao fármaco adsorvido na superfície das partículas proveniente de um processo pouco eficiente de encapsulação. Eles também observaram que o “burst” diminuiu quando as micropartículas de PHB foram revestidas por um filme de quitosana, devido à criação de uma barreira a carga presente na superfície.

Leite (2004) em sua tese de mestrado estudou a liberação de progesterona em matrizes de P3HB (formuladas pela técnica de “Spray Drying”) e observou, em uma das suas formulações um “burst” inicial, onde cerca de 18% da carga ativa foi liberada nas primeiras 2 horas. Essa maior porcentagem de progesterona liberada durante o “burst” em relação à liberação de explosão obtida no presente trabalho indica que a técnica e os parâmetros utilizados durante a formulação influenciam na quantidade de fármaco que fica adsorvido na superfície das micropartículas.

A análise comparativa dos perfis de liberação das formulações estudadas é relativamente complexa, pois deve ser considerando a influência de 3 fatores marcantes: a cristalinidade da matriz, a interação progesterona-matriz e a morfologia apresentada pelas micropartículas. O fato de que a liberação ocorreu principalmente por processos difusivos (após o “burst”) implica que esta seja dependente da cristalinidade do polímero, uma vez que o fármaco se difunde pela região amorfa do polímero e a fase cristalina se comporta como uma barreira ao transporte. Portanto, este fator contribuiu para que os perfis de liberação das cápsulas de P3HB/nM/Pg e P3(HB-co-HHx)/nM/Pg fossem semelhantes. Como já foi discutido anteriormente a cristalinidade das partículas de P3HB diminuiu devido a um efeito plastificante causado pela progesterona, o que resultou em uma cristalinidade bem próximas entre os dois tipos de matrizes utilizadas no estudo de liberação de progesterona.

Outro fator que influencia na taxa de liberação da progesterona é a morfologia externa das micropartículas, onde as formulações de P3(HB-co-HHx) apresentou uma superfície com cavidades maiores e, portanto sua taxa de liberação deveria ser

pronunciadamente maior. Entretanto, como foi discutido na análises da eficiência de encapsulamento, a maior interação progesterona-matriz retarda o processo e consequentemente tem um efeito contrario na taxa de liberação resultando em uma diferença menos pronunciada entre ambas as formulações.

Fazendo uma análise do efeito do campo magnético pulsante nos perfis de liberação de progesterona a partir das micropartículas é possível observar uma diferença de aproximadamente 10% na liberação da progesterona às 96 horas (ao término do estudo), causado pelo efeito do campo magnético. Esse aumento na liberação da progesterona se deve a vibração das nanopartículas magnéticas (nanomagnetita), presentes nas formulações, induzido pelo campo magnético pulsante externo. Visto que essa vibração das nanomagnetitas promove um aumento da temperatura que causa modificações conformacionais nas cadeias poliméricas e aumenta o coeficiente de difusão da matriz, e consequentemente, aumenta o transporte de progesterona (Edelmer e Lander, 1993; Dash e Cudworth, 1998; Liu *et al.*, 2009).

Atentando-se a estrutura das matrizes, o efeito térmico originado pelas cargas magnéticas deveria ser mais pronunciado no copolímero que apresenta uma estrutura mais flexível (menor temperatura de transição vítrea), que é o caso do P3 (HB-co-HHx), dado o efeito plastificante interno da cadeia lateral (3HHx) que introduz a presença do co-monômero na estrutura. Porém, as diferenças encontradas entre as percentagens de progesterona liberada sem e com o efeito do campo magnético para as duas matrizes foram relativamente semelhantes (~10%), isso ocorreu provavelmente por consequência da menor carga magnética que foi constatada nos ensaios termogravimétricos para o copolímero P3(HB-co-HHx). Era de se esperar que se a carga magnética nas duas formulações fossem iguais a diferença na liberação causada pelo efeito do campo magnético externo seria muito mais pronunciado no P3(HB-co-HHx).

Outros trabalhos tem reportado o efeito do campo magnético externo sobre o perfil de liberação de fármacos tais como a Insulina em matriz de Alginato/quitosana (Finotelli *et al.*, 2010) e Levodopa, fármaco antiparkinsonianos, em matriz de Alginato (Kondaveeti *et al.*, 2018), encontrando 20% e 26% respectivamente a mais de liberação devido ao efeito do campo magnético externo. O uso de nanopartículas magnéticas nas formulações de sistemas de liberação controlada e vetorizada de

fármacos é um assunto inovador e não é reportado na literatura o seu uso em matrizes de polihidroxialcanoatos.

Para descrever os possíveis mecanismos que atuam e controlam a liberação de um agente ativo se faz necessário considerar os modelos clássicos de liberação. Foram então, analisados os ajustes dos dados experimentais (após o “burst”) considerando os três principais modelos cinéticos associados a perfis de liberação: cinética de ordem zero, cinética de primeira ordem e cinética $t^{1/2}$ (cinética Higuchi) (Figuras 38 e 39). Na Tabela 8 são apresentados os valores do coeficiente de regressão linear para cada ajuste feito.

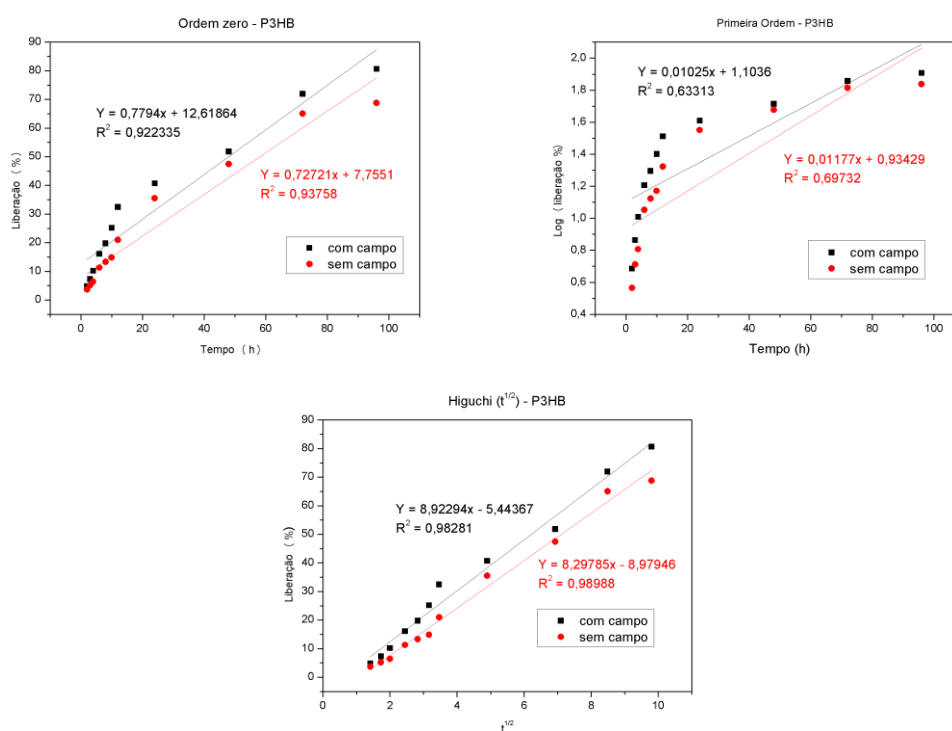


Figura 38 – Correlação linear para a Liberação de ordem zero, primeira ordem e $t^{1/2}$ para as micropartículas de P3HB.

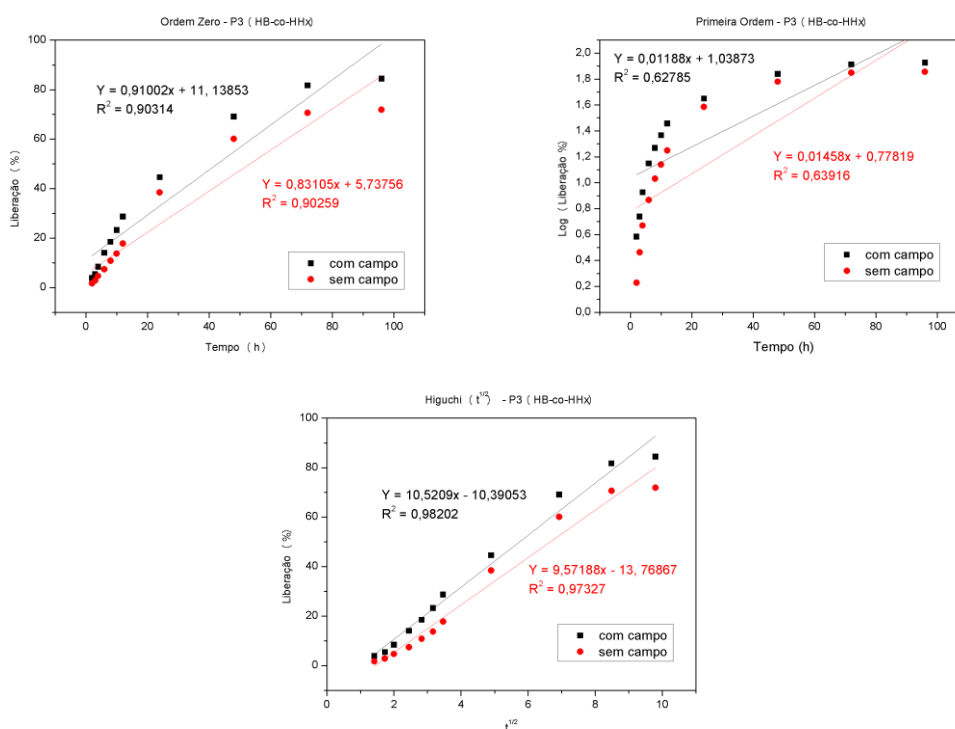


Figura 39 – Correlação linear para a Liberação de ordem zero, primeira ordem e $t^{1/2}$ para as micropartículas de P3(HB-co-HHx).

Tabela 8- Coeficiente de regressão linear dos ajustes feitos para cinética de diferentes ordens.

Modelo cinético	P3HB/Magnetita/Progesterona		P3(HB-co-HHx)/Magnetita/Progesterona	
	Com campo Magnético	Sem Campo Magnético	Com campo Magnético	Sem Campo Magnético
Ordem zero	0,92233	0,93758	0,90314	0,90259
Primeira ordem	0,63313	0,69732	0,62785	0,63916
Higuchi ($t^{1/2}$)	0,98281	0,98988	0,98202	0,97327

Analisando os coeficientes encontrados, é possível verificar que os dados experimentais referentes à liberação da progesterona se ajustam mais a cinética do tipo $t^{1/2}$ mais comum nos sistemas monolíticos. Estudos mais aprofundados da morfologia interna das micropartículas devem ser feitos para que se confirme que as

micropartículas produzidas se tratam ou não de um sistema monolítico onde o agente ativo se encontra disperso na matriz polimérica. A cinética de Higuchi é caracterizada como aquela em que a taxa de liberação diminui de forma menos acentuada do que na cinética de primeira ordem (Costa e Lobo, 2001; Siepmann e Siepmann, 2012; Jain e Jain, 2016).

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

- O método de emulsão simples foi apropriado para as formulações objeto desse estudo considerando que a eficiência de encapsulação alcançada foi superior a 70%.
- Para ambas as formulações os parâmetros de processamento utilizados originaram partículas de formato esférico e com maior distribuição de tamanho entre 2-16 μm . Sendo que para as micropartículas de P3HB a superfície se apresentou de forma rugosa e com carga magnética de 3,1%, enquanto as micropartículas de P3(HB-co-HHx) apresentaram superfície em forma de malha e carga magnética de 2,3%.
- Devido a um possível efeito plastificante, ocasionado pela progesterona, ambas as formulações apresentaram uma cristalinidade de aproximadamente 42%.
- Os perfis de liberação das formulações estudadas se apresentaram de forma semelhante com um “burst” na primeira hora de aproximadamente 2% e ao término da liberação foi possível observar uma liberação de 10% a mais de progesterona devido ao efeito do campo magnético externo.
- O comportamento cinético, observado para as formulações utilizando como matriz o P3HB e P3(HB-co-HHx), correspondeu à cinética Huguchi ($t^{1/2}$). O que indica uma provável distribuição do agente ativo por toda matriz polimérica como é característicos quando utilizadas cargas relativamente hidrofóbicas em matrizes também hidrofóbicas.
- Os resultados apresentados mostraram que o P3HB e P3(HB-co-HHx) são polímeros promissores para a liberação controlada e vetorizada da progesterona quando incorporado um núcleo magnético que permite modular a taxa de liberação e vetorizar a entrega do agente ativo com o auxílio de um campo magnético externo.

SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO PRESENTE ESTUDO

Estudos posteriores deveriam abordar:

- O estabelecimento de parâmetros para a obtenção de capsulas com tamanho nanométrico, para que se possa utilizar a via intravenosa como forma de aplicação no controle do ciclo reprodutivo de equinos, visto que a via intravenosa é a mais utilizada para este fim.
- Estudos *in-vivo* para avaliar tanto o perfil de liberação da progesterona nestas condições quanto a sua eficiência na sincronização do estro de equinos.
- O estudo do perfil de liberação estendido aos copolímeros P3(HB-coHHx) com maiores porcentagens do co-monômero hidroxihexanoato no copolímero procurando um maior impacto do campo magnético externo.

CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, H.; Doi, Y.; Aoki, H.; Akehata, T.; Hori, Y.; Yamaguchi, A. Physical Properties and Enzymatic Degradability of Copolymers of (R)-3-Hydroxybutyric and 6-Hydroxyhexanoic Acids. **Macromolecules**. V. 28, p. 7630-7637, 1995.

Althuri, A.; Mathew, J.; Sindhu, R.; Banerjee, R.; Pandey, A.; Binod, P. Microbial synthesis of poly-3-hydroxybutyrate and its application as targeted drug delivery vehicle. **Bioresource Technology**. V. 145, p. 290-296, 2013.

Andreani, L. **Desenvolvimento e caracterização de microesferas de glúten de Trigo para utilização em sistemas de liberação controlada**. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 91p, 2008.

Aoyagi, Y.; Yamashita, K.; Doi, Y. Thermal degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate], poly[ϵ -caprolactone], and poly[(S)-lactide]. **Polymer Degradation and Stability**. V. 76, p. 53-59, 2002.

Arruebo, M.; Pacheco, R. F., Ibarra, M. R.; Santamaria, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. **Nanotoday**. V. 2(3), p. 22-32, 2007.

Atta, A. M.; El-Mahdy, G. A.; Al-Lohedan, H. A.; Al-Hussain, S. A. Synthesis of Environmentally Friendly Highly Dispersed Magnetite Nanoparticles Based on Rosin Cationic Surfactants as Thin Film Coating of Steel. **International Journal of Molecular Sciences**. V. 15, p. 6974-6989, 2014.

Bôa Morte, E. F. **Suporte modificados com propriedades superparamagneticas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. Campos dos Goytacazes – RJ, 119p. 2017.

Bordes, P.; Pollet, E.; Avérous, L. Nano-biocomposites: Biodegradables polyester/nanoclay systems. **Progress in Polymers Science**. V. 34, p. 125-155, 2009.

Bozzo, G. C.; Lemos-Senna, E.; Gonçalves, M. C.; Pires, A. T. N. Effect of Preparation Conditions on Morphology, Drug Content and Release Profiles of Poly(hydroxybutyrate) Microparticles Containing Piroxicam. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. V. 19 (5), p. 914-921, 2008

Brasil. **Farmacopédia Brasileira** – Volume 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA: Brasília. p. 904, 2010.

Braunegg, G.; Lefebvre, G.; Genser, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**. V. 65, p. 127-161, 1998.

Campos, E.; Branquinho, J.; Carreira, A. S.; Carvalho, A.; Coimbra, P.; Ferreira, P.; Gil, M. H. Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. **European Polymer Journal**. V. 49, p. 2005-2021, 2013.

Cerchiara, T.; Luppi, B.; Bigucci, F.; Zecchi, V. Effect of chitosan on progesterone release from hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexes. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 258, p. 209-215, 2003.

Céspedes, L. G.; Nahat, R. A. T. P. S.; Mendonça, T. T.; Tavares, R. R.; Oliveira-Filho, E. R.; Silva, L. F.; Taciro, M. K.; Sánchez, R. J.; Gomez, J. G. C. A non-naturally-occurring P(3HB-co-3HA_{MCL}) is produced by recombinant *Pseudomonas* sp. From an unrelated carbon source. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 114, p. 512-519, 2018.

Chen, G-Q.; Wu, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**. V. 26, p. 6565-6578, 2005.

Cheng, M. L.; Chen, P. Y.; Lan, C. H.; Sun, Y. M. Structure, mechanical properties and degradation behaviors of the electrospun fibrous blends of PHBHHx/PDLLA. **Polymer**. V. 52, p. 1391-1401, 2011.

Chomoucka, J.; Drbohlavova, J.; Huska, D.; Adam, V.; Kizek, R.; Hubalek, J. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. **Pharmacological Research**. V. 62, p. 144-149, 2010.

Chorny, M.; Fishbein, I.; Yellen, B. B.; Alferiev, I. S.; Bakay, M.; Ganta, S.; Adamo, R.; Amiji, M.; Friedman, G.; Levy, R. J. Targeting stents with local delivery of paclitaxel-loaded magnetic nanoparticles using uniform fields. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. V. 107, p. 8346-8351, 2010.

Costa, P.; Lobo, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 13, p. 123-133, 2001.

Dash, A. K.; Cudworth II, G. C. Therapeutic Applications Implantable Drug Delivery Systems. **Jornal of Pharmacological and Toxicological Methods**. V. 40, p. 1-12, 1998.

Deatsch, A. E.; Evans, B. A. Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. V. 354, p. 163-172, 2014.

Dennis, D.; McCoy, M.; Stangl, A.; Valentin, H. E.; Wu, Z. Formation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from *Ralstonia eutropha*. **Journal of Biotechnology**. V. 64, p. 177-186, 1998.

Dhakar, R. C.; Maurya, S. D.; Sagar, B. P.; Bhagat, S.; Prajapati, S. K.; Jain, C. P. Variables influencing the drug entrapment efficiency of microspheres: a pharmaceutical review. **Scholars Research Library**. V. 2 (5), p. 102-116, 2010.

Doi, Y. **Microbial Polyesters**. Ed. VHC Publish, New York, 156p., 1990.

Doi, Y.; Kitamura, S.; Abe, H. Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Macromolecules**. V. 28, p. 4822-4828, 1995.

Du, G.; Chen, J.; Yu, J.; Lun, S. Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system. **Journal of Biotechnology**. V. 88, p. 59-65, 2001.

Edelmer, E. R.; Langer, R. Optimization of release magnetically controlled release devices from polymeric drug. **Biomaterials**. V.14, p. 621-626, 1993.

Faria, D.R.; Gradela A. Hormonioterapia aplicada à ginecologia equina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. V. 34(2), p. 114-122, 2010.

Ferreira, R. V. **Estudo e Caracterização de Nanopartículas Magnéticas Funcionalizadas com Núcleo Magnético de Magnetita**. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 104p. 2009.

Finotelli, P. V.; Silva, D.; Sola-Penna, M.; Rossi, A. M.; Farina, M.; Andrade, L. R.; Takeuchi, A. Y.; Rocha, M. H. Microcapsules of alginate/chitosan containing magnetic nanoparticles for controlled release of insulin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. V. 81, p. 206-211, 2010.

Freiberg, S.; Zhu, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 282, p. 1-18, 2004.

Freitas, S.; Merkle, H. P.; Gander, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal of controlled release**. V. 102, p. 313-332, 2005.

Galego, N.; Rozsa, C.; Sánchez, R.; Fung, J.; Vázquez, A.; Tomás, J. S. Characterization and application of poly(β -hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. **Material Characterisation**. V. 19, p. 485-492, 2000.

Gangrade, N.; Price, J. C. Poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) microspheres containing progesterone: preparation, morphology and release properties. **Journal Microencapsulation**. V. 8, p. 185-202, 1991.

Gao, Y.; Kong, L.; Zhang, L.; Gong, Y.; Chen, G.; Zhao, N.; Zhang, X. Improvement of mechanical properties of poly(DL-lactide) films by blending of poly(3—hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **European Polymer Journal**. V. 42, p. 764-775, 2006.

Ghazanfari, M. R.; Kashefi, M.; Shams, S. F.; Jaafari, M. R. Perspective of Fe₃O₄ Nanoparticles Role in Biomedical Applications. **Biochemistry Research International**. V. 2016, 32p, 2016.

Gnanaprakash, G.; Philip, J.; Jayakumar, T.; Ray, B. Effect of Digestion Time and Alkali Addition Rate on Physical Properties of Magnetite Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry**. V. 111, p. 7978-7986, 2007.

Graf, C.; Goroncy, C.; Stumpf, P.; Weschke, E.; Boeglin, C.; Ronneburg, H.; Rühl, E. Local Magnetic and Electronic Structure of the Surface Region of Postsynthesis Oxidized Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging. **The Journal of Physical Chemistry**. V. 119, p. 19404-19414, 2015.

Gupta, A. K.; Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**. V. 26, p. 3995-4021, 2005.

Hazer, D. B.; Kiliçay, E.; Hazer, B. Poly(3-hydroxyalkanoate)s: Diversification and biomedical applications A state of the arte review. **Materials Science and Engineering C**. V. 32, p. 637-647, 2012.

Heinz, H.; Pramanik, C.; Heinz, O.; Ding, Y.; Mishra, R. K.; Marchon, D.; Flatt, R. J.; Estrela-Lopis, I.; Llop, J.; Moya, S.; Ziolo, R. F. Nanoparticle Decoration with Surfactants: Molecular Interactions, Assembly, and Applications. **Surface Science Reports**. V. 72, p. 1-58, 2017.

Hofmann-Antenbrink, M.; Rechenberg, B.; Hofmann, H. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications. **Nanostructured Materials for Biomedical Application**. p. 119-149, 2009.

Huang, X.; Brazel, C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal of controlled release**. V. 73, p. 121-136, 2001.

Huynh, C. T.; Lee, D. S. Controlled Release. Encyclopedia of Polymeric **Nanomaterials**. p. 1-12, 2014.

Issa, B.; Obaidat, I. M.; Albiss, B. A.; Haik, Y. Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications. **International Journal of Molecular Sciences**. V. 14, p. 21266-21305, 2013.

Jain, A.; Jain, S. K. *In vitro* release kinetics model fitting of liposomes: An insight. **Chemistry and Physics of Lipids**. V. 201, p. 28-40, 2016.

Jameela, S. R.; Kumary, T. V.; Lal, A. V.; Jayakrishnan, A. Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system. **Journal of Controlled Release**. V. 52, p. 17-24, 1998.

Juni, K.; Nakano, M.; Kubota, M. Controlled release of aclarubicin, an anticancer antibiotic, from poly-8-hydroxybutyric acid microspheres. **Journal of Controlled**. V. 4, p.25-32, 1986.

Ke, S.; Yang, Y.; Ren, L.; Wang, Y.; Li, Y.; Huang, H. Dielectric behaviors of PHBHHx- BaTiO₃ multifunctional composite films. **Composites Science and Technology**. V. 72, p.370-375, 2012.

Kiliçay, E.; Demirbilek, M.; Türk, M.; Güven E.; Hazer, B.; Denkbas, E. B. Preparation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHX) based nanoparticles for targeted cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutical sciences**. V.44, p. 310-320, 2011.

Kim, D. K.; Mikhaylova, M.; Zhang, Y.; Muhammed, M. Protective Coating of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. **Chemistry of Materials**. V. 15, p. 1617-1627, 2003.

Koller, M.; Salerno, A.; Strohmeier, K.; Schober, S.; Mittelbach, M.; Illieva, V.; Chiellini, E.; Braunegg, G. Novel precursors for production of 3-hydroxyvalerate-containing poly[(R)-hydroxyalkanoate]s. **Biocatalysis and Biotransformation**. V. 32(3), p. 161-167, 2014.

Kondaveeti, S.; Semeano, A. T. S.; Cornejo, D. R.; Ulrich, H.; Petri, D. F. S. Magnetic hydrogels for levodopa release and cell stimulation triggered by external magnetic field. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. V. 167, p. 415-424, 2018.

Kulkarni, S. A.; Feng, S. S. Effects of Particle Size and Surface Modification on Cellular Uptake and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. **Pharmaceutical Research**. V. 30, p. 2512-2522, 2012.

Lageveen, R. G.; Huisman, G. W.; Preusting, H.; Ketelaar, P.; Eggink, G.; Witholt, B. Formation of Polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-Hydroxyalkenoates. **American Society for Microbiology**. V. 54, p. 2924-2932, 1988.

Laurent, S.; Dutz, S.; Häfeli, U. O.; Mahmoudi, M. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**. V. 166, p. 8-23, 2011.

Lee, S. Y.; Choi, J. Wong, H. H. Recent advances in polyhydroxyalkanoates production by bacterial fermentation: mini-review. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 25, p. 31-36, 1999.

Leimann, F. V.; Biz, M. H.; Musyanovych, A.; Sayer, C.; Landfester, K. Araújo, P. H. H. Hydrolysis of Poly(Hydroxybutyrate-co-Hydroxyvalerate) Nanoparticles. **Journal of Applied Polymer Science**. V. 128, p. 3093-3098, 2012.

Leite, H. M. E. **Formulação e Caracterização de Matrizes de Polihidroxibutirato para Liberação Controlada de Fármacos**. Tese de mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. Campos dos Goytacazes 92p. 2004.

Leite, M. V. **Microcápsulas de alginato-quitosana contendo nanopartículas magnéticas para liberação controlada de progesterona**. Tese de mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. Campos dos Goytacazes. 104p. 2014.

Li, W.; Noeaid, P.; Roether, J. A.; Schubert, D. W.; Boccaccini, A. R. Preparation and characterization of vancomycin releasing PHBV coated 45S5 Bioglass[®]- based glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of the European Ceramic Society**. V. 34, p. 505-514, 2014a.

Li, Y.; Jiang, R.; Liu, T.; Lv, H.; Zhang, X. Single-microemulsion-based solvothermal synthesis of magnetite microflowers. **Ceramics International**. V. 40, p. 4791-4795, 2014b.

Lin, M. M.; Kim, D. K.; Hay, A. J. E.; Dobson, J. Development of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONS) for Translation to Clinical Applications. **IEEE Transactions on Nanobioscience**. V. 7, p. 298-305, 2008.

Lins, L. C.; Bazzo, G. C.; Barreto, P. L. M.; Pires, A. T. N. Composite PHB/Chitosan Microparticles Obtained by Spray Drying: Effect of Chitosan Concentration and Crosslinking Agents on Drug Release. **Journal of The Brazilian Chemical Society**. V. 25, p. 1462-1471, 2014.

Liu, T. Y.; Hu, S. H.; Liu, D. M.; Chen, S. Y.; Chen, I. W. Biomedical nanoparticles carriers with combined thermal and magnetic responses. **Nano Today**. V. 4, p. 52-65, 2009.

Liu, J.; Huang, Y.; Kumar, A.; Tan, A.; Jin, S.; Mozhi, A.; Liang, X. J. pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in câncer therapy. **Biotechnology Advances**. V. 32, p. 693-710, 2014.

Lodhia, J.; Mandarano, G.; Ferris, N. J.; Eu, P.; Cowell, S. F. Development and use of iron oxide nanoparticles (Part 1): Synthesis of iron oxide nanoparticles for MRI. **Biomedical Imaging and Intervention Journal**. V. 6(2), p. 1-11, 2010.

Mahdavi, M.; Ahmad, M. B.; Haron, M. J.; Namvar, F.; Nadi, B.; Rahman, M. Z. A.; Amin, J. Synthesis, Surface Modification and Characterisation of Biocompatible Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. **Molecules**. V. 18, p. 7533-7548, 2013.

Mahmoudi, M.; Sant, S.; Wang, B.; Laurent, S.; Sem, T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**. V. 63, p. 24-46, 2011.

Maiti, P.; Batt, C. A.; Giannelis, E. P. New Biodegradable Polyhydroxybutyrate/Layered Silicate Nanocomposites. **Biomacromolecules**. V. 8, p. 3393-3400, 2007.

Martin, M. A.; Miguens, F. C.; Rieumont, J.; Sanchez, R. Tailoring of the external and internal morphology of poly-3-hydroxy butyrate microparticles. **Colloids and Surfaces**. V. 17, p. 111-116, 2000.

Mashak, A.; Taghizadeh, S. M. *In vitro* progesterone release from γ -irradiated cross-linked polydimethylsiloxane. **Radiation Physics and Chemistry**. V. 75, p. 229-235, 2006.

Mendonça, T. T.; Tavares, R. R.; Cespedes, L. G.; Rodriguez, R. J. S.; Schripsema, J.; Taciro, M. K.; Gomez, J. G. C. Combining molecular and bioprocess techniques to produce poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with controlled monomer composition by *Burkholderia sacchari*. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 98, p. 654-663, 2017.

Menegucci, J. S.; Santos, M-K. M. S.; Dias, D. J. S.; Chaker, J. A.; Sousa, M. H. One-step synthesis of magnetic chitosan for controlled release of 5-hydroxytryptophan. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. V. 380, p. 117-124, 2015.

Mody, V. V.; Cox, A.; Shah, S.; Singh, A.; Bevins, W.; Parilhar, H. Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor. **Applied Nanoscience**. V. 4, p. 385-392, 2014.

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

Nigmatullin, R.; Thomas, P.; Lukasiewicz, B.; Puthussery, H.; Roy, I. Polyhydroxyalkanoates, a family of natural polymers, and their applications in drug delivery. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. V. 90(7), p. 1209-1221, 2015.

Nihant, N.; Schugens, C.; Grandfils, C.; Jerome, R.; Teyssie, P. Polylactide Microparticles Prepared by Double Emulsion – Evaporation. **Journal of Colloid Interface Science**. V. 173, p. 55-65, 1994.

Okassa, L. N.; Marchais, H.; Eyrolles, L. D.; Jonathan, S. C.; Soucé, M.; Dubois, P.; Chourpa, I. Development and characterization of sub-micron poly(D, L-Lactide-co-glycolide) particles loaded with magnetite/maghemite nanoparticles. **Internatinal Journal of Pharmaceutics**. V. 302, p. 187-196, 2005.

Oliveira, L. C. A.; Fabris, J. D.; Pereira, M. C. Óxidos de ferro e suas aplicações em processos catalíticos: Uma revisão. **Química Nova**. V. 36(1), p. 123-130, 2012.

Padermshoke, A.; Sato, H.; Katsumoto, Y.; Ekgasit, S.; Noda, I.; Ozaki, Y. Thermally induced phase transition of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) investigated by two-dimensional infrared correlation spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**. V. 36, p. 241-249, 2004.

Parveen, S.; Misra, R.; Sahoo, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. V. 8, p. 147-166, 2012.

Paşcu, E. I.; Stokes, J.; McGuinness, G. B. Electrospun composites of PHBV, silk fibroin and nano-hydroxyapatite for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**. V. 33, p. 4905-4916, 2013.

Peng, Q.; Zhang, Z-R.; Gong, T.; Chen, G-Q.; Sun, X. A rapid-acting, long-acting insulin formulation based on a phospholipid complex loaded PHBHHx nanoparticles. **Biomaterials**. V. 33, p. 1583-1588, 2012.

Pereira, S. M. F.; Sánchez, R. J.; Rieumont, J.; Cabrera, J. G. Synthesis of biodegradable polyhydroxyalcanoate copolymer from a renewable source by alternate feeding. **Polymer Engineering and Science**. V. 48(10), p. 2051-2059, 2008.

Petcharoen, K.; Sirivat, A. Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method. **Materials Science and Engineering B**. V. 177, p. 421-427, 2012.

Rajaratnam, D. D.; Ariffin, H.; Hassan, M. A.; Kawasaki, Y.; Nishida, H. Effects of (R)-3-hydroxyhexanoate units on thermal hydrolysis of poly((R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyhexanoate)s. **Polymer Degradation and stability**. V. 137, p. 58-66, 2017.

Reddy, C S. K.; Ghai, R.; Rashmi, Kalia, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**. V. 87, p. 137-146, 2003.

Rodríguez-Contreras, A.; Canal, C.; Calafell-Monfort, M.; Ginebra, M-P.; Julio-Moran, G.; Marqués- Calvo, M-S. Methods for the preparation of doxycycline-loaded phb micro- and nano-spheres. **European Polymer Journal**. V. 49, p. 3501-3511, 2013.

Rothen-Weinhold, A.; Gurny, R.; Dahn, M. Formulation and technology aspects of controlled drug delivery in animals. **Pharmaceutical Science e Technology Today**. V. 3(7), p. 222-231. 2000

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

Sanchez, R. R.; Rieumont, J. B.; Cardoso, S. L.; Silva, M. G.; Sthel, M. S.; Massunaga, M. S. O.; Gatts, C. N.; Vargas, H. Photoacoustic Monitoring of Internal Plastification in Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Copolymers: Measurements of Thermal Parameters. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. V. 10 (2), p. 97-103, 1999.

Sato, H.; Nakamura, M.; Padermshoke, A.; Yamaguchi, H.; Terauchi, H.; Ekgasit, S.; Noda, I.; Ozaki, Y. Thermal Behavior and Molecular Interaction of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) Studied by Wide-Angle X-ray Diffraction. **Macromolecules**. V.37, p. 3763-3769, 2004.

Shubayev, V.; Pisanic II, T. R.; Jin, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. **Advanced Drug Delivery Reviews**. V. 61, p. 467-477, 2009.

Siepmann, J.; Siepmann, F. Modeling of dissolution controlled drug delivery. **Journal of Controlled Release**. V. 161, p. 351-362, 2012.

Silva, C.; Ribeiro, A.; Ferreira, D.; Veiga, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. V. 39(1), p. 1-20, 2003.

Silva, J. F. S.; Cnop, F. P.; Sánchez, R. J. R.; Vianna, S. A. B.; Souza, G. V.; Eligio, C. T.; Ribas, J. A. S.; Costa, D. S. Avaliação da dinâmica útero-ovário da égua sob o

efeito de um implante subcutâneo de micro-cápsulas de polihidroxibutirato contendo progesterona. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinárias**. V. 101, p. 225-230, 2006.

Silva, M. F.; Pineda, E. A. G.; Bergamasco, R. Aplicação de óxidos de ferro nanoestruturados como adsorventes e fotocatalisadores na remoção de poluentes de águas residuais. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 393-398, 2015.

Skrbic, Z.; Divjakovic, V. Temperature Influence on Changes of parameters of the unit cell of biopolymer PHB. **Polymer communications**, V. 37(3), p. 505-507, 1996.

Sun, J.; Zhou, S. Hou, P.; Yang, Y.; Weng, J.; Li, X.; Li, M. Synthesis and characterization of biocompatible Fe₃O₄ nanoparticles. **Journal of Biomedical Materials Research Part**. V. 80(2), p. 333-341, 2006.

Taghizadeh, S. M.; Mashak, A.; Jamshidi, A.; Imani, M. Study of Progesterone Release Mechanisms from a Silicone Matrix by a New Analytical Method. **Journal of Applied Polymer Science**. V. 91, p. 3040-3044, 2004.

Tan, G. Y. A.; Chen, C. L.; Li, L.; Ge, L.; Wang, L.; Razaad, I. M. N.; Li, Y.; Zhao, L.; Mo, Y.; Wang, J. Y. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. **Polymers**. V. 6, p. 706- 754, 2014.

Tran, V. T.; Benoît, J. P.; Julienne, M. C. V. Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy? **International Journal of Pharmaceutics**. V. 407, p. 1-11, 2011.

Ventura, C. A.; Tommasini, S.; Crupi, E.; Giannone, I.; Venera, C.; Musumeci, T.; Puglisi, G. Chitosan microspheres for intrapulmonary administration of moxifloxacin: Interaction with biomembrane models and *in vitro* permeation studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. V. 68, p. 235-244, 2008.

Wang, J.; Yu, H. Q. Biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) and extracellular polymeric substances (EPS) by *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 in batch cultures. **Applied microbial and Cell Physiology**. V. 75, p. 871-878, 2007.

Wang, Y. W.; Mo, W.; Yao, H.; Wu, Q.; Chen, J.; Chen, G. Q. Biodegradation studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Polymer Degradation and Stability**. V. 85, p. 815-821, 2004.

Wei, Y.; Han, B.; Hu, X.; Lin, Y.; Wang, X.; Deng, X. Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles and their magnetic properties. **Procedia Engineering**. V. 27, p. 632-637, 2012.

Whisnant, C. S.; Burns, P. J. Evaluation of steroid microspheres for control of estrus in cows and induction of puberty in heifers. **Theriogenology**. V. 58, p. 1229-1235, 2002.

Willard, M. A.; Kurihara, L. K.; Carpenter, E. E.; Calvin, S.; Harris, V. G. Chemically prepared magnetic nanoparticles. **International Materials reviews**. V. 49, p. 125-170, 2004.

Xie, W. P.; Chen, G. Q. Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes phaPCJ. **Biochemical Engineering Journal**. V. 38, p. 384-389, 2008.

Xu, F.; Shi, Y.-C.; Wang, D. X-ray scattering studies of lignocellulosic biomass: A review. **Carbohydrate Polymers**. V. 94(2), p. 904-917, 2013.

Xu, J.; Guo, B. H.; Yang, R.; Wu, Q.; Chen, G. Q. Zhang, Z. M. In situ FTIR study on melting and crystallization of polyhydroxyalkanoates. **Polymer**. V. 43, p. 6893-6899, 2002.

Yang, J.; Park, S. B.; Yoon, H. G.; Huh, Y. M. Haam, S. Preparation of poly ϵ -caprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 324, p. 185-190, 2006.

Yigit, M. V.; Moore, A.; Medarova, Z. Magnetic nanoparticles for cancer diagnosis and therapy. **Pharmaceutical Research**. V. 29, p. 1180-1188, 2012.

Yu, J. Y.; Lee, W. C. Microencapsulation of Pyrrolnitrin from *Pseudomonas cepacia* using gluten and casein. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. V. 84(5), p. 444-448, 1997.

Zhang, L.; Zheng, Z.; Xi, J.; Gao, Y.; Ao, Q.; Gong, Y.; Zhao, N.; Zhang, X. Improved mechanical property and biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for blood vessel tissue engineering by blending with poly(propylene carbonate). **European Polymer Journal**. V. 43, p. 2975-2986, 2007.

Zhang, Y.; Chan, H. F.; Leong, K. W. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**. V. 65, p. 104-120, 2013.

Zhao, Q.; Wang, S.; Kong, M.; Geng, W.; Li, R. k. Y.; Song, C.; Kong, D. Phase morphology, physical properties, and biodegradation behavior of novel PLA/PHBHHx blends. Society for Biomaterials. **Journal of Biomedical Material Research Part B: Applied Biomaterials**. V. 100(1), p. 23-31, 2012.

Zinn, M.; Witholt, B.; Egli, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Advanced Drug Delivery Reviews**. V. 53, p. 5-21, 2001.