



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**MICRO E NANOPARTÍCULAS BIODEGRADÁVEIS PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE ESTERÓIDES EM BOVINOS**

WILLYAN MACHADO GIUFRIDA

TESE APRESENTADA COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM ENGENHARIA
QUÍMICA, ÁREA DE DESENVOLVIMENTO DE
PROCESSOS – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
MARINGÁ.

ORIENTADOR: DR. VLADIMIR FERREIRA CABRAL
CO-ORIENTADORES: DR. LÚCIO CARDOZO-FILHO E DR. MARCOS KUNITA

MARINGÁ, 17 DE JUNHO DE 2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central – UEM, Maringá – PR., Brasil)

	Giufrida, Willyan Machado
G537m	Micro e nanopartículas biodegradáveis para liberação controlada de esteroides em bovinos / Willyan Machado Giufrida. -- Maringá, 2013. 160 f. : il. : algumas color. Orientador: Prof. Dr. Vladimir Ferreira Cabral. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2013. 1. Biopolímeros. 2. Micro partículas. 3. Nano partículas. 4. PHBV. 5. IATF. 6. SAS. 8. SFEE. 9. Esteróides. 10. Emulsão simples. 11. Fluídos supercríticos. I. Cabral, Vladimir Ferreira, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.
	CDD 22.ed. 668.9

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

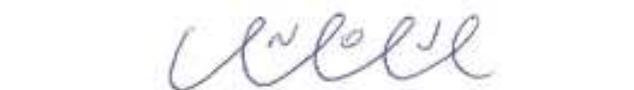
Esta é a versão final de tese de Doutorado apresentada por Willyan Machado Giufrida perante a Comissão Julgadora do Curso de Doutorado em Engenharia Química em 17 de junho de 2013.

COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho
Coorientador / Presidente


Prof. Dr. Marcos Hiroiúqui Kunita
Coorientador


Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira
Membro


Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior
Membro


Prof. Dr. Adriano Valim Reis
Membro


Prof. Dr. Benedito Prado Dias Filho
Membro

Dedico este trabalho de modo muito especial:

A minha esposa Maria, companheira, amiga e compreensiva que amo muito e compartilho todos os momentos de minha vida e que ao meu lado me incentivou, apoiou e contribuiu enormemente para a realização deste trabalho.

Ao meu filho Bernardo, que veio com a graça de Deus alegrar imensamente minha vida e dar novo sentido aos meus propósitos para o dia de amanhã.

Aos meus pais Mario e Nancy, que são para mim exemplos de vida, conquista e superação. Que foram o alicerce de tudo que sou hoje, jamais me impediu de sonhar alto e sempre me estenderam as mãos sem medir esforços, acreditando que eu poderia chegar até aqui;

As minhas irmãs Nilyan e Nilye, por quem tenho imenso amor, carinho e admiração; companheiras nas horas certas e incertas, nos sonhos e nas conquistas e que sempre me apoiaram e incentivando a buscar o melhor.

AGRADECIMENTOS

*Primeiramente a Deus por todas as coisas,
por estar sempre comigo, me guiando, amparando e orientando
nos momentos bons e ruins de minha vida;*

*Aos professores Lúcio e Vladimir, a quem tenho extrema
admiração, e que com esforço e dedicação, souberam partilhar suas
capacidades e conhecimentos para que este trabalho se realizasse;*

*Ao professor Marcos Kunita pela atenção, orientação e apoio
neste trabalho, contribuindo de forma incomparável nas discussões de
resultados e idéias promissoras;*

*Ao professor Sandro da Rocha, que teve parte fundamental para
realização deste trabalho, me acolhendo, orientando e compartilhando seu
conhecimento durante o período em que estive nos EUA;*

*Ao amigo Adriano Valin Reis, que contribuiu muito para este
trabalho com suas idéias, orientações e conhecimentos, sanando muitas
dúvidas com seu amplo conhecimento em ciência farmacêutica.*

*Aos amigos e companheiros de trabalho da UEM, Leandro,
Daniel, Helen, Guilherme e Andréia, por bons momentos de discussões de
idéias e descontração;*

MICRO E NANOPARTÍCULAS BIODEGRADÁVEIS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE ESTERÓIDES EM BOVINOS

AUTOR: WILLYAN MACHADO GIUFRIDA

ORIENTADOR: DR. VLADIMIR FERREIRA CABRAL

Tese de doutorado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo 5790, Bloco E-46, Sala 09; CEP 87020-900, Maringá, Pr – Brasil; defendida em 17 de junho de 2013.

Neste trabalho foram realizados estudos de produção de partículas a base de polímero do tipo biodegradável, poli(3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV), carregadas de esteróides para uso veterinário (progesterona e medroxiprogesterona), que venha contribuir para a administração controlada de esteróides aplicada a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) de bovinos. Foram produzidas partículas em escalas de micro e nanômetros utilizando diferentes técnicas a baixas e altas pressões como: emulsão simples do tipo convencional, precipitação em Fluido Supercrítico (FSC) via SAS (supercrítico anti-solvente), emulsão convencional com extração do solvente por FSC (*supercritical fluid extraction of emulsion - SFEE*) e uma nova técnica promovendo a formação de uma emulsão seguida de extração do solvente por FSC em única etapa. Um estudo da redução da massa molecular do PHBV foi realizado como intuito de avaliar a influência da massa viscosimétrica sobre o tamanho das partículas. As partículas obtidas foram caracterizadas em termos de tamanho e aspectos morfológicos e um estudo inicial do carregamento das mesmas com esteróides foi realizado utilizando dois diferentes métodos com o objetivo de avaliar a melhor condição em termos de eficiência de encapsulamento e tempo de sustentação da droga a ser liberada. Estudos experimentais das curvas de liberação dos esteróides carregados nas partículas de PHBV foram realizados por meio de um sistema “*in vitro*” e avaliadas por um modelo matemático com ajustes em termos de cinética de primeira e segunda ordem.

Palavras chaves: PHBV, IATF, SAS, SFEE, esteróides, micro partículas, nano partículas, emulsão simples.

BIODEGRADABLE MICRO-NANOPARTICLES TO STEROIDS CONTROL RELEASE IN ANIMAL HUSBANDRY

AUTOR: WILLYAN MACHADO GIUFRIDA

ORIENTADOR: DR. VLADIMIR FERREIRA CABRAL

Doctoral thesis; Post-Graduation Program in Chemical Engineering; State University of Maringá; Av. Colombo 5790, Bloco E-46, Sala 09; CEP 87020-900, Maringá, Pr – Brazil; defended in Jun, 17th of 2013.

In this work were conducted studies about production of particles the base of poly(3-hydroxybutirate-co-3-hydroxivalerate) (PHBV) biodegradable polymer loaded of steroids (progesterone and medroxyprogesterone) to veterinarian use to contribute for steroids control release at Fixed Time Artificial Insemination (FTAI) bovine. Particles at scale of micro and nanometers were produced using different techniques at high and low pressure how to: conventional single emulsion, supercritical anti-solvent precipitation process (SAS), supercritical fluid extraction of emulsion process (SFEE) and a new technique to promote a emulsion followed by supercritical extraction of solvent in unique time. Studies of PHBV molecular weight reduction was conducted with objective of evaluate the polymer viscosimetric mass and the particles size. The particles obtained were characterized in terms of size and morphological aspects. An initial study of loading of steroids in the PHBV particles was conducted in two different methods with objective of to evaluate the best condition in terms of encapsulation efficiency and time of drug release. The experimental studies of release curve of steroids loaded in PHBV particles were conducted by in vitro system and evaluated via mathematical model with adjust in kinetics of first and second order.

Keywords: PHBV, FTAI, Steroids, SAS, SFEE, microparticles, nanoparticles, single emulsion.

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	v
Micro e Nanopartículas Biodegradáveis para liberação controlada de esteróides em bovinos	vi
Biodegradable Micro-Nanoparticles to steroids control release in animal husbandry.....	vii
Sumário	viii
Índice de Tabelas.....	xii
Índice de Figuras	xiii
Índice de Equações.....	xviii
Lista de Símbolos e Siglas	xix
1. Introdução	21
2. Considerações Gerais.....	29
3. Análise, Caracterização e Purificação dos materiais utilizados.....	31
3.1. Introdução	31
3.2. Materiais	31
3.3. Purificação do polímero PHBV	32
3.4. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio	33
3.6. Calorimetria Diferencial de Varredura - DSC	38
3.7. Termogravimetria – TG	40
3.8. Cromatografia de Permeação em Gel - GPC	41
4. Equilíbrio de fases dos sistemas ternários CO ₂ + solvente Orgânico + (P4, AMP e PHBV)	44
4.1. Introdução	44
4.2. Parte experimental	45
4.3. Resultados e Discussões	47
4.3.1. Sistema CO ₂₍₁₎ + Diclorometano ₍₂₎ + AMP ₍₃₎	48
4.3.2. Sistema CO ₂₍₁₎ + Clorofórmio ₍₂₎ + PHBV ₍₃₎	51
4.3.3. Sistema CO ₂₍₁₎ + Diclorometano ₍₂₎ + PHBV ₍₃₎	53
4.4. Conclusões	54

5. Produção de M-NPs de PHBV usando método supercrítico anti-solvente (SAS).....	56
5.1. Introdução	56
5.1.1. Cromatografia por Fluido Supercrítico (CFS).....	57
5.1.2. Fracionamento por FSC.....	58
5.1.3. Formação de partículas empregando fluidos supercríticos como solventes.....	58
5.1.4. Formação de partículas empregando fluidos supercríticos como anti-solvente.....	60
5.2. Parte experimental	63
5.2.1. Produção de M-NPs de PHBV.....	63
5.3. Resultados e Discussões	64
5.3.1. Caracterização das M-NPs de PHBV.....	64
5.4. Conclusões	66
6. Produção de M-NPs de PHBV a partir da técnica de Emulsão Simples	67
6.1. Introdução	67
6.1.1. Emulsão simples e Emulsão dupla.....	67
6.1.2. Nanoprecipitação	70
6.1.3. Emulsificação-Difusão.....	71
6.2. Parte experimental	73
6.2.1. Emulsão Simples - preparação.....	73
6.2.2. Remoção do Surfactante	74
6.2.3. Secagem das partículas	74
6.3. Resultados e Discussões	74
6.4. Conclusões	82
7. Produção de MPs de PHBV utilizando nova técnica com formação de Emulsão seguida de Extração de solvente por FSC.....	83
7.1 Introdução	83
7.2. Parte experimental	84
7.2.1. Preparação das soluções.....	84
7.2.2. Formação da emulsão e extração do solvente orgânico.....	85

7.2.3. Remoção do surfactante residual	86
7.2.4. Secagem das partículas	87
7.3. Resultados e Discussões	87
7.4. Conclusões	94
8. NPs de PHBV produzidas por técnica de extração do solvente da emulsão por fluido supercrítico (SFEE)	95
8.1. Introdução	95
8.2. Parte experimental	97
8.2.1. Redução da massa molecular do PHBV	97
8.2.2. Preparação da Emulsão (Emulsão Convencional)	97
8.2.3. Processo de extração do solvente orgânico por FSC	98
8.3. Métodos Analíticos	99
8.3.1. Determinação do peso molecular do polímero	99
8.3.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	100
8.3.3. Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV)	101
8.4. Resultados e Discussões	101
8.4.1. Resultados da caracterização do PHBV	101
8.4.2. Estudo morfológico das NPs de PHBV	103
8.1. Conclusões	109
9. Estudos iniciais de carregamento e liberação de esteróides a partir de micro e nano-sistemas constituído de m-nps de phbv	110
9.1. Introdução	110
9.1.1. Modelos de estudos <i>in vitro</i> da cinética de liberação de fármacos.	116
9.1.2. Eficiência de Encapsulação (EE%)	119
9.2. Parte experimental	120
9.2.1. Impregnação de P4 em M-NPs de PHBV produzidas via SAS	120
9.2.1.1. Medida da eficiência de impregnação / carregamento	122
9.2.1.2. Estudo “ <i>in vitro</i> ” da liberação de progesterona carregada em M-NPs de PHBV	123

9.2.2. Produção de NPs de PHBV carregadas de AMP via SFEE.....	124
9.2.2.1. Medidas de Eficiência do Encapsulamento (EE%)	124
9.2.2.2. Medidas de liberação da AMP encapsuladas com PHBV	125
9.3. Resultados e discussões	125
9.3.1. Estudos de Impregnação e Liberação da P4 em M-NPs de PHBV.....	125
9.3.1.1. Aplicação do modelo cinético que prediz o perfil de liberação do P4 a partir de M-NPs de PHBV.....	128
9.3.2. Estudos de Encapsulamento e Liberação de AMP carregadas em NPs de PHBV. ..	132
9.4. Conclusões	137
10. Considerações finais	138
10.1. Conclusões gerais.....	138
10.2. Perspectivas futuras	140
Referências bibliográficas	141

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 – Peso molecular PHBV avaliado pó GPC.....	43
Tabela 4.1 – Propriedades e características dos componentes puros	47
Tabela 4.2 – Dados experimentais de transição do tipo líquido-vapor para o sistema CO ₂₍₁₎ + diclorometano ₍₂₎ + AMP ₍₃₎ a uma concentração 0,010 g.cm ⁻³ em uma base livre de CO ₂	48
Tabela 4.3 – Dados experimentais de transição do tipo líquido-vapor para o sistema CO ₂₍₁₎ + diclorometano ₍₂₎ + AMP ₍₃₎ a uma concentração 0,020 g.cm ⁻³ em uma base livre de CO ₂	49
Tabela 4.4 – Parâmetros de interação de Peng-Robinson	51
Tabela 5.1 – Condições operacionais utilizadas no sistema SAS para produção de NPs de PHBV	64
Tabela 6.1 – Condições utilizadas durante a preparação das emulsões simples	73
Tabela 6.2 – Tamanho das partículas em relação à condição experimental.....	81
Tabela 7.1 – Condições experimentais abordados no processo experimental.	87
Tabela 8.1 – Condições operacionais utilizadas no sistema SFEE para produção de NPs de PHBV.	99
Tabela 8.2 – Resultados das análises PHBV obtidos por GPC, viscosidade intrínseca e RMN de H ¹	103
Tabela 8.3 – Tamanho médio das NPs em função do PHBV de diferentes pesos moleculares.	108
Tabela 9.1 – Condições experimentais para impregnação de P4 em M-NPs de PHBV.	122
Tabela 9.2 – Valores de % P4 carregados nas M-NPs de PHBV	125
Tabela 9.3 – Valores de constantes aplicados aos modelos cinéticos de 1º e 2º ordens em função da fração máxima de P4 liberada.	132
Tabela 9.4 - Valores de constantes aplicados ao modelo cinético de 1ª e 2ª ordem.	136

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Fórmula estrutural geral dos poli(hidroxi alcanóatos) PHA's.....	24
Figura 1.2 – Fórmula estrutural do poli(hidroxi butirato) PHB.....	24
Figura 1.3 – Estrutura química do PHBV.....	25
Figura 2.1 – Fluxograma descritivo	30
Figura 3.1 – Representação de um núcleo a rodopiar como um pião (à esquerda), que se comporta como um magneto tendo um pólo sul e um pólo norte (à direita).	33
Figura 3.2 – Espectro de RMN (^1H) obtido a partir da amostra de PHBV dissolvida em CDCl_3 a uma concentração de 10 mg/mL.	34
Figura 3.3 – Espectro de RMN (^1H) gerado pelo software de simulação MarvinSketch 5.11.5 a partir da estrutura molecular do PHBV.....	35
Figura 3.4 – Espectro de RMN de ^1H da amostra de progesterona (P4) dissolvida em CDCl_3 a uma concentração de 10 mg/mL.	36
Figura 3.5 – Espectro de RMN de ^1H da amostra de AMP dissolvida em CDCl_3 a uma concentração de 10 mg/mL.	37
Figura 3.6 - (a) Espectro de FTIR do PHBV obtido da literatura de Jack <i>et al.</i> , 2009. (b) Espectro de FTIR do PHBV utilizado neste trabalho.	38
Figura 3.7 – Análise térmica (DSC) para as amostras de AMP, PHBV e P4 realizadas a uma taxa média de $10^\circ\text{C}/\text{min}$	39
Figura 3.8 – Análise termogravimétrica realizada para as amostras de P4, AMP e PHBV.....	41
Figura 3.9 – Resultados obtidos da análise cromatográfica de GPC para amostra de PHBV.	42
Figura 4.1 – Aparato experimental.....	46
Figura 4.2 – Diagrama experimental da composição de pressão para o sistema $\text{CO}_{2(1)}$ + acetona $_{(2)}$ sob condições de equilíbrio LV a 303 K.	47

Figura 4.3 – Diagrama dos dados experimentais de transição do tipo LV para o sistema CO ₂₍₁₎ + diclorometano ₍₂₎ + AMP ₍₃₎	50
Figura 4.4 – Diagrama dos dados experimentais de transição do tipo LV para o sistema CO ₂₍₁₎ + diclorometano ₍₂₎ + AMP ₍₃₎ comparados com modelo termodinâmico.	50
Figura 4.5 – Diagrama dos dados de transição do tipo LV para o sistema CO ₂₍₁₎ + clorofórmio ₍₂₎ + PHBV ₍₃₎ obtidos por Pimentel, 2010.....	52
Figura 4.6 – Diagrama de fases do sistema ternário CO ₂₍₁₎ + Diclorometano ₍₂₎ + PHBV ₍₃₎ construído com dados de equilíbrio LV extraídos da literatura de Franceschi, 2009.	54
Figura 5.1 – Diagrama esquemático da técnica RESS (Franceschi, 2009).....	59
Figura 5.2 – Diagrama esquemático da técnica GAS.	61
Figura 5.3 – Esquema do aparato experimental de produção de partículas por FSC como antisolvente (SAS) ou ASES.....	62
Figura 5.4 – Imagem real do aparato experimental SAS – THAR.	63
Figura 5.5 – Imagens obtidas por MEV das M-NPs de PHBV com Magnitude de: a) x 2.000; b) x 6.000; c) 30.000, e d) Distribuição de tamanho das M-NPs e tamanho médio.....	65
Figura 6.1 – Esquema do processo de emulsão do tipo óleo/água (O/A).	68
Figura 6.2 – Esquema do processo de emulsão do tipo água/óleo (A/O).	68
Figura 6.3 – Tipos de emulsão dupla.	69
Figura 6.4 – Esquema ilustrativo da preparação de uma dupla emulsão utilizando ultra-som seguido de evaporação/difusão do solvente orgânico.	69
Figura 6.5 - Esquema ilustrativo do processo de produção de partículas por nanoprecipitação.	70
Figura 6.6 - Esquema ilustrativo do processo de produção de partículas por emulsificação-disusão.....	72
Figura 6.7 – Imagens das partículas obtidas por MEV (a: x180, b: x100 e c: x30.000), e (d) distribuição de tamanho obtidos a partir da condição N° 1 da Tabela 6.1.	76

Figura 6.8 – Imagens das partículas obtidas por MEV (a: x800, b: x2.700 e c: x9.500), e (d) distribuição de tamanho obtidos a partir da condição N° 2 da Tabela 6.1.	77
Figura 6.9 – Imagens das partículas obtidas por MEV (a: x10.000, b: x6.000 e c: x3.700), e (d) distribuição de tamanho obtidos a partir da condição N° 3 da Tabela 6.1.	78
Figura 6.10 – Imagens das partículas obtidas por MEV (a: x150, b: x100 e c: x2.000), e (d) distribuição de tamanho obtidos a partir da condição N° 4 da Tabela 6.1.	79
Figura 6.11 – Imagens das partículas obtidas por MEV (a: x1.000, b: x10.000 e c: x10.000), e (d) distribuição de tamanho obtidos a partir da condição N° 5 da Tabela 6.1.....	79
Figura 6.12 – Imagens das partículas obtidas por MEV (a: x14.000, b: x18.000 e c: x33.000), e (d) distribuição de tamanho obtidos a partir da condição N° 6 da Tabela 6.1.....	80
Figura 6.13 – Imagens das partículas obtidas por MEV (a: x20.000, b: x40.000 e c: x30.000), e (d) distribuição de tamanho obtidos a partir da condição N° 7 da Tabela 6.1.....	81
Figura 7.1 – Esquema ilustrativo do aparato experimental utilizado para formação de emulsão seguida de extração do solvente orgânico por CO ₂ SC.....	86
Figura 7.2 – Imagens das MPs obtidas sob condição experimental N°. 1 da tabela 7.1 e caracterizadas por MEV com aumento de: a) x 3000; b) x 3000; c) x 1500. d) Distribuição de tamanho.	88
Figura 7.3 – Imagens das MPs obtidas sob condição experimental N°. 2 da tabela 7.1 e caracterizadas por MEV de: a) x 500; b) x 1800; c) x 2000. d) Distribuição de tamanho.....	89
Figura 7.4 – Imagens das MPs obtidas sob condição experimental N°. 3 da tabela 7.1 e caracterizadas por MEV de: a) x 2000; b) x 500; c) x 500. d) Distribuição de tamanho.....	90
Figura 7.5 – Imagens das MPs obtidas sob condição experimental N°. 4 da tabela 7.1 e caracterizadas por MEV de: a) x 1000; b) x 3000; c) x 1500. d) Distribuição de tamanho.....	90
Figura 7.6 – Imagens das MPs obtidas sob condição experimental N°. 5 da tabela 7.1 e caracterizadas por MEV de: a) x 2700; b) x 2700; c) x 2700. d) Distribuição de tamanho.....	91
Figura 7.7 – Imagens das MPs obtidas sob condição experimental N°. 6 da tabela 7.1 e caracterizadas por MEV de: a) x 500; b) x 2000; c) x 2000. d) Distribuição de tamanho.....	92

Figura 7.8 – Imagens das MPs obtidas sob condição experimental N°. 7 da tabela 7.1 e caracterizadas por MEV de: a) x 500; b) x 1000; c) x 2400. d) Distribuição de tamanho.....	93
Figura 7.9 – Imagens das MPs obtidas sob condição experimental N°. 8 da tabela 7.1 e caracterizadas por MEV de: a) x 500; b) x 1500; c) x 2400. d) Distribuição de tamanho.....	93
Figura 8.1 – Esquema do método utilizado para realizar a emulsão convencional.	97
Figura 8.2 – Esquema do aparato experimental utilizado para SFEE.....	98
Figura 8.3 – Gráfico da viscosidade intrínseca obtido a partir dos dados de (•) n(red) e (♦) n(inh) para encontrar [η]	100
Figura 8.4 – Espectro de RMN H^1 comparativo para as amostras de PHBV degradadas por processo de hidrólise ácida.....	102
Figura 8.5 – (a) Tendência da queda da massa molecular do PHBV considerando M_v , M_n e M_w , (b) Curvas das análises de PHBV por GPC.	102
Figura 8.6 – Imagens caracterizadas por MEV de NPs obtidas de amostras PHBV com diferentes pesos moleculares por meio de técnica de emulsão convencional.....	105
Figura 8.7 - Imagens caracterizadas por MEV de NPs obtidas de amostras PHBV com diferentes pesos moleculares por meio de técnica de SFEE.	107
Figura 8.8 – NPs fundidas ou degradadas após processo de dispersão por ultrason.	108
Figura 9.1 – Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrados por mecanismos de liberação convencional de multidose (D1, D2, D3), e sistema de liberação controlada de fármaco.	111
Figura 9.2 – Alterações observadas nos sistemas matriciais hidrofílicos que intumescem e sofrem erosão..	114
Figura 9.3 - Exemplo dos diferentes tipos de encapsulamento para um sistema polimérico de liberação controlada de fármacos.	115
Figura 9.4 – Imagem real do aparato experimental de equilíbrio de fases utilizado para impregnação da progesterona.....	121
Figura 9.5 – Curva de calibração de P4 em solução hidro-alcóolica	122

Figura 9.6 – Esquema do sistema utilizado para realizar o estudo de liberação contr. de P4....	123
Figura 9.7 – Curva de calibração do AMP em etanol via UV-vis (240 nm).....	124
Figura 9.8 – Aumento do % de carregamento de P4 em função do tempo de acordo com a tabela 9.2.....	126
Figura 9.9 – Imagem obtida por MEV das M-NPs de PHBV+P4 obtidas no tempo de 32h de impregnação..	126
Figura 9.10 – Massa acumulativa de P4 liberada (mg/mL) em função do tempo (horas) para as amostras carregadas nos tempos de 2, 4, 8, 16 e 32 horas.	127
Figura 9.11 – Curva de liberação adimensional da progesterona em diferentes tempos de impregnação (2, 4, 8, 16 e 32 horas).	127
Figura 9.12 – Curvas de cinética de 1º Ordem (Modelo) ajustado com as curvas de liberação dos dados experimentais	130
Figura 9.13 – Curvas de cinética de 2º Ordem (Modelo) ajustado com as curvas de liberação dos dados experimentais	131
Figura 9.14 – Comportamento da concentração de P4 liberado em termos de tempo de meia vida (t1/2)	131
Figura 9.15 – Imagens das NPs de PHBV carregadas de AMP obtidas por MEV	133
Figura 9.16 – Curva de calibração do AMP em solução hiodro-alcóolica	134
Figura 9.17 – Massa acumulativa de AMP liberada em função do tempo em termos de FL (fração liberada) e Ft (Ct/C0)	134
Figura 9.18 – Curvas de cinética de 1ª e 2º Ordens (Modelo) ajustadas com as curvas de liberação dos dados experimentais	135
Figura 9.19 – Comportamento da concentração de AMP liberado em termos de tempo de meia vida (t1/2)	136

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 7.1 – Equação da energia interfacial de Gibbs.....	88
Equação 9.1 – Equação matemática do fenômeno de transferência de calor.....	117
Equação 9.2 – Equação de Higuchi para calcular as taxas de liberação do fármaco.....	117
Equação 9.3 – Modelo semi-empírico descrito pela equação de Ritger-Peppas	117
Equação 9.4 – Modelo de Baker para liberação controlada de uma matriz esférica.....	118
Equação 9.5 – Equação semi-empírica proposta por Korsmeyer-Peppas	118
Equação 9.6 – Modelo de Peppas e Sahlin	119
Equação 9.7 – Cálculo do coeficiente de difusão α	128
Equação 9.8 – Cálculo da constante de liberação (1ª Ordem)	129
Equação 9.9 – Cálculo da fração de fármaco liberada (1ª Ordem)	129
Equação 9.10 – Cálculo da constante de liberação (2ª Ordem)	130
Equação 9.11 – Cálculo da fração de fármaco liberada (2ª Ordem)	130
Equação 9.12 – Cálculo do tempo de meia vida	131

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

A = Área interfacial.

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico.

AMP – Acetato de Medroxiprogesterona.

BE – Benzoato de Estradiol.

CaCO_3 – Carbonato de Cálcio.

CDCl_3 – Clorofórmio Delterado.

CHCl_3 – Clorofórmio.

CIDR – Controlled Internal Drug Release.

CO_2 – Dióxido de Carbono.

CO_2SC – Dióxido de carbono supercrítico.

DCM – Diclorometano.

FD – Folículo Dominante.

FSH – Hormônio folículo estimulante.

G = Energia interfacial de Gibbs.

GnRH – Hormônio Liberador de gonodotrofos.

H – Hidrogênio.

HB – Hidroxibutiratos.

hCG - Hormônio Coriônico Gonadotrófico.

HCL – Ácido Clorídrico.

HV – Hidrixivaleratos.

k_{ij} = parâmetro de interação binária.

LH – Hormônio Luteinizante.

l_{ij} = parâmetro de interação binária.

M-NPs – Micro e nanopartículas.

MPs – Micropartículas.

NPs – Nanopartículas.

P4 – Progesterona.

PB – Ponto de Bolha.

P_c – Pressão Crítica.

PCL – poli(ϵ -caprolactona).

PH4HB – Poli(3-hidroxitirato).

PHA – Poli(hidroxicarbanos).

PHBHHX – Poli(3-hidroxihexanoato).

PHBV – poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato).

PHO - Poli(3-hidroxiacetato).

PLGA – Poli(ácido lático-co-glicólico).

PO – Ponto de Orvalho.

PVA – Polivinil Álcool.

SMB – Sincro-Mate-B.

T_c – Temperatura Crítica.

TETF – Transferência de Embriões em Tempo Fixo.

T_f – Temperatura de fusão.

T_m – Temperatura de degradação.

γ = Tensão interfacial.

σ – Desvio padrão experimental.

1. INTRODUÇÃO

Inúmeras pesquisas tem se destacado no âmbito da reprodução de bovinos em busca de melhores condições que promovam o aumento do rendimento do rebanho em menores períodos de tempo. Várias técnicas direcionadas a Inseminação Artificial (IA) estão sendo estudadas e mostram em bons resultados que a sincronização de vários animais em um mesmo período de tempo pode ser obtida a partir do uso de esteróides. Sendo assim, vários estudos estão sendo direcionados ao desenvolvimento de protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF).

A indução de estros e a sincronização da ovulação para o uso da IATF são alternativas descritas para a busca de aumento de produtividade em sistemas de produção de bovinos de corte (Gottschal *et al.*, 2012). O uso da IATF em rebanhos de vacas de cria possibilita que as vacas sejam inseminadas e se tornem gestantes no início da estação de monta, diminuindo com isto o período de serviço e aumentando a eficiência reprodutiva do rebanho (Meneghetti *et al.*, 2009).

Para isto, os programas de indução e sincronização de estros são métodos que precisam apresentar repetibilidade e ser minimamente dependentes do ambiente, isto possibilita que elevadas taxas de prenhes (números de vacas prenhas/número de vacas sincronizadas) sejam obtidas em diferentes locais e situações, e quanto menor a necessidade de observação do estro, mais atrativos se torna os programas de IA (Siqueira *et al.*, 2008).

Os protocolos de IATF são feitos a base de indutores de ovulação, e os mais utilizados em bovinos são o benzoato de estradiol (BE), o hormônio liberador de gonodotrofinas (GnRH) (Siqueira *et al.*, 2008), a progesterona e seus derivados. A progesterona e seus análogos têm sido usados em protocolos de sincronização há vários anos (Odde, 1990).

A contracepção hormonal pode ser alcançada utilizando tanto métodos combinados (estrógenos + progesterona) quanto aquele contendo apenas progesterona. Os contraceptivos á base de progesterona são administrados sob diferentes formas: via oral, intradérmica, injetável e intra-uterina (Rathke *et al.*, 2001). O principal objetivo dos contraceptivos hormonais é a produção de ciclos reprodutivos femininos anovulatórios, ou seja, sem ovulação. Este objetivo é atingido por meio de estrogênio, com ou sem progesterona, presente nos contraceptivos hormonais que age no hipotálamo e na hipófise, resultando na inibição de secreção do GnRH, conseqüentemente do FSH e do LH, essenciais para que ocorra a ovulação (Gottschall, 2012).

A progesterona (P4) e seus análogos têm sido usados em protocolos de sincronização há vários anos (Odde, 1990). P4 é um hormônio esteroidal sintetizado a partir do colesterol e é um

importante intermediário para formação do cortisol via pregnolona, estrógenos e testosterona. P4 induz mudanças clínicas no endométrio que permitem a implantação do óvulo fertilizado. P4 é também responsável pela manutenção do útero durante a gravidez, supressão das concentrações uterinas até o período do parto e preparo para a lactação. A medição dos níveis de P4 é útil para a detecção de insuficiência luteal em fases iniciais da gravidez, para monitorar mulheres em terapia de reposição e prevenção de problemas em casos de deficiência hormonal, incluindo osteoporose e doenças do coração (Santos *et al.*, 2004).

O P4 possui alguns derivados de grande interesse para o controle hormonal, como o acetato de medroxiprogesterona (AMP) (acetato de 17 α -hidroxi-6 α -metilprogesterona). O AMP é extremamente usado na ciência da ginecologia e obstetria, é também uma molécula complicada, no qual contêm três diferentes grupos carbonil tal como grupo carbonil C3 do α,β -cetona insaturada, grupo carbonil C20 da cetona saturada e grupo carbonil C23 de ester (Shi & Fan, 2012). O AMP tem propriedades de agonizar o receptor de progesterona no endométrio, mas exerce efeitos antagonistas dos receptores de progesterona em células endoteliais e do músculo liso vascular. Por outro lado, este se liga a progestina de outros receptores de esteróides tais como receptores de glucorticóides e receptores de estrogênio (Odening *et al.*, 2012).

O AMP é uma molécula progestínica sintética (estruturalmente relacionado ao hormônio progesterona endógeno) que demonstrou possuir várias ações farmacológicas sobre o sistema endócrino, como: inibição das gonadotrofinas pituitárias (FSH e LH, por mecanismo de *feedback* em nível hipotálamo-hipofisário); diminuição dos níveis sanguíneos de ACTH e de hidrocortisona; diminuição da testosterona circulante; diminuição dos níveis de estrogênio circulante (como resultado da inibição de FSH e indução enzimática de redutase hepática, resultando em aumento do *clearance* de testosterona e conseqüente redução de conversão de androgênios para estrogênios). Autores em alguns casos reportam que exógeno da progesterona (AMP) tem diferentes efeitos significantes daqueles endógenos da progesterona, e especulam que o AMP pode ter um efeito diferente na repolarização cardíaca do que a progesterona endógena (Skinner *et al.*, 2012).

O AMP na dose recomendada, administrado por via oral ou parenteral, a mulheres com estrogênio endógeno adequado, transforma o endométrio proliferativo em secretório. Notam-se efeitos androgênicos e anabólicos, mas o fármaco é aparentemente livre de atividade estrogênica significativa. Quando o acetato de medroxiprogesterona é administrado parenteralmente, ocorre inibição da produção de gonadotrofina, que por sua vez previne a maturação folicular e ovulação; dados disponíveis indicam que isto não ocorre quando a dose oral geralmente recomendada é administrada em doses únicas diárias. Pode ser usada no tratamento de

endometriose, e também é usada topicamente, no tratamento da diminuição de lubrificação das paredes da vagina.

Vários métodos de liberação de P4 e progestágenos têm sido usados incluindo injeções (Zimbelman *et al.*, 1952, Whismant *et al.*, 2002), administração oral, implantes auriculares (Gonzales-Padilha *et al.*, 1975) e intravaginais (Macmillan *et al.*, 1991, Pimentel, 2006). Os intravaginais, na sua maioria, são compostos de uma estrutura de nylon, recobertos com uma membrana de elastômero de silicone inerte impregnado com progesterona. Estes materiais são biocompatíveis, mas não são biodegradáveis e aumentam os custos dos protocolos de IATF (Pimentel, 2006). Além do mais, a liberação do medicamento não ocorre de maneira sustentada, mantendo doses que, em alguns momentos, podem ser muito mais altas do que as necessárias.

Atualmente, uma variedade de estudos relacionados ao descarte de sólidos sobre o meio ambiente vem sendo realizado. Os plásticos obtidos de materiais poliméricos sintéticos (derivados de petróleo) são inerentemente muito resistentes ao ataque da natureza. O maior grupo de polímeros utilizados em embalagens e materiais desta natureza são as poliolefinas, que devido sua resistência a peroxidação, água e microorganismos, são duráveis durante o uso (Scott, 2001). Para amenizar os efeitos decorrentes do uso de materiais poliméricos convencionais, novos polímeros de caráter biodegradável estão sendo desenvolvidos em função de aplicações que necessitam do material por período de tempo determinado, como sistemas de liberação de medicamento por exemplo.

A biodegradação é um processo pelo qual microorganismos como bactérias, fungos ou algas convertem os materiais em dióxido de carbono, água e biomassa. Segundo a ISO 472, “um polímero biodegradável é aquele que sofre mudanças em sua estrutura química na presença de microorganismos, gerando materiais com propriedades distintas que podem ser medidas por testes padronizados apropriados” (Pellicano, 2008).

Dentre uma gama de novos polímeros pode-se destacar os poli(hidroxi alcanatois) (PHA's). PHA's pertence a família dos poliésteres naturais lineares de ácidos hidroxialcanoicos. Eles são produzidos por uma variedade de diferentes tipos de bactérias como uma fonte de energia quando seus nutrientes são limitados. Isto é armazenado pela fermentação de açúcares, lipídeos e outros grupos funcionais (Akaraonye, *et al.*, 2010).

Ao contrário de polímeros sintéticos usados como polí(l-ácido láctio), PHA's são sustentáveis. Assim, sua adaptação favorecerá na preservação de reservas minerais de. Os PHA's não são apenas ambientalmente amigáveis, mas eles são também biodegradáveis e biocompatíveis. Através da extração de células bacterianas eles demonstram qualidades

elastomericos e termoplásticos comparável a propriedades favoráveis de plásticos sintéticos derivados de petróleo assim como polipropileno (Roy *et al.*, 2010).

A estrutura do PHA (Figura 1.1) é ideal para aplicações na engenharia biomédica. Esta é uma ampla família com mais de 100 tipos diferentes no qual são derivados de uma vasta ordem de diferentes monômeros. Isto é devido ao fato de que todas as unidades monoméricas são estereoespecíficas e na configuração-R é portanto, um bom material de partida. O grupo carboxil de um dos monômeros forma uma ligação ester com o grupo hidroxil do monômero adjacente, então criando o monômero ácido 3-hidroxiácido; estes são os blocos de construção do PHA (Horowitz *et al.*, 1999).

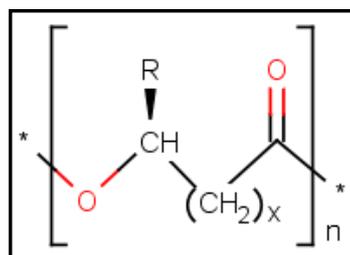


Figura 1.1 – Fórmula estrutural geral dos PHA's. Adaptado de (Boccaccini *et al.*, 2007).

Existem vários copolímeros derivados do PHA, incluindo Poli(hidroxiacetato) (PHA), PHBV, copolímero do poli(3-hidroxiacetato) (P4HB), poli(3-hidroxiacetato)(PHBHHX), e poli(3-hidroxiacetato) (PHO).

O homopolímero PHB (Figura 1.2) é um polímero resistente e quebradiço. O polímero menos resistente tem mais perspectiva como um biomaterial. Nos anos recentes, PHA, PHB e outros copolímeros são largamente usados na aplicação de dispositivos biomédicos e biomateriais, tais como placas ósseas, suturas, rebites, parafusos e grampos, pinos ortopédicos, dispositivos de regeneração e demais várias aplicações (Sabir *et al.*, 2009).

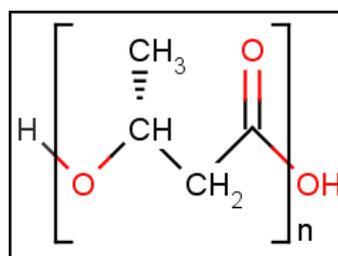


Figura 1.2 – Fórmula estrutural do poli(hidroxiacetato) PHB.

O PHBV é um copolímero termoplástico semicristalino biodegradável e biocompatível produzido por fermentação bacteriana, de cadeia linear com maior proporção de segmentos hidroxibutiratos (HB) e segmentos hidroxivalerato (HV). O aumento na quantidade de HV diminui o ponto de fusão, permitindo menores temperaturas de processamento, superando a baixa estabilidade térmica do homopolímero PHB (Pellicano, 2008). PHBV é um material com propriedades adequadas para a adesão e crescimento celular com características controladas de degradação e adequado para o projeto de estruturas que pode ser usado frequentemente para a reconstrução de tecidos como nervos devido a requisitos de axônios na orientação regular (Biazar *et al.*, 2010). A biodegradabilidade do polímero oferece a possibilidade de aplicações biomédicas, incluindo a liberação controlada de agentes terapêuticos de drogas (Volova *et al.* 2003).

As propriedades mecânicas e cristalinas do PHBV podem mudar com o aperfeiçoamento do percentual ou relação dos respectivos monômeros. Sofre erosão de superfície por clivagem hidrolítica das ligações dos ésteres. A degradação do copolímeros por processo de multiestágio no qual grande parte da perda do peso molecular ocorre antes da perda de massa considerável (Sabir *et al.*, 2009).

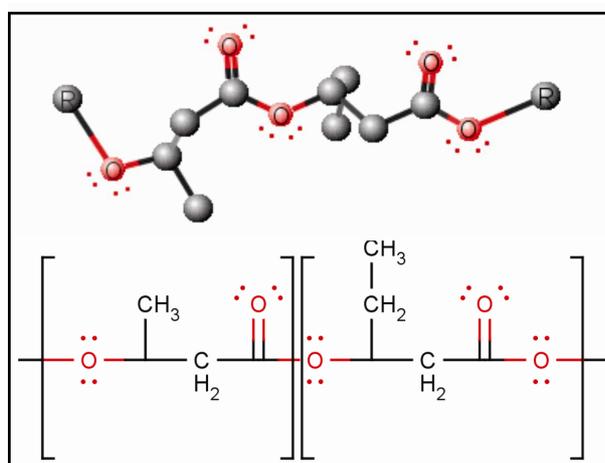


Figura 1.3 – Estrutura química do PHBV (Biazar *et al.*, 2010).

O campo de aplicação para o PHBV abrange embalagens para defensivos e produtos agrícolas, cápsula de fármacos com liberação controlada, filmes para embalagens de alimentos e produtos injetados, tais como: brinquedos, materiais escolares e produtos de limpeza descartáveis. Estes produtos biodegradáveis suportam mais de 4 anos em prateleiras e armários, e degradam em menos de 6 meses em ambientes ricos em microorganismos, como aterros sanitários (Pellicano, 2008).

Dispositivos intravaginais de P4 confeccionados a partir de biopolímeros como o PHB-V e poli(ϵ -caprolactona) (PCL) demonstraram liberar quantidades semelhantes deste hormônio, quando comparados aos dispositivos de silicone (Pimentel, 2006) e são igualmente eficientes em programas de IATF (Braga, 2008) e (Transferência de Embriões em Tempo Fixo) TETF (Pardo, 2008).

Vários métodos de liberação de P4 e progestágenos têm sido usados incluindo injeções (Zimbelman *et al.*, 1952, Whisnant *et al.*, 2002), administração oral, implantes auriculares (Gonzales-Padilha *et al.*, 1975) e intravaginais (Macmillan *et al.*, 1991 e Pimentel, 2006). Os intravaginais, na sua maioria, são compostos de uma estrutura de nylon, recobertos com uma membrana de elastômero de silicone inerte impregnado com P4. Estes materiais são biocompatíveis, mas não são biodegradáveis e aumentam os custos dos protocolos de IATF (Pimentel, 2006). Além do mais, a liberação do medicamento não ocorre de maneira sustentada, mantendo doses que, em alguns momentos, podem ser muito mais altas do que as necessárias. Entretanto, uma simples injeção de nanopartículas (NPs) ou micro partículas (MPs) de P4 carregadas em polímeros biodegradáveis podem ser capazes de proporcionar níveis adequados deste hormônio, suficientes para sincronizar a ovulação ou indução da puberdade em novilhas (Whisnant *et al.*, 2002). Usando NPs, com tamanho controlado, é possível aumentar o período de biodisponibilidade do princípio ativo, tempo de metabolização, diminuir a dosagem terapêutica ou ainda modificar o sistema de distribuição de fármacos intra-corpóreo.

A partir desses resultados favoráveis, a confecção de implantes com biopolímeros em MPs ou NPs hormonais vem sendo pesquisada com grande frequência. Com esta aplicação, a biodisponibilidade do princípio ativo é aumentada, assim como o período de ação do fármaco no organismo do animal. O transporte de fármacos para o local de ação é considerado o aspecto mais importante, e para que este consiga liberar uma dose eficaz do fármaco no local de ação são necessários veículos adequados. Partículas na ordem micrométrica são veículos atraentes para fins de liberação de substâncias ativas de interesse por apresentarem facilidade na liberação de macromoléculas aprisionadas via mecanismo de difusão aquosa. As NPs apresentam aplicações potenciais na administração de substâncias terapêuticas com o objetivo de aumentar a eficiência do transporte de fármacos e melhorar os perfis de liberação (Kumar, 2000). Nesse aspecto, microesferas biodegradáveis têm sido amplamente investigadas como sistemas de liberação de compostos bioativos, tais como agentes terapêuticos de baixa massa molar ou macromoleculares, antígenos e DNA (Embleton *et al.*, 2002).

O perfil e o mecanismo de liberação do fármaco dependem também da natureza do polímero e também das propriedades físico-químicas da substância nele incorporada. Alguns

polímeros são menos sensíveis às condições empregadas nos processos de preparação, o que pode ser devido à sua composição química, à sua massa molar e à sua cristalinidade (Rieux *et al.*, 2006). No entanto, o desenvolvimento de sistemas biodegradáveis requer o controle de um maior número de variáveis já que a cinética de degradação do polímero, *in vivo*, deve permanecer constante para que seja obtida uma liberação controlada da substância. Portanto, fatores como o pH e a temperatura, que podem promover um aumento ou uma redução na velocidade de degradação do sistema, devem ser avaliados durante o desenvolvimento (Dask e Cudworth, 1998).

O tamanho das partículas, bem como sua distribuição de tamanhos, é o fator chave para o uso de diferentes materiais orgânicos e inorgânicos. Frequentemente, tais propriedades têm que ser modificadas, para subsequente uso destes materiais. Portanto, operações de cominuição e recristalização são realizadas em larga escala nas indústrias farmacêuticas, veterinárias, químicas e de polímeros entre outras (Gallagher *et al.*, 1989).

A produção de partículas submicrométricas, sejam NPs ou nano cápsulas, tem sido amplamente estudada por diversos autores, pois apresentam características interessantes para o uso em sistemas de liberação controlada de fármacos. Em se tratando particularmente de microesferas de PHBV, neste é difícil conseguir uma rápida liberação do fármaco devido à estabilidade hidrolítica deste polímero. Em contrapartida, processos que possibilitem um controle sobre a porosidade deste material são particularmente atraentes, permitindo liberar o princípio ativo encapsulado de acordo com o número, tamanho, profundidade e tortuosidade dos poros do polímero (Weiss-Angeli *et al.*, 2008). Contudo, o processo de preparação de NPs deveser simples, contínuo e eficiente; viável para larga escala; aceito por autoridades regulatórias; e permitir quantidades flexíveis de fármaco nelas impregnadas.

Atualmente diversas técnicas têm sido abordadas para a produção de partículas em escala micro e nanométrica para uso de liberação sustentada de fármacos. Existem os métodos que requer uma reação de polimerização ou aquelas em que se utiliza diretamente uma macromolécula ou um polímero pré-formado. Os métodos mais abordados são emulsificação e evaporação de solvente, emulsificação/difusão de solvente, nanoprecipitação, *salting-out* e polimerização interfacial “*in situ*” (Gaspari, 2006). Muitas destas técnicas são excelentes estratégias para produção MPs e NPs, no entanto, a aplicação da maioria delas envolve o uso de solventes orgânicos que precisam ser removidos cuidadosamente no final do processo, pois caso a remoção do solvente não seja efetuada de forma correta, a qualidade morfológica e a polidispersidade das partículas podem ser comprometidas.

Novas técnicas de produção de MPs, NPs e sistemas matriciais têm sido desenvolvidas com o propósito de amenizar os problemas atuais. A técnica de FSC utilizando dióxido de carbono tem se mostrado adequada à produção de micro, submicro e NPs de polímeros biodegradáveis, sejam elas carregadas ou não de fármaco. A aplicação da tecnologia supercrítica, usando o dióxido de carbono como anti-solvente, é um processo que tem sido proposto como alternativa interessante para produção de MPs e NPs carregadoras de fármacos. Este processo tem se destacado, uma vez que confere qualidades ao produto, tais como: tamanho de partículas submicroscópicas, com distribuição de tamanhos controlada, morfologia homogênea, alta eficiência de encapsulamento da droga na matriz polimérica e produtos isentos de traços de solventes, entre outros (Thies e Muller, 1998).

A vantagem do uso do dióxido de carbono como anti-solvente é a possibilidade de processar uma quantidade maior de soluto. O uso de um fluido anti-solvente compressível é vantajoso, quando comparado com a utilização de anti-solventes líquidos, por causa da facilidade da recuperação do solvente e anti-solvente, secagem ou purificação do precipitado e rápidas taxas de transferência de massa entre o solvente e o anti-solvente (Dixon, 1993).

Apesar de alguns processos utilizarem solventes orgânicos e, portanto, requererem uma etapa de secagem do precipitado, técnicas de secagem utilizando fluidos no estado supercrítico é extremamente vantajosa. Como o solvente líquido é solúvel no FSC, não existe a interface líquido vapor durante a retirada do solvente. Assim, as forças de capilaridade ou de superfície são bem menores, o que possibilita a remoção do solvente preservando a estrutura do material precipitado (Srinivasan e Elliot, 1992).

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Levando em consideração o interesse pela melhoria dos protocolos de IATF e o desenvolvimento de novos sistemas que ofereçam um controle sustentável para a administração de esteróides em função da determinação do período do cio em bovinos, este trabalho tem como objetivo conduzir um estudo aprofundado sobre técnicas de produção de micro e NPs de PHBV carregadas de esteróides para fins de promover um sistema de liberação modificada que possa contribuir para o desenvolvimento de novos protocolos de IATF. NPs apresentam algumas propriedades superiores aos compósitos tradicionais utilizando baixos teores de carga devido às características do reforço em escala nanométrica.

Deste modo serão abordados nos próximos capítulos estudos e metodologias que visam à obtenção de sistemas matriciais em escalas micro e nanométrica a partir de técnicas de produção de partículas a baixas e altas pressões.

No capítulo III são realizados estudos de caracterização dos principais materiais utilizados em todas as etapas experimentais, tendo por objetivo o conhecimento de aspectos individuais dos componentes como, análise termogravimétrica, estudos de calorimetria, análise de ressonância magnética, entre outros estudos de relevância fundamental para a obtenção de um processo ou produto em particular.

No capítulo IV (*parte experimental I*) foi feito um estudo do comportamento de fases dos principais sistemas ternários envolvendo CO_2 + solvente orgânico + soluto para o conhecimento das principais condições em termos de pressão, temperatura e composição que conduzam a obtenção de sistemas particulados em condições supercríticas.

No capítulo V (*parte experimental II*), é abordada uma breve revisão no conceito de produção de partículas por meio de FSC, e posteriormente são produzidas micro e nanopartículas (M-NPs) de PHBV a partir do sistema ternário CO_2 + diclorometano + PHBV utilizando o método SAS (supercrítico anti-solvente).

No capítulo VI (*parte experimental III*) são discutidos estudos de formação de emulsão como base para a produção de M-NPs de PHBV a partir de emulsão simples em diferentes condições.

No capítulo VII (*parte experimental IV*) são revisados alguns conceitos envolvendo produção de emulsão convencional e extração de solventes orgânicos por meio de FSC como base para o desenvolvimento de um sistema que promove a formação instantânea de uma emulsão seguida de extração do solvente por meio de CO_2SC em uma única etapa de produção.

No capítulo VIII (*parte experimental V*) primeiramente é feito um estudo da redução da massa molecular do PHBV em diferentes valores e sua influência direta na ordem dos tamanhos de partículas, e posteriormente são produzidas NPs de PHBV com diferentes pesos moleculares a partir da técnica de extração da emulsão por FSC (SFEE – do inglês: *Supercritical Fluid Extraction of Emulsion*).

Por fim no capítulo IX (*parte experimental VI*) são realizados estudos iniciais de carregamento e liberação de esteróides a partir sistemas constituídos de M-NPs de PHBV. Dois diferentes métodos de carregamento são apresentados e justificados com estudos de eficiência de carregamento e encapsulamento seguidos da avaliação do comportamento da curva de liberação dos esteróides em um sistema “*in vitro*”.

Para melhor compreensão do desenvolvimento do trabalho, abaixo é apresentado um fluxograma descritivo das etapas experimentais deste trabalho.

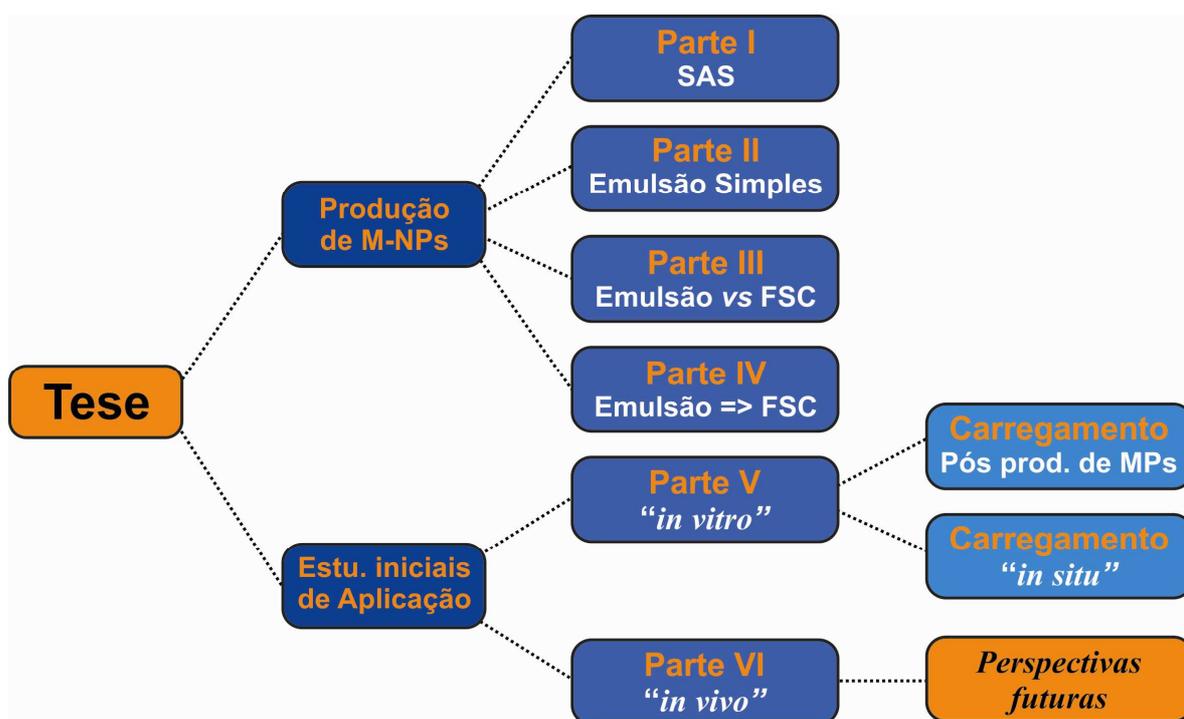


Figura 2.1 - Fluxograma descritivo.

3. ANÁLISE, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS MATERIAIS UTILIZADOS

3.1. INTRODUÇÃO

É crescente o interesse pela área de análise e caracterização de materiais devido à necessidade de seleção adequada do material baseado no desempenho do sistema em estudo. Dependendo das solicitações a que este material ou sistema será submetido, a caracterização poderá abranger a avaliação de propriedades mecânicas, elétricas, bioatividade, eletrônicas, magnéticas, ópticas, químicas, térmicas, etc. A caracterização visa também estimar o desempenho no período de vida útil do material, bem como a possibilidade de degradação e falhas indesejáveis durante a utilização do produto. De acordo com a óptica da Engenharia e Ciência dos Materiais podemos conceituar a definição de caracterização como:

“A caracterização descreve os aspectos de composição (incluindo defeitos) dos materiais, dentro de um contexto de relevância para um processo, produto ou propriedade em particular”.

Tendo em vista a importância da caracterização, alguns dos componentes utilizados neste trabalho foram submetidos a análises com o objetivo de obter aspectos morfológicos, propriedades térmicas como temperatura de fusão (T_m), temperatura de transição vítrea (T_g) e grau de cristalinidade, perfil de degradação térmica, peso molecular e traços residuais, e de acordo com a necessidade alguns materiais foram submetidos a um processo de purificação por apresentarem aspectos de impurezas. Sendo assim foram realizadas análises de DSC (Calorimetria Diferencial de Varredura), RMN ^1H (Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio), FTIR (Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier), GPC (Cromatografia Permeável em Gel) e TGA (análise termogravimétrica).

3.2. MATERIAIS

Neste capítulo apresentaremos todos os materiais utilizados neste trabalho, seguido de suas respectivas origens e procedências e que estarão presentes nos próximos capítulos.

Nas etapas em que os estudos foram realizados no Brasil na Universidade Estadual de Maringá - UEM, os materiais utilizados foram: O clorofórmio (CHCl_3) (cas nº 67-66-3, 99,8%),

etanol (cas nº 64-17-5, 99,9%), hexano (cas nº 110-54-3, 99,9%) e diclorometano (DCM) (cas nº 75-09-2, 99,5%), obtidos de Vetec Química Fina - Brasil, Dióxido de Carbono (cas nº 124-38-9, 99,9%) em fase líquida foi obtido de White Martins Praxair Inc - Brasil, PHBV FE-113 (99,0%) foi gentilmente doado por PHB Industrial S.A. - Brasil, Progesterona foi gentilmente doado por Genix Indústria Farmacêutica LTDA – Brasil, Poli Vinil Álcool - PVA (cas nº 9002-89-5, 87-90%) hidrolisado (Mw: 30.000 a 70.000) foi adquirido de Sigma-aldrich® - EUA, Acetato de Medroxiprogesterona Micro BP/USP (cas nº 71-58-9, PM 314,47) foi gentilmente doado por DEG (Químicos Importados – Brasil), e membranas de diálises (corte 12.000) adquirido de Sigma-aldrich® - EUA importados para o Brasil. Clorofórmio Delterado (CDCL₃ – cas nº 865-49-6, 99,8% +0,005% TMS) – Cambridge Isotope Laboratories, Inc – USA.

Nos estudos realizados nos EUA na Wayne State University – WSU, alguns materiais foram levados do Brasil, como PHBV FE - 113, Progesterona e Medroxiprogesterona, e os demais materiais foram: PVA - Sigma-aldrich® - EUA. Diclorometano (cas nº 75-09-2, 99,5%) e Etanol (cas nº 64-17-5, 99,5%) foram adquiridos de EMD Químicos – EUA. Clorofórmio (cas nº 67-66-3, 99,8%) e Ácido Clorídrico (7647-01-0, 36,5–38,0%) foram adquiridos de Mallinckrodt Químicos – EUA. Hexano (cas nº 110-54-3, 99,8%) foi adquirido de Fisher Químicos - EUA. Dióxido de Carbono (cas nº 124-38-9, 99,9%) foi adquirido de (Praxair, Inc. Danbury - EUA). Água deionizada (NANOpurell: Barnstead), com resistividade de 18,2 MΩ.cm⁻¹, foi usada nos experimentos.

Os materiais adquiridos com certificado de grau de pureza não necessitaram passar por processo de purificação.

3.3. PURIFICAÇÃO DO POLÍMERO PHBV

O PHBV é um polímero produzido a base de cana de açúcar e foi adquirido com traços visíveis de impureza, como coloração e resíduos de matéria prima, e desta forma o mesmo foi submetido ao seguinte processo de purificação.

O polímero foi solubilizado em solvente orgânico em uma concentração de 30 mg/mL de clorofórmio e mantido sob agitação por um período de 3 horas a uma temperatura média de 323 K. Após completa solubilização, a solução foi filtrada através de um filtro de papel de poros (150 mm) com vácuo para remoção de impurezas, e posteriormente a solução filtrada foi adicionada em solução de hexano para que ocorresse completa precipitação do polímero. O polímero precipitado foi separado da mistura contendo hexano/clorofórmio posteriormente seco

em estufa com circulação de ar a 323 K durante aproximadamente 18 horas. Este processo foi repetido três vezes para que o polímero fosse totalmente purificado.

3.4. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica analítica versátil, que pode ser utilizada desde a análise de compostos químicos simples à elucidação estrutural e investigação da dinâmica de proteínas e imagiologia de órgãos de seres vivos, de um modo não invasivo e não destrutivo, é uma técnica analítica que permite obter informação estrutural e dinâmica sobre a matéria, e que se baseia na detecção das propriedades magnéticas exploradas nos núcleos dos átomos que podem ser vistos como pequenos piões com carga que rodopiam em torno do seu eixo, gerando o seu próprio pequeno campo magnético (Figura 3.1) (Luzyanin e Abrantes, 2010).

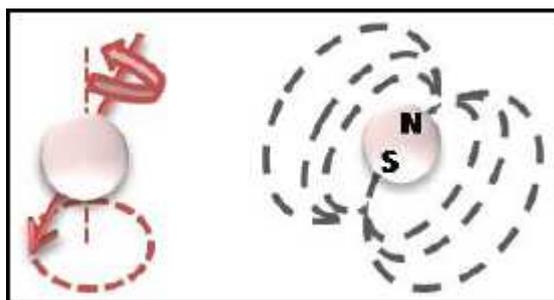


Figura 3.1 – Representação de um núcleo a rodopiar como um pião (à esquerda), que se comporta como um ímã tendo um pólo sul e um pólo norte (à direita) (Luzyanin e Abrantes, 2010).

Para os materiais base do estudo e desenvolvimento deste trabalho, como PHBV purificado, Progesterona (P4) e Acetato de Medroxiprogesterona (AMP) foram realizadas análises de RMN de Hidrogênio (^1H) com o propósito de validar suas estruturas e características de acordo com estruturas moleculares originais dos mesmos. A partir dos resultados obtidos foi possível a identificação e caracterização dos grupos funcionais por meio de cadeias de H identificadas e comparados com dados da literatura. O espectro de RMN mapeia cada grupo de hidrogênios em forma de picos que se distribuem em uma escala e podem ser interpretados em pontos (pt), segundos (sec), Hertz (Hz) e partes por milhão (ppm).

Para procedimento de análise, todas as amostras foram solubilizadas em Clorofórmio Delterado (CDCl_3) utilizando uma concentração padrão de 10 mg/mL de massa da amostra em relação ao solvente orgânico. As análises foram realizadas em um equipamento Marca Varian

(Modelo Mercury Plus 300) a uma temperatura ambiente de aprox. 22 °C e frequência de 400 MHz.

Os resultados obtidos primeiramente foram importados com uso do software MestreC - ver. 4.8.6.0 (Copyright © 1996-2005) em que permitiu a identificação em escala (ppm) de cada pico correspondente a amostra.

A figura abaixo (Figura 3.2) se refere ao espectro obtido a partir da amostra de PHBV.

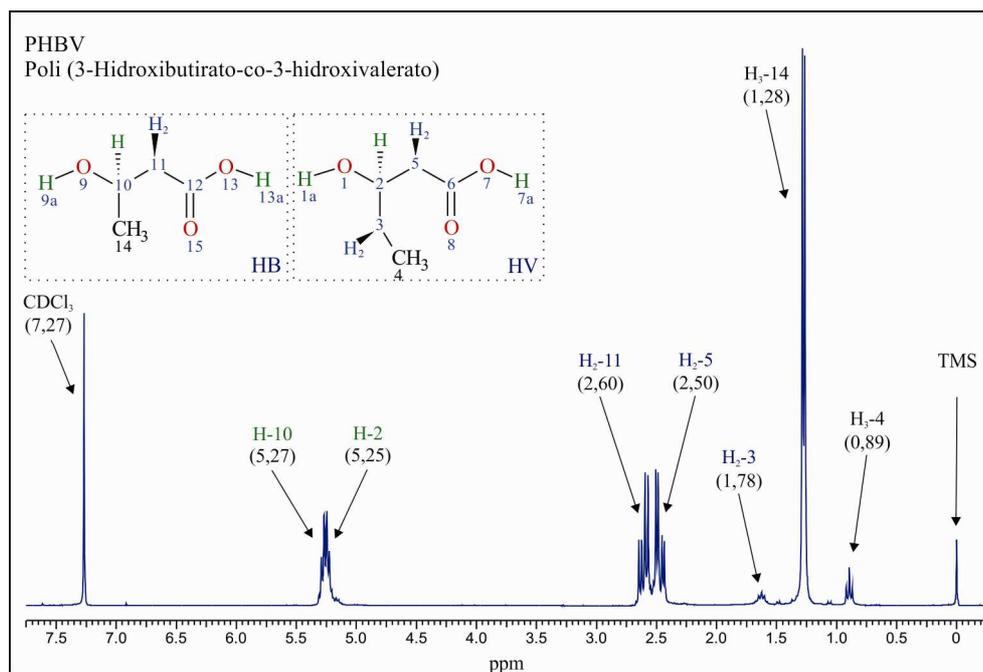


Figura 3.2 – Espectro de RMN (¹H) obtido a partir da amostra de PHBV dissolvida em CDCl₃ a uma concentração de 10 mg/mL.

A identificação dos picos e dos respectivos grupos de hidrogênio foram obtidos com o auxílio de dados da literatura que apresentam espectros similares, De acordo com a literatura de Tao *et al.*, 2009, o pico referente a 5,25-5,27 (ppm) corresponde ao grupo de prótons metino (-CH), os picos referente a 2,60, 2.50 e 1,78 (ppm) correspondem ao grupo de prótons metileno (-CH₂) e os picos localizados em 1,28 e 0,89 (ppm) correspondem ao grupo de prótons metil (-CH₃). A estrutura da molécula do PHBV como é ilustrada na Figura 3.2 e pode ser dividida em duas partes, sendo a primeira correspondente ao grupo Hidroxibutirato (HB) e a segunda correspondente ao grupo Hidroxivalerato (HV). A partir da estrutura molecular do PHBV também foi possível gerar/simular um espectro de RMN ¹H (Figura 3.3) com o uso do software de simulação MarvinSketch 5.11.5 cedido por Copyright © 1998-2013 ChemAxon Ltd – Licença Acadêmica (Academic Research), e auxiliar na identificação de muitos dos picos.

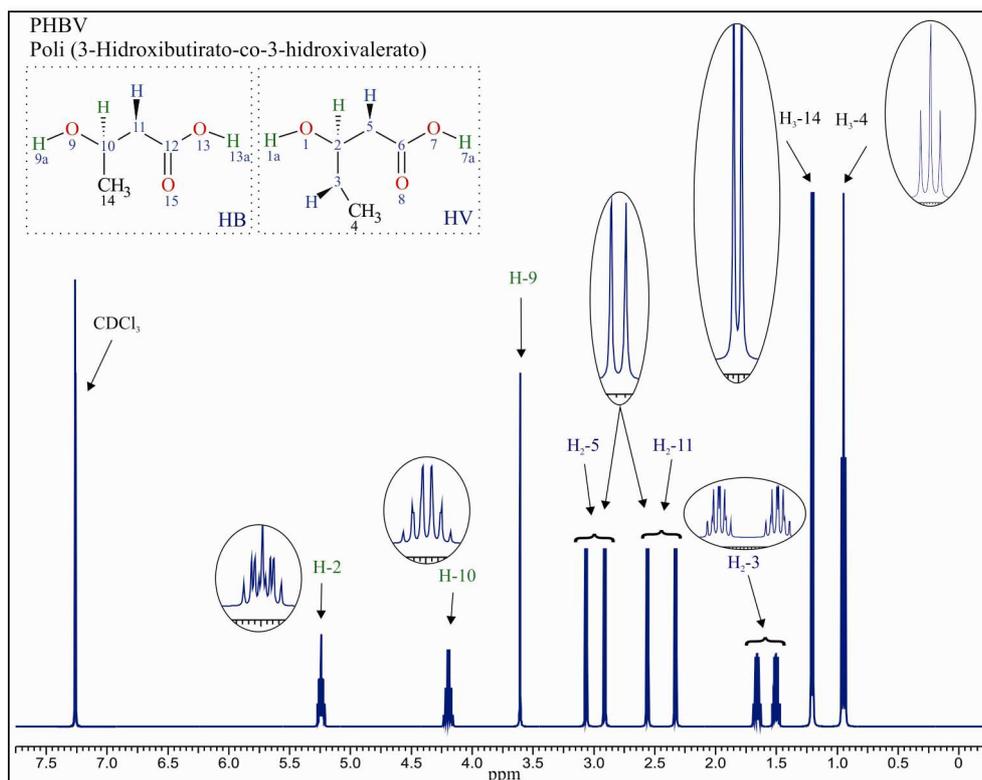


Figura 3.3 – Espectro de RMN (^1H) gerado pelo software de simulação MarvinSketch 5.11.5 a partir da estrutura molecular do PHBV.

Utilizando o espectro obtido e analisando a área dos picos correspondentes ao grupo metil ($-\text{CH}_3$) onde $\delta = 1,28$ (ppm) corresponde ao HB e $0,89$ (ppm) corresponde ao HV, foi possível calcular o valor percentual equivalente aos respectivos grupos a partir da fórmula:

$$\% \text{ HB} = \frac{a(\text{HB})}{a(\text{HB}) + a(\text{HV})} \quad \text{e} \quad \% \text{ HV} = \frac{a(\text{HV})}{a(\text{HB}) + a(\text{HV})}$$

Os valores em percentuais obtidos foram de 94,65% (HB) e 5,35% (HV).

Para as amostras de P4 e AMP também foram feitas análises de RMN (^1H). A compreensão detalhada e clara do estado da estrutura da solução e conformação dos esteróides é possível com estudo de RMN. Desta forma, a ressonância magnética para os núcleos de hidrogênio dos benzenos aparecem a uma frequência diferente dos prótons hexatrienos ou n-hexanos. Nos esteróides temos um espalhamento de frequências que constituem um espectro de frequência dimensional (Farrant *et al.*, 1983).

Os espectros de RMN (^1H) também foram obtidos para as amostras de P4 e AMP. Estudo de relaxamento molecular no estado sólido fornece uma visão em dinâmica molecular de movimentos tanto intramolecular como intermolecular. A progesterona é um esteróide com o mesmo grupo fundido de quatro anéis de carbono como colesterol e cortisona, ambos recentemente estudados em estado sólido por RMN (Andrew, *et al.*, 1992).

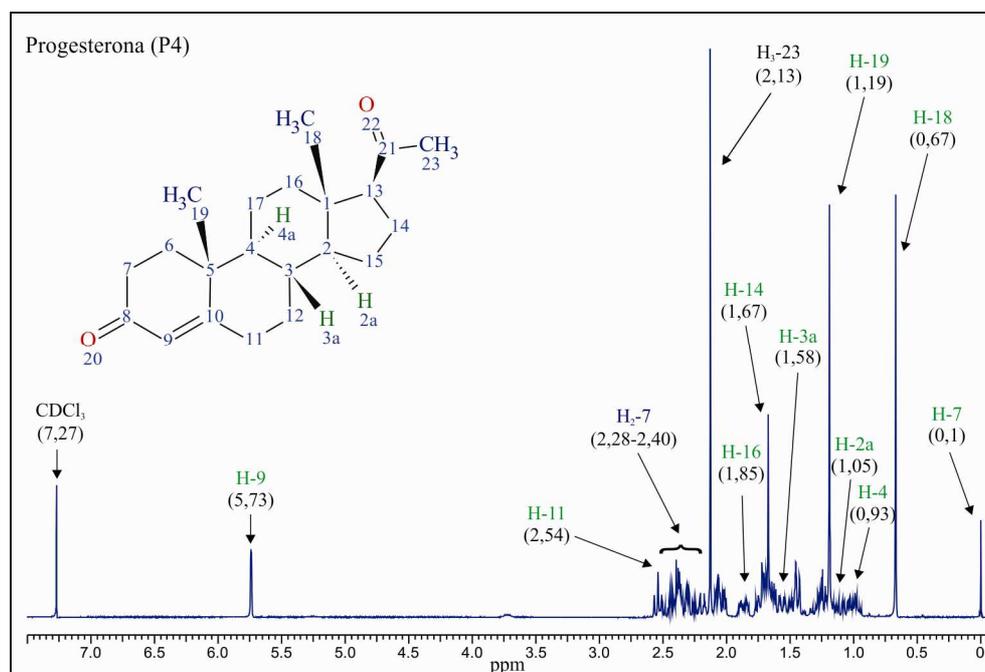


Figura 3.4 – Espectro de RMN de ^1H da amostra de progesterona (P4) dissolvida em CDCl_3 a uma concentração de 10 mg/mL.

Nas figuras 3.4 e 3.5 são identificados a 7,27 ppm. Os picos 2,13 ppm dos prótons H-23 (P4) e H-28 (AMP) destacam a presença característica do grupo metil acetil (Xue *et al.*, 2003). Os espectros de P4 e AMP diferem muito pouco, mas alguns grupos podem ser encontrados na amostra de AMP e não aparecem no P4, como é o caso dos picos (3,70-3,80 ppm) (Beranic *et al.*, 2012) que são multipletos simétricos e representam os prótons H-18 e H-20 respectivamente apenas na Figura 3.5. Os picos entre 3,7 e 3,8 na Figura 3.5 não foram identificados em outros espectros da literatura e aparentam sem traços de impurezas.

Estudos da literatura de Farrant *et al.*, 1983 mostraram por meio de análises de RMN que o AMP possui uma conformação de meia cadeia de anel cristalino invertido, e há apenas alguns casos conhecidos que possui esta conformação, como por exemplo 2 β -acetoxitesterona-17-cloroacetato. Isto tem considerado que o efeito combinado dos grupos 17 α -acetoxi e 6 α -metil tem causado o anel cristalino invertido no AMP. Foi considerado que a

capacidade do AMP e outros compostos relacionados possuírem um anel invertido pode ser correlacionada com sua atividade progesteracional excepcionalmente elevada.

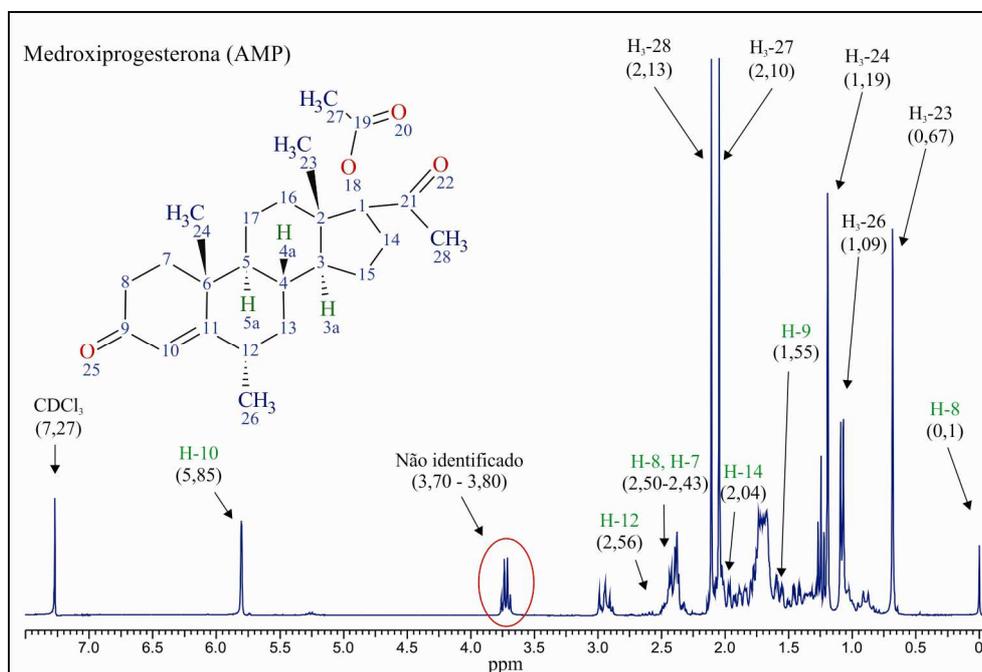


Figura 3.5 – Espectro de RMN de ¹H da amostra de Acetato de Medroxiprogesterona (AMP) dissolvida em CDCl₃ a uma concentração de 10 mg/mL.

3.5. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO TRANSFORMADA DE FOURIER - FTIR

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) é uma técnica de inestimável importância na análise orgânica qualitativa, sendo amplamente utilizada na área de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas.

Para maior clareza a respeito das características do PHBV também foi realizado análise de FTIR. A espectroscopia FTIR permite a determinação automatizada dos parâmetros de maior importância de muitas substancias e compostos. Utiliza metodologia pratica e rápida obtendo informações sumárias sobre o produto a cerca de 30s / amostra, não é poluente considerando que não utilizam reagentes e é versátil podendo ser utilizada para outras determinações complementares. A metodologia de análise não constitui um processo absoluto, e o valor analítico do parâmetro a determinar é obtido pela aplicação de algoritmo em que são compensadas as contribuições de interfaces relativamente ao valor que adviria da ponderação direta das absorvâncias nos diversos comprimentos de onda. O equipamento seleciona os comprimentos de ondas (filtros), que para cada parâmetro, apresenta maior variação estatística

para os valores de referência analítica. Seleciona também os filtros de referência de modo a obter os canais, isto é, as razões entre as absorvâncias dos filtros e as absorvâncias dos filtros de referências. A posição e intensidade das bandas de absorção são extremamente específicas no caso de uma substância pura. Isto possibilita que o espectro de IR seja utilizado como uma grande função característica para a identificação.

Para o PHBV a análise de FTIR foi realizada utilizando o polímero purificado e de massa molecular (Mw) igual a 228.515 Da. A Figura 3.3.a mostra o espectro obtido para o PHBV deste trabalho, e a Figura 3.3.b mostra um espectro de FTIR para o PHBV extraído da literatura de Jack *et al.*, 2009, em que as bandas vibracionais esperadas podem identificar um C=O alongado em 1720 cm^{-1} , vários modos vibracionais alifáticos C-H nas regiões entre $1227\text{-}1478$ e $979\text{-}826\text{ cm}^{-1}$ e modos vibracionais C-O a 1183 , 1133 e 1057 cm^{-1} , e pode-se notar que a 563 cm^{-1} não identificamos a banda vibracional característica do HA que aparece como um traço quando o polímero não é puro (Jack *et al.*, 2009), ou seja, não está presente no polímero puro.

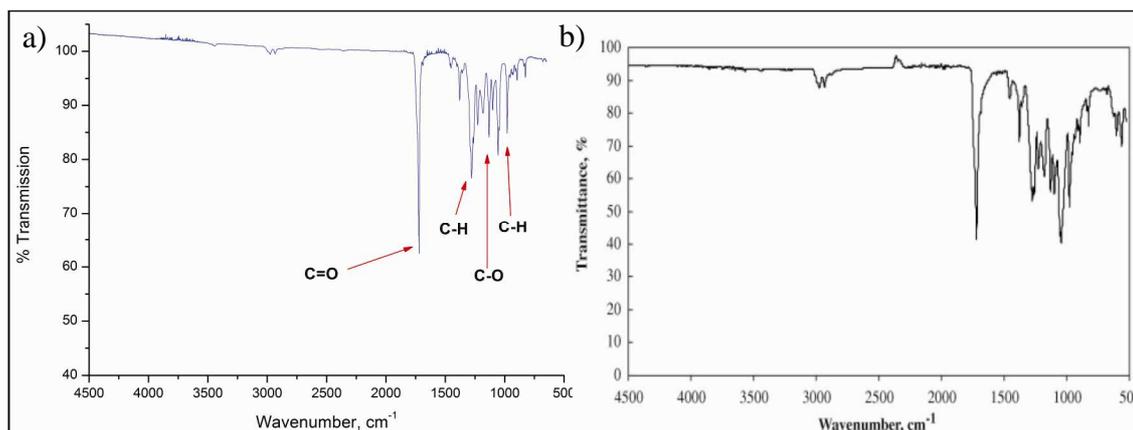


Figura 3.6 - (a) Espectro de FTIR do PHBV utilizado neste trabalho, (b) Espectro de FTIR do PHBV obtido da literatura de Jack *et al.*, 2009.

3.6. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA - DSC

A análise térmica é o conjunto de técnicas que permite medir as mudanças de uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação em função da temperatura e do tempo, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura. Dentre as técnicas, a calorimetria exploratória diferencial (DSC - *differential scanning calorimetry*) destaca-se na área farmacêutica devido à grande importância adquirida na caracterização de materiais e no estudo de compatibilidade entre fármaco excipientes, sendo

utilizada pelos farmacêuticos a mais de 30 anos (Ionashiro e Giolito, 1980). A técnica de DSC é utilizada para medir a diferença de fluxo de calor entre uma substância e um material de referência em função de um programa de aquecimento ou resfriamento. Na área farmacêutica é utilizada na caracterização térmica e determinação da pureza de fármacos, estudos de compatibilidade entre os constituintes da formulação e identificação de polimorfismo com determinação das entalpias de cada forma cristalina (Oliveira *et al.*, 2011).

Como foi introduzido no primeiro capítulo, o propósito deste trabalho é desenvolver sistemas matriciais e base de biopolímeros para uso de liberação controlada de fármacos, e a avaliação inicial bem como o conhecimento do comportamento dos materiais que envolvem estes sistemas em relação a condições de temperatura, umidade e pureza é de extrema importância. Na caracterização de fármacos e produtos farmacêuticos é possível identificar e quantificar os eventos de perdas de massas, e identificar os processos endotérmicos ou exotérmicos (Oliveira *et al.*, 2001). Portanto foram realizadas análises de DSC para as amostras de PHBV, P4 e AMP.

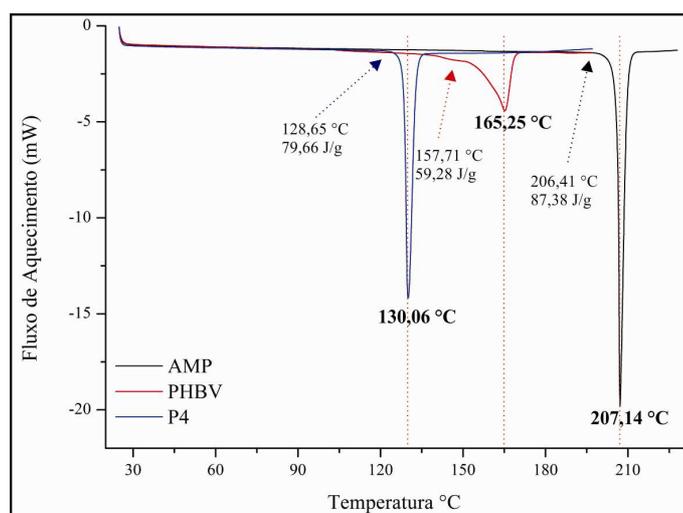


Figura 3.7 – Análise térmica (DSC) para as amostras de AMP, PHBV e P4 realizadas a uma taxa média de 10°C/min.

Para as análises de DSC utilizou-se 10 mg de cada amostra acomodadas em porta amostra de alumínio não hermético e submetidos a uma razão de aquecimento de 10°C·min⁻¹ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL·min⁻¹) em uma faixa de temperatura de 25 a 250 °C, e foram realizadas em um equipamento DSC-TG SHIMADZU Modelo TGA-50. As medidas de análise térmica determinam a temperatura de desnaturação das amostras e mostram a transição dos materiais em uma função do tempo e temperatura controlada, e a variação da entalpia

endotérmica da origem aos picos que demonstram transições de primeira ordem. Pode-se observar que a transição vítrea para a amostra de P4 iniciou-se em 128,65 °C a 79,66 J/g seguindo de uma reação endotérmica até 130,06 °C, para amostra de PHBV em 157,71°C a 59,28 J/g com reação endotérmica até 165,25 °C e na amostra de AMP em 206,41 °C em 87,38 J/g e reação endotérmica até 207,14 °C.

A avaliação de pureza por DSC pode ser realizada pelo simples acompanhamento visual da curva calorimétrica, observando a presença dos eventos térmicos característicos do fármaco. Os resultados da Figura 3.7 permitem observar, paralelo aos dados da literatura, a pureza dos materiais. O P4 e ao PHBV foram analisados por meio de DSC por Pimentel, 2010, no qual apresentou picos calorimétricos iguais a 133 °C e 165 °C, e para a amostra de AMP não foram encontrados dados de referência contendo análise de DSC.

3.7. TERMOGRAVIMETRIA – TG

A TG é utilizada para medir a variação de massa em função da temperatura em uma atmosfera controlada sob um programa de aquecimento. Para fins farmacêuticos, seu uso é descrito na caracterização, determinação de pureza e de umidade, identificação de pseudopolimorfismo, na avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos e em estudos de cinética de degradação (Oliveira *et al.*, 2011). Os experimentos são executados por meio de uma termobalança de elevada sensibilidade, reprodutividade e resposta rápida às variações de massa. As curvas obtidas fornecem informações relativas à composição e estabilidade térmica da amostra, dos produtos intermediários e do resíduo formado. Dada a natureza dinâmica da variação de temperatura da amostra para originar curvas TG, fatores instrumentais, vazão de gás, composição da amostra (quantidade, granulometria, forma cristalina, empacotamento, condutividade térmica, solubilidade dos gases liberados da amostra e calor de reação envolvido) podem influenciar a natureza, a precisão e a exatidão dos resultados experimentais (Silva *et al.*, 2007).

As amostras de P4, AMP e PHBV foram submetidas a análises de TG com o propósito de avaliar a estabilidade térmica de cada material, e analisando a curva termogravimétrica pode-se observar o momento em que ocorre a decomposição térmica inicial (Ti) de cada material e a estabilidade térmica que ocorre em (Tf).

A metodologia aplicada para análise termogravimétrica (TG) assim como nas análises de DSC foram conduzidas no equipamento DSC-TG SHIMADZU Modelo TGA-50. As

amostras foram pesadas em quantidades em torno de 7 mg, armazenadas em bases de alumínio não hermético e submetidas a uma razão de aquecimento de $10 \text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}$ numa atmosfera dinâmica de nitrogênio ($50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) a uma faixa de temperatura de 25 a $1000 \text{ }^\circ\text{C}$. Estas análises permitiram obter uma medida quantitativa das variações da massa da amostra em função das alterações de temperatura.

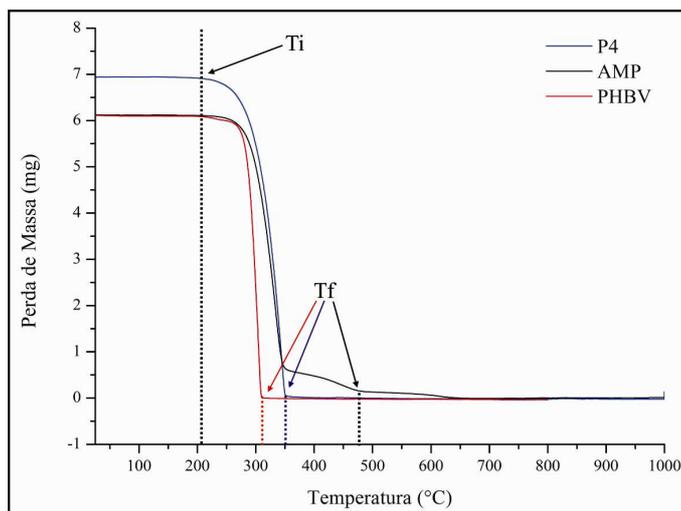


Figura 3.8 – Análise termogravimétrica realizada para as amostras de P4, AMP e PHBV.

Os resultados a partir da Figura 3.8 mostram que para as três amostras analisadas a decomposição térmica inicial (Ti) foi em torno de $210 \text{ }^\circ\text{C}$, ou seja, até esta temperatura a massa inicial permaneceu estável. O período de decomposição térmica variou entre as diferentes amostras, e os valores de temperatura final de decomposição térmica (Tf) foram de $\pm 350 \text{ }^\circ\text{C}$ para o P4, $\pm 310 \text{ }^\circ\text{C}$ para o PHBV e $\pm 480 \text{ }^\circ\text{C}$ para o AMP.

A cinética de degradação térmica é utilizada para a avaliação de estabilidade de fármacos e de formulações farmacêuticas e pode ser determinada tanto por TG dinâmica quanto por TG isotérmica. Tanto a cinética de degradação não isotérmica quanto à cinética de degradação isotérmica são utilizadas na área farmacêutica, no entanto, em estudos isotérmicos existe a possibilidade de se determinar o prazo de validade por extrapolação, utilizando a Equação de Arrhenius (Oliveira *et al.*, 2011).

3.8. CROMATOGRAFIA DE PERMEÇÃO EM GEL - GPC

Análise de GPC foi realizada com o objetivo identificar as características de peso molecular do PHBV em termos de M_n (numérico), M_w (mássico) e M_z (médio) em Daltons. Considerando que o propósito deste trabalho é produzir partículas de diversos tamanhos utilizando diferentes técnicas, o conhecimento do peso molecular do polímero é fator determinante entre as interações intermoleculares no momento de polimerização apresentando grande influencia no tamanho final das matrizes poliméricas, seja por técnicas de expansão, emulsão, precipitação, etc.

A técnica de GPC é extremamente poderosa para o fracionamento de polímeros e sua distribuição de massa molecular. Em essência a técnica consiste na separação molecular com base no tamanho efetivo das moléculas em solução, conseguida por meio de injeção de uma solução de polímero numa corrente contínua de solvente que passa através de colunas com perlas porosas, de modo que as moléculas menores penetrem mais nas partículas, permanecendo mais tempo na coluna do que as moléculas maiores. Os cromatógrafos de permeação em gel consistem de um sistema de bombeamento, injetor, colunas, detectores e registradores. O fluxo de solvente se divide em dois: uma metade vai para a coluna de referencia, e a outra para a coluna que conterá a amostra. A solução do polímero é injetada na corrente da amostra através de uma válvula. As duas correntes, após passarem pelos dois sistemas de colunas (cada um com três ou quatro colunas em série com pérolas de diferentes tamanhos) são analisadas pelo detector. Os dados são convertidos e interpretados por um software que traduz os dados do pico do volume de retenção (mL) resultando em dados de M_n , M_w , M_z , M_w/M_n entre outros.

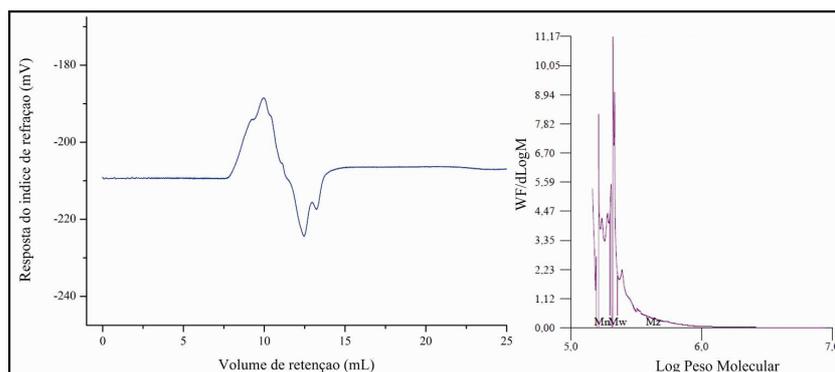


Figura 3.9 – Resultados obtidos da análise cromatográfica de GPC para amostra de PHBV. Resposta do índice de refração (mV) versus Volume de retenção (mL) e WF/dLogM versus Log do peso molecular.

O peso molecular absoluto das amostras foi determinado usando um cromatógrafo modelo Viscotek GPCmax VE2001 equipado com triplo detector consistindo de: detector de

índice de refração (RI), detector viscosimétrico e detector de espalhamento de luz (modulo 270 Dual Detector Viscotek).

A amostra de PHBV foi dissolvida em CHCl_3 padrão HPLC a uma concentração de $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em seguida injetadas ($200 \mu\text{m}$) e submetidas à separação em uma coluna Waters Styragel HR5E termostaticada a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e utilizado como fase móvel CHCl_3 sob fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Os resultados obtidos do sistema de multi-detectores para a caracterização do peso molecular da amostra em Daltons (Da) foram:

Tabela 3.1 – Peso molecular PHBV avaliado por GPC.

Mn	199.626 Da
Mw	228.515 Da
Mz	375.339 Da
Mw/Mn	1,145

4. EQUILÍBRIO DE FASES DOS SISTEMAS TERNÁRIOS CO₂ + SOLVENTE ORGÂNICO + (P4, AMP E PHBV)

Neste capítulo apresentamos o estudo do equilíbrio de fases para os sistemas CO₂ + diclorometano + AMP e referenciamos a partir da literatura os sistemas CO₂ + clorofórmio + PHBV (Pimentel, 2010) e CO₂ + diclorometano + PHBV (Franceschi, 2009). A aplicação de FSC como anti-solvente para precipitação de materiais sólidos como P4, AMP e PHBV é técnica atrativa considerando a baixa solubilidade destas substâncias em CO₂ supercrítico. Sendo assim, o conhecimento do comportamento de fases de um componente sólido em estado supercrítico torna-se aspecto crucial. Neste capítulo abordaremos dados experimentais de equilíbrio de fases para os sistemas ternários em diferentes concentrações de P4, AMP e PHBV em solvente orgânico em uma faixa de temperatura de 303 à 333K. Para todos os sistemas descritos foram observados transições de fases líquido-vapor (LV) do tipo ponto de bolha (PB) e ponto de orvalho (PO). Os dados experimentais foram obtidos usando o método estático sintético com o uso de uma célula de volume variável em diferentes frações de CO₂. Alguns dados foram correlacionados com dados obtidos usando a equação de estado de Peng-Robinson para o sistema de duas fases.

4.1. INTRODUÇÃO

A produção de partículas com tamanho e distribuição de tamanho controlado, com aplicações em diversas áreas, tem sido alvo de várias pesquisas para o desenvolvimento de NPs de compostos com vista a formulações de liberação controlada de princípios ativos com aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e veterinária (Yeo e Kiran, 2005). O tamanho da partícula é o fator chave para a performance no uso de diferentes materiais orgânicos e inorgânicos (Alessi *et al.*, 1996). O processo por FSC está se fundindo como importante alternativa para métodos convencionais em muitos campos, tais como extração, micronização de partículas, processamento de materiais, cromatografia ou cristalização/purificação (Elvassore e Bertucco, 2003). Equilíbrio e propriedades volumétricas de misturas binárias contendo solvente orgânico e FS, especialmente dióxido de carbono (CO₂), desempenham um papel fundamental na determinação do sucesso de muitas destas aplicações.

Em particular, equilíbrio líquido-vapor e densidade líquida são dados necessários para designar adequadamente o processo de precipitação/recristalização por gás antisolvente (Stievano e Elvassore, 2005). A grande vantagem do uso do FSC está na possibilidade da produção da fase sólida com morfologia única em condições suaves de operação. O CO₂ é um solvente interessante porque não é inflamável, barato, não tóxico e miscível com muitos solventes orgânicos. Recentemente se tem tido grande interesse no uso de CO₂ como um antisolvente para a cristalização de solutos dissolvidos. A escolha do solvente orgânico no processo antisolvente é fator importante no controle da solubilidade do soluto, morfologia e tamanho das partículas (Lazzaroni *et al.*, 2005). No entanto, para a correta aplicação do uso do CO₂ em estado de FS como antisolvente para obtenção de NPs, é necessário o conhecimento do comportamento de fases dos sistemas ternários CO₂ + solvente orgânico + (P4, AMP e PHBV). Portanto este trabalho apresenta um estudo realizado do comportamento de fases destes sistemas, em que foram identificadas transições de fases LV do tipo PB e PO com presença e ausência de sólidos em diferentes condições de pressão, temperatura e frações dos componentes do sistema.

4.2. PARTE EXPERIMENTAL

Os materiais que foram utilizados para obtenção destes dados experimentais encontram-se apresentados no Capítulo III. As propriedades dos componentes puros para o CO₂, AMP e diclorometano são apresentados na Tabela 4.1

Os dados experimentais de equilíbrio de fases foram conduzidos pelo método estático sintético e pode ser mais bem compreendido no trabalho de Giufrida *et al.*, 2010. O aparato experimental é composto de uma bomba volumétrica de alta-pressão do tipo seringa (ISCO 260D, Lincoln, USA), uma célula volumétrica de alta-pressão com janelas laterais e frontal de safira e volume interno de 27 cm³, controlador de pressão absoluto com precisão de 0,03 MPa (Smar LD 301, Sertãozinho, Brasil) e controlador de temperatura (COEL HW 1440). A célula de equilíbrio é composta por um pistão móvel que permite a oscilação da pressão do sistema que é controlada por uma bomba do tipo seringa (Figura 4.1). Primeiramente o soluto (P4, AMP e PHBV) foi solubilizado em solvente orgânico em concentração desejada (mg·cm⁻³). Inicialmente a quantidade desejada de solução contendo soluto + solvente orgânico foi pesada com o uso de uma balança analítica com escala de precisão (Marte AM-220, ± 0.0001 g, Santa Rita do Sapucaí, Brasil). A célula foi purgada com CO₂ para remoção do ar residual e posteriormente carregada com quantidade conhecida do composto. A carga de CO₂ desejada foi alimentada com

o uso da bomba seringa. Com condições determinadas de pressão e temperatura foi possível determinar a quantidade exata de CO_2 alimentado a partir de sua densidade. Esperou-se em torno de 30 min. para o sistema se estabilizar e iniciou-se a alimentação do FSC. Para obter os dados de equilíbrio do tipo LV foi fixada a temperatura e variou a pressão do sistema gradativamente até ocorrer transição de fase do tipo LV. As medidas de transição foram realizadas para as temperaturas de 303, 313, 323 e 333 K. O procedimento experimental foi repetido para outras condições constituídas de diferentes frações molares de CO_2 no sistema. Nas medidas de transições de fases foram observados transições do tipo PB e PO.

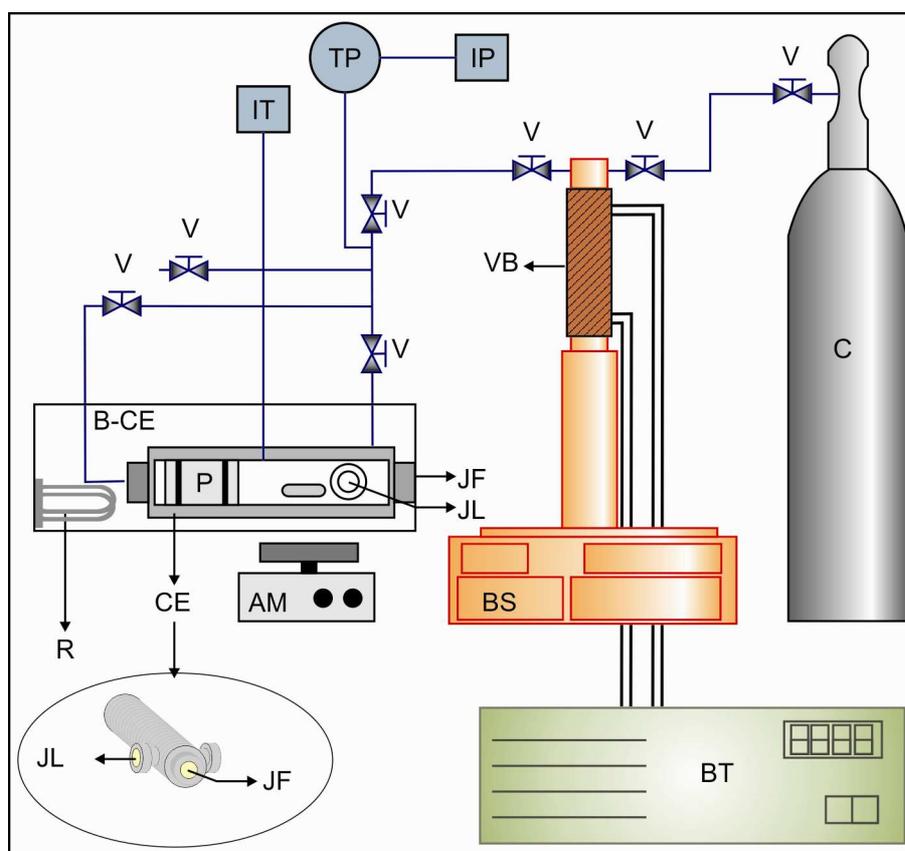


Figura 4.1 – Aparato experimental. BS – Bomba tipo seringa, C – Cilindro de CO_2 , VB – Vaso da bomba, V – Válvulas do tipo agulha, AM – Agitador magnético, CE – Célula de equilíbrio, JF – Janela frontal, JL – Janela lateral, R – Resistência elétrica, P – Pistão, B-CE – Banho da célula de equilíbrio, IT – Indicador de temperatura, TP – Transdutor de pressão, IP – Indicador de pressão, BT – Banho termostático.

Tabela 4.1 – Propriedades e características dos componentes puros.

Componente	T_c/K^a	P_c/MPa^a	$M_w(g.gmol^{-1})^a$	T_m/K^b	$T_f/(J/g)^c$
CO ₂	304,21	7,38	44,01	-	-
Diclorometano	510	6,08	84,93	-	-
AMP	851,0	1,316	386,5	480	87,38

^a. (DIPPR 801, 2003), ^b. TG – Cap. III, ^c. DSC – Cap. III.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para checar a confiança do aparato e procedimento experimental representado pela Figura 4.1, dados de equilíbrio de fases foram obtidos neste estudo para o sistema CO₂₍₁₎ + acetona₍₂₎ nas temperaturas de 303 e 313 K, em que são apresentados na Figura 4.2 e comparados com dados experimentais reportados da literatura de Chiehming *et al.*, 1998, Stievano e Elvassore, 2005 e Chiu *et al.*, 2008.

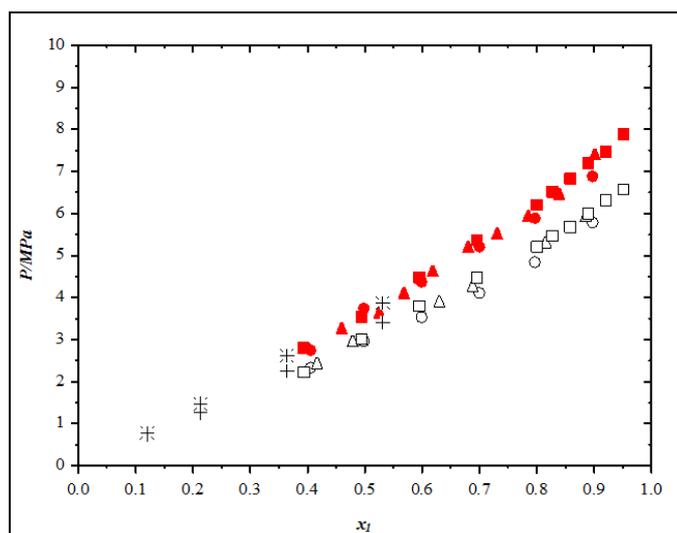


Figura 4.2 – Diagrama experimental da composição de pressão para o sistema CO₂₍₁₎ + acetona₍₂₎ sob condições de equilíbrio LV a 303 K. (○, este trabalho; △, CHIEHMING *et al.*, 1998; +, Stievano e Elvassore, 2005; □, Chiu *et al.*, 2008) e 313 K (●, este trabalho; ▲, Chiehming *et al.*, 1998; ※, Stievano e Elvassore, 2005; ■, Chiu *et al.*, 2008).

Pode-se observar que os dados obtidos neste trabalho estão em boa concordância com os dados presentes na literatura para as isotermas de 303 e 313 K.

4.3.1. SISTEMA CO₂₍₁₎ + DICLOROMETANO₍₂₎ + AMP₍₃₎

Durante a obtenção dos dados de equilíbrio de fases do sistema CO₂₍₁₎ + diclorometano₍₂₎ + AMP₍₃₎ foram preparadas duas soluções contendo 0,010 g·cm⁻³ e 0,020 g·cm⁻³ em uma base isenta de CO₂. A Tabela 4.2 representa os dados de equilíbrio de fases do tipo líquido-vapor para o sistema contendo uma concentração de 0,010 g·cm⁻³ e a Tabela 4.3 representa os dados para o sistema contendo uma concentração de 0,020 g·cm⁻³ de AMP em uma base isenta de CO₂.

Tabela 4.2 – Dados experimentais de transição do tipo líquido-vapor para o sistema CO₂₍₁₎ + diclorometano₍₂₎ + AMP₍₃₎ a uma concentração 0,010 g·cm⁻³ em uma base livre de CO₂.

<u>T</u> K	<u>P</u> MPa	<u>σ</u> ^a MPa	Tipo de transição	<u>T</u> K	<u>P</u> MPa	<u>σ</u> ^a MPa	Tipo de Transição
$x_l = 0,4309$				$x_l = 0,8527$			
303	3,01	0,15	PB-LV	303	5,36	0,30	PB-SLV
313	3,82	0,25	PB-LV	313	6,67	0,20	PB-SLV
323	4,63	0,20	PB-LV	323	7,91	0,10	PB-SLV
333	5,52	0,40	PB-LV	333	9,17	0,05	PB-SLV
$x_l = 0,5903$				$x_l = 0,9039$			
303	3,99	0,35	PB-LV	303	5,62	0,40	PB-SLV
313	4,89	0,05	PB-LV	313	7,03	0,10	PB-SLV
323	5,84	0,30	PB-LV	323	8,40	0,20	PB-SLV
333	6,76	0,15	PB-LV	333	9,58	0,20	PO-SLV
$x_l = 0,6875$				$x_l = 0,9513$			
303	4,56	0,50	PB-SLV	303	6,13	0,30	PB-SLV
313	5,44	0,10	PB-LV	313	7,49	0,15	PB-SLV
323	6,48	0,10	PB-LV	323	8,54	0,05	PB-SLV
333	7,63	0,05	PB-LV	333	9,44	0,20	PO-SLV
$x_l = 0,7770$							
303	4,96	0,10	PB-SLV				
313	6,02	0,10	PB-SLV				
323	7,28	0,10	PB-SLV				
333	8,59	0,10	PB-SLV				

^a – Desvio padrão experimental da pressão, LV – Líquido-vapor, SLV – Sólido-líquido-vapor.

A Figura 4.3 mostra o envelope de equilíbrio de fases construído a partir dos dados obtidos da Tabela 4.2 e Tabela 4.3. A maioria dos pontos experimentais obtidos em (a) foram do tipo PB e apenas nas frações de 0,9039 e 0,9513 e temperatura igual a 303 K foram obtidos pontos do tipo PO. Foi possível observar que na fração molar de CO₂ igual a 0,6875 ocorreu

formação de sólido de AMP para a temperatura igual a 303 K, e que nas demais temperatura referente a essa fração o AMP tornou-se novamente solúvel, e na fração molar igual a 0,7770 a 303 K ocorreu novamente formação de sólido. A partir deste ponto a presença de sólido se manteve para as demais temperaturas e frações molares. Os dados experimentais expressos nas tabelas seguem em termos de fração molar de CO₂ (x_1), valor da pressão de transição (P) e o erro experimental para cada composição representada pelo desvio padrão das medidas de pressão repetidas.

Tabela 4.3 – Dados experimentais de transição do tipo líquido-vapor para o sistema CO₂₍₁₎ + diclorometano₍₂₎ + AMP₍₃₎ a uma concentração 0,020 g.cm⁻³ em uma base livre de CO₂.

<u>T</u> K	<u>P</u> MPa	<u>σ</u> ^a MPa	Tipo de transição	<u>T</u> K	<u>P</u> MPa	<u>σ</u> ^a MPa	Tipo de transição
$x_1 = 0,4866$				$x_1 = 0,8623$			
303	3,41	0,15	PB-LV	303	5,56	0,15	PB-SLV
313	4,10	0,15	PB-LV	313	6,84	0,00	PB-SLV
323	4,91	0,10	PB-LV	323	8,15	0,25	PB-SLV
333	5,65	0,20	PB-LV	333	9,29	0,20	PB-SLV
$x_1 = 0,6122$				$x_1 = 0,9139$			
303	4,13	0,15	PB-LV	303	5,94	0,10	PB-SLV
313	5,03	0,10	PB-LV	313	7,39	0,10	PB-SLV
323	5,93	0,20	PB-LV	323	8,66	0,10	PB-SLV
333	6,88	0,35	PB-LV	333	9,43	0,10	PO-SLV
$x_1 = 0,7020$				$x_1 = 0,9599$			
303	4,74	0,10	PB-SLV	303	6,44	0,20	PB-SLV
313	5,73	0,10	PB-SLV	313	7,80	0,25	PB-SLV
323	6,85	0,20	PB-SLV	323	8,60	0,15	PO-SLV
333	7,89	0,25	PB-SLV				
$x_1 = 0,7858$							
303	5,20	0,50	PB-SLV				
313	6,32	0,30	PB-SLV				
323	7,52	0,20	PB-SLV				
333	8,65	0,15	PB-SLV				

^a – Desvio padrão experimental da pressão, LV – Líquido-vapor, SLV – Sólido-líquido-vapor.

Na Figura 4.3 (b) a maioria dos pontos experimentais obtidos foram do tipo PB e para as frações de 0,9139 e 0,9599 a temperatura igual a 303 K foram obtidos pontos do tipo PO. Notou-se também que ocorreu formação de sólido de AMP a partir da fração molar de CO₂ igual a 0,7020, e que a presença de sólido para este sistema se manteve para todas as demais temperaturas e frações do envelope de fases.

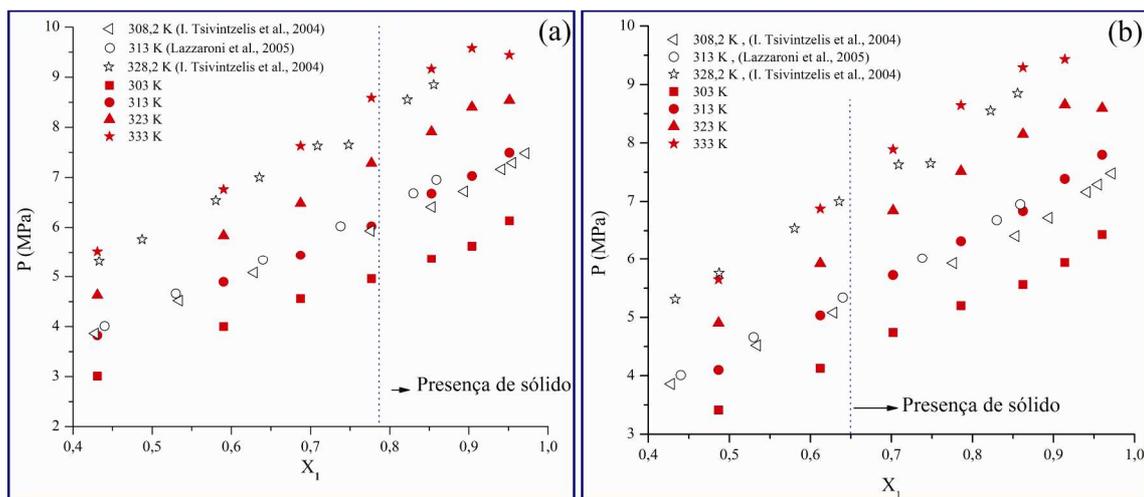


Figura 4.3 – Diagrama dos dados experimentais de transição do tipo LV para o sistema $\text{CO}_2(1) + \text{diclorometano}(2) + \text{AMP}(3)$ a uma concentração de (a) $0,010 \text{ g}\cdot\text{cm}^3$ e (b) $0,020 \text{ g}\cdot\text{cm}^3$ em uma base livre de CO_2 comparados com dados da literatura.

Tal comportamento pode ser observado pela linha tracejada em ambas as Figuras 4.3 (a) e (b), que indica a área do diagrama de fases que contém presença ou não de sólido. A diferença da posição da linha que identifica a presença de sólido em ambos os gráficos se dá devido à diferença de concentração de AMP no sistema, e a baixa solubilidade do AMP em CO_2 .

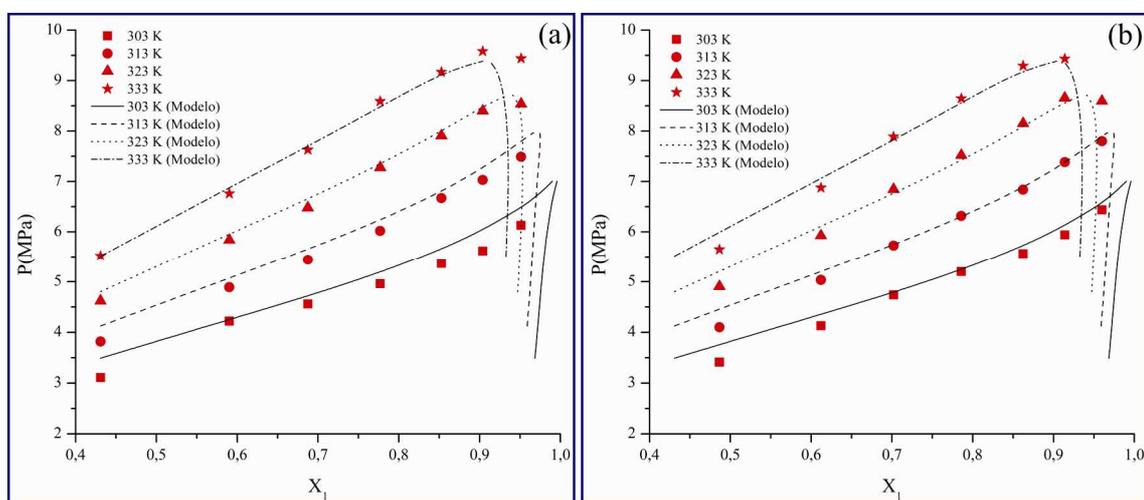


Figura 4.4 – Diagrama dos dados experimentais de transição do tipo LV para o sistema $\text{CO}_2(1) + \text{diclorometano}(2) + \text{AMP}(3)$ a uma concentração de (a) $0,010 \text{ g}\cdot\text{cm}^3$ e (b) $0,020 \text{ g}\cdot\text{cm}^3$ em uma base livre de CO_2 comparados com modelo termodinâmico.

Os resultados experimentais para o sistema $\text{CO}_2(1) + \text{diclorometano}(2) + \text{AMP}(3)$ foram correlatados usando a equação de estado de Peng-Robinson (Tsvintz *et al.*, 2004) com regras de

mistura quadrada para os parâmetros a e b (Reid *et al.*, 1987). Os parâmetros de interação de Peng-Robinson têm sido estimados usando a ferramenta “Solver” contido na planilha do Excel para Windows. Os coeficientes de fugacidade foram calculados com o XEOS Excel add-in (Castier, 2008). Como o AMP na mistura inicial encontra-se em quantidade consideravelmente inferior ao diclorometano, a mistura ternária foi feita como sistema pseudo binário. Neste caso foi desconsiderada a presença de AMP na mistura. O objetivo deste cálculo foi checar se este tipo de correlação simplificada pode reproduzir o comportamento da transição de fase para a mistura ternária. Os parâmetros de interação de Peng-Robinson para o sistema pseudo binário estão presentes na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Parâmetros de interação de Peng-Robinson

System	k_{ij}	l_{ij}
CO ₂ (₁) + dichloromethane(₂)	0.0295	-0.0661

A Figura 4.4 (a) e (b) compara os valores de equilíbrio de fases obtidos de forma experimental e calculados para o sistema pseudo binário formado por CO₂(₁) + diclorometano(₂) + AMP(₃) a concentrações de (0,010 g·cm⁻³ e 0,020 g·cm⁻³) e mostram que o modelo termodinâmico pode representar os resultados experimentais muito bem. No entanto, esta estratégia de cálculo termodinâmico foi usada somente para verificar uma correlação simplificada que pode reproduzir o comportamento do sistema ternário sob condições similares aos estudos neste trabalho. Em sistemas com alta concentração de soluto, esta abordagem torna-se insuficiente para cálculo do comportamento do equilíbrio de fase.

4.3.2. SISTEMA CO₂(₁) + CLOROFÓRMIO(₂) + PHBV(₃)

O estudo deste sistema foi conduzido por meio de dados extraídos da literatura de Pimentel, 2010. Como o sistema foi bem explorado no trabalho de Pimentel, 2010, não se viu a necessidade de obter novos dados de transições de fases para o sistema ternário CO₂(₁) + clorofórmio(₂) + PHBV(₃). Pimentel, 2010, conduziu os experimentos com o preparo de duas soluções contendo diferentes concentrações de PHBV em função do solvente orgânico (0,010 e 0,020 g·cm⁻³). Para a solução contendo a concentração de 0,010 g·cm⁻³ de massa em função do solvente orgânico foram obtidas transições de fases do tipo LV em uma faixa de fração molar de CO₂ entre 0,4746 e 0,9499, e pressões de transição que variarão entre 3,57 a 9,53 MPa.

De modo semelhante ocorreu nos experimentos contendo uma concentração de $0,020 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ de massa do polímero em função do solvente orgânico. Os dados de equilíbrio de fases do tipo LV foram obtidos nas frações molares de CO_2 entre 0,5012 a 0,9229 e pressões de transição que variaram entre 3,74 a 9,67 MPa. Para os dois sistemas foram obtidos dados de transições de fases nas temperaturas entre 303 a 333 K. Os resultados são abordados com base na Figura 4.5 (Pimentel, 2010), que mostra a formação parcial de um envelope de fase obtido pela pressão [P(MPa)] em função da fração molar do componente 1 (X_1).

Os dados obtidos neste sistema são em maioria do tipo PB e apenas na fração 0,9499 em relação do componente (1) e temperaturas de 323 e 333 K foram identificados transições do tipo PO. Nota-se a presença da formação de orvalho próximo ao fechamento do envelope de fases. De acordo como o diagrama (Figura 4.5.(a)) ocorreu formação de sólido na região entre as frações molares de 0,5940 e 0,6896 (x_I) devido o poder de antisolvente do CO_2 nestas condições de proporção do componente, e para o sistema de concentração de PHBV igual a $0,020 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ as transições foram semelhantes ao sistema de menor concentração, e se pode notar que ocorreram transições LV do tipo PB para em todas as frações molares exploradas, ou seja, até a fração de 0,9229 (x_I). O fator de miscibilidade entre os componentes também se mostrou presente nestes resultados, sendo possível notar que ocorre formação de sólido entre as frações molares 0,6141 e 0,7063 (x_I), e que nas frações molares posteriores a formações de sólidos ganhou proporção relativa ao aumento da quantidade de CO_2 presente no sistema. A linha tracejada que aparece em (a) e (b) da Figura 4.5 indica a região em que aparece sólido em meio às transições de fases.

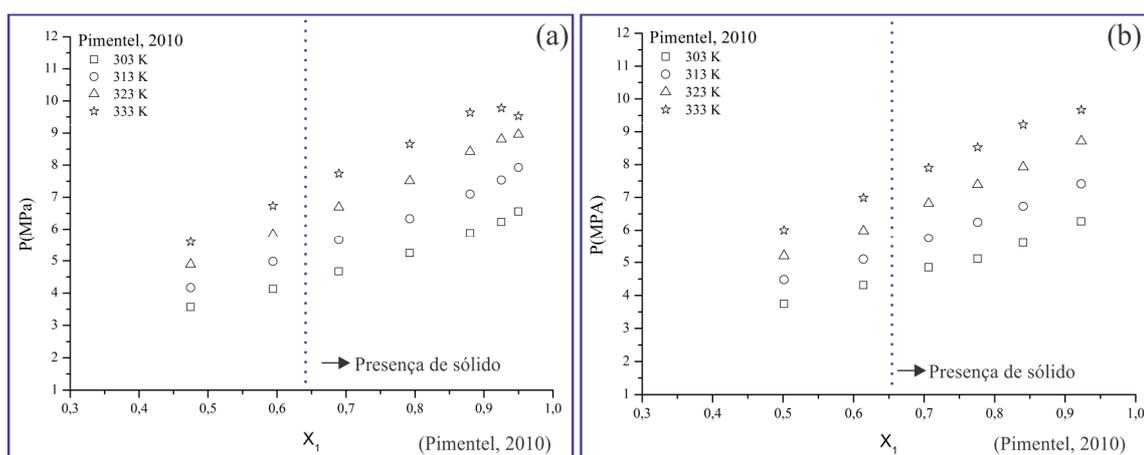


Figura 4.5 – Diagrama dos dados de transição do tipo LV para o sistema $\text{CO}_{2(1)} + \text{clorofórmio}_{(2)} + \text{PHBV}_{(3)}$ obtidos por Pimentel, 2010, (a) $0,010 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ e (b) $0,020 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ em uma base livre de CO_2 .

Foi possível observar no sistema obtido por Pimentel, 2010, que a diferença de concentração do PHBV contida no clorofórmio, pouco alterou a tendência das pressões de transição de fases.

As regiões identificadas com início de formação de sólido e os pontos críticos da misturas no diagrama de fases são favoráveis para determinar o tipo de fase presente durante a mistura do sistema solvente-cosolvente (CO_2 + clorofórmio), sendo estas condições ideais para precipitação do soluto e remoção do solvente orgânico, principalmente para misturas não azeotrópicas.

4.3.3. SISTEMA $\text{CO}_{2(1)}$ + DICLOROMETANO $_{(2)}$ + PHBV $_{(3)}$

A abordagem deste sistema será conduzida apenas com base em dados da literatura, considerando que este sistema já foi explorado por Franceschi, 2009, e seus resultados mostraram grande eficiência para o conhecimento do comportamento de fases para o sistema ternário envolvendo $\text{CO}_{2(1)}$ + Diclorometano $_{(2)}$ + PHBV $_{(3)}$. Sendo assim, iremos citar os resultados obtidos no trabalho de Franceschi, 2009, com o intuito de extrair as melhores condições para a produção de M-NPs utilizando os conceitos de precipitação do soluto e extração solvente orgânico na presença de CO_2 como FSC, considerando o potencial do mesmo como antisolvente (componente (3)) e solvente (componente (2)) ao mesmo tempo.

Franceschi, 2009, obteve dados de equilíbrio de fases do tipo LV para este sistema conduzindo os experimentos em dois sistemas o qual diferenciam apenas as concentrações de PHBV em termos mássico em função do solvente orgânico em uma base isente de CO_2 . Desta forma, a Figura 4.6 (a) apresenta dados obtidos de um sistema ternário contendo uma concentração de $0,010 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ de soluto por solvente orgânico e a Figura 3.6 (b) apresenta dados obtidos para o mesmo sistema porém, contendo uma concentração de $0,040 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ de massa do soluto em função apenas do solvente orgânico.

Os dados apresentados na Figura 4.6 (a) foram obtidos em uma faixa de fração molar em relação ao componente um (x_1) entre 0,326 e 0,946, pressões de 2,8 a 9,2 MPa a uma faixa de temperatura de 303, 313, 323 e 333 K, sendo identificados os pontos de transição do tipo PB para a maioria dos pontos obtidos e PO apenas na fração de 0,946 (x_1) a uma temperatura de 313 K. Franceschi, 2009 notou que ocorreu início da formação de sólido a partir da fração molar (x_1) igual a 0,602 e manteve para as demais frações do sistema. Para a Figura 4.6 (b), os dados foram obtidos em frações que variaram de 0,180 a 0,946 molar (x_1), pressões entre 1,9 a 9,1 MPa e temperaturas de 303, 313, 323 e 333 K. Neste caso a maioria dos pontos também foram

transições do tipo PB e apenas na fração (x_1) igual a 0,946 a uma temperatura de 323 K foi obtido transição de fase do tipo PO. Franceschi, 2009 também notou que em condições deste sistema ocorreu formação de sólido a partir da fração (x_1) igual a 0,564, e que como na figura (a) a presença de sólido também se manteve para as demais frações do sistema.

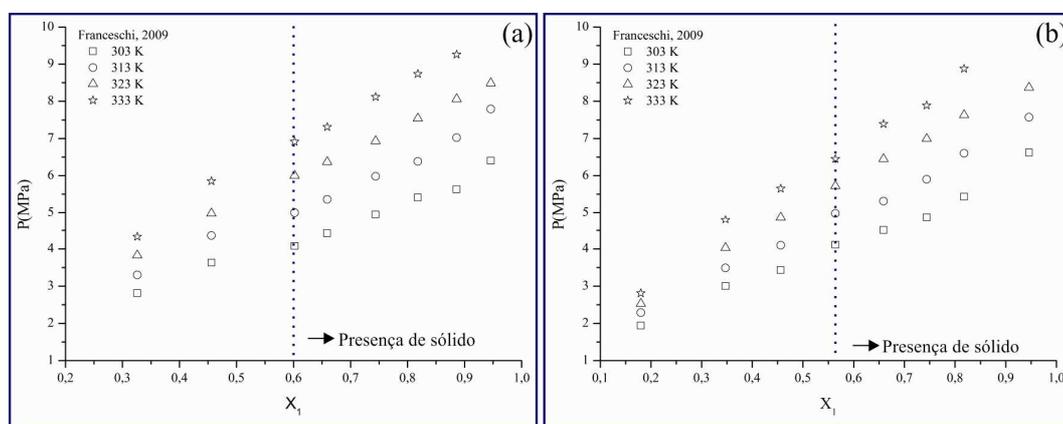


Figura 4.6 – Diagrama de fases do sistema ternário $\text{CO}_{2(1)} + \text{Diclorometano}_{(2)} + \text{PHBV}_{(3)}$ construído com dados de equilíbrio LV extraídos da literatura de Franceschi, 2009.

A análise destes resultados mostra que a mudança na concentração do soluto pouco influenciou na região de formação de sólido assim como no sistema $\text{CO}_2 + \text{clorofórmio} + \text{PHBV}$. Esta ocorrência será discutida nos capítulos posteriores quando estas condições serão aplicadas para a produção de partículas poliméricas a partir de fluido supercrítico.

4.4. CONCLUSÕES

O estudo do equilíbrio de fases para os sistemas abordados neste capítulo é de grande importância para a determinação de condições ideais ou muito próximas para a obtenção de sistemas matriciais envolvendo técnicas de precipitação e/ou expansão de materiais seguidos de extração do solvente orgânico por CO_2SC e separação de fases. As observações consideradas para o sistema envolvendo $\text{CO}_{2(1)} + \text{diclorometano}_{(2)} + \text{AMP}_{(3)}$ indica que as concentrações de CO_2 e AMP, assim como a temperatura do sistema, são os principais fatores que determinam a região onde ocorre o aparecimento de uma fase sólida. As regiões de separação de fases do tipo líquido-vapor são influenciadas pela temperatura e pressão do sistema, assim como da fração molar de CO_2 . Entretanto, a concentração de AMP não mostrou influência significativa neste aspecto. De modo similar ocorre para os sistemas abordados de literatura de Franceschi, 2009 e

Pimentel, 2010, para os sistemas envolvendo $\text{CO}_{2(1)} + \text{clorofórmio}_{(2)} + \text{PHBV}_{(3)}$ e $\text{CO}_{2(1)} + \text{Diclorometano}_{(2)} + \text{PHBV}_{(3)}$, onde a região de precipitação em termos de razões de proporção entre os componentes do sistema, praticamente não se altera em função da modificação da quantidade de soluto no sistema.

Os resultados obtidos neste Capítulo mostram que os sistemas ternários estudados podem ser utilizados em técnicas que empregam o CO_2 em condições supercríticas como anti-solvente para a produção de M-NPs, sejam por processo de expansão de materiais ou por extração do solvente de um sistema.

No capítulo seguinte será abordada uma técnica utilizando CO_2SC como antisolvente em que os princípios e conhecimentos do comportamento de fases para sistemas ternários envolvendo CO_2 serão aplicados.

5. PRODUÇÃO DE M-NPs DE PHBV USANDO MÉTODO SUPERCRÍTICO ANTI-SOLVENTE (SAS).

Neste Capítulo será reportado um método para a produção de M-NPs de PHBV impregnadas com progesterona. As partículas de PHBV foram obtidas a partir do método SAS usando CO₂ como anti-solvente supercrítico. Este sistema de expansão baseia-se em conceitos fundamentais e condições em termos de pressão, temperatura e razões molares específicas do comportamento de fases para sistemas envolvendo CO₂, soluto e solvente. Por isso realizamos uma abordagem teórica e experimental como base introdutória a este capítulo.

5.1. INTRODUÇÃO

A liberação de componentes bioativos a partir de NPs é de grande interesse para o tratamento de várias doenças incluindo, câncer, tuberculose, fibrose cística e diabetes (Hans e Lowman, 2007). NPs possibilitam que haja uma liberação controlada e direcionada de componentes, o qual depende da seleção apropriada da química do polímero, modificação da superfície das partículas com ligações específicas, tamanho e polidispersidade das partículas (Yeo e Kiran, 2005). A produção de partículas com tamanho controlado e distribuição de tamanho controlado tem sido o objetivo de grandes pesquisas (Nakamura *et al.*, 2010; Zielińska *et al.*, 2009; Hogan Jr. *et al.*, 2007), o que inclui estudos de desenvolvimento de NPs a partir de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis (Lu e Chen, 2004).

As técnicas tradicionais para a produção de NPs apresentam algumas limitações no qual inclui excesso do uso de solvente, grande concentração residual no final do produto, sólido químico e degradação térmica, dificuldades no controle de tamanho e distribuição de tamanho durante o processo, e baixa eficiência do encapsulamento (Elvassore *et al.*, 2003). Por outro lado, processos que empregam FSC podem promover M-NPs com uma distribuição de tamanho estreita além de uma boa eficiência de encapsulamento. Além disso, outras vantagens podem ser observadas dependendo da escolha da configuração do processo: alta purificação dos produtos, polimorfismo dos cristais, possibilidade de processamento de moléculas termo-sensíveis, processo em único estágio, e é uma tecnologia ambientalmente aceitável (Fages *et al.*, 2004).

Existem vários componentes que podem ser usados como FSC, no entanto, para o ponto de vista farmacêutico e indústria alimentícia, o mais interessante e mais usado como FSC é o CO₂. Isto é por possuir características favoráveis como: não tóxico, não reativo, não inflamável, barato e ambientalmente menos prejudicial que os solventes orgânicos convencionais (Nalawade *et al.*, 2006).

A tecnologia de FSC tem apresentado aplicações em diferentes áreas, como indústrias de separação de alimentos, de processos químicos, de polímeros farmacêuticos e biodegradáveis, indústria têxtil entre outras. No período da década de 80, muitas aplicações industriais com fluidos supercríticos foram estudadas, incluindo a purificação de surfactantes e produtos farmacêuticos, fracionamento de materiais poliméricos e reações químicas e de polimerização. Neste mesmo período o interesse no uso de fluidos supercríticos para processos de precipitação e cristalização de materiais farmacêuticos teve início, e essa atividade tem aumentado constantemente nos últimos anos.

Os fluídos supercríticos são extremamente usados no desenvolvimento de formulações estáveis de proteínas. Fluídos supercríticos oferecem alternativas viáveis para processos envolvendo peptídeos e proteínas sem afetar a atividade farmacológica dos mesmos. Desta forma muitas aplicações de tecnologias de fluidos supercríticos na indústria farmacêutica têm expandido como extração por FSC, reações químicas, cromatografia por fluidos supercríticos, fracionamento por fluidos supercríticos, processos poliméricos, formação, encapsulamento e revestimento de partículas.

Hoje o processamento de partículas é um dos maiores desenvolvimentos da aplicação do FSC em áreas industriais como química, farmacêutica, cosmético, e indústrias alimentícias, especialmente na pesquisa farmacêutica (Y. Kang *et al.*, 2008).

5.1.1. CROMATOGRAFIA POR FLUIDO SUPERCRÍTICO (CFS).

A CFS é uma das áreas mais bem sucedidas dentre os fluidos supercríticos e tornou-se uma técnica analítica comumente usada para a separação e análise de moléculas de fármacos. CFS pode ser usado para a separação do extrato a alta pressão ou para limpeza de misturas de produtos de reações. Também é possível concentrar um extrato pela remoção de impurezas ou subprodutos indesejáveis.

O desenvolvimento industrial está restrito a purificação de ácidos graxos poliinsaturados e enantiômeros. CFS é um processo tecnicamente viável para purificar um polipeptídeo de outros peptídeos e de outros componentes obtidos a partir de fermentação.

Exemplo ciclosporina A que pode ser separado do extrato micelial por CFS e purificado por cristalização subsequente para atender as especificações de pureza da Farmacopéia USP. Uma planta em escala industrial de CFS para a produção de até 1000 kg/ano de ciclosporina A purificada foi construído e testado com sucesso. Também FFS (fracionamento por fluido supercrítico) com CFS são acoplados com sucesso para atingir até 50% de concentrado enriquecido nutracêuticos contendo esterolester e fosfolipídios (Sinha *et al.*, 2004).

5.1.2. FRACIONAMENTO POR FSC.

Aplicação industriais com FFS são projetados para obter uma operação contínua: fracionamento de polímeros como lubrificantes e farmacêuticos especiais, produção de aromas por fermentação e bebidas destiladas, ácidos graxos poliinsaturados, compostos ativos de caldo de fermentação, etc. Vários aplicativos acoplados SFE/SFF para a preparação de fitos-fármacos e de especiarias e a extração de aromas no local de grandes produções agrícolas são construídos.

5.1.3. FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS EMPREGANDO FLUIDOS SUPERCRÍTICOS COMO SOLVENTES.

Esta técnica envolve a precipitação do soluto presente em uma solução supercrítica homogênea pela rápida expansão desta para condições ambientes de temperatura e pressão. Esta técnica é chamada de Rápida Expansão de Soluções Supercríticas (RESS) e, segundo Jung e Perrut *apout*, (Joung *et al.*, 2001), o trabalho pioneiro utilizando esta técnica foi realizado por Krukonis em 1984, *apout* (Franceschi, 2009), na recristalização de beta-estradiol, ferroceno e dodecanolactam entre outros.

A expansão de soluções supercríticas leva à perda do poder solvente do FSC e, conseqüentemente, à precipitação do soluto. Rápidas expansões, da ordem de 10⁻⁵ s, podem ser alcançadas em bocais e capilares, levando a altas super saturações e conseqüentemente a minúsculas partículas. Ressalta-se também que a redução da pressão é uma perturbação mecânica que ocorre na velocidade do som, favorecendo a rápida obtenção de condições uniformes no fluido em expansão. Esta combinação de elevadas supersaturações e condições uniformes do meio em nucleação é uma característica peculiar do processo RESS, que pode, em princípio, ser designado para produzir partículas minúsculas e monodispersas com estreita distribuição de tamanhos (Yeo *et al.*, 1993). A morfologia do material sólido resultante, cristalina ou amorfa, depende da estrutura química do material e dos parâmetros do processo de

RESS, como temperatura, queda de pressão, geometria e dimensões do bocal, concentração da solução entre outros (Franceschi, 2009).

A Figura 5.1 ilustra o diagrama esquemático da técnica RESS, em que o composto sólido é solubilizado em um FSC em um vaso de extração a temperatura e pressão pré-determinadas, logo após esta solução é despressurizada ou expandida rapidamente a condições ambientes no vaso de expansão por intermédio de um bocal, causando rápida e uniforme nucleação do material sólido e, como consequência produzindo partículas de tamanho microscópico com estreita distribuição de tamanho (Franceschi, 2009).

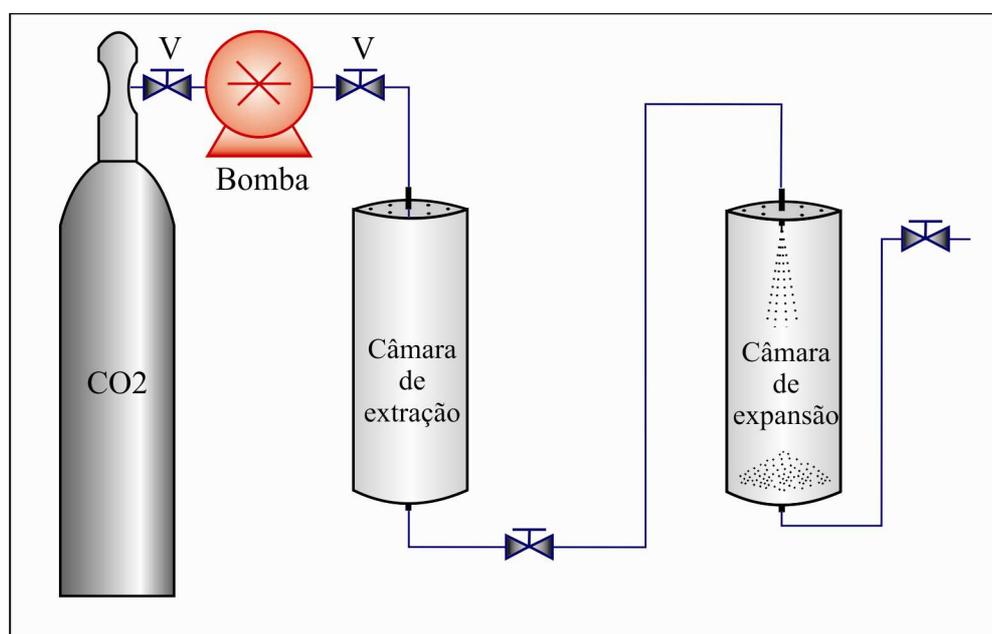


Figura 5.1 – Diagrama esquemático da técnica RESS (Franceschi, 2009).

A linha que vai da câmara de extração até a entrada da câmara de expansão é chamada de dispositivo de pré-expansão. Tal dispositivo normalmente é um tubo espiral, possuindo as mesmas dimensões das demais linhas. Este dispositivo é usualmente mantido a aproximadamente 50 °C (323 K) acima da temperatura da câmara de extração pelo uso de uma fita de aquecimento ou por um banho termostático ou forno evitando assim precipitações prematuras do soluto nas linhas (Joung *et al.*, 2001).

Na câmara de expansão, a solução é expandida por meio de um dispositivo de restrição de fluxo. Este dispositivo limita o crescimento das partículas após o processo de nucleação afetando a dinâmica da expansão do jato. O efeito Joule-Thompson, resultante da grande expansão volumétrica na saída do dispositivo de restrição, causa uma queda na temperatura, podendo até levar ao congelamento do solvente e o consequente entupimento do dispositivo.

Durante o projeto deste processo, é necessário que se tenha o melhor entendimento possível com relação ao que ocorre antes do bocal, isto é, durante o passo de extração. Conseqüentemente, é importante tanto coletar dados de equilíbrio da literatura quando estão disponíveis, ou realizar experimentos acerca da solubilidade do(s) soluto(s) no FSC (Joung *et al.*, 2001).

Infelizmente, muitos compostos polares ou de alto peso molecular, como é o caso dos polímeros, possuem solubilidade extremamente baixa em fluidos supercríticos comumente empregados na literatura, especialmente em CO₂. Isto faz com que a técnica RESS possua algumas limitações, tais como, a alta faixa de pressão necessária para obter solubilidades adequadas, o alto fluxo do fluido e o modo de operação do processo que é feito de forma descontínua em muitos casos.

Como regra geral, no entanto, se o soluto possuir uma solubilidade significativa no FSC, a técnica RESS poderá ser a primeira escolha para a obtenção de partículas devido a sua simplicidade (Shariati e Peters, 2003).

5.1.4. FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS EMPREGANDO FLUIDOS SUPERCRÍTICOS COMO ANTI-SOLVENTE.

Esta categoria utiliza fluidos pressurizados ou supercríticos como anti-solventes, causando a precipitação do(s) substrato(s) dissolvido(s) inicialmente em uma solução orgânica. Esta categoria é empregada para compostos que são praticamente insolúveis em fluidos supercríticos. Diferentes siglas são utilizadas pela literatura para esta categoria, tais como GAS, SAS, PCA, SEDS e ASES. Porém, a principal diferença entre estes processos é a maneira como ocorre o contato entre a solução orgânica e o anti-solvente comprimido.

O princípio básico das técnicas anti-solvente reside no fato que o soluto seja completamente miscível no solvente orgânico e imiscível ou muito pouco miscível no antisolvente e, ainda, que o solvente orgânico possua uma afinidade maior pelo anti-solvente do que pelo soluto. Desta forma, quando a solução contendo o soluto é posta em contato com o anti-solvente, a solubilidade do soluto no solvente orgânico é drasticamente reduzida, devido ao anti-solvente causar um decréscimo no poder de solvatação do solvente orgânico, levando à precipitação do soluto na forma particulada.

A técnica de precipitação GAS (Gás Anti-Solvente) foi o primeiro método descrito empregando anti-solvente pressurizado. Este método demonstrara que a taxa de adição de um gás anti-solvente pode ser programada para controlar a morfologia, tamanho e distribuição de

tamanho dos cristais sob uma ampla faixa. Estes autores aplicaram esta propriedade para recrystalizar explosivos de difícil cominuição. A Figura 5.2 apresenta um diagrama esquemático da técnica GAS (Franceschi, 2009).

Nesta técnica a solução é introduzida em uma câmara, normalmente de aço inox, com temperatura controlada. Então, o anti-solvente é adicionado ou borbuhlado pelo fundo da câmara através de um filtro dispersor a uma taxa constante pré-determinada e na temperatura em que a operação é realizada.

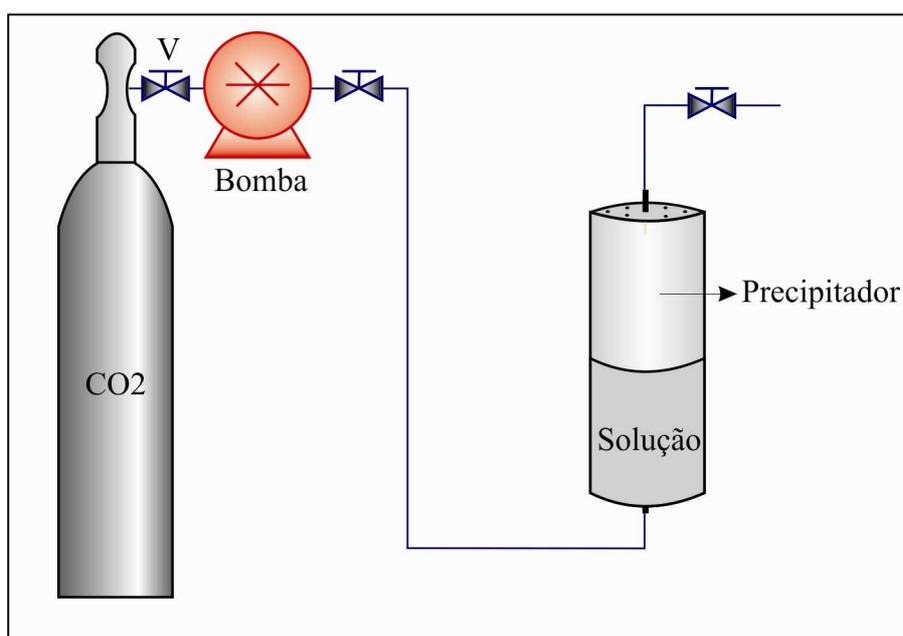


Figura 5.2 – Diagrama esquemático da técnica GAS (Joung *et al.*, 2001).

O anti-solvente é introduzido até que a pressão alcance o valor final pré-definido causando a expansão da solução líquida. A partir daí, uma válvula de saída é aberta e antisolvente puro é adicionado com o objetivo de retirar todo o solvente orgânico de dentro da câmara de precipitação. Nesta etapa, a pressão e a temperatura são mantidas constantes. O último passo é a despressurização da câmara e a coleta do material precipitado (Joung *et al.*, 2001) Nesta técnica as características das partículas precipitadas, sejam elas puras ou encapsuladas, podem ser ajustadas pela temperatura, pressão, taxa de adição do anti-solvente e, em alguns casos, pela agitação mecânica realizada na câmara de precipitação no sentido de aumentar o contato do anti-solvente com a solução.

Neste trabalho, para fins de diferenciação, nos referimos à técnica SAS quando o anti-solvente estiver em estado supercrítico e ASES quando estiver em estado subcrítico. Nestes modos de processo, a solução e o anti-solvente são adicionados simultaneamente em modo co-

corrente por orifícios diferentes ou contracorrente para dentro da câmara de precipitação, a qual já contém o anti-solvente. O mecanismo de contato entre o anti-solvente e a solução é diferente, comparado com o método GAS.

Quando a solução é aspergida no meio contendo o anti-solvente, ocorre a geração de micro gotas desta, gerando um rápido contato entre os meios, levando a uma alta taxa de supersaturação da solução. Este resultado gera uma rápida nucleação e crescimento, criando conseqüentemente, minúsculas partículas. Para que ocorra a formação de micro gotas, a solução normalmente é aspergida a uma pressão em torno de 20 bar (2,0 MPa) superior à pressão de operação da câmara (Franceschi, 2009). A Figura 5.3 mostra um diagrama esquemático da técnica SAS.

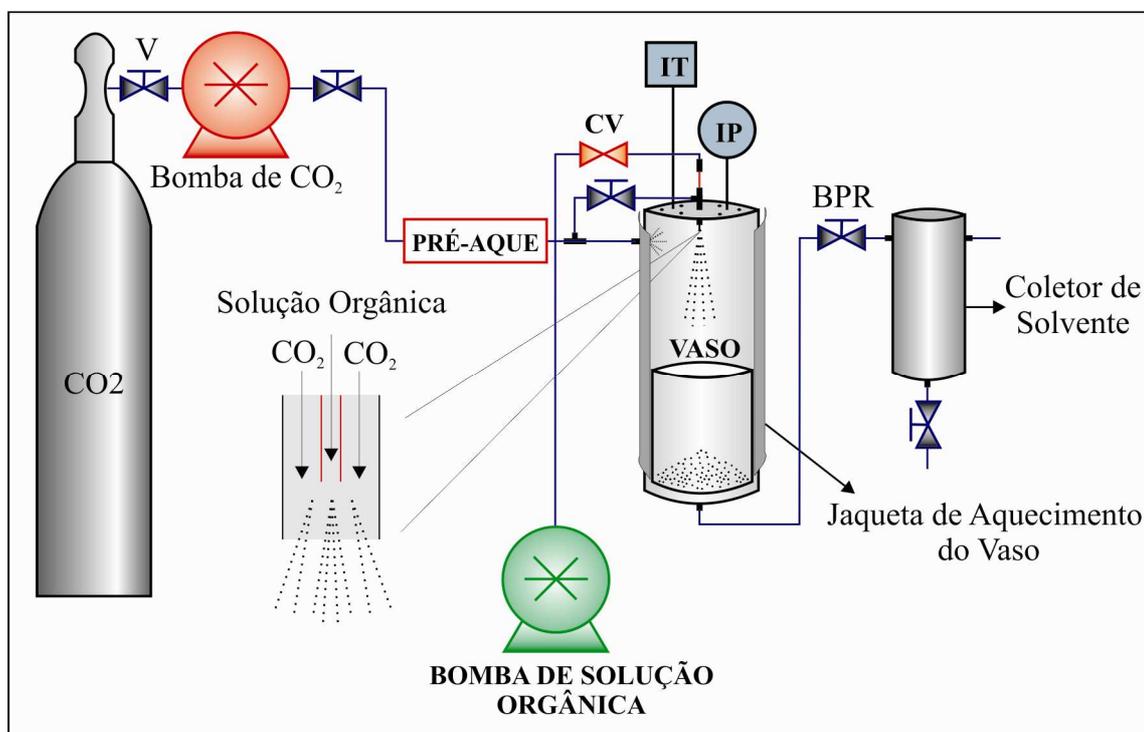


Figura 5.3 – Esquema do aparato experimental de produção de partículas por FSC como antisolvente (SAS) ou ASES. (Joung *et al.*, 2001)

5.2. PARTE EXPERIMENTAL

5.2.1. PRODUÇÃO DE M-NPs DE PHBV

Para produção de M-NPs de PHBV foi utilizado equipamento Super Particle SAS Modelo 200 (THAR®) (Figura 5.4). O equipamento consiste em duas bombas de alta pressão, sendo uma bomba de fluxo contínuo (THAR, modelo P-350) para alimentação do anti-solvente (CO₂) e pressurização do sistema, e uma bomba para líquidos também de fluxo contínuo (THAR, modelo P-50) para alimentação da solução orgânica. Uma câmara de expansão com sistema de aquecimento interno e externo e duas válvulas de controle de pressão do tipo BPR (Back Pressure Regulator), sendo uma (manual - SWAGELOK, modelo KPB1 S0A415P20000) para o controle de pressão de entrada da solução orgânica e outra (eletrônica - THAR, modelo ABPR-200) para controle de pressão de saída do anti-solvente após passagem pelo sistema de expansão. Um banho termostático (JULABO, modelo F-25) localizado antes da bomba do antisolvente para liquefazer o gás e um trocador de calor (THAR, modelo HE) é localizado após a bomba de anti-solvente para expansão do gás e melhor eficiência de pressão. O sistema foi monitorado por um medidor de fluxo de massa (SIEMENS, modelo MSS6000), e um computador com software disponibilizado pela THAR® para monitoramento e controle de pressurização, aquecimento, alimentação e fluxo do sistema.



Figura 5.4 – Imagem real do aparato experimental SAS – THAR.

O sistema de entrada e alimentação dos componentes no vaso de expansão é composto por um conjunto capilar/pick-tubo com diâmetro interno reduzido de 180 μm , e operado em

modo contínuo co-corrente com uma pequena mudança no sistema de alimentação do CO₂ com o propósito de aumentar a turbulência no interior da câmara de expansão como pode ser observado no esquema da Figura 5.3. Este aparato consiste de um sistema de precipitação no qual o anti-solvente e a solução orgânica são inseridos no topo da câmara de expansão em que o soluto formado é armazenado em um copo coletor e os demais compostos são descarregados por uma saída localizada no fundo do vaso. A expansão ocorreu em uma câmara de expansão com volume interno de 2 litros composta por um sistema de aquecimento elétrico para manter a temperatura interna controlada durante toda reação. O interior da câmara de expansão é composta por um vaso coletor que possui no fundo um filtro de aço sinterizado com a função de permitir apenas a passagem do solvente e anti-solvente e reter o soluto expandido. A mistura de compostos que saem da câmara de expansão são direcionados para um vaso coletor de volume interno igual a 500 mL e mantidos a uma pressão controlada de 10 bar (1,0 MPa) com o uso de uma válvula manual reguladora de pressão (GO, modelo BP3-1A11B5I111). As condições de operação utilizadas no sistema de expansão são apresentadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Condições operacionais utilizadas no sistema SAS para produção de NPs de PHBV.

Condições operacionais	Valores
Pressão da câmara de expansão	85 bar (8,5 MPa)
Concentração da solução orgânica	10 mg/mL
Fluxo de alimentação da solução (PHBV + CHCl ₃)	5 mL/min
Fluxo de CO ₂	80 g/mL
Temperatura do vaso de expansão	313 K

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS M-NPs DE PHBV.

As M-NPs de PHBV obtidas via SAS foram caracterizadas por microscopia eletrônica por varredura (MEV). Para melhor dispersão e visualização das partículas, as M-NPs foram dispersas em água destilada e posteriormente depositadas em uma lamínula de vidro. Esperou-se um intervalo de 18 horas para que a água fosse totalmente evaporada restando sobre a lamínula

apenas M-NPs dispersas. Para o processo de MEV as amostras foram metalizadas com ouro por um intervalo de 15 min sob uma corrente de ionização ~ 7 mA e um vácuo de 10 Pa. As amostras foram capturadas com uso do software SS550 fornecido pela SHIMADZU e posteriormente analisadas com software ImajeJ 1.44p (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA).

As imagens obtidas mostraram (Figura 2.4) M-NPs de PHBV com um diâmetro médio de $916,26 \pm 374,72$ nm, cerca de 500 partículas foram analisadas em termos de tamanhos com o uso do software ImageJ e a distribuição de tamanho analisada e ajustada no gráfico pelo método de Gauss (Figura 5.5). Podem-se observar algumas formações de aglomerados ou ligações entre partículas que se originaram durante o processo de remoção do solvente orgânico ainda no interior da câmara de expansão.

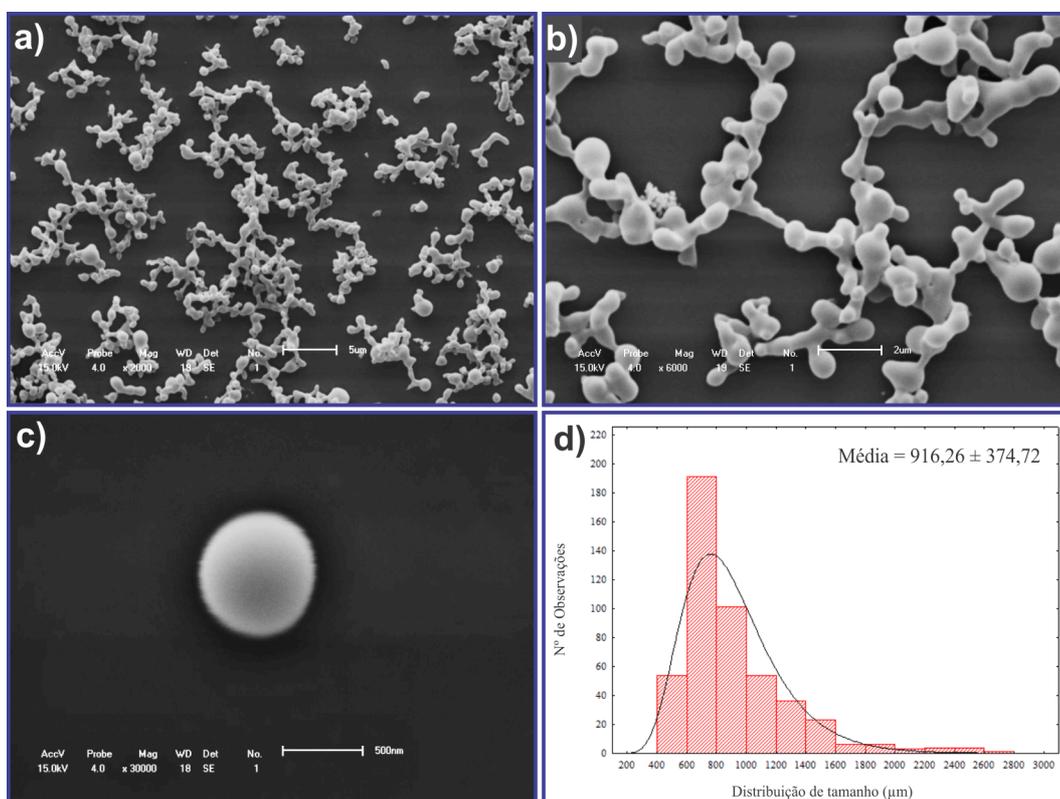


Figura 5.5 – Imagens obtidas por MEV das M-NPs de PHBV com Magnitude de: a) x 2.000; b) x 6.000; c) x 30.000, e d) Distribuição de tamanho das M-NPs e tamanho médio.

A produção de partículas utilizando a técnica convencional do SAS neste capítulo foi aplicada utilizando apenas uma condição, apresentada na tabela 5.1, considerando que diferentes condições para este sistema já foram bastante exploradas em trabalhos de diversos autores como: Pimentel, 2010 e Franceschi, 2009.

Pimentel, 2010, obteve partículas de PHBV pelo método SAS na ordem entre 1 a 3 μm , e Franceschi, 2009, em diversas condições obteve partículas em que o diâmetro médio variou de 0,278 a 89 μm .

5.4. CONCLUSÕES

Nesta segunda parte experimental foi apresentado um método para produção de partículas de PHBV no qual foi utilizada a técnica SAS e o CO_2SC como anti-sonvente. O estudo abordado promoveu a produção de partículas na ordem de micro e nanômetros com tamanho médio de $916,26 \pm 374,72$ nm. Pôde ser observado a presença de aglomerados que podem ter surgido em decorrência da ausência ou mínima característica tensoativa do CO_2SC . Esta ocorrência faz com que a forma esférica das gotículas se modifique ou coalescem umas nas outras durante o tempo de remoção do solvente orgânico por meio do CO_2SC . Tais resultados indicaram a necessidade de novos estudos em função de melhor dispersão das partículas após remoção do solvente orgânico e processo de secagem. Portanto os próximos capítulos são destinados ao estudo de técnicas que promovam a obtenção de partículas com melhores aspectos morfológicos e tamanhos médios reduzidos.

6. PRODUÇÃO DE M-NPs DE PHBV A PARTIR DA TÉCNICA DE EMULSÃO SIMPLES

Neste capítulo são abordados alguns conceitos de técnicas de emulsão para a produção de sistemas matriciais / particulados que possam contribuir para a obtenção de partículas em escalas micro e nanométricas com melhor polidispersão. O princípio de formação de uma emulsão do tipo água/óleo (A/O) é abordado para a produção de emulsões consideradas simples/únicas envolvendo o polímero em estudo PHBV, de peso molecular original (Capítulo III), o surfactante PVA e os solventes orgânicos CHCl_3 e DCM. Esta técnica foi explorada com o intuito de conhecer o comportamento do polímero PHBV diante da formação de micelas, evaporação/remoção do solvente orgânico, interação e estabilidade do mesmo na presença de surfactantes, entre outros fatores que possam contribuir no direcionamento deste trabalho.

6.1. INTRODUÇÃO

Os métodos de preparação de M-NPs a partir de polímeros pré-formados, como os poliésteres alifáticos, são particularmente adaptados para incorporar princípios ativos lipofílicos, e as M-NPs devem ser preparadas com base numa razão princípio ativo/polímero adequada à obtenção de uma elevada eficiência de encapsulação e toxicidade reduzida (Souto, 2012). A emulsão é uma das técnicas mais utilizadas e mais comuns para o processo de polimerização em que envolve emulsão simples e microemulsão. Polimerização por emulsão é comumente conhecida e muito utilizada como técnica de polimerização de heterofases.

6.1.1. EMULSÃO SIMPLES E EMULSÃO DUPLA

Uma emulsão é uma dispersão constituída de dois líquidos não miscíveis entre eles. Um dos líquidos é dominado na fase contínua, dispersante ou externa da emulsão, enquanto o outro é dominado na fase interna ou dispersa. As emulsões simples são classificadas como do tipo óleo em água (O/A), aquela em que o óleo constitui a fase dispersa e a água a fase contínua (Figura 6.1).

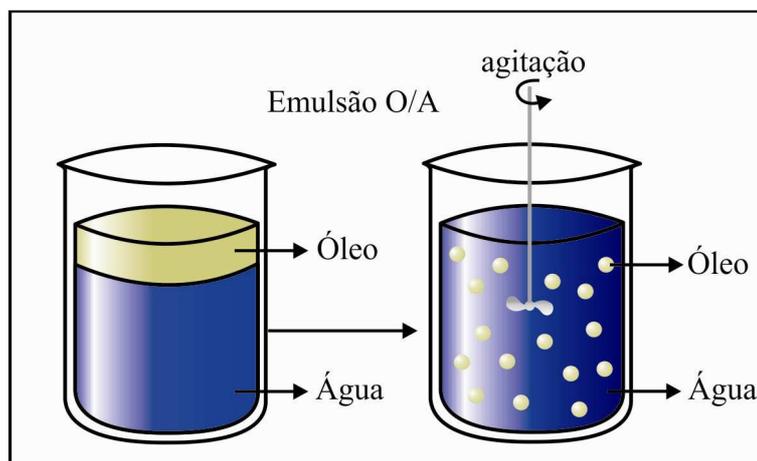


Figura 6.1 – Esquema do processo de emulsão do tipo óleo/água (O/A).

Caso ocorra a água como fase dispersa, ou seja, o inverso e teremos emulsões do tipo água em óleo (A/O) (Figura 6.2).

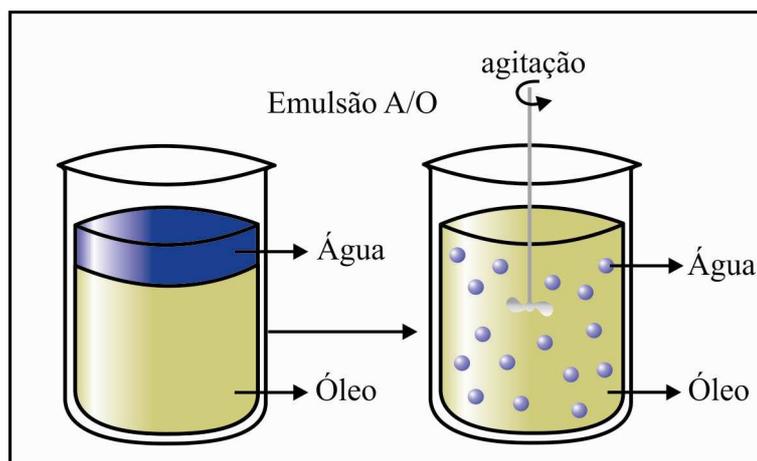


Figura 6.2 – Esquema do processo de emulsão do tipo água/óleo (A/O).

As emulsões duplas podem ser do tipo água-óleo-água (A/O/A) ou do tipo óleo-água-óleo (O/A/O). São sistemas heterodispersivos complexos que também podem ser usados em processos de nanoencapsulação. Em duplas emulsões a fase interna é em si uma emulsão separada da fase de outro líquido pela própria camada que a forma, isso permite a formação de um “núcleo” no interior da partícula obtida. O processo de emulsão de duas fases é preparado com a presença de dois surfactantes: um dominante hidrofóbico usado para estabilizar a interface A/O interna da emulsão e um dominante hidrofílico para estabilizar a interface externa de glóbulos de óleo se a emulsão for do tipo A/O/A.

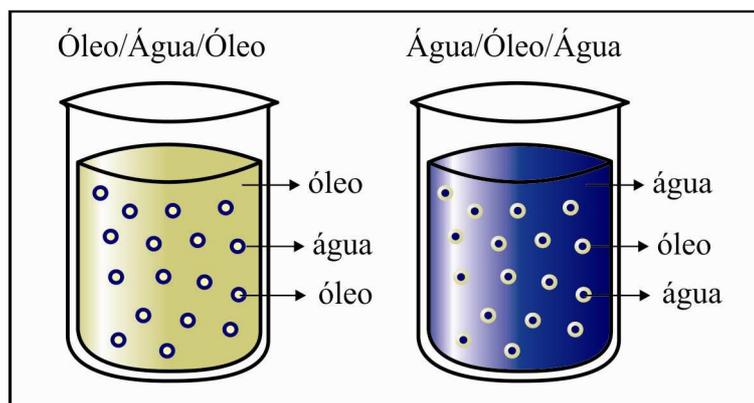


Figura 6.3 – Tipos de emulsão dupla.

O método de dupla emulsão é uma união entre os métodos de nanoprecipitação e emulsão-difusão, nele primeiramente uma emulsão A/O é preparada com auxílio de ultra-som que emulsificará uma fase orgânica contendo um solvente e um polímero mais uma fase aquosa contendo um princípio ativo, por exemplo. Após a primeira emulsificação a emulsão é colocada em uma segunda fase aquosa, contendo surfactante e novamente emulsificada também com o uso de ultra-som ou ultra-agitador formando a fase interna da emulsão, e por fim esta emulsão é adicionada em um meio aquoso denominado fase externa no qual permanecerá sob leve agitação para ocorrer difusão/evaporação do solvente orgânico (Figura 6.4).

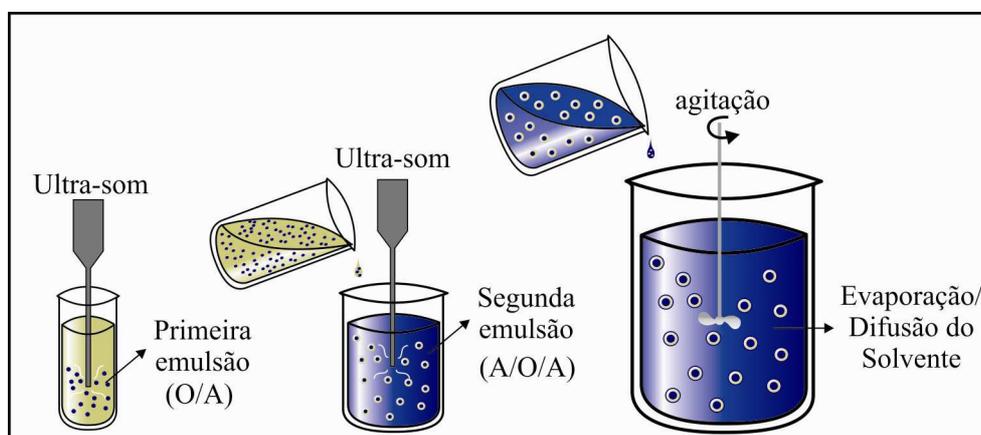


Figura 6.4 – Esquema ilustrativo da preparação de uma dupla emulsão utilizando ultra-som seguido de evaporação/difusão do solvente orgânico.

O papel do surfactante nesse tipo de nanocápsulas é formar um filme e uma barreira para a liberação da droga na interface interna, além disso, a eficiência de encapsulação e o tamanho médio das partículas também são afetados pelo tipo de surfactante usado na preparação da emulsão (Tavares, 2011).

6.1.2. NANOPRECIPITAÇÃO

Existem várias técnicas potencialmente úteis para a precipitação de partículas poliméricas biodegradáveis. O método de nanoprecipitação é uma técnica simples, de fácil realização que tem sido amplamente utilizada na preparação de NPs (Hasmam, 2009), e baseia-se numa emulsificação espontânea da fase interna orgânica contendo o polímero dissolvido na fase externa aquosa, obtendo nanoesferas. Esse método também é conhecido como deslocamento/substituição do solvente ou deposição interfacial. No processo de formação a partir do método de nanoprecipitação é necessário a presença de um solvente, geralmente orgânico e um não solvente, geralmente água, substância formadora de filme (polímero), uma substância ativa (fármaco) e um agente estabilizante (surfactante) (Figura 6.5). Para se obter nanocápsulas com núcleo lipofílico, o processo de preparação deve levar em conta a velocidade de agitação da fase aquosa e a velocidade de adição da fase orgânica (Tavares, 2011).

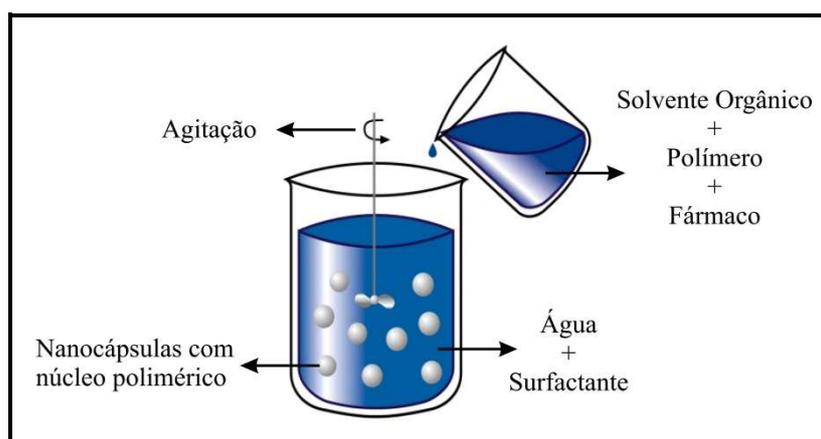


Figura 6.5 - Esquema ilustrativo do processo de produção de partículas por nanoprecipitação.

Segundo o trabalho de Sugimoto, 1987, para o processo de precipitação de polímeros, a formação de partículas pelo método de nanoprecipitação ocorre em três estágios: nucleação, crescimento e agregação, onde a etapa que corresponde à mudança entre nucleação e crescimento determina a uniformidade das partículas, e a produção de cada etapa determina o tamanho das partículas. Por outro lado, a transferência de massa entre dois líquidos e o efeito Gibbs-Marangoni, determinam que a formação de NPs ocorra devido à diferença de tensão superficial, e dessa forma a formação de nanocápsulas ocorre devido à agregação de polímeros em gotículas de emulsões estabilizadas, onde a nucleação e o crescimento não estão envolvidos (McManawey *et al.*, 1973).

De acordo com o trabalho de Schaffazick, 2006, as taxas de encapsulação obtidas são elevadas para fármacos lipofílicos. A formação das nanocápsulas baseia-se no fato de que quando a fase orgânica, contendo o polímero e o óleo, é vertida na fase aquosa (não-solvente), as vesículas são formadas por emulsificação espontânea, enquanto o solvente difunde no não-solvente. Assim, polímero insolúvel tanto no óleo quanto no não solvente, é dessolvatado na interface dos dois componentes imiscíveis. Entretanto o método de nanoprecipitação apresenta algumas limitações, tais como a impossibilidade de ser usado para fármacos que não são solúveis nestes solventes (miscíveis com a água) e a dificuldade de escolha do sistema fármaco/polímero/solvente/não-solvente, em que as partículas possam ser formadas e a substância ativa eficientemente encapsulada.

6.1.3. EMULSIFICAÇÃO-DIFUSÃO

Em comparação com os métodos de produção de NPs poliméricas a partir de polimerização de monômeros, a preparação utilizando polímeros pré-formados é mais facilmente controlável, de maior rendimento, e pode ser realizada por emulsificação-difusão do solvente (Souto, 2012).

A técnica de emulsificação-difusão (*salting-out*) foi primeiramente estudada por Quintanar-Guerrero (1997), e consiste na dissolução do polímero de encapsulação num solvente parcialmente solúvel em água. Após emulsificação desta fase, sob agitação vigorosa, numa solução aquosa contendo um estabilizador, adiciona-se água ao sistema, o que provoca a difusão do solvente para a fase externa e a formação de nanoesferas ou nanocápsulas, de acordo com a razão óleo/polímero. O solvente é eliminado por evaporação sob lenta agitação mecânica ou magnética, de acordo com o seu ponto de ebulição (Figura 6.6). Este processo utiliza solventes orgânicos aceitáveis do ponto de vista farmacêutico, não necessita de passos de homogeneização, conduz a rendimentos elevados, é reprodutível e facilmente transposto à escala industrial, e eficaz na encapsulação de fármacos lipofílicos (Silva, 2003 apud Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998).

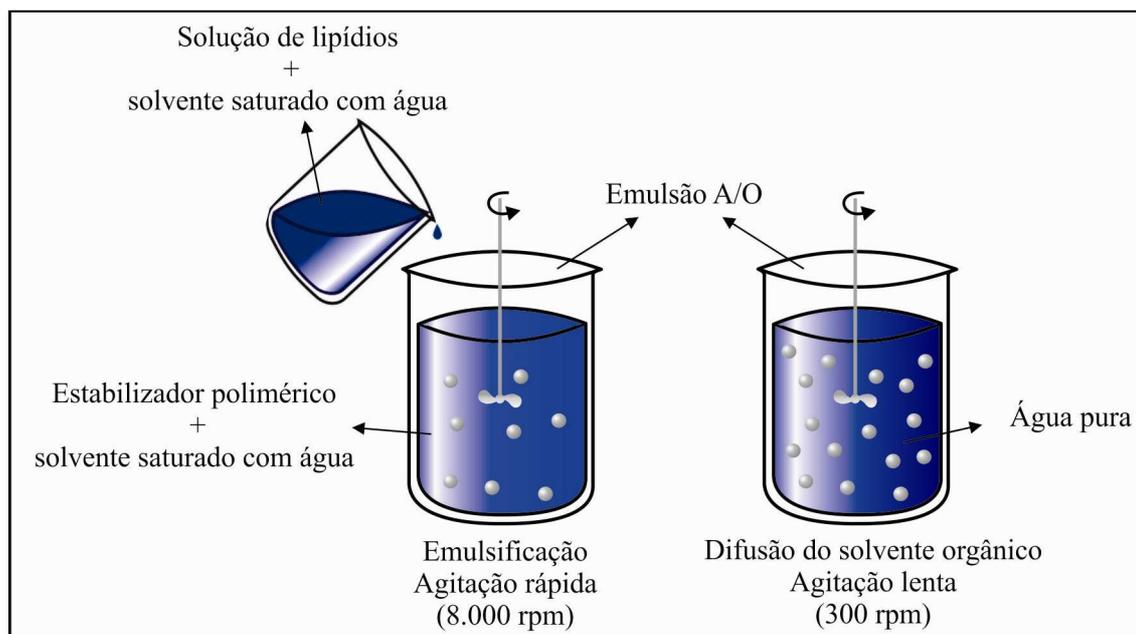


Figura 6.6 - Esquema ilustrativo do processo de produção de partículas por emulsificação-difusão.

Os princípios ativos hidrossolúveis podem ser incorporados por dispersão numa fase aquosa, que posteriormente vai constituir a fase interna de uma emulsão múltipla A/O/A. Este processo é particularmente adequado para a incorporação de peptídeos e proteínas em nanoesferas. Neste caso, como a fase aquosa interna tem tendência para coalescer durante a agitação, a presença de um tensoativo na fase orgânica é essencial para aumentar a estabilidade da emulsão primária A/O em consequência da emulsão múltipla A/O/A (Souto, 2012).

Guinebretière *et al.*, 2002, prepararam nanocápsulas (NC) utilizando o método de emulsificação-difusão. A emulsão foi preparada usando um agitador de alta velocidade (Ultraturrax T25). O mecanismo de formação de partículas foi baseado na difusão do solvente seguido da deposição do polímero em torno da gota de óleo. O solvente parcialmente solúvel em água e incluso nas gotas difusas foi adicionado em um meio externo médio aquoso após a difusão da emulsão com água. Neste trabalho foi estudado o controle do tamanho das NC, os efeitos de vários parâmetros da emulsão, como natureza e concentração do polímero, estabilizador, a fase aquoso-orgânica, morfologia das NC e tamanho. O tamanho médio das NCs foi de 500 nm, mas pôde ser observada uma faixa de tamanho de diâmetro entre 200 a 1.000 nm. Segundo Guinebretière *et al.*, 2002, o mecanismo de formação baseado na difusão do solvente para a fase aquosa foi muito rápido e o nível de cinética depende no volume de água.

Muitos métodos têm sido usados para preparação de MPs, tanto para polímeros naturais como sintéticos. Alguns dos processos comumente usados para a preparação de micropartículas

de polímeros biodegradáveis incluem separação de fases, evaporação e extração de solvente, técnicas de fluido supercrítico e *spray drying*. O processo de emulsão/evaporação do solvente orgânico proposto por diversos autores representa um método fácil e reprodutivo que proporciona partículas com uniformidade de tamanho (Farago *et al.*, 2008).

6.2. PARTE EXPERIMENTAL

6.2.1. EMULSÃO SIMPLES - PREPARAÇÃO

Diferentes condições foram abordadas durante a preparação das emulsões simples modificando parâmetros como: concentração do soluto em função do solvente orgânico, tipo do solvente orgânico, concentração do surfactante, volumes dos componentes da emulsão, frequência e tempo do ultrasonicador (Tabela 6.1).

Tabela 6.1 – Condições utilizadas durante a preparação das emulsões simples.

Met. N°.	PHBV/Mw: 214.589 Da	Solvente Orgânico/Vol.	PVA (Fase Interna) Vol. / %	Potência Ultrason (Freq./Temp.)	PVA (Fase externa) Vol. / %
1	50 mg	CHCl ₃ / 6 mL	5 mL / 5 %	75 W / 3 min	200 mL / 0,5 %
2	50 mg	CHCl ₃ / 1 mL	10 mL / 0,1 %	75 W / 2 min	200 mL / 0,25 %
3	10 mg	CHCl ₃ / 6 mL	5 mL / 5 %	75 W / 3 min	200 mL / 0,5 %
4	25 mg	DCM / 0,6 mL	2 mL / 1 %	25 W / 15 seg.	50 mL / 0,3 %
5	30 mg	DCM / 0,6 mL	2 mL / 1 %	50 W / 2 min	200 mL / 0,3 %
6	8 mg	DCM / 2 mL	5 mL / 5 %	50 W / 2 min	200 mL / 1,0 %
7	16 mg	DCM / 2 mL	5 mL / 5 %	^a 50 W / 3 min	200 mL / 1,0 %

^a Frequência do ultrason em modo pulso (10 pulsos).

A metodologia base para a preparação das emulsões deu-se primeiramente na preparação das soluções de surfactante em diferentes concentrações (para fase interna e externa da emulsão) em base aquosa (água deionizada). Logo o polímero PHBV foi dissolvido em solvente orgânico em condições estabelecidas, e posteriormente adicionado ao volume de solução de surfactante preparado para fase interna da emulsão. Esta mistura de soluções (solução orgânica + solução aquosa) foi submetida à ultrasonicador de alta frequência (OMNI CORP, modelo OmniRUPTOR 250) em condições estabelecidas de potência (W) e tempo (min ou seg)

utilizando banho de gelo para evitar ganho excessivo de temperatura. Posteriormente a emulsão gerada foi introduzida na solução aquosa de surfactante preparada para a fase externa no qual permaneceu sob leve agitação durante aproximadamente 12 h para completa evaporação do solvente orgânico.

6.2.2. REMOÇÃO DO SURFACTANTE

Após ter evaporado por completo o solvente orgânico das partículas dispersas na fase aquosa, foi necessária remoção do surfactante. A solução foi centrifugada a uma rotação de 15.000 rpm e descartado o sobrenadante composto por água e surfactante. Novamente as partículas foram dispersas em água deionizada para nova lavagem. O processo de lavagem foi realizado três vezes para completa remoção do PVA.

6.2.3. SECAGEM DAS PARTÍCULAS

O processo de produção de partículas por técnica de emulsão pode ser finalizado apenas com a lavagem caso o intuito do trabalho seja manter as amostras dispersas em água ou outro meio. Porém, se o objetivo for à obtenção de partículas em estado sólido é necessário que seja feito um processo de secagem para remoção da água sem prejudicar a morfologia das partículas. Existem algumas técnicas de secagem de sistemas particulados utilizadas na indústria farmacêutica como *spray-drier*, leito fluidizado, liofilizador, etc. As amostras obtidas neste trabalho foram secas pelo método de liofilização, onde as mesmas são congeladas e posteriormente secas sob *vacuum* a baixa temperatura.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As condições aplicadas ao método de emulsão simples do tipo água e óleo seguido de evaporação de solvente orgânico em condições ambientes, resultaram na obtenção de M-NPs com variados tamanhos médios. Não foi realizado teste de estabilidade da emulsão, no entanto as partículas se mostraram estáveis no período pré-secagem, e as amostras obtidas foram secas para processo de caracterização em termos de morfologia e tamanho. Técnica de microscopia eletrônica por varredura (MEV) foi utilizada para obtenção de tamanho e aspectos morfológicos

das M-NPs. As imagens foram obtidas com o uso de um microscópio eletrônico da marca SHIMADZU (Modelo SS-550). Para melhor visualização das partículas, as mesmas foram dispersas em água destilada e posteriormente depositadas em uma lamínula de vidro. Esperou-se um intervalo de aproximadamente 18 horas para que a água fosse totalmente evaporada restando sobre a lamínula apenas M-NPs secas. De acordo como procedimento de operação do MEV, as amostras primeiramente foram submetidas a um processo de metalização com ouro durante um intervalo de tempo de 15 min sob uma corrente de ionização ~ 7 mA e um vácuo de 10 Pa.

O tamanho das partículas foi obtido por meio do software ImageJ 1.44p (Wayne Rasband – National Institutes of Health, USA), e a distribuição de tamanho obtida com o uso do software Statistica ver. 8.0. Algumas partículas foram caracterizadas pelo método de DLS (Dynamic Light Scattering), em que as mesmas foram dispersas em água deionizada durante processo de preparação e obtenção da distribuição de tamanho médio das mesmas.

Diante dos resultados obtidos é possível avaliar parâmetros que mais influenciam em termos de tamanho e distribuição de tamanho das partículas como: concentração do polímero, tipo do solvente orgânico, concentração de surfactante nas fases interna e externa, potencia e tempo de aplicação do ultra-som de alta frequência. Como observado no Capítulo III, item 3.8, o peso molecular (Mw) do PHBV é 228.515 Da, relativamente alto se tratando de formação de sistemas matriciais em escala micro e nanométrica. O peso molecular considera sendo o número de unidades de repetição pelo peso da estrutura da molécula, que mesmo completamente isolada apresentará um tamanho limite de redução para formação de uma partícula. Com base nesse conceito é previsto que o tamanho das partículas será na ordem de micro e nanômetro. A análise dos resultados é apresentada de acordo com a interpretação das Figuras a seguir.

As diferentes condições experimentais abordadas mostram nas imagens microscópicas um variado tamanho médio de partículas. A Figura 6.7 refere-se às partículas obtidas a partir da condição N° 1, e por meio da distribuição de tamanho (Figura 6.7.d) pode-se observar que o tamanho médio das partículas é igual a 21 μm , porém, observando a distribuição na ordem de tamanho e número de contagem nota-se que existem duas populações que sobressaem. Se separarmos em duas populações terá tamanhos médios de $14,15 \pm 3,19$ μm e $28,36 \pm 4,0$ μm . As duas populações podem ser separadas utilizando-se de processo de centrifugação com níveis diferentes de velocidade. Este procedimento seria interessante se o tamanho médio das duas populações apresentasse grande diferença entre eles, como por exemplo, ordem de nm e μm . É possível notar a presença de grandes aglomerações que pode ser oriundos do coalescimento entre duas ou mais partículas durante o processo de evaporação do solvente orgânico, lavagem ou secagem.

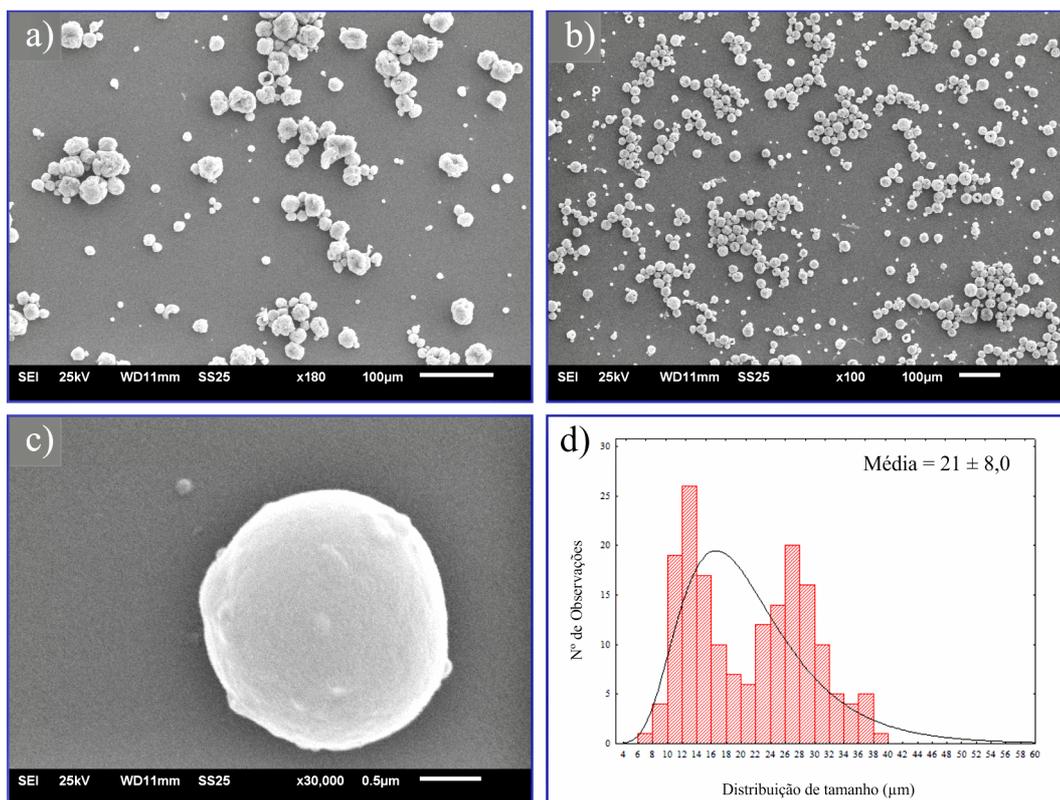


Figura 6.7 – Imagens das partículas obtidas por MEV (a: x180, b: x100 e c: x30.000), e (d) distribuição de tamanho obtidos a partir da condição N° 1 da Tabela 6.1.

Uma melhor eficiência na distribuição de tamanho das partículas pode ser observada nos resultados pertencentes a condições N° 2 após análise das imagens da Figura 6.8. A distribuição de tamanho mostra uma população em ordem crescente de quantidade de partículas em relação ao decréscimo do tamanho obtendo um tamanho médio de $0,87 \pm 0,5 \mu\text{m}$, no entanto a presença de aglomerados destaca-se com a formação de grandes fragmentos compostos pela união de centenas de partículas da mesma ordem de tamanho.

Os resultados pertinentes a condição N° 3 apresentaram uma melhor dispersidade das partículas, essa evolução pode ser considerada devido à redução da massa de PHBV em relação ao solvente orgânico, pois as demais condições permanecem praticamente iguais ao N° 1. A distribuição de tamanho apresentada na Figura 6.9.d resulta em partículas com tamanho médio de $0,75 \pm 0,54 \mu\text{m}$. Alguns traços de aglomeração aparecem nas imagens de microscopia da Figura 6.9, porém a grande maioria das partículas mostra-se dispersas.

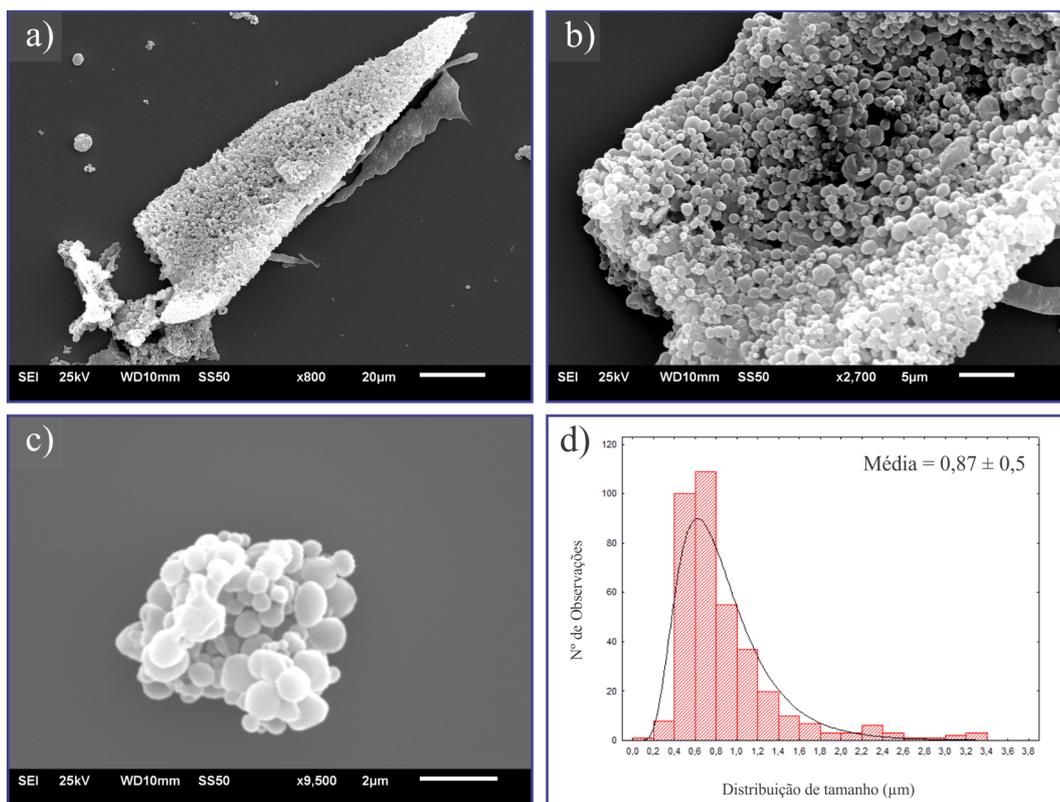


Figura 6.8 – Imagens das partículas obtidas por MEV (a: x800, b: x2.700 e c: x9.500), e (d) distribuição de tamanho obtidos a partir da condição N° 2 da Tabela 6.1.

Nos resultados apresentados acima foi utilizado o CHCl_3 como solvente orgânico para os experimentos de 1 a 3, e nos experimentos entre 4 a 7 utilizou-se o DCM. Tal modificação foi abordada com a intenção de avaliar o comportamento do solvente orgânico em relação ao tamanho e morfologia das partículas. Os dois solventes possuem pontos de pressão de vapor diferentes, o que influencia na acomodação da estrutura polimérica na formação da matriz durante a evaporação/extração do solvente. Micropartículas de biopolímeros carregadas de bioativos tem sido descritos na literatura por evaporação do solvente usando o DCM como a fase solvente e o co-polímero PHBV como matriz biopolimérica, e a eficiência de encapsulamento reportada varia entre 40 – 60 % (Falco *et al.*, 2013).

No experimento (N° 4) contendo DCM para a formação da emulsão os resultados não foram como esperados. A análise das imagens de microscopia apresentada na Figura 6.10 resultou em um tamanho médio das partículas bem acima da ordem de 1 μm , ou seja, um tamanho médio igual a $32,32 \pm 19,09 \mu\text{m}$ e a presença de duas populações, sendo a maior com um tamanho em torno de 25 μm e uma menor em torno de 90 μm . Este grande aumento no tamanho das partículas deve-se diretamente em função da redução da potência e do tempo de ultrason (25 W/15 seg) durante a reação. A redução foi em busca de amenizar os traços de

coalescência presente nas amostras no termino do processo, porém, a potência oferecida não foi suficiente o bastante para quebrar de forma homogênea e em tamanhos menores as gotas durante a formação das micelas da emulsão.

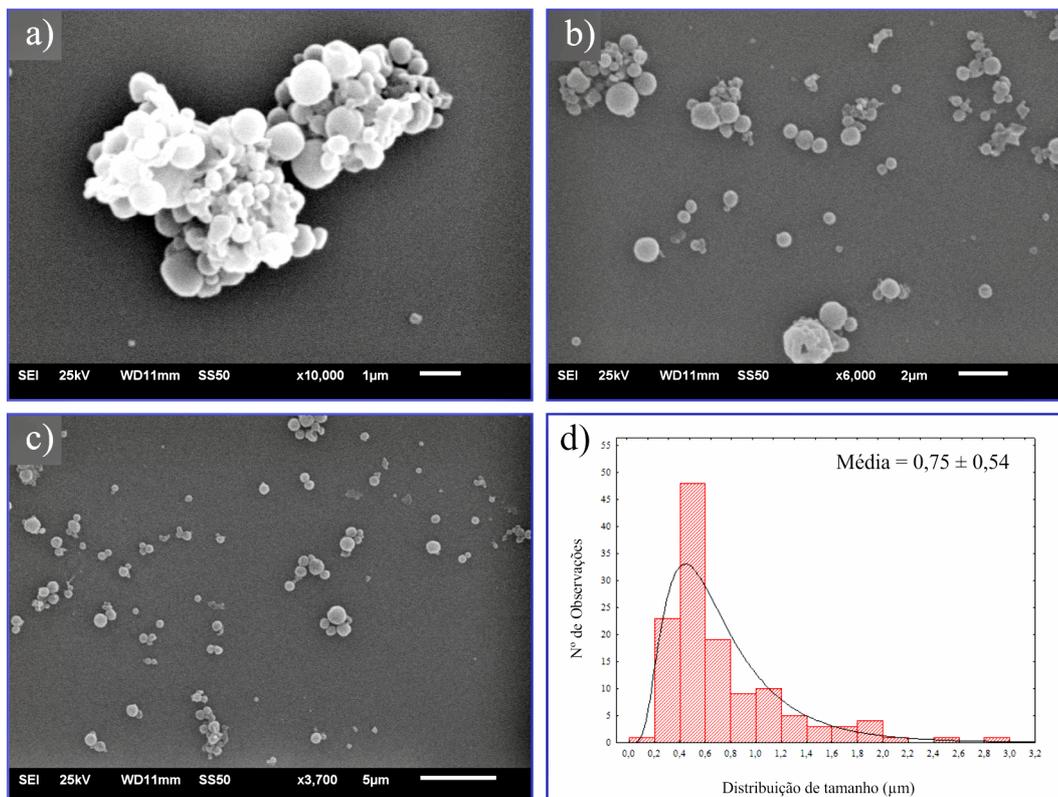


Figura 6.9 – Imagens das partículas obtidas por MEV (a: x10.000, b: x6.000 e c: x3.700), e (d) distribuição de tamanho obtidos a partir da condição Nº 3 da Tabela 6.1.

Mesmo não tendo bons resultados com a redução da potência do ultrason na condição Nº 3, mantiveram-se a potência um pouco abaixo das primeiras condições estabelecendo a mesma para 50 W nas três ultimas condições da tabela 6.1. A massa do polímero para a condição de Nº 5 (Figura 6.11) foi alterada para 30 mg/mL, uma concentração um pouco acima da anterior. Os resultados mostram uma melhora relativa em relação à redução da presença de aglomerados de partículas e melhor distribuição de tamanho. As condições expressas resultaram em partículas com diâmetro médio de $1,39 \pm 0,84 \mu\text{m}$ com a presença de partículas fundidas umas entre as outras. Durante o processo de lavagem das partículas para remoção do surfactante, foi utilizado o ultra-som em baixa frequência para melhor dispersão das partículas, porém notou-se que o uso em excesso desta técnica pode conduzir calor e afetar a morfologia das partículas formando aglomerados de partículas fundidas/degradadas.

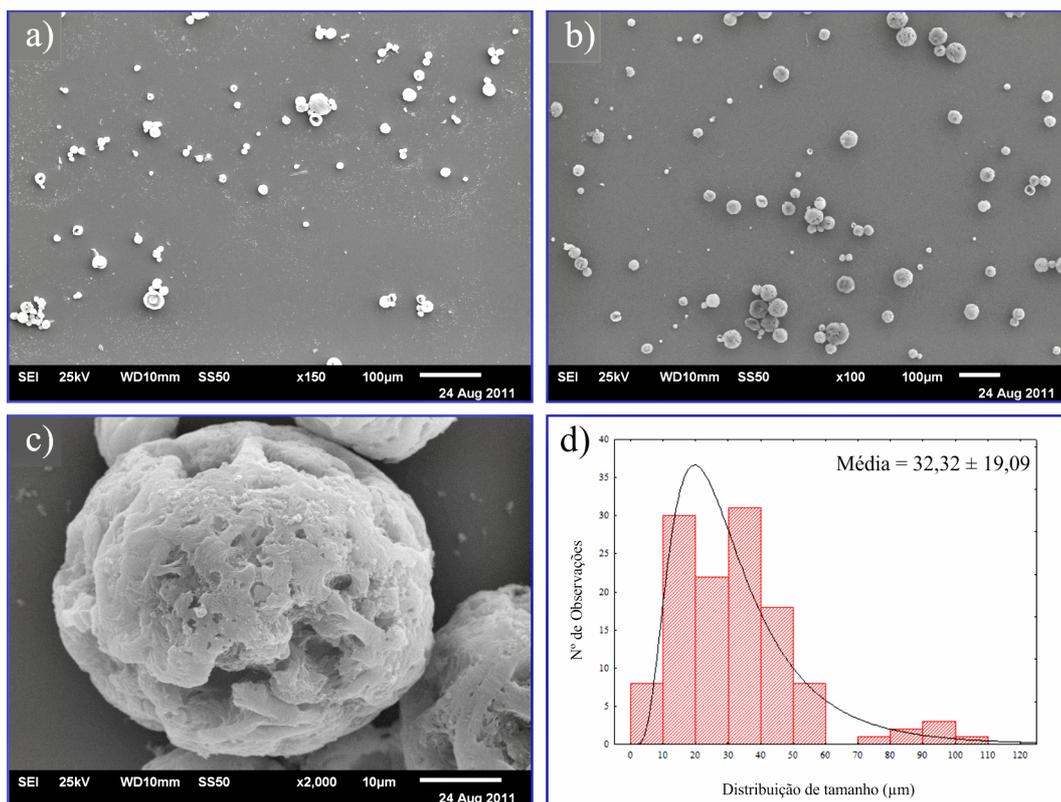


Figura 6.10 – Imagens das partículas obtidas por MEV (a: x150, b: x100 e c: x2.000), e (d) distribuição de tamanho obtidos a partir da condição N° 4 da Tabela 6.1.

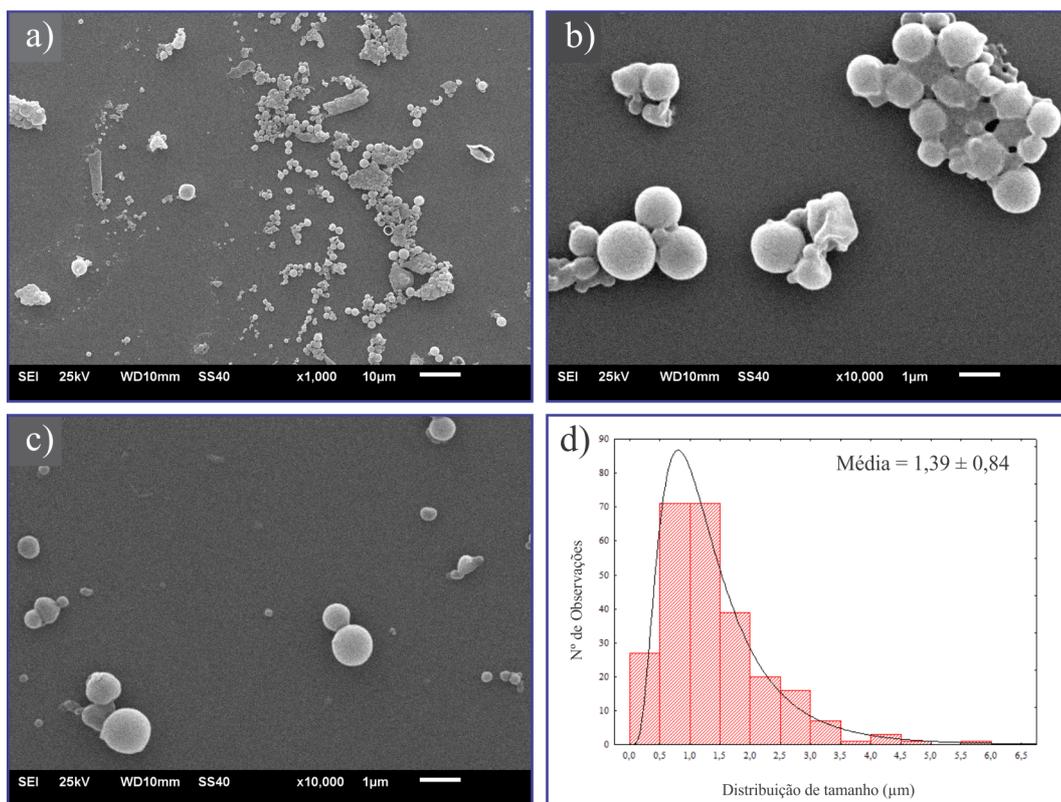


Figura 6.11 – Imagens das partículas obtidas por MEV (a: x1.000, b: x10.000 e c: x10.000), e (d) distribuição de tamanho obtidos a partir da condição N° 5 da Tabela 6.1.

Tal fenômeno pode ser visualizado também na Figura 6.12, em que muitas partículas aparecem fundidas umas nas outras, e ao mesmo tempo é possível notar também que as mesmas partículas obtiveram boa morfologia durante o processo inicial de formação da emulsão. Em decorrência dos fenômenos de coalescência e de fundição, para a condição experimental N° 6 foram modificadas condições de massa do polímero e concentração do surfactante. Obteve-se uma melhora relativa, considerando que ainda existe presença de aglomerados, no entanto o tamanho médio do diâmetro das partículas reduziu bastante, obtendo um tamanho médio de $0,55 \pm 0,36 \mu\text{m}$, no entanto a distribuição de tamanho visto no item (b) da Figura 6.12 apresenta um deslocamento amplo em relação ao tamanho máximo das partículas que é em torno de $1,64 \mu\text{m}$.

Por fim uma última condição foi atribuída a estes experimentos. Considerando que as partículas da condição experimental N° 6 foram boas, algumas pequenas modificações foram aplicadas na condição N° 7. A massa do PHBV foi dobrada, mantiveram-se as concentrações de surfactante e aumentou o tempo de ultrason para 3 min e utilizou uma frequência de 50 W em modo de pulsos (10 pulsos) para melhor homogeneização da emulsão. Desta forma foram obtidas partículas com um tamanho médio de $0,340 \pm 0,33 \mu\text{m}$ (Figura 6.13).

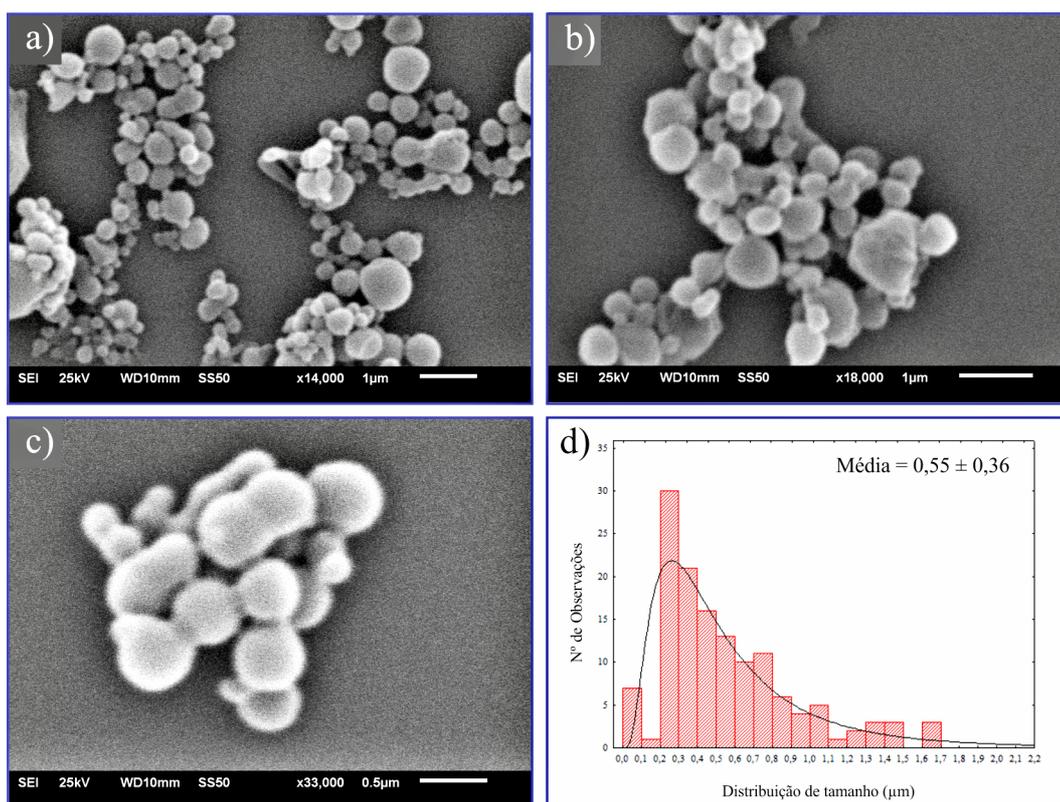


Figura 6.12 – Imagens das partículas obtidas por MEV (a: x14.000, b: x18.000 e c: x33.000), e (d) distribuição de tamanho obtidos a partir da condição N° 6 da Tabela 6.1.

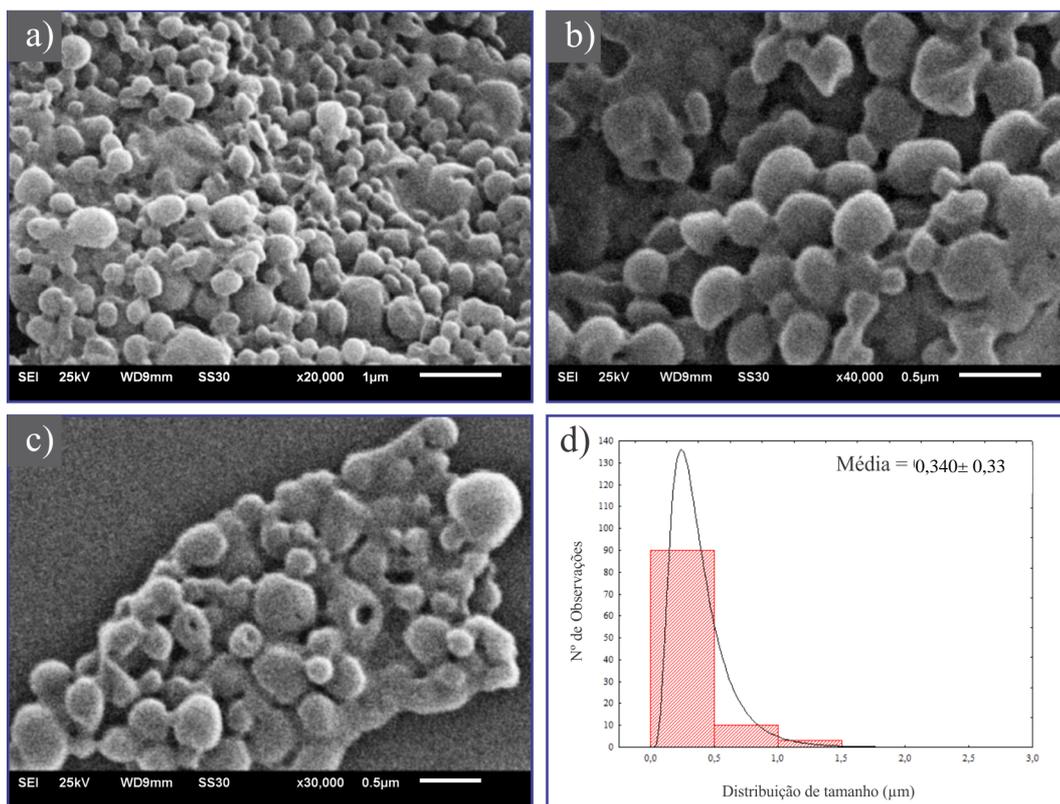


Figura 6.13 – Imagens das partículas obtidas por MEV (a: x20.000, b: x40.000 e c: x30.000), e (d) distribuição de tamanho obtidos a partir da condição N° 7 da Tabela 6.1.

Traços de partículas fundidas ainda se mostram presente nas imagens, portanto outro método experimental será abordado no Capítulo VII em busca de amenizar este problema. Os resultados obtidos diante das condições exploradas para a produção de MPs e NPs mostrados na discussão acima são reunidos na Tabela 6.2 para melhor visualização da evolução dos experimentos.

Tabela 6.2 – Tamanho das partículas em relação às condições experimentais.

Condição experimental N°	Tamanho das partículas (μm)
1	21,00 ± 8,00
2	0,870 ± 0,50
3	0,750 ± 0,54
4	32,32 ± 19,09
5	1,390 ± 0,84
6	0,550 ± 0,36
7	0,340 ± 0,33

6.4. CONCLUSÕES

A abordagem da técnica de emulsão simples para a obtenção de M-NPs de polímeros biodegradáveis conduz a um conhecimento do comportamento dos materiais perante componentes miscíveis e não miscíveis durante a produção de sistemas matriciais. Como foi mostrado neste capítulo, diversos fatores durante a formação de uma emulsão do tipo água e óleo podem influenciar na formação inicial das micelas, na acomodação das estruturas poliméricas durante extração do solvente e por fim na morfologia final das partículas, sejam elas secas ou dispersas em solução. Dentre as diferentes condições exploradas para a produção das partículas foi possível obter tamanhos que variam entre 0,340 a 32,32 μm .

Sendo assim, os estudos de emulsão simples vistos neste capítulo serão de extrema importância para o desenvolvimento dos próximos capítulos, onde abordaremos estudos envolvendo técnica de emulsão seguida de extração do solvente orgânico por FSC. As observações realizadas a partir dos resultados das diferentes condições de emulsão mostradas aqui serão fundamentais na escolha de melhores condições como: escolha do solvente orgânico, concentração de polímero, concentração de surfactante, etc., para serem utilizadas na preparação da emulsão seguida de técnica de extração do solvente por CO_2SC .

7. PRODUÇÃO DE MPS DE PHBV UTILIZANDO NOVA TÉCNICA COM FORMAÇÃO DE EMULSÃO SEGUIDA DE EXTRAÇÃO DE SOLVENTE POR FSC.

A produção de sistemas particulados a partir de técnicas de emulsão convencionais tem apresentado algumas dificuldades durante o processo acarretando em pontos negativos nos resultados finais do processo. Como vimos nos Capítulos IV e V, o uso do solvente orgânico bem como sua remoção durante o processo de produção interfere diretamente na qualidade das partículas em termos de morfologia e distribuição de tamanho. Tomando como base a técnica de extração de solvente orgânico da emulsão por fluido supercrítico (SFEE) do inglês “supercritical fluid extraction of emulsion”, neste trabalho foi criado um sistema em que envolve a formação de uma emulsão instantânea constituída da mistura de uma solução orgânica contendo polímero e droga e outra solução aquosa contendo uma concentração conhecida de surfactante seguido de extração do solvente orgânico em condições supercríticas. Sabe-se que para manter a estabilidade de uma emulsão é necessário inserir um terceiro componente, um surfactante, o qual fornece cargas em torno das gotículas que ajudam a impedir a floculação e coalescência aumentando a estabilidade da emulsão. Desta forma um co-solvente também pode ser adicionado para aumentar ainda mais a área superficial, diminuindo assim a tensão superficial. Com este sistema é possível estabelecer e variar condições como percentual de cada componente da mistura da emulsão, fluxo de entrada da emulsão, fluxo de entrada do FSC (CO₂), temperatura e pressão.

7.1 INTRODUÇÃO

Uma nova tecnologia promissora para a produção de partículas nanométricas de substâncias naturais é representada pelo uso de FSC em uma combinação com micro e nano-emulsões, o qual representa vantagem sobre estes dois ativos separados (Mezzomo *et al.*, 2012). Técnicas com FSC têm sido desenvolvidas para promover produtos livre de solvente orgânico e alternativa efetiva para métodos tradicionais de processamento de drogas e polímeros, contornando muitos dos problemas associados com técnicas tradicionais (Zhang *et al.*, 2012). Evaporação convencional de solvente usualmente procede em baixa velocidade e pode requerer altas temperaturas ou pressões reduzidas para eliminar o solvente orgânico; extração de solvente

requer uma grande quantidade de uma fase antisolvente para extrair o solvente. Processos baseados em FSC têm sido propostos na literatura para remoção de solvente orgânico durante a produção de sistemas micro e nanoparticulados.

Precipitação envolvendo antisolvente supercrítico tem sido usada frequentemente para a produção de NPs, mas interações complexas entre equilíbrio de fases a altas pressões, dinâmicas do fluido e transferência de massa tem se tornadas condições favoráveis para a produção de NPs (Campardelli *et al.*, 2012).

Extração supercrítica da emulsão foi descrito para produção de micro esferas de polímero/droga com tamanho e distribuição controlados. Particularmente, CO₂ supercrítico foi proposto como agente extrator de solvente orgânico contido na fase dispersa de uma emulsão, deixando as micropartículas aproximadamente livres de solvente orgânico (Falco *et al.*, 2013). O processo de extração por FSC tem sido proposto para uma eliminação efetiva de solventes orgânicos; por exemplo, de emulsões o/a para a produção de suspensão de micropartículas, usando o processo de extração da emulsão por FSC (Campardelli *et al.*, 2012).

Para micro emulsões convencionais considerando água, óleo e surfactante, o comportamento de fases do sistema, tensão superficial (γ) e curvatura precisam estar correlacionados. Ambas as fases aquosa e orgânica pode, no entanto, se dispersa em CO₂ dar estabilidade suficiente para a interface. A força sintonizável do CO₂ proporciona oportunidade para manipular as propriedades da emulsão e para quebrar rapidamente as emulsões no final do processo por despressurização (Rocha *et al.*, 2001).

Uma modificação no sistema atual de extração da emulsão é apresentada com o intuito de promover a formação de uma emulsão seguida de extração do solvente orgânico com FSC em uma única etapa do processo, ocasionando uma turbulência interfacial durante o deslocamento do solvente, com formação de turbilhões do solvente na interface, produzindo gotículas micro-nano que são então transformadas em M-NPs sólidas quando o solvente migra para a dispersão da fase não-solvente devido também uma diminuição localizada da tensão interfacial dinâmica.

7.2. PARTE EXPERIMENTAL

7.2.1. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

Os materiais utilizados neste capítulo assim como nos demais também foram apresentados no capítulo III. A metodologia utilizada para a produção de M-NPs deu-se primeiramente a partir da preparação das soluções contendo polímero + solvente e surfactante +

água. O polímero, PHBV de peso molecular original foi solubilizado em DCM em concentrações estimadas de acordo com a Tabela 7.1, da mesma forma o surfactante PVA, foi dissolvido em água destilada em condições também estabelecidas na mesma tabela.

7.2.2. FORMAÇÃO DA EMULSÃO E EXTRAÇÃO DO SOLVENTE ORGÂNICO

O aparato experimental utilizado foi o SAS modificado, como pode ser visto na Figura 7.1. Em primeiro momento foram estabelecidas as condições fixas do sistema como temperatura (313 K) e pressão (8,0 MPa). O processo de formação da emulsão se deu primeiramente com a mistura envolvendo dois líquidos não miscíveis como água e óleo. Neste caso consideremos a fase orgânica como “óleo”, constituída de PHBV + DCM, e a fase aquosa composta por água + PVA. As diferentes fases da mistura foram adicionadas ao sistema ao mesmo tempo utilizando-se de duas bombas de líquido a alta pressão por diferentes caminhos. A solução de surfactante foi alimentada pela bomba (1) e a solução orgânica pela bomba (2), e ambas conduzidas por tubos de diâmetro interno igual a 1/16”. Ambas as bombas possuem válvulas do tipo check válvula que impedem o retorno das soluções para as mesmas. Posteriormente, as duas soluções se encontraram em uma união do tipo “T” localizada pouco antes de uma válvula de controle de pressão do tipo BPR descrita em outros capítulos. Esta união proporcionou uma mistura entre as duas soluções em condições estabelecidas de fluxo e concentração no qual gerou uma pré-emulsão. Após passar pela válvula BPR a emulsão foi conduzida até a entrada do reator no qual é composto por um capilar que proporcionou a redução do diâmetro interno da entrada para 150 μm . A redução da entrada da alimentação do reator teve como propósito quebrar em tamanhos iguais as gotículas da emulsão e ao mesmo tempo reduzir o tamanho das mesmas proporcionando melhor resultado final na produção das partículas. Paralelo a formação da emulsão, alimentou o sistema com CO_2 em condições supercríticas para realizar a extração do solvente orgânico. O CO_2 foi conduzido por meio de uma bomba de alta pressão passando seqüencialmente por um pré-aquecedor em que adquire temperaturas estabelecidas ao sistema, e posteriormente alimentado no reator por uma entrada de diâmetro interno igual a 1/16” paralela ao capilar, e outra entrada lateral de diâmetro interno igual a 1/8”. O reator permanece sob condições de pressão e temperatura estabelecidas durante todo processo. A emulsão gerada fica suspensa em um vaso coletor no interior do reator e a mistura contendo CO_2 + solvente orgânico é conduzida até um reator menor, em que chamamos de coletor de solvente, no qual ocorre uma

leve depressurização gerando uma separação de fases, armazenando apenas o solvente e descartando o CO₂.

7.2.3. REMOÇÃO DO SURFACTANTE RESIDUAL

Uma terceira etapa do processo é necessária para que seja feita a remoção do surfactante que fica junto com a solução aquosa e não pôde ser totalmente arrastada com CO₂SC. A remoção do PVA residual pode ser feita seguindo a mesma metodologia utilizada para o processo de emulsão convencional (Capítulo VI – Item 6.2.2), onde a emulsão é centrifugada sob alta rotação para que haja separação das partículas, e se faz a remoção do sobrenadante e posteriormente re-dispersa as partículas em água destilada ou deionizada até que não haja mais presença de surfactante.

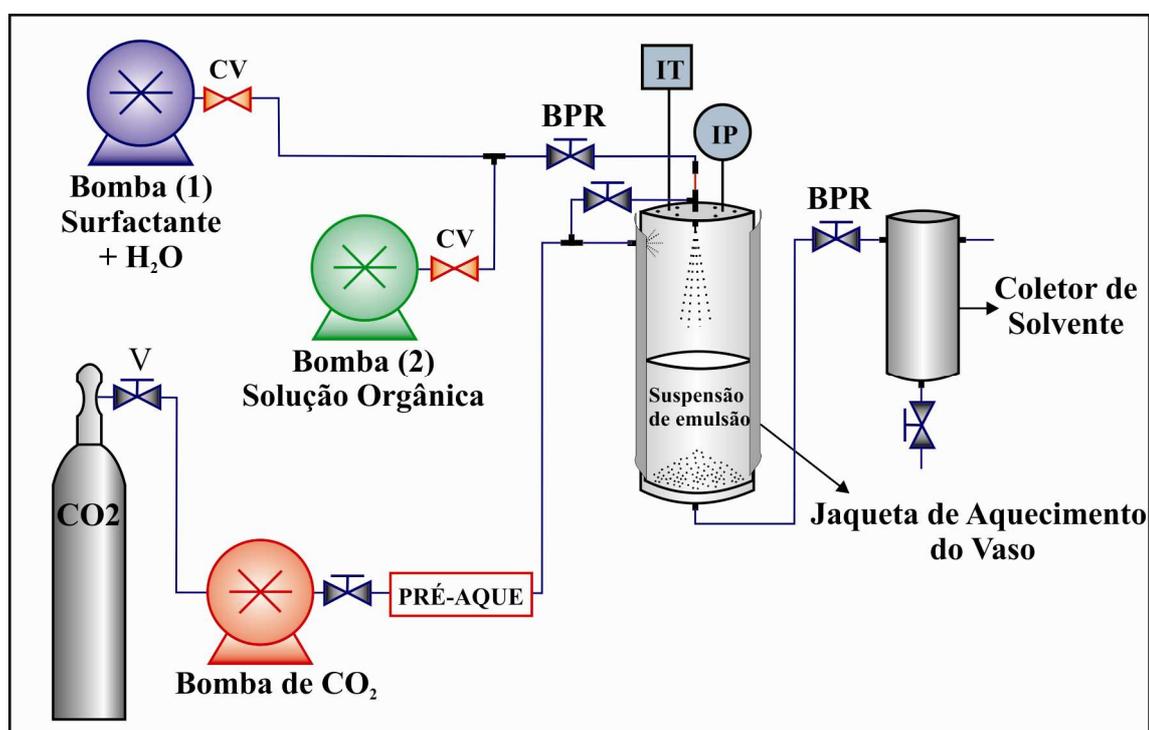


Figura 7.1 – Esquema ilustrativo do aparato experimental utilizado para formação de emulsão seguida de extração do solvente orgânico por CO₂SC.

7.2.4. SECAGEM DAS PARTÍCULAS

O processo de secagem das amostras foi conduzido pelo método de liofilização apresentado no Capítulo VI deste trabalho.

Tabela 7.1 – Condições experimentais abordados no processo experimental.

Condição n°.	Concentração de PHBV	Concentração de PVA	Fluxo de S. Orgânica	Fluxo de entrada de PVA	Fluxo de CO ₂
1	10 mg/mL	2,5 %	1 mL/min	5 mL/min	10 mL/min
2	10 mg/mL	5,0 %			
3	20 mg/mL	2,5 %			
4	20 mg/mL	5,0 %			
5	10 mg/mL	2,5 %	1 mL/min	5 mL/min	20 mL/min
6	10 mg/mL	5,0 %			
7	20 mg/mL	2,5 %			
8	20 mg/mL	5,0 %			

7.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A principal vantagem deste método é o fato de permitir algum controle sobre a distribuição das massas moleculares do polímero durante o processo de polimerização do mesmo pela manipulação de fatores como a concentração inicial do surfactante e a proporção do mesmo em relação à solução orgânica contendo polímero, e condições atribuídas ao CO₂SC durante o processo de extração, tais como pressão, fluxo e temperatura. A reação de polimerização ocorre preferencialmente nas partículas poliméricas em crescimento e no interior das micelas do surfactante, ou seja, inicialmente quando ocorre o encontro das duas soluções não miscíveis (água/óleo). Porém, pode também ocorrer parcialmente na fase contínua com o FSC, onde o mesmo exercerá a função de solvente e anti-solvente ao mesmo tempo por razão das diferentes interações de miscibilidade, originando partículas de polímero livres.

No capítulo V a reação que ocorre no processo é uma reação de polimerização instantânea onde umas das fases é a solução orgânica contendo o polímero e outra um FSC que se apresenta como anti-solvente. Porém é claramente visível na Figura 5.7 a formação de coalescência entre a maioria das partículas, e isto se deve a ausência de característica tensoativa do CO₂SC na reação. A incorporação da formação de uma emulsão em meio a este processo mostra-se estratégia significativa para a redução dos fenômenos de coalescência entre as

partículas. Para a preparação de emulsões razoavelmente estáveis é necessário a presença de um terceiro componente, um surfactante, o qual formará um filme adsorvido nas gotas dispersas, o que ajuda a impedir a coalescência aumentando a estabilidade da mesma. A formação de um filme de surfactante ao redor das gotas da emulsão facilita o processo de emulsificação e também tende a minimizar a coalescência das gotas. Contudo, um co-surfactante, como o CO₂SC pode se adicionado para aumentar ainda mais a área superficial, diminuindo assim a tensão superficial. Tal fenômeno pode ser verificado pela equação da energia interfacial de Gibbs (Rocha *et al.*, 2000):

$$G = \gamma \cdot A \quad \text{Eq. 7.1}$$

Onde G é a energia interfacial, γ é a tensão interfacial e A é a área interfacial. Sendo que, se diminuirmos a tensão interfacial, conseqüentemente a área interfacial será mais facilmente expandida para que a energia se mantenha constante.

Com base nos conhecimentos destes conceitos, apresentamos os resultados das emulsões preparadas de acordo com as condições estabelecidas na Tabela 7.1, e descrevemos as observações extraídas das imagens das partículas obtidas por meio de MEV acompanhada dos respectivos gráficos de distribuição de tamanho.

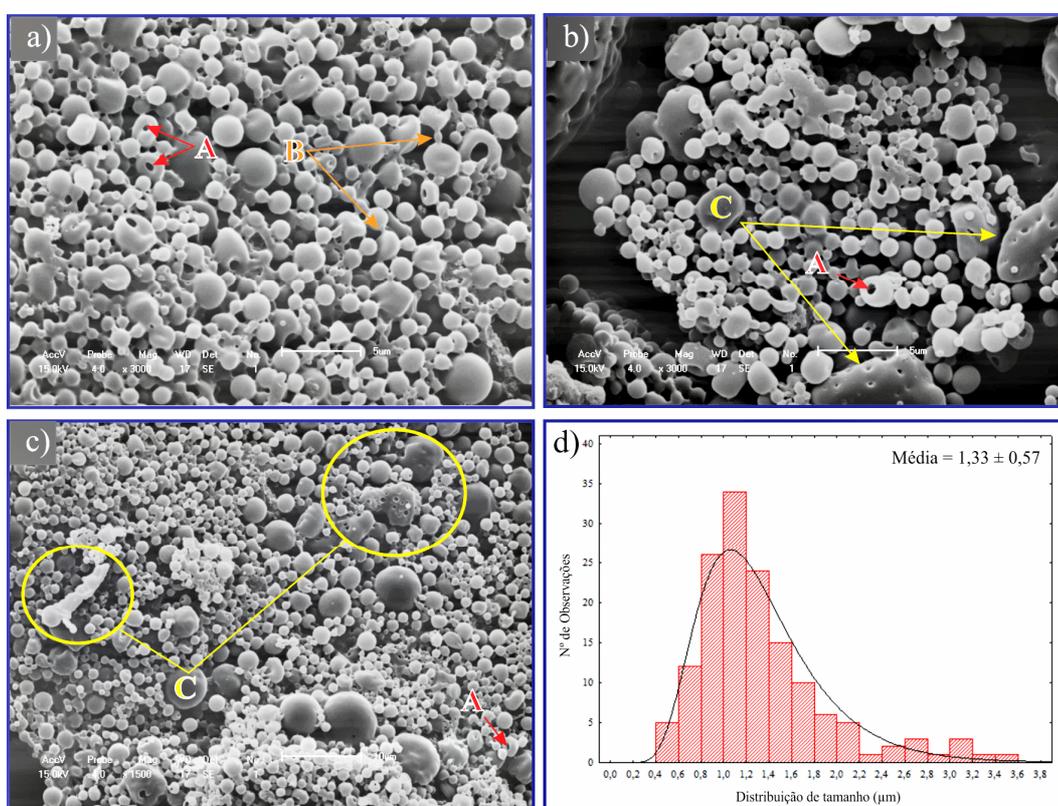


Figura 7.2 – Imagens das MPs obtidas sob condição experimental N°. 1 da tabela 7.1 e caracterizadas por MEV com aumento de: a) x3000; b) x3000; c) x1500. d) Distribuição de tamanho.

Podemos observar na Figura 7.2, onde as partículas foram obtidas sob condição experimental N^o. 1 da tabela 7.1, que houve uma redução considerável nos traços de coalescência entre as partículas, e aparece apenas em alguns pontos onde são identificados pelas setas da letra “B” em maiúsculo destacada na figura. O perfil da curva de distribuição de tamanho mostra que o tamanho médio do diâmetro das partículas é de $1,33 \pm 0,57 \mu\text{m}$ e uma população de MPs que se estendo a um tamanho máximo de $3,6 \mu\text{m}$. A letra “A” em destaque indica algumas partículas estruturalmente danificadas. Tal ocorrência deve-se a presença de CO_2SC no momento do processo de extração do solvente orgânico, e a saída do mesmo pode provocar um vacúolo danificando a estrutura da matriz polimérica.

O efeito do surfactante como tensoativo em condições experimentais estabelecidas na tabela 7.1, mostra que o aumento da concentração de PVA nas soluções teve efeito positivo relevante na redução do perfil de coalescência. Para a condição N^o. 2 com uma quantidade de 5% de PVA presente em água, duas vezes mais que na condição N^o. 1, o fenômeno de coalescência é pouco notado quando analisamos detalhadamente a Figura 7.3.

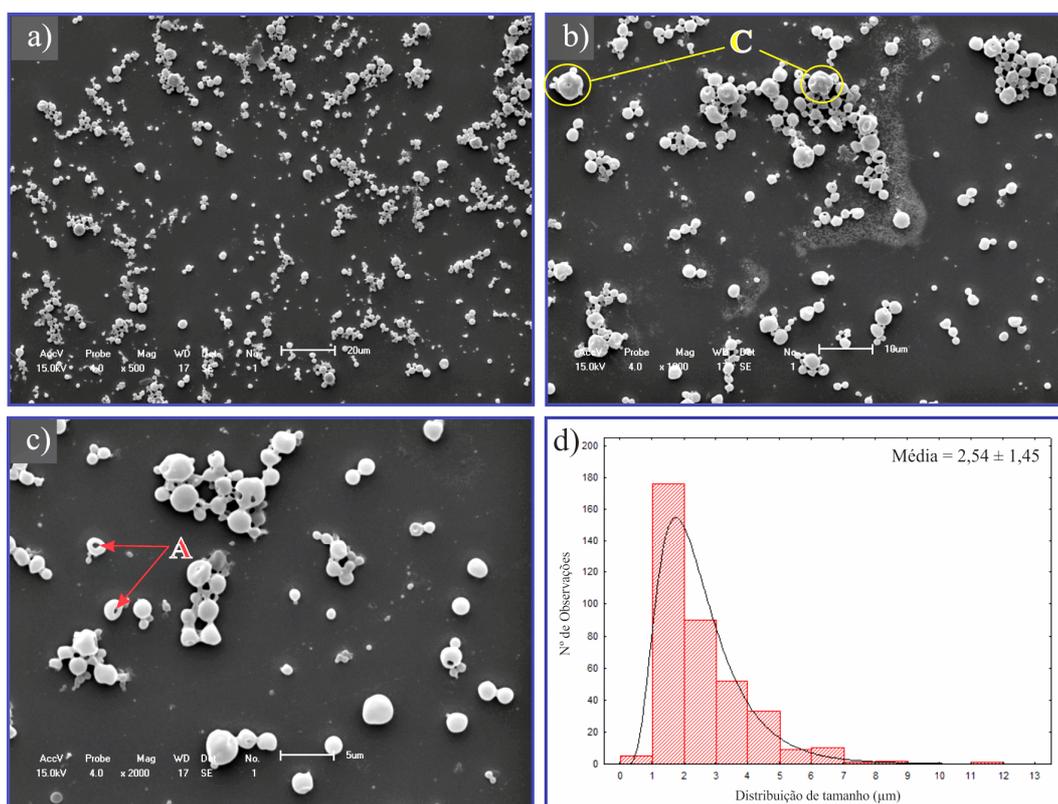


Figura 7.3 – Imagens das MPs obtidas sob condição experimental N^o. 2 da tabela 7.1 e caracterizadas por MEV de: a) x500; b) x1800; c) x2000. d) Distribuição de tamanho.

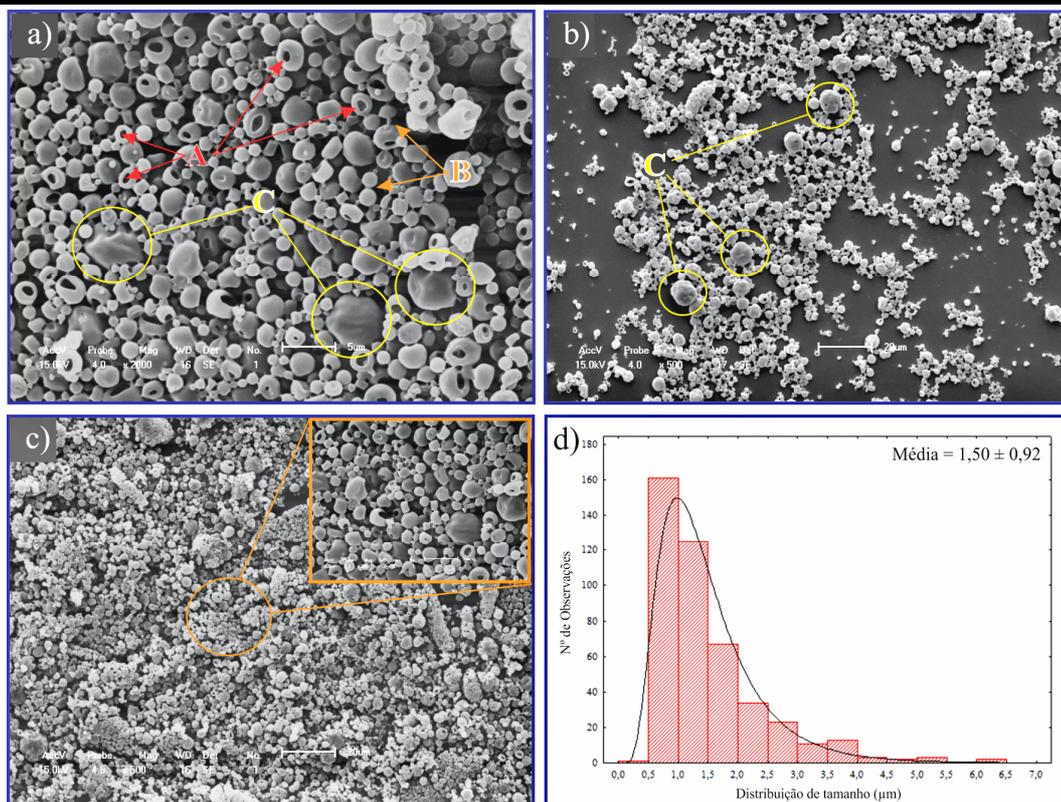


Figura 7.4 – Imagens das MPs obtidas sob condição experimental Nº. 3 da tabela 7.1 e caracterizadas por MEV de: a) x2000; b) x500; c) x500. d) Distribuição de tamanho.

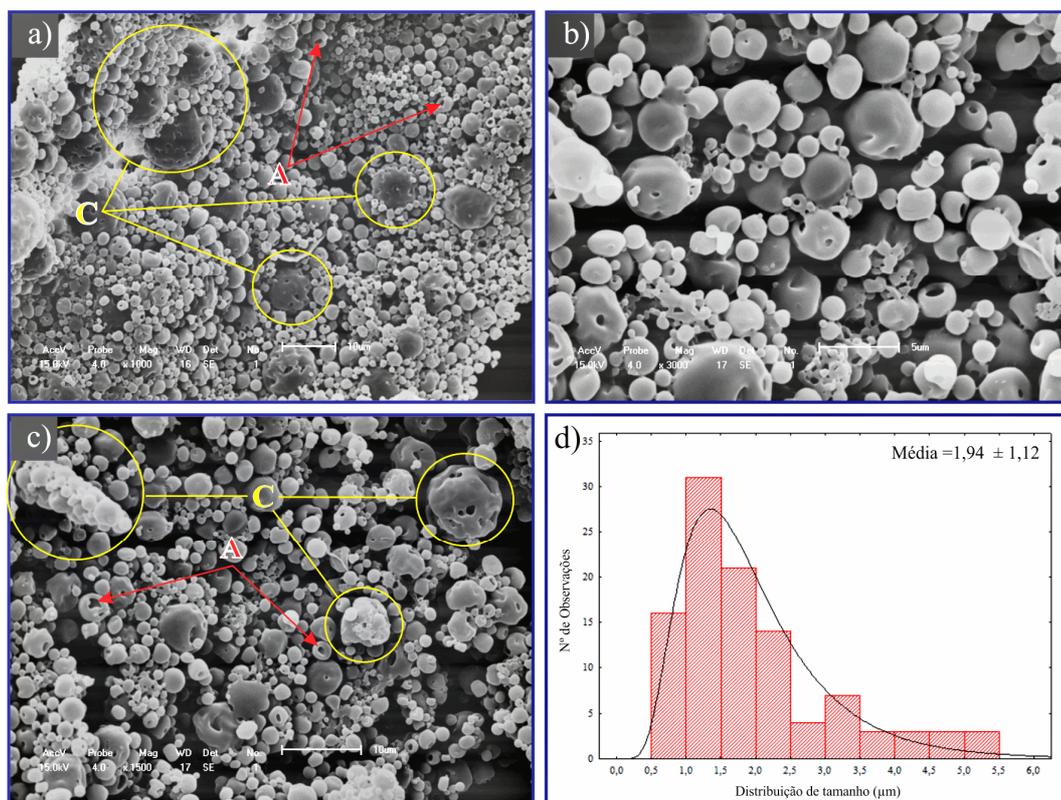


Figura 7.5 – Imagens das MPs obtidas sob condição experimental Nº. 4 da tabela 7.1 e caracterizadas por MEV de: a) x1000; b) x3000; c) x1500. d) Distribuição de tamanho.

Porém há presença de formação de algumas partículas aglomeradas que são apontados por setas e identificados pela letra “C” em quase todas as figuras. Tais aglomerados resultam de mudanças na estrutura da parede polimérica das MPs ocorridas durante a extração do solvente orgânico, oriundas de união instantânea de diversas gotas da emulsão durante o processo de formação ou durante o processo de lavagem e congelamento para secagem (pré-liofilização).

A morfologia das partículas obtidas para a condição experimental N° 2 pode ser observada na Figura 7.3 juntamente com o gráfico que mostra a distribuição de tamanho das partículas com tamanho médio de $2,54 \pm 1,45 \mu\text{m}$. Na Figura 7.4 pertencente às imagens microscópicas da condição experimental N° 3, obteve-se por meio de caracterização, um tamanho médio das partículas de $1,50 \pm 0,92 \mu\text{m}$. Observou-se a presença de alguns aglomerados e rugosidade em algumas partículas.

Os poros evidenciados em grande parte dos resultados são atribuídos à rapidez com que ocorreu a evaporação do solvente orgânico, e a rugosidade é característica do polímero PHBV puro e pode favorecer a degradação do mesmo, pois ela proporciona um aumento na área superficial do polímero (Senhorini, 2010). Este aspecto pode ser importante para uma etapa de aplicação em que consiste na degradação da matriz polimérica para a liberação de qualquer princípio ativo.

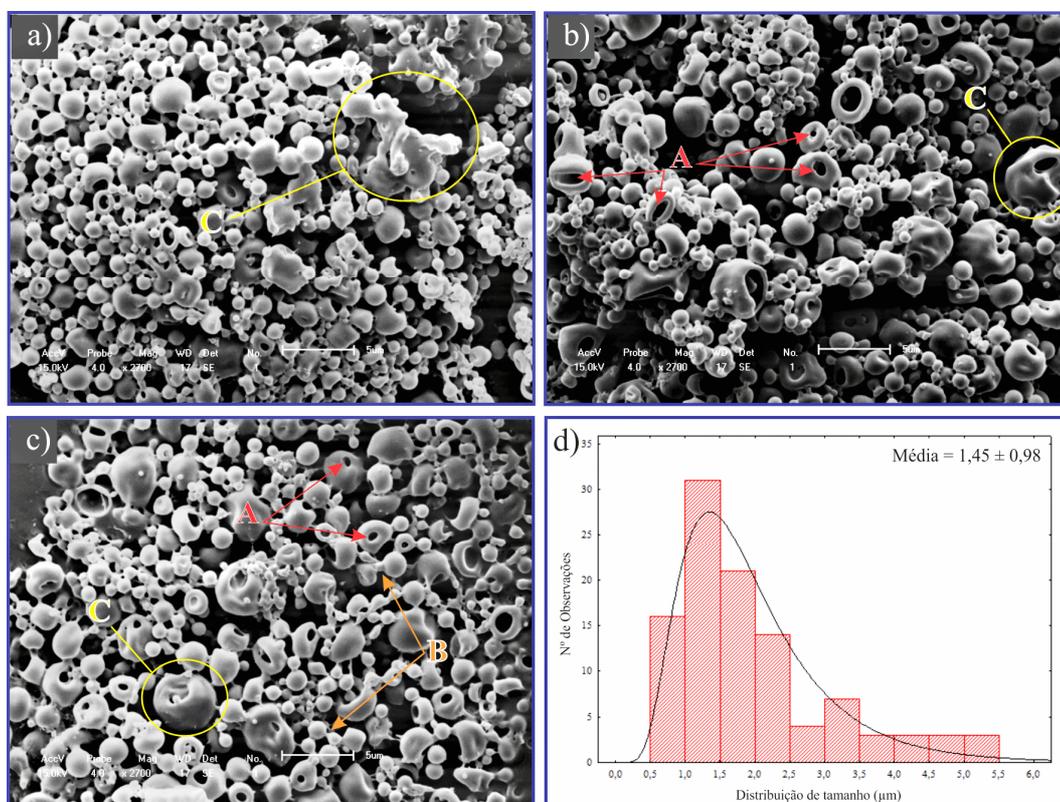


Figura 7.6 – Imagens das MPs obtidas sob condição experimental N°. 5 da tabela 7.1 e caracterizadas por MEV de: a) x2700; b) x2700; c) x2700. d) Distribuição de tamanho.

Ocorre que para a etapa de caracterização por MEV, as MPs foram secas por processo de liofilização e re-suspensas em água para posterior evaporação e melhor dispersão das mesmas assim como descrito no Capítulo VI (item 6.3). Caso este preparo não seja bem conduzido, condições extremas de temperatura e tempo de evaporação podem acarretar no surgimento de novos traços de aglomerações ou fundição/degradação das MPs.

Em alguns casos, como desidratação de suspensões, o efeito de coalescência pode ser amenizado com o uso de um agente crioprotetor. Os crioprotetores agem atribuindo a formação de uma matriz amorfa ao redor das MPs ou NPs, promovendo um espaçamento entre as mesmas, evitando a agregação durante a remoção do solvente orgânico e o congelamento. Os crioprotetores mais comuns citados na literatura são os carboidratos (Schaffazick *et al.*, 2003).

Os aspectos de rugosidade e má formação da estrutura polimérica também são destacados em alguns pontos das imagens microscópicas para a condição experimental N° 4 e distinguidos pela letra “C”. A avaliação morfologia feita a partir da Figura 7.5 mostra a maioria das partículas dispersas e com um tamanho de diâmetro médio igual a $1,94 \pm 1,12 \mu\text{m}$.

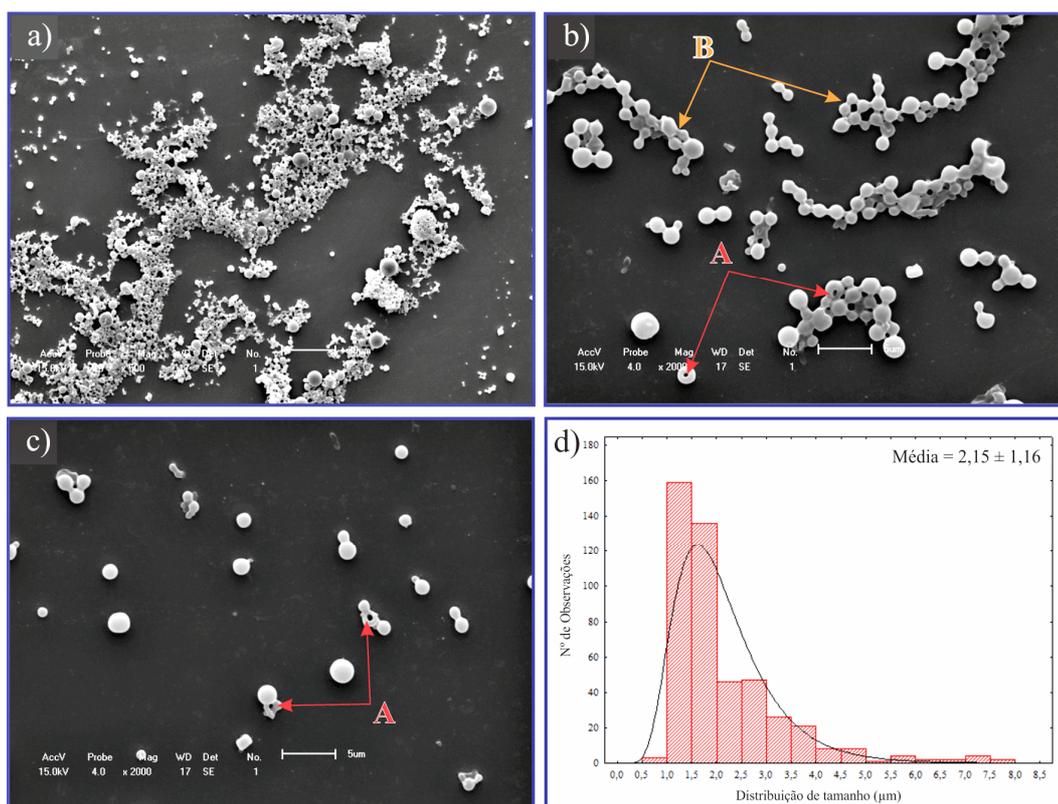


Figura 7.7 – Imagens das MPs obtidas sob condição experimental N°. 6 da tabela 7.1 e caracterizadas por MEV de: a) x500; b) x2000; c) x2000. d) Distribuição de tamanho.

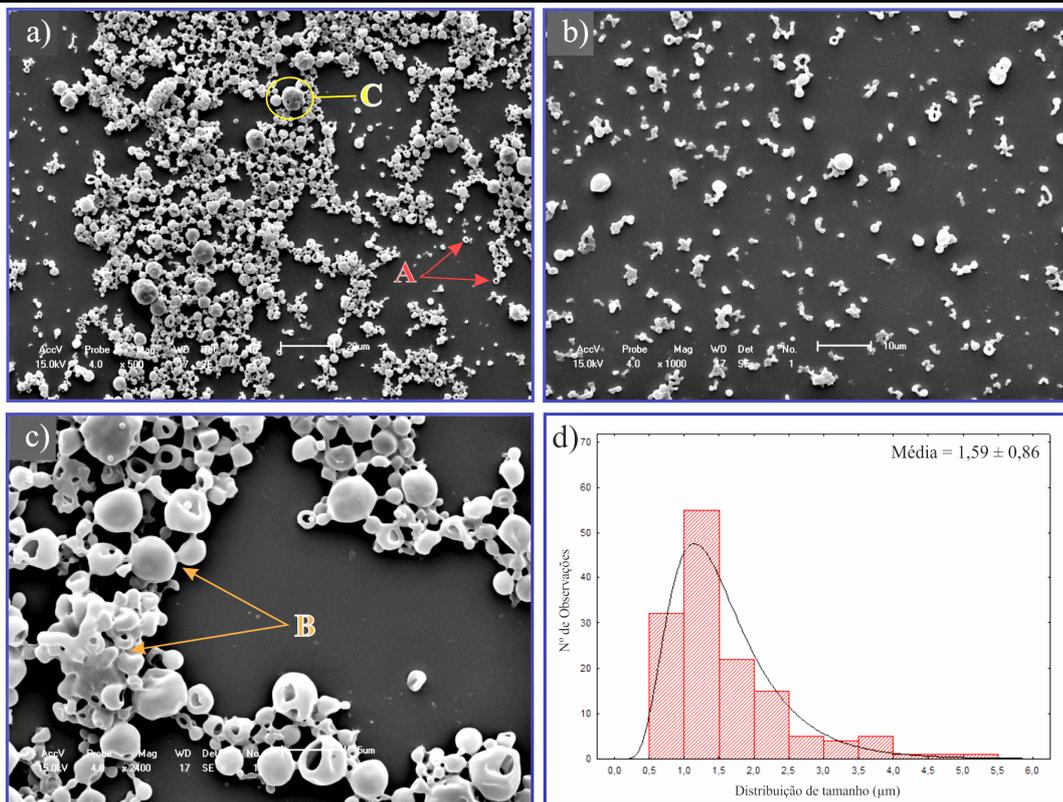


Figura 7.8 – Imagens das MPs obtidas sob condição experimental N°. 7 da tabela 7.1 e caracterizadas por MEV de: a) x500; b) x1000; c) x2400. d) Distribuição de tamanho.

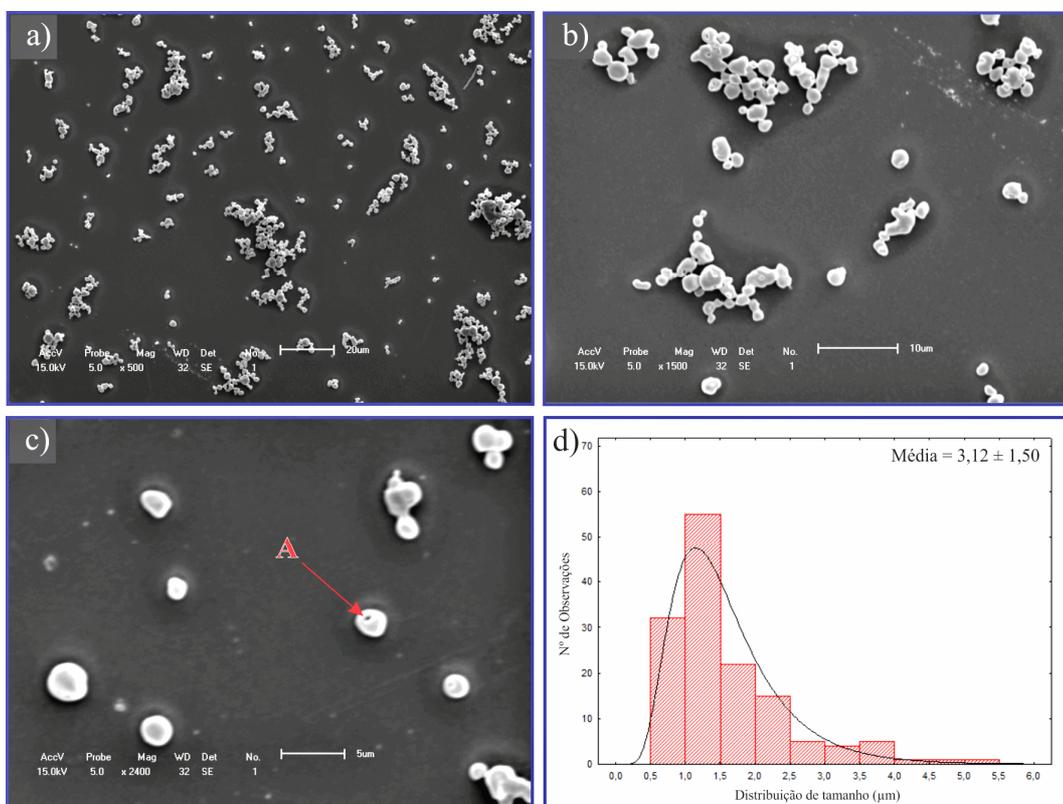


Figura 7.9 – Imagens das MPs obtidas sob condição experimental N°. 8 da tabela 7.1 e caracterizadas por MEV de: a) x500; b) x1500; c) x2400. d) Distribuição de tamanho.

Uma melhora relativa a este aspecto é evidenciado na Figura 7.6 onde os aspectos de aglomerações são reduzidos, mas surgem algumas partículas morfologicamente deformadas como aponta a letra “A”. A distribuição de tamanho médio das partículas desta condição (Nº 5) é igual a $1,45 \pm 0,98 \mu\text{m}$. Da mesma forma caracterizando os resultados das demais condições, evidenciando com letras maiúsculas os pontos de aglomeração “C”, coalescência “B” e deformação das partículas “A”. A Figura 7.7 apresenta imagens das partículas referentes à condição experimental Nº 6 com tamanho médio de $2,15 \pm 1,16 \mu\text{m}$, da mesma forma interpretamos a Figura 7.8, que caracteriza os resultados pertencentes à condição experimental Nº 7, que mostra um tamanho médio de partículas igual a $1,59 \pm 0,86 \mu\text{m}$. Por último abordamos a Figura 7.9 que ilustra a os aspectos morfológicos pertinentes a condição experimental Nº 8, onde foi avaliada a distribuição de tamanho das partículas resultando em um tamanho médio de $3,12 \pm 1,50 \mu\text{m}$.

7.4. CONCLUSÕES

Nos métodos tradicionais de nanoprecipitação a remoção do solvente orgânico ocorre por meio de evaporação convencional sob moderada agitação. Os mecanismos propostos na literatura indicam que a formação de NPs ocorre devido à turbulência interfacial gerada durante o deslocamento do solvente, o qual produz uma diminuição localizada da tensão interfacial dinâmica. A técnica apresentada acima mostrou que é possível promover a produção de uma emulsão instantânea a partir da mistura de duas soluções não miscíveis em proporções adequadas com o uso de duas bombas de fluxo contínuo ocasionando um encontro das soluções no decorrer do caminho. O uso de um capilar de diâmetro reduzido contribui para a formação de gotículas/micelas em pequenas escalas de tamanho e a interação do CO_2 em condições SC alimentado paralelo a emulsão, promove um leve efeito tensoativo ao mesmo tempo em que extrai e arrasta o solvente orgânico do meio. Os resultados obtidos mostram que a técnica é promissora e pode ser explorada para melhores resultados.

8. NPs DE PHBV PRODUZIDAS POR TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DO SOLVENTE DA EMULSÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO (SFEE)

Os estudos apresentados neste capítulo foram conduzidos no laboratório do prof. Dr. Sandro da Rocha na Wayne State University, na cidade de Detroit-Mi, EUA. Foram realizados estudos direcionados a obtenção de partículas de PHBV com tamanhos na ordem de 200 nm. Tomando como base os resultados obtidos nas etapas anteriores pelo método SAS Capítulo V e em estudos de técnicas de emulsão Capítulo VI e VII, notou-se a possibilidade da obtenção de partículas com tamanhos menores por meio da redução da massa molecular do polímero original, levando em consideração a influencia direta da viscosidade no tamanho das partículas durante o processo de formação. A redução da massa molecular foi conduzida utilizando o método de hidrólise ácida, com a obtenção de diferentes massas moleculares em diferentes tempos de reação. Para produção das NPs foi utilizada técnica de emulsão simples com o uso de surfactante seguido de extração do solvente orgânico por FSC. Os valores em termos de peso e massa molar foram obtidos por técnicas de viscosidade intrínseca e cromatografia permeável em gel (GPC) e a caracterização do tamanho e morfologia das partículas por MEV.

8.1. INTRODUÇÃO

No campo de liberação controlada de droga, a habilidade do controle de tamanho, morfologia e liberação de drogas das partículas são fundamentais para uma boa segmentação e eficácia, como uma partícula de tamanho pequeno que conduz a elevadas rotas de dissolução (Ginty *et al.*, 2005). Com recentes desenvolvimentos em nanotecnologia, vários estudos têm sido reportados sobre o uso de NPs com plataforma para uma variedade de aplicação incluindo detecção e liberação de drogas (Raj *et al.*, 2011), no entanto o uso de MPs e NPs parece ser um caminho muito interessante como estes sistemas que facilitam a difusão biológica por meio de barreiras (Costa *et al.*, 2007). NPs são partículas matrizes cuja massa inteira é sólida e as moléculas podem ser adsorvidas na superfície da esfera ou encapsulada dentro da partícula (Prasad Rao *et al.*, 2011), podem ser convenientemente preparadas a partir de polímeros pré-formados ou por polimerização direta de monômeros usando polimerização clássica ou polireações. Métodos como evaporação de solvente, diálises e tecnologia de FSC, envolvendo rápida expansão de solução SC ou rápida expansão de uma solução SC dentro de um solvente

líquido, podem ser utilizados para a preparação de NPs polimérica de polímeros pré-formados. Por outro lado, NPs poliméricas pode ser sintetizada diretamente por polimerização de monômeros usando várias técnicas de polimerização como micro-emulsão, mini-emulsão, emulsão livre de surfactante e polimerização interfacial (Prasad Rao *et al.*, 2011). No entanto, o uso de FSC como o CO₂SC tem provido uma alternativa limpa e efetiva para métodos tradicionais de processamento de drogas e polímeros (Ginty *et al.*, 2005).

Produção de micro e NPs usando tecnologia de FSC é técnica muito atraente, uma vez que fornece uma solução alternativa para vários problemas encontrados em técnicas tradicionais (Yeo e Kiran, 2005) como o uso de solventes tóxicos, altas temperaturas, ou estresse mecânico que causa degradação da droga (Ginty *et al.*, 2005). Existem atualmente diferentes caminhos para a formação de partículas usando FSC. O processo de antisolvente (SAS), partículas através de solução de gás saturado (PGSS), rápida expansão de soluções SC (RESS) (Alessi *et al.*, 1996) e extração do solvente da emulsão por FSC (SFEE) que é uma combinação entre técnica de emulsão e anti-solvente SC onde neste caso, o uso do CO₂SC para as NPs é proposto para aplicação após formação da emulsão, como agente de extração da fase óleo em água e obtenção de NPs livre de solvente. O solvente supercrítico (comumente CO₂) é adicionado na solução, e em geral, exibe maiores interações com o solvente do que o solúvel. Com consequência, o solvente original é preferencialmente solúvel na fase SC e uma grande variação (decréscimo) da densidade é obtida. A grande vantagem do uso do FSC é a possibilidade da produção de uma fase sólida com única morfologia em condições de operação moderada (Alessi *et al.*, 1996). Estas técnicas são baseadas em um princípio simples onde a droga e um polímero são co-precipitados juntos usando as propriedades de antisolvente (não-solvente) do CO₂SC, uma vez que muitos polímeros e drogas não são solúveis em CO₂SC (Chattopadhyay *et al.*, 2006).

Com base nestes estudos, neste Capítulo NPs de PHBV são produzidas por técnica SFEE, considerando que, a alta difusividade e baixa viscosidade do FSC promovem rápida penetração e extração do solvente da amostra, a solubilidade do componente no FSC pode proporcionar uma indicação básica de viabilidade técnica de qualquer processo de extração por FSC (Asghari-Khiavi *et al.*, 2003).

8.2. PARTE EXPERIMENTAL

8.2.1. REDUÇÃO DA MASSA MOLECULAR DO PHBV

A redução da massa molecular do polímero PHBV foi obtida via hidrólise ácida usando uma solução de HCl 6N. 400 mg de PHBV foram adicionadas em 50 mL de solução ácida (HCl 6N) a uma temperatura controlada de 105 °C, e a reação de depolimerização ocorreu em diferentes tempos para se obter polímeros de diferentes massas moleculares. Após a reação, o PHBV depolimerizado foi filtrado e lavado três vezes com água deionizada para remoção da solução ácida e redução do pH, e uma vez lavado com metanol para remoção de traços residual.

8.2.2. PREPARAÇÃO DA EMULSÃO (EMULSÃO CONVENCIONAL)

Foram preparadas emulsões do tipo água/óleo, onde 16 mg de PHBV (para diferentes pesos moleculares) foram dissolvidos em 2 mL de diclorometano (8 mg/mL). Em primeiro momento a solução orgânica foi gotejada por uma seringa com agulha lentamente em 5 mL de solução de surfactante (PVA 5% em água deionizada) sob agitação magnética para formação de uma pré-emulsão (Figura 8.1.a). Em uma segunda etapa a solução obtida na pré-emulsão foi submetida à ultrasonicador de alta frequência (OMNI CORP, modelo OmniRUPTOR 250) por um intervalo de tempo de 2 minutos (50W – 10 pulsos) em banho de gelo (Figura 8.1.b).

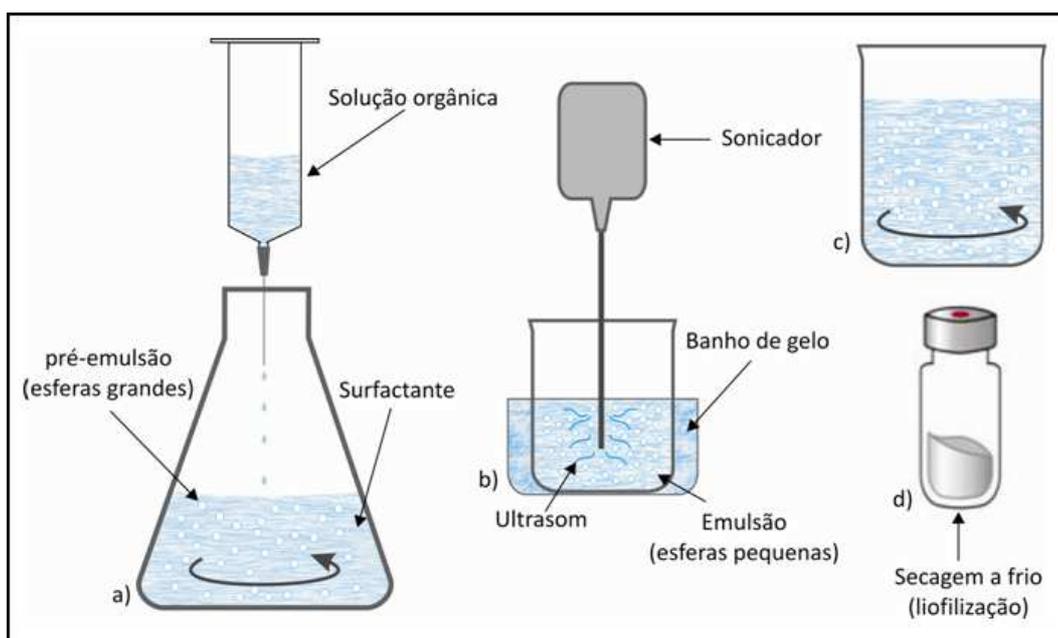


Figura 8.1 – Esquema do método utilizado para realizar a emulsão convencional.

Para remoção do solvente orgânico no processo de emulsão convencional, a emulsão obtida foi dispersa em 200 mL de solução de surfactante (PVA 0,5% em água) e manteve-se sobre agitação moderada durante 12 horas para total evaporação do solvente orgânico (Figura 8.1.c). Após remoção do solvente orgânico foi feita remoção do surfactante de acordo com a metodologia apresentada no Item 6.2.2 do Capítulo VI. As partículas permaneceram dispersas em água deionizada após processo de lavagem e foram congeladas e secas por processo de liofilização.

8.2.3. PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO SOLVENTE ORGÂNICO POR FSC

O processo de extração de solvente orgânico utilizando a técnica SFEE, do inglês “supercritical fluid extraction of emulsion” foi conduzido por um aparato (Figura 8.2) contendo uma bomba de alta pressão do tipo seringa (ISCO, modelo 260D) para pressurização e controle do fluxo de alimentação do CO₂, uma bomba de fluxo contínuo para líquidos do tipo bomba de HPLC (WATERS, modelo 501) para alimentação da solução orgânica contendo emulsão, um vaso cilíndrico de alta pressão de volume igual a 40 mL com sistema de aquecimento e coletor de amostra, um sistema de pré-aquecimento, um sistema de alimentação tubo-capilar em modo concorrente com capilar de diâmetro interno igual a 150 µm e uma válvula reguladora de pressão do tipo BPR.

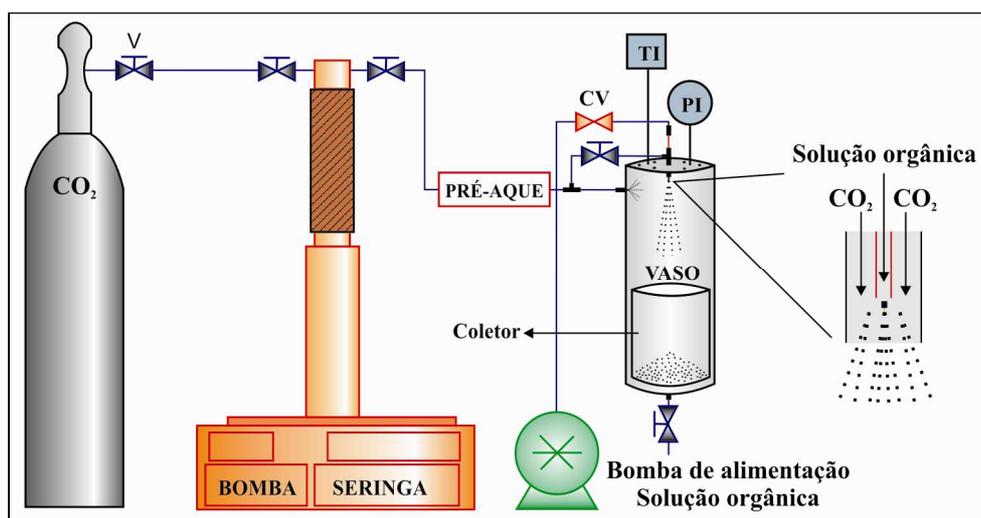


Figura 8.2 – Esquema do aparato experimental utilizado para SFEE.

Primeiramente foi estabelecido condição de temperatura do sistema ajustando o pré-aquecedor e o sistema de aquecimento do vaso em temperaturas iguais. A bomba tipo seringa foi alimentada de CO₂ e foi preparada emulsão utilizando método convencional apresentado no

tópico 8.2.2 desta parte experimental. O sistema foi pressurizado com CO₂ até alcançar a condição de pressão desejada. A bomba foi operada em modo de fluxo constante tendo a pressão do sistema controlada pela válvula reguladora de pressão do tipo BPR localizada na saída do vaso. Com as condições de operação estabelecidas iniciou-se a alimentação da emulsão pela bomba tipo HPLC paralelo ao fluxo contínuo de CO₂. Após alimentação total da emulsão iniciou-se lentamente a despressurização do sistema juntamente com a queda natural de temperatura do sistema de aquecimento do vaso, e com o sistema totalmente despressurizado o vaso foi aberto e feito a coletada da amostra retida no coletor. As condições de operação como temperatura e pressão foram selecionadas com o objetivo de facilitar o máximo a extração da fase orgânica e a perda mínima de polímero dissolvidos/arrastados por CO₂SC.

Tabela 8.1 – Condições operacionais utilizadas no sistema SFEE para produção de NPs de PHBV.

Condições operacionais	Valores
Pressão da câmara de expansão	100 bar (10 MPa)
Temperatura do vaso de expansão	313 K
Fluxo de alimentação da emulsão	0,5 mL/min
Fluxo de CO ₂	10 mL/min

8.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

8.3.1. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DO POLÍMERO

O peso molecular do polímero degradado por hidrólise ácida foi determinado por técnica de viscosidade intrínseca e por GPC. Primeiramente a viscosidade da solução do polímero foi medida com viscosímetro do tipo Ubbelohde em clorofórmio a uma temperatura de 25 °C. Foram utilizadas as constantes de Mark-Houwink onde $\alpha = 0.82$ e $K = 6.0 \times 10^{-3} \text{ dL/g}$ $[\eta] = K.Mw^\alpha$ (Baran *et al.*, 2002). Para cada polímero de diferente peso molecular foram preparadas soluções contendo diferentes concentrações em relação ao solvente orgânico, e feito medição do tempo de escoamento através do capilar do viscosímetro nas devidas condições estabelecidas. Com os tempos de escoamentos obtidos foram calculados: $n(r)$ – viscosidade relativa, $n(sp)$ – viscosidade específica, $n(in)$ – viscosidade inerente e $n(red)$ – viscosidade reduzida. Um gráfico foi construído com os dados das viscosidades reduzida e inerente para se

obter $[\eta]$, conforme podemos observar na Figura 8.3. Os dados de massa viscosimétrica (M_v) obtidos para todos os polímeros degradados encontram-se na Tabela 8.2.

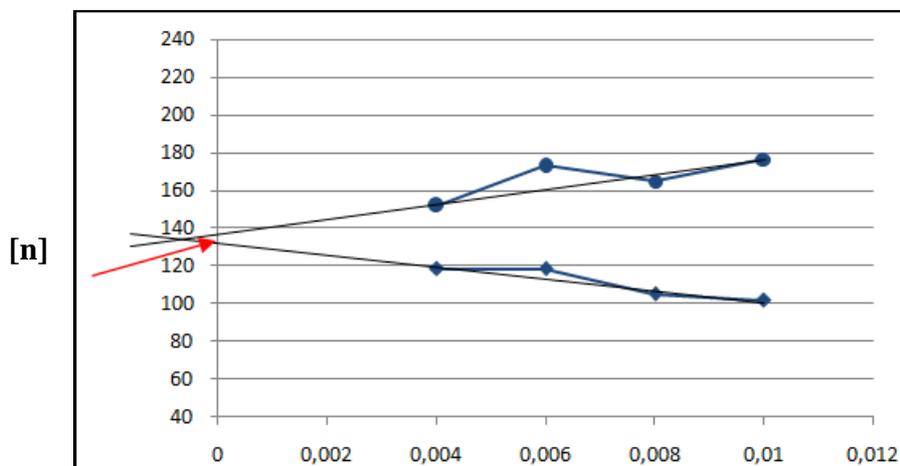


Figura 8.3 – Gráfico da viscosidade intrínseca obtido a partir dos dados de (●) $n(\text{red})$ e (◆) $n(\text{in})$ para encontrar $[\eta]$.

O peso molecular absoluto das amostras foi determinado pelo método de GPC usando um cromatógrafo modelo Viscotek GPCmax VE2001 equipado com triplo detector consistindo de: detector de índice de refração (RI), detector viscosimétrico e detector de espalhamento de luz (modulo 270 Dual Detector Viscotek). As amostras injetadas (200 μm) foram submetidas à separação em uma coluna Waters Styragel HR5E termostaticada a 30 °C e utilizado como fase móvel CHCl_3 sob fluxo de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A integração dos picos obtidos pelos detectores permite a obtenção da massa molar absoluta da amostra. Os valores determinados por GPC também podem ser visualizados na Tabela 8.2 e apresentam os valores de M_v (peso molecular médio viscosimétrico), M_w (peso molecular médio ponderado) e M_n (peso molecular médio em número).

8.3.2. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Análise de RMN de H^1 foi realizada nas amostras de PHBV degradadas utilizando um espectro de alta resolução (Varian Mercury – 400 espectrofotometro). Para análise o polímero foi dissolvido em CDCl_3 usando uma concentração padrão de 10 mg/0.8 mL.

8.3.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA POR VARREDURA (MEV)

A morfologia das NPs de PHBV obtidas neste capítulo foi avaliada por MEV (modelo Joel – JSM-6510LV-LGS). Primeiramente foi feita a preparação das amostras dispersando as NPs em água deionizada e posteriormente gotejando uma pequena quantidade da solução em lamínula de vidro (tipo microscópio - 18 mm²). A lamínula com as gotas da solução dispersa foi posta em uma capela com exaustor para que ocorresse total evaporação da água. As NPs que permaneceram na lamínula foram metalizadas com ouro em um metalizador (Ernest Fullam) por 35 segundos e o microscópio eletrônico operado a 25 kV.

8.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

8.4.1. RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO DO PHBV

Muitos trabalhos sobre micro e NPs incluindo biopolímeros mostram a influência direta entre o tamanho das partículas e o peso molecular do polímero. Desta forma o processo de redução do peso molecular do PHBV foi realizado e caracterizado com o objetivo de ter certeza da eficiência do processo e conhecer o peso molecular real obtido em termos de Mw, Mv e Mn.

É possível observar que os tamanhos das partículas estão diretamente relacionados com o peso molecular do polímero. O peso molecular é um dos fatores mais importantes que governa as propriedades dos polímeros (Luo *et al.*, 2002). Peso molecular e distribuição do peso molecular afeta a resistência mecânica do polímero e o desempenho quando usado em sistema de liberação controlada de medicamentos. A redução do peso molecular resulta em uma estrutura mais permeável, promovendo um crescimento na faixa de degradação e propriedades que podem também influenciar na rota de biodegradação e hidrólise do polímero (Montoro *et al.*, 2011), desta forma estes aspectos indicam a diminuição da viscosidade do PHBV em solventes orgânicos e que afetam a diminuição do tamanho das gotas durante o processo de emulsão por ultrasonificação. A viscosidade da emulsão pode aumentar ou diminuir aparentemente o tamanho das partículas quando as gotas são adicionadas ao meio aquoso e as características da emulsão convencional podem ser controladas pela variação da dimensão das gotas, o que pode aumentar ou diminuir a rota de liberação da droga (McClements, 2010).

As amostras de PHBV degradados obtidas por hidrólise ácida foram analisadas por RMN de H¹ com propósito de mostrar que a estrutura molecular do polímero não foi alterada

durante o processo de reação e que se mantiveram as características originais da estrutura do polímero original. Uma análise aprofundada da amostra de PHBV foi apresentada no Capítulo III, e a análise de RMN H^1 comparativa das amostras degradadas apresentadas na Figura 8.4 pode ser avaliada de acordo com observações e discussões pertinentes a Figura 3.2 do item 3.4 deste trabalho.

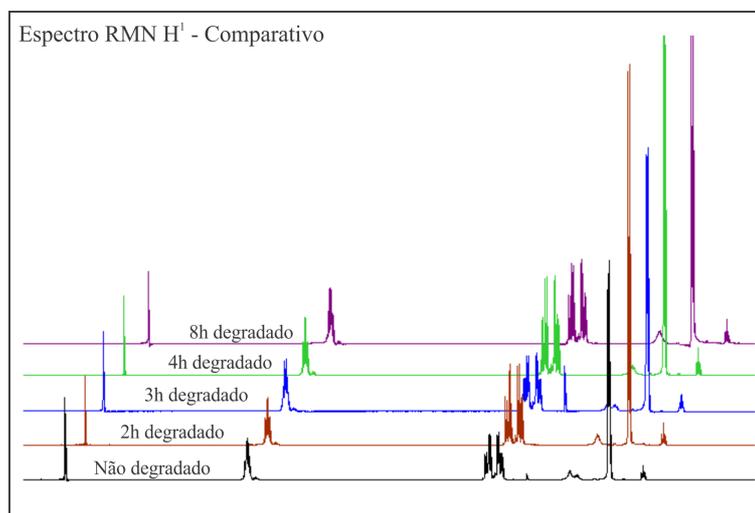


Figura 8.4 – Espectro de RMN H^1 comparativo para as amostras de PHBV degradadas por processo de hidrólise ácida.

Os picos que se referem ao espectro do polímero não degradado foram caracterizados no item 3.4, e uma análise visual comparativa mostra que o processo de degradação no qual o polímero foi submetido não alterou a estrutura do mesmo. É possível notar que os grupos metil, metino e metileno que aparecem no espectro de H^1 da amostra original mantiveram-se nas demais amostras de peso molecular modificado.

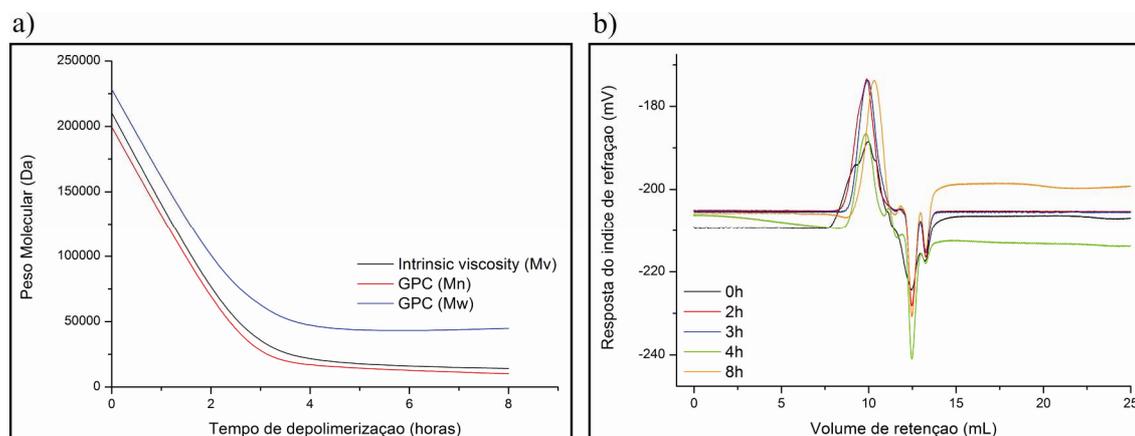


Figura 8.5 – (a) Tendência da diminuição da massa molecular do PHBV considerando M_v , M_n e M_w , (b) Curvas das análises de PHBV por GPC.

A análise de GPC e a Viscosidade Intrínseca (VI) mostraram a redução do peso molecular do PHBV degradado nos tempos de 2, 3, 4 e 8 horas. Para as análises de GPC foram preparadas soluções de PHBV em CHCl_3 a uma concentração de 5 mg.mL^{-1} , e poliestireno padrão com baixa polidispersidade foi utilizado para gerar a curva de calibração. Os resultados interpretados em valores reais são apresentados na Tabela 8.2.

Tabela 8.2 – Resultados das análises de PHBV obtidos por GPC, viscosidade intrínseca e RMN de ^1H .

Tempo de depolimerização	M_v (Daltons)	M_n (Daltons)	M_w (Daltons)	M_w/M_n	% HB	%HV
Não degradado	210.379	199.626	228.515	1,145	94,65	5,35
2 horas	69.024	63.045	92.466	1,467	94,70	5,30
3 horas	32.031	22.453	61.068	2,720	94,60	5,40
4 horas	17.452	15.134	40.665	2,687	94,75	5,25
8 horas	14.080	10.143	44.890	4,426	94,00	6,00

A viscosidade intrínseca foi obtida com diferentes concentrações de PHBV em CHCl_3 para calcular as viscosidades inerente, reduzida, específica e relativa. A Figura 8.5 (a) mostra as curvas dos pesos moleculares obtidos em termos de M_w , M_v e M_n em Daltons (Da) e (b) mostra as curvas obtidas por GPC e. Os dados interpretados na Figura 8.5 (a) mostram que os resultados obtidos pelo método de viscosidade intrínseca ficaram condizentes com os dados obtidos por GPC, considerando que para os polímeros as massas moleculares podem variar sendo $M_w \geq M_v \geq M_n$.

8.4.2. ESTUDO MORFOLÓGICO DAS NPS DE PHBV

É de grande importância se ter um controle morfológico e de micronização para componentes com dispersão sólida usando tecnologia envolvendo CO_2SC . As propriedades físico-químicas do CO_2SC são fatores chaves no design de partículas. Em particular, a solubilidade em CO_2SC é o maior pré-requisito para o desenvolvimento de partículas usando CO_2SC , tanto é que a aplicabilidade desta tecnologia depende do fator de solubilidade. As NPs resultaram de um processo combinado entre a tecnologia FSC e emulsão convencional. A extração com CO_2SC mostrou ser um processo efetivo para a manufatura de NPs sólidas livre de solvente orgânico. Os

experimentos conduzidos usando o processo SFEE tiveram como objetivo estudar as características do processo de extração como tempo requerido para a completa extração do solvente, variáveis do controle de tamanho e todos os parâmetros que foram essenciais para a produção assegurada ao se ter uma suspensão aquosa com distribuição de tamanho pequeno e mínimo solvente residual. Desta forma, uma comparação da técnica SFEE entre o processo de emulsão convencional permitiu avaliar a influência direta das características do CO₂SC na produção de NPs. O processo envolvendo SFEE não apenas limita a extensão de agregação de partículas durante a remoção do solvente orgânico por redução drástica do tempo de extração do solvente orgânico, mas também permite facilmente criar um processo contínuo, a eficiência da extração usando CO₂SC é muito maior do que os métodos convencionais como evaporação, extração líquida e diluição, e oferece um alto potencial no campo de produção de partículas, uma vez que se obtêm produtos puros e livres de solvente quando operados a temperaturas moderadas (Furlan *et al.*, 2010 e Chattopadhyay *et al.*, 2006).

As NPs obtidas nos processos de emulsão simples e SFEE foram caracterizadas por MEV e as imagens foram analisadas e avaliadas de acordo com a metodologia de caracterização utilizada no item 5.3.1 do Capítulo V deste trabalho para obtenção de aspectos morfológicos, tamanho médio e a distribuição de tamanho das partículas. Os resultados obtidos mostram que a variação na escala de tamanho das partículas foi determinada em função do peso molecular do polímero classificado na tabela (8.2). As condições de operações expressas na tabela 8.1 mantiveram-se fixas e de acordo com considerações e observações vistas na literatura de Chattopadhyay *et al.*, 2005, alterações operacionais de pressão e temperatura não influenciam significativamente no tamanho das partículas, pois o tamanho médio das mesmas está relacionado com o tamanho das gotículas, da natureza da emulsão e do peso molecular do polímero.

O peso molecular é um dos fatores mais importantes que regem as propriedades de um polímero (Luo *et al.*, 2002). O peso molecular e a distribuição do peso molecular afeta a resistência mecânica do polímero e sua performance quando usado em sistemas de administração de drogas. A redução do peso molecular resulta em uma estrutura mais permeável, promovendo um aumento na taxa de degradação e propriedades que podem também influenciar na taxa de biodegradação e hidrólise do polímero (Montoro *et al.*, 2011).

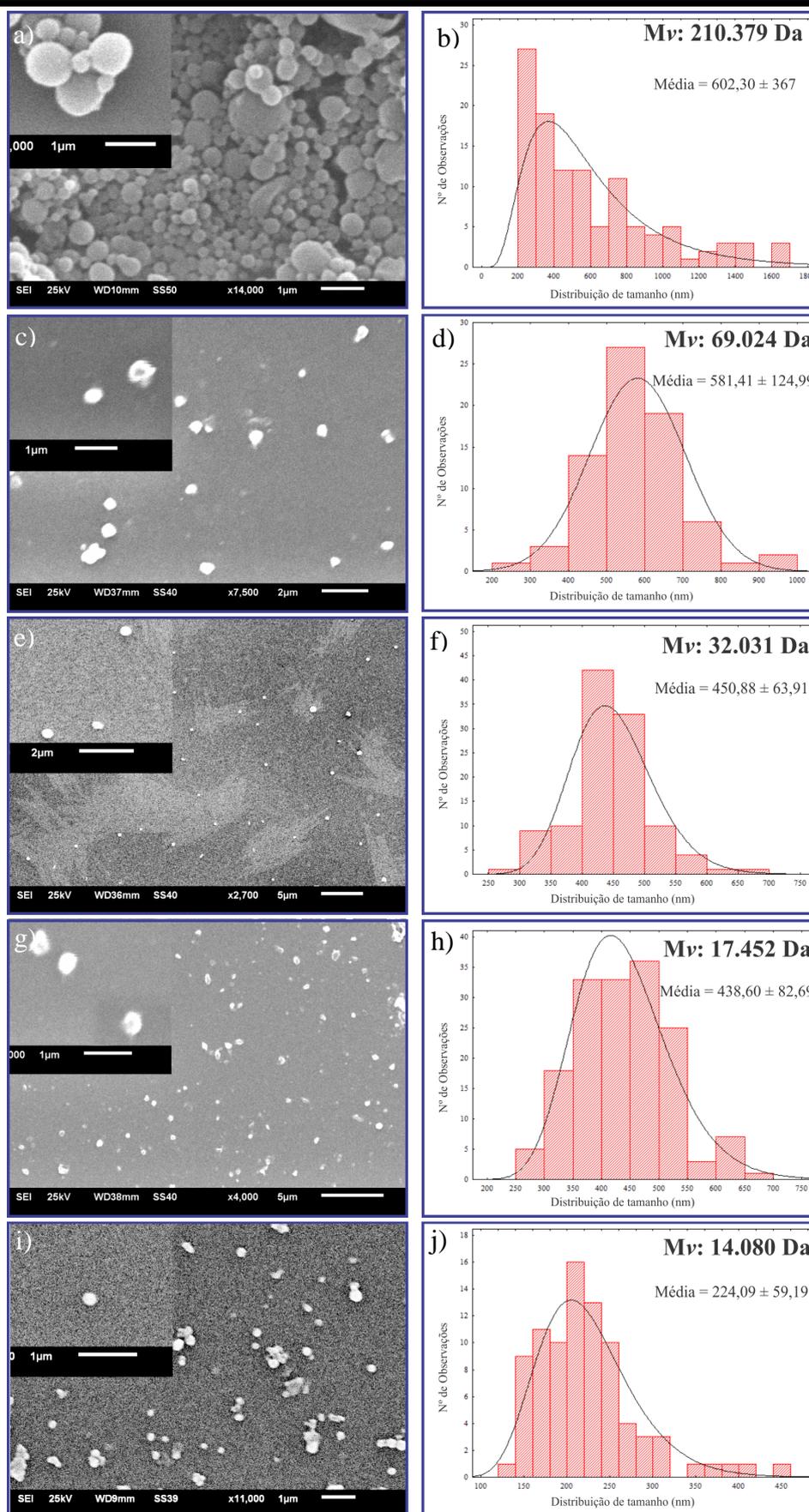


Figura 8.6 – Imagens das NPs de PHBV obtidas com polímero de diferentes pesos moleculares por meio de técnica de emulsão convencional.

Primeiramente foram avaliadas as NPs obtidas pelo método de emulsão convencional para as amostras de PHBV de diferentes pesos moleculares. As imagens de microscopia eletrônica foram juntadas na Figura 8.6 e são descritas separadamente para visualização da morfologia e dos respectivos tamanhos médio das NPs em escala de nanômetros. A ordem do tamanho das partículas manteve-se diretamente proporcional ao peso molecular do polímero. Como é apresentado na Figura 8.6, as imagens (a) mag. x14.000, (c) mag. x7.500, (e) mag. x2.700, (g) mag. x4.000 e (i) mag. x11.000, referem-se às NPs obtidas por MEV para as amostras de peso molecular (M_v) que variam entre 14.080 a 210.379 Da, e as imagens (b), (d), (f), (h) e (j) mostram a distribuição de tamanho médio equivalente em todas as amostras de PHBV de peso modificado. Os tamanhos médios variam entre $244,09 \pm 59,19$ a $602,30 \pm 367,99$ Da. Os resultados são descritos na tabela 8.3.

De modo similar são apresentados os resultados das NPs obtidos por meio de extração do solvente por FSC. A análise de caracterização foi conduzida por meio de MEV seguida de avaliação do tamanho médio das partículas por meio de curva de distribuição. Os aspectos morfológicos podem ser identificados na Figura 8.7 onde as imagens de MEV estão classificadas de acordo com o peso molecular das amostras de PHBV em ordem decrescente e com magnitudes variadas sendo: (a) x5.000, (c) x6.000, (e) x3.700, (g) x9.000 e (i) x40.000, e pesos moleculares (M_v) entre 14.080 a 210.379 Da. Para esta técnica os tamanhos médios das NPs variaram entre $170,84 \pm 32,52$ a $645,86 \pm 266,72$ e os gráficos das distribuições de tamanho são apresentados nas imagens (b), (d), (f), (h) e (j) da Figura 8.7 em ordem decrescente relativo ao peso molecular da amostra.

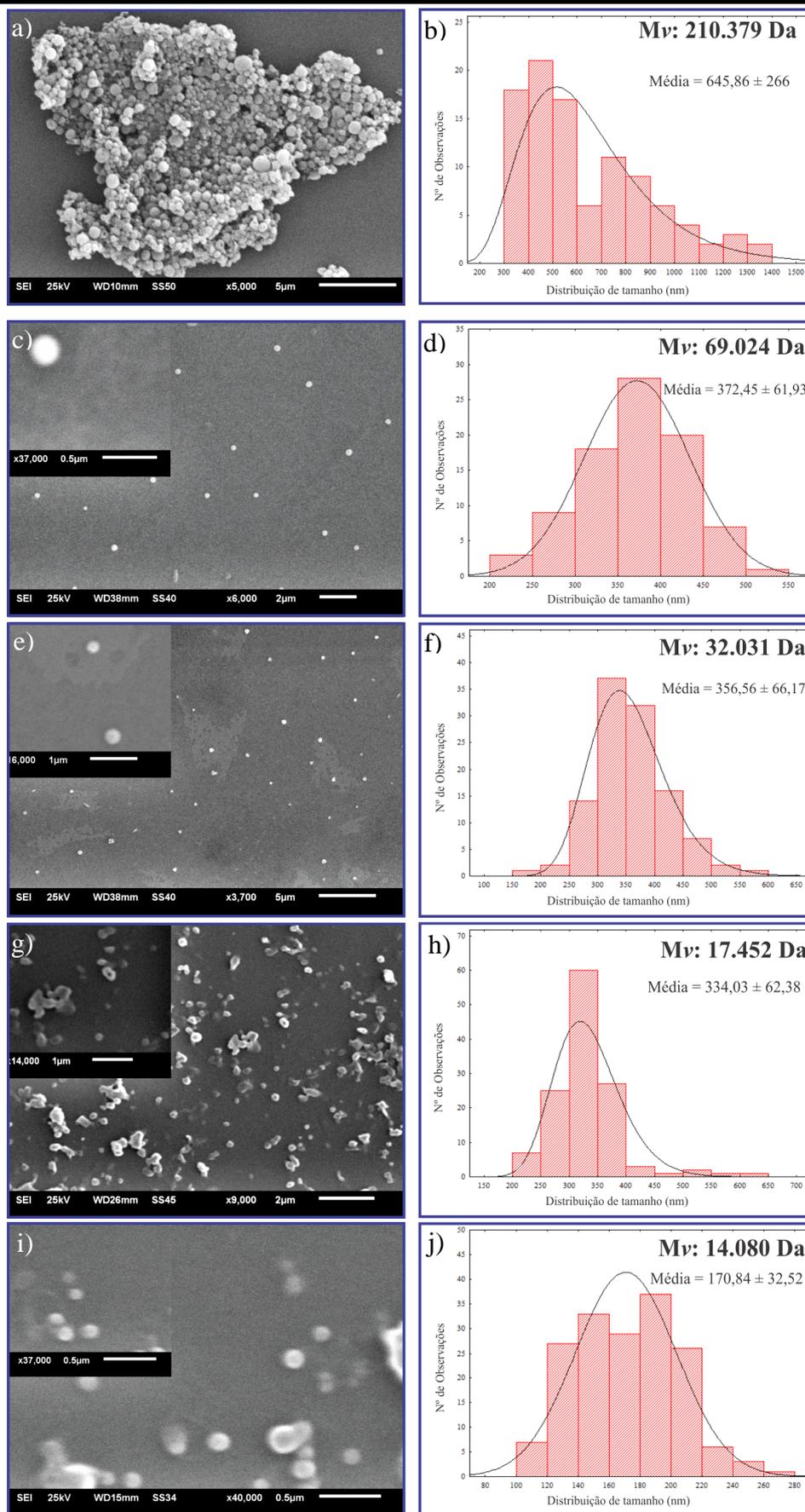


Figura 8.7 - Imagens das NPs de PHBV obtidas com polímero em diferentes pesos moleculares por meio de técnica de SFEE.

Tabela 8.3 – Tamanho médio das NPs em função do PHBV de diferentes pesos moleculares.

PHBV	Emulsão convencional	Extração por FSC
M_v (Da)	Diâmetro médio (nm)	Diâmetro médio (nm)
210.379	602,30 ± 367,08	645,86 ± 266,72
69.024	581,41 ± 124,99	372,45 ± 61,93
32.031	450,88 ± 63,91	356,56 ± 66,17
17.452	438,60 ± 82,69	334,03 ± 62,38
14.080	224,09 ± 59,19	170,84 ± 32,52

O surfactante mostrou ótima eficiência como estabilizador das gotas formando partículas esféricas regulares. Pich *et al.*, 2006 e Prasad Rao *et al.*, 2011 mostram que com o aumento da concentração de PVA no sistema leva a diminuição das gotas na emulsão contendo PHBV, enquanto a velocidade de homogeneização, a rota de evaporação ou secagem a frio influenciaram levemente no tamanho das partículas.

No entanto é preciso ter alguns cuidados na remoção do surfactante e no processo de lavagem. O uso de alta potencia do ultrason para dispersar partículas no momento da lavagem pode causar impacto negativo nas partículas agredindo a morfologia por meio de degradação/fusão ocasionadas pela liberação excessiva de calor (Figura 8.8).

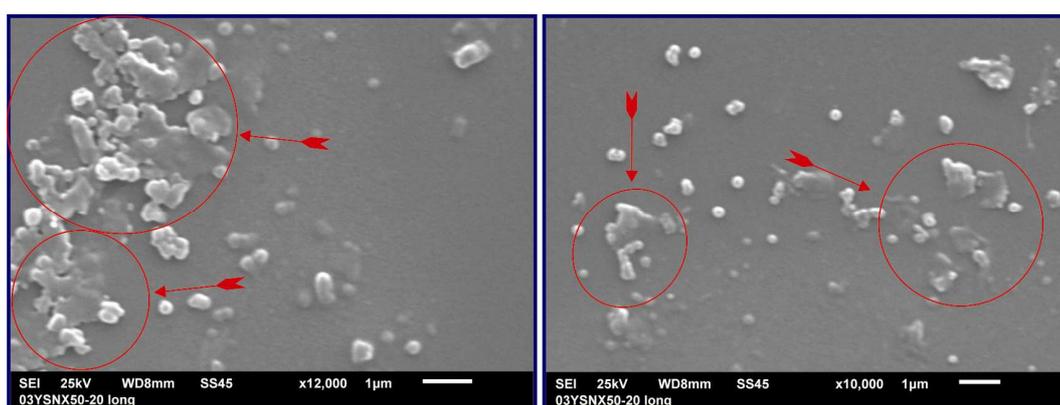


Figura 8.8 – NPs fundidas ou degradadas após processo de dispersão por ultrason.

8.1. CONCLUSÕES

Como se pôde notar, a redução do tamanho das partículas foi conduzida em concordância com a característica mais permeável da estrutura do PHBV em função do decréscimo do peso molecular do polímero, estes aspectos indicam que o decréscimo da viscosidade no solvente orgânico afetou no diâmetro da gota durante o ultrason. A viscosidade de uma emulsão pode aumentar ou diminuir apreciavelmente o tamanho das partículas se as gotículas são adicionadas à solução aquosa, e as características de emulsões convencionais podem ser controladas variando a dimensão das gotículas (McClements, 2010). Sendo assim as partículas obtidas a partir do PHBV de diversos pesos moleculares mantiveram-se na ordem de nanômetros e variaram entre $170,84 \pm 32,52$ a $645,86 \pm 266,72$ nm. O processo de extração do solvente por meio de FSC (SFEE) mostrou-se relativamente eficiente para a obtenção de NPs com tamanhos médios um pouco abaixo dos obtidos no sistema convencional. Isto confirma as discussões revisadas acima que relata a importância do CO₂SC como agente de extração para solventes a ele miscíveis e o seu moderado potencial tensoativo a estas condições, proporcionando uma melhor acomodação da estrutura polimérica durante o tempo de formação morfológica da matriz.

9. ESTUDOS INICIAIS DE CARREGAMENTO E LIBERAÇÃO DE ESTERÓIDES A PARTIR DE MICRO E NANO-SISTEMAS CONSTITUÍDO DE M-NPS DE PHBV

Nos capítulos anteriores foram apresentados estudos relevantes à produção de matrizes poliméricas a partir de PHBV em escalas micro e nanométricas por diferentes técnicas de produção. Visando aplicação das partículas no campo farmacêutico e veterinário, estudos introdutórios foram realizados com o objetivo de avaliar o potencial das M-NPs como sistemas de liberação controlada/modificada de fármaco, bem como, contribuir no desenvolvimento de protocolos de IATF.

Neste capítulo são abordados os estudos “*in vitro*” de carregamento e liberação de esteróides nos sistemas contendo M-NPs de PHBV+P4 e PHBV+AMP.

9.1. INTRODUÇÃO

A tecnologia de liberação modificada de fármacos representa uma das fronteiras da ciência, porque envolve diferentes aspectos multi disciplinares e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana. Os sistemas de liberação, freqüentemente descritos como “*drug delivery systems*”, oferecem inúmeras vantagens quando comparadas a formas de dosagem convencional. Estas novas estratégias de veiculação de fármaco e/ou solutos incluem aplicações importantes da ciência de colóides, nas suas mais variadas formas (emulsões múltiplas e inversas, micro e nanogéis, lipossomas, M-NPs biodegradáveis, micro e nanocápsulas). Nano e micro sistemas de liberação modificada de fármaco e/ou solutos representam, uma área em desenvolvimento relativamente nova cujo objetivo geral tem sido prolongar e melhorar o controle da administração de fármacos (Azevedo, 2002).

A melhoria no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada e/ou modificada depende estritamente da seleção de agentes apropriados que sejam capazes de controlar a liberação do fármaco, sustentar a ação terapêutica ao longo do tempo e/ou de liberar o fármaco especificamente em determinado tecido ou órgão alvo. Os agentes ideais para essas preparações devem garantir que o fármaco seja liberado no sítio certo, na dose certa e no tempo requerido (Lyra *et al.*, 2007). Atualmente existem variados sistemas de liberação de modificada de fármacos, aparecendo expressões para defini-los como liberação retardada, repetida, controlada,

sustentada, entre outras. Este amplo leque de designações deve-se ao fato de surgirem classificações tanto a ação farmacológica propriamente dita como ao processo tecnológico de obtenção dos medicamentos. As formas farmacêuticas de liberação modificada, cuja liberação do fármaco é prolongada, requerem administrações menos freqüente do medicamento em relação às formas convencionais, nas quais a concentração do fármaco apresenta um aumento na corrente sanguínea, atinge um pico máximo e então declina (Figura 9.1) (Lyra *et al.*, 2007).

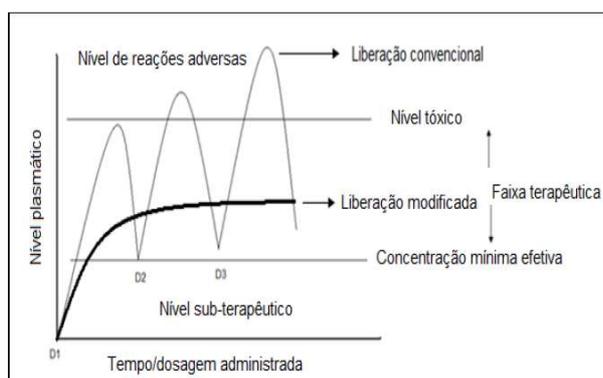


Figura 9.1 – Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrados por mecanismos de liberação convencional de multidosagem (D1, D2, D3), e sistema de liberação modificada de fármaco (Tavarez, 2011).

A liberação controlada de fármacos tem como objetivo principal o controle temporal e espacial, *in vivo*, da concentração de fármacos para que o benefício clínico da administração destes seja maximizado e os efeitos adversos minimizados. A liberação implica a associação, química ou física, dos fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas que, quando administrados *in vivo*, tenham a capacidade de (i) controlar, de forma pré-determinada, a taxa de liberação/entrega do fármaco a partir desse mesmo sistema, e/ou (ii) conduzir o fármaco até o sítio específico em que este deve atuar (Coimbra, 2010).

Ampla variedade de sistemas, visando condicionar a velocidade e o local de liberação dos fármacos, tem sido objeto de investigação na área da indústria farmacêutica. Entre estes sistemas estão incluídos os lipossomas, as bombas osmóticas, os revestimentos entéricos, os sistemas transdérmicos, os pró-fármacos, os sistemas matriciais poliméricos, entre outros (Lopes *et al.*, 2005).

Um sistema polimérico de liberação de fármaco por via oral pode ser planejado e desenvolvido por vários métodos de processamento. Modificando as propriedades do polímero, um sistema de matriz pode ser elaborado para uma liberação sustentada ou controlada do fármaco. Materiais poliméricos farmacêuticos com pequena ou nenhuma toxicidade podem ser

utilizados como membranas ou matrizes nas quais o ingrediente ativo é disperso ou dissolvido (Oliveira e Lima, 2006).

Os sistemas matriciais são de fácil obtenção e custo reduzido frente a outros sistemas de liberação controlada de fármacos, constituindo-se uma alternativa simples no desenvolvimento de formulações eficazes. Dentre os sistemas matriciais os sistemas constituídos por matrizes hidrofílicas biodegradáveis são os mais difundidos. Diversos polímeros hidrofílicos são aplicados à obtenção de formas farmacêuticas bioadesivas, em sua grande maioria mucoadesivas. A interação entre os polímeros e a membrana mucosa é regida por diversos enlaces químicos e a elucidação do princípio da mucoadesão é objetivada por meio do estudo da teoria de adesão (Lyra *et al.*, 2007).

A utilização de sistemas matriciais constituídos por diversos tipos de polímeros é opção interessante, sendo uma das estratégias mais empregadas no desenvolvimento de uma formulação oral de liberação modificada devido às vantagens inerentes a estes sistemas, como versatilidade, eficácia, baixo custo e produção que recorre a equipamentos e técnicas convencionais. Os sistemas matriciais são definidos do ponto de vista tecnológico como um sistema que modifica a liberação da substância ativa, molecularmente dispersa ou dissolvida num suporte geralmente resistente à desintegração. Nos sistemas matriciais, a liberação do fármaco pode envolver processos de intumescimento do polímero, difusão do fármaco e erosão da matriz. Em alguns casos o fármaco pode estar ligado quimicamente à cadeia polimérica e ser liberado pela quebra hidrolítica ou enzimática dessa ligação (Bicheri, 2010).

Nos sistemas matriciais, o fármaco pode se encontrar homogeneamente disperso na matriz polimérica, dentro de um reservatório ou adsorvido em sua superfície. Na sua liberação estão envolvidos processos físicos e químicos, incluindo penetração de água na matriz, dissolução e difusão do fármaco pelos poros da matriz, degradação do polímero ou uma combinação destes mecanismos (Rego *et al.*, 2003). Embora simples de preparar, esses sistemas têm a desvantagem de o fármaco poder ser liberado repentinamente por meio de um colapso da matriz, podendo levar a conseqüências potencialmente sérias para o paciente. Segundo Mehuys *et al.*, (2005), a erosão das matrizes pode sofrer influência dos alimentos devido às alterações de forças mecânicas que ocorrem na mobilidade do trato gastrointestinal.

Numerosos polímeros biodegradáveis estão disponíveis e têm sido estudados para aplicações na liberação controlada de fármacos. Estes polímeros são sistemas aptos para modificar a taxa de liberação do fármaco, evitando a necessidade da retirada da matriz após a exaustão do fármaco, uma vez que, são solúveis e biodegradáveis. Quando se utilizam polímeros

não-biodegradáveis, a liberação ocorre apenas por um processo de difusão lenta pela matriz (Rego *et al.*, 2003).

Os sistemas matriciais podem ser dos tipos hidrofóbico ou hidrofílico. Nas matrizes hidrofóbicas, constituídas por ceras, que podem ser denominadas matrizes inertes, o fármaco é liberado essencialmente por difusão, podendo haver um mecanismo de erosão associado às matrizes hidrofóbicas. Nas matrizes hidrofílicas, a liberação é regulada pelos processos de intumescimento, difusão e erosão. (Pezzini *et al.*, 2007)

Matrizes hidrofílicas podem ser preparadas por compressão de uma mistura contendo fármaco e o polímero hidrofílico. Esses sistemas têm atraído considerável atenção como dispositivos para liberação de fármacos, devido, entre outros fatores a facilidade no processo de produção (Genc *et al.*, 2008). As matrizes hidrofílicas, quando em contato com o meio de dissolução ou com o fluido aquoso gastrointestinal, absorvem água, sobretudo através dos poros do sistema matricial. Os sistemas de liberação matricial preparados via compressão com polímeros hidrofílico, de início apresenta uma liberação imediata do fármaco presente na superfície do comprimido, no entanto, com o tempo os polímero hidrofílico intumescem e formando uma camada gelatinosa de polímero (estado maleável) a volta do núcleo seco do comprimido. A água continua a penetrar na matriz, através da camada exterior gelificada que sofre posterior erosão. Estes dois fenômenos (intumescimento e erosão) ocorrem simultaneamente e o sistema matricial mantém um volume mais ou menos constante. Quando a penetração da água na matriz gelificada excede um valor crítico de concentração (concentração na qual as interações entre a água e o polímero aumentam com conseqüente redução das interações polímero-polímero), as cadeias poliméricas começam a se separar, alargando os espaços ocorrendo então difusão do fármaco. Então essas cadeias dispersam-se na camada mais externa, resultando um aumento da taxa de erosão (Figura 9.2). Em conseqüência do aumento da distância entre si, aumento da distancia entre as cadeias poliméricas, estas deixam de estar interligadas entre si, separando-se com subseqüente desintegração total do sistema (Bicheri, 2010).

A escolha do polímero hidrofílico na formulação da matriz pode fornecer uma combinação apropriada dos mecanismos de intumescimento, de dissolução ou de erosão e determinam a cinética de liberação *in vitro*. As matrizes de intumescimento são sistemas monolíticos preparados pela compressão de mistura de polímero hidrofílico e de fármaco. Elas representam sistemas de liberação em que os vários mecanismos podem ser adaptados ao programa de liberação. O sucesso desses sistemas está relacionado com a tecnologia de

fabricação e com as características físicas e químicas do polímero, responsáveis pelo mecanismo de liberação (Lopes *et al.*, 2005).

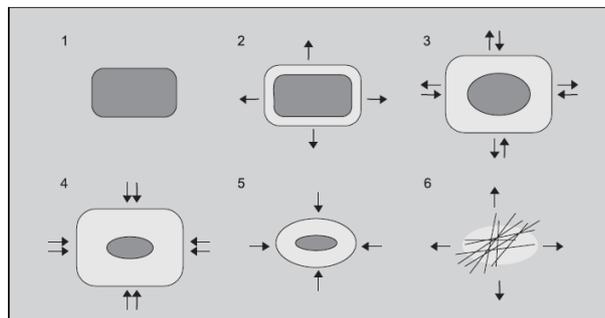


Figura 9.2 – Alterações observadas nos sistemas matriciais hidrofílicos que intumescem e sofrem erosão: 1) matriz no estado seco; 2) início da hidratação e intumescimento da matriz; 3 e 4) aumento da hidratação e intumescimento da matriz; 6) separação das cadeias poliméricas com liberação rápida do fármaco restante (Lopes *et al.*, 2005).

Muitas classes de polímeros farmacêuticos têm sido usadas em sistemas de liberação controlada de fármacos devido às suas diferentes permeabilidades. A permeabilidade de um fármaco através de um material polimérico é um processo de três partes envolvendo dissolução, migração e difusão das moléculas do fármaco em função da solubilidade e coeficiente de difusão. A estrutura cristalina de um polímero tem maior grau de empacotamento molecular e, portanto, tende a resistir mais à difusão de um fármaco em relação a polímeros amorfos com a mesma estrutura. As propriedades de dissolução do polímero afetam bastante a liberação de princípios ativos, e a dissolução do fármaco pode ser acelerada ou retardada dependendo da solubilidade ou permeabilidade do veículo (Oliveira e Lima, 2006).

Um requisito fundamental para que os materiais poliméricos possam ser utilizados na preparação de um sistema de liberação controlada de fármacos, é que estes e os seus produtos de degradação não sejam tóxicos, apresentem uma boa biocompatibilidade, pelo menos nos tecidos com que vão ter contato direto, e que sofra degradação química *in vivo*, seja por hidrólise ou ação enzimática. Como os sistemas vivos são compostos majoritariamente por água, as propriedades hidrofílicas / hidrofóbicas dos polímeros são também um aspecto fundamental a ter em conta na altura de selecionar um polímero para uma aplicação específica (Coimbra, 2010).

Os sistemas de liberação controlados por difusão encontram-se divididos em dois tipos: sistemas de reservatório e sistemas matriciais.

Um sistema reservatório consiste num dispositivo constituído por um núcleo de fármaco, no estado líquido ou sólido, rodeado por uma membrana polimérica não biodegradável,

pela qual o fármaco se difunde lentamente. As propriedades do fármaco e da membrana polimérica determinam a taxa de difusão e, conseqüentemente, a taxa de liberação do fármaco. Num sistema matricial o fármaco encontra-se uniformemente disperso ou dissolvido numa matriz polimérica, sendo a taxa de liberação controlada pela taxa de difusão do fármaco dessa mesma matriz (Coimbra, 2010), desta forma obtém-se um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado (Azevedo, 2002).

A diferença morfológica entre a forma de distribuição do princípio ativo no sistema polimérico matricial e no sistema polimérico reservatório são descritos na Figura 9.3.

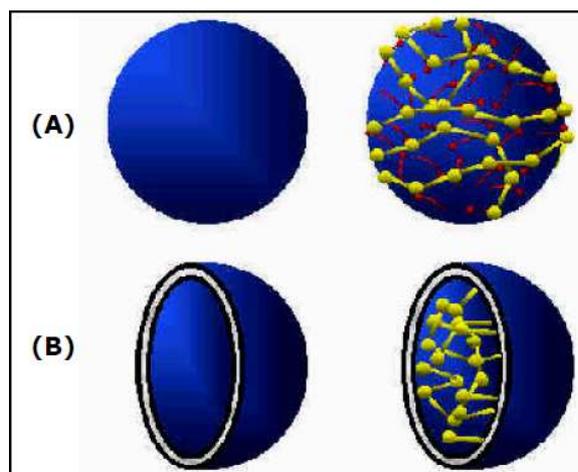


Figura 9.3 - Exemplo dos diferentes tipos de encapsulamento para um sistema polimérico de liberação controlada de fármacos: (A) esfera (sistema matricial); (B) cápsula (sistema reservatório (Adaptado de Azevedo, 2002)).

Em geral, a liberação dos fármacos incorporados em sistemas constituídos por polímeros hidrofílicos baseia-se na transição do estado vítreo “*glassy*” para o estado maleável “*rubbery*”, resultante da penetração da água na matriz. A velocidade de penetração da água no sistema matricial condiciona o modo de liberação do fármaco, e no caso de comprimidos matriciais constituídos à base de polímeros hidrofílicos, é condicionada por: transporte do meio de dissolução para a matriz polimérica; intumescimento “*swelling*” do polímero com formação de uma camada de gel; difusão do fármaco através da camada de polímero intumescido e erosão do polímero intumescido (Lopes, 2005).

9.1.1. MODELOS DE ESTUDOS *IN VITRO* DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.

Para que os medicamentos possam exercer seu efeito terapêutico, é necessário que as moléculas do fármaco sejam dissolvidas nos fluidos gastrintestinais e, dessa forma, estejam disponíveis para a absorção (Gonzales *et al.*, 1995). Estudos cinéticos de liberação do fármaco é importante porque possibilita avaliar os parâmetros dissolução, difusão e mecanismos de erosão, auxiliando assim no entendimento, das características farmacotécnicas das formulações (Lopes, 2005). Embora os adjuvantes farmacotécnicos sejam considerados inertes, do ponto de vista farmacológico, eles podem exercer influência significativa na velocidade de liberação do fármaco (Villanova *et al.*, 1999).

Devido à natureza crítica dos primeiros dois passos, a dissolução *in vitro* constitui uma relevante predição da performance *in vivo* de medicamentos. Dentre todos os testes de controle empregados nesse tipo de apresentação, o ensaio de dissolução mostra-se como um dos mais importantes, congregando na sua interpretação conceitos físico-químicos diversos (Bortoluzi e Laporta, 2008).

O perfil de dissolução de fármacos é obtido determinando-se a partir de amostras seriadas, coletadas em intervalos previamente estabelecidos, a quantidade de fármaco dissolvido no meio de dissolução. A partir dos dados obtidos, é construída uma curva de porcentagem de fármaco dissolvido em função do tempo (Bortoluzi e Laporta, 2008).

O uso de modelos matemáticos vem sendo um fator bastante importante no desenvolvimento de dispositivos farmacêuticos de liberação controlada. Estes modelos trazem inúmeros benefícios práticos como a possibilidade de simular os efeitos dos parâmetros delineados, a redução do número de experimentos necessários, além de facilitarem o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (Lyra *et al.*, 2007).

A aplicação de modelos cinéticos de dissolução permite inferir mais detalhadamente diferenças nos perfis de dissolução de medicamentos. O modelo cinético de dissolução de uma forma farmacêutica é avaliado por meio da linearização dos dados de dissolução de acordo com parâmetros dependentes do tempo e/ou porcentagem de fármaco liberada. A escolha do modelo cinético mais adequado ocorre perante a avaliação do coeficiente de correlação de *Person*, em que o modelo mais ajustado é aquele próximo da perfeita linearidade (Rodrigues *et al.*, 2006)

Existem alguns modelos que são bastante conhecidos e bem usados com o intuito de se analisar os mecanismos de liberação de substâncias ativas. Se tratando de processos cinéticos na liberação controlada de fármacos, os fatores mais importantes são: determinar a ordem do

processo e analisar qual modelo se adequa melhor ao perfil de liberação analisado (Tavares, 2011). Um dos modelos bastante utilizados é o de Higuchi, e que é governado pelo processo de difusão fundamentado na 1ª lei de difusão de Fick. Esse modelo de difusão supõe que uma matriz porosa degradável em fase líquida se dissolve lentamente no meio a partir da penetração do líquido através de seus poros.

A difusão é um processo pela qual a matéria é transportada de um local para outro situado no interior do próprio sistema e resulta de movimentos moleculares aleatórios, que ocorrem em pequenas distancias. Adolf Fick foi o primeiro a procurar quantificar o processo de difusão ao adotar a equação matemática do fenômeno de transferência de calor proposto por Fourier. A expressão matemática que traduz esta velocidade de transferência, por unidade de superfície, da substância a difundir num meio isotrópico através de uma seção do polímero pode representar-se como segue:

$$\frac{dQ}{dt} = -D \frac{dC}{dX} \quad \text{Eq. 9.1}$$

Onde dQ/dt representa a velocidade de difusão, Q , a massa de fármaco transportada, t , o tempo, C , a concentração da substância que se difunde, X , a coordenada espacial normal à seção e D , o coeficiente de difusão (Manadaset *al.*, 2002).

O coeficiente de difusão de um fármaco num sistema matricial pode ser influenciado por vários parâmetros: densidade de reticulação do polímero, grau de ramificação, grau de cristalinidade, tamanho das zonas cristalinas, etc (Manadaset *al.*, 2002 apud Peppas, 1983).

O material dissolve-se lentamente na fase líquida e difunde por meio da estrutura da matriz entre os poros interconectados. Matematicamente a equação de Higuchi pode ser usada para calcular as taxas de liberação do fármaco representadas como (Lacerda *et al.*, 2009):

$$M = kt^{1/2} \quad \text{Eq. 9.2}$$

Onde M é a quantidade total de material liberado no tempo t , e k é a constante cinética de liberação que leva em conta as características estruturais e geométricas da amostra.

Pode ser utilizado para descrever o mecanismo de transporte de solutos a partir de uma matriz flexível um modelo semi-empírico descrito pela equação de Ritger-Peppas (Piai, 2008):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{Eq. 9.3}$$

Onde M_t/M_∞ é fração de fármaco liberado da matriz, t é o tempo de liberação, k é uma constante dependente do sistema solvente/polímero e n é o coeficiente difusional que caracteriza o mecanismo de difusão do solvente para o interior do gel ou o mecanismo de liberação do soluto. Peppas (1985) usou valores de n de modo a caracterizar os diferentes mecanismos de liberação, tendo chegado a valores de $n = 0,5$ para a difusão (modelo de Fick) e valores de n mais elevados entre 0,5 e 1,0 em um sistema plano, para a transferência de massa segundo um modelo não-Fickiano. Este modelo é geralmente usado para analisar a liberação de formas farmacêuticas poliméricas, quando o mecanismo de liberação não é bem conhecido ou quando possa estar envolvendo mais de um tipo de liberação (Costa e Lobo, 2001b).

A partir do modelo de Higuchi, em 1974 Baker e Lonsdale desenvolveram um modelo que descreve a liberação controlada a partir de uma matriz esférica, sendo representado pela seguinte expressão:

$$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = kt \quad \text{Eq. 9.4}$$

Onde M_t/M_∞ é a fração do fármaco liberada e k a constante de liberação (Costa e Lobo, 2001b).

Outro modelo baseia-se na equação semi-empírica proposta por Korsmeyer-Peppas. Esta equação é utilizada para descrever a liberação do soluto quando o mecanismo que prevalece é uma combinação da difusão do fármaco (transporte Fickiano) e do (transporte não Fickiano), controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas. Neste modelo, a relação entre a velocidade de liberação e o tempo é igual a:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n + b \quad \text{Eq. 9.5}$$

Em que K é uma constante cinética, que incorpora características estruturais e geométricas do mecanismo e n é o expoente de liberação que, de acordo como o valor numérico que assume, caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco (Lopes *et al.*, 2005).

Esta equação é geralmente utilizada para interpretar e descrever a liberação do fármaco quando o mecanismo que prevalece não é bem conhecido ou resulta da combinação de dois processos aparentemente independentes: um devido ao transporte de fármacos que obedece às leis de Fick ou transporte Fickiano, e outro conseqüentemente dos fenômenos de

inchamento/relaxamento do gel (expansão dinâmica) e que envolve a transição de um estado semi-rígido a outro mais flexível (Lopes *et al.*, 2005)

Outro modelo matemático de referência, no caso de sistemas matriciais, é o modelo de Peppas e Sahlin (1989). Numa tentativa de quantificar as contribuições relativas dos dois fenômenos responsáveis pela liberação (difusão e relaxamento), Peppas *et al.*, introduziram um segundo termo na equação Korsmeyer-Peppas, surgindo o modelo de Peppas-Shalin:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_1 t^m + K_2 t^{2m} \quad \text{Eq. 9.6}$$

Em que K_1 e K_2 representam constantes que refletem as contribuições relativas do mecanismo de difusão Fickiana e do mecanismo de erosão/relaxamento, e o coeficiente m é o expoente de difusão Fickiana da preparação farmacêutica que apresente uma liberação modificada, qualquer que seja a sua forma (Lopes *et al.*, 2005).

Os modelos de ordem zero e o modelo de Higuchi são mutuamente exclusivos: quando se aplica um, o outro já não tem aplicação. O mesmo não sucede com o modelo de Korsmeyer-Peppas e o modelo de Peppas e Sahlin, sendo a aplicação destes modelos bastante úteis para complementar as informações relativamente aos mecanismos de liberação dos fármacos obtidas com a aplicação dos outros dois modelos.

Existem na literatura outros diversos modelos matemáticos que não foram descritos neste trabalho e podem ser adotados como mecanismos de simulação para sistemas de liberação de fármacos como os modelos de: *Hixson-Crowell*, *Hopfenberg*, *Makoid-Banakar*, *Weibull*, etc.

9.1.2. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE%)

A eficiência de encapsulação do fármaco é estimada como sendo a diferença percentual entre a concentração inicialmente adicionada na formulação e a concentração associada às partículas. Desta maneira, quando a técnica de emulsão/evaporação do solvente é utilizada, a eficiência de encapsulação é fortemente influenciada pelo coeficiente de partição do fármaco entre a fase interna e externa da emulsão. Fármacos caracterizados por apresentar baixa hidrossolubilidade podem ser encapsulados com sucesso pela formação de uma emulsão óleo em água (O/A). Entretanto, quando fármacos que apresentam elevada hidrossolubilidade são utilizados, baixas taxas de encapsulação têm sido observadas. Neste caso, a encapsulação pode ser realizada por meio da formação de uma emulsão água em óleo (A/O), onde um solvente polar contendo o fármaco e o polímero é emulsificado em uma fase oleosa, como óleo mineral, ou pela

formação de uma emulsão múltipla (A/O/A), em que uma fase aquosa contendo o fármaco é dispersa em uma solução do polímero no solvente volátil, e a emulsão (A/O) resultante é, por sua vez, dispersa em uma segunda fase aquosa (Bidone, 2008).

A eficiência de encapsulação do princípio ativo contido no interior das partículas pode ser determinada pelo método direto, por meio de espectrofotometria na região ultravioleta e visível (UV-Vis) por medida do comprimento de onda máxima determinado pela varredura da droga/princípio ativo em estudo. Com o uso de solvente orgânico miscível apenas ao material incorporado faz-se a extração por completo do princípio contido seguido de separação por ultrafiltração/centrifugação. A partir de curva analítica construída com diferentes concentrações de soluto em solvente orgânico é possível determinar-se a quantidade do ativo livre no sobrenadante (Tagliari, 2012).

9.2. PARTE EXPERIMENTAL

A parte experimental foi dividida em duas partes, sendo uma parte pertencente à impregnação de P4 em M-NPs de PHBV produzidas pelo método SAS apresentado no Capítulo V, e a segunda parte envolvendo o encapsulamento de AMP em NPs de PHBV produzidas pelo método SFEE apresentado no Capítulo VIII.

9.2.1. IMPREGNAÇÃO DE P4 EM M-NPs DE PHBV PRODUZIDAS VIA SAS

O carregamento/impregnação de progesterona em M-NPs de PHBV foi realizado utilizando-se de um aparato de equilíbrio de fases a alta pressão composto por um reator do tipo célula de equilíbrio, uma bomba de alta pressão do tipo seringa e um sistema de aquecimento com controle apurado de temperatura. O esquema do aparato é idêntico ao descrito no Capítulo IV mostrado na Figura 4.1 e o aparato real pode ser visto na Figura 9.4.

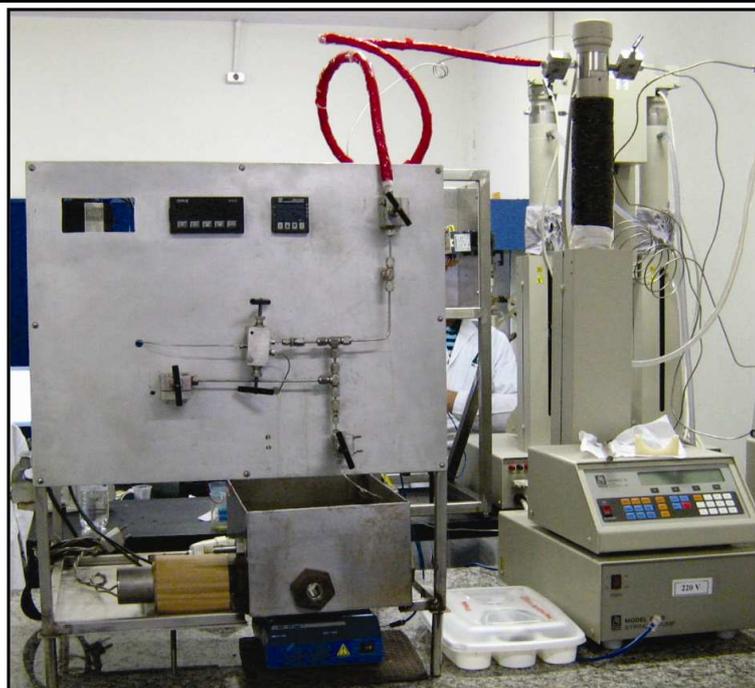


Figura 9.4 – Imagem real do aparato experimental de equilíbrio de fases utilizado para impregnação da progesterona.

Inicialmente uma quantidade desejada de M-NPs de PHBV foram pesadas em balança analítica (MARTE AM-220) e introduzidas na célula de equilíbrio. A progesterona (em torno de 0,3 g) foi inserida em uma cápsula e isolada por um filtro de mesh 300 e posteriormente introduzida na célula de equilíbrio. O filtro foi utilizado com o intuito de evitar o contato direto da progesterona com as M-NPs de PHBV. O reator foi fechado e vedado com anéis de teflon e conectado junto à alimentação de CO₂ deixando apenas a saída de alívio aberta. Ainda com a saída de alívio aberta foi feita uma leve injeção de CO₂ com o objetivo de remover o todo gás residual e manter no interior da célula apenas os componentes desejados. A saída de alívio foi fechada e o sistema de aquecimento foi ligado com condição de temperatura estabelecida em 323 K mantida por um controlador (COEL, modelo HW 1440). Depois de estabilizada a temperatura desejada o sistema foi então alimentado com CO₂ e pressurizado a 250 (bar) tendo o controle de pressão obtido por um transdutor de pressão (SMAR, modelo LD 301) e um programador de pressão (NOVUS, modelo N1500). O tempo de residência durante o processo de impregnação da progesterona foi realizado em cinco diferentes tempos (2, 4, 8, 16 e 32 horas).

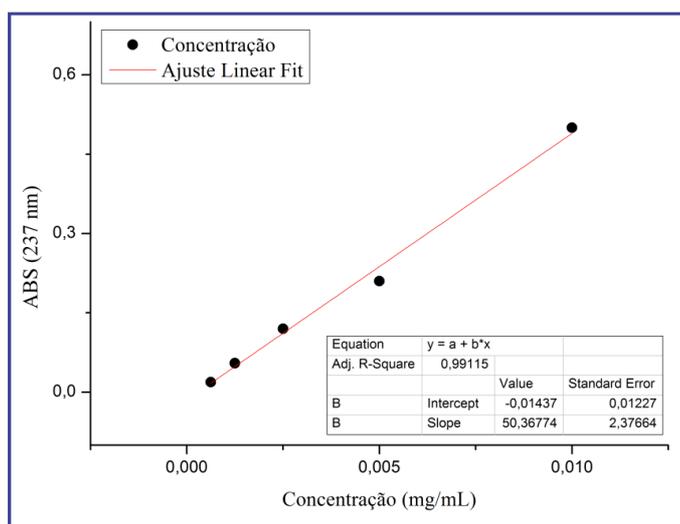
Após o termino do tempo de impregnação, o sistema de aquecimento foi desligado e foi feito depressurização lentamente para evitar o arraste das M-NPs juntamente com o CO₂ eliminado. As M-NPs foram coletadas e armazenadas cuidadosamente e a cápsula contendo P4 foi pesada novamente obtendo um valor médio teórico de droga aprisionada.

Tabela 9.1 – Condições experimentais para impregnação de P4 em M-NPs de PHBV.

Massa de M-NPs (mg)	Massa P4 Cápsula (mg)	Temperatura (K)	Pressão (Bar)	Tempo (h)
450	43 (10 %)	323	250	2
				4
				8
				16
				32

9.2.1.1. MEDIDA DA EFICIÊNCIA DE IMPREGNAÇÃO / CARREGAMENTO

Os valores percentuais da eficiência do carregamento da droga impregnada nas M-NPs de PHBV foram obtidos a partir da quantidade inicial teórica de P4 aprisionada no interior da matriz. De acordo com o método descrito no item 9.2.1, uma quantidade determinada de P4 foi pesada e inserida em uma cápsula que posteriormente a esta foi inserida no reator. Ao término da reação a massa final da cápsula foi pesada e pode-se determinar um valor teórico da quantidade de P4 carregada para as M-NPs. Para determinação do valor de carregamento experimental extraiu-se a quantidade total de droga carregada nas M-NPs a partir de solução hidro-alcóolica (62,5 % de etanol e 37,5 % de água destilada) e com uso da curva de calibração (Figura 9.5) determinou-se o valor real encapsulado.

**Figura 9.5** – Curva de calibração de P4 em solução hidro-alcóolica.

9.2.1.2. ESTUDO “*IN VITRO*” DA LIBERAÇÃO DE PROGESTERONA CARREGADA EM M-NPS DE PHBV

Os estudos de liberação “*in vitro*” para as M-NPs contendo progesterona foram fundamentados no protocolo de liberação de medicamentos USP XXIII (1995). Os experimentos foram conduzidos em um aparato (Figura 9.6) contendo cinco reservatórios de vidro de volumes igual a 200 mL e encamisados com uma caixa de acrílica acoplada a um banho termostático (JULABO, modelo F12-EH). A base do aparato é composta de um agitador magnético de cinco pontos de agitação em série (IKA, modelo IKA-RO5), sendo que o mesmo teve como papel fundamental promover a homogeneização do meio.

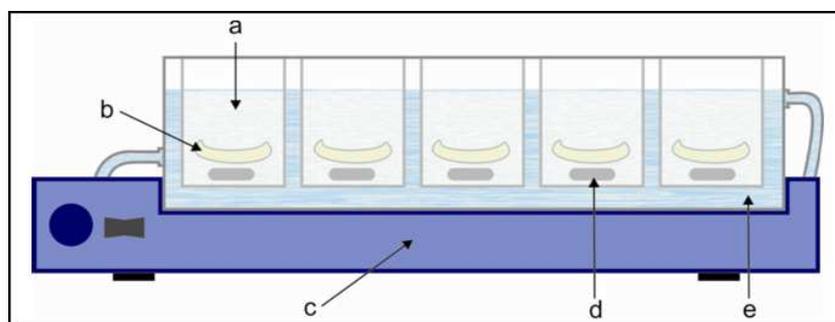


Figura 9.6 – Esquema do sistema utilizado para realizar o estudo de liberação controlada de progesterona para cinco amostras; a) solução hidro-alcoólica, b) membrana de diálise, c) agitador magnético, d) barra magnética, e) sistema de controle de temperatura com água.

Primeiramente as membranas de diálises foram submetidas à hidratação em água destilada por um período de 24 horas sob refrigeração. Foi preparada uma solução hidro-alcoólica contendo 62,5 % de etanol e 37,5 % de água destilada. Cada reservatório foi alimentado com 220 mL da solução hidro-alcoólica. As amostras de M-NPs de PHBV impregnadas com progesterona foram pesadas 100 mg, dispersas em 30 mL da solução hidro-alcoólica e posteriormente foram inseridas nas membranas de diálise. As membranas foram fechadas e inseridas nos reservatórios com os 220 mL de solução. A solução nos reservatórios foi mantida a 37° C durante todo tempo o teste e uma agitação de 100 rpm foi utilizada para manter a homogeneidade do meio.

A quantidade de progesterona liberada das M-NPs foi determinada utilizando um espectrofotômetro UV-vis (SHIMADZU, modelo UV-2601) com leitura ajustada em 237 nm. Para isso, cerca de 3 mL de cada solução dos cinco recipientes foram coletados em tempos pré-

estabelecidos, lida sua absorvância no equipamento de UV e retornada ao seu reservatório de origem para preservar o volume inicial da solução.

9.2.2. PRODUÇÃO DE NPS DE PHBV CARREGADAS DE AMP VIA SFEE

As NPs de PHBV carregadas com AMP foram obtidas a partir da metodologia 8.2.2 abordada no Capítulo VIII. O carregamento do fármaco foi conduzido no momento da obtenção da pré-emulsão, adicionando uma quantidade de 2% de AMP em relação do PHBV no momento do preparo da solução em DCM. O preparo da emulsão e extração do solvente procedeu sem modificação.

9.2.2.1. MEDIDAS DE EFICIÊNCIA DO ENCAPSULAMENTO (EE%)

Para obter a eficiência do encapsulamento das NPs carregadas de AMP, primeiramente foi construída uma curva de calibração com diferentes concentrações de AMP dissolvidas em etanol (Figura 9.6). As quantidades de medroxiprogesterona conhecida nas soluções foram interpretadas em um espectrofotometro UV-vis (SHIMADZU, modelo UV-2601) com comprimento de onda (λ) igual a 240 nm. Para identificação do comprimento de onda foi realizado uma leitura de varredura da amostra. Para extração da medroxiprogesterona, uma quantidade conhecida de NPs (2,5 mg) foi dispersa em 15 mL de etanol. A solução foi mantida sob agitação durante 24 horas em temperatura ambiente. Após 24 horas, o solução foi centrifugada a 10.000 rpm durante 30 min, e 3 mL do sobrenadante foi coletado e feita à leitura do mesmo em UV para determinação da quantidade de droga extraído.

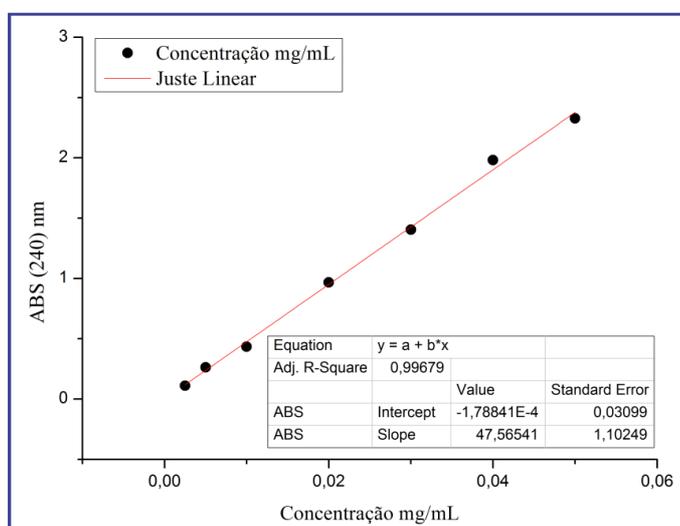


Figura 9.7 – Curva de calibração do AMP em etanol via UV-vis (240 nm).

9.2.2.2. MEDIDAS DE LIBERAÇÃO DA AMP ENCAPSULADAS COM PHBV

O estudo de liberação “*in vitro*” foi realizado utilizando uma solução hidro-alcoólica (70:30). Uma quantidade igual 10 mg de NPs de PHBV foi adicionada em 50 mL de solução hidro-alcoólica. O sistema foi mantido a uma temperatura controlada de 37 °C e em intervalos de tempos igual a (30 min, 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas) a solução foi centrifugada a 10.000 rpm e coletado cerca de 3 ml do sobrenadante e lido em espectrofotômetro UV-vis usando $\lambda = 240$ nm. Posteriormente a solução coletada foi retornada ao sistema para se manter a quantidade inicial da amostra.

9.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

9.3.1. ESTUDOS DE IMPREGNAÇÃO E LIBERAÇÃO DA P4 EM M-NPs DE PHBV

O potencial do carregamento de P4 em M-NPs de PHBV foi avaliado separadamente para cada amostra e classificadas de acordo como tempo de carregamento que variaram entre 2 a 32 horas sob CO₂SC pressurizado. O tempo decorrido da reação foi o fator determinante para a quantidade de P4 armazenada nas amostras, ou seja, o menor tempo de reação (2h) mostrou um percentual o menor valor percentual de quantidade de droga carregada em relação à massa inicial teórica, e para o maior tempo de reação (32h) obteve-se maior percentual de P4 carregado.

A tabela abaixo mostra os valores de eficiência de carregamento obtidos para cada amostra em função do tempo de reação.

Tabela 9.2 – Valores de % P4 carregados nas M-NPs de PHBV.

Amostras	2h	4h	8h	16h	32h
Carregamento	20,60%	22,28%	35,41%	43,01%	53,22 %

Os valores óbitos para melhor compreensão da eficiência do carregamento são apresentado em forma de gráfico que mostra o a aumento do percentual de carregamento em função do tempo de reação de impregnação (Figura 9.8)

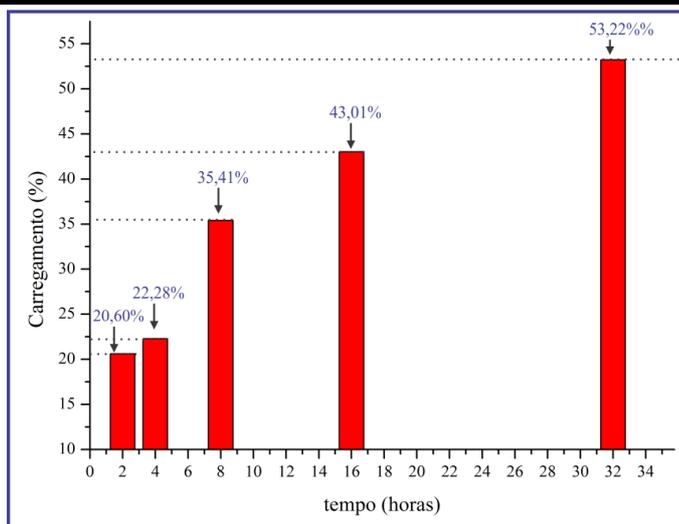


Figura 9.8 – Aumento do % de carregamento de P4 em função do tempo de acordo com a tabela 9.2.

O estudo morfológico das M-NPs mostra que a presença de P4 pouco alterou a morfologia das partículas, e que a presença da maioria dos aglomerados deve-se ao processo de formação das partículas via SAS. Tal fenômeno foi bastante discutido no Capítulo V. A Figura 9.9 se refere as M-NPs de PHBV impregnadas de P4 no tempo de 32h de reação.

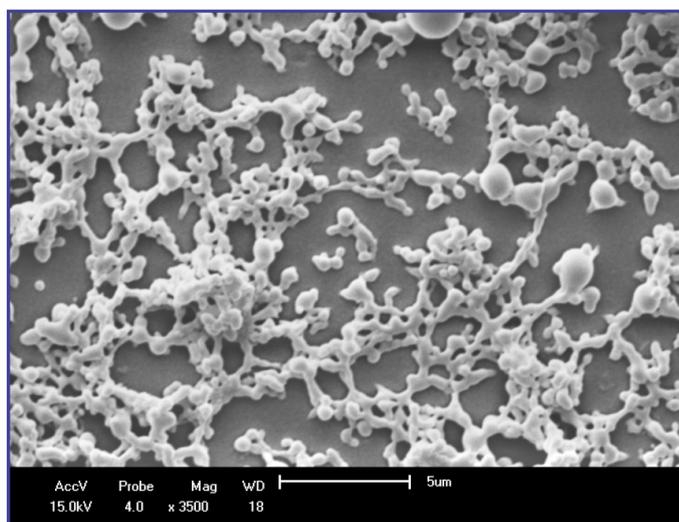


Figura 9.9 – Imagem obtida por MEV das M-NPs de PHBV+P4 obtidas no tempo de 32h de impregnação.

O estudo de liberação das M-NPs carregadas de P4 “*in vitro*” foi feito a partir dos valores avaliados por UV-vis das alíquotas de todas as amostras coletada em tempos determinados que variaram entre 0 a 35 horas. Os valores obtidos nos intervalos de tempo foram

convertidos em valores de concentração de massa por volume de solução (mg/mL) e plotados em um gráfico que mostra a variação da concentração de P4 liberada por tempo de reação.

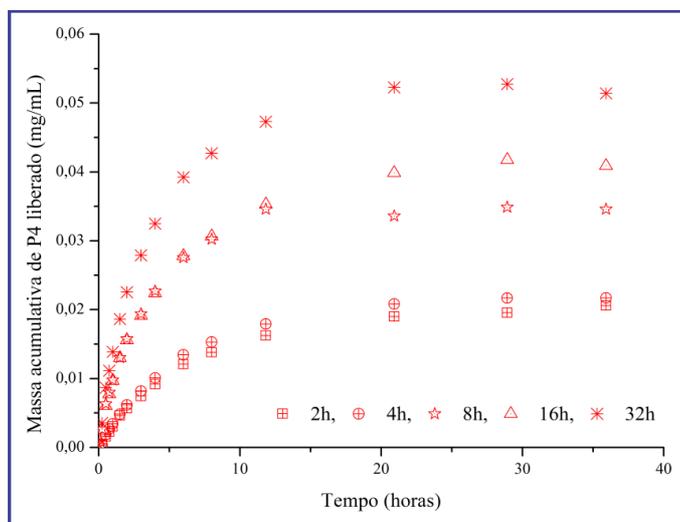


Figura 9.10 – Massa acumulativa de P4 liberada (mg/mL) em função do tempo (horas) para as amostras carregadas nos tempos de 2, 4, 8, 16 e 32 horas.

Os valores decorrentes da curva de liberação da massa de P4 são acumulativos devido o meio ser fechado e as alíquotas serem retornadas ao reservatório após avaliação de valores. Observa-se na Figura 9.10 que o tempo de carregamento tem influência direta sobre a carga de P4 incorporada nas M-NPs de PHBV que conseqüentemente também teve influência sobre a quantidade final de fármaco liberado.

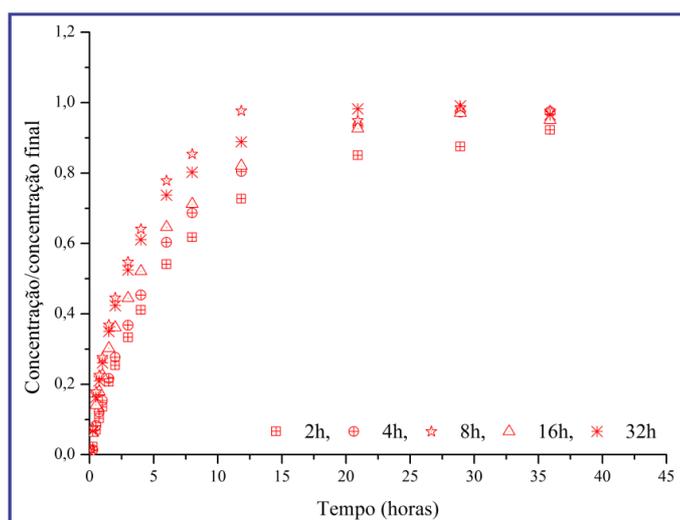


Figura 9.11 - Curva de liberação adimensional da progesterona em diferentes tempos de impregnação (2, 4, 8, 16 e 32 horas).

Pode se notar que próximo de 30 horas de liberação alguns valores diminuem em relação ao acúmulo do soluto. Tal fenômeno decorre da direção de difusão do entre os meios matriz e solvente. A difusão reversa ocorre durante a liberação de todo o soluto contido na matriz ou o meio externo estar saturado, após ocorrer um dos fenômenos o soluto pode retornar para a matriz por difusão inversa.

Os valores mostram que os diferentes tempos de carregamento estão gerando diferentes perfis de liberação em decorrência da diferença de velocidade de liberação de cada amostra. Para melhor compreensão da variação do perfil de liberação do P4 entre as diferentes amostras a Figura 9.11 mostra a curva adimensional dos resultados a partir da concentração liberada /concentração final em função do tempo.

9.3.1.1. APLICAÇÃO DO MODELO CINÉTICO QUE PREDIZ O PERFIL DE LIBERAÇÃO DO P4 A PARTIR DE M-NPS DE PHBV.

Muitos modelos matemáticos foram desenvolvidos para descrever os perfis de liberação do soluto em polímeros, e a maioria dos relatos na literatura demonstra que a liberação dos solutos é fortemente dependente de vários fatores, tais como: composição polimérica, forma geométrica, grau de intumescimento, dissolução e difusão do soluto no polímero (Reis, 2007).

O processo de absorção e de adsorção de água pelos materiais poliméricos é um fator importante na correlação entre biocompatibilidade e as propriedades de superfície. Quando um polímero é colocado em meio aquoso as interações de sua estrutura química com a água, tais como ligações de hidrogênio favorecem o intumescimento. Durante o processo de difusão das moléculas de água na estrutura polimérica, as suas cadeias tornam mais estendidas, provocando, desta forma, uma expansão física e um ordenamento da estrutura polimérica (Terence, 2002).

O mecanismo de liberação de P4 a partir de M-NPs de PHBV ilustrado nas Figuras 9.10 e 9.11 podem ser correlacionados com modelos capazes de prever e ajustar o comportamento de liberação do fármaco contido na matriz. A liberação de P4 obtida experimentalmente se distingue como sendo difusiva, e pode ser avaliada de acordo com o modelo proposto por Reis *et al.*, 2007, que permite a obtenção de parâmetros que juntamente a constantes estabelecidas nos procedimentos experimentais permite prever o comportamento da liberação do P4 em cinéticas de primeira e segunda ordens. O modelo proposto toma como fator determinante a finidade física e química do soluto entre a matriz e o solvente em que ocorre o processo de difusão entre as fases, e o parâmetro que determina a ocorrência desse fenômeno é o termo α e pode ser calculado

a partir da equação 9.7. Ocorrerá difusão do soluto entre as fases da matriz e do solvente quando $\alpha > 0$.

$$\alpha = \frac{F_{max}}{1-F_{max}} \quad \text{Eq. 9.7}$$

Quando o termo α se anula, pode-se inferir que não haverá liberação do soluto. Isto porque, não existirá partição do soluto entre as fases do solvente e da matriz, ou seja, não existirá difusão de soluto entre as fases. Porém, se $\alpha > 0$ ocorrerá difusão do soluto entre as fases da matriz e do solvente. Note que o valor do parâmetro α descreve a existência ou não de difusão do soluto entre as fases matriz-solvente (Reis *et al.*, 2007).

Os valores de α são calculados em função da fração máxima do fármaco liberado (F_{max}) e com os valores experimentais em termos de fração do soluto liberada (F_L) obtém-se a constante de liberação (K_L) que pode ser determinada para uma cinética de primeira ordem de acordo com a equação 9.8:

$$F_{max} \times \ln\left(\frac{F_{max}}{F_{max}-F_L}\right) = k_L t \quad \text{Eq. 9.8}$$

Deste modo, a fração do soluto liberada pode ser calculada em qualquer tempo t para a cinética de liberação reversível de primeira utilizando a equação 9.9.

$$F_L = F_{max}(1 - e^{-(k_L/F_{max})t}) \quad \text{Eq. 9.9}$$

O percentual acumulativo de droga liberado pode ser obtido para qualquer tempo t por meio de uma cinética reversível tanto para primeira como segunda ordem. As variações da concentração do soluto na solução afeta diretamente a velocidade de liberação do mesmo a partir da matriz de acordo com o tempo, e quando o soluto passa a ser reabsorvido pela matriz, a concentração na solução será a diferença na quantidade de soluto liberado e absorvido (Reis *et al.*, 2007). Este perfil cinético é aplicado ao sistema e pode ser visualizado na Figura 9.12. O modelo foi aplicado para as amostras de M-NPs carregadas de P4 em diferentes tempos de reação, e os resultados prescritos pelo ajuste matemático mostram que para os tempos de 2, 4 e 32 horas foram obtidos bons ajustes, e para os tempos de 8 e 16 horas as curvas cinéticas do modelo não ficaram tão condizentes com os dados experimentais.

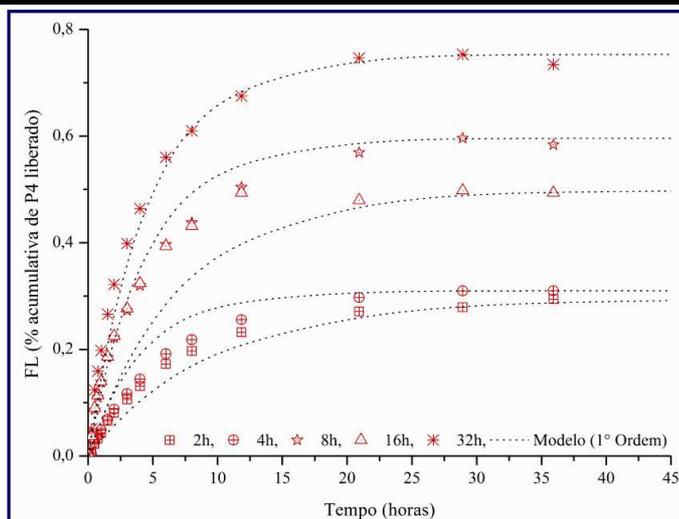


Figura 9.12 – Curvas de cinética de 1º Ordem (Modelo) ajustado com as curvas de liberação dos dados experimentais.

O sistema de liberação também pode ser avaliado seguindo uma cinética de liberação reversível de segunda ordem, considerando que a velocidade de liberação do soluto em um dado instante de tempo é diretamente proporcional à diferença entre os quadrados da concentração do soluto liberado e absorvido (Reis *et al.*, 2007). Da mesma forma que foi aplicada ao modelo cinético de primeira ordem, a constante de liberação (K_L) pode ser determinada em função de α pela equação 9.10.

$$\frac{\alpha}{2} \ln \left(\frac{F_L - 2F_L F_{max} + F_{max}}{F_{max} - F_L} \right) = k_L t \quad \text{Eq. 9.10}$$

E a fração de soluto liberado (F_L) também é determinada em função de α e do K_L obtido.

$$F_L = \frac{F_{max}(e^{2(k_L/\alpha)t} - 1)}{1 - 2F_{max} + e^{2(k_L/\alpha)t}} \quad \text{Eq. 9.11}$$

Os valores ajustados para uma cinética de segunda ordem plotados no gráfico juntamente com os dados experimentais em função do tempo (t) mostram um melhor ajuste para os resultados obtidos experimentalmente nas temperaturas de 4 e 16 horas, principalmente para as primeiras 10 horas de reação (Figura 9.13). Os principais valores aplicados aos modelos são apresentados na tabela 9.3. Uma melhor compreensão das equações aplicadas aos ajustes matemáticos, assim como suas respectivas deduções são apresentados no trabalho de (Reis *et al.*, 2007).

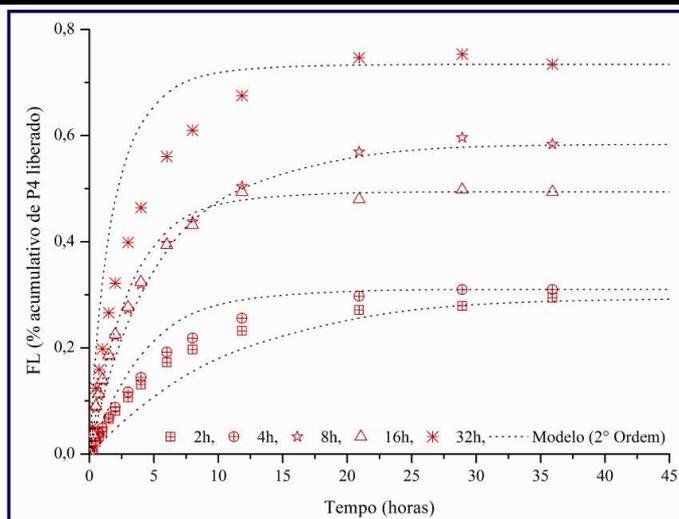


Figura 9.13 – Curvas de cinética de 2º Ordem (Modelo) ajustado com as curvas de liberação dos dados experimentais.

O perfil de liberação para qualquer sistema relaciona-se diretamente com o tempo decorrido das transferências de massa entre soluto, matriz e o solvente. Com base nessa observação, utilizando a Equação 9.12 foi feito o cálculo para o tempo de meia vida ($t_{1/2}$), o tempo necessário para que seja liberado 50% do soluto em cada espaço de tempo (Tabela 9.3).

$$t_{1/2} = \frac{\alpha}{2k_R} x \ln(3 - 2F_{max}) \quad \text{Eq. 9.12}$$

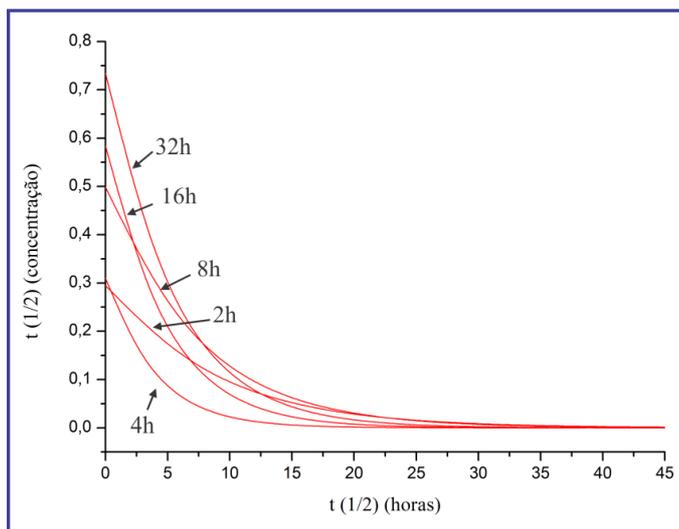


Figura 9.14 – Comportamento da concentração de P4 liberado em termos de tempo de meia vida ($t_{1/2}$).

Nota-se que o tempo de meia vida, exceto para a amostra carregada no tempo de 4h, variou de forma inversa em função do tempo de reação durante o carregamento e da fração

máxima liberada, ou seja, tem-se um tempo de meia vida modificado em função da carga de P4 aprisionada na matriz. Os resultados mostram que a quantidade de fármaco aprisionado próximo à superfície da matriz aumenta em função da quantidade total de fármaco carregado, e conseqüentemente diminui o tempo $t_{1/2}$ de liberação do mesmo (2h – $t_{1/2}$: 5,742 e 32h – $t_{1/2}$: 3,582), como pode ser visualizado na Figura 9.14.

Tabela 9.3 – Valores de constantes aplicados aos modelos cinéticos de 1° e 2° ordens em função da fração máxima de P4 liberada.

Amostra (M-NPs)	F_{\max}	α	$K_L (10^{-2})$	R^2	$t_{1/2}$ (horas)
2h	0,2943	0,4170	3,196	0,9709	5,742
4h	0,3101	0,4470	7,527	0,9239	2,574
8h	0,4982	0,9928	7,152	0,6283	4,823
16h	0,5839	1,4032	13,53	0,9965	3,139
32h	0,7343	2,7636	16,44	0,9547	3,582

9.3.2. ESTUDOS DE ENCAPSULAMENTO E LIBERAÇÃO DE AMP CARREGADAS EM NPS DE PHBV.

A amostra de NPs de PHBV carregadas de AMP via emulsão simples seguida de extração do solvente por meio de CO_2SC , primeiramente foram avaliadas em função da eficiência de encapsulamento do fármaco nas NPs. O valor obtido da alíquota retirada do sobrenadante concentrado de AMP foi convertido em termos de concentração de AMP por volume da solução (mg/mL) a partir da curva de calibração da solução de AMP em etanol descrita na Figura 9.7

As medidas de eficiência de encapsulamento foram determinadas usando a equação abaixo:

$$EE\% = \frac{C_e}{C_t} \times 100\% \quad \text{Eq. 9.10}$$

Onde C_e é a concentração experimental obtida após extração da massa de AMP carregada nas NPs e C_t é a concentração teórica estabelecida durante a preparação do sistema matricial carregado de fármaco.

O preparo da pré-emulsão durante o processo de produção das NPs resultou em um método eficiente para o carregamento do fármaco. A eficiência de encapsulamento das NPs de PHBV foi de 70,29%.

Uma análise morfológica das NPs carregadas de AMP foi realizada utilizando técnica de MEV e os resultados demonstram que o carregamento do fármaco durante o processo de emulsão não promoveu alteração morfológica no resultado final das partículas (Figura 9.15). Alguns aspectos de coalescência ou derretimento, conforme comentado no Capítulo VIII pode ser decorrente do processo de remoção do surfactante, secagem e/ou no processo de preparação da amostra para MEV, considerando que o baixo peso molecular da amostra e o tamanho reduzido das mesmas aumentam a sensibilidade do material em termos de temperatura.

O resultado obtido com uma perda em torno de 30% do fármaco durante o processo de produção pode ser justificado em decorrência de uma pequena migração da droga contida na emulsão primária para a fase aquosa durante o processo de emulsificação, e posteriormente eliminada durante a extração do solvente orgânico e remoção do surfactante.

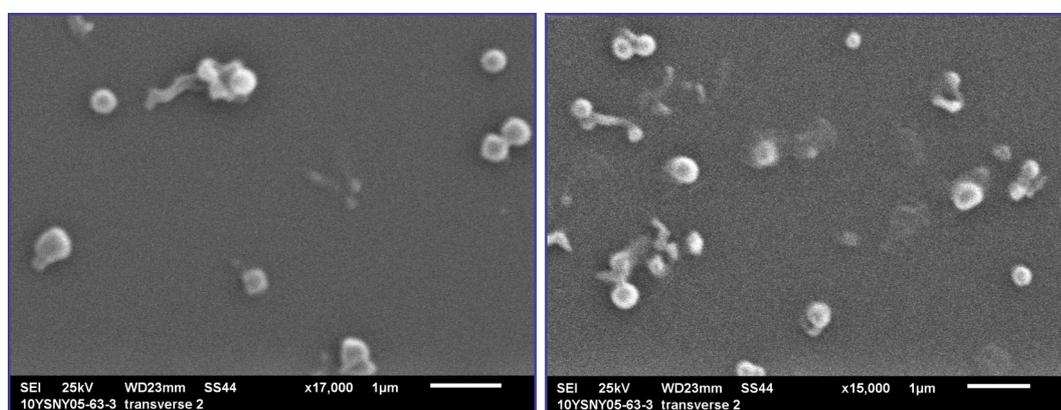


Figura 9.15 – Imagens das NPs de PHBV carregadas de AMP obtidas por MEV.

Os estudos da cinética de liberação das NPs carregadas de AMP conduzidos em solução hidro-alcóolica (70:30), foram determinados por valores de concentração acumulativa de fármaco obtidos em tempos variadas de reação num intervalo de tempo entre 0 a 200 horas. Os valores adquiridos das alíquotas coletadas foram avaliados por meio da curva de calibração em UV-vis do AMP em solução hidro-alcóolica (Figura 9.16).

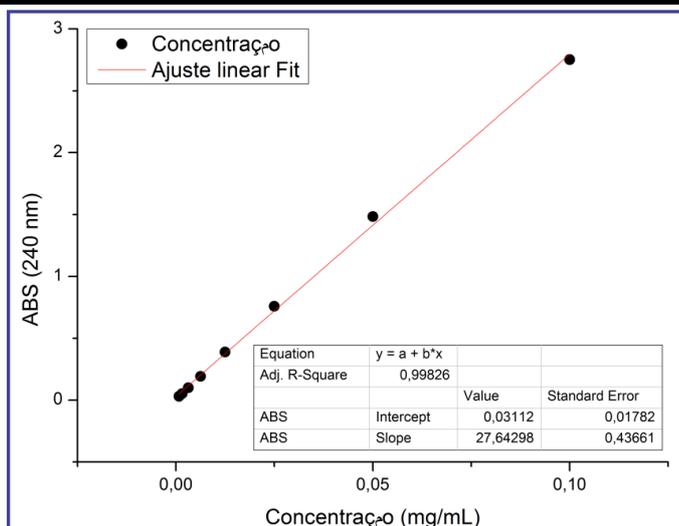


Figura 9.16 – Curva de calibração do AMP em solução hidro-alcóolica via UV-vis (240 nm).

O estudo do comportamento da liberação do AMP a partir de NPs de PHBV foi avaliado primeiramente em termos de massa acumulativa de fármaco em função do tempo. Os cálculos foram realizados considerando o valor experimental de AMP carregado obtido pela razão do percentual da eficiência do encapsulamento em função da massa teórica adicionada. Para este sistema de liberação foram utilizadas 10 mg de NPs de PHBV com 2% de massa teórica de AMP, ou seja, se o sistema tivesse EE% de 100% teria 0,2 mg de AMP, contudo para o sistema com 70,29% de EE% terá 0,14 mg ($0,2 \text{ mg} \times 0,7029$) de AMP.

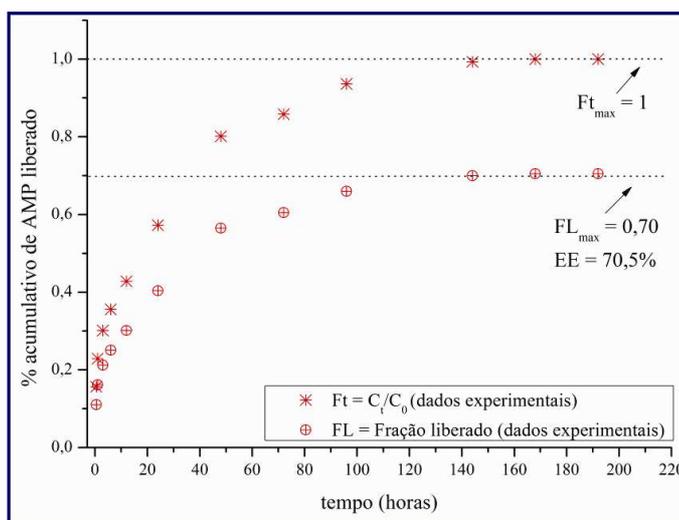


Figura 9.17 – Massa acumulativa de AMP liberada em função do tempo em termos de FL (fração liberada) e Ft (C_t/C_0).

A massa acumulativa é plotada em forma de fração adimensional em cada tempo (F_t), que é a concentração no tempo “ t ” (C_t) dividida pela concentração inicial (C_0), e pela fração de liberação (FL) dos dados experimentais (figura 9.17).

A avaliação da curva de liberação da AMP contida em NPs mostra na Figura 9.16 que o percentual de acúmulo do fármaco liberado atingiu 50% próximo ao tempo de 15 horas e que se estabilizou em torno de 144 horas, atingindo uma quantidade máxima de 2,82 (10^{-3}) mg de AMP, e deste ponto em diante não houve mais acúmulo de soluto liberado. O sistema apresenta um aumento moderado na quantidade de fármaco liberado em função do tempo obtendo um sistema de liberação do tipo modificada.

O modelo matemático também foi utilizado como ajuste para os dados obtidos na construção da curva de liberação. Por meio da equação 9.8 obteve-se a constante de liberação (K_L) para uma cinética de primeira ordem, e pela equação 9.10 o K_L para uma cinética de segunda ordem. Os respectivos dados de fração de liberação para os modelos de cinética de primeira e segunda ordem foram obtidas utilizando as equações 9.10 e 9.11. Os resultados do modelo matemático são visualizados na figura 9.18 juntamente com os dados experimentais.

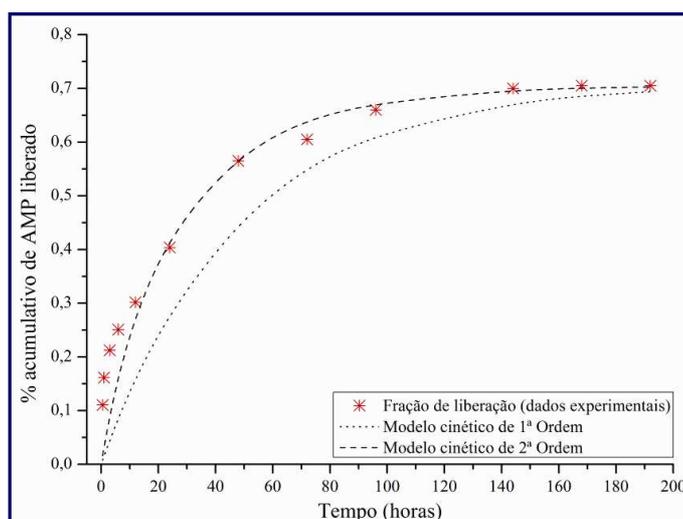


Figura 9.18 – Curvas de cinética de 1ª e 2ª Ordens (Modelo) ajustadas com as curvas de liberação dos dados experimentais.

Os modelos cinéticos explorados, tanto de cinética de primeira como para segunda ordem, evidenciando a ocorrência do processo de difusão do soluto entre as fases matriz e solvente, promovendo um ajuste ideal que descreve o sistema de liberação modificada conduzido neste trabalho, no entanto, o modelo cinético de segunda ordem oferece uma melhor aproximação dos dados experimentais e descreve de claramente o sistema obtido. O perfil de liberação para qualquer sistema relaciona-se diretamente com o tempo decorrido das

transferências de massa entre soluto, matriz e solvente. Para este sistema também obteve os cálculos do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) onde pode observar que nas primeiras 17 horas de reação, 50% da quantidade total de massa impregnada nas NPs foram liberadas (figura 9.19).

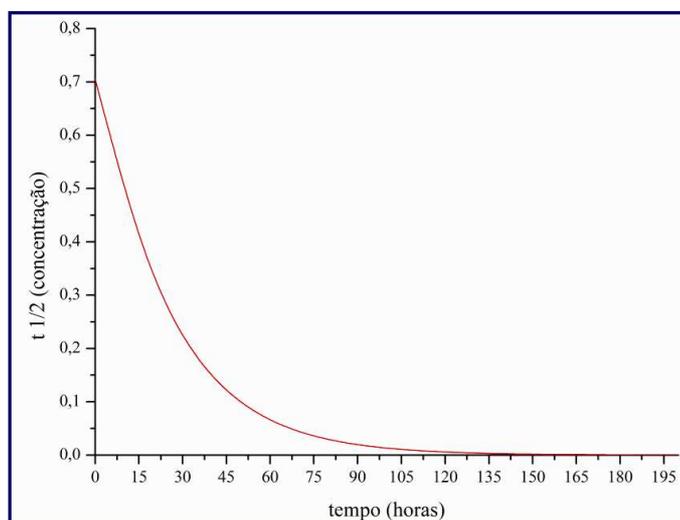


Figura 9.19 - Comportamento da concentração de AMP liberado em termos de tempo de meia vida ($t_{1/2}$).

Os principais dados utilizados nos cálculos do modelo cinético, tanto para primeira como segunda ordem, são apresentados na tabela 9.4.

Tabela 9.4 - Valores de constantes aplicados ao modelo cinético de 1ª e 2ª ordem.

Cinética	F_{\max}	α	KR (10^{-2})	R^2	$t_{1/2}$ (horas)
1ª Ordem	0,705	2,3898	2,149	0,9748	17,028
2ª Ordem	0,705	2,3898	3,254	0,9566	

9.4. CONCLUSÕES

Neste capítulo foram abordados dois sistemas de liberação modificada de esteróides (P4 e AMP) produzidos de formas diferentes, porém utilizando o mesmo polímero, o PHBV para confecção das matrizes.

O primeiro estudo abordado constitui de um sistema do tipo matricial no qual foram produzidas em primeiro momento M-NPs de PHBV via SAS e posteriormente foi feito o carregamento de P4 com o uso de CO₂SC com veículo de transporte da droga para a matriz em diferentes tempos de reação. Os estudos da eficiência de carregamento e da curva de liberação mostraram que os diferentes tempos de reação são diretamente proporcionais a quantidade de P4 aprisionado na matriz polimérica, e que as variações na quantidade de fármaco modificam o perfil de liberação do mesmo.

O segundo sistema explorado é do tipo reservatório, em que se obteve NPs de PHBV com peso molecular reduzido, carregadas de AMP via técnica de SFEE. O método de produção utilizando emulsão simples mostrou grande eficiência na quantidade de fármaco encapsulado e promoveu uma curva de liberação modificada com moderado percentual de acúmulo de AMP liberado em função do tempo.

Para os dois sistemas foram aplicados modelos matemáticos que mostraram ajustes próximos aos dados experimentais utilizando cinéticas de primeira e segunda ordem descrevendo claramente os perfis de liberação obtidos em ambos os sistemas.

Os dois sistemas demonstram vantagem quando se fala de sistemas de liberação modificada de fármacos. Os processos de carregamento e encapsulamento mostram curvas de liberação condizentes com o proposto e oferecem métodos que controlam a quantidade de fármaco carregado na matriz, possibilitando atingir uma condição ideal de liberação dentro da faixa terapêutica (Figura 9.1).

Contudo, os resultados mostram que os sistemas matriciais estudados possuem grande potencial para uso no âmbito farmacêutico e veterinário.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

10.1. CONCLUSÕES GERAIS

O grande interesse em busca do desenvolvimento de um sistema de liberação modificado de fármacos que venha ser empregado a administração de esteróides é de grande interesse para o avanço de novas tecnologias de IATF no âmbito veterinário.

Polímeros do tipo biodegradável como o PHBV, oferecem uma forma estrutural de características interessante para a produção de sistemas particulados para fins de carregamento e liberação de princípios ativos, e escalas micro e nanométricas desempenham papéis fundamentais no direcionamento e melhores respostas de sistemas farmacológicos.

O objetivo deste trabalho foi acarrear estudos de diferentes técnicas de produção de M-NPs visando obter um sistema matricial composto de PHBV e esteróides. O princípio dos estudos de pesquisa foi a aplicação do uso do CO₂SC como co-solvente com o intuito de melhorar as técnicas convencionais de produção de partículas.

No primeiro momento os estudos do comportamento de fases para os sistemas ternários envolvendo CO₂ + solvente orgânico + soluto mostraram as melhores condições possíveis para a aplicação do CO₂SC na obtenção de M-NPs de PHBV envolvendo a precipitação do soluto por fatores de imiscibilidade e a remoção do solvente orgânico por separação das fases sólido fluido.

Na segunda etapa experimental, M-NPs de PHBV foram produzidas utilizando a técnica SAS para o sistema envolvendo CO₂ + Clorofórmio + PHBV. M-NPs com tamanhos médios de $916,26 \pm 374,72$ nm foram obtidas, no entanto as partículas apresentaram traços de aglomerações oriundos do processo de secagem instantâneo após precipitação do mesmo. Este processo mostrou-se bem eficiente considerando a praticidade de se obter M-NPs de PHBV em uma única etapa de produção e eficiente eliminação do solvente orgânico.

O estudo de produção de M-NPs com base em técnicas de emulsão apresentado no capítulo VI mostrou em diversas condições a obtenção de partículas de tamanhos que variam na ordem de micro e nanômetros. As observações mostraram a presença de alguns traços de aglomerações e polidispersidade não muito boas que podem ter originados de diversos fatores, entre eles o tempo de evaporação do solvente por meio convencional, no entanto os resultados foram fundamentais para o desenvolvimento de uma nova técnica envolvendo a formação de um emulsão seguida de extração do solvente orgânico que visa amenizar a formação de aglomerados e melhorar a polidispersidade das partículas.

A técnica apresentada no capítulo VII mostrou que é possível obter a formação de uma emulsão em um meio pressurizado com o uso de duas bombas de alta pressão para líquidos onde os caminhos se interceptam por meio de uma união do tipo “T” e posteriormente entram em contato com CO₂ em condições SC. O resultado final deste processo experimental acarretou na obtenção de partículas na ordem de micrômetros e com boa polidispersidade. Os resultados mostram que a técnica é promissora em função da redução dos níveis de aglomeração presentes no método SAS, pois neste caso o CO₂SC age com moderada função tensoativa e como co-solvente ao mesmo tempo. A alternativa apresentada elimina a aplicação de um método separado (outra etapa) para a formação da emulsão e oferece uma eliminação mais efetiva do solvente orgânico.

Um estudo pertinente ao tamanho das partículas em função do peso molecular do PHBV foi abordado no capítulo VIII. O polímero sofreu redução do seu peso molecular por meio de reação de hidrólise ácida e foi feita a aplicação da melhor condição da técnica de emulsão simples condizente ao menor tamanho médio de partículas de PHBV obtidas na ordem de nanômetros para todas as amostras com diferentes PM. Os resultados mostraram um efeito positivo na redução do tamanho das partículas em decorrência do decréscimo da massa molar do PHBV. De forma semelhante, a técnica de SFEE foi explorada com as mesmas condições de formação de emulsão visando melhoria no processo de extração do solvente. A técnica de SFEE mostrou-se eficiente resultando na obtenção de NPs de tamanhos médios um pouco abaixo do obtido no processo de emulsão convencional.

Por fim, foram realizados estudos iniciais de carregamento e liberação de esteróides a partir de M-NPs de PHBV carregadas de P4 e AMP. Optou-se por explorar modos diferentes de aprisionamento do fármaco no núcleo da matriz e avaliar os respectivos rendimentos pertinentes a eficiência de carregamento e encapsulamento. Um sistema matricial composto de M-NPs produzidas via SAS foram carregadas de P4 por meio de um sistema pressurizado com CO₂SC, e um sistema reservatório de NPs carregadas de AMP produzidas via SFEE. A avaliação dos estudos de eficiência de carregamento e encapsulamento mostraram que o método de impregnação em sistema pressurizado permite a determinação da quantidade de fármaco aprisionado em decorrência do tempo de reação, e no método de carregamento por emulsão a quantidade de fármaco a ser carregada é pré-determinada no momento do preparo da emulsão, considerando que haverá certo percentual de perda durante o processo. O estudo da cinética de liberação mostrou que os sistemas matriciais e reservatório, obtiveram uma cinética de liberação controlada do tipo modificada, e que as variações da quantidade de fármaco aprisionado em decorrência dos diferentes tempos de impregnação apresentada no sistema matricial resultam em

cinéticas com diferentes perfis de liberação. Contudo, os sistemas de liberação modificada apresentados neste trabalho mostram grande potencial para administração de fármacos no campo farmacêutico e veterinário.

10.2. PERSPECTIVAS FUTURAS

A abordagem de várias técnicas de produção de M-NPs apresentadas neste mostraram uma evolução na ordem dos tamanhos das partículas obtidas, porém os resultados podem ser melhorados em relação à polidispersidade das mesmas.

O sistema de produção de partículas utilizando a técnica de formação de emulsão seguida de extração por FSC em única etapa apresentado no capítulo VII pode ser mais explorado, visto que várias condições podem ser modificadas em função de um melhor rendimento, como fração dos componentes, fluxos do sistema, diferentes polímeros e diferentes surfactantes, tal como diferentes condições de pressão e temperatura.

Um estudo mais aprofundado do sistema de liberação modificado a partir de M-NPs carregadas de esteróides pode ser explorado por meio de outras formas/técnicas de carregamento, bem como o uso de modelos matemáticos que simulam cinéticas de várias ordens e permitem o ajuste ideal do perfil de liberação do fármaco.

Realizar estudos do comportamento deste material em sistemas “*in vivo*” para a administração de esteróides no desenvolvimento de protocolos de IATF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELWAHED, W., DEGOBERT, G., FESSI, H. A. pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): formulation and process optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 309, p. 178-188, 2006.
- ABRANTES, M. e KONSTATIN, L. Ressonância Magnética Nuclear – Ferramenta Versátil em Química Farmacêutica e Imagiologia Média. Centro de Química Estrutural (Artigos). Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa. *Química* 117 – Abr/Jun. 2010.
- AKARAONYE, E., KESHAVARZ, T., ROY, I. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* v. 85, p. 732-743. 2010
- ALESSI, P., CORTESI, A., KIKIC, I., FOSTER, N. R., MACNAUGHTON, S. J., COLOMBO, I. “Particle Production of Steroid Drugs Using Supercritical Fluid Processing”. *Ind. Eng. Chem. Res.* 1996, 35, 4718-4726.
- ALFREY, T., GURNEE, E.F. *Polímeros Orgânicos*. Tr.: Júlio Buschinelli. São Paulo: Edgard Blucher, 1971.
- ANDREW, E. R., JURGA, K., RADOMSKI, J. M., & REYNHARDT, E. C.. Proton relaxation NMR study of polycrystalline progesterone. *Solid state nuclear magnetic resonance*, 1(3), 121–5. (1992).
- ASGHARI-KHIAVI, M., YAMINI, Y., FARAJZADEH, M. A. “Solubilities of two steroid drugs and their mixtures in supercritical carbon dioxide”. *The Journal of Supercritical Fluids* 30 (2004) 111–117.
- AZEREDO, D. M. DE, ROCHA, D. C., JOBIM, M. I. M., MATTOS, R. C., & GREGORY, R. M. (2007). Efeito da sincronização e da indução de estros em novilhas sobre a prenhez e o índice de repetição de crias na segunda estação reprodutiva. *Ciência Rural*, v.37(1), p. 201–205. (2007) doi:10.1590/S0103-84782007000100032.

- AZEVEDO, M.M.M. Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. Monografia de conclusão de curso. Laboratório de Química do Estado Sólido – Instituto de Química – UNICAMP-Workshop, 09.dez.2002.
- BALDASSARRE, H. Reproducción asistida en la especie caprina: inseminación artificial a clonación. *Rev. Bras. Reprodução Animal*. v.31, p.274-282, 2007.
- BARBOSA, C. F., JACOMINI, J. O., DINIZ, E. G., MARIA, R., & TAVARES, M.. *Revista Brasileira de Zootecnia* Inseminação artificial em tempo fixo e diagnóstico precoce de gestação em vacas leiteiras mestiças 1 Timed artificial insemination and early pregnancy diagnosis in crossbred dairy cows, 79–84. 2011.
- BARUSELLI, P.S., SOUZA, A.H., MARTINS, C.M., GIMENES, L.U., SALES, J.N.S., AYRES, H., ANDRADE, A.F.C., RAPHAEL, L.C.F., ARRUDA, R.P. Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, n.2, abril/jun. 2007.
- BARUSELLI, P.S., REIS, E.L., MARQUES, M.D.O., NASSER, L.F.T., BÓ, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 479-486, 2004.
- BARUSELLI, P.S., MARQUES, M.O., CARVALHO, N.A.T., MADUREIRA, E.H., CAMPOS FILHO E.P. Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 26, n. 3, p. 218-221, 2002.
- BATHISTA, A.L.B.S. Produção de plástico biodegradável a partir de fontes renováveis. (2001) In: *Anais do IX Encontro de Iniciação Científica*. Cuiabá: EdUFMT, 327 p.
- BERANIČ, N., BROŽIČ, P., BRUS, B., SOSIČ, I., GOBEC, S., & LANIŠNIK RIŽNER, T. Expression of human aldo-keto reductase 1C2 in cell lines of peritoneal endometriosis: potential implications in metabolism of progesterone and dydrogesterone and inhibition by progestins. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 130(1-2), 16–25. 2012. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.12.011.
- BIANCO, A.C., RABELO, R. Introdução à fisiologia endócrina. In: Aires, M.M. *Fisiologia*, 2ª Edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, cap. 65, p. 741-765. 1999.

- BICHERI, M.T. Desenvolvimento e avaliação *in vitro* de comprimidos de liberação modificada para veiculação de zidovudina. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade de Sorocaba. Sorocaba, SP – Brasil, 2010.
- BOCCACCINI, A.R., BUCKE, C., ROY, I. & VALAPPIL, S.P. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, V. 91, pp. 1-17. 2007.
- BORTOLUZI, P., e LAPORTA, L.V. Equivalência farmacêutica e estudo comparativo dos perfis de dissolução de *study of dissolution profiles of medications containing cimetidine*. *Disc. Scientia. Série: Ciências da Saúde*, Santa Maria, v. 8, n. 1, p. 21-38, 2008.
- BÓ, G.A., BARUSELLI, P.S., MORENO, D., CUTAIA, L., CACCIA, M., TRIBULO, R., TRIBULO, H. and MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*. v.57, p.53-72. 2002.
- BRAGA, F.A.. Emprego de um novo dispositivo intravaginal para liberação de progesterona em programa de IATF em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). Dissertação (mestrado), Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2008.
- BRAGANÇA, J.F.M. Estratégias Hormonais de indução/sincronização de estro em novilhas de corte entre 12 e 14 meses de idade. Tese de doutorado. Centro de Ciências Rurais. Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria-RS, Brasil, 2009.
- CAMPARDELLI, R., G. DELLA PORTA, *et al.* "Solvent elimination from polymer nanoparticle suspensions by continuous supercritical extraction." *The Journal of Supercritical Fluids*, v.70(0): p.100-105. 2012.
- CASTIER, M. XSEOS: An Open Software for Chemical Engineering Thermodynamics. *Chem. Eng. Educ*, v.42, 2, p.74-81. Spring. 2008.
- CAVALIERI, J., FITZPATRICK, L.A. Oestrus detection techniques and insemination strategies in *Bos indicus* heifers synchronised with norgestomet-oestradiol. *Australian Veterinary Journal* v.72 p. 177-82, 1995.

- CHATTOPADHYAY, P., HUFF, R., SHEKUNOV, B.Y. “Drug Encapsulation Using Supercritical Fluid Extraction of Emulsions”. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 95, No. 3, 2006.
- CHEON, Y., *et al.* A genomic approach to identify novel progesterone receptor regulated pathways in the uterus during implantation. *Molecular Endocrinology*. v.16, n.12. p.2853-2871, 2002.
- CHIEHMING, C.J., CHIU, K.L., DAY, C.Y. A new apparatus for the determination of P-x-y diagrams and Henry’s constants in high pressure alcohols with critical carbon dioxide. *J. of Supercrit. Fluids*, 12:337-14. 1998.
- CHIU, H.Y., LEE, M.J., LIN, H.M. Vapor-liquid phase boundaries of binary mixtures of carbon dioxide with ethanol and acetone. *J. Chem. Eng. Data*, 53, 2393-2402. 2008.
- COCERO, M.J., MARTÍN, A., MATTEA, F., SALIMA, V. Encapsulation and coprecipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 47, n. 3, p. 546-555, 2009.
- COIMBRA, U.D.E. *Preparação e Caracterização de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural*. Tese (doutorado). Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade de Coimbra. Coimbra, 2010.
- COOPER, D.A., CARVER, D.A., VILLENEUVU, P., SILVIA, W.J., INSKEEP, E.K. Effects of progestogen treatment on concentrations of prostaglandins and oxytocin in plasma from the posterior vena cava of post-partum beef cows. *J. Reprod. Fertil.* v.91, p.411-421, 1991.
- CORTEEL, J.M., LEBOEUF, B. & BARIL, G. Artificial breeding of adult goat and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. *Small Rum. Res.* 1:19-35, 1988.
- COSTA, M. S., DUARTE, A. R. C., MARGARIDA CARDOSO, M., DUARTE, C. M. M. “Supercritical antisolvent precipitation of PHBV microparticles”. *International Journal of Pharmaceutics*. v.328, p.72-77, 2007.
- COSTA, P., LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001b.

- DASH A.K, CUDWORTH, I.I.G.C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, v. 40, p. 1-12, 1998.
- DIXON, D.J., *Polymeric Materials processed with Compresses Fluids Anti-solvent*. PhD thesis, 1993.
- EISENBRAND, G., POOL-ZOBEL, B., BAKER, V., BALLS, M., BLAAUBOER, B.J., BOOBIS, A., CARERE, A., KEVEKORDES, S., LHUGUENOT, J.C., PIETERS, R., KLEINER, J.. *Methods of in vitro toxicology*. *Food Chem. Toxicol.* v.40, p.193-236. 2002.
- ELVASSORE, N., PARTON, T. AND BERTUCCO, A. Kinetics of Particle Formation in the Gas Antisolvent Precipitation Process. *AIChE Journal*, v. 49, n° 4, p. 859-868, 2003.
- EMBLETON, J.K., TIGUE, B.J. Polymers for biodegradable medical devices XI. Microencapsulation studies: characterization of hydrocortisone-loaded poly-hydroxybutyratehydroxyvalerate microspheres. *Journal of Microencapsulation*. v. 19, n. 6, 737-752, 2002.
- ESTEVEES, A.C.C., BARROS-TIMMONS, A., & TRINDADE. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos, *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 5, 798-806, 2004.
- FAGES, J., LOCHARD, H., LETOURNEAU, J.J., SAUCEAU, M. AND RODIER, E. Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology. *Powder Technology*, v. 141, p. 219 – 226, 2004.
- FALCO, N., REVERCHON, E., DELLA PORTA, G., *Injectable PLGA/hydrocortisone formulation produced by continuous supercritical emulsion extraction*, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 441, Issues 1–2, 30 January 2013, Pages 589-597, ISSN 0378-5173, 10.1016/j.ijpharm.2012.10.039.
- FARAGO, P.V, RAFFIN, R.P., & POHLMANN, A.R. Obtained by the Double Emulsion / Solvent Evaporation Technique, v.19(7), p.1298–1305. 2008.
- FAROKHZAD, O.C., LANGER, R. Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, n. 14, p.1456-1459, 2006.

- FARRANT, R.D., KIRK, D.N., MERSH, J.D., & SANDERS, J.K.M. Recent applications of N.M.R. to the investigation of steroid structures. *Journal of Steroid Biochemistry*, 19(1), 181–187. 1983. doi:10.1016/S0022-4731(83)80024-7.
- FAVARETO, R., CABRAL, V.F., CORAZZA, M.L. AND CARDOZO-FILHO, L. Vapor-liquid and solid-fluid equilibrium for progesterone + CO₂, progesterone+propane, and progesterone+n-butane systems at elevated pressures. *Journal of Supercritical Fluids*. v. 45, p. 161 – 170, 2008.
- FRANCESCHI, E. Precipitação e encapsulamento de β -caroteno em PHBV empregando tecnologia supercrítica. Tese de Doutorado. Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC – Brasil. 2009.
- FURLAN, M., KLUGE, J., MAZZOTTI, M., LATTUADA, M. “Preparation of biocompatible magnetite–PLGA composite nanoparticles using supercritical fluid extraction of emulsions”. *J. of Supercritical Fluids* v.54 p.348–356. 2010.
- GALLAGHER, P.M., COFFEY, M.P., KRUKONIS, V.J., KLASUTIS, N. “Gas Antisolvent Recrystallization: New Process to Recrystallize Compounds Insoluble in Supercritical Fluids, American Chemical Society Symposium, v.44, p.334-354, 1989.
- GAO, X., WU, B., ZHANG, Q., CHEN, J., ZHU, J., ZHANG, W., RONG, Z., CHEN, H., JIANG, X. Brain delivery of vasoactive intestinal peptide enhanced with the nanoparticles conjugated with wheat germ agglutinin following intranasal administration. *Journal of Controlled Release*, v.121, p.156-167, 2007.
- GASPARI, P.D. M. Preparação e caracterização de micro e nanopartículas poliméricas contendo estreptomicina. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP, 2006.
- GENÇ, L., JALVAND, E. Preparation and in vitro evaluation of controlled release hydrophilic matrix tablets of ketorolac tromethamine using factorial design. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 34, p. 903-910, 2008.
- GINTY, P.J., WHITAKER, M.J., SHAKESHEFF, K.M., HOWDLE, S.M. “Drug delivery goes supercritical”. *Research Report. Nanotoday*, August p.42 – 48. 2005.

- GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. A nomenclatura em análise térmica – parte II. Cerâmica, São Paulo, v.34, n.225, p.163-164, 1988.
- GIUFRIDA, W.M., FAVARETO, R., CABRAL, V.F., MEIRELES, M.A.A, CARDOZO-FILHO, L., CORAZZA, M.L. High-Pressure Vapor-Liquid Equilibrium Data for Ternary Systems CO₂ + Organic Solvent + Curcumin. The Open Chemical Engineering Journal, v.4, p.3-10. 2010.
- GONZÁLES, M. S *et al.* Estudio comparativo de disolución de comprimidos de clorhidrato de propranolol. Revista Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo, v. 31, n. 2, p. 79-83, 1995.
- GONZALES-PADILHA, E., RUIZ, R., LEFEVER, D., DENHAM, A., WILTBANK, J.N. Puberty in Beef Heifers. III Induction of Fertile Estrus. Journal Animal ScienceI, v. 40, pp. 1110-1118, 1975.
- GOTTSCHALL, C., BITTENCOURT, H.R., MATTOS, R.C., & GREGORY, R.M. Retardo da realização da IATF sobre o desempenho reprodutivo na estação de acasalamento de vacas de corte lactantes, Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.64, n.2, p.295-304, 2012.
- GRAZZINI, E. *et al.* Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. Nature, v.392, p.509–512, 1998.
- GURSEL I., YAGMURLU, F., KORKUSUZ, F., HASIRCI, V. In vitro antibiotic release from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) rods. Journal of microencapsulation. V. 19, n. 2, 153-164, 2002.
- GUTERRES, S.S., BENVENUTTI, E.V., POHLMANN, A.R. Nanopartículas poliméricas para administração de fármacos. In: DURAN, Nelson; MATTOSO, Luiz Henrique Capparelli e MORAES, Paulo Cezar. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo: Artliber editora, p.161-173. 2006.
- HANS, M.L. AND LOWMAN, A.M., Nanoparticles for drug delivery. Handbook of Nanoscience, Engineering and Technology. 2a. Ed., CRC Press LLG, Boca Rato, Florida, Editor: Goddard, W.A. III. 2007.

- HASMAM, F.P., ASSAD, C., JAHNO, V.D., SILVA, J.B., ROSANE, A., & EINLOFT, S. Síntese de polímeros biodegradáveis para a preparação de nanopartículas poliméricas para uso na área médica, X Salão de iniciação Científica PUCRS. 1248–1250. 2009.
- HAYASHI, M.C.P.I., FURNIVAL, A.C.M., HAYASHI, M.R.M., SILVA, M.R., LIMA, M.Y. Em direção à construção de indicadores regionais de nanociência e nanotecnologia. *Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional*. Vol.2, n.3, p.85-127, Set/Dez. 2006.
- HOGAN, JR, C.J., YUN, K.M., CHEN, D., LENGGORO, I.W., BISWAS, P. AND OKUYAMA, K., Controlledsize polymer particle production via electrohydrodynamicatomization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 331, p. 67-76, 2007.
- HOROWITZ, M., MARTIN, D. P., PEOPLES, O. P. & WILLIAMS, S. F. PHA applications: addressing theprice performance issue in tissue engineering. *International Journal of Biological Molecules*, V. 25, pp. 111-121. 1999.
- JACK, K. S., VELAYUDHAN, S., LUCKMAN, P., TRAU, M., GRØNDAHL, L., & COOPER-WHITE, J.. The fabrication and characterization of biodegradable HA/PHBV nanoparticle-polymer composite scaffolds. *Acta biomaterialia*, 5(7), 2657–67. (2009) doi:10.1016/j.actbio.2009.03.017.
- JOUNG, S.N., YOO, C.W., SHIN, H.Y., KIM, S.Y., YOO, K-P, LEE, C.S., AND HUH, W.S., Measurments and correlation of high-pressure VLE of binary CO₂-alcoholo systems (methanol, ethanol, -methoxyethanol and 2-ethoxyethanol), *Fluid Phase Equilibria*, vol. 185, pp. 219-230, 2001.
- KANG, YUNQING, YIN, GUANGFU, OUYANG, PING, HUANG, ZHONGBING, YAO, YADONG, LIAO, XIAOMING, CHEN, AIZHENG, PU, XIMING. Preparation of PLLA / PLGA microparticles using solution enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS).
- KORSMEYER, R.W., GURNY, R., DOELKER, E., BURI, P., PEPPAS, N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983.

- KRÄHENBÜHL, O., TSCHOPP, J. Debate: the mechanism of lymphocytemediated killing. Perforin-induced pore formation. *Immunol Today*. v.12, p.399-402. 1991
- KUMAR, M.N.V.R. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v.3 (2), p.234-258, 2000.
- LAZZARONI, M.J., BUSH, D., BROWN, J.S., AND ECKERT, C.A., High-pressure vapor-liquid equilibria of some carbon dioxide plus organic binary systems. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 50 (1): p. 60-65. 2005.
- LOPES, C.M., LOBO, J.M.S., COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, Vol.41, n.2, Abr/Jun, 2005.
- LU, Y. AND CHEN, S.C. Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, p.1621-1633, 2004.
- LUO, S., GRUBB, D.T., & NETRAVALI, A. N. The effect of molecular weight on the lamellar structure, thermal and mechanical properties of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerates). *Exposure*, 43, 4159–4166. 2002.
- LUO, S., NETRAVALLI, A.N., A study of physical and mechanical properties of poly(hidroxyburyrate-co-hidroxyvalerate) during composting. *Polymer degradation and stability*, v.85, p. 815-821, 2004.
- LYRA, M.A.M. SOARES-SOBRINHO, J.L., BRASILEIRO, M.T., La ROCA, M.F., BARRAZA, J.A., VIANA, O.S., ROLIM-NETO, P.J. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. *Lat. Am. J. Pharm.* V. 26 (5): p. 784-93. 2007.
- MACEDO NETO, J.C. Produção e caracterização de nanocompósitos poliméricos obtidos por polimerização em emulsão utilizando caulinita amazônica. Tese de Doutorado. Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP – Brasil, 2011.
- MACMILLAN, K.L., TAUFA, V.K., BARNES, D.R., DAY, M. Plasma Progesterone Concentrations in Heifers and Cows Treated with a New Intravaginal Device. *Animal Reproduction Science*, v. 26, pp. 25-40, 1991.

- MADUREIRA, E.H., PIMENTEL, J.R.V. IATF como uma ferramenta para melhorar a eficiência reprodutiva In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, v.16, Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.
- MADUREIRA, E.H., PIMENTEL, J.R.V., ALMEIDA, A.B., ROSSA, L.A.F. “Sincronização com Progestágenos” In: Simpósio Internacional de Reprodução Aplicada, Londrina- PR. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- Universidade de São Paulo, São Paulo. Anais. 1, p. 246, 2004.
- MANADAS, R., EUGÉNIA, M., & VEIGA, F.. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada, Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 38, n. 4, out./dez., 2002.
- MANO, E. B., MENDES, L. C. Introdução a Polímeros, Rio de Janeiro: Edgard Blücher, 2º Ed. 191 p. 1996.
- MANO, E.B. Introdução a Polímeros. 3d. São Paulo: Edgard Blucher, 1988.
- MANSUR, H. S. Notas de Aula de Caracterização de Superfícies e Interfaces. Curso de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e Minas. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Brasil, 2001.
- MARIA, S. Estratégias Hormonais de Indução / Sincronização de Estro em novilhas de estro em novilhas de corte entre 12 e 14 meses de Idade. Tese de Doutorado. 1–123. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS – Brasil, 2007.
- MARTINEZ, M.F., DE NAVA, G., DEMMERS, K.J., TUTT, D., RODRIGUEZ SABARRÓS, M., SMAILL, B., CORTI, M., *et al.* Intravaginal progesterone devices in synchronization protocols for artificial insemination in beef heifers. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, v.47(2), p.230–7. 2012. doi:10.1111/j.1439-0531.2011.01833.x
- MCCLEMENTS, D.J. “Emulsion Design to improve the delivery of functional lipophilic Components”. *Annual Reviews. Food Science Technology*. 2010. 1:241–69.

- McCRACKEN, J.A. *et al.* Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological Reviews*, v. 79, p. 263-324, 1999.
- McHUGH, M.A. & KRUKONIS, V.J. *Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice*. Butterworth-Heinemann, 2th Edition, 1994.
- MCMANAMEY, W.J, DAVIES, J.T, WOOLLEN, J.M., COE, J.R. The influence of molecular diffusion on mass transfer between turbulent liquids. *Chemical Engineering Science*, vol. 28, p. 1061-1069. 1973.
- MEHL, H. "Nanocompósitos Formados por Nanotubos de Carbono , Nanopartículas de Prata e Polianilina : Síntese e Caracterização". Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em engenharia – PIPE. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Pr – Brasil. 2011.
- MEHUYS, E., REMON, J.P. KORST, A. BORTEL, L.V. MOLS, R. AUGUSTIJS, A. PORTER, C. & VERVAET, C. *J. Control. Release*. v.107 p. 523-36. 2005.
- MENEGHETTI, M., SÁ FILHO, O.G., PERES, R.F.G., LAMB, G.C., VASCONCELOS, J.L.M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. *Theriogenology*, v. 72, p. 179-189, 2009.
- MEZZOMO, N., E. D. PAZ, *et al.* "Supercritical anti-solvent precipitation of carotenoid fraction from pink shrimp residue: Effect of operational conditions on encapsulation efficiency." *The Journal of Supercritical Fluids* 66(0): 342-349. 2012.
- MIGNONI, M. L. Síntese, caracterização e aplicações de nanocompósitos polímero-argila. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Ciências dos Materiais. Univ. Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS – Brasil, 2008.
- MONTORO, S.R., TEBALDI, M.L., ALVES, G.M., BARBOZA, J.C.S. Redução da massa molecular e funcionalização do poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBHV) via hidrólise ácida e transesterificação com glicóis. *Polímeros*, vol. 21, nº 3, p. 182-187, 2011.
- MULYE, N.V., TURCO, S.J. A simple model based on first order kinetics to explain release of highly water soluble drugs from porous dicalcium phosphate dehydrate matrices. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v. 21, n. 8, p. 943-953, 1995.

- NAIR, L.S, LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, v. 32, p. 762-798, 2007.
- NAKAMURA, M., OZAKI, S., ABE, M., DOI, H., MATSUMOTO, T. AND ISHIMURA, K. Size-controlled synthesis, surface functionalization, and biological applications of thiol-organosilicaparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 79, p.19-26, 2010.
- NALAWADE, S.P., PICCHIONI, F. AND JANSSEN, L.P.B.M. Supercritical carbon dioxide as a green solvent for processing polymer melts: Processing aspects and applications. *Progress in Polymer Science*, v.31, p.19-43, 2006.
- ODDE, K.G. A review of synchronization of estrus in post-partum cattle. *Journal of Animal Science*. v. 68, p. 817-830, 1990.
- ODENING, K.E., CHOI, B.-R., & KOREN, G. Sex hormones and cardiac arrest in long QT syndrome: does progesterone represent a potential new antiarrhythmic therapy? *Heart rhythm: the official journal of the Heart Rhythm Society*, 9(7), 1150–2. doi:10.1016/j.hrthm.2012.02.028. 2012.
- OLIVEIRA, M.A, YOSHIDA, M.I. and LIMA GOMES, E.C. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. *Quím. Nova [online]*., vol.34, n.7, pp. 1224-1230. 2011. ISSN 0100-4042.
- OLIVEIRA, R.P.M., OLIVEIRA, F.F. Manipulação do ciclo estral em ovinos. *pubvet*, V.2, N.7, Fev3, 2008.
- PAL, S.L., JANA, U., MANNA, P. K., MOHANTA, G. P., MANAVALAN, R. Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. v.01 (06), p.228-234, 2011.
- PARDO, F.J.D.. Emprego de um novo dispositivo intravaginal para liberação sustentada de progesterona em programas de TETF em receptoras de embrião (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*). Dissertação (mestrado), Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2008.
- PELLICANO, M. Desenvolvimento e caracterização de blendas PHBV/ECOFLEX® e suas modificações com amidos. Dissertação (Mestrado, Ciências e Engenharia dos

- Materiais). Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, São Carlos, 2008.
- PEREIRA, V.C. Inseminação Artificial e sincronização em bovinos. Monografia de conclusão de curso de graduação. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS, Brasil, 2009.
- PEZINNI B.R., SILVA M.A.S., FERRAZ H.G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 43, p.491-502, 2007.
- PIAI, F.J. Preparação e caracterização de complexos polieletrólitos de quitosana/sulfato de condroitina e estudos de liberação controlada. Tese doutorado (61 fl.). Departamento de Química. Centro de Ciências Exatas. Universidade Estadual de Maringá, Maringá-Pr, Brasil. 2008.
- Pich, A., Schiemenz, N., Corten, C., Adler, H-J. P. "Preparation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) particles in O/W emulsion". *Polymer* 47 (2006) 1912–1920.
- PIMENTEL, J. R. V.. Emprego de matriz polimérica biodegradável em dispositivos vaginais para liberação sustentada de progesterona em fêmeas bovinas: Testes *in vitro* e *in vivo*. Dissertação (mestrado), 97fls – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2006.
- PIMENTEL, J. R. V.. Liberação sustentada de progesterona em micro partículas de PHB-V e PHB-V/PCL produzidas em meio super-crítico. Tese (Doutorado), 137fls – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2010.
- PRASAD RAO, J., GECKELER, K.E. "Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters". *Progress in Polymer Science*. v.36, p.887–913. 2011.
- QUINTANAR-GUERRERO D. Etude du mcanisme de formation de nanoparticules polyme'riques par la technique d'e'mulsification- diffusion. *Colloid Polym Sci* 275:640–647. 1997.

- QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLEMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E.
Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v. 24, p. 1113-1128, 1998.
- RAFFIN, R.P., OBACH, E.S., MEZZALIRA, G., POHLMANN, A.R., GUTERRES, S.S.
Nanocápsulas poliméricas secas contendo indometacina: Estudo de formulação e de tolerância gastrointestinal em ratos. *Acta Farm. Bonaerense*, p. 163-72, 2003.
- RAJ, V., JAIME, R., ASTRUC, D., SREENIVASAN, K. "Detection of cholesterol by digitonin conjugated gold nanoparticles". *Biosensors and Bioelectronics* v.27 p.197–200. 2011.
- RATHKE, A.F., POESTER, D., LORENZATTO, J.F., SCHMIDT, V.B., & HERTER, L.D. Contraceção hormonal contendo apenas progesterona Contracepción hormonal conteniendo apenas progesterona, (10). *Adolescencia Latinoamericana*. 1414-7130/2-90-96. 2001.
- REGO, M.G.B., S.F. LIGÓRIO, J.A. CARDILHO, R.C. SIQUEIRA, R. JORGE & A.S.J. CUNHA. *Arq. Bras. Oftalmol.* 66: 891-6. 2003.
- REID, R.C., PRAUSNITZ, J.M., POLING, B.E. *The Properties of Gases and Liquids*. 4th ed., McGraw-Hill, New York, 1987.
- REIS, A.V., GUILHERME, M.R., RUBIRA, A.F., MUNIZ, E.C. Mathematical model for the prediction of the overall profile of in vitro solute release from polymer networks. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.310 p.128–135. 2007.
- REVERCHON, E., DELLA PORTA, G., FALIVENE, M.G. Process Parameters and Morphology in Amoxicillin Micro and Submicro Particles Generation by Supercritical Antisolvent Precipitation. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 17, p. 239-248, 2000a.
- RIEUX, A., FIEVEZ, V., GARINOT, M., SCHNEIDER, Y.J., PRÉAT, V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release*, v. 116, p. 1-27, 2006.

- ROCHA, S.R.P. DA, PSATHAS, P.A., KLEIN, E., JOHNSTON, K.P., Concentrated CO₂-in-Water Emulsions with Nonionic Polymeric Surfactants, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2001, 239, 241-253.
- RODRIGUES, P.O., STULZER, H. K., CRUZ, A. P., FOPPA, T., CARDOSO, T. M., SILVA, M.A.S. Equivalência farmacêutica entre comprimidos de propranolol comercializados no mercado nacional. *Infarma*, v. 18, n. 3/4, p. 16-21, 2006.
- ROY, I., SIVANIAH, E., SUMMERS, D. & THOMSON, N. In vitro production of polyhydroxyalkanoates: achievements and applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, V. 85, pp. 760-767. 2010.
- GUINEBRETIERE, S. BRIANÇON, S. LIETO, J. MAYER, C. FESSI, H. *Drug Dev. Res.* V.57 p.18–33. 2002.
- S.-D. YEO, P.G. DEBENEDETTI, M. RADOSZ AND H.-W. Schmidt, Supercritical Anti-Solvent (SAS) Process for Substituted Para-Linked Aromatic Polyamides: Phase Equilibrium and Morphology Study. *Macromolecules*, 26, 6207, 1993.
- SABIR, M. I., XU, X., & LI, L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *Journal of Materials Science*, 44(21), 5713–5724. doi:10.1007/s10853-009-3770-7. 2009.
- SANTOS, R.M.M. dos; FIALHO, S. L. Nanopartículas: uma alternativa para a administração de fármacos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 37, p. 53-59, 2007.
- SANTOS, R.M., VASCONCELOS, J.L.M., PEREZ, G.C., SÁ FILHO, O.G., MACIEL, A.B.B. Concentração sérica de progesterona em novilhas tratadas com diferentes dispositivos intravaginais de progesterona. DPEA - FMVZ - UNESP, Botucatu, SP, Brasil *Acta Scientiae Veterinariae*, v.32, p.217, 2004.
- SCHAFFAZICK, S.R., GUTERRES, S.S., FREITAS, L.L., POHLMANN, A. R. Caracterização e Estabilidade Físico-química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados para Administração de Fármacos. *Química Nova*, v. 26 (5), p. 726-737, 2003.

- SCHAFFAZICK, S.R. Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antioxidante de sistemas nano e microparticulados contendo melatonina. Tese (Doutorado). 256 p. Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS, Brasil, 2006.
- SCHULZ, P.A.B. A encruzilhada da nanotecnologia: inovação, tecnológicas e riscos. Vieira & Lent. Rio de Janeiro: 2009.
- SCOTT, G. (2001) Green Polymers. *Carbohydrate Polym*, 68, 1-7.
- SCURTO, A. M., LUBBERS, C. M., BRENNECKE, J. F. "Experimental measurement and modeling of the vapor-liquid equilibrium of carbon dioxide + chloroform." *Fluid Phase Equilibria*. 2001, 190(1-2): 135-147. ISSN: 0378-3812.
- SEHORINI, G.A. Micropartículas poliméricas de PHBV e emulsões contendo extrato vegetal de *Carapa guianensis*: desenvolvimento, caracterização e aplicação. Tese (Doutorado). Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Paraná. Curitiba-Pr, Brasil, 2010.
- SHARIATI, A., AND PETERS, C.J., High-pressure phase behavior of systems with ionic liquids: I. Measurements and modeling of the binary system fluoroform + 1-ethyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, *Journal of Supercritical Fluids*, 25 (2), 109-117. 2003.
- SHEPARD, M.K., AND FAINSTAT, T. Comparison of Serum Progesterone and Endometrial Biopsy for Confirmation of Ovulation and Evaluation of Luteal Function. *Fertility and Sterility*, v.28, p. 541, (1977).
- SHI, J., & FAN, C. FT-IR study on interactions between medroxyprogesterone acetate and solvent in $\text{CHCl}_3/\text{cyclo-C}_6\text{H}_{12}$ and $\text{CCl}_4/\text{cyclo-C}_6\text{H}_{12}$ binary solvent systems. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, v.95, p.230-234. doi:10.1016/j.saa.2012.05.002.
- SILVA, Elton C., PAOLA, M.V.R.V., e MATOS, J.R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* [online]. 2007, vol.43, n.3, pp. 347-356. ISSN 1516-9332.

- SIMONETTI, L., BLANCO, M.R., GARDON, J.C.: Estrus synchronization in ewes treated with sponges impregnated with different doses of medroxyprogesterone acetate. *Small Ruminant Research*, v.38, p.243–247. 2000.
- SIMPLÍCIO, A.A., FREITAS, V.J.F. & FONSECA, J.F. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. *Rev. Bras. Reprodução Animal*. v.31, p.234-246, 2007.
- SINHA, V.R., BANSAL, K., KAUSHIK, R., KUMRIA, R., TREHAN, A., Review: Poly- β -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview, *International Journal of Pharmaceutics*, 278, 1–23, 2004.
- SIQUEIRA, L.C., OLIVEIRA, J.F.C., LOGUÉRCIO, R.S., LÖF, H.K., GONÇALVES, P.B.D.. Sistemas de inseminação artificial em dois dias com observação de estro ou em tempo fixo para vacas de corte amamentando. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.2, p.411-415, mar-abr, 2008.
- SKINNER, J.R., & VANDENBERG, J. I. Is medroxyprogesterone safe in women with long QT syndrome? *Heart rhythm: the official journal of the Heart Rhythm Society*, 9(7), 1148–9. 2012. doi:10.1016/j.hrthm.2012.02.029.
- SOUTO, E.B., GENÓMICA, C.DE, TRÁS-OS-MONTES, U.DE, DOURO, A., Biotecnológicos, D. D. P., & Santana, M. H. A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de Polímeros Pré-formados – Parte II, 22, 101–106. 2012.
- SOUZA, R.C.R., ANDRADE, C.T. Investigação dos processos de gelatinização e extrusão de amido de milho. *Polímeros Ciência e Tecnologia*, v. 10, p. 24-30. 2000.
- SRINIVASAN, G.E., ELLIOT, J.R., *Microcellular Materials via Polymerization in Supercritical Fluids*, *Ind. Eng. Chem. Res.*, v.31, p.1414-1417, 1992.
- STIEVANO M, ELVASSORE N. High-pressure density and vapor-liquid equilibrium for the binary systems carbon dioxide-ethanol, carbon dioxide-acetone and carbon dioxide-dichloromethane. *Journal of Supercritical Fluids*. v.33(1), p.7-14. 2005.
- SUGIMOTO, T. Preparation of monodispersed colloidal particles. *Adv. Colloid Interf. Sci.* 28, 65-108. 1987.

- TAO, J., SONG, C., CAO, M., HU, D., LIU, L., LIU, N., & WANG, S. Thermal properties and degradability of poly(propylene carbonate)/poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) (PPC/PHBV) blends. *Polymer Degradation and Stability*, 94(4), 575–583. (2009). doi:10.1016/j.polymdegradstab.2009.01.017.
- TAVAREZ, G.F. Nanocompósitos de ouro/polipirrol e fármacos/polímeros entéricos: aplicações em sensores de metanol e liberação controlada de drogas. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Ciências dos Materiais. Universidade Federal do Vale do São Francisco. Juazeiro-BA, Brasil, 2011.
- Tecnepec. Manual de Técnico. Sincronização e IATF em Bovinos. Programa Tecnepec, 2010.
- TERENCE, M.C., Obtenção de um sistema de liberação controlada de drogas a partir do PVAL irradiado com radiação gama. Tese de Doutorado. Instituto de pesquisas energéticas e nucleares. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- THIES, J.E., MULLER, W., Size Controlled Production of Biodegradable Microparticles with Supercritical Gases. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 45, pp. 67-74, 1998.
- UNGERFELD, R., RUBIANES, E. Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. *Small Ruminant Research*, v.46, p. 63–66, 2002.
- USP XXIII (1995): 1995 U. S. Pharmacopoeia & the National Formulary: USP 23-NF18, United States Pharmacopoeia. US Pharmacopoeia. January 1994.
- VALLE, E.R., ANDREOTTI, R., THIAGO, L.R.L. de S. Estratégias para aumento da eficiência reprodutiva e produtiva em bovinos de corte. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1998. 80p. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 71).
- VAN DEN BROECK, W. *et al.* Cell-specific distribution of progesterone receptors in the bovine ovary. *Reproduction Domestic Animal*, v. 37, p. 314-320, 2002.a
- VASCONCELOS, J.L.M., PEREZ, G.C., SANTOS, R.M., SILVA, A.T.N., MACIEL, A.B.B. Progesterone intravaginal device and/or calf removal on anestrus Angus

crossbred cows during a 60-days breeding season. *J. Anim. Sci.*, v.82 (Suppl. 1), p.67 (Abstract), 2004.

VILLANOVA, J.C.O *et al.* Estudo comparativo de formas farmacêuticas sólidas contendo dipirona comercializadas no mercado nacional: teste e cinética de dissolução. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.35, n. 1, p.87-93, 1999.

VOLOVA, T., SHISHATSKAYA, E., SEVASTIANOV, V., EFREMOV, S. AND MOGILNAYA, O. Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers. *Biochemical Engineering Journal*, v.16, p.125–133, 2003.

WEISS-ANGELI, V, POLETTI, F.S, ZANCAN, L.R, BALDASSO, F, POHLMANN, A.R, GUTERRES, S.S. Nanocapsules of Octyl Methoxycinnamate Containing Quercetin Delayed the Photodegradation of Both Components Under Ultraviolet A Radiation. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. v.4, p. 80–89, 2008.

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, pp. 1229-1235, 2002.

XUE, L., ZGODA, V.G., ARISON, B., & CORREIA, M.A. Structure-function relationships of rat liver CYP3A9 to its human liver orthologs: site-directed active site mutagenesis to a progesterone dihydroxylase. *Archives of biochemistry and biophysics*, v.409(1), p.113–26. 2003.

YEO, S. D., KIRAN, E. “YEO, S.D., KIRAN, E. Formation of polymer particles with supercritical fluids: a review”. *Journal of Supercritical Fluids* 34, 287–308. 2005.

Yeo, S.-D. and Kiran, E., Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 34, p. 287 – 308, 2005.

ZHANG, C., G. LI, *et al.* "Preparation and characterization of 5-fluorouracil-loaded PLLA–PEG/PEG nanoparticles by a novel supercritical CO2 technique." *Int J Pharm* v.436(1–2): p.272-281. 2012.

ZHANG, Z., & KESHEL, S. H. Short communication Cellular orientation on micro-patterned biocompatible PHBV film. *Journal of Paramedical Sciences (JPS)* 1(4), 2008–2011. 2010.

ZIELIŃSKA, A., SKWAREK, E., ZALESKA, A., GAZDA, M. AND HUPKA, J.
Preparation of silver nanoparticles with controlled particlesize. *Procedia Chemistry*, v. 1,
p. 1560-1566, 2009.

ZIMBELMAN, R.G.; CHRISTIAN, R.E.; CASIDA, L.E. Ovarian Response in Heifers to
Progesterone Injections. *Journal Animal Science*, v. 10, pp. 752-761, 1951.