



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

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS
MICROESTRUTURADOS A BASE DE
POLIHIDROXIALCANOATOS PARA A LIBERAÇÃO
PERIODONTAL DO NAPROXENO**

LUIZA FERREIRA DOMINGOS

Florianópolis
2012

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

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS
MICROESTRUTURADOS A BASE DE
POLIHIDROXIALCANOATOS PARA A LIBERAÇÃO
PERIODONTAL DO NAPROXENO**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina.

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

LUIZA FERREIRA DOMINGOS

Florianópolis
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

D671d Domingos, Luiza Ferreira

Desenvolvimento de sistemas microestruturados a base de polihidroxialcanoatos para liberação periodontal do naproxeno [dissertação] / Luiza Ferreira Domingos ; orientadora, Elenara Lemos Senna. - Florianópolis, SC, 2012.

1 v.: il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Polihidroxialcanoatos. 3. Doença periodontal. 4. Microencapsulação. I. Senna, Elenara Maria Teixeira Lemos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

“Desenvolvimento de sistemas microestruturados a base de polihidroxialcanoatos para liberação periodontal do naproxeno”

POR


Luiza Ferreira Domingos

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:




Profa. Dra. Giovana Carolina Bazzo (Univille – Membro Titular)



Profa. Dra. Hellen Karine Stulzer (UFSC – Membro Titular)



Dr. Paulo Renato de Oliveira (UFSC – Membro Titular)



Profa. Dra. Elenara Lemos Senna (UFSC – Orientadora)

Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 30 de março de 2012.

Dedico à minha mãe, Marly, minhas irmãs Marina, Mayza e ao meu namorado Leonardo, pelo apoio, carinho e suporte em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Elenara Lemos Senna pela oportunidade, orientação e confiança e por ter tornado possível a concretização deste trabalho.

À minha querida família, mãe Marly e irmãs Marina e Mayza por estarem sempre presente, pelo apoio e conselhos.

Ao meu namorado e “IC”, pelo carinho, apoio e paciência nos finais de semana de trabalho.

A minha amiga alvinegra Mariana pelo companheirismo e apoio durante todo o trabalho.

Aos meus colegas e amigos do laboratório: Talitha, Clarissa, Cristian, Bianca, Luis, Georgia, Mariana e Leticia pela amizade, pelos momentos de descontração e ajuda para a realização deste trabalho.

À Mayra do Laboratorio de Controle de Processos pela ajuda na síntese.

À Prof^a. Dr^a. Daisy Janice Aguilar Netz do Laboratorio de Tecnologia Farmacêutica da UNIVALI pelo apoio nas análises de reologia.

Ao Rafa e Prof. Dr. Marcos Segatto pela colaboração nos ensaios de DSC.

Aos meus demais amigos, em especial à Anna e Emily pela amizade e torcida.

À Universidade Federal de Santa Catarina pela estrutura.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Não basta saber, é preciso também aplicar,
não basta querer, é preciso também fazer.”

Goethe

RESUMO

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são polímeros amplamente utilizados na indústria farmacêutica por suas características de biodegradabilidade e biocompatibilidade. O poli(3-hidroxitubirato) (P(3HB)) e seu copolímero poli(3-hidroxitubirato-co-3-hidroxitvalerato) (P(3HB-co-3HV)) são os mais comuns deste grupo e tem sido extensivamente estudados, visando diversas aplicações como carreadores de fármacos. Desta forma, os PHAs são materiais interessantes para aplicações na área da saúde e farmacêutica como constituinte de formas farmacêuticas de liberação controlada. Como estratégia para controlar a liberação, podem ser empregados diferentes materiais em uma formulação, os quais podem modificar e melhorar as suas propriedades físico-químicas. Neste contexto, o naproxeno (NPX) foi encapsulado em sistemas microestruturados, obtidos a partir de PHAs polihidroxialcanoatos, acetato de celulose e suas blends, com o intuito de avaliar as propriedades físico-químicas das microesferas e obter um sistema de liberação prolongada para o tratamento da periodontite. Estas microesferas foram então dispersas em gel de poloxamer com o objetivo de para manter as partículas intrabolsa periodontal. A fim de observar o efeito no tamanho e eficiência de encapsulação, a massa molar do P(3HB) foi reduzida por síntese com borohidreto de sódio. O método de emulsão/evaporação do solvente foi empregado no preparo das microesferas de PHA e acetato de celulose nas proporções de 100:0, 50:50 e 0:100, usando clorofórmio e acetona como solventes. Os valores de eficiência de encapsulação e teor variaram de 33,21 – 99,11% e 3,14 – 9,91 mg NPX/100 mg formulação, respectivamente. Partículas esféricas foram obtidas apresentando diâmetro médio entre 6,145 e 16,266 μm . A redução da massa molar do P(3HB) e a adição do acetato de celulose provocaram a redução do diâmetro médio das partículas. As análises por calorimetria exploratória diferencial e difração de raios-X indicaram uma interação entre os componentes da formulação. Os estudos de liberação em fluido salivar simulado mostraram que o aumento da concentração de acetato de celulose nas microesferas levou a uma liberação mais acentuada do naproxeno. Os modelos matemáticos aplicados demonstraram ainda que o mecanismo de liberação do fármaco ocorre principalmente por difusão.

Palavras-chave: microesferas, poli(3hidroxibutirato),
poli(3hidroxibutirato-co-3hidroxivalerato), naproxeno, liberação
controlada.

ABSTRACT

Title: Development of microstructured systems based on polyhydroxyalkanoates for periodontal release of naproxen

The polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polymers widely used in the pharmaceutical industry for its characteristics of biodegradability and biocompatibility. Poly(3-hydroxybutyrate) (P(3HB)) and its copolymer Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (P(3HB-co-3HV)) are the most common of this group and have been extensively studied as drug carriers. In this way, PHAs are interesting materials for applications in both health and pharmaceutical industries as a constituent of controlled release dosage forms. As strategy to control the release, different materials can be used in a formulation which can modify and improve its physicochemical properties. In this context, Naproxen (NPX) was encapsulated in microstructured systems obtained from polyhydroxyalkanoates, cellulose acetate and their blends, in order to evaluate the physical and chemical properties of the microspheres and to obtain a prolonged-release system for the treatment of periodontitis. These microspheres were then dispersed in poloxamer gel in order to keep the particles of the periodontal pocket. In order to observe the effect on size and encapsulation efficiency, the molecular weight of P(3HB) was reduced by synthesis with sodium borohydride. The method of emulsion/solvent evaporation was used to prepare the microspheres of PHA and ethylcellulose in proportions of 100:0, 50:50 and 0:100 (w/w), using chloroform and acetone as solvent. The values of encapsulation efficiency and drug content ranged from 33.21 to 99.11% and 3.14 to 9.91 mg NPX/100 mg formulation, respectively. Spherical particles were obtained with average diameter between 6.145 and 16.266 micrometers. The reduction of the molecular weight of P(3HB) and addition of ethyl cellulose caused a reduction in average particle diameter. Analyses by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction indicated an interaction between the components of the formulation. Studies of release in simulated saliva showed that the concentration of cellulose acetate on microspheres resulted in a pronounced release of naproxen. Moreover, mathematical models demonstrated that the mechanism of drug release is predominantly controlled by diffusion.

Keywords: microspheres, poly(3-hydroxybutyrate), Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvakerate), naproxen, controlled release.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágios da doença periodontal: (A) gengiva saudável, (B) placa bacteriana, (C) gengivite e (D) periodontite.	39
Figura 2. Bolsa periodontal.	40
Figura 3. Estrutura geral dos polihidroxiácidoalcanoatos.	48
Figura 4. Rota biossintética e de degradação do P(3HB).	50
Figura 5. Estrutura química do acetato de celulose.	53
Figura 6. Estrutura química do naproxeno.	54
Figura 7. Esquema ilustrativo do método de preparação das microesferas pelo método de emulsão/evaporação do solvente.	65
Figura 8. Mecanismo proposto para a redução do P(3HB) com borohidreto de sódio.	77
Figura 9. Cromatograma de partição em gel do PHBr.	78
Figura 10. Espectro de absorção no UV das amostras: (A) PHB:AC50:50 sem fármaco; (B) PHBV:AC50:50 sem fármaco; (C) PHBr:AC50:50 sem fármaco e (D) solução padrão de naproxeno 20 µg/mL em metanol.	79
Figura 11. Curva de calibração de naproxeno em metanol obtida por espectrofotometria de absorção no ultravioleta.	80
Figura 12. Fotomicrografias obtidas por MEV das micropartículas de acetato de celulose contendo naproxeno (AC ₁₀₀).	85
Figura 13. Fotomicrografias obtidas por MEV das microesferas de PHB ₁₀₀ e PHB/AC _{50:50} contendo naproxeno.	86
Figura 14. Fotomicrografias obtidas por MEV das microesferas de PHBV ₁₀₀ e PHBV/AC _{50:50} contendo naproxeno.	87

Figura 15. Fotomicrografias obtidas por MEV das microesferas de PHBr ₁₀₀ , PHBr/AC _{50:50} contendo naproxeno.	88
Figura 16. Curvas DSC obtidas a partir das matérias primas. Em (A) NPX; (B) P(3HB); (C) P(3HB-co-3HV); (D) P(3HB)r e (E) AC....	93
Figura 17. Curvas DSC obtidas a partir das microesferas e matérias primas. Em (A) NPX; (B) P(3HB); (C) PHB:AC _{50:50} sem fármaco; (D) PHB ₁₀₀ ; (E) PHB:AC _{50:50} ; (F) AC ₁₀₀ e (G) AC.....	94
Figura 18. Curvas DSC obtidas a partir das microesferas e matérias primas. Em (A) NPX; (B)P(3HB-co-3HV); (C) PHBV:AC _{50:50} sem fármaco; (D) PHBV ₁₀₀ ; (E) PHBV:AC _{50:50} ; (F) AC ₁₀₀ e (G) AC.....	95
Figura 19. Curvas DSC obtidas a partir das microesferas e matérias primas. Em (A) NPX; (B) P(3HB)r; (C) PHBr:AC _{50:50} sem fármaco; (D) PHBr ₁₀₀ ; (E) PHBr:AC _{50:50} ; (F) AC ₁₀₀ e (G) AC.....	96
Figura 20. Difrátogramas obtidos a partir das microesferas e das matérias primas. Em (A) P(3HB); (B) PHB ₁₀₀ ; (C) PHB:AC _{50:50} ; (D) AC ₁₀₀ ; (E) Acetado de celulose e (F) NPX.....	98
Figura 21. Difrátogramas obtidos a partir das microesferas e matérias primas. Em (A) P(3HB-co-3HV); (B) PHBV ₁₀₀ ; (C) PHBV:AC _{50:50} ; (D) AC ₁₀₀ ; (E) Acetado de celulose e (F) NPX.	99
Figura 22. Difrátogramas obtidos a partir das microesferas e matérias primas. Em (A) P(3HB)r; (B) PHBr ₁₀₀ ; (C) PHBr:AC _{50:50} ; (D) AC ₁₀₀ ; (E) Acetado de celulose e (F) NPX.....	99
Figura 23. Difrátogramas obtidos a partir das matérias primas. Em (A) P(3HB)r e (B) P(3HB).....	101
Figura 24. Espectro de infravermelho de (A) NPX, (B) P(3HB), (C) PHB ₁₀₀ , (D) PHB:AC _{50:50} , (E) AC ₁₀₀ e (F) AC.....	103

Figura 25. Espectro de infravermelho de (A) NPX, (B) P(3HB-co-3HV), (C) PHBV100, (D) PHBV:AC50:50, (E) AC100 e (F) AC.	104
Figura 26. Espectro de infravermelho de (A) NPX, (B) P(3HB)r, (C) PHBr ₁₀₀ , (D) PHBr:AC _{50:50} , (E) AC ₁₀₀ e (F) AC.....	105
Figura 27. Fotos dos géis, em (A) gel de poloxamer sem formulação a 25 °C, (B) gel de poloxamer com formulação PHB:AC _{50:50} incorporada a 25 °C, (C) gel de poloxamer sem formulação a 37 °C, (D) gel de poloxamer com formulação PHB:AC _{50:50} incorporada a 37 °C.....	107
Figura 28. Perfil de escoamento do gel branco (sem formulação incorporada) e gel com as microesferas de PHB:AC _{50:50} dispersas a temperatura de 25 e 37°C.	111
Figura 29. Curva de calibração de naproxeno no meio fluido salivar simulado (FSS).	112
Figura 30. Perfis de liberação de naproxeno obtido a partir de microesferas preparadas usando PHB/Acetato de celulose.	114
Figura 31. Perfis de liberação de naproxeno obtido a partir de microesferas preparadas usando PHBV/Acetato de celulose.....	114
Figura 32. Perfis de liberação de naproxeno obtido a partir de microesferas preparadas usando PHBr/Acetato de celulose.	115
Figura 33. Micrografias obtidas por MEV das microesferas após o ensaio de liberação <i>in vitro</i>	126

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Estudos de microencapsulação visando aplicações periodontais.	46
Tabela 2. Composição das formulações de microesferas.	64
Tabela 3. Massas molares viscosimétrica (Mv), numérica média (Mn) e ponderal média (Mw) do PHBr.	77
Tabela 4. Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade (precisão intradia) do método para determinação de naproxeno.	81
Tabela 5. Resultados obtidos na avaliação da precisão intermediária (interdia) do método para determinação de naproxeno.	82
Tabela 6. Resultados obtidos na avaliação da exatidão do método para determinação de naproxeno.	82
Tabela 7. Resultados obtidos na avaliação da robustez do método de quantificação de naproxeno por UV.	83
Tabela 8. Eficiência de encapsulação (EE) e teor de naproxeno nas microesferas poliméricas (n=3)	84
Tabela 9. Diâmetro médio e distribuição granulométrica das partículas contendo fármaco naproxeno (n=3).	90
Tabela 10. Resultados da análise por calorimetria exploratória diferencial.	97
Tabela 11. Modelos matemáticos aplicados aos diferentes géis desenvolvidos.	108
Tabela 12. Dados e modelos matemáticos aplicados aos diferentes géis desenvolvidos.	109
Tabela 13. Percentagem de liberação do naproxeno a partir das formulações após 36 horas de ensaio.	116

Tabela 14. Análise da variância referente ao aos valores de $t_{50\%}$..	118
Tabela 15. Análise de variância referente ASC.	118
Tabela 16. Valores de diferença entre as médias de $t_{50\%}$	120
Tabela 17. Valores de diferença entre as médias da ASC de NPX após 36 horas de ensaio de liberação.....	121
Tabela 18. Modelos matemáticos aplicados aos hidrogéis contendo as microesferas.....	123
Tabela 19. Coeficientes de correlação dos modelos matemáticos aplicados das amostras.....	124

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AC – Acetato de celulose
AIDS – Acquired immune deficiency syndrome
AINES – Antiinflamatórios não esteroidais
ANOVA – Análise da Variância
ASC – Área sob a curva
b – Índice de fluxo
C_A – Concentração encontrada na amostra
CERMAV - Centre de Recherches sur lês Macromolecules Végétales
C_{NPX} – Concentração de naproxeno na amostra
C_T – Concentração teórica
d.m.s – Diferença Mínima Significativa
DPR – Desvio padrão relativo
DRX – Difração de raios-x
DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial
EE – Eficiência de encapsulação
FSS – Fluido salivar simulado
GL – Graus de liberdade
HIV - Human immunodeficiency virus
ICH – International Conference on Harmonization
IR – Infravermelho
LCME – Laboratório Central de Microscopia
LCP – Laboratório de Controle de Processos
LD – Limite de detecção
LDRX – Laboratório de Difração de raios-x
LQ – Limite de quantificação
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
Mn – Massa molar numérica média
MQ – Média dos quadrados
Mv – Massa molar viscosimétrica
Mw – Massa molar ponderal média
NaBH₄ – Borohidreto de sódio
NPX – Naproxeno
P(3HB) – Poli(3-hidroxi-butarato)
P(3HB-co-3HV) – Poli(3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato)
PCL - Policaprolactona
PEO – Poli(óxido etileno)
PHAs – Polihidroxi-alcanoatos
PLA – Poli(ácido láctico)

PLG – Poli(ácido glicólico)

PLGA – Poli(ácido lático-co-glicólico)

PPO – Poli(óxido de propileno)

PVA – Álcool polivinílico

q - Valor tabelado em função do número de tratamento e dos graus de liberdade do resíduo

Qi – Massa de fármaco adicionada nas formulações

QMR – Quadrado Médio do Resíduo

Qp – Massa de microesferas pesadas

r – Número de tratamentos

R – Recuperação

SCB – Sistema de Classificação Biofarmacêutica

SQ – Soma dos quadrados

t_{50%} - Tempo para liberação de 50% do fármaco associado às partículas

T_f – Temperatura de fusão

T_g – Temperatura de transição vítrea

UV – Ultravioleta

ΔH_{exp} – Entalpia de fusão experimental

τ – Ponto de ruptura

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	29
1.2 OBJETIVOS.....	35
1.2.1 Objetivo Geral.....	35
1.2.2 Objetivos Específicos.....	35
2.REVISÃO DA LITERATURA.....	37
2.1 DOENÇA PERIODONTAL	39
2.2 MICROENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS.....	43
2.2.1 Microencapsulação de fármacos para doença periodontal	44
2.3 POLIHIDROXIALCANOATOS.....	47
2.3.1 Características químicas dos PHAs.....	47
2.3.2 Biossíntese e degradação dos PHAs	49
2.3.3 Toxicidade e biocompatibilidade dos polihidroxicanoatos...50	
2.3.4 Polihidroxicanoatos e blendas poliméricas	51
2.4 ACETATO DE CELULOSE.....	52
2.5 NAPROXENO.....	53
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
3.1 MATERIAIS	59
3.1.1 Matérias-primas.....	59
3.1.2 Solventes e reagentes	59
3.1.3 Equipamentos	59
3.2 MÉTODOS.....	61
3.2.1 Preparação de microesferas de polihidroxicanoatos e de suas blendas com acetato de celulose	61
3.2.2 Determinação do teor e eficiência de encapsulação do naproxeno por espectroscopia de absorção no ultravioleta.....	65
3.2.3 Caracterização físico-química das microesferas	68
3.2.4 Preparação e caracterização de hidrogéis termosensíveis contendo as microesferas.....	70

3.2.5 Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do naproxeno a partir das microesferas.....	71
3.2.6 Análise estatística.....	72
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
.....	74
4.1 PREPARAÇÃO DAS MICROESFERAS.....	75
4.1.1 Determinação da massa molar do PHBr.....	76
4.1.2 Determinação da eficiência de encapsulação e teor de naproxeno por espectroscopia de absorção no ultravioleta	78
4.1.2.1 Validação da técnica de quantificação de naproxeno nas micropartículas.....	78
4.1.3 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de naproxeno nas microesferas	83
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROESFERAS.....	84
4.2.1 Avaliação da morfologia.....	84
4.2.2 Determinação do diâmetro médio, distribuição granulométrica	88
4.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	91
4.2.4 Difração de raios-X.....	97
4.2.5 Espectroscopia de Infravermelho.....	101
4.3 DESENVOLVIMENTO DOS GÉIS CONTENDO AS MICROESFERAS.....	105
4.3.1 Preparação de um gel hidrofílico contendo as microesferas .	105
4.3.2 Caracterização das propriedades reológicas do gel.....	108
4.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VIVO</i> DO NAPROXENO A PARTIR DAS MICROESFERAS	111
4.4.1 Curva de calibração do naproxeno em fluido salivar simulado (FSS).....	111

4.4.2Avaliação da solubilidade e estabilidade do naproxeno em fluido salivar simulado	112
4.4.3 Avaliação do perfil de liberação do naproxeno em meio de fluido salivar simulado (FSS).....	113
5. CONCLUSÕES.....	127
.....	131
6. BIBLIOGRAFIA.....	131

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é considerada uma morbidade que atinge grande parte da população. Trata-se de uma resposta inflamatória localizada, causada pela infecção de uma bolsa periodontal originada do acúmulo de placa bacteriana subgingival. A fase inicial da doença é marcada pela inflamação da gengiva (gengivite), sendo caracterizada por intumescimento, vermelhidão e sangramento da gengiva marginal (JAIN et al., 2008). O acúmulo microbiano do biofilme dental no interior das áreas subgingivais do periodonto, desencadeia um processo inflamatório mais grave (periodontite) que se estende aos tecidos mais profundos e afeta as estruturas do suporte dental, resultando na formação de uma bolsa periodontal (BRUSCHI et al., 2006). A bolsa periodontal é um sulco aprofundado patologicamente entre a gengiva e o dente. Em sulco gengival normal, o espaço entre a gengiva e o dente mede de 1 a 3 mm de profundidade. Entretanto, durante a periodontite, a profundidade da bolsa excede 5 mm, podendo chegar a 12mm, com aumento da produção de fluido e composição protéica semelhante a do soro, indicando a formação de exsudato nesses locais (BRUSCHI et al., 2006). Esta bolsa periodontal proporciona condições ideais para a proliferação de microorganismos, especialmente espécies anaeróbias facultativas gram-negativas.

O tratamento convencional da doença periodontal consiste na remoção da placa bacteriana depositada à superfície dentária por raspagem e alisamento radicular, com o objetivo de tornar a superfície do dente lisa e a reduzir o número de bactérias patogênicas (BIMSTEIN et al., 2003). A terapia sistêmica também é empregada para o tratamento de doenças periodontais. Entretanto, a liberação sistêmica de fármacos frequentemente não fornece uma concentração suficientemente grande do agente terapêutico no local de ação, além de necessitar de repetidas doses que pode levar ao aparecimento de efeitos colaterais indesejáveis. Neste sentido, a liberação de fármacos diretamente na bolsa periodontal tem atraído grande interesse de pesquisadores, com o objetivo de suprimir ou erradicar a microbiota patogênica ou, ainda, modular a resposta antiinflamatória, limitando, assim, a destruição do tecido periodontal (CETIN et al., 2005). A bolsa periodontal pode ser considerada um sítio natural para o tratamento local das doenças periodontais, visto que provê um reservatório de fácil acesso para a inserção de um sistema de liberação, aliada à presença do fluido

gingival que auxilia na distribuição e na manutenção dos níveis do fármaco ao longo da bolsa, durante um determinado período de tempo (JAIN et al., 2008). Assim, a liberação periodontal oferece vantagens como: controle e manutenção dos níveis de fármaco na bolsa periodontal, obtenção de altas concentrações do fármaco no sítio de ação, redução dos efeitos colaterais e melhoria da adesão do paciente ao tratamento (BRUSCHI et al., 2006). Dentre as formas de administração periodontal estudadas destacam-se os filmes (EL-KAMEL; ASHRI; ALSARRA, 2007), géis (AKINCIBAY; SENEL; AY, 2007), micropartículas (MUNDARGI et al., 2007) e nanopartículas (PIÑON-SEGUNDO et al., 2004), obtidos a partir de materiais poliméricos naturais ou sintéticos, que apresentam em comum as características de biocompatibilidade e biodegradabilidade (EDLUND; ALBERTSSON, 2001).

Os principais mecanismos que governam a liberação do fármaco a partir das partículas são a difusão e a erosão, sendo a velocidade com que ocorre grandemente dependente das características físico químicas do fármaco e do polímero. Em especial, fatores como tamanho e distribuição granulométrica das partículas, porosidade, cristalinidade, configuração e massa molecular da cadeia polimérica podem ser alterados com o objetivo de modular a velocidade de liberação do fármaco (ANDERSON; SHIVE, 1997).

Uma classe de polímeros conhecida como polihidroxialcanoatos (PHAs) tem representado um imenso potencial para aplicação farmacêutica, uma vez que podem ser obtidos a baixo custo aliada às características de biodegradabilidade e biocompatibilidade. Estes polímeros são poliésteres de hidroxíácidos estereoregulares opticamente ativos, obtidos por bactérias a partir de matérias primas naturais. O mais comum dos PHAs é o homopolímero poli(3-hidroxiбутirato) (P(3HB)). O P(3HB) apresenta resistência à umidade, pureza óptica e piezoeletricidade, além disso, a estereoregularidade do P(3HB) torna-o um material altamente cristalino. Ainda que o P(3HB) seja biodegradável, o que lhe confere um potencial para obtenção de sistemas de liberação de fármacos, a alta cristalinidade deste polímero proporciona uma dureza e afeta as propriedades de degradação da matriz polimérica e liberação do fármaco. Copolímeros do ácido 3-hidroxiбутírico e 3-hidroxiivalérico também são obtidos biosinteticamente, formando o poli(3-hidroxiбутirato-co-3-hidroxiivalerato) (P(3HB-co-3HV)), que pelo fato de apresentarem ponto

de fusão mais baixo e serem menos cristalinos, são materiais mais promissores para aplicação em diversas áreas (CARMIGNAN; BIDONE; LEMOS-SENNA, 2008).

Uma estratégia que tem sido amplamente empregada para melhoria das propriedades físicas e químicas dos polímeros é a formação de blendas. A blenda polimérica é a mistura de um ou mais polímeros que dá origem a um novo material, com características específicas desejadas, através da aditividade das propriedades dos polímeros puros. Um fator que deve ser considerado na escolha do polímero para a blenda com P(3HB) é a miscibilidade; uma blenda miscível apresenta uma única fase, ou seja, trata-se de uma mistura homogênea com características dependentes da sua composição e de fatores externos como temperatura e pressão. Na blenda imiscível o sistema apresenta caráter heterogêneo e as propriedades dos polímeros constituintes estão presentes (QUENTAL et al., 2010). No caso de sistemas de liberação, a formação de blendas poliméricas permite a modulação das propriedades das partículas como porosidade, velocidade de degradação e erosão e, conseqüentemente, velocidade de liberação (CARMIGNAN; BIDONE; LEMOS-SENNA, 2008).

Os fármacos antiinflamatórios inibem a produção dos mediadores bioquímicos importantes de alguns dos eventos patológicos da doença periodontal, tais como a inflamação gengival e a reabsorção óssea e outros produtos metabólicos deletérios do ácido araquidônico na rota da ciclooxigenase (JERNBERG, 1999). Antiinflamatórios não esteroidais (AINES) inibem a produção de prostaglandinas, as quais são associadas com a gengivite e perda de osso alveolar, constituindo uma das abordagens terapêuticas para o tratamento das doenças periodontais (DIONNE; BERTOLD, 2001). O naproxeno (ácido 6-metoxi-a-metil-2-naftalenoacético) é um fármaco do grupo de AINES derivado do ácido propiônico. O efeito do naproxeno está relacionado à ação primária na inibição da ciclooxigenase do ácido araquidônico e na inibição das prostaglandinas e tromboxanos, diminuindo assim, a hiperalgesia inflamatória e regulando as respostas neuronais basais. Outra ação que pode contribuir para o efeito antiinflamatório do naproxeno é a produção de oxigênio reativo por neutrófilos e macrófagos, este efeito produz uma forte destruição de radicais de O₂, reduzindo a lesão tecidual (RANG et al, 2001).

Considerando o exposto acima, este trabalho tem como objetivo desenvolver microesferas contendo o naproxeno com vistas à administração periodontal. Os sistemas microestruturados serão obtidos a partir de polihidroxialcanoatos e de suas blendas com o acetato de celulose. O efeito de fatores como tipo e massa molecular do polímero e proporção de polihidroxialcanoato e acetato de celulose na blenda, sobre as características das partículas e velocidade de liberação do fármaco, será avaliado.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver microesferas a partir de polihidroxialcanoatos e suas blendas com acetato de celulose contendo naproxeno, com vistas à administração intrabolsa periodontal.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Preparar microesferas de liberação modificada contendo naproxeno a partir de polihidroxialcanoatos e suas blendas com acetato de celulose pelo método de emulsão e evaporação do solvente, com as características desejáveis de uma formulação destinada à administração periodontal.
- b) Reduzir e avaliar a massa molar no poli(3-hidroxitirato)
- c) Caracterizar as microesferas quanto à morfologia, tamanho e distribuição granulométrica.
- d) Avaliar o efeito do tipo e massa molar do polímero e da proporção de polihidroxialcanoato e acetato de celulose na blenda sobre as características físico-químicas das partículas e perfil de liberação do fármaco.
- e) Desenvolver e validar metodologia analítica de espectrometria de absorção no ultravioleta para determinação do naproxeno nos sistemas desenvolvidos.
- f) Determinar o teor e a eficiência de encapsulação do naproxeno nas microesferas.
- g) Caracterizar a cristalinidade da matriz polimérica das partículas por técnicas de calorimetria exploratória diferencial e de difração de raios-X.
- h) Observar a possível interação fármaco polímero através da espectrometria no infravermelho.
- i) Preparar e caracterizar géis hidrofílicos de poloxamer contendo as microesferas
- j) Avaliar e comparar o perfil de liberação *in vitro* do naproxeno a partir dos hidrogéis contendo as microesferas
- k) Comparar os resultados de diferentes formulações quanto à capacidade de controlar a liberação do naproxeno

2.REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇA PERIODONTAL

Doença periodontal é um termo usado para designar várias condições patológicas caracterizadas pela degeneração e inflamação da gengiva, ligamentos periodontais, osso alveolar e cimento dental, sendo a maior causa de perda de dente após os 25 anos de idade. Trata-se de uma morbidade que atinge grande parte da população, estando relacionada principalmente com a negligência da saúde bucal. Trata-se de uma resposta inflamatória localizada, causada pela infecção de uma bolsa periodontal originada pelo acúmulo de placa bacteriana subgengival. A Figura 1 mostra os estágios da doença periodontal. O primeiro estágio representa uma gengiva saudável; a ausência de higiene bucal acarreta no acúmulo de componentes microbianos no biofilme dental em áreas subgengivais causando a placa bacteriana (estágio dois). No terceiro estágio da doença, as toxinas liberadas pelos agentes bacterianos causam a gengivite, uma inflamação em tecidos mais profundos, sendo caracterizada por intumescimento, vermelhidão e sangramento da gengiva marginal. No último estágio da doença, o processo inflamatório afeta as estruturas do suporte dental, levando à periodontite, a qual pode causar mobilidade dos dentes, sangramento, sensibilidade e perda óssea (BRUSCHI et al., 2006; JAIN et al., 2008).



Figura 1. Estágios da doença periodontal: (A) gengiva saudável, (B) placa bacteriana, (C) gengivite e (D) periodontite.

Fonte: JAIN et al., 2008.

A etiologia da periodontite é de origem microbiana e é considerada uma infecção oportunista. As bactérias induzem alterações na microflora presente no epitélio juncional dental resultando em uma resposta inflamatória, pois este tecido não oferece barreira frente à permeabilidade superficial, constituindo uma via pelo qual as toxinas atingem os tecidos mais profundos (BRUSCHI et al., 2006). A agressão

aos tecidos mais profundos inicia um ciclo inflamatório e de injúrias teciduais, que facilita a entrada de enzimas, toxinas e alérgenos pelo sulco dental. Em resposta, os fatores de defesa, como a resposta do hospedeiro, podem explicar a suscetibilidade e o grau de severidade da doença. Como resultado, pode ocorrer o rompimento do ligamento do tecido conectivo a raiz do dente, que pode resultar na regressão gengival e formação da bolsa periodontal (SEYMOUR, HEASMAN; 1995).

A bolsa periodontal é um sulco aprofundado patologicamente entre a gengiva e o dente e proporciona condições ideais para a proliferação de microorganismos, especialmente espécies anaeróbias facultativas gram-negativas (Figura 2). Em um sulco gengival normal, o espaço entre a gengiva e o dente mede de 1 a 3 mm de profundidade. Entretanto, durante a periodontite, com o aumento dos espaços intercelulares a profundidade da bolsa excede 5 mm, podendo chegar a 12mm. Além disso, em sítios saudáveis do periodonto ocorre a presença de pequenas quantidades de fluido crevicular gengival ($0,04 \mu\text{L}$), com baixas taxas de fluxo ($0,03 \mu\text{L}/\text{min}$) e concentração de proteínas similar ao fluido extracelular. Contrariamente, nos sítios doentes há um aumento na produção de fluido e a composição protéica torna-se semelhante à do soro indicando a formação de exsudato nestes locais (BRUSCHI et al., 2006).

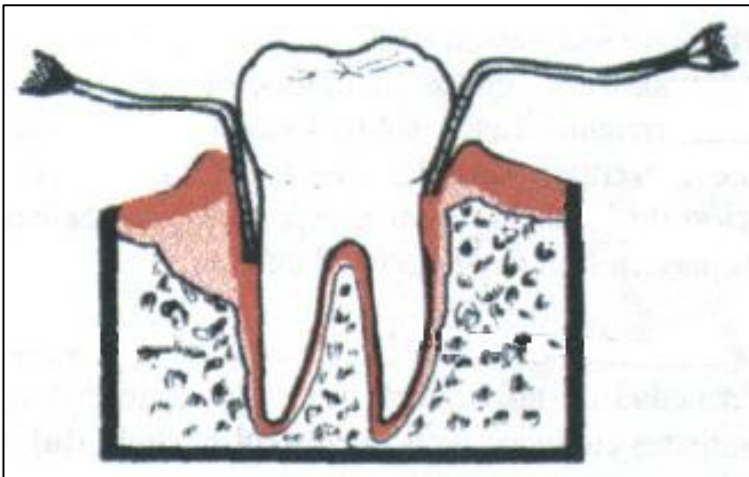


Figura 2. Bolsa periodontal.

Fonte: JAIN et al., 2008.

A doença periodontal pode estar associada a doenças como diabetes tipo I, Síndrome de Down e a AIDS. Isto ocorre em indivíduos com baixa resposta defensiva devido à doença sistêmica.

O diabetes mellitus tipo I, insulino-dependente, constituiu um fator de risco para a doença periodontal, visto que aumenta a susceptibilidade à infecção bacteriana. Estudos mostram também que a doença periodontal afeta o controle da glicose sanguínea e contribui para a progressão do diabetes, havendo assim, uma relação bidirecional entre as doenças. Esta associação se deve ao fato que o defeito na secreção da insulina é tóxica ao organismo e causa dano, disfunção e falha em vários órgãos como rins, coração e vasos sanguíneos, estas alterações comprometem o indivíduo como um todo (SILVA et al., 2008).

A doença periodontal mostra-se precoce e severa em pacientes portadores de Síndrome de Down. Por causa das deficiências neurológicas e motoras com respeito aos aspectos craniofaciais e bucais, há uma dificuldade na higienização bucal desses pacientes, tornando-os assim mais suscetíveis às doenças periodontais. Outro aspecto que se destaca é a dificuldade de combater as bactérias presentes no biofilme dental e a rapidez e severidade da doença em pacientes portadores de Síndrome de Down, pois apresentam deficiência imunológica comprovada. Tanto a dentição decídua, quanto a dentição permanente são afetadas, causando perda precoce dos dentes e reabsorção óssea (AMANO et al., 2008).

A doença periodontal também pode ser associada à infecção pelo HIV, visto que o sistema imunológico dos indivíduos infectados torna-se incapaz de conter infecções oportunistas. Segundo Holmstrup e Glick (2000), a imunodeficiência decorrente do HIV pode ter influencia na patogênese da periodontite. Desta forma, os pacientes infectados por HIV frequentemente exibem lesões bucais mais graves que acometem indivíduos não imunodeficientes (HOLMSTRUP; GLICK, 2000).

Outro fator de risco associado à doença periodontal é o tabagismo. Fumantes estão predispostos a desenvolver doenças periodontais seis vezes mais do que não fumantes, apresentando uma perda óssea mais severa, uma maior profundidade da bolsa periodontal e maior perda dentária quando comparados a indivíduos não fumantes (KHAN, 2011).

Diante do exposto podemos ressaltar a importância de uma boa higiene bucal e acompanhamento do dentista. O tratamento convencional da doença periodontal consiste na remoção da placa bacteriana depositada à superfície dentária por raspagem e alisamento radicular, com o objetivo de tornar a superfície do dente lisa e a reduzir o número de bactérias patogênicas (BIMSTEIN et al., 2003). Entretanto, nos estágios mais avançados da doença há a necessidade de cirurgia e terapia sistêmica com antibióticos e antiinflamatórios. A terapia sistêmica com antiinflamatórios esteriodais (glicocorticóides) e não-esteriodais (salicilatos e derivados dos ácidos propiônico, antranílico e fenilacético) também é empregada para o tratamento de doenças periodontais, como adjuvantes ao tratamento mecânico de limpeza realizado pelo dentista (SEYMOUR; HEASMAN, 1995). Entretanto, a liberação sistêmica de fármacos frequentemente não fornece uma concentração suficientemente grande do agente terapêutico no local de ação, além de necessitar de repetidas doses que pode levar ao aparecimento de efeitos colaterais indesejáveis (BRUSCHI et al., 2006).

Neste sentido, a liberação de fármacos diretamente na bolsa periodontal tem atraído grande interesse de pesquisadores, com o objetivo de suprimir ou erradicar a microbiota patogênica e modular a resposta antiinflamatória, limitando, assim, a destruição do tecido periodontal (CETIN et al., 2005). A bolsa periodontal pode ser considerada um sítio natural para o tratamento local das doenças periodontais, visto que provê um reservatório de fácil acesso para a inserção de um sistema de liberação, aliada à presença do fluido gengival que auxilia na distribuição e na manutenção dos níveis do fármaco ao longo da bolsa, durante um determinado período de tempo (JAIN et al., 2008). Dentre os dispositivos utilizados para a liberação intra bolsa periodontal estão os filmes e fibras muco-adesivas, em que o fármaco é liberado a partir de uma matriz biodegradável e as nano e micropartículas, que contém o fármaco encapsulados sendo estes inseridos com o auxílio de uma seringa diretamente na cavidade da bolsa periodontal (JAIN et al., 2008). Assim, a liberação periodontal oferece vantagens como: controle e manutenção dos níveis de fármaco na bolsa periodontal, obtenção de altas concentrações do fármaco no sítio de ação, redução dos efeitos colaterais e melhoria da adesão do paciente ao tratamento (BRUSCHI et al., 2006).

2.2 MICROENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS

A microencapsulação de fármacos, obtida a partir de materiais poliméricos naturais ou sintéticos, apresenta uma boa estratégia para a obtenção de formas farmacêuticas de liberação modificada, melhoria da estabilidade de fármacos e a vetorização de substâncias ativas em sítios específicos; as micropartículas resultantes podem ser administradas por via oral, tópica ou parenteral (EDLUND; ALBERTSSON, 2001). As micropartículas possuem formato esférico e apresentam tamanho que varia de 1 a algumas centenas de micrometros, podendo ser classificadas segundo sua estrutura em microesferas ou microcápsulas (THOMPSON et al., 2007). As microesferas são partículas compactas constituídas por uma matriz polimérica na qual a substância ativa encontra-se distribuída no seu estado sólido ou molecular e, microcápsulas são partículas constituídas por um núcleo interno contendo fármaco, recoberto por uma barreira polimérica de espessura variável (LI; CHANG, 2005).

Vários métodos são descritos na literatura para a obtenção de micropartículas. A aspersão em torre de secagem, também chamada de nebulização ou spray drying é um procedimento que se baseia na pulverização de uma solução polimérica contendo o fármaco em uma câmara de secagem. Sob o termo de coarervação ou separação de fases estão agrupadas outra série de técnicas de microencapsulação envolvendo a desolvatação do polímero, induzida por algum procedimento que conduza à alteração das características do meio, tais como pela mudança de temperatura, pH ou adição de um não-solvente, sal ou outro polímero incompatível (VILA JATO, 1997).

Entre as técnicas de microencapsulação de fármacos, o método de emulsificação/evaporação do solvente tem sido frequentemente empregado, pois possui grande vantagem em face da simplicidade das etapas envolvidas e a modulação das características da micropartícula pela escolha das condições e componentes na preparação. A versatilidade desta técnica permite uma ampla adequabilidade no que se refere às classes de medicamentos e estrutura do sistema, uma vez que há fatores passíveis de otimização, tais como as características físico-químicas das substâncias empregadas, que determinam as propriedades do produto final. Esta técnica consiste em emulsificar o polímero e o fármaco em uma solução orgânica de um solvente volátil (fase interna) em uma solução aquosa contendo agente emulsificante (fase externa). O solvente é removido pela aplicação de calor, vácuo ou ainda pela evaporação em temperatura ambiente, com auxílio de agitação, levando

a formação de partículas esféricas. Estas por sua vez, são separadas por filtração ou centrifugação, lavadas com solvente apropriado e liofilizadas (WATTS; DAVIES; MELIA, 1990).

A estrutura final e composição das microesferas são resultantes de uma complexa contribuição das características físicas e físico-químicas do polímero, fármaco, solvente e agente emulsificante, bem como os parâmetros envolvidos na preparação, como agitação, temperatura, volume e concentração das substâncias empregadas (WATTS; DAVIES; MELIA, 1990).

A liberação do fármaco a partir de uma matriz polimérica consiste na combinação de várias etapas de transferência do mesmo entre os diferentes sítios da partícula. Por outro lado, a liberação de fármacos pode estar associada à erosão da matriz, tornando-se mais complexo o mecanismo de liberação, quando a degradação da microesfera ocorre concomitante com o fenômeno de difusão (LI; CHANG, 2005). A relação fármaco/polímero, as características de solubilidade, cristalinidade e distribuição do fármaco, bem como o tamanho, a distribuição granulométrica e a porosidade das partículas são parâmetros a serem correlacionados com o perfil de liberação. Além disso, fatores como configuração da cadeia polimérica, massa molar, pH, presença e composição do copolímero, podem ser avaliados com o objetivo de modular a velocidade de biodegradação dos polímeros e, conseqüentemente, o perfil de liberação do fármaco (ANDERSON; SHIVE, 1997).

2.2.1 Microencapsulação de fármacos para doença periodontal

Novos estudos abrangem o uso de micropartículas em sistemas de liberação periodontal. Tais dispositivos permitem a introdução de fármacos diretamente na bolsa periodontal ou no interior do canal radicular, controlando a liberação do fármaco diretamente do sítio de ação. A utilização destes sistemas pode auxiliar e até mesmo substituir parcialmente o tratamento cirúrgico ou mecânico (ÁLVAREZ; ESPINAR; MÉNDEZ, 2011).

Um fator importante no desenvolvimento de sistemas de liberação intraperiodontal é a necessidade de tamanho reduzido, de modo a facilitar a inserção do medicamento na bolsa periodontal sem causar dor ou interferências na higiene bucal diária do paciente (BIMSTEIN et al., 2003). As micropartículas podem apresentar um

diâmetro médio variando entre 20 e 120 μm para a liberação intrabolsa periodontal, uma vez que podem ficar retidas no tecido intersticial e agir como um depósito para a liberação prolongada (CORTESI *et al.* 2002).

Estes sistemas oferecem muitas vantagens como:

- possibilitam o controle e monitoramento dos níveis do fármaco no sítio de ação

- constituem um meio eficaz de liberação na cavidade oral de um fármaco pouco absorvível no sistema gastrointestinal

- permitem o mascaramento do sabor e odor desagradável de alguns fármacos e evitam o aparecimento de manchas nos dentes (BRUSCHI *et al.*, 2006).

No desenvolvimento de micropartículas para liberação periodontal deve ser considerada a influência do fluido crevicular gengival. Este fluido irriga naturalmente a gengiva, mas em pessoas com periodontite, o fluxo é mais intenso e, geralmente, este aumento no fluxo gera uma difusão mais rápida do fármaco liberado pela micropartícula. Assim, a liberação deve ser mais alta no estágio inicial do tratamento, atingindo o nível terapêutico rapidamente e mantendo-se durante o período restante do tratamento (FRIEDMAN; STEINBERG, 1990). A Tabela 1 descreve alguns estudos realizados sobre a microencapsulação de fármacos em micropartículas para liberação periodontal.

Tabela 1. Estudos de microencapsulação visando aplicações periodontais.

Fonte: adaptado ALVAREZ, ESPINAR e MENDEZ (2011).

Polímero	Fármaco	Comentário
Polifosfazenas	NPX	Extração/evaporação do solvente (Tamanho 30 – 80 µm). 5% de fármaco na formulação; 800h de liberação. Níveis terapêuticos satisfatórios.
PLGA	Minociclina	Estudo clínico usando microesferas (20 – 60 µm) em pacientes com periodontite crônica. Avaliação da eficácia e segurança.
PLGA	Minociclina	Microesferas usadas no tratamento periodontal complementar à raspagem e alisamento radicular. Avaliação clínica.
PLGA/PCL	Doxiciclina	Microesferas preparadas por dupla emulsão (A/O/A). Caracterização físico-química. Avaliação <i>In vitro</i> e clínica. Periodontite crônica
PLGA/PCL	Doxiciclina	Microesferas; técnica de evaporação do solvente (A/O/A) Comparação com gel de clorexidina. Estudo e caracterização (tamanho, liberação, atividade antimicrobiana) e parâmetros clínicos.

2.3 POLIHIDROXIALCANOATOS

Uma classe de polímeros conhecida como polihidroxicanoatos (PHAs) tem representado um inenso potencial para aplicação farmacêutica, uma vez que podem ser obtidos a baixo custo aliada às características de biodegradabilidade e biocompatibilidade. Estes polímeros são poliésteres de hidroxiácidos estéreo regulares opticamente ativos, obtidos por bactérias a partir de matérias primas naturais como açúcares (DINIZ et al., 2004). O mais comum dos PHAs é o homopolímero poli (3-hidroxi butirato) (P(3HB)) e seu copolímero poli(hidroxi butirato-co-hidroxi valerato) (P(3HB-co-3HV)) os quais vem sendo extensivamente estudados, visando diversas aplicações. Desta forma, os PHAs são materiais interessantes não só como termoplásticos sintéticos, mas também para aplicações na área da saúde e farmacêutica como próteses, suportes de cultura de tecidos para implantes e constituintes de formas farmacêuticas de liberação controlada (ROSA; FRANCO; CALIL, 2001).

2.3.1 Características químicas do PHAs

A estrutura geral dos PHAs está demonstrada na Figura 3. Como se pode observar, os polihidroxicanoatos são poliésteres lineares do carbono, oxigênio e hidrogênio. A composição de cadeia lateral “R” e o valor de “x” identificam uma unidade monomérica. O “R” pode ser um átomo de hidrogênio ou uma cadeia de até 13 carbonos e “x” pode variar de 1 a 3 carbonos. O monômero do polímero P(3HB), mais comum entre os PHAs, apresenta um grupo metila na cadeia lateral “R” e valor de “x” igual a 1, enquanto o P(3HB-co-3HV) é constituído da cadeia lateral de um grupo etila. Os PHAs possuem uma ampla faixa de massa molar que varia entre 60.000 a 3×10^6 Daltons (DINIZ et al., 2004).

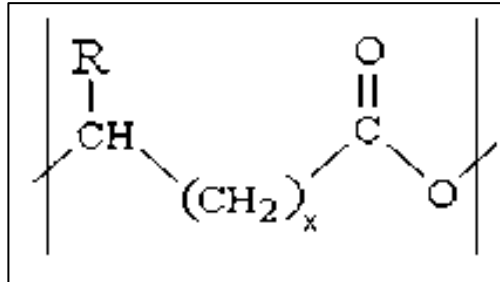


Figura 3. Estrutura geral dos polihidroxicanoatos.

No estado sólido, o P(3HB) apresenta-se na forma de uma hélice com duas unidades monoméricas completando uma volta. As forças envolvidas nesta conformação são principalmente interações do tipo Van der Waals entre os agrupamentos hidrocarbonetos e metilas (GALEGO et. Al., 2000).

O P(3HB) apresenta resistência à umidade e pureza óptica. Além disso, a estereoregularidade do P(3HB) torna-o um material altamente cristalino. Ainda que o P(3HB) seja biodegradável, o que lhe confere um potencial para obtenção de sistemas de liberação de fármacos, a alta cristalinidade deste polímero proporciona uma dureza e afeta as propriedades de degradação da matriz polimérica e liberação do fármaco. O P(3HB) isolado a partir das bactérias possui grau de cristalinidade de cerca de 55 a 80% (POUTON; AKHTAR. 1996).

Copolímeros do P(3HB) também são obtidos biosinteticamente, como o P(3HB-co-3HV). A formação deste copolímero contendo unidade de metila e etila na cadeia lateral altera as propriedades do material, levando a diminuição da cristalinidade com o aumento da fração molar das unidades de hidroxivalerato (HV). Estas características, somadas a menores temperaturas de transição vítrea, conferem ao P(3HB-co-3HV) melhores propriedades mecânicas, conduzindo a um polímero menos rígido e mais promissor para aplicação em diversas áreas que o P(3HB) puro (CARMIGNAN; BIDONE; LEMOS-SENNA, 2008).

A temperatura de fusão dos PHAs depende dos monômeros que constituem a cadeia lateral. O P(3HB) funde em uma faixa de 160-180°C conforme a massa molar do polímero. O teor de HV na molécula do P(3HB-co-3HV) influencia o ponto de fusão do polímero, levando ao

seu abaixamento em relação ao ponto de fusão do P(3HB). Os PHAs são solúveis em solventes orgânicos, como clorofórmio e diclorometano, e sua solubilidade depende da temperatura e massa molar da cadeia polimérica (DINIZ et al., 2004).

2.3.2 Biossíntese e degradação dos PHAs

Uma grande variedade de microorganismos produz PHAs, como bactérias do solo, microflora estuária e algas verdes azuis. Dois tipos de PHAs podem ser obtidos a partir do substrato utilizado: PHAs de cadeia curta (3 a 5 átomos de carbono) produzidos a partir de *Alcaligenes eutrophus* (*R.eutropha*) e PHAs de cadeia média (6 a 14 átomos de carbono) produzidos a partir de *Pseudomonas oleovorans* (DINIZ et al., 2004).

A rota biossintética de produção dos PHAs pode ser representada por seu principal representante da classe, o P(3HB) (Figura 4). Esta rota consiste de três reações enzimáticas catalisadas por enzimas diferentes. A primeira reação consiste na condensação de duas moléculas de acetilcoenzima A (acetil-CoA) a acetoacetil-CoA pela β -cetoacil-CoA tiolase (codificada pelo gene *phbA*). A segunda reação consiste na redução da acetoacetil-CoA a (R)-3-hidroxi-butiril-CoA por uma acetoacetil-CoA redutase NADPH-dependente (codificada pelo gene *phbB*). Finalmente, os monômeros (R)-3-hidroxi-butiril-CoA são polimerizados a P(3HB), pela P(3HB) polimerase, codificada pelo gene *phbC* (REDDY et al., 2003).

As características de degradação dos polihidroxicanoatos devem ser estudadas visto que afetam as características de liberação de fármacos a partir de matrizes poliméricas. Na degradação destes polímeros ocorre a clivagem das cadeias poliméricas formando oligômeros e posteriormente monômeros. A velocidade desta degradação pode ser influenciada por fatores como temperatura, teor de umidade, pH, composição do polímero e cristalinidade (SCANDOLA et al., 1997).

Pouton e colaboradores (1996) observaram a degradação *in vitro* do P(3HB) a partir de filmes de 85 micrômetros a 37°C e pH 7,4. A perda de massa destes filmes ocorreu com uma meia vida de aproximadamente 152 semanas, entretanto, a degradação de filmes de

P(3HB-co-3HV) demonstrou ser mais rápida do que a do homopolímero. A penetração de água dentro do polímero foi muito pequena para ser analisada, o que levou aos autores concluírem que o mecanismo de degradação *in vitro* procedeu através do processo de erosão superficial (POUTON; AKHTAR, 1996).

Como os polihidroxicanoatos são polímeros com uma alta massa molar e incapazes de serem transportados através da parede celular, vários microorganismos excretam PHB-depolimerases extracelulares que os hidrolisam em monômeros e oligômeros solúveis em água, que são posteriormente utilizados como nutrientes. A velocidade de degradação enzimática também diminui com o aumento da cristalinidade do polímero. A PHB-depolimerase hidrolisa inicialmente cadeias de poliésteres amorfas na superfície e subsequentemente provoca a erosão das cadeias poliméricas no estado cristalino (ABE; DOI, 1999).

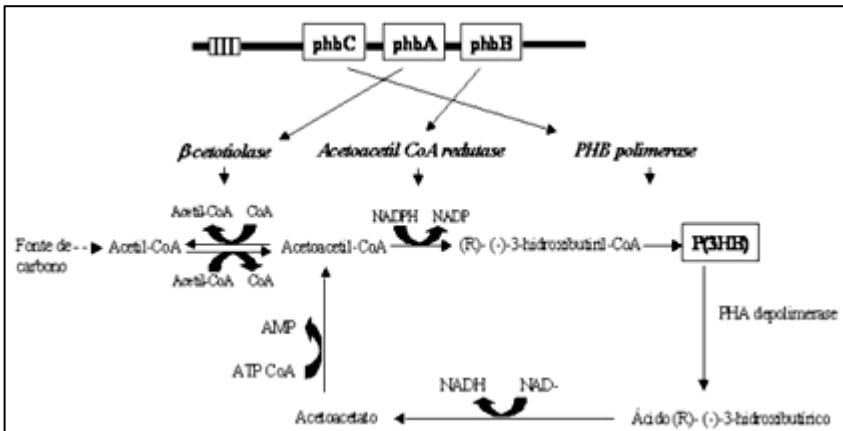


Figura 4. Rota biossintética e de degradação do P(3HB)

Fonte: CARMIGNAN et al., 2008.

2.3.3 Toxicidade e biocompatibilidade dos polihidroxicanoatos

Um aspecto importante para a aplicação de polímeros no desenvolvimento de formas farmacêuticas é a biocompatibilidade do material e de seus produtos de degradação. A biocompatibilidade de um material é a capacidade deste apresentar uma resposta apropriada quando aplicado sem causar toxicidade. A degradação do P(3HB) *in*

vitro leva a formação do monômero ácido D-(-)-3-hidroxiбутírico, que em comum com acetoacetato e acetona, é uma das três acetonas corporais produzidas endogenamente. Além disso, os PHAs de baixo peso molecular complexados a outras macromoléculas encontram-se distribuídos nas células biológicas. Esta complexação leva a modificações químicas e físicas, permitindo assim que os PHAs atravessem regiões tanto aquosas como lipídicas, fluidos intracelulares e lipoproteínas (CHEN; WU, 2005).

Adicionalmente os oligômeros e monômeros resultantes da degradação aos PHAs são principalmente derivados de hidroxiácidos como o 3-hidroxiбутirato, 3-hidroxi valerato e o 3-hidroxi hexanoato, os quais são substâncias que apresentam propriedades nutricionais e terapêuticas. Estas substâncias quando administradas oralmente são úteis no controle de ataques epilépticos, doenças metabólicas, supressão do apetite, nutrição parenteral, aumento da eficiência cardíaca, tratamento de diabetes e tratamento de doenças neurodegenerativas. Desta forma pode-se afirmar que os PHAs e seus oligômeros e monômeros não são tóxicos às células e ainda podem fornecer benefícios nutricionais e terapêuticos (CHEN; WU, 2005).

2.3.4 Polihidroxiálcanoatos e blendas poliméricas

Uma estratégia que tem sido amplamente empregada para melhoria das propriedades físicas e químicas dos polímeros é a formação de blendas. A blenda polimérica é a mistura de um ou mais polímeros que dá origem a um novo material, com características específicas desejadas, através da aditividade das propriedades dos polímeros puros. Um fator que deve ser considerado na escolha do polímero para a blenda com P(3HB) é a miscibilidade; uma blenda miscível apresenta uma única fase, ou seja, trata-se de uma mistura homogênea com características dependentes da sua composição e de fatores externos como temperatura e pressão. Na blenda imiscível o sistema é heterogêneo e as propriedades dos polímeros constituintes estão presentes (QUENTAL et al., 2010). No caso de sistemas de liberação, a formação de blendas poliméricas permite a modulação das propriedades das partículas como porosidade, velocidade de degradação e erosão e, conseqüentemente, velocidade de liberação (CARMIGNAN; BIDONE; LEMOS-SENNA, 2008).

Há vários trabalhos na literatura que relatam a formação de blendas de PHAs com outros polímeros biodegradáveis (QUENTAL et al., 2010). As blendas de P(3HB) e poli(óxido de etileno) (PEO) formam uma mistura miscível quando a proporção de PEO na blenda não ultrapassa 30% da composição, este comportamento pode ser observado através de um decréscimo acentuado na temperatura de fusão do P(3HB) na presença do PEO (YOU et al, 2003). As blendas de PHAs/derivados de celulose são de grande interesse por sua biodegradabilidade. Para teores maiores que 50% em massa de P(3HB) e P(3HB-co-3HV)/acetato de celulose observa-se uma queda na temperatura de fusão, indicando a miscibilidade do sistema. Por outro lado, para teores de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) inferiores a 50% em massa, a cristalização do P(3HB) e do P(3HB-co-3HV) é impedida, sendo obtidas blendas de caráter mais amorfo (WANG et al, 2003).

2.4 ACETATO DE CELULOSE

O acetato de celulose (AC) (Figura 5) é um éster derivado da celulose com grande potencial para aplicação em sistemas de liberação, devido às suas propriedades como baixa toxicidade, boa estabilidade e biocompatibilidade. O AC pode ser usado em processos de separação por membranas, separação de gases, matrizes para liberação controlada de fármacos, proteção de filmes ópticos e preparação de filmes de alumina. Este polímero é produzido facilmente a partir de reações de acetilação da celulose, utilizando anidrido acético como agente acetilante em ácido acético e ácido sulfúrico como catalisador, onde ocorre a substituição dos grupos hidroxila das unidades de glicose por grupos acetila. Como resultado da síntese pode-se obter diferentes graus de substituição do polímero, sendo o grau de substituição o número médio de grupos acetila que substituem as hidroxilas por unidade glicosídica, variando de zero (a celulose) a 3 (material tri-substituído). O grau de substituição é um parâmetro importante, pois afeta a cristalinidade do polímero, o potencial de biodegradabilidade e a solubilidade em diferentes solventes, entre outras propriedades (CRUZ, et al., 2011; CERQUEIRA et al., 2010). Os agrupamentos hidroxílicos livres e os substituintes são os responsáveis pela reatividade dos derivados de celulose. O polímero quando armazenado a temperatura de 60°C pode sofrer cisão dos grupos acetato diminuindo assim, sua estabilidade (EDGAR et al., 2008).

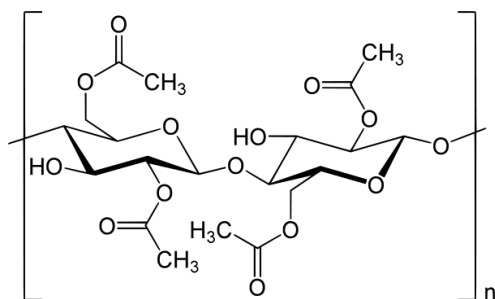


Figura 5. Estrutura química do acetato de celulose.

Devido a sua segurança, funcionalidade e facilidade de processamento, os ésteres de celulose continuam a desempenhar um importante papel no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada como materiais para a obtenção de revestimentos entéricos, membranas semi-permeáveis e matrizes hidrofóbicas. Estes polímeros encontram aplicação não somente como excipientes farmacêuticos, mas também para o controle da liberação de substâncias ativas na agricultura, fragrâncias e outros aditivos (EDGAR et al., 2008).

O acetato de celulose apresentando grau de substituição igual a 2,5 (39,8% de grupos acetil, m/m) tem sido empregado com sucesso para obtenção de matrizes hidrofóbicas por compressão direta, visando a liberação prolongada de fármacos como paracetamol, teofilina e proxifilina (EDGAR et al., 2008). O acetato de celulose também tem sido testado como material polimérico para a obtenção de microesferas de liberação controlada de teofilina, pela técnica de emulsão evaporação do solvente. Tal sistema foi capaz de retardar a liberação do fármaco por um período de mais de 12 horas, dependendo das condições testadas (SAHOO et al., 2011). A liberação de fármaco a partir de sistemas de liberação constituídos por acetato de celulose tem mostrado ocorrer por meio da dissolução e difusão do fármaco através do polímero, obedecendo, neste caso, a lei de difusão de Fick (LIMA NETO, PETROVICK, 1997).

2.5 NAPROXENO

Os fármacos antiinflamatórios inibem a produção dos mediadores bioquímicos importantes de alguns dos eventos patológicos da doença periodontal, tais como a inflamação gengival e a reabsorção

óssea e outros produtos metabólicos deletérios do ácido aracdônico na rota da ciclooxigenase. Antiinflamatórios não esteroidais (AINES) inibem a produção de prostaglandinas, as quais são associadas com a gengivite e perda de osso alveolar. Evidências demonstram que os AINES são capazes de reduzir a perda de osso alveolar, constituindo uma das abordagens terapêuticas para o tratamento das doenças periodontais (DIONNE; BERTOLD, 2001).

O naproxeno (ácido 6-metoxi-metil-2-naftalenoacético) é um fármaco do grupo dos antiinflamatórios não esteroidais (AINES) derivado do ácido propiônico que apresenta atividade antiinflamatória, antipirética e analgésica (Figura 6). O naproxeno se apresenta na forma de um sólido cristalino branco, inodoro e de sabor amargo. O naproxeno existe em duas formas enantioméricas: (R) e (S). No entanto, é amplamente documentado que a atividade terapêutica do naproxeno se deve ao enantiômero puro (S), que é mais eficaz do que o enantiômero (R). No caso do naproxeno, nenhuma de suas formas é tóxica e a mistura racêmica é comercializada. Devida a alta seletividade das enzimas, estas são capazes de distinguir entre os enantiômeros e o enantiômero (S) é esterificado mais rapidamente (FUCHS; WANNMACHER, 1998).

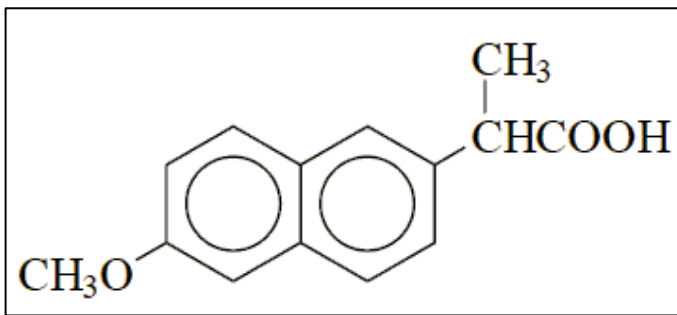


Figura 6. Estrutura química do naproxeno.

O naproxeno é um fármaco pertencente à classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), a qual inclui fármacos com baixa solubilidade aquosa e alta permeabilidade. É pouco solúvel em solução aquosa e bastante solúvel em etanol, metanol, clorofórmio e acetona. A solubilidade do naproxeno aumenta com o pH, sendo o fármaco bastante insolúvel a baixos valores de pH. A determinação

potenciométrica da constante de dissociação do naproxeno fornece um valor de pKa de 4,2 a 25°C (FUCHS; WANNMACHER, 1998).

O efeito do naproxeno está relacionado à ação primária na inibição da ciclooxigenase do ácido araquidônico e na inibição das prostaglandinas e tromboxanos, diminuindo assim, a hiperalgesia inflamatória e regulando as respostas neuronais basais. Outra ação que pode contribuir para o efeito antiinflamatório do naproxeno é a produção de oxigênio reativo por neutrófilos e macrófagos; este efeito produz uma forte destruição de radicais de O₂, reduzindo a lesão tecidual (RANG *et al*, 2001).

Os efeitos indesejados mais comuns estão associados ao uso prolongado do naproxeno, pois este é utilizado em doses altas. Podem-se destacar principalmente efeitos colaterais no trato gastrointestinal, mas também no fígado, rim baço, sangue e medula óssea (RAINSFORD, 1999). Os efeitos gastrointestinais mais comuns são dispepsia, náuseas e vômitos. A diarreia também pode ocorrer em grande frequência. As razões da lesão gástrica incluem irritação sobre a mucosa, isto porque o fármaco inibe a síntese das prostaglandinas que possuem ação protetora sobre a mucosa e inibem a secreção gástrica (RANG *et al*, 2001).

O naproxeno é geralmente prescrito para via oral em forma de comprimidos revestidos em intervalos de 12h. São administrados com os alimentos para diminuir a irritação digestiva sem prejudicar a absorção do fármaco. Estudos demonstram que, após a administração oral de 500 mg de naproxeno, o pico de concentração ocorre entre 2-4 horas e o tempo de meia vida de 12-15 horas. Por seu tempo de meia vida elevado, o naproxeno no organismo requer dias para atingir a concentração plasmática máxima (FUCHS; WANNMACHER, 1998).

Veronese e colaboradores (1999) preparam microesferas contendo naproxeno encapsulado a partir de polifosfazenos, em um teor de fármaco de 22 mg para 150 mg de polímero, para o tratamento de doenças periodontais. A estas micropartículas foram misturado também hidroxapatite, um composto conhecido para melhorar a formação de osso e a manutenção da assepsia. As microesferas obtidas possuem tamanho de cerca de 30 - 80 µm. O estudo de liberação do fármaco a partir das microesferas foi conduzido de modo a obter um teor de fármaco final de 5%. O perfil de liberação demonstrou a liberação do fármaco a uma taxa de concentração no sangue terapêuticamente satisfatória.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Matérias-primas

- Acetato de celulose (Mn 30,000, teor de acetil 38,8% em peso, Sigma –Aldrich, EUA)
- Álcool polivinílico P. S. (Vetec, Brasil)
- Naproxeno (Lote 0803105, origem China, Brasil)
- Poli(3-hidroxibutirato) P(3HB) (Biocycle[®] 1000 FE – 117, M_w = 312,800 g/mol, PHB Industrial S/A, Brasil)
- Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) P(3HB-co-3HV) (M_w = 300,000 g/mol, Sigma-Aldrich, EUA)
- Poloxamer 407 (Lutrol[®] F127, Sigma-Aldrich, EUA)

3.1.2 Solventes e reagentes

Com exceção da dimetilformamida, todos os outros solventes utilizados possuíam grau de pureza para análise (P. A.)

- Acetona (Synth, Brasil)
- Ácido fosfórico 85% (Vetec, Brasil)
- Borohidreto de sódio (Sigma-Aldrich, EUA)
- Brometo de potássio (Isifar, Brasil)
- Cloreto de sódio (Isifar, Brasil)
- Clorofórmio 99,5% (Synth, Brasil)
- Dimetilformamida grau HPLC (Sigma)
- Fosfato de potássio monobásico (Vetec, Brasil)
- Metanol (Vetec, Brasil)
- Membrana de celulose para tubos de dialise D9777 (Sigma-Aldrich, EUA)
- Poli(etilenoglicol) PEG 400 U.S.P. (Synth, Brasil)
- Sódio fosfato bibásico dodecaidratado (Nuclear, Brasil)

3.1.3 Equipamentos

- Agitador magnético DI-06 (Dist, Brasil)
- Agitador tipo vortex KMC-1300V (Vision Scientific CO Ltda, EUA)
- Balança analítica AS2000 (Ohaus Corporation, EUA)
- Banho de ultrassom USC 700 (Unique Indústria e Comércio de Produtos Eletrônicos Ltda, Brasil)

- Calorímetro exploratório diferencial DSC-50 (Shimadzu, Japão)
- Centrífuga 4K15 Sigma (Sigma, EUA)
- Dissolutor 299 (Nova Ética, Brasil)
- Difrátômetro a laser Mastersizer 2000 (Malvern, Inglaterra)
- Difrátômetro de raios X'Pert PRON (PANalytical, EUA)
- Espectrofotômetro UV/Visível UV-1800 (Shimadzu, Japão)
- Espectrofotômetro IR Prestige 21 (Shimadzu, Japão)
- Estufa de secagem de convecção forçada UF (VWR, Portugal)
- Liofilizador LD1500 (Terroni Equipamentos Científicos Ltda, Brasil)
- Microscópio JEOL JSM -6390LV (JeolLtda, EUA)
- Mufla UL1400 (Fornitec, Brasil)
- pHmetro Oakton WD-35613-00 (Oakton, EUA)
- Processador ultrassônico UP 200 S (Hielscher, Alemanha)
- Recobridora a vácuo Leica EM SCD500 (Leica Microsystems, EUA)
- Sistema cromatográfico de permeação em gel Agilent 390-MDS (Agilent, EUA)
- Viscosímetro Rotacional HAAKE, modelo VT 550-PK10 (Middleboro, EUA)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparação de microesferas de polihidroxicanoatos e de suas blends com acetato de celulose

3.2.1.1 Redução da massa molar do P(3HB)

3.2.1.1.1 Redução da massa molar via reação com borohidreto de sódio

A redução da massa molar do P(3HB) foi realizada conforme descrito por Baran et al. (2002). A solubilização de P(3HB) em clorofórmio foi realizada após modificação de sua cristalinidade por meio de tratamento térmico. Para isso, 15 g do polímero foram submetidos ao aquecimento em mufla até a sua temperatura de fusão (180°C). O polímero foi imediatamente resfriado em banho de gelo e dissolvido em 400 mL de clorofórmio. A mistura foi então mantida sob agitação magnética até completa solubilização do polímero. Em seguida, 130 mg de borohidreto de sódio (NaBH₄) foram pesados, dissolvidos com 44 mL de metanol e a solução resultante foi então adicionada à solução de P(3HB). A solução foi continuamente agitada por 4 horas a 17 °C e, após, 250 mL de metanol foram adicionados para precipitação do polímero. A mistura do polímero reduzido (P(3HB)_r) foi centrifugada a 2500 rpm por 15 min, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi levado à secagem em estufa de convecção forçada a 60°C até que não fosse mais detectada variação de massa. Este experimento foi realizado no Laboratório de Controle de Processos (LCP) do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos da UFSC.

3.2.1.1.2 Determinação da massa molar do P(3HB)_r

A massa molar viscosimétrica, ponderal e numérica (M_v, M_w e M_n) do P(3HB)_r foi determinada por cromatografia de permeação em gel (GPC). As medidas foram realizadas em equipamento Agilent 390-MDS, composto de bomba injetora ProStar 290-LC, forno de coluna ProStar 510 e detectores de índice de refração 390-MDS e UV Knauer Smartline 2500. As amostras do polímero foram dissolvidas em dimetilformamida contendo cloreto de lítio 0,1 M, de modo a obter concentração de 0,1 mg/mL, e filtradas em filtro seringal (PTFE, 0,45 µm, Rotilabo). A separação foi realizada em duas colunas Agilent PolyPore PL 1113-6500 (7,5 mm x 300 mm, 5 µm) em linha, com limite

de exclusão de 200-2,000,000, a temperatura de 60°C e vazão de 1 mL/min. As massas molares foram calculadas usando padrões de poliestireno VARIAN EasiCAL PS-1 (Mw 580-7,500,000). Os resultados foram obtidos usando o software Agilent Technologies Cirrus MDS 390-LC. Este experimento foi realizado em colaboração com o Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV, França).

3.2.1.2 Preparação das soluções de polihidroxicanoatos (PHAs) em clorofórmio

A solubilização de P(3HB) e P(3HB)_r em clorofórmio foi realizada após modificação de sua cristalinidade por meio de tratamento térmico. Para isso, 2 g do polímero foram submetidos ao aquecimento em mufla até a sua temperatura de fusão (180°C). O polímero foi imediatamente resfriado em banho de gelo, transferido para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com clorofórmio. A mistura foi então mantida sob agitação magnética até completa solubilização do polímero. Para a preparação da solução de P(3HB-co-3HV), 2 g deste polímero foram pesados, transferidos para balão volumétrico de 100,0 mL e o volume foi completado com clorofórmio.

3.2.1.3 Preparação das microesferas

A preparação das microesferas foi realizada pela técnica de emulsão e evaporação do solvente, segundo descrito por Reis et al. (2006). Resumidamente, uma solução contendo somente P(3HB), P(3HB)_r ou P(3HB-co-3HV) ou com diferentes proporções de acetato de celulose e naproxeno em clorofórmio/acetona foi adicionada, com auxílio de pipeta de Pasteur, a uma solução aquosa contendo álcool polivinílico (PVA) 0,5 % (m/V), previamente saturada com clorofórmio e mantida sob agitação ultrassônica contínua com 70% de amplitude, em banho de gelo. A emulsão formada foi então mantida sob agitação magnética durante 24 horas a temperatura ambiente para eliminação do solvente orgânico. As partículas formadas foram lavadas com água destilada e centrifugadas durante 2 horas a 2500 rpm por 3 vezes e liofilizadas. Blendas de P(3HB), P(3HB)_r e P(3HB-co-3HV) com acetato de celulose (AC) foram testadas nas seguintes proporções: 100:0, 50:50 e 0:100. Microesferas sem fármaco (brancas) foram preparadas usando o mesmo procedimento. A composição das

formulações testadas é mostrada na Tabela 2. Um esquema ilustrativo do método de preparação das microesferas é apresentado na Figura 7. As formulações de P(3HB), P(3HB-co-3HV) e P(3HB)r foram descritas com a sigla PHB, PHBV e PHBr, respectivamente. Todas as formulações foram preparadas em triplicata.

Tabela 2. Composição das formulações de microesferas.

	PHB₁₀₀	PHB:AC_{50:50}	PHBV₁₀₀	PHBV:AC_{50:50}	PHBr₁₀₀	PHBr:AC_{50:50}	AC₁₀₀
FASE ORGÂNICA							
P(3HB)¹ (mg)	100	50	-	-	-	-	-
P(3HB-co-3HV)¹ (mg)	-	-	100	50	-	-	-
P(3HB)_r¹ (mg)	-	-	-	-	100	50	-
Acetato de celulose² (mg)	-	50	-	50	-	50	50
Naproxeno³ (mg)	10	10	10	10	10	10	5
Acetona (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Clorofórmio qsp (mL)	10	10	10	10	10	10	10
FASE AQUOSA							
Solução de PVA 0,5% (m/V) (mL)	30	30	30	30	30	30	30

¹Foi utilizada uma solução do polímero 2% (m/V) em clorofórmio.

²Foi utilizada uma solução do polímero 2% (m/V) em acetona.

³Foi utilizada uma solução do fármaco 1% (m/V) em clorofórmio.

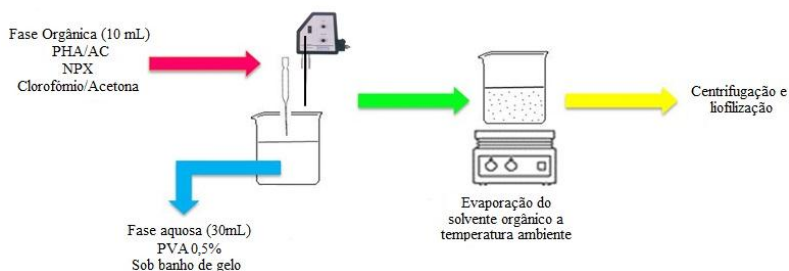


Figura 7. Esquema ilustrativo do método de preparação das microesferas pelo método de emulsão/evaporação do solvente.

3.2.2 Determinação do teor e eficiência de encapsulação do naproxeno por espectroscopia de absorção no ultravioleta

3.2.2.1 Validação da técnica de quantificação do naproxeno nas micropartículas

A determinação do naproxeno (NPX) nas microesferas foi realizada por espectroscopia de absorção no ultravioleta no comprimento de onda de 261 nm, em um espectrofotômetro Shimadzu (Japão). O método foi validado de acordo com o ICH (2005) utilizando os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e determinação dos limites de detecção e quantificação.

3.2.2.1.1 Especificidade

Para avaliar a especificidade do método, 50 mg de microesferas brancas (sem naproxeno) foram exatamente pesadas, transferidas para um balão volumétrico de 25,0 mL e o volume completado com metanol. Esta mistura foi mantida em agitação magnética durante 4 horas e, em seguida, centrifugada a 2500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e analisado por espectroscopia de absorção UV contra o mesmo solvente. Os espectros de varredura resultantes foram comparados com o espectro de uma solução padrão de naproxeno 20 µg/mL, analisada nas mesmas condições.

3.2.2.1.2 Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A linearidade do método foi determinada pela construção de três curvas de calibração em três dias diferentes. Cerca de 50 mg de naproxeno exatamente pesados foram dissolvidos em metanol e o volume completado para 50,0 mL em balão volumétrico. Esta solução foi diluída com metanol para obter soluções de naproxeno nas concentrações variando de 10 e 40 µg/mL. As soluções foram preparadas em triplicata e analisadas por espectrofotometria de absorção no ultravioleta no comprimento de onda de 261 nm, contra o mesmo solvente. A curva de calibração foi construída a partir das absorbâncias de cada concentração, a equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados pela análise de regressão linear.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados conforme as seguintes equações:

$$LD = \frac{3,3 X \sigma}{S}$$

$$LQ = \frac{10 X \sigma}{S}$$

em que, σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo y da equação da reta e S é inclinação da reta.

3.2.2.1.3 Precisão intra e interdia

Cerca de 50 mg de microesferas sem fármaco foram exatamente pesadas e transferidas para um balão volumétrico de 25,0 mL. Uma alíquota de uma solução padrão de naproxeno em metanol foi adicionada a esta solução e o volume completado de modo a obter uma concentração final do fármaco de 20 µg/mL. Esta mistura foi então mantida sob agitação magnética por 4 horas e então centrifugada a 2500 rpm por 15 min. O sobrenadante foi coletado e analisado por espectroscopia de absorção no UV no comprimento de onda de 261 nm, contra o mesmo solvente. A repetibilidade (precisão intradia) foi avaliada por meio da análise de seis amostras no mesmo dia. A precisão intermediária (interdia) foi avaliada por meio da análise das três amostras em três dias diferentes. A precisão foi expressa como percentagem de desvio padrão (DPR%).

3.2.2.1.4 Exatidão

Para avaliar a exatidão do método, 50 mg de microesferas brancas, exatamente pesadas, foram transferidas para um balão volumétrico de 25,0 mL. As amostras de microesferas PHB₁₀₀ e AC₁₀₀ foram contaminadas com uma solução padrão de naproxeno em três níveis diferentes (baixo, médio e alto), correspondendo a concentrações finais de 10, 20 e 30 µg/mL, e o volume foi completado com metanol. Esta mistura foi então mantida em agitação magnética por 4 horas e então centrifugadas a 2500 rpm por 15 min. O sobrenadante foi coletado e analisado por espectroscopia de absorção no UV no comprimento de onda de 261 nm, contra o mesmo solvente. As análises foram realizadas em triplicata e a recuperação (R%) foi estimada utilizando a seguinte equação:

$$R(\%) = \frac{C_A}{C_t}$$

Em que C_A e C_t são as concentrações de NPX encontradas nas amostras e a teórica, respectivamente.

3.2.2.1.5 Robustez

Para a avaliação da robustez do método, as seguintes condições foram alteradas: comprimento de onda de análise (258, 261 e 264 nm) e o tempo de extração do NPX a partir das microesferas (3, 4 e 5 horas). Cerca de 50 mg de microesferas brancas foram pesadas em um balão volumétrico de 25,0 mL, uma alíquota de uma solução padrão de naproxeno em metanol foi adicionada a esta solução e o volume completado de modo a obter uma concentração final do fármaco de 20 µg/mL, e o volume completado com metanol. A mistura foi submetida à agitação magnética a temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 20 minutos e as alíquotas do sobrenadante foram coletadas e analisadas por UV, contra o mesmo solvente. As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.2.2 Determinação do teor e eficiência de encapsulação do naproxeno nas microesferas

Cerca de 50 mg de microesferas foram pesados em um balão volumétrico de 25,0 mL e o volume completado com metanol. A

mistura foi submetida à agitação magnética por 4 horas em temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 20 minutos e alíquotas do sobrenadante foram coletadas e analisadas. A concentração de naproxeno foi determinada por meio da comparação da absorção da amostra com aquela obtida por uma solução padrão de concentração conhecida, analisada nas mesmas condições. A eficiência de encapsulação (E.E.%) e o teor de fármaco (mg NPX/100 mg de microesferas) foram calculados conforme as equações abaixo:

$$E. E. = \frac{C_{NPX} \times 25 \times 100}{Q_p}$$

$$Teor = \frac{C_{NPX} \times 25 \times 100}{Q_i}$$

Onde: C_{NPX} = concentração de naproxeno na amostra (mg/mL)

Q_i = massa de fármaco adicionado nas formulações (mg)

Q_p = massa de microesferas pesadas (mg)

Os resultados foram expressos pela média de três determinações e os valores de eficiência de encapsulação e teor de naproxeno em mg NPX/100 mg de microesferas foram analisadas.

3.2.3 Caracterização físico-química das microesferas

3.2.3.1 Avaliação da morfologia

A morfologia das partículas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio JEOL JSM-6390LV utilizando voltagem de 10 e 15 kV. As amostras foram dispostas em suportes de alumínio sob fita de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro de 350 Å de espessura em aparelho a vácuo Polaren E 500. As fotomicrografias foram obtidas nos aumentos 1000 a 18000 vezes. As análises foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2.3.2 Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica

O diâmetro médio e a distribuição granulométrica das partículas foram determinados por difração a laser em equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido), com luz monocromática vermelha (632,8 nm) de um laser de HeNe e obscurecimento entre 10 e 13%. As amostras foram dispersas em água destilada em banho de ultrassom, a distribuição do tamanho foi determinada com base na teoria de difração de Fraunhofer e os resultados foram expressos em diâmetro por volume equivalente a 10% ($d_{0,1}$), 50% ($d_{0,5}$) e 90% ($d_{0,9}$) do volume acumulado e como diâmetro médio ($d_{3,4}$). O Span foi calculado de acordo com a equação abaixo. Todas as análises foram realizadas em triplicata

$$Span = \frac{d_{90\%} - d_{10\%}}{d_{50\%}}$$

3.2.3.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O comportamento térmico das microesferas com e sem fármaco, assim como as matérias primas, foram analisados por calorimetria exploratória diferencial (DSC) em equipamento DSC-50 Shimadzu (Kyoto, Japão). Cerca de 3 mg de material foram pesados em cápsulas de alumínio e lacradas. As amostras foram submetidas ao aquecimento até 200 °C, numa razão de 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio. Uma cápsula de alumínio vazia lacrada foi utilizada como referência. As temperaturas de fusão foram obtidas a partir das curvas DSC. Este estudo foi realizado com colaboração do laboratório de Controle de Qualidade da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2.3.5 Difração de raios-X

Os modelos de difração de raios-X (DRX) foram obtidos utilizando difratômetro X'Pert PRO equipado com detector X'Celerator (PANalytical, Holanda) com goniômetro $\Theta - \Theta$. Para emissão de raios-X foi utilizado ânodo de cobre radiação $\text{CuK}\alpha$, com $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, voltagem de 45kV e intensidade de corrente de 40 mA. O circuito de difração foi formado por tubo de cobre, fenda divergente de $\frac{1}{4}$ e fenda de anti-espalhamento de $\frac{1}{2}$. A varredura foi realizada a ângulos 2θ de 3° a 80° em temperatura ambiente de 25 °C. Este estudo foi realizado nas instalações multiusuários do Laboratório de Difração de Raios-X

(LDRX) do Centro de Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2.3.6 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho (IR) foram obtidos usando um equipamento Shimadzu (Kyoto, Japão). Discos de brometo de potássio (KBr) contendo os compostos puros e as microesferas foram preparados e as leituras das amostras foram efetuadas entre 4000 e 400 cm^{-1} .

3.2.4 Preparação e caracterização de hidrogéis termosensíveis contendo as microesferas

3.2.4.1 Preparação do gel de poloxamer contendo as microesferas

Brevemente, 20 g de poloxamer 407 (BASF, EUA) foram pesados e gradualmente adicionados a água destilada previamente resfriada a temperatura de 5-10° C, sob agitação magnética, para a obtenção de uma concentração final de 20% (m/m). O recipiente foi fechado e mantido em geladeira overnight a 5° C. As microesferas contendo naproxeno foram pesadas e incorporadas ao hidrogel de modo a obter uma concentração de partículas de 10% (m/m).

3.2.4.2 Avaliação das propriedades reológicas do hidrogel

As propriedades reológicas do hidrogel de poloxamer contendo as microesferas foram avaliadas em viscosímetro rotacional HAAKE, modelo VT 550-PK10 (Middleboro, EUA), com sensor SV-DIN e copo SV/TSV, acoplado ao Software RheoWin Job Manager e RheoWin Data Manager. As amostras dos hidrogéis foram submetidas a velocidades de rotação variáveis a temperatura ambiente e a 37° C e, respeitando os limites de torque (entre 10% e 100%). Os valores de tensão de cisalhamento e viscosidade em função do gradiente de cisalhamento foram avaliados e comparados. Amostras do hidrogel branco (sem as microesferas) foram analisadas nas mesmas condições. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UNIVALI.

3.2.5 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* do naproxeno a partir das microesferas

3.2.5.1 Preparação do meio de liberação

Os estudos de liberação do NPX a partir das microesferas foram realizados em fluido salivar simulado (FSS) conforme descrito por Chiappetta et al. (2006). Brevemente, 2,38 g fosfato de sódio bibásico dodecaidratado, 0,19g de fosfato de potássio monobásico e 8,00 g de cloreto de sódio foram pesados, transferidos para um balão volumétrico de 1 L e o volume completado com água destilada. A mistura foi mantida sob agitação magnética até completa dissolução dos componentes do meio. O pH foi ajustado a 6,75 com ácido fosfórico.

3.2.5.2 Avaliação da estabilidade do naproxeno no meio de liberação

Uma solução de naproxeno 20 µg/mL em fluido salivar simulado pH 6,75 foi mantida em agitação magnética em temperatura ambiente por 36 horas. Após este período, a solução foi analisada por espectroscopia de absorção no UV contra o mesmo solvente. A análise foi realizada em triplicata.

3.2.5.3 Determinação da solubilidade do naproxeno no meio de liberação

Um excesso de naproxeno foi adicionado a 20 mL fluido salivar simulado pH 6,75 e a mistura foi mantida sob agitação magnética a 800 rpm por 48 horas, em temperatura ambiente. A mistura foi então centrifugada a 2500 rpm durante 15 minutos e uma alíquota do sobrenadante foi coletado e analisada em espectrofotômetro a 261 nm. As análises foram realizadas em triplicata e a concentração de naproxeno foi determinada pela comparação da absorbância das amostras com aquela obtida com uma solução padrão de naproxeno de concentração conhecida, analisada nas mesmas condições.

3.2.5.4 Curva de calibração do naproxeno em fluido salivar simulado

Para a construção da curva de calibração, 50 mg de naproxeno exatamente pesados foram colocados em um balão volumétrico de 50,0 mL e o volume foi completado com metanol. Esta solução foi diluída

em fluido salivar simulado pH 6,75 a fim de obter soluções nas concentrações de 5 a 40 µg/mL. As soluções foram preparadas em triplicata e analisadas em espectrofotômetro a 261 nm, contra o mesmo solvente. A curva de calibração foi construída a partir das médias das absorbâncias de cada concentração e a equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados pela análise de regressão linear.

3.2.5.5 Avaliação do perfil de liberação do naproxeno em fluido salivar simulado pH 6,75

Para os ensaios de liberação, cerca de 3 g dos géis contendo as microesferas foram pesados e colocados em sacos de diálise de 7 mm x 25 mm de celulose. Os sacos de diálise foram então fechados e colocados em 300 mL do meio de liberação, mantido a temperatura de $37 \pm 0,5$ °C, com agitação de 50 rpm. Alíquotas de 3 mL foram retiradas nos tempos, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 30 e 36 horas. Após cada coleta, o volume de meio removido foi repostado para manutenção das condições *sink*. As alíquotas foram analisadas quanto à concentração de naproxeno por espectroscopia no UV 261 nm (XUAN et al. 2010). A partir dos resultados, curvas de percentual de naproxeno liberado *versus* tempo foram construídas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pela ANOVA a partir dos resultados de $t_{50\%}$ (tempo para liberação de 50% do fármaco associado às partículas) e área sob a curva (ASC) obtidos a partir dos perfis de liberação ($\alpha=0,05$). A comparação entre as médias foi realizada mediante aplicação do teste de Tukey, em que a diferença mínima significativa (d.m.s.) é calculada empregando-se a seguinte equação:

$$d. m. s. = q \sqrt{\frac{QMR}{r}}$$

onde QMR é o quadrado médio do resíduo (erro), r é o número de tratamentos e q é um valor tabelado em função do número de tratamento e dos graus de liberdade do resíduo, para um $\alpha=0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PREPARAÇÃO DAS MICROESFERAS

O desenvolvimento de microesferas tem sido considerado uma boa estratégia para a obtenção de formas farmacêuticas de liberação prolongada, cujas características podem ser moduladas de acordo com a via de administração. Diversas técnicas são descritas na literatura para a preparação de microesferas, entre elas, a técnica de emulsificação seguida da evaporação do solvente tem sido amplamente empregada em virtude da simplicidade dos procedimentos envolvidos para a obtenção das partículas. Além disso, trata-se de um procedimento versátil que permite a encapsulação de substâncias de natureza hidrofóbica ou hidrofílica, pela escolha das condições de preparação (REIS et al., 2006). Neste trabalho, esta técnica foi empregada para a encapsulação do naproxeno, um fármaco pouco solúvel em água. Assim, a encapsulação foi realizada mediante a formação de uma emulsão óleo em água, em que este fármaco é previamente solubilizado na fase orgânica da formulação.

Vários são os fatores que afetam as características finais das partículas, incluindo as características fisicoquímicas do fármaco e do polímero, e as condições de preparação. Neste estudo, os polihidroxialcanoatos foram selecionados como material encapsulante tendo em vista as suas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade, sendo os produtos de degradação assimiláveis pelo organismo. Esta classe de polímeros tem o P(3HB) como principal representante, o qual é obtido por fermentação usando matérias-primas renováveis da agricultura, principalmente derivados da cana de açúcar (DINIZ et al., 2004). Entretanto, o P(3HB) exibe elevada cristalinidade e massa molar, as quais são características que limitam a sua utilização no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. A liberação de moléculas ativas de baixa massa molar a partir de matrizes de P(3HB) geralmente ocorre rapidamente por mecanismo de difusão, sendo a velocidade de liberação substancialmente maior que a velocidade de degradação do polímero (CHEN; WU, 2005). Assim, com o intuito de avaliar o efeito dos parâmetros de formulação sobre a velocidade de liberação do NPX a partir das microesferas, a formação de blendas com acetato de celulose (AC) e a redução da massa molar do P(3HB) foram testadas. Além disso, o copolímero P(3HB-co-3HV), menos cristalino, também foi usado para a preparação das microesferas.

4.1.1 Determinação da massa molar do PHBr

A massa molar é um fator de extrema importância, pois afeta diretamente a resistência mecânica do polímero, a capacidade de intumescimento, a capacidade de sofrer hidrólise e, conseqüentemente, a taxa de biodegradação. Um fator que evidencia a dependência da massa molar com a taxa de degradação do polímero biodegradável e, portanto, com a liberação do fármaco, está relacionado com a direta proporcionalidade entre os valores da temperatura de transição vítrea (T_g), ou seja, quanto menor a massa molar, menor será o valor da T_g do polímero. Com o intuito de obter polímeros com características mais desejáveis, diversas técnicas têm sido utilizadas para a redução da massa molar dos PHAs, incluindo hidrólise ácida utilizando-se ácido clorídrico em meio aquoso, a transesterificação com etilenoglicol ou hexilenoglicol catalisada por ácido e a redução da massa molar em solução utilizando-se o tetraboridreto de sódio (NaBH_4) (MONTORO et al., 2010). A Figura 8 mostra dois mecanismos propostos para a redução do P(3HB) com borohidreto de sódio. Em (A) o agente redutor ataca o centro eletrofílico da cadeia polimérica formando o ânion alcóxido, que, subsequentemente, leva à formação de um ânion enolato gerando um grupo estável α - β -insaturado. Outro mecanismo proposto é a reação de descarboxilação da cadeia polimérica como demonstrado na Figura 8 (B) (BERGAMASCHI et al., 2011).

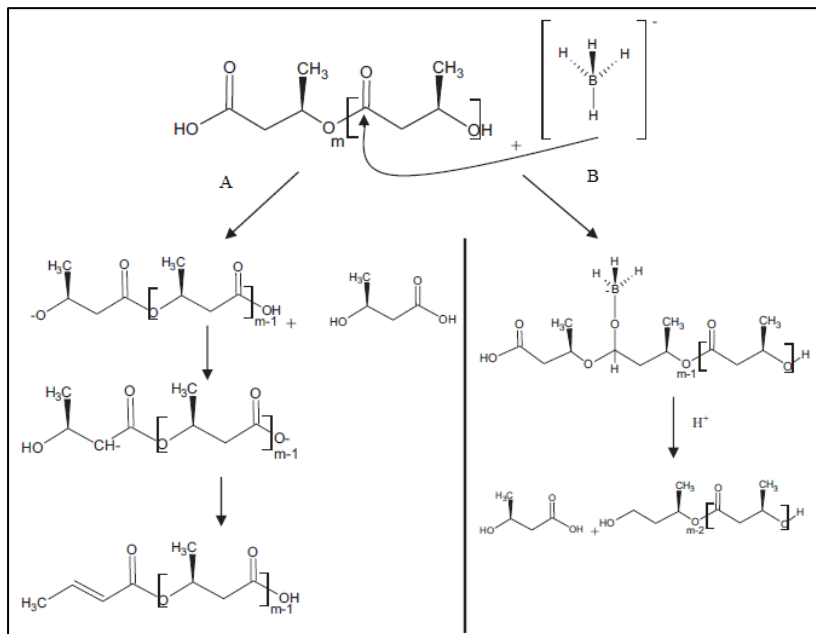


Figura 8. Mecanismo proposto para a redução do P(3HB) com borohidreto de sódio.

Fonte: Bergamaschi et al., 2011.

O P(3HB) empregado nesse trabalho apresenta massa molar declarada de cerca de $300,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Biocycle[®] 1000 FE 117). Após o tratamento com NaBH_4 , a massa molar média do polímero foi determinada por cromatografia de partição em gel, conforme descrito em Montoro et al., 2010. Os resultados de massa molar viscosimétrica (Mv), numérica média (Mn) e ponderal média (Mw) do P(3HB)r estão apresentadas na Tabela 3. O cromatograma representativo do P(3HB)r pode ser visualizado na Figura 9.

Tabela 3. Massas molares viscosimétrica (Mv), numérica média (Mn) e ponderal média (Mw) do PHBr.

	Mv (g/mol)	Mn (g/mol)	Mw (g/mol)
P(3HB)r	16770	12552	17586

Figura 9. Cromatograma de partição em gel do PHBr.

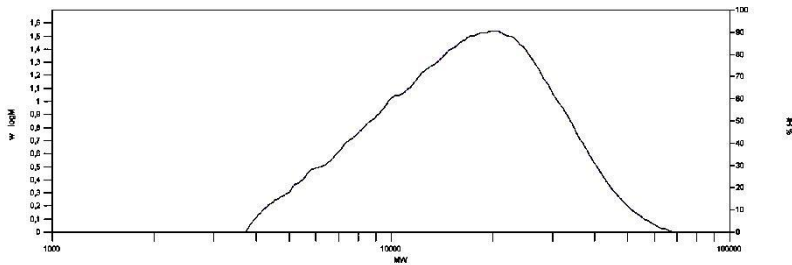


Figura 9. Cromatograma de partição em gel do PHBr.

Considerando o resultado obtido, pode-se concluir que a técnica empregada promoveu a redução da massa molar do polímero de maneira eficiente. Entretanto, pode ser observado que a síntese de redução da massa molar levou à obtenção de uma ampla distribuição de massas molares. A Figura 9 mostra a presença de uma cauda, a qual evidencia a obtenção de uma fração do polímero apresentando massa molar baixa. Este comportamento foi observado por Bergamaschi e Felisberti (2011), os autores avaliaram a redução da massa molar do PHB, quando o polímero foi reduzido com NaBH_4 e concluíram a partir de estudos de espectrometria de massa que outros produtos foram formados na redução, como ácidos insaturados provenientes dos monômeros da cadeia polimérica do P(3HB).

4.1.2 Determinação da eficiência de encapsulação e teor de naproxeno por espectroscopia de absorção no ultravioleta

4.1.2.1 Validação da técnica de quantificação de naproxeno nas micropartículas

4.1.2.1.1 Especificidade

A Figura 10 apresenta os espectros de absorção no UV das amostras PHB:AC_{50:50}, PHBV:AC_{50:50}, PHBr:AC_{50:50} sem fármaco e da solução padrão de naproxeno 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O espectro de absorção do naproxeno é típico de um composto naftaleno 2-substituído, apresentando três sistemas de bandas localizados em torno de 220 nm, 240–280nm e 310-330 nm (PIRNAU; BOGDAN, 2008) (Figura 9D). Conforme mostrado na Figura 9, o método é específico para a

quantificação de naproxeno, uma vez que as amostras sem fármaco não apresentam absorvância de luz no comprimento de onda selecionado para análise.

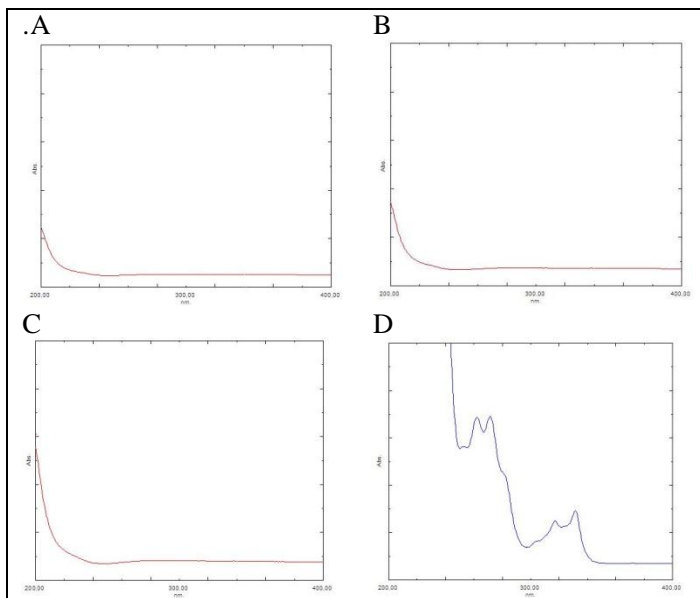


Figura 10. Espectro de absorção no UV das amostras: (A) PHB:AC50:50 sem fármaco; (B) PHBV:AC50:50 sem fármaco; (C) PHBr:AC50:50 sem fármaco e (D) solução padrão de naproxeno 20 µg/mL em metanol.

4.1.2.1.2 Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A Figura 11 exibe uma curva padrão representativa de naproxeno em metanol. A curva de calibração de naproxeno foi linear na faixa de concentração de 10 µg/mL a 40 µg/mL com o coeficiente de correlação de 0,9998 ($y = 0,0225x + 0,0241$). A análise de variância confirmou a linearidade do método ($F_{\text{calculado}} 249,158 > F_{\text{crítico}} 2,848$, $\alpha = 0,05$). O limite de detecção e de quantificação foram $3,53 \pm 0,66$ µg/mL e $10,71 \pm 0,87$ µg/mL, respectivamente, indicando que o método foi suficientemente sensível para determinar o teor de naproxeno nas microesferas poliméricas.

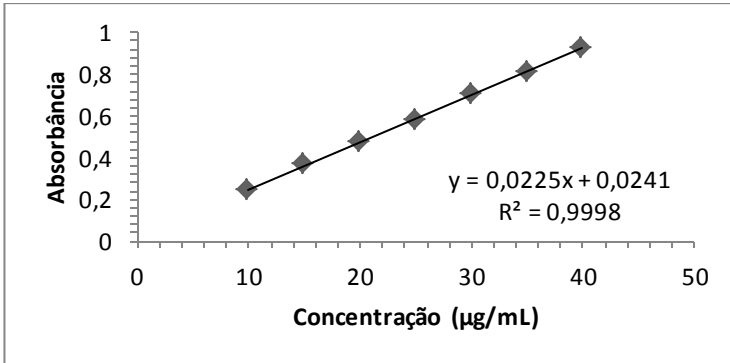


Figura 11. Curva de calibração de naproxeno em metanol obtida por espectrofotometria de absorção no ultravioleta

4.1.2.1.3 Precisão intra e interdia

A repetibilidade do método (precisão intradia) foi avaliada após análise das soluções obtidas após a extração das formulações PHB₁₀₀ e AC₁₀₀ por espectroscopia de absorção no UV a 261 nm ($n=6$) (Tabela 4). Para avaliação da precisão intermediária (interdia) analisando as formulações PHB₁₀₀ e AC₁₀₀ em triplicata em três dias diferentes (Tabela 5). Os valores de desvio padrão relativo (DPR) para todas as amostras foram menor que 1%, indicando uma variabilidade aceitável na concentração de naproxeno obtido a partir das microesferas poliméricas.

Tabela 4. Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade (precisão intradia) do método para determinação de naproxeno.

Repetições	PHB ₁₀₀			AC ₁₀₀		
	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Média	DPR %	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Média	DPR%
1	20,01	20,03	0,28	20,17	20,12	0,62
2	19,96					
3	20,04					
4	20,04					
5	20,00					
6	20,13			19,96		

Tabela 5. Resultados obtidos na avaliação da precisão intermediária (interdia) do método para determinação de naproxeno.

Dia	PHB ₁₀₀			AC ₁₀₀		
	Conc. (µg/mL)	Média	DPR (%)	Conc. (µg/mL)	Média	DPR (%)
1	20,00			20,08		
2	20,08	20,03	0,28	20,17	20,13	0,22
3	20,00			20,13		

4.1.2.1.4 Exatidão

A Tabela 6 apresenta os valores de recuperação de naproxeno adicionado às amostras brancas PHB₁₀₀ e AC₁₀₀. Todos os valores permaneceram na faixa de 100,14 a 101,63 %, evidenciando a exatidão do método.

Tabela 6. Resultados obtidos na avaliação da exatidão do método para determinação de naproxeno

Amostra	Conc. teórica (µg/mL)	Conc. média obtida (µg/mL)	Exatidão (%)	DPR%
PHB ₁₀₀	10	10,12	101,18	0,51
	20	20,03	100,14	0,45
	30	30,04	100,15	0,40
AC ₁₀₀	10	10,16	101,63	0,67
	20	20,20	101,02	0,45
	30	31,60	101,33	0,87

Onde Conc. é a concentração.

4.1.2.1.5 Robustez

Para avaliação da robustez do método dois parâmetros de análise foram variados: comprimento de onda e tempo de extração. Como observado na Tabela 7, verificou-se que o método é robusto quanto aos parâmetros analisados.

Tabela 7. Resultados obtidos na avaliação da robustez do método de quantificação de naproxeno por UV.

Variação	PHB ₁₀₀		AC ₁₀₀	
	Conc. (µg/mL)	DPR (%)	Conc. (µg/mL)	DPR (%)
Comprimento de onda	258 nm	20,11	20,38	
	261 nm	19,75	0,91	20,17
	264 nm	19,98		20,08
Tempo de extração	3 h	20,14		19,96
	4 h	20,03	0,34	20,17
	5 h	20,01		19,87

4.1.3 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de naproxeno nas microesferas

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos para eficiência de encapsulação e teor de NPX nas microesferas. Como pode ser observado, os valores de eficiência de encapsulação e teor de naproxeno variaram entre 31 a 98% e de 3,14 a 9,81 mg/100 mg de microesferas, respectivamente, conforme a formulação testada. Quando somente o acetato de celulose foi empregado na preparação das microesferas, esses valores foram mais baixos, podendo estar relacionado à menor concentração de fármaco na fase orgânica da formulação, uma vez que parte do fármaco é solubilizado na fase aquosa e removido nas etapas de lavagem e centrifugação. Além disso, a redução da massa molar do P(3HB) pareceu reduzir a encapsulação do NPX nas partículas. Esse efeito também foi observado por outros autores, os quais justificam que com o aumento da massa molar do polímero ocorre o aumento da sua hidrofobicidade e, conseqüentemente, a mais rápida precipitação do mesmo nas gotas da emulsão e mínima partição do fármaco para a fase aquosa (EL-KAMEL; AL-SHORA; EL-SAYED, 2006).

Tabela 8. Eficiência de encapsulação (EE) e teor de naproxeno nas microesferas poliméricas (n=3)

Formulação	E.E. ± d.p. (%)	Teor de fármaco ± d.p. (mg NPX/100 mg microesferas)
PHB₁₀₀	98,13 ± 0,40	9,81 ± 0,04
PHB:AC_{50:50}	89,40 ± 2,07	8,94 ± 0,21
PHBV₁₀₀	80,12 ± 1,56	8,01 ± 0,16
PHBV:AC_{50:50}	70,35 ± 1,61	7,03 ± 0,16
PHBr₁₀₀	59,42 ± 1,23	5,94 ± 0,12
PHBr:AC_{50:50}	78,44 ± 1,79	7,84 ± 0,18
AC₁₀₀	31,42 ± 1,50	3,14 ± 0,15

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROESFERAS

4.2.1 Avaliação da morfologia

Vários são os fatores que podem afetar as características de superfície das micropartículas poliméricas preparadas pela técnica de emulsificação/evaporação do solvente incluindo a solubilidade do fármaco, tipo de solvente empregado, taxa de remoção do solvente orgânico da fase interna da emulsão, temperatura, quantidade de fármaco empregada e viscosidade e cristalinidade do material polimérico (DONNEL; McGINITY, 1997; MARTIN et al., 2000; LI, ROUAUD, PONCELET, 2008). No caso da preparação das microesferas, com exceção do tipo de polímero, todas as outras condições de preparação foram mantidas constantes, sendo, portanto, o tipo de material polimérico determinante nas características de morfologia das partículas.

Como podem ser observadas, as microesferas preparadas unicamente com acetato de celulose exibem formato esférico e superfície lisa (Figura 12). AS microesferas preparadas a partir do P(3HB) e P(3HB)r são igualmente esféricas, mas apresentam superfície rugosa (Figuras 13 e 15). A rugosidade das partículas pareceu ser menor com a utilização do P(3HB-co-3HV) e PHBr e decresceu com a utilização das blendas de PHAs e AC (Figura 14). Segundo alguns autores, micropartículas preparadas com polímeros de caráter amorfo, como o acetato de celulose, tem levado a formação de partículas com

superfície lisa em comparação com o P(3HB) e o P(3HB)r. Isto sugere que as porções cristalinas do P(3HB) e P(3HB)r determinam as características da superfície da microesfera, tornando-as mais rugosas (MARTIN et al., 2000).

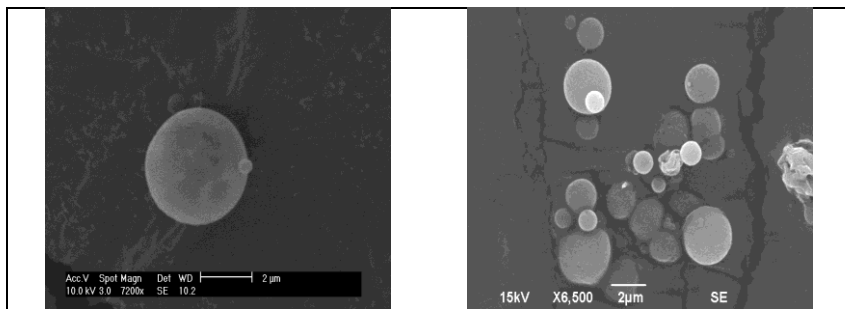


Figura 12. Fotomicrografias obtidas por MEV das micropartículas de acetato de celulose contendo naproxeno (AC₁₀₀).

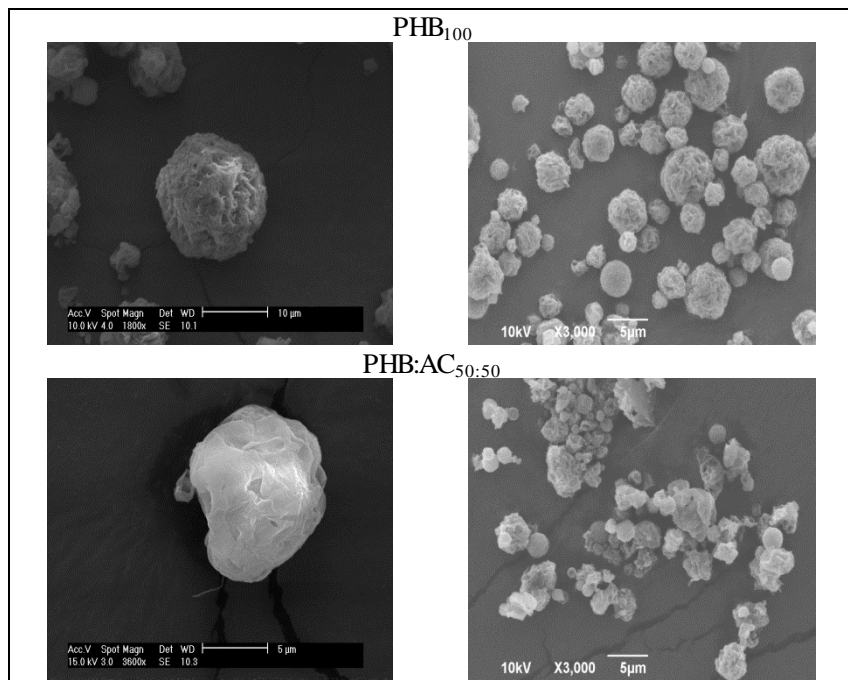


Figura 13. Fotomicrografias obtidas por MEV das microesferas de PHB₁₀₀ e PHB/AC_{50:50} contendo naproxeno.

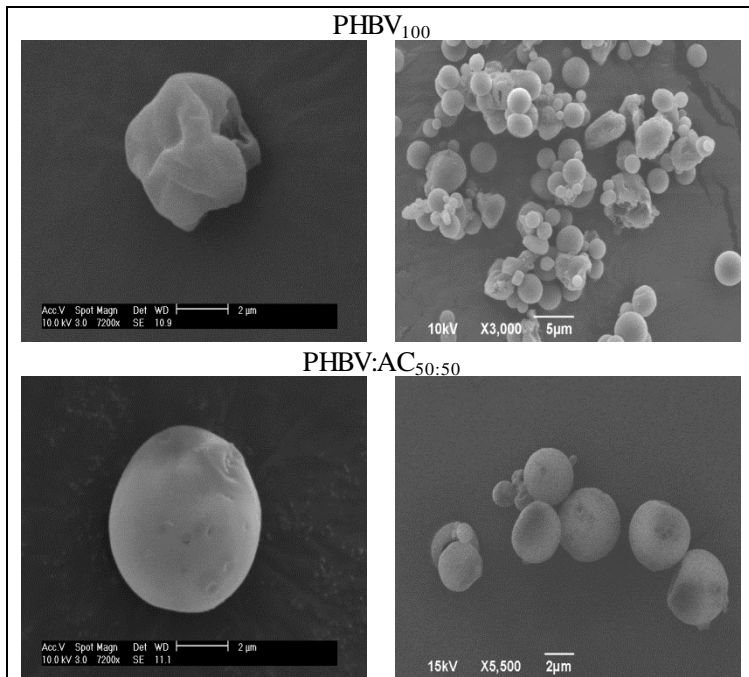


Figura 14. Fotomicrografias obtidas por MEV das microsferas de PHBV₁₀₀ e PHBV/AC_{50:50} contendo naproxeno.

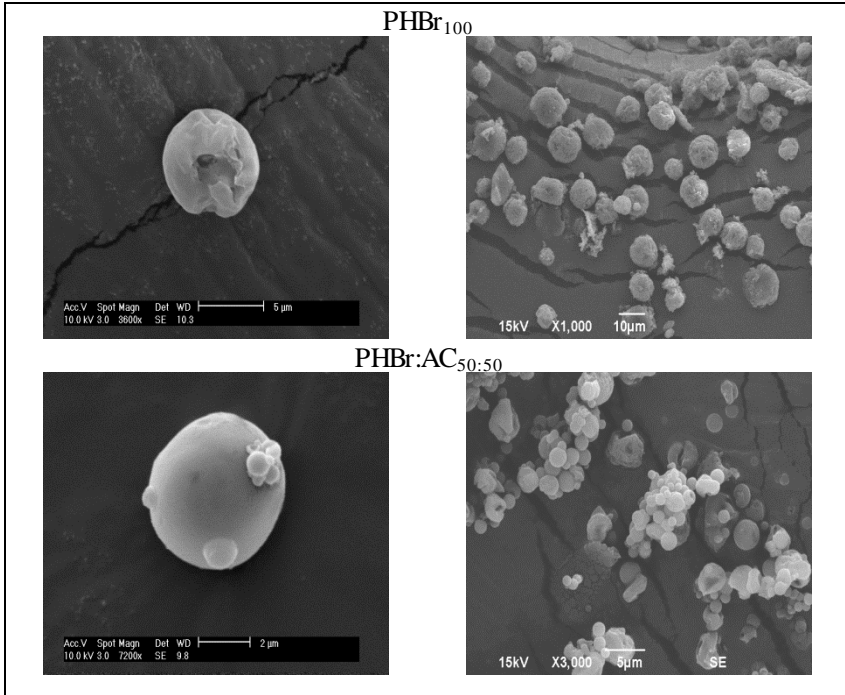


Figura 15. Fotomicrografias obtidas por MEV das microsferas de PHBr₁₀₀, PHBr/AC_{50:50} contendo naproxeno.

4.2.2 Determinação do diâmetro médio, distribuição granulométrica

As características de tamanho e distribuição granulométrica das micropartículas foram avaliadas pela técnica de difração a laser. A tabela 9 exhibe os valores de $d_{0,1}$, $d_{0,5}$, $d_{0,9}$, bem como os valores de diâmetro geométrico médio ($d_{4,3}$) e span obtidos com as diferentes formulações de microsferas. Como pode ser observado nesta tabela, os valores de diâmetro médio variaram entre 6,145 e 16,266 μm , dependendo da formulação testada. Os valores de span, os quais caracterizam a amplitude da distribuição de tamanhos, variaram entre 3,85 e 6,12. Diâmetros geométricos médios menores foram obtidos quando o P(3HB)r e o AC foram empregados como material

polimérico. Além disso, a adição de AC, para obtenção da blenda com P(3HB) e P(3HB-co-3HV), provocou a redução do tamanho das partículas (Tabela 9).

Tabela 9. Diâmetro médio e distribuição granulométrica das partículas contendo fármaco naproxeno (n=3).

Formulação	$d_{0,1} \pm d.p.$	$d_{0,5} \pm d.p.$	$d_{0,9} \pm d.p.$	Span $\pm d.p.$	$d_{4,3} \pm d.p.$
PHB ₁₀₀	1,581 \pm 0,41	10,089 \pm 0,38	37,118 \pm 0,86	3,850 \pm 1,61	16,266 \pm 0,60
PHB:AC _{50:50}	1,067 \pm 0,29	7,431 \pm 0,38	23,483 \pm 1,17	4,169 \pm 0,44	8,087 \pm 0,44
PHBV ₁₀₀	1,410 \pm 0,31	5,153 \pm 0,12	30,716 \pm 1,31	6,123 \pm 0,40	12,266 \pm 1,35
PHBV:AC _{50:50}	1,094 \pm 0,10	3,989 \pm 0,84	22,835 \pm 1,82	5,747 \pm 0,34	8,792 \pm 0,32
PHBr ₁₀₀	1,343 \pm 0,31	4,022 \pm 0,92	17,214 \pm 0,85	4,249 \pm 0,27	7,233 \pm 1,36
PHBr:AC _{50:50}	1,354 \pm 0,34	4,599 \pm 0,73	21,368 \pm 1,45	4,677 \pm 0,92	6,145 \pm 1,17
AC ₁₀₀	0,860 \pm 0,32	4,595 \pm 0,75	25,186 \pm 1,24	5,002 \pm 0,62	9,250 \pm 0,34

Quando a técnica de emulsão e evaporação é empregada, o diâmetro médio das microesferas é afetado por fatores como concentração do polímero e viscosidade da fase interna, velocidade de agitação e tipo e concentração de estabilizante na fase externa. Neste estudo, como as demais condições de preparação foram mantidas constantes, a redução do tamanho da partícula provavelmente ocorreu devido à menor viscosidade da fase orgânica, quando o P(3HB)r e blendas de P(3HB)/AC e P(3HB-co-3HV)/AC 50:50 foram usados. Igualmente, a menor concentração de acetato de celulose na fase orgânica da formulação AC₁₀₀ certamente contribuiu para a redução do tamanho da partícula.

Tamanho e distribuição granulométrica são parâmetros importantes na caracterização das micropartículas, pois estão diretamente correlacionados com a velocidade de liberação, além de condicionar o modo de administração (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008). Os tamanhos obtidos aqui parecem ser adequados para administração periodontal. Cortesi et al. (2002) relatam que microesferas com diâmetro na faixa de 20 a 120 μm podem ser usadas para a administração periodontal, pois permanecem retidas no local de administração e agem como depósitos de fármacos de liberação prolongada. Entretanto, o uso de partículas de diâmetros menores e de nanopartículas para administração periodontal também é descrito na literatura (KONG et al., 2000; ALVAREZ, ESPINAR e MENDEZ, 2011). Ainda, a possibilidade de injeção do sistema de liberação na bolsa periodontal é vantajosa, pois se trata de um procedimento relativamente simples em que a forma farmacêutica é introduzida com auxílio de uma seringa, permitindo que a formulação tenha acesso a toda região no interior da bolsa. Neste caso, o emprego de partículas de até 100 μm é desejável para evitar os inconvenientes causados pelo entupimento da agulha (BRUSCHI et al., 2006).

4.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Com o objetivo de verificar uma possível interação entre o fármaco e a matriz polimérica as microesferas foram analisadas por calorimetria exploratória diferencial. Dependendo dos monômeros que constituem o polímero, a temperatura de fusão dos PHAs pode variar de 50 a 180 °C. O P(3HB) funde entre 160-180 °C, conforme a sua massa

molar. O copolímero P(3HB-co-3HV) apresenta temperatura de fusão mais baixa que o homopolímero, mas esta é influenciada pelo teor de HV na molécula. A temperatura de fusão decresce com o aumento da fração de 3HV, podendo alcançar até 80 °C, sem afetar a temperatura de degradação. As temperaturas de transição vítrea do P(3HB) e P(3HB-co-3HV) ocorrem na faixa de -5 a 20 °C e parecem ser independentes da composição do copolímero (POUTON & AKHTAR, 1996).

As curvas DSC das matérias-primas puras e microesferas estão apresentadas nas Figuras 16 a 19. Os parâmetros termoanalíticos obtidos após a análise por DSC encontram-se sumarizados na Tabela 10. O P(3HB) e P(3HB-co-3HV) puros exibiram eventos endotérmicos referentes à fusão do polímero em 172,98 e 153,61 °C e entalpia de fusão de 67,27 e 33,16 J/g respectivamente (Figura 16B e 16C). Estes resultados corroboram com a cristalinidade do P(3HB) ser mais alta que o seu copolímero P(3HB-co-3HV). Em relação aos polímeros utilizados na microesferas, PHB, PHBV e PHBr, o aumento da concentração de acetato de celulose resulta na redução da temperatura de fusão da microesfera, e em alguns casos o evento da fusão não é definido, este fato esta associado a interação entre os dois polímeros na formulação. O polímero P(3HB)_R apresentou um evento endotérmico em temperatura menor que o material de partida P(3HB), em 165,02°C e 172,98°C respectivamente um segundo pico de foi observado, decorrente, provavelmente, de um processo de fusão/recristalização ocorrido durante a análise de DSC (YOSHIE et al., 2000). Podemos concluir que a redução da massa molar do polímero afeta a mobilidade da cadeia polimérica diminuindo o seu ponto de fusão e a entalpia de fusão. Quando as microesferas de P(3HB), P(3HB-co-3HV) e P(3HB)r foram analisadas, a adição de AC numa proporção de 50:50 provocou uma redução na temperatura de fusão do PHA, sugerindo a interação entre os dois polímeros da formulação (Figura 17C, 18C, 19C). Os resultados demonstrados na Tabela 10 indicam que tanto o P(3HB) e P(3HB)r como seu copolímero P(3HB-co-3HV) formam blendas miscíveis com o acetato de celulose (QUENTAL et al., 2010).

O naproxeno exibiu um evento endotérmico a 156,06 °C correspondendo à fusão do fármaco, estando este resultado em concordância com a literatura (Figura 16A) (SONG; SOHN, 2011). Nas microesferas contendo o fármaco, o pico de fusão do naproxeno não pode ser visualizado, sugerindo que o fármaco possa encontrar-se molecularmente na matriz polimérica (Figuras 17, 18 e 19, curvas DSC

de D a F). Por outro lado, quando as curvas de DSC das microesferas com e sem o fármaco preparadas com a blenda PHA e AC são comparadas nas proporções 50:50, pode-se observar que a redução da temperatura de fusão do respectivo PHA é maior. Assim, pode-se sugerir que quando submetido a variações de temperatura o fármaco interage com o polímero reduzindo sua temperatura de fusão.

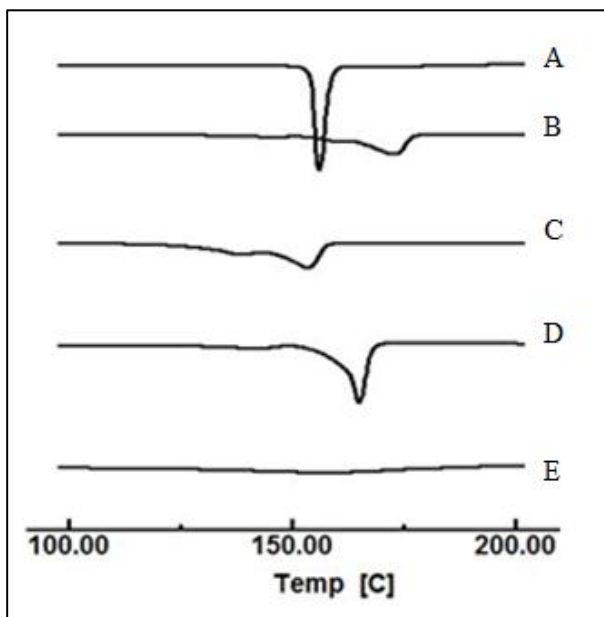


Figura 16. Curvas DSC obtidas a partir das matérias primas. Em (A) NPX; (B) P(3HB); (C) P(3HB-co-3HV); (D) P(3HB)r e (E) AC.

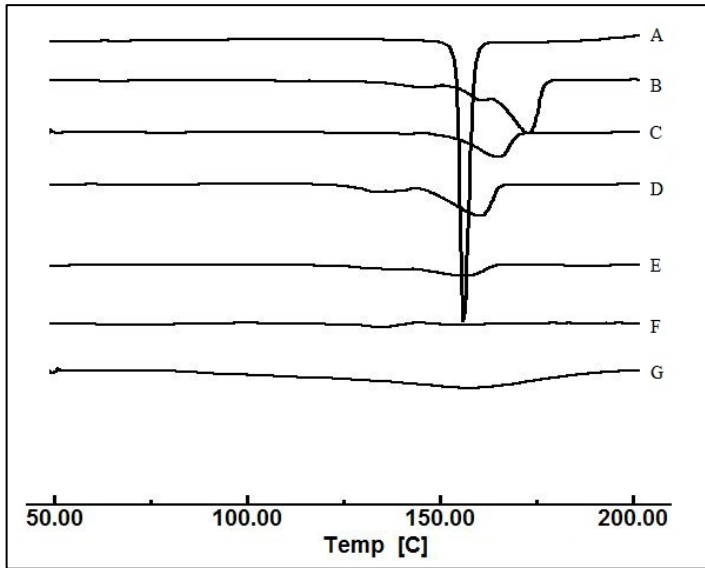


Figura 17. Curvas DSC obtidas a partir das microesferas e matérias primas. Em (A) NPX; (B) P(3HB); (C) PHB:AC_{50:50} sem fármaco; (D) PHB₁₀₀; (E) PHB:AC_{50:50}; (F) AC₁₀₀ e (G) AC

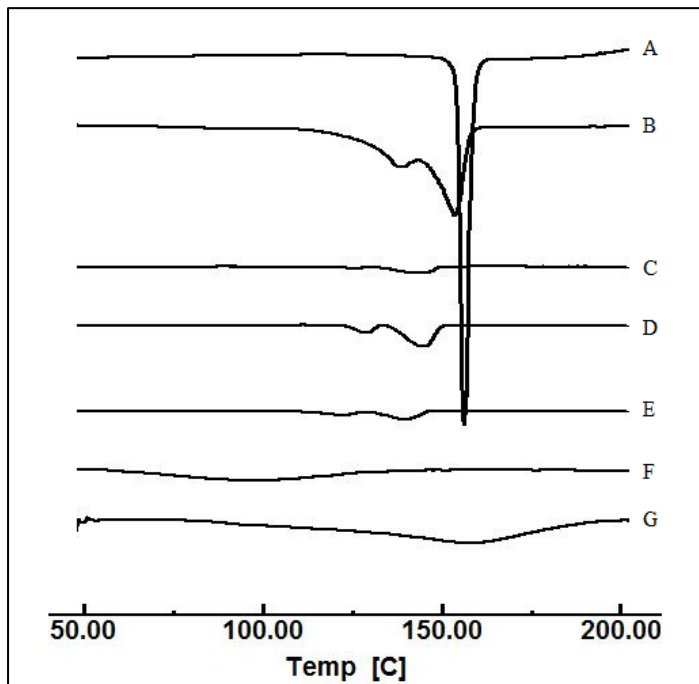


Figura 18. Curvas DSC obtidas a partir das microesferas e matérias primas. Em (A) NPX; (B) P(3HB-co-3HV); (C) PHBV:AC_{50:50} sem fármaco; (D) PHBV₁₀₀; (E) PHBV:AC_{50:50}; (F) AC₁₀₀ e (G) AC

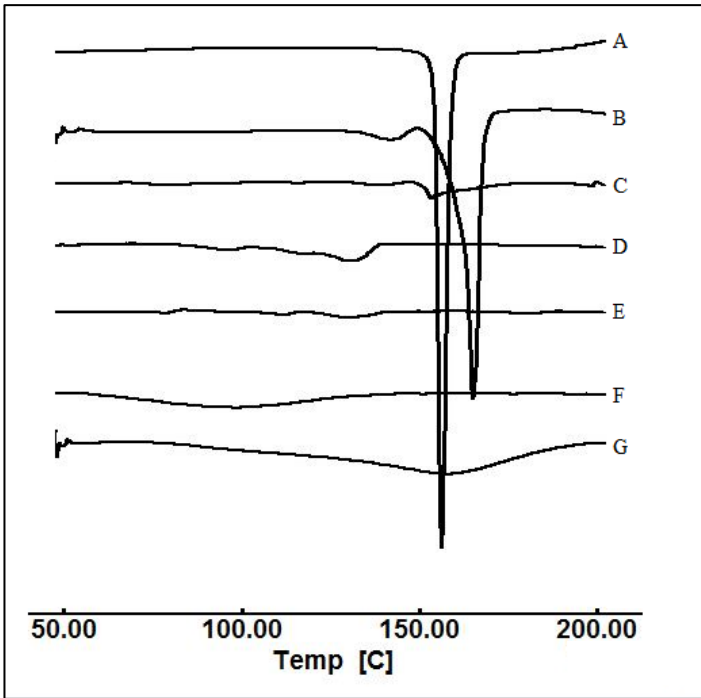


Figura 19. Curvas DSC obtidas a partir das microesferas e matérias primas. Em (A) NPX; (B) P(3HB)r; (C) PHBr:AC_{50:50} sem fármaco; (D) PHBr₁₀₀; (E) PHBr:AC_{50:50}; (F) AC₁₀₀ e (G) AC

Tabela 10. Resultados da análise por calorimetria exploratória diferencial.

	Formulações	T_f (°C)	ΔH_{exp} (J/g)
Matéria prima	NPX	156,06	139,64
	P(3HB)	172,98	67,27
	P(3HB-co-3HV)	153,61	33,16
	P(3HB)r	165,02	92,11
	AC	-	-
Microesferas brancas	PHB:AC _{50:50}	165,07	36,92
	PHBV:AC _{50:50}	143,42	6,98
	PHBr:AC _{50:50}	153,62	6,57
Microesferas com NPX	PHB ₁₀₀	162,85	59,74
	PHB:AC _{50:50}	154,34	36,92
	PHBV ₁₀₀	144,66	17,15
	PHBV:AC _{50:50}	139,89	7,10
	PHBr ₁₀₀	130,91	7,51
	PHBr:AC _{50:50}	129,09	7,82
	AC ₁₀₀	-	-

4.2.4 Difração de raios-X

No desenvolvimento farmacêutico, a difração de raios-x é uma técnica útil que permite avaliar a cristalinidade dos materiais, as quais estão estreitamente relacionadas à liberação do fármaco e degradação da matriz polimérica. Os difratogramas obtidos para os componentes puros e as microesferas contendo naproxeno encontram-se demonstrados nas Figuras 20, 21 e 22.

O difratogramas obtido após a análise do naproxeno puro é típico de uma estrutura cristalina apresentando picos de difração característicos em 2θ igual a $6,5^\circ$, $12,4^\circ$, $16,6^\circ$, $19,0^\circ$, $20,0^\circ$, $22,5^\circ$, $24,0^\circ$ e $28,5^\circ$ (JAVADZADEH et al., 2010) (Figura 20(F), 21(F) e 22(F)). Tem sido relatado que o naproxeno apresenta polimorfismo e sua estrutura cristalográfica é descrita como monoclinica (SONG; SOHN, 2011).

Picos de difração característicos da estrutura cristalina dos PHAs (GALEGO et al., 2000) podem ser observados nos difratogramas

obtidos a partir dos polímeros P(3HB), P(3HB-co-3HV) e P(3HB)r puros em 2θ de $13,5^\circ$, $16,9^\circ$, $21,7^\circ$, $21,8^\circ$, $22,6^\circ$ e $25,6^\circ$ nas Figuras 20(A), 21(A) e 22(A), respectivamente. A natureza amorfa do acetato de celulose pode ser visualizada no difratograma obtido a partir deste polímero (Figura 19(E), 20(E) e 21(E)).

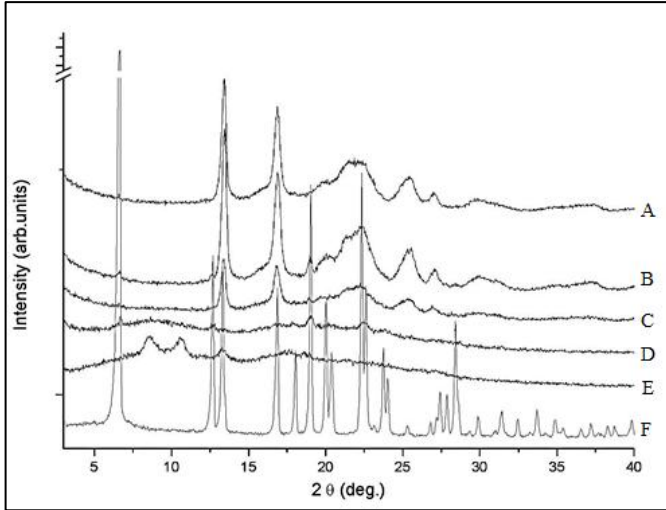


Figura 20. Difratogramas obtidos a partir das microesferas e das matérias primas. Em (A) P(3HB); (B) PHB₁₀₀; (C) PHB:AC_{50:50}; (D) AC₁₀₀; (E) Acetato de celulose e (F) NPX.

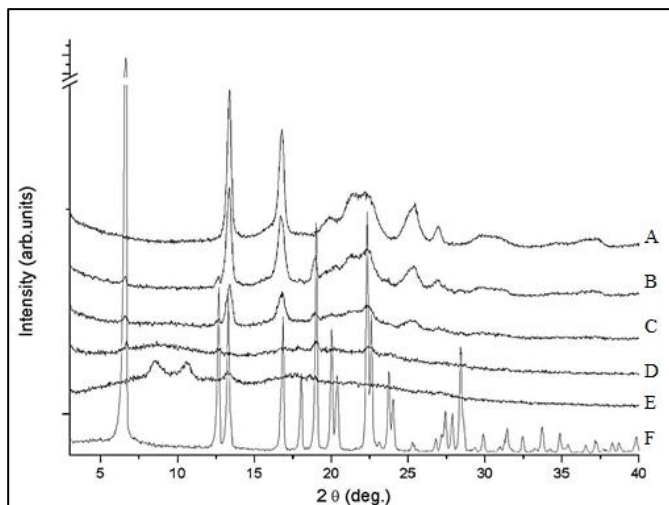


Figura 21. Difratoqramas obtidos a partir das microesferas e matérias primas. Em (A) P(3HB-co-3HV); (B) PHBV₁₀₀; (C) PHBV:AC_{50:50}; (D) AC₁₀₀; (E) Acetado de celulose e (F) NPX.

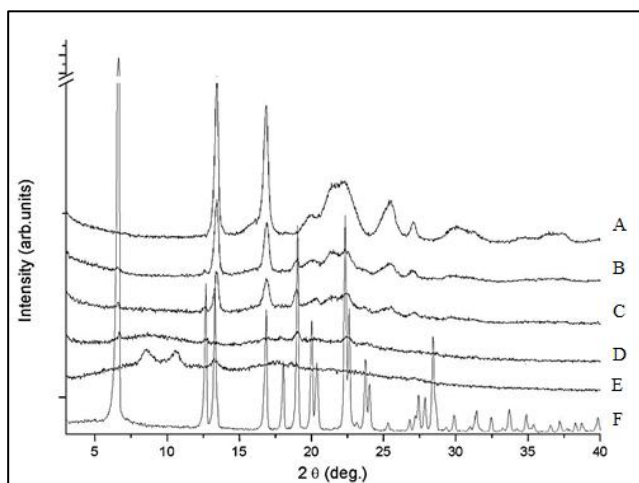


Figura 22. Difratoqramas obtidos a partir das microesferas e matérias primas. Em (A) P(3HB)r; (B) PHBr₁₀₀; (C) PHBr:AC_{50:50}; (D) AC₁₀₀; (E) Acetado de celulose e (F) NPX.

Nos difratogramas formulações somente alguns picos do fármaco podem ser visualizados e em uma intensidade bastante reduzida. Isso ocorre devido ao efeito de diluição do fármaco nas amostras. Pode-se sugerir a partir destes resultados que apenas uma pequena fração da porção cristalina das amostras é de naproxeno na sua forma cristalina original e no caso do DSC esta quantidade foi tão pequena que estava abaixo da sensibilidade do aparelho. Entretanto, as mudanças substanciais nas intensidades relativas, como o pico em $18,6^\circ$ se torna o mais intenso, na largura e posição dos picos de Bragg do fármaco, quando diluído nas formulações, são suficientes atestar mudanças significativas na microestrutura do fármaco, incluindo o tamanho médio dos cristalitos (domínios cristalinos), desordem e na orientação preferencial.

As intensidades dos picos de difração do P(3HB), P(3HB-co-HV) e P(3HB)r aparecem bastante reduzidas nos respectivos difratogramas a partir das microesferas indicando uma possível redução na cristalinidade da matriz. Este resultado está de acordo com aqueles verificados na análise por DSC, confirmando que com a adição de acetato de celulose nas microesferas, há uma alteração significativa na matriz polimérica da partícula. Os resultados de DRX também sugerem que a técnica de redução da massa molar do P(3HB) não afeta as características estruturais do polímero. Entretanto alguns resultados apontam alterações na microestrutura do polímero P(3HB)r em função da redução da massa molar. A maior intensidade nas reflexões de Bragg do P(3HB)r sugere maior coerência entre as ondas refletidos pelo domínio cristalinos presentes, e, portanto, uma microestrutura mais ordenada nessa amostra (Figura 23). Este comportamento pode estar atribuído a uma organização da microestrutura durante a reação de redução ou até mesmo no momento de secagem por estufa de convecção forçada a 60°C .

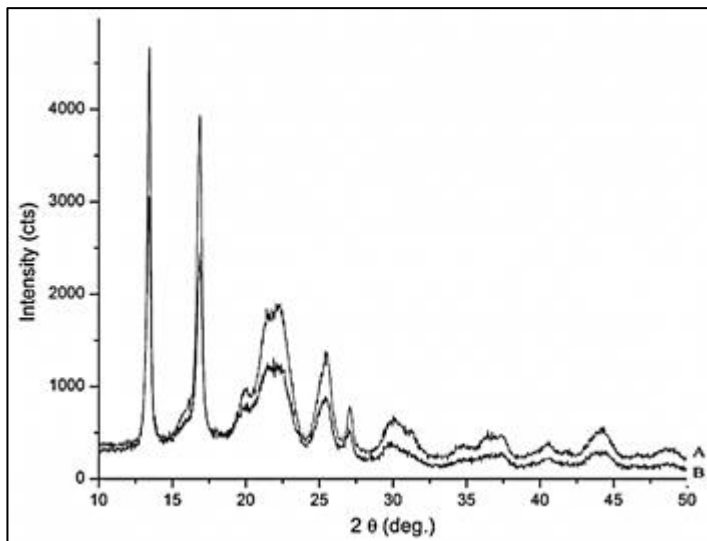


Figura 23. Difratomogramas obtidos a partir das matérias primas. Em (A) P(3HB)r e (B) P(3HB).

4.2.5 Espectroscopia de Infravermelho

A técnica de espectroscopia no infravermelho foi utilizada para caracterizar as microesferas e verificar as possíveis interações entre os componentes das formulações (Figuras 24 a 26). Como pode ser observado, o NPX possui picos característicos em 1629 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=O; em 1369 cm^{-1} , o estiramento da ligação CH_3 ; em 1172 cm^{-1} , estiramento da ligação C-O do agrupamento ácido, e em torno de 3441 cm^{-1} , os estiramentos das ligações C-H do anel aromático. Os PHAs possuem bandas características em torno de 3430 cm^{-1} referente aos estiramentos assimétricos do grupo metila e em 1730 cm^{-1} , referente da ligação C=O. O acetato de celulose apresenta em 1732 cm^{-1} banda referente a ligação C=O, e em 2983 e 2934 cm^{-1} estão situados os estiramentos assimétricos dos grupos CH_3 e CH_2 respectivamente.

Pode-se observar a interação do naproxeno com o polímero nas amostras de PHB_{100} pelo deslocamento da banda C=O do P(3HB) puro em 1732 cm^{-1} para 1726 cm^{-1} na microesfera (Figura 24(B)). Além disso, há um alargamento da banda em 3412 cm^{-1} quando comparado

com o espectro do naproxeno puro. As matérias primas de P(3HV-co-3HV) e P(3HB)r apresentam um ombro na banda do agrupamento C=O; sugere-se que esta banda seja a deformação simétrica do tipo “umbrela” do agrupamento CH₃. Como esta banda está muito próxima à banda da ligação C=O do naproxeno, a interação não pode ser vista claramente (Figuras 254(B) e 26(B)).

Nas microesferas preparadas a partir das blendas com AC, a presença de interação dos polímeros com o fármaco não pode ser visualizada devido a sobreposição das bandas.

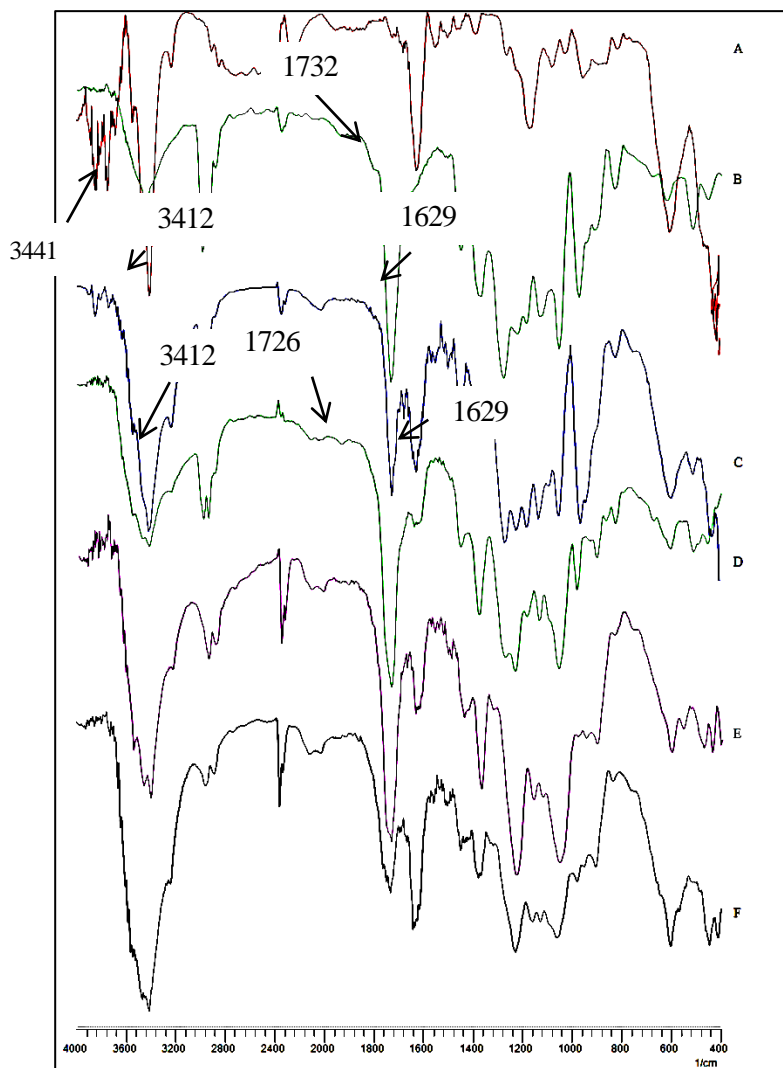


Figura 24. Espectro de infravermelho de (A) NPX, (B) P(3HB), (C) PHB₁₀₀, (D) PHB:AC_{50:50}, (E) AC₁₀₀ e (F) AC.

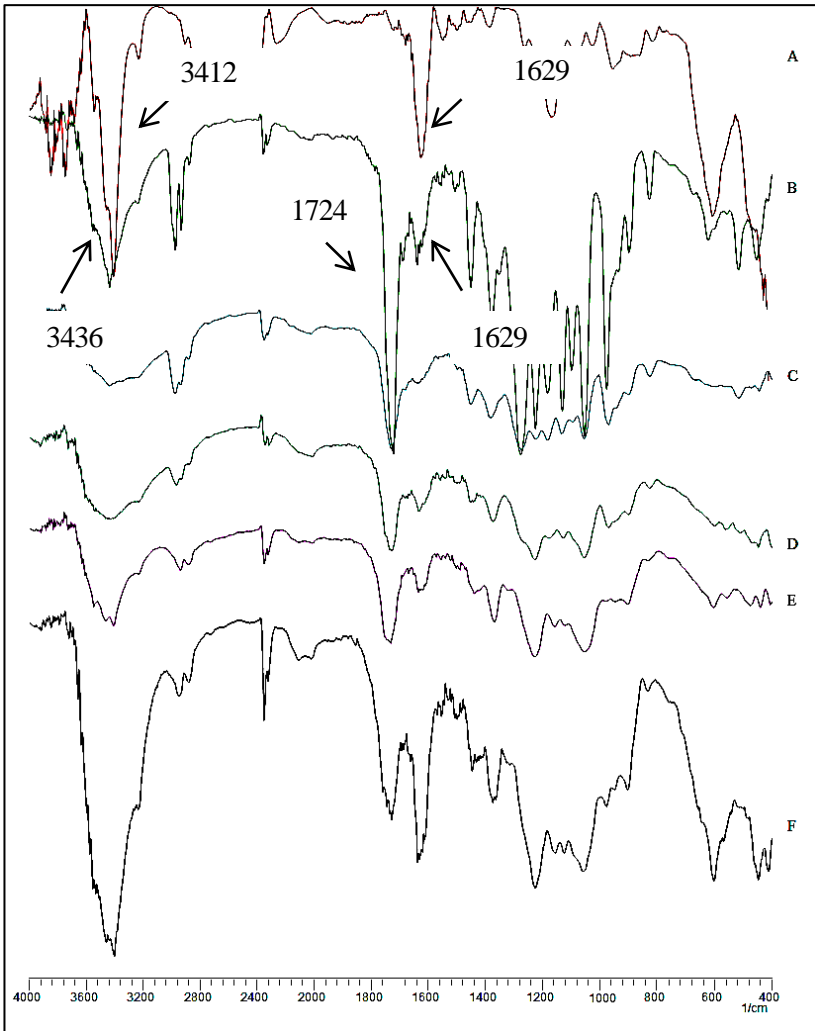


Figura 25. Espectro de infravermelho de (A) NPX, (B) P(3HB-co-3HV), (C) PHBV100, (D) PHBV:AC50:50, (E) AC100 e (F) AC.

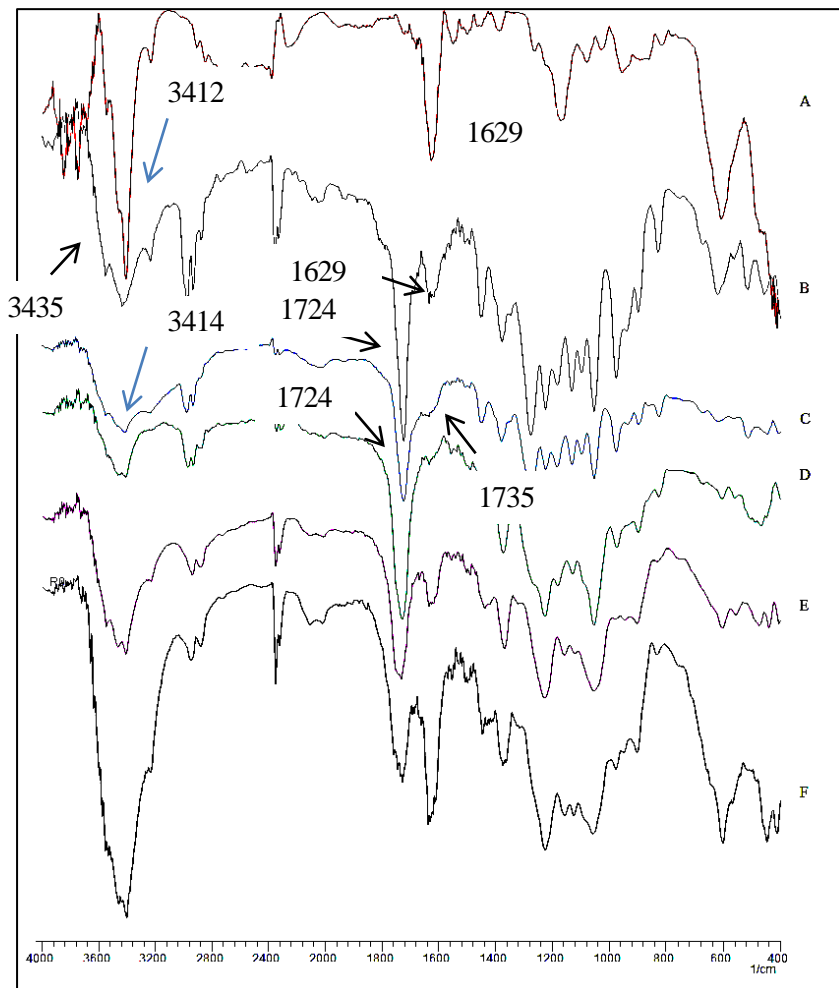


Figura 26. Espectro de infravermelho de (A) NPX, (B) P(3HB)r, (C) PHBr₁₀₀, (D) PHBr:AC_{50:50}, (E) AC₁₀₀ e (F) AC.

4.3 DESENVOLVIMENTO DOS GÉIS CONTENDO AS MICROESFERAS

4.3.1 Preparação de um gel hidrofílico contendo as microesferas

Sistemas de liberação de fármaco intraperiodontal híbridos combinam as propriedades de mais de uma classe de dispositivos em um único sistema. Geralmente, micropartículas poliméricas são incorporadas a hidrogéis que favorecem a retenção da formulação no local de aplicação, permitindo ainda, o maior controle da liberação do fármaco (BRUSCHI et al., 2006). Para administração periodontal em que a formulação é injetada, sistemas formadores de géis *in situ* são preferíveis, principalmente os sistemas termossensíveis.

Os copolímeros em bloco de óxido de etileno e de óxido de propileno (PEO-PPO-PEO), também conhecidos como poloxamers, têm sido frequentemente estudados em aplicações farmacêuticas, como excipientes para a liberação de fármacos na região oral, parenteral, retal, ocular e tópica, em função da baixa toxicidade e disponibilidade comercial (SCHERLUND et al., 2000). Estes materiais constituem uma classe de copolímeros tribloco, formados de blocos de óxido de etileno e de óxido de propileno, apresentando a estrutura geral $EO_x-PO_y-EO_x$. O poloxamer 407 é frequentemente empregado como agente gelificante para administração periodontal, por apresentar propriedades termoreversíveis, em que a transição do estado sol-gel é dependente da temperatura. Abaixo da temperatura crítica, a solução de poloxamer 407 apresenta-se no estado fluido e, acima desta temperatura, ele torna-se semissólido. A termogelação é resultante das interações entre os diferentes segmentos do copolímero. À medida que a temperatura aumenta, o poloxamer 407 agrega-se em micelas devido à desidratação do bloco hidrofóbico de PO, a qual é seguida pela gelação para amostras suficientemente concentradas (DUMORTIER et al., 2006). Assim, na temperatura ambiente o poloxamer 407 apresenta-se na forma líquida e, na temperatura corporal após administração, ele torna-se um gel semissólido.

Partículas poliméricas de copolímeros do ácido láctico e ácido glicólico, de aproximadamente 0,2 mm de diâmetro, foram preparadas para liberação de tetraciclina intrabolsa periodontal. Microcápsulas contendo tetraciclina foram suspensas em um gel termosensível de poloxamer 407, que gelifica na temperatura de 37°C, retendo, assim, as micropartículas na bolsa durante o período de tratamento. Em animais, foi observado que o sistema manteve a concentração de tetraciclina no fluido crevicular gengival por 3 a 4 dias (VANDEKERCKHOVE et al., 1998).

Assim, visando obter uma formulação adequada à administração periodontal, neste trabalho foram preparados e

caracterizados géis a partir de poloxamer 407. Como esperado, as amostras apresentaram-se líquidas à temperatura de 25 °C e viscosas na temperatura de 37 °C (Figura 27). Os géis contendo formulação incorporada apresentaram-se homogêneos e, quando em repouso, não foi observado a sedimentação de microesferas nas duas temperaturas estudadas.

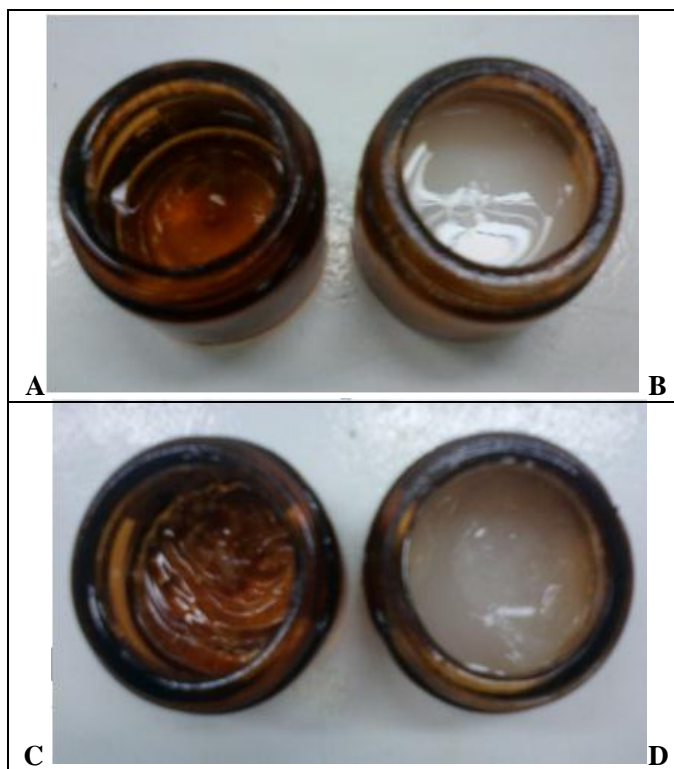


Figura 27. Fotos dos géis, em (A) gel de poloxamer sem formulação a 25 °C, (B) gel de poloxamer com formulação PHB:AC_{50:50} incorporada a 25 °C, (C) gel de poloxamer sem formulação a 37 °C, (D) gel de poloxamer com formulação PHB:AC_{50:50} incorporada a 37 °C.

4.3.2 Caracterização das propriedades reológicas do gel

A partir dos géis preparados, foram analisados os parâmetros reológicos: a viscosidade aparente (viscosidade em uma determinada taxa de deformação) e foram aplicados 3 modelos matemáticos: Lei das Potências para valores indicativos de índice de fluxo, Herschel Bulkley para valores indicativos de ponto de ruptura e Bingham para valores indicativos de viscosidade plástica utilizando o software RheoWin Data Manager (Tabela 11). O grau de tixotropia dos géis também foi avaliado. A Tabela 12 mostra os resultados dos parâmetros reológicos estudados onde, GB é o gel branco e GM é o gel com as microesferas PHB:AC_{50:50} incorporada.

Tabela 11. Modelos matemáticos aplicados aos diferentes géis desenvolvidos.

Modelo	Equação
Lei das Potencias	$\tau = k\dot{\gamma}^n$
Herschel-Bulkley	$\tau = \tau_0 + k\dot{\gamma}^n$
Bingham	$\tau = \tau_y + \eta_p \dot{\gamma}$

Tabela 12. Dados e modelos matemáticos aplicados aos diferentes géis desenvolvidos.

		Tixotropia	Lei das Potencias	Herschel-Bulkley	Bingham
	Viscosidade aparente (mPa.s)	Diferença (Pa/s)	Índice de Fluxo b	Ponto de ruptura τ_0	τ_0
GB 25 °C	3398,0	793,7	0,1202	220,5	261,0
GB 37 °C	3528,0	759,3	0,07956	273,4	303,3
GM 25 °C	6583,0	719,0	0,1519	245,5	475,0
GM 37 °C	7668,0	778,5	0,1646	320,3	552,3

Os comportamentos reológicos podem ser classificados de acordo com a resposta à tensão ou pressão de cisalhamento imposta, em Newtonianos e não-Newtonianos. Neste trabalho, as amostras apresentaram comportamento não Newtoniano, uma vez que a resposta entre a tensão de cisalhamento imposta e a velocidade de deformação observada não foi constante, ou seja, a viscosidade foi dependente da taxa de cisalhamento. Pode-se observar que a viscosidade aparente das amostras aumenta em função da temperatura, em uma proporção maior quando há incorporado a este gel as microesferas, uma vez que o Poloxamer é mais viscoso à temperatura de 37 °C.

O poloxamer 407 possui baixa toxicidade e é biocompatível com as células e fluídos corporais. Este surfactante hidrofílico apresenta um comportamento gelificante termorreversível, que pode ser administrado como líquido frio através de uma seringa e após a administração forma um gel *in situ*. A transição sol-gel ocorre porque em solução aquosa o aumento da temperatura faz com que ocorra uma desidratação na parte hidrofóbica da molécula, as moléculas do poloxamer 407 então se agregam em micelas esféricas de superfície hidrofílica (ESPOSITO et al., 1996).

Os géis, cujos reogramas estão ilustrados na Figura 28, apresentaram comportamento tixotrópico, isto é, apresentam viscosidade dependente do tempo. Além disso, este comportamento reológico é típico de materiais os quais são capazes de retornar à estrutura anterior. Este aspecto é importante, pois está associado a menos alteração da viscosidade durante o transporte, armazenamento ou manuseio, aumentando desta forma a estabilidade. Os valores de tixotropia (Tabela 12) foram considerados médios, o que implica em um produto que escorre facilmente durante a aplicação apresentando boa característica de espalhabilidade (AULTON, 2005).

O modelo da Lei das potências fornece o Índice de Fluxo, que é a medida da dependência da viscosidade da taxa de cisalhamento. Todas as amostras apresentaram caráter pseudoplástico, uma vez que o índice de fluxo apresentou, em todas as amostras, valor menor que 1 (AULTON, 2005).

O Ponto de ruptura, que é definido como a tensão necessária para que o material comece a escoar e deformar plasticamente, está apresentado na Tabela 11, e foi calculado pelos modelos de Herschel-Bulkley e Bingham. Os valores observados indicam que as amostras a 37 °C apresentam uma tensão mínima maior para o início do fluxo viscoso em comparação com as amostras a 25 °C.

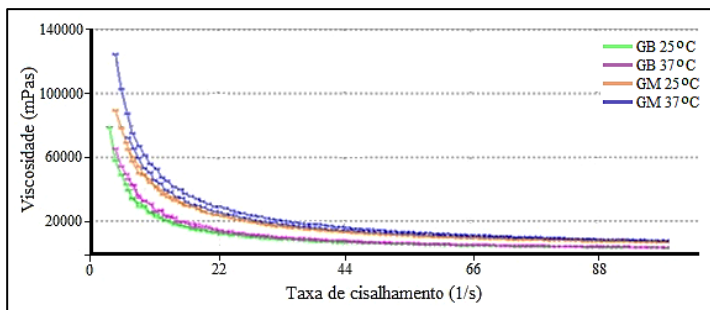


Figura 28. Perfil de escoamento do gel branco (sem formulação incorporada) e gel com as microesferas de PHB:AC_{50:50} dispersas a temperatura de 25 e 37°C.

4.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VIVO* DO NAPROXENO A PARTIR DAS MICROESFERAS

4.4.1 Curva de calibração do naproxeno em fluido salivar simulado (FSS)

A Figura 29 mostra a curva de calibração do naproxeno em fluido salivar simulado. A curva foi linear para a faixa de concentração estudada de 5 a 40 µg/mL com um coeficiente de correlação de 0,9982 e equação da reta $y = 0,0219x + 0,0012$. A análise de variância confirmou a linearidade do método ($F_{\text{calculado}} 21,135 > F_{\text{crítico}} 4,600, \alpha = 0,05$). O limite de detecção e de quantificação foram $0,19 \pm 0,02$ e $0,59 \pm 0,04$ µg/mL, respectivamente, indicando que o método foi suficientemente sensível para determinar o teor de naproxeno no meio de liberação.

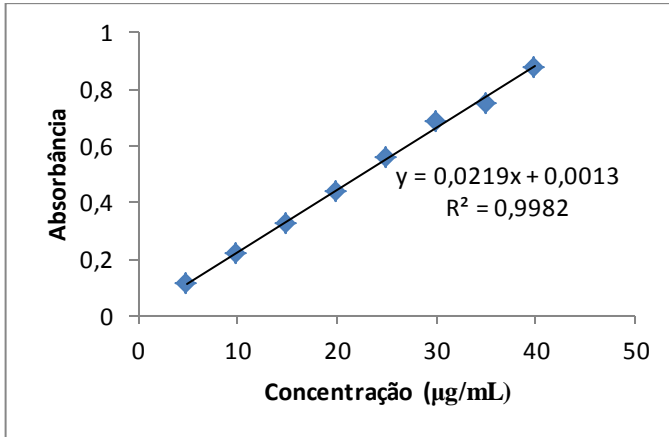


Figura 29. Curva de calibração de naproxeno no meio fluido salivar simulado (FSS).

4.4.2 Avaliação da solubilidade e estabilidade do naproxeno em fluido salivar simulado

Estudos de liberação de fármacos a partir de sistemas de liberação requerem a utilização de condições *sink*, a qual é definida como uma situação de diluição infinita, onde não ocorre a saturação no meio. De acordo com algumas referências, a concentração do fármaco no meio de dissolução não deve exceder de 15 a 20% da sua concentração na saturação. A ausência de condições *sink* pode resultar em cinéticas de liberação imprevisíveis e supressão dos perfis de liberação (AMIDON et al., 1995). Assim para garantir que o ensaio de liberação do naproxeno respeitasse as condições *sink*, a solubilidade do fármaco foi determinada conforme escrito em 3.2.5.3 e foi igual a $892,03 \pm 1,09 \mu\text{g/mL}$. A partir deste dado, a quantidade de microsferas para 300 mL de meio de liberação foi estimada de modo a não ultrapassar a concentração correspondente a 20% da concentração de saturação, ou seja, $178,41 \mu\text{g/mL}$.

Para a obtenção de resultados confiáveis, o fármaco deve permanecer estável no meio de liberação durante o período de ensaio. Assim, para avaliar a estabilidade do fármaco, uma solução contendo $20 \mu\text{g/mL}$ de naproxeno em meio fluido salivar simulado (FSS) foi mantida em agitação magnética à temperatura ambiente por 36 horas. Os espectros de varredura no UV do NPX em FSS, obtidos no tempo 0 e

após 36 horas, foram perfeitamente sobreponíveis, indicando que não houve alterações no fármaco que comprometesse os estudos de liberação (dados não mostrados).

4.4.3 Avaliação do perfil de liberação do naproxeno em meio de fluido salivar simulado (FSS)

Os perfis de liberação do NPX a partir das formulações dos hidrogéis de poloxamer 407 contendo as microesferas de P(3HB), P(3HB)-co-P(3HV) e P(3HB)_r, assim como de suas blendas com AC podem ser visualizados nas Figuras 30, 31 e 32, respectivamente. Igualmente, perfis obtidos a partir do hidrogel sem a encapsulação nas microesferas e de uma solução do fármaco livre, podem ser observados nessas Figuras. Os parâmetros que caracterizam os perfis de liberação, os quais são o tempo para que ocorra 50% de liberação do fármaco ($t_{50\%}$), área sobre a curva (ASC) e percentual de NPX liberado após 36 horas, encontram-se sumarizados na tabela 13.

Como pode ser observado, todas as formulações foram capazes de retardar a liberação do fármaco, visto que, quando a solução do fármaco livre foi testada (NPX/PEG), cerca de 70 a 80% do fármaco foi transferido para o meio nas primeiras horas, sendo a velocidade governada apenas pelo processo de difusão através do saco de diálise. Igualmente, a encapsulação do fármaco nas microesferas mostrou ser efetiva no retardo da liberação. Quando o hidrogel de poloxamer 407 contendo o fármaco não encapsulado foi testado, o valor de $t_{50\%}$ foi menor, quando comparado com o valores obtidos para as formulações contendo as microesferas. Quando os perfis de liberação obtidos a partir dos hidrogéis contendo as microesferas são comparados, pode-se observar que a liberação foi afetada pela presença de AC na blenda, sendo que a mais rápida liberação ocorreu quando as microesferas foram preparadas unicamente com este polímero.

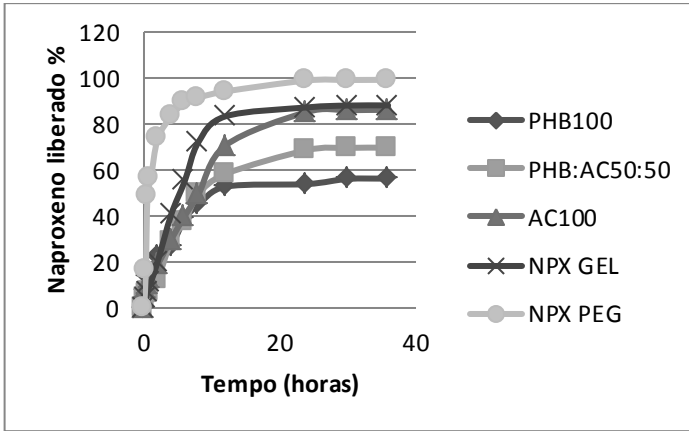


Figura 30. Perfis de liberação de naproxeno obtido a partir de microesferas preparadas usando PHB/Acetato de celulose.

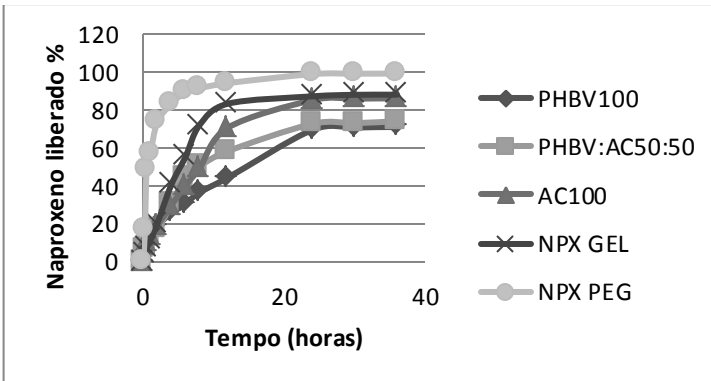


Figura 31. Perfis de liberação de naproxeno obtido a partir de microesferas preparadas usando PHBV/Acetato de celulose.

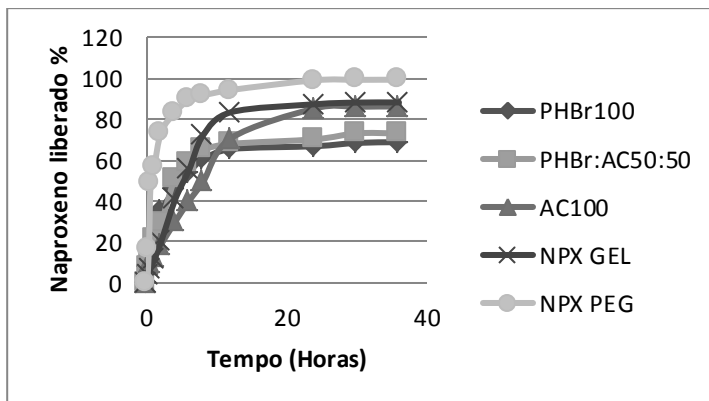


Figura 32. Perfis de liberação de naproxeno obtido a partir de microesferas preparadas usando PHBr/Acetato de celulose.

Tabela 13. Percentagem de liberação do naproxeno a partir das formulações após 36 horas de ensaio.

	$t_{50\%}$ (h) média (DP)	ASC média (DP)	NPX liberado após 36 h (%) Média (DP)
PHB ₁₀₀	8,94 (0,47)	1387,58 (12,27)	56,30 (1,55)
PHB/AC _{50:50}	8,08 (0,25)	1600,24 (11,38)	69,78 (0,96)
PHBV ₁₀₀	10,91 (0,26)	1882,69 (9,88)	71,17 (1,63)
PHBV/AC _{50:50}	7,92 (0,21)	2122,14 (16,43)	74,18 (0,71)
PHBr ₁₀₀	6,61 (0,37)	1785,23 (5,51)	68,79 (0,87)
PHBr/AC _{50:50}	6,15 (1,69)	1850,42 (36,95)	73,09 (3,27)
AC ₁₀₀	8,09 (0,21)	1985,81 (13,64)	86,27 (0,42)
Fármaco livre	4,36 (0,25)	nd	99,31 (0,85)
Hidrogel branco	5,54 (0,27)	nd	88,17 (0,87)

n.d.: não determinado

A comparação estatística dos perfis de liberação foi realizada pela ANOVA, empregando-se como variáveis dependentes, o tempo para que ocorram 50% da liberação do fármaco ($t_{50\%}$) e a área sob a curva (ASC) obtida até 30 horas de ensaio (Tabela 14 e 15, respectivamente). A comparação entre os valores médios de $t_{50\%}$ e ASC foi realizada mediante aplicação do teste de Tukey. O valor de diferença mínima significativa entre duas médias foi calculado empregando a equação descrita no item 3.2.6.

Tabela 14. Análise da variância referente aos valores de $t_{50\%}$

Origem de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F _{crítico}
Tipo do PHA	28,8163	2	14,4081	212,8057	3,8853
Concentração do PHA	9,3169	2	4,6585	68,8048	3,8853
Tipo do PHA + Concentração do PHA	5,9204	4	1,4801	21,8607	3,2592
Dentro de grupos	0,8125	12	0,0677		
Total	44,866	20	2,2433		

Tabela 15. Análise de variância referente ASC.

Origem de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F _{crítico}
Tipo do PHA	436.304,143	2	218.152,0715	38,4121	3,8853
Concentração do PHA	276.058,1408	2	138.029,0704	24,3041	3,8853
Tipo do PHA + Concentração do PHA	389.919,994	4	97.479,9985	17,1642	3,2592
Dentro de grupos	68.151,1298	12	5.679,2608		
Total	1.170.433,4075	20	58.521,6704		

A análise da variância demonstrou que os valores de $t_{50\%}$ e de ASC foram significativamente afetados pelo tipo de PHA e pela adição de AC para formação da blenda, visto que para ambos os fatores o valores de F_{cal} foram maiores que de $F_{crítico}$, para um nível de significância de 5% (Tabelas 14 e 15). Os valores de d.m.s obtidos após a aplicação do teste de Tukey foram 0,3556 e 102,99, para os valores de $t_{50\%}$ e de ASC, respectivamente ($\alpha = 0,05$). Quando estes valores de d.m.s. são usados para comparar os valores de diferença entre as médias do $t_{50\%}$, pode-se concluir que não houve variação significativa na formulação PHB:AC_{50:50} quando comparadas com as formulações de PHBV:AC_{50:50} e AC₁₀₀. Este mesmo fato ocorreu na comparação entre as formulações de PHBV:AC_{50:50} e AC₁₀₀ (Tabela 16). Os valores de d.m.s. foram comparados para as médias da ASC e estão demonstrados na Tabela 17. Não houve diferença mínima significativa para as formulações de PHBV₁₀₀ quando comparadas com as formulações de PHBr:AC nas proporções 100:0 e 50:50 e entre as formulações PHBr₁₀₀ e PHBr:AC_{50:50}.

Tabela 16. Valores de diferença entre as médias de $t_{50\%}$

Formulações			PHB:AC		PHBV:AC		PHBr:AC		AC
			100:0	50:50	100:0	50:50	100:0	50:50	0:100
			8,94	8,08	10,91	7,92	6,61	6,15	8,09
PHB: AC	100:0	8,94	-	0,86	1,97	1,02	2,33	2,79	0,85
	50:50	8,08		-	2,83	0,16*	1,47	1,93	0,01*
PHBV :AC	100:0	10,91			-	2,99	4,30	4,76	2,82
	50:50	7,92				-	1,31	1,77	0,17*
PHBr: AC	100:0	6,61					-	0,46	1,48
	50:50	6,15						-	1,94
AC	0:100	8,09							-

Tabela 17. Valores de diferença entre as médias da ASC de NPX após 36 horas de ensaio de liberação.

Formulações		PHB:AC		PHBV:AC		PHBr:AC		AC		
		100:0	50:50	100:0	50:50	100:0	50:50	0:100		
PHB:AC	100:0	1387,58	-	1387,59	1600,24	1882,69	2122,14	1785,42	1850,42	1985,81
	50:50	1600,24	-	212,66	495,11	734,56	397,65	462,84	598,23	
PHBV: AC	100:0	1882,69	-	-	239,45	92,27*	32,27*	103,12		
	50:50	2122,14	-	-	-	336,74	271,72	136,33		
PHBr: AC	100:0	1785,23	-	-	-	-	65,19*	200,58		
	50:50	1850,42	-	-	-	-	-	135,39		
AC	0:100	1985,81	-	-	-	-	-	-		

Os principais mecanismos que governam a liberação de um fármaco a partir de um sistema de liberação são a difusão do fármaco e a erosão do sistema. Na prática, o perfil de liberação é resultante da combinação desses dois mecanismos, podendo ser usados para descrever a estrutura do sistema e a conduta da formulação. A velocidade de liberação pode ser afetada por diversos fatores que envolvem as características físicoquímicas da matriz polimérica, assim como as propriedades do fármaco e polímero (ZHU & FREIBERG, 2004). A compatibilidade entre polímeros, levando à formação de uma matriz polimérica homogênea e com estrutura mais amorfa, pode levar ao maior controle da liberação do fármaco em comparação com polímeros cristalinos. Outro fator importante que afeta a liberação refere-se ao tamanho das partículas. De modo geral, quanto menor o tamanho, menor é a rota difusional para que ocorra transferência do fármaco do interior da partícula para o meio e, portanto, mais rápida é a liberação (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008). Este fator pode ter contribuído para os resultados obtidos neste trabalho, pois tanto as micropartículas preparadas a partir da blenda como aquela com o P(3HB)r de massa molar reduzida exibiram menores tamanhos, quando comparado às partículas obtidas de P(3HB), unicamente.

No desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, a aplicação de modelos matemáticos representa uma importante ferramenta para o entendimento dos mecanismos envolvidos, além de fornecer dados que podem ser usados para simular o efeito dos parâmetros estudados sobre a cinética de liberação. Os mecanismos mais descritos incluem a difusão fickniana, intumescimento e erosão/degradação da matriz polimérica. Considerando que os polímeros das microesferas são hidrofóbicos, não há erosão/degradação da matriz e, desta maneira, os modelos de Higuchi e Korsmeyer-Peppas foram aplicados. Para efeito de comparação os modelos de ordem zero e primeira ordem também foram aplicados (Tabela 18).

Tabela 18. Modelos matemáticos aplicados aos hidrogéis contendo as microesferas.

Modelo	Equação
Zero Ordem	$F=k_0t$
Primeira Ordem	$\ln (1-F)=-k_1t$
Higuchi	$F=k_Ht^{1/2}$
Korsmeyer-Peppas	$F=k_{K-P}t^n$

Tabela 19. Coeficientes de correlação dos modelos matemáticos aplicados das amostras.

	Modelo matemático			
	Zero ordem	Primeira ordem	Higuchi	Korsmeyer-Peppas
PHB₁₀₀	0,9245	0,9661	0,9902	0,9211 (0,4173)
PHB:AC_{50:50}	0,9488	0,9156	0,9786	0,9823 (0,6208)
PHBV₁₀₀	0,9204	0,9585	0,9967	0,9918 (0,5797)
PHBV:AC_{50:50}	0,9438	0,9766	0,9786	0,9822 (0,6208)
PHBr₁₀₀	0,8529	0,9225	0,9716	0,9712 (0,6235)
PHBr:AC_{50:50}	0,8462	0,9123	0,9679	0,9882 (0,6415)
AC₁₀₀	0,9808	0,9780	0,9650	0,9833 (0,5294)

Nas equações: F é a fração de fármaco liberado no tempo t . k_0 , k_f , k_h e k_{K-P} são constantes de velocidade de liberação obtidas a partir dos modelos matemáticos e n é o expoente de liberação do modelo matemático de Korsmeyer-Peppas (COSTA; LOBO, 2001)

Os altos coeficientes de correlação obtidos após a linearização dos perfis de liberação de acordo com os modelos de Higuchi e Korsmeyer-Peppas (liberação até 60% do fármaco) indicam que o fármaco é liberado principalmente por um processo de difusão (Tabela 19). Ainda pode-se observar, a partir do coeficiente “n” da equação de Korsmeyer-Peppas, que o hidrogel contendo as microesferas PHB₁₀₀ apresenta uma liberação governada por um mecanismo de difusão fickiniana ($n = 0,45$), enquanto para as demais formulações, a liberação é governada por mecanismo de transporte anômalo ($0,45 < n > 0,89$) (COSTA; LOBO, 2001). Deve-se salientar que o poloxamer forma um hidrogel no meio de liberação que pode atuar como barreira para a difusão do fármaco. Portanto, este aspecto pode ter contribuído para o mecanismo responsável pela liberação do NPX a partir das formulações testadas. A ausência de degradação ou erosão das micropartículas após ensaio de liberação corrobora com os resultados obtidos na modelização matemática dos perfis de liberação, como pode ser observado nas micrografias obtidas por MEV (Figura 33).

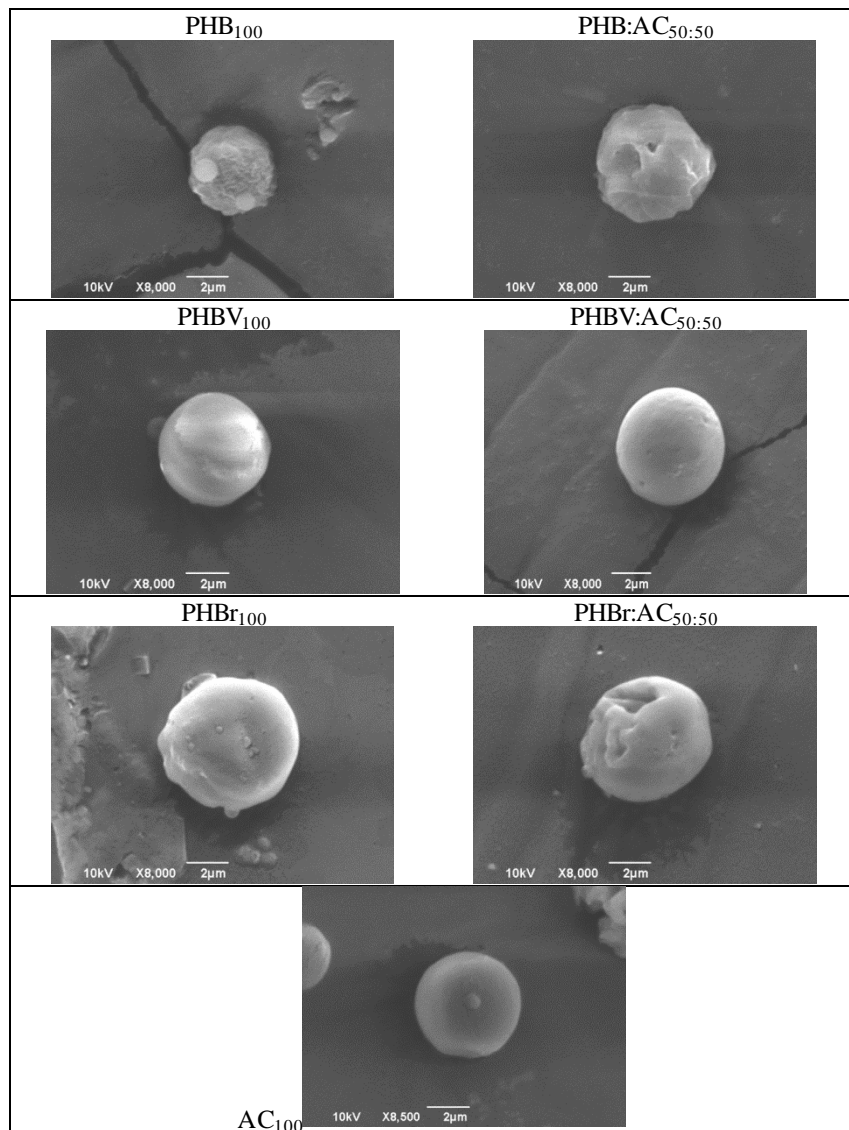


Figura 33. Micrografias obtidas por MEV das microsferas após o ensaio de liberação *in vitro*.

5. CONCLUSÕES

- A preparação das microesferas de PHA e acetato de celulose contendo naproxeno pela técnica de emulsão e evaporação do solvente mostrou ser viável e de simples execução.
- Pode-se concluir que a técnica de redução empregada promoveu a redução da massa molar do polímero de maneira eficiente obtendo uma ampla distribuição de massas molares.
- O método analítico de absorção no UV para a determinação do teor de naproxeno nas microesferas provou ser sensível, linear, preciso, exato e robusto.
- Altos valores de eficiência de encapsulação e teor de naproxeno foram obtidos para as microesferas com concentração maior de PHA. Pode-se sugerir que o baixo valor obtido na formulação de acetato de celulose é resultado de uma solubilização parcial do naproxeno no meio.
- As microesferas exibiram formato esférico, entretanto, as formulações de P(3HB) e P(3HB)r apresentaram superfície rugosa.
- Os valores de tamanho de partícula das microesferas variam entre 6,145 e 16,266 μm , dependendo da formulação testada. A redução da massa molar do P(3HB) e a adição do acetato de celulose provocaram a redução do diâmetro médio das partículas. Este efeito pode estar relacionado a uma menor viscosidade nas fases orgânicas na preparação das microesferas.
- A presença de interações entre os polímeros e o fármaco foram visualizados por calorimetria exploratória diferencial; observou-se uma queda na temperatura de fusão nas formulações contendo acetato de celulose na sua composição em comparação ao polímero puro, indicando a miscibilidade do sistema.
- Os estudos de difração de raios-x sugerem que apenas uma pequena fração da porção cristalina das amostras é de naproxeno na sua forma cristalina original, indicando a

presença do naproxeno nas microesferas no seu estado molecular.

- Os géis preparados com poloxamer apresentaram um comportamento gelificante termorreversível. Os dados do estudo reológico indicam que os géis apresentam caráter não newtoniano e pseudoplástico.
- A liberação do naproxeno a partir das microesferas variou de 56,30 a 86,27% após 36 horas de experimento. Comparando as formulações dos hidrogéis contendo as microesferas, pode-se observar que aquela utilizando o P(3HB) apresentou maior retardo na liberação do fármaco. A análise de variância mostrou que a liberação do naproxeno foi significativamente afetada pelo tipo de PHA e pela proporção PHA/acetato de celulose na blenda.
- Os modelos matemáticos aplicados permitiram avaliar o mecanismo de liberação do fármaco da microesfera no fluido salivar simulado. Os resultados indicaram que o fármaco é liberado principalmente por um processo de difusão. Entretanto, a presença do hidrogel pode ter contribuído para a obtenção de um mecanismo de transporte anômalo na maioria das formulações testadas.
- A encapsulação do naproxeno em micropartículas permitiu o controle da liberação do fármaco. Apesar de não haver uma alteração significativa na liberação com a redução da massa molar ou com a utilização do copolímero, a formação da blenda permitiu modular a liberação e as características físico-químicas das microesferas. A incorporação das micropartículas em um hidrogel termossensível mostrou ser uma estratégia promissora para a obtenção de uma forma farmacêutica de administração periodontal do naproxeno.

6. BIBLIOGRAFIA

ABE, H.; DOI, Y. Structural effects on enzymatic degradability for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 185 – 192, 1999.

AKINCIBAY, H.; SENEL, S.; AY, Z. Y. Application of chitosan gel in the treatment of chronic periodontitis. **Journal of Biomedical Materials Research Part B – Applied Biomaterials**, v. 80B, p. 290 – 296, 2006.

ÁLVAREZ, A. L.; ESPINAR, F. O.; MÉNDEZ, J. B. The application of microencapsulation techniques in the treatment of endodontic and periodontal diseases. **Pharmaceutics**, v. 3, p. 538 – 571, 2001.

AMANO, A.; MURAKAMI, J.; AKIYAMA, S.; MORISAKI, I. Etiologic factors of early-onset periodontal disease in Down syndrome. **Japanese Dental Science Review**, v. 44, p. 118 – 127, 2008.

AMIDON, G. L.; LENNEMAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v. 12, p. 413 – 420, 1995.

ANDERSON, J. M.; SHIVE, M. S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. **Advance drug delivery reviews**, v. 28, p. 5 – 24, 1997.

AULTON, M. E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2ª Edição, São Paulo: **Editora Artmed**, 2005.

BARAN, E. T.; ÖZER, N.; HASIRCI, V. *In vivo* half life of nanoencapsulated L-asparaginase. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 13, p. 1113 – 1121, 2002.

BERGAMASCHI, J. M.; PILAU, E. J.; GOZZO, F. C.; FELISBERTI, M. I. Synthesis of Polyurethane from Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(p-dioxane): Molar Mass reduction via sodium borohydrate. **Macromolecular Symposia**, v. 299, p. 10 – 19, 2011.

BIMSTEIN, E. et al. Saúde e doenças periodontais e gengivais. Tradução Cimara F. Fortes. 1ª Edição, São Paulo: **Editora Santos**, 2003.

BOZDAG, S. et al. *In vitro* evaluation and intra-articular administration of biodegradable microspheres containing naproxen sodium. **Journal Microencapsulation**, v. 18, n. 4, p. 443 – 456, 2001.

BRUSCHI, M. L. et al. Sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal. **Revista Brasileira de Ciência Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 29-47, 2006.

CARMIGNAN, F.; BIDONE, J.; LEMOS-SENNA, E. Emprego dos polihidroxialcanoatos em sistema de liberação controlada de fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27(1), p. 131 – 143, 2008.

CERQUEIRA, D. A.; FILHO, G. R.; CARVALHO, R. A.; VALENTE, A. J. M. Caracterização de acetato de celulose obtido a partir do bagaço da cana-de-açúcar por ¹H-RMN . **Polímeros**, v. 20, n. 2, p. 85 – 91, 2010.

CETIN, E. O. et al. In vitro studies of a degradable device for controlled – release of meloxicam. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, p. 773 – 777, 2005.

CRUZ, A. C. et al. Utilização do acetato de celulose produzido a partir da celulose extraída do caroço de manga como matriz para produção de sistemas microparticulados. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 385 – 389, 2011.

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

CHIAPPETTA, D. A. et al. Comprimidos Bioadhesivos Formulados con Excipientes Hidrofílicos para Uso Bucofaríngeo. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 25, p. 360 – 365, 2006.

CORTESI, R. et al. Microparticles as delivery systems for local delivery to the oral cavity. **Informa Healthcare**, v. 126, p. 453 – 461, 2002.

DIONNE, R. A.; BERTHOLD, C. W. Therapeutic uses of non-steroidal anti-inflammatory drugs in dentistry. **Critical Reviews in Oral Biology e Medicine**, v. 12, n. 4, p. 315 – 330, 2001.

DINIZ, S. C.; TACIRO, M. K.; GOMEZ, J. G. C.; PRADELLA, J. G. C. High-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* IPT 046 and médium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from sugarcane carbohydrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 119, p. 51 – 69, 2004.

DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F.; CHAUMEIL, J. C. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p. 2709 – 2728, 2006.

EDGAR, K. J. et al. Advances in cellulose ester performance and application. **Progress in Polymer Science**, v. 26, p. 1605 – 1688, 2001.

EDLUND, A. U.; ALBERTSSON, C. Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery. **Advances in Polymer Science**, v. 157, p. 67 – 112, 2001.

EL-KAMEL, A. H.; ASHRI, L. Y.; ALSARRA, I. A. Micromatrical metronidazole benzoate film as a local mucoadhesive delivery system of periodontal diseases. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, p. E1 – E11, 2007.

EL-KAMEL, A. H.; AL-SHORA, D. H.; EL-SAYED, Y. M. Formulation and pharmacodynamics evaluation of captopril sustained release microparticles. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n. 4, p. 389 – 404, 2006.

ESPOSITO, E. et al. Comparative analysis of tetracycline-containing dental gels: poloxamer- and monoglyceride-based formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 142, p. 9 – 23, 1996.

FREIER, T. et al. In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate). **Biomaterials**, n. 23, p. 2649 – 2657, 2002.

FRIEDMAN, M.; STEINBERG, D. Sustained release delivery systems for treatment of dental diseases. **Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 4, p. 313 – 317, 1990.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. Farmacologia clinica. 2^a Edição, Rio de Janeiro. **Editora Guanabara Koogan**, p. 187 – 193, 1998.

GALEGO, N. et al. Characterization and application of poly(β -hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. **Polymer testing**, v. 19, p. 485 – 492, 2000.

HOLMSTRUP, P.; GLICK, M. Treatment of periodontal disease in the immunodeficient patient. **Periodontology** **2000**, v. 28, p. 190 – 205, 2002.

International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH-Q2 (R1), November (2005), Geneva, Switzerland.

JAIN, N. et al. Recent approaches for the treatment of periodontitis. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 21/22, p. 932 – 943, 2008.

KHAN, S. Effect of smoking on periodontal health. **Disease-a-Month**, v. 57, n. 4, p. 214 – 217, 2011.

KONG, L. X. et al. Nanotechnology and its role in the management of periodontal diseases. **Periodontology** **2000**, v. 40, p. 184 – 196, 2006.

JAVADZADEH, Y. et al. Preparation and physicochemical characterization of naproxen-PLGA nanoparticles. **Colloids and Surfaces: Biointerfaces**, v. 81, p. 498 – 502, 2010.

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

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation : State of the art for process engineering approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p. 26 – 39, 2008.

- LIMA NETO, S. A.; PETROVICK, P. R. A celulose na farmácia. **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 1, p. 19 – 23, 1997.
- MARK, J. E. Polymer Data Handbook. Cincinnati, EUA. **Editora Oxford University**, p. 586 – 597, 1999.
- MARTIN, M. A.; MIGHENS, F. C.; RIEUMONT, J.; SANCHEZ, R. Tailoring of the external and internal morphology of poly-3-hydroxy butyrate microparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 17, p. 111 – 116, 2000.
- MONTORO, S. R. et al. Estudo cinético de redução de massa molar do Poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBHV). **Polímeros: Ciência e tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 19 – 24, 2010.
- MUNDARGI, R. C. et al. Development and evaluation of novel biodegradable microspheres based on poly(D,L-lactide-co-glycolide) and poly(ϵ -caprolactone) for controlled delivery of doxycycline in the treatment of human periodontal pocket: In vitro and in vivo studies. **Journal of Controlled Release**, v. 119, p. 59 – 68, 2007.
- O'DONNELL, P. B.; MCGINITY, J. W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. **Advanced Drug Delivery**, v. 28, p. 25 – 42, 1997.
- PIÑÓN-SEGUNDO, E. et al. Preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, p. 217 – 232, 2005.
- PIRNAU, A.; BOGDAN, M. Investigation of the interaction between naproxen and human serum albumin. **Romanian Journal Biophysics**, v. 18, n. 1, p. 49 – 55, 2008.
- POUTON, C. W.; AKHTAR, S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potencial in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18, p. 133 – 162, 1996.
- QUENTAL, A. C. et al. Blendas de PHB e seus copolímeros: miscibilidade e compatibilidade. **Química Nova**, v. 33, p. 438 – 446, 2010.

RAINSFORD, K. D. Profile and mechanisms of gastrointestinal and other side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **The American Journal of Medicine**, v. 107 (6A), p. 27 – 35, 1999.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; DALE, M. M. Farmacologia. 4^a Edição, Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan**, 2001.

REDDY, C. S. K. et al. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 137 – 146, 2003.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, p. 8 – 21, 2006.

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

SAHOO, S. K. et al. Evaluation of Controlled Release Theophylline Microspheres Prepared with Cellulose Acetate Using Solvent Evaporation Method. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, p. 195 – 201, 2011.

SCANDOLA, M. et al. Polymer blends of natural poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and a synthetic atactic poly(3-hydroxybutyrate). Characterization and biodegradation studies. **Macromolecules**, v. 30, p. 2568 – 2574, 1997.

SCHERLUND, M.; MALMSTEN, M.; HOLMQVIST, P.; BRODIN, A. Thermosetting microemulsions and mixed micellar solutions as drug delivery systems for periodontal anesthesia. **Journal of Pharmaceutics**, v. 194, p. 103 – 116, 2000.

SILVA, J. A. F. et al. The influence of type I diabetes mellitus in periodontal disease induced changes of the gingival epithelium and connective tissue. **Tissue and Cell** **40**, p. 283 – 292, 2008.

SEYMOUR, R. A.; HEASMAN, P. A. Pharmacological control of periodontal disease. II. Antimicrobial agents. **Journal of Dentistry**, v. 23, n. 1, p. 5 – 14, 1995.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726 – 737, 2003.

SONG, J. S.; SOHN, Y. T. Crystal forms of naproxen. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 1, p. 87 – 90, 2011.

THOMPSON, C. J. et al. Evaluation of ibuprofen-loaded microspheres prepared from novel copolyesters. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 53 – 61, 2007.

YOSHIE, N. et al. Effect of low molecular weight additives on enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate). **Polymer**, v. 41, p. 3227 – 3234, 2000.

YOU, J. W.; CHIU, H. J.; DON, T. M. Spherulitic morphology and crystallization kinetics of melt-miscible blends of poly(3-hydroxybutyrate) with low molecular weight poly(ethyleneoxide). **Polymer**, v. 44, p. 4355 – 4362, 2003.

VANDERKERCKHOVE, B. N. A.; QUIRYNEN, M.; STEENBERGHE, D. The use of locally-delivered minocycline in the treatment of chronic periodontitis. A review of the literature. **Journal Clinical Periodontal**, v. 25, p. 964 – 968, 1998.

VERONESE, F. M. et al. Polyphosphazene membranes and microspheres in periodontal diseases and implant surgery. **Biomaterials**, v. 20, p. 91 – 98, 1999.

XUAN, J. J. et al. Rheological characterization and in vivo evaluation of thermosensitive poloxamer-based hydrogel for intramuscular injection of piroxicam. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, p. 317 – 323, 2010.

WANG, T. et al. Crystallization behavior, mechanical properties, and environmental biodegradability of poly(hydroxybutyrate)/cellulose acetate butyrate blends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 89, i. 8, p. 2116 – 2122, 2003.

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